
Aus der experimentellen Forschung der Klinik und Poliklinik für Unfall-,
Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie

der Universität Würzburg

Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Knorpelintegration unter Hemmung der Kollagensynthese im Disc-Ring-Modell: eine In-vitro-Studie

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Felix Kiepe aus Hannover

Würzburg, September 2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2021

Der Promovend ist Arzt

Widmung

In Liebe

Lena Kiepe, geb. 31.12.1987

Anton Kiepe, geb. 27.05.2019

Ursula Schlömer-Kiepe, geb. 07.02.1961

Hermann Kiepe, geb. 22.08.1960

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	1
2 Abbildungsverzeichnis	
3 Einleitung	1
3.1 Knorpelarten	2
3.2 Anatomie und Physiologie des hyalinen Gelenkknorpels	3
3.3 Chondrogenese	5
3.3.1 Kollagensynthese	8
3.4 Defekte des Gelenkknorpels	9
3.5 Therapie von Gelenkknorpeldefekten	10
3.5.1 Konservative Therapie	11
3.5.2 Operative Therapie	11
3.6 Unzureichende Integration des Gelenkknorpels	15
3.7 Zielsetzung	17
4 Material und Methoden	19
4.1 Materialien	19
4.2 Probenpräparation	21
4.3 Kultivierung	26
4.4 Biomechanisches Messverfahren	27
4.4.1 Materialprüfmaschine	27

4.4.2	Aufbau und Durchführung	27
4.4.3	Messkurve & Berechnung der Adhäsionskraft	31
4.5	Überprüfung der Vitalität	33
4.6	Histologie	34
4.7	Auswertung und Statistik	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Vorversuche	37
5.1.1	Press-fit Modell	37
5.1.2	Fibrinkleber	41
5.2	Kontrolle der Vitalität	42
5.3	Biomechanische Untersuchung	43
5.3.1	Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration 43 auf die Integration	
5.3.2	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Integration	49
5.3	Histologische Untersuchung	50
5.3.1	Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Glykosaminoglykansynthese	51
5.3.2	Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Kollagensynthese	53
5.3.3	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Glykosaminoglykansynthese	57
5.3.4	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Kollagensynthese	57

6 Diskussion	60
6.1 Vorversuche	60
6.2 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Integration von nativem Knorpelgewebe	62
6.3 Einfluss der Kombination von Ascorbinsäure und EDHB auf die Integration von nativem Knorpelgewebe in vitro	65
6.4 Einfluss der Kultivierungsdauer unter Ascorbinsäure und EDHB auf die Integration	67
7 Zusammenfassung	69
8 Literaturverzeichnis	71
Danksagung	
Lebenslauf	

2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** *Schneidevorrichtung; einliegender Knorpelzylinder und eingebrachte Rasierklinge als Anlagefläche*
- Abbildung 2:** *Schneidevorrichtung; Schematische Zeichnung, Seitenansicht mit Knorpelzylinder*
- Abbildung 3:** *„Push-out-Konstrukt“ nach dem Schneidevorgang mit Höhe von 1 mm mit Methylenblau markiert; Markierter Knorpelring und Kernstück nach dem Stanzvorgang; Zusammengesetztes Konstrukt mit ausgerichteter Markierung*
- Abbildung 4:** *Stanzvorrichtung; Stanzmodul mit montierter Haltevorrichtung, getrennte Teile der Haltevorrichtung mit eingebrachter Probe*
- Abbildung 5:** *Materialprüfmaschine mit Haltevorrichtung der Probe und Ausrichteeinheit nach Abschluss der Kalibrierung*
- Abbildung 6:** *Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus*
- Abbildung 7:** *Schematische Darstellung des Messvorgangs*
- Abbildung 8:** *Aufbau zur Kalibrierung im Rahmen der Vorbereitungen der Messvorgänge*
- Abbildung 9:** *Messkurven einer Versuchsgruppe in der Auswertungssoftware TestXpertII®*
- Abbildung 10:** *Schematische Messkurve in der Auswertungssoftware TestXpertII® mit Beschriftung der Kurvengrafik*
- Abbildung 11:** *Foto der U-förmigen Fixierungsvorrichtung aus Polyethylen mit vorübergehend fixiertem „press-fit“-Konstrukt und Foto der manuellen Fixierung durch 2 Akkupunktornadeln*

- Abbildung 12:** *Schematische Zeichnung des „press-fit“-Modells und Foto der manuellen Fixierung durch 2 Akkupunkturnadeln*
- Abbildung 13:** *Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT Assay*
- Abbildung 14:** *Grafische Darstellungen der gemessenen Adhäsionskraft der Bezugsgruppen „D0 Fibrin“ und „D0 Nativ“ in kPa*
- Abbildung 15:** *Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 7*
- Abbildung 16:** *Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 14*
- Abbildung 17:** *Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 21*
- Abbildung 18:** *Zusammenfassende Darstellung der biomechanischen Untersuchungen der Adhäsionskraft (kPa) aller Gruppen an Tag 0, 7, 14 und 21*
- Abbildung 19:** *Grafische Darstellungen der gemessenen Adhäsionskraft (kPa) innerhalb der getesteten Gruppen an Tag 0, 7, 14 und 21*
- Abbildung 20:** *Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 7*
- Abbildung 21:** *Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 14*
- Abbildung 22:** *Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 21*
- Abbildung 23:** *Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 7*
- Abbildung 24:** *Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 14*

- Abbildung 25:** *Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 21*
- Abbildung 26:** *Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 7, 14 und 21*
- Abbildung 27:** *Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 7, 14 und 21*
- Abbildung 28:** *Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ I-Färbung an Tag 7, 14 und 21*

3 Einleitung

Chronisch-degenerative und posttraumatische Gelenkknorpeldefekte führen im Krankheitsverlauf oft zu Arthrose und somit zu Schmerzen und Funktionseinschränkungen der betroffenen Gelenke. Gelenkknorpel verfügt hierbei nur über eine eingeschränkte Fähigkeit zur Heilung entstandener Substanzdefekte (Boushell et al. 2017; CDC 2010). Gelenkknorpeldefekte führen daher häufig zu einem vorzeitigen Gelenkverschleiß und der Notwendigkeit operativer Therapie. Derzeitige operative Behandlungsmethoden sind heutzutage entweder ausgerichtet auf die Erhaltung der Gelenkoberfläche (Lavage, Shaving, Débridement), auf die Rekonstruktion der Gelenkoberfläche mittels Initiierung einer Spontanheilung durch Regeneratknorpel (Mikrofrakturierung) oder auf die Transplantation von osteochondralem Gewebe (OATS), beziehungsweise autologer Chondrozyten-Transplantate (ACI, MACI). Derzeitige operative Behandlungsmethoden versagen jedoch immer noch oft bei der Integration von eingebrachtem Knorpelgewebe in Gelenkknorpeldefekte (Boushell et al. 2017).

Bei Versagen dieser Methoden ist letztendlich die Implantation einer Endoprothese als Gelenkersatz indiziert (Buckwalter 2002; Niemeyer et al. 2008). Die Indikation einer gelenkersetzenden Operation sollte, vor allem bei jungen Patienten, aufgrund der Gefahr von Revisionsoperationen im weiteren Verlauf, nicht zu frühzeitig gestellt werden. Die Lebensdauer einer solchen Prothese liegt aktuell bei 15-20 Jahren und ein Prothesenwechsel weist im Vergleich zur Erst-Operation eine erhöhte Komplikationsrate auf und kann nur in begrenztem Ausmaß wiederholt werden (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2008; Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie 2018). Die Wiederherstellung der Gelenkoberfläche via Transfer von nativem oder mittels „Tissue Engineering“ angezüchtetem Knorpel in Knorpeldefekte ist aufgrund der limitierten Fähigkeit der Integration des eingebrachten Knorpels in das native Knorpelgewebe des Defektes derzeit noch immer Gegenstand der Forschung.

Kollagen ist mit bis zu 30% Anteil an der Gesamtmasse ein zellulärer Hauptbestandteil des Gelenkknorpelgewebes und zusammen mit dem Glykosaminoglykangehalt wichtig für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels (Pearle et al. 2005).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zum besseren Verständnis der Integrationsprozesse von nativem Knorpel in einen nativen Knorpeldefekt die Abhängigkeit der mechanischen Integration von der Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese untersucht. Hierzu erfolgten mechanische und histologische Untersuchungen des Einflusses von Ascorbinsäure, als wichtiger Cofaktor der Kollagensynthese, und des Kollagensyntheseinhibitors Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) auf die Integrationsstärke, die Produktion von Kollagen und extrazellulärer Matrix.

3.1 Knorpelarten

Unterschieden werden die drei Knorpelarten elastischer Knorpel, Faserknorpel und hyaliner Knorpel mit jeweils charakteristischer anatomischer Zusammensetzung. Die Grundsubstanz aller Knorpelarten besteht histologisch hauptsächlich aus Knorpelzellen (Chondrozyten), Proteoglykanen und Kollagenfasern. Die Faserarten unterscheiden sich jedoch je nach Knorpelart (Pearle et al. 2005).

Elastischer Knorpel:

Elastischer Knorpel besteht aus elastischen Fasern aus Elastin, Proteoglykanen, kollagenen Fasern vom Typ 2 und Chondrozyten. Er ähnelt dem Aufbau des hyalinen Knorpels, jedoch beinhaltet er weniger Chondrozyten. Er besitzt eine hohe Biegsamkeit und ist unter anderem im äußeren Ohr, der Tuba auditiva und der Epiglottis zu finden (Pearle et al. 2005).

Faserknorpel:

Faserknorpel findet sich in den Ansätzen von Sehnen und Bändern sowie in den Disci und Menisci und besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen und dichten Faserbündeln aus Typ 1 Kollagen (Pearle et al. 2005).

Hyaliner Knorpel:

Gelenkknorpel besteht hauptsächlich aus hyalinem Knorpel. Er besitzt einen charakteristischen histologischen Aufbau aus Typ 2 Kollagen, Proteoglykanen und Chondrozyten (Pearle et al. 2005).

3.2 Anatomie und Physiologie des hyalinen Gelenkknorpels

Knorpel ist ein wichtiger Bestandteil des Stütz- und Bewegungsapparates und überzieht die Enden der humanen Gelenkknochen in einem Gelenk. Dank seiner anatomischen Eigenschaften sichert Knorpel ein nahezu reibungsfreies Gleiten zwischen zwei kommunizierenden Gelenkflächen im Gelenk (Dell'accio und Vincent 2010; Rudert und Wirth 1998). Knorpel ist hierbei in der Lage hohe mechanische Belastungen auszuhalten ohne Zeichen von Schäden zu zeigen (Aspberg 2012; Dell'accio und Vincent 2010; Erlebacher et al. 1995). Grund dieser hohen Widerstandsfähigkeit ist das Zusammenspiel und die Zusammensetzung seiner Komponenten (Buckwalter 1998; Pearle et al. 2005). Ein Großteil des Gesamtgewichtes geht auf Wasser (65-80%) zurück, der zweite Hauptbestandteil ist die extrazelluläre Matrix. Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen (5-10%) und Kollagen (15-30%) (Buckwalter und Mankin 1997; Mow et al. 1992; Schulz und Bader 2007). Die große Wasserbindungskapazität der Proteoglykane in der extrazellulären Matrix gewährleistet eine hohe Elastizität und Stabilität zugleich und ermöglicht dem Knorpelgewebe eine Verformung durch Verschiebung der flüssigen Bestandteile bei relevanter Krafteinwirkung. Somit können punktuelle Belastungen aufgenommen, auf die gesamte Knorpelfläche verteilt und punktuell verringert auf den darunter liegenden Knochen übertragen werden um die Wahrscheinlichkeit potenzieller lokaler Schäden zu verringern (Messner und Gillquist 1996; Pearle et al. 2005).

Die Oberfläche humaner Gelenke ist mit einer zwei bis vier Millimeter dicken Schicht hyalinem Knorpels überzogen (Sophia Fox et al. 2009). Da Knorpel weder über eine vaskuläre noch über eine lymphatische oder nervale Versorgung verfügt, erfolgt die Ernährung via Diffusion durch die Synovialflüssigkeit (Sophia Fox et al. 2009; Pearle et al. 2005). Zusätzlich wird der Knorpel ebenfalls über den subchondralen Knochen mitversorgt (Wang et al. 2013). Die Synovialflüssigkeit enthält unter anderem neu synthetisierte Moleküle und Wachstumsfaktoren (Hunziker et al. 2001). Aufgrund der fehlenden Vaskularisation weisen Chondrozyten einen vorwiegend anaeroben Stoffwechsel auf (Pearle et al. 2005). Knorpelzellen machen ca. 2% des Gesamtvolumens von Knorpel aus und ihre Morphologie, Anzahl und Aktivität variiert abhängig von der Zone und damit von der umgebenden Matrix (Sophia Fox et al. 2009). Chondrozyten haben eine limitierte Regenerationsfähigkeit. Dies ist ein Faktor für die schlechte Heilungstendenz von Knorpelschäden (Pearle et al. 2005).

Im vertikalen Aufbau lässt sich hyaliner Knorpel in folgende vier Zonen unterteilen: „Superficial zone“, „Transitional zone“, „Deep zone“ und „Calcified cartilage layer“ (Pearle et

al. 2005; Temenoff und Mikos 2000). Jede dieser Zonen unterscheidet sich in Dicke und Anordnung des Kollagens sowie der Zellzahl, Zellaktivität und damit auch Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Die verschiedenen Schichten unterscheiden sich daher zudem in ihren biochemischen und biomechanischen Eigenschaften (Jähne et al. 2013; Temenoff und Mikos 2000). Die Organisation innerhalb der verschiedenen vertikalen Schichten ist verantwortlich für die Widerstandsfähigkeit des Knorpels, welcher neben Scherkräften an der Oberfläche auch Druck-/ Kompressionkräften in den tieferen Zonen standhält (Buckwalter und Mankin 1998).

Innerhalb jeder Zone lässt sich wiederum eine Einteilung aufgrund der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und ihres Abstandes zur Knorpelzelle vornehmen. Unterteilt wird hier, um den Chondrozyten herum, in eine „pericellular region“, eine „territorial region“ und eine „interterritorial region“ zwischen den jeweiligen Knorpelzellen (Pearle et al. 2005; Temenoff und Mikos 2000).

„Superficial zone“:

Die oberflächliche Zone ist die dünnste Schicht und macht circa 10-20% der Gesamtdicke aus. Sie hat hauptsächlich eine Schutzfunktion. Bedeckt ist sie von der „Lamina splendens“, einer azellulären Hülle, welche vorwiegend aus Kollagenfibrillen besteht. Diese hat einen Durchmesser im Mikrometerbereich und aufgrund ihrer speziellen Zusammensetzung ist sie für die Verminderung der Reibung zwischen den Gelenkflächen verantwortlich (Ulrich-Vinther et al. 2003). Die Kollagenfibrillen in dieser Zone bestehen vorwiegend aus Kollagen-Typ 2 und 9. Sie sind dicht gepackt und parallel angeordnet (Pearle et al. 2005). Die ECM in dieser Schicht ist reich an Kollagen, Fibronectin und Wasser und besitzt im Vergleich zu den weiteren Schichten einen geringeren Proteoglykangehalt. Anordnung und Dicke der Kollagenfibrillen sowie die Zusammensetzung der ECM unterscheiden sich gegenüber den tieferen Schichten und sorgen für eine hohe mechanische Belastbarkeit in Bezug auf die Scherkräfte durch die artikulierenden Gelenkflächen (Temenoff und Mikos 2000). Die Kollagenfibrillen sind mit 30 bis 32 nm Durchmesser deutlich dünner als in den mittleren und tiefen Schichten. Zudem steht die superfizielle Zone in direktem Kontakt zur Synovialflüssigkeit (Johnson und Pedowitz 2006; Pearle et al. 2005).

„Transitional zone“:

Sie schließt sich der „Superficial zone“ direkt an, nimmt damit circa 40-60% der Gesamtdicke des Knorpels ein und im Gegensatz zu den abgeflachten Chondrozyten der „Superficial zone“ zeigen sich hier rundliche Knorpelzellen (Sophia Fox et al. 2009; Pearle et al. 2005). Es finden sich dickere Kollagenfibrillen von 40-100 nm im Durchmesser ohne spezielle Anordnung (Johnson und Pedowitz 2006). Der Proteoglykangehalt ist höher im Vergleich zur „Superficial zone“, der Kollagen- und Wassergehalt niedriger. Das führt zu einem verstärkten Widerstand gegen vertikale Krafteinwirkungen (Johnson und Pedowitz 2006; Temenoff und Mikos 2000).

„Deep zone“:

Die „Deep zone“ weist von allen drei Schichten den höchsten Widerstand gegen vertikal auf den Knorpel wirkende Kräfte auf. Die Kollagenfibrillen dieser Schicht haben im Vergleich zu den anderen Schichten den größten Durchmesser und machen ca. 30% der gesamten Knorpeldicke aus (Johnson und Pedowitz 2006; Pearle et al. 2005). Die Kollagenfibrillen sind radiär umgeben von Chondrozyten und senkrecht zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die Chondrozyten dieser Schicht haben eine zehnfach höhere Synthese-Produktivität als die der superfiziellen Schicht (Temenoff und Mikos 2000). In Gewebekulturen zeigten sich die Chondrozyten dieser Schicht zusätzlich verantwortlich für die Bildung/ Proliferation von „Neocartilage“ (Bos et al. 2008).

„Calcified cartilage layer“:

Die „Tidemark“ trennt den mineralisierten Knorpel des „Calcified cartilage layer“ von den übrigen Schichten (Pearle et al. 2005; Temenoff und Mikos 2000). Hauptaufgabe ist die Stabilisierung durch die Verankerung des Knorpels am subchondralen Knochen. In dieser Schicht zeigen sich vereinzelte hypotrophe Chondrozyten, welche teils komplett mit kalzifizierter ECM umgeben sind. Dies deutet auf eine geringe metabolische Aktivität hin (Eyre et al. 2006; Sophia Fox et al. 2009; Temenoff und Mikos 2000).

3.3 Chondrogenese

Das Skelettsystem entwickelt sich während der Embryogenese überwiegend aus dem Mesoderm. Die Knochen der Extremitäten werden initial knorpelig angelegt und im Rahmen der enchondralen Ossifikation durch Knochen ersetzt. Der Gelenkknorpel verbleibt als mesenchymaler Überrest des hyalinen Knorpels an den distalen Knochenenden (Erlebacher et

al. 1995). Im Prozess der Chondrogenese entwickelt sich das Knorpelgewebe aus sich verdichtenden mesenchymalen Stammzellen und sich zu Chondrozyten differenzierenden Chondroprogenitorzellen (Lefebvre und Smits 2005; Lolli et al. 2017; Thorogood und Hinchliffe 1975). Der Prozess der Chondrogenese wird durch Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Proteasen gesteuert und modifiziert sowie durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen reguliert (DeLise et al. 2000; Lolli et al. 2017). Die undifferenzierten, mesenchymalen Zellen produzieren extrazelluläre Matrix, welche reich an Kollagen Typ 1, Hyaluron, Tenascin und Fibronectin ist. Unter Einfluss von Wachstumsfaktoren differenzieren sich die mesenchymalen Chondroprogenitorzellen in proliferierende Chondrozyten. Diese trennen sich zunehmend räumlich durch die gebildete extrazelluläre Matrix (ECM). Während des Differenzierungsprozesses kommt es zu einer Veränderung der Zusammensetzung der ECM. Die Chondrozyten beginnen das gewebespezifische Kollagen Typ 2 zu produzieren sowie Kollagen Typ 9 und 11, Aggrecan, Gla- und Link-Proteine (DeLise et al. 2000; Lefebvre und Smits 2005; Thorogood und Hinchliffe 1975). Die Produktion von Kollagen Typ 1 wird dabei zunehmend reduziert. Umgeben von der ECM nehmen die Chondrozyten im Verlauf ihre charakteristische runde Form an. Im Laufe der weiteren Differenzierung nimmt die Produktion von Typ 2 Kollagen zunehmend ab, während vermehrt Kollagen Typ 10 sezerniert wird. Nach der beginnenden Vaskularisierung des Perichondriums werden Osteoblasten über das Blut in das angelegte Knorpelgewebe transportiert und ersetzen den Knorpel durch mineralisierten Knochen. Dieser Prozess aus Chondrogenese, Hypertrophie, Mineralisierung und Formation des knöchernen Gewebes wird „enchondrale Ossifikation“ genannt (DeLise et al. 2000). Der Differenzierungsprozess der Chondrozyten stoppt mit dem Abschluss des skelettalen Wachstums. Die metabolische Aktivität und die Matrixsynthese der Chondrozyten nehmen im Verlauf der Differenzierungsphase ab. Nach Abschluss des skelettalen Wachstums dient die kontinuierliche Aktivität der Chondrozyten lediglich dem Erhalt des Gewebes. Mit Ausnahme der Chondrozyten der „Tidemark“ hypertrophieren die Knorpelzellen nicht (Mankin 1963).

Durch die Produktion von Matrixbestandteilen rücken die Chondroblasten auseinander und werden im Verlauf von Interzellulärschubstanz umgeben. Ab diesem Stadium spricht man von Chondrozyten. Im Laufe ihrer Differenzierung verlieren Chondrozyten die Fähigkeit sich stetig zu teilen (Sophia Fox et al. 2009; Watanabe et al. 1998). Alter, hydrostatische Kräfte, Dauer und Intensität der mechanischen Belastung sowie weitere Faktoren, wie zum Beispiel die

Wirkung von Wachstumsfaktoren, beeinflussen die Aktivität der Zellen (Buckwalter und Mankin 1997; Pearle et al. 2005).

Die Funktionseinheiten des Knorpelgewebes werden als Chondrone bezeichnet und bestehen aus mehreren Elementen. Die Knorpelzellen (Chondrozyten) liegen in einer Knorpelhöhle. Diese wird von einer Knorpelkapsel (perizelluläre Matrix) umgeben, welche wiederum von einem Knorpelhof (territorielle Matrix) umschlossen ist (SundarRaj et al. 1995; Vincent et al. 2007).

Die perizelluläre Matrix umgibt die Chondrozyten direkt und besteht aus verschiedenen Komponenten, die von den Knorpelzellen produziert werden, unter anderem Proteoglykane, Glykoproteine, Kollagen Typ 6 und Perlecan (SundarRaj et al. 1995; Vincent et al. 2007). Die perizelluläre Matrix ist sowohl an biochemischen als auch biomechanischen Prozessen, der Signalübertragung und der damit einhergehenden Stimulierung der Chondrozyten beteiligt (Temenoff und Mikos 2000; Vincent et al. 2007).

Die territoriale Matrix umgibt die perizelluläre Matrix und besteht hauptsächlich aus einem Gerüst dünner Kollagenfibrillen sowie Proteoglykanen und hat mutmaßlich eine protektive Funktion in Bezug auf mechanische Belastung (Muir 1995; Pearle et al. 2005; Szirmai et al. 1967). Die interterritoriale Matrix macht den größten Anteil an der extrazellulären Matrix aus. Sie besteht hauptsächlich aus großen Kollagenbündeln, deren Anordnung sich je nach Zone unterscheidet. Sie hat entscheidenden Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels (Pearle et al. 2005; Temenoff und Mikos 2000). In der „Superficial zone“ sind die Kollagenbündel parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet. In der „Middle zone“ sind sie schräg zur Oberfläche ausgerichtet und in der „Deep zone“ haben sie eine horizontale Ausrichtung bezüglich der Knorpeloberfläche. Des Weiteren ist ein hoher Proteoglykangehalt nachzuweisen. Dieser stabilisiert die interterritoriale Matrix (Pearle et al. 2005; Temenoff und Mikos 2000).

Die aggregierenden Proteoglykane der extrazellulären Matrix sorgen aufgrund ihrer hohen Wasserbindungskapazität für eine raumfüllende Wirkung der Proteoglykane in dem Netzwerk aus Kollagenfasern. Dies ist der Grund für die Kompressionsresistenz und Elastizität des Knorpelgewebes, während die Kollagenfibrillen für die Resistenz gegenüber Scher- und Spannkraften verantwortlich sind (Buckwalter und Mankin 1997; Mow et al. 1992; Pearle

et al. 2005; Schulz und Bader 2007). 80-95% der Kollagenfasern in hyalinem Gelenkknorpel bestehen aus Typ 2 Kollagen. Der restliche Anteil wird aus Kollagen Typ 1, 6, 9, 10 und 11 gebildet (Muir 1995). Die anatomische Anordnung der Kollagenfasern in einer Triple-Helix-Struktur ist verantwortlich für seine mechanische Funktion und variiert je nach Schicht (Pearle et al. 2005).

Proteoglykane setzen sich aus Polysaccharidketten (95% der molaren Masse) gebunden an Proteinen (5% der molaren Masse) zusammen. Die Polysaccharidketten bestehen aus Glykosaminoglykanen (GAG). Dies sind sich wiederholende, lineare, lange Kohlenhydratgruppen aus Disacchariden. Die Funktion der Proteoglykane ist die Füllung des interfibrillären Platzes mit ECM durch Komplexbildung mit anderen Proteoglykanen sowie zu Hyaluronsäure und den Faserproteinen (Muir 1995, Watanabe et al. 1998). Neben seiner Bedeutung für die mechanischen Funktionen des Knorpels und der Protektion der Knorpelzellen hat die extrazelluläre Matrix auch eine Lagerfunktion für Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Moleküle. Sie ist somit wichtiger Bestandteil der Signalübertragung und reguliert die Versorgung der Chondrozyten mit Nährstoffen (Buckwalter und Mankin 1997; Buckwalter und Mankin 1998). In hyalinem Gelenkknorpel ist Aggrecan das am meisten vertretene Protein in den Proteoglykanverbindungen. Daneben finden sich unter anderem ebenfalls die kleineren Proteoglykane um Decorin und Fibromodulin sowie das Proteoglykan Biglycan mit jeweils geringerer Anzahl an GAG-Ketten (Vynios 2014). Während Aggrecan im hyalinen Gelenkknorpel zusammen mit Hyaluronsäure als Aggregat vorliegt, eine hohe Wasserbindungskapazität aufweist und so zur Elastizität des Knorpels beiträgt, helfen Decorin, Fibromodulin und Biglycan dabei die ECM zu organisieren, indem sie Kollagenfibrillen stabilisieren und den Metabolismus beeinflussen (Aspberg 2012; Pearle et al. 2005; Vynios 2014).

3.3.1 Kollagensynthese

Kollagen Typ 2 ist die Hauptkomponente der ECM und wichtig für die Zugfestigkeit und Elastizität des Knorpelgewebes (Pearle et al. 2005; Sato et al. 2017). Kollagen Typ 2 besteht aus drei Molekülketten gleicher Größe, welche helical angeordnet sind und eine sogenannte Triplehelix bilden. Die Synthese der Kollagenfibrillen findet teils intrazellulär, teilweise extrazellulär statt. Intrazellulär gebildete Polypeptid-a-Ketten mit spezifischer Sequenz aus den

Aminosäuren Prolin und Lysin werden durch die Enzyme Peptidyl-Prolin- und Peptidyl-Lysin-Hydroxylase hydroxyliert. Der Schritt der Hydroxylierung benötigt als Cofaktor Ascorbinsäure (Vitamin C). Nach Glykosylierung des Hydroxylysins folgt die Verdrillung des Prokollagens zu einer Triplehelix. Es folgt die Exozytose der triplehelikalen Protokollagenmoleküle. Extrazellulär werden die Propeptide an C- und N-Termini des Prokollagens durch spezielle Enzyme, Endopeptidasen, abgespalten. Die nun entstandenen Tropokollagenmoleküle sind nun wasserunlöslich und es erfolgt die kovalente Quervernetzungen der Tropokollagene über Hydroxylysinreste, welche die entstandene Kollagenfibrillen im Rahmen der Fibrillogenese dauerhaft fixieren. Der letzte Schritt ist die Faserbildung, bei der sich mehrere Fibrillen mithilfe zwischengelagerter matrixspezifischer Enzyme zu Kollagenfasern zusammenlagern (Grant und Prockop 1972).

Die Stabilität des Kollagens hängt von den oben genannten posttranslationalen Modifikationen ab. Eine der wichtigsten Schritte hierbei ist die Hydroxylierung des Kollagens durch die „Kollagen Prolyl 4-Hydroxylase“ (CP4H). CP4H katalysiert in diesem Schritt mit Hilfe des wichtigen Cofaktors Ascorbinsäure die Umwandlung von Prolin in 4-Hydroxy-Prolin. Vitamin C ist hierbei für die Reaktivierung von CP4H durch Reduzierung des Eisens im Zentrum des Enzyms von Fe (III) auf Fe (II) notwendig (De Jong et al. 1982; Vasta et al. 2016; Vasta und Raines 2018).

Der Kollagensyntheseinhibitor Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) ist ein gebräuchlicher Inhibitor des Enzyms Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase, welcher oft in Zellkulturen verwendet wird, um die Kollagensynthese zu unterbinden bzw. zu reduzieren (Vasta et al. 2016; Vasta und Raines 2018). EDHB verringert die Aktivität der CP4H durch die kompetitive Hemmung an der Bindungsstelle des Cofaktors Vitamin C. Zudem induziert EDHB als starker Chelator einen intrazellulären Eisenmangel (Majamaa et al. 1986; Sasaki et al. 1987; Wang et al 2002).

3.4 Defekte des Gelenkknorpels

Unter physiologischen Umständen herrscht im Knorpel ein Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen (Pearle et al. 2005). Störungen dieses metabolischen Gleichgewichts, zum Beispiel durch traumatische Verletzungen oder entzündliche Prozesse, können zu

Erkrankungen des Knorpelgewebes wie Arthritis oder Arthrose führen (Boushell et al. 2017; Kim et al. 2010; Widuchowski et al. 2007).

Durch Gelenkknorpelverletzungen entsteht meist ein irreversibler Knorpeldefekt, da postnataler Gelenkknorpel kaum spontane Regeneration zeigt. Ein Grund hierfür ist unter anderem die fehlende Vaskularisierung (Mankin 1982; Richter 2009; van der Kraan et al. 2009). Man unterscheidet hierbei die primäre Osteoarthrose aufgrund chronisch progressiver Degeneration des Knorpelgewebes ohne eindeutige Ursache und umschriebene Gelenkknorpeldefekte infolge von Traumata und/ oder Gelenkfehlbildungen.

Traumatische Knorpelverletzungen treten häufig in Begleitung von komplexen Binnenverletzungen und/ oder Nekrosen, wie zum Beispiel Osteochondrosis dissecans, auf (Boushell et al. 2017; He et al. 2014; Rabenberg 2013). Die residenten Chondrozyten sind hier zu keinem ausreichenden Reparaturprozess mehr in der Lage. Eine Rekrutierung vorhandener Progenitorzellen aus der Superficialzone oder der Synovia findet ebenfalls kaum statt (Mankin 1982; Richter 2009; van der Kraan et al. 2009). Aufgrund der fehlenden Regenerationsfähigkeit werden umschriebene Defekte ab einer Läsionstiefe bis in den subchondralen Knochen reichend durch faserknorpeliges, mechanisch minderwertiges Ersatzgewebe gedeckt (He et al. 2014). Die strukturelle Schädigung der Knorpeloberfläche erhöht signifikant das Risiko für die Entwicklung einer sekundären Osteoarthrose (Boushell et al. 2017; Gomoll 2012). Die Prävalenz diagnostizierter Arthrose liegt laut Gesundheitsberichten des amerikanischen CDC und des Robert Koch-Instituts in der Altersgruppe unter 65 Jahren durchschnittlich zwischen 15 und 27% und in der Altersgruppe über 65 Lebensjahren bei ca. 50%. Die Prävalenz Arthrosebedingter Funktionseinschränkungen liegt hierbei bei Personen mit diagnostizierter Arthrose bei 43.2% und bei 9.8% der Gesamtpopulation (CDC 2013; Rabenberg 2013).

3.5 Therapie von Gelenkknorpeldefekten

In der leitliniengerechten Behandlung von Knorpeldefekten erfolgt zunächst eine konservative Therapie. Nach maximaler, erfolgloser Ausschöpfung der konservativen Maßnahmen folgt eine operative Therapie. Hierbei sollte das Therapiekonzept individuell an das Krankheitsbild und dessen Entwicklung angepasst werden (Michael et al. 2010).

Im Verlauf der Erkrankung kommt es nach Ausschöpfung der konservativen Maßnahmen meist zu einer operativen Behandlung des betroffenen Gelenks. Hierbei unterscheidet man gelenkerhaltende arthroskopische Operationen, Methoden zur Wiederherstellung der Gelenkoberfläche und gelenkersetzende Operationen (Rabenberg 2013).

3.5.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie hat drei Ziele. Neben Schmerzlinderung und Verbesserung der Lebensqualität versucht sie die Progredienz der Arthrose zu verzögern. Die konservative Therapie setzt sich aus Veränderungen des Lebensstils des Patienten, therapeutischen Maßnahmen mit Physiotherapie und physikalischen Maßnahmen sowie Hilfsmittelerordnungen zusammen (Michael et al. 2010; Rabenberg 2013). Die medikamentöse Schmerztherapie erfolgt mittels nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR) oder bei progredienten Beschwerden in Kombination mit Opioiden. Als interventionelle Schmerztherapie kommen Ultraschallanwendungen und/ oder die intraarterielle Gabe von Glukokortikoiden und Hyaluronsäure zum Einsatz (Michael et al. 2010; Pendleton et al. 2000, Rabenberg 2013). Als „Disease modifying osteoarthritis drugs“ (DMOAD) können Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat oral oder intraartikulär verabreicht werden. Die Wirkungsweise dieser Medikamente ist derzeit noch unklar, der therapeutische Effekt in Bezug auf die Schmerzlinderung und Funktionsverbesserung ist jedoch klinisch erwiesen (Michael et al. 2010; Pendleton et al. 2000).

3.5.2 Operative Therapie

Methoden zur Erhaltung der Gelenkoberfläche:

Nach Ausschöpfung der konservativen Therapie ist eine operative Behandlung indiziert. Arthroskopische Verfahren wie die Lavage, das Shaving oder das Débridment dienen der Erhaltung der Gelenkoberfläche und eignen sich zur symptomatischen Behandlung bei Arthrose-bedingten Beschwerden (Burkart et al. 2001). Diesen Therapieverfahren wird ein kurzfristiger schmerzlindernder Effekt zugeschrieben, der therapeutische Nutzen bei einer generalisierten Arthrose ist jedoch umstritten. Keines dieser Verfahren führt zu einer

Regeneration des defekten Knorpelgewebes oder zu einem Stopp des degenerativen Prozesses (Bouillon et al. 2003; Kim et al. 1991).

Lavage:

Bei der Lavage wird das Gelenk mit Kochsalzlösung gespült. Hierbei wird das Gelenk arthroskopisch inspiziert und dann mittels Spülung von Entzündungszellen, lysosomalen Enzymen, Knorpeldebris und Detritus befreit (Bouillon et al. 2003; Burkart et al. 2001).

Shaving:

Frei bewegliche, noch am Knochen haftende, Knorpelanteile können im Rahmen einer Arthroskopie entfernt werden. Das Entfernen und Glätten von mechanisch instabilen Knorpelanteilen und das Entfernen von hypertrophen Synovialisanteilen verbessert die Funktion des betroffenen Gelenks und lindert die Beschwerden (Baumgaertner et al. 1990; Bouillon et al. 2003).

Débridement:

Das Débridement umfasst die Verfahren der Lavage und des Shaving mit zusätzlicher Glättung eingerissener Meniskusränder und Abtragung störender Osteophyten sowie der Möglichkeit einer partiellen Synovektomie bei entzündlich veränderter Synovia (Bouillon et al. 2003).

Methoden zur Wiederherstellung der Gelenkoberfläche:

Etablierte operative Verfahren zur Wiederherstellung der Gelenkoberfläche nutzen „Regeneratknorpel“ (Mikrofrakturierung), die Möglichkeiten von Transplantationen von Knorpel-/ Knochengewebe (OATS) und zellbasierte Therapien unter Verwendung von autologen Chondrozyten (ACI/ MACI) (Burkart et al. 2001; Kraeutler et al. 2018; Riboh et al. 2016).

Zellbasierte Therapien mit Transplantation autologer Knorpelzellen (ACI/ MACI) oder mesenchymaler Stammzellen (MSC) basieren auf der künstlichen Herstellung von Chondrozyten. Hierbei werden im Rahmen des Tissue Engineering Zellen gezüchtet und mittels verschiedener Zell-Trägermaterial-Konstrukte in die Knorpeldefekte implantiert. Aktuelle experimentelle Therapieansätze im Bereich des Tissue Engineering beschäftigen sich unter anderem mit der Entwicklung von Trägergerüsten („scaffolds“) oder Trägermaterialien,

zum Beispiel auf Basis von Hydrogelen, und der Untersuchung des Einflusses dieser Materialien auf die integrativen Prozesse des Knorpelgewebes (Huang et al. 2016).

Drilling, Abrasionsarthroplastik und Mikrofrakturierung:

Knochenmarkstimulierende Techniken durch Penetration des subchondralen Knochens induzieren eine Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt, welche sich dann zu chondrogenen Zellen ausdifferenzieren und eine extrazelluläre Matrix bilden. Histologisch zeigt sich jedoch, dass der hyaline Gelenkknorpel durch neu gebildeten minderwertigen Reparaturknorpel ersetzt wird, welcher sich aus hyalinem und aus Faserknorpel zusammensetzt und somit eine signifikant geringere Menge Typ 2 Kollagen besitzt (Alford und Cole 2005; Burkart et al. 2001; Gobbi et al. 2005). Der „Regeneratknorpel“ hat daher aufgrund seiner biochemischen Unterschiede nicht die gleichen biomechanischen Eigenschaften wie der hyaline Gelenkknorpel (Gobbi et al. 2005). Die Mikrofrakturierung des Knorpels im Bereich des Defektes und die Anbohrung des subchondralen Knochens mittels Drilling oder Abrasionsarthroplastik sind hierbei die gängigen Verfahren (Burkart et al. 2001). Die Mikrofrakturierung ist hierbei das aktuell klinisch relevanteste Verfahren und kann als Weiterentwicklung des Drillings und der Abrasionsarthroplastik gesehen werden (Kraeutler et al. 2018; Matsunaga et al. 2007). Bei der Mikrofrakturierung werden im Abstand von 3-4 mm mit einer Ahle mehrere ca 4-5 mm tiefe Defekte im subchondralen Knochen gesetzt (Bernholt 2003). Ein Vorteil des Verfahrens ist, dass im Gegensatz zu den Methoden Drilling und Abrasionsarthroplastik die Mikrofrakturierung nicht durch eine Bohrung geschieht und somit die Gefahr einer hitzeinduzierten Nekrose minimiert werden kann (Burkart et al. 2001; Matsunaga et al. 2007). Laut aktueller Studienlage bietet das Verfahren der Mikrofrakturierung gute klinische Ergebnisse bei der Behandlung kleinerer Knorpelläsionen unter 400 mm² von jungen Patienten unter 30 Jahren. Multiple Läsionen und ältere Patienten zeigen in Langzeitbeobachtungen nach 2 bis 5 Jahren eine klinische Verschlechterung und ein Progress der degenerativen Veränderungen des Knorpelgewebes (Gobbi et al. 2014; Riboh et al. 2016).

Osteochondrale Transplantation (OATS):

Die Transplantation von Knorpelgewebe und Knochengewebe („Osteochondral Allograft or Autograft Transplantation“ bzw. OATS) erfolgt entweder autolog aus den weniger belasteten Zonen des Gelenkes oder allogenen als Allograft (Burkart et al. 2001; Minas und Nehler 1997). Die Indikationen für diese Technik sind fokale Läsionen, traumatisch bedingt oder durch aseptische Knochennekrosen entstanden, kontraindiziert ist sie bei Arthrose mit großen

Knorpeldefekten (Kish et al. 1999). Das Transplantat liegt in Form eines Knochen-Knorpel-Zylinders vor. Zur Implantation wird die sogenannte „pressfit“-Methode verwendet. „Pressfit“ bedeutet, der Zylinder hat einen minimal größeren Durchmesser als der Defekt. Dadurch entsteht eine zirkuläre Kraft, welche das Transplantat fixieren soll (Burkart et al. 2001). Ein Problem dieser Methode ist die mangelnde laterale Integration an der Knorpel-Knorpelgrenze der Knorpelwundränder. Es kommt zu Spaltbildungen. Die dadurch geringere biomechanische Belastbarkeit kann zu weiteren Defekten führen (Khan et al. 2008; Lane et al. 2001; Zarnett et al. 1987). Die Deckung eines fokalen Knorpeldefektes kann ebenfalls durch eine Perichondrium- und Periostlappenplastik erfolgen. Für das Transplantat werden Perichondrium aus den dem Sternum nahen Rippen oder dem Periost aus der medialen Tibiafläche gewonnen (Reines 2004). Das Explantat wird dann in den Defekt eingenäht oder mittels Fibrinkleber eingeklebt und soll hyalinartigen Knorpel ausbilden, um den Defekt zu füllen. Diese Methode beruht auf der biologischen Potenz des implantierten periostalen/ perichondralen Gewebe zur Chondrogenese (Freed et al. 1993; Reines 2004). Klinische Nachuntersuchungen zeigten jedoch, dass es postoperativ zu Ossifikationen und arthrotischen Veränderungen sowie klinisch nicht zufriedenstellenden Ergebnissen kommt (Bouwmeester et al. 1997; Freed et al. 1993).

Zellbasierte Therapien bei Knorpeldefekten:

Autologe Chondrozyten-Implantation (ACI) und Matrix-assoziierte autologe Chondrozyten-Implantation (MACI):

Die ACI ist in drei Teilschritte gegliedert. Zuerst wird Gelenkknorpel bioptisch extrahiert. Im zweiten Schritt werden aus dem gewonnenen Material durch enzymatischen Verdau Knorpelzellen von der extrazellulären Matrix getrennt und in einer Zellkultur mit der Hilfe von Wachstumsfaktoren zur Proliferation gebracht, bis eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Transplantation gewonnen werden konnte (Burkart et al. 2001; Marlovits et al. 2006). Als dritter Schritt folgt dann die Implantation der gezüchteten Knorpelzellen in den Defekt. Nach der Implantation beginnen die Zellen mit der Proliferation und Produktion von extrazellulärer Matrix und füllen so den Defekt (Marlovits et al. 2006). Bei der MACI wird das Transplantat mittels „scaffold“ in den Defekt implantiert und durch Fibrinkleber fixiert. Das „scaffold“ besteht aus einem Biomaterial, zum Beispiel Kollagengel, und dient zunächst als Platzhalter für die Chondrozyten und die produzierte extrazelluläre Matrix. Es wird im Verlauf abgebaut und durch ECM ersetzt (Dunkin und Lattermann 2013). In klinischen Studien konnte in Nachuntersuchungen zwar hyalines Knorpelgewebe im Defekt nachgewiesen werden, jedoch handelt es sich bei dem neu produzierten Gewebe mehrheitlich um Faserknorpel (Brittberg et

al. 1994; Knutsen et al. 2004; Obradovic et al. 2001). In klinischen Vergleichsstudien zeigten weder ACI/ MACI noch OATS ein signifikant besseres klinisches Outcome verglichen mit der Mikrofrakturierung (Kraeutler et al. 2018; Lim et al. 2012).

Mesenchymale Stammzellen (MSC):

Eine Alternative zur Autologen Chondrozyten Transplantation ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen. Im Rahmen einer Knochenmarkspunktion werden multipotente Stammzellen gewonnen, kultiviert und so eine chondrogene Ausdifferenzierung induziert. Die Implantation des Zell-Transplantats erfolgt anschließend in Form eines festen Kollagengel-Zell-Komposits oder mittels Injektion unter einen Periostlappen. Wakitani et al. führten 2002 die erste Transplantation mesenchymaler Stammzellen an 24 Patienten durch. Die Implantation führte arthroskopisch und histologisch zu einer Verbesserung im Gewebeaufbau. Eine Besserung der klinischen Symptomatik nach durchschnittlich 42 Wochen konnte jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht festgestellt werden (Wakitani et al. 2002). Klinisch zeigt sich bisher im Gegensatz zu den etablierten Verfahren um Mikrofrakturierung, OATS und ACI/ MACI eine begrenzte Evidenz der Wirksamkeit dieser Therapieform (Ha et al. 2019).

3.6 Unzureichende Integration des Gelenkknorpels

Die laterale Integration stellt ein bis heute nicht gelöstes Problem dar (Athens et al. 2013; Boushell et al. 2017; Khan et al. 2008). Zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten werden, wie unter 3.5.2 beschrieben, aktuell verschiedene operative Techniken eingesetzt. Technisch und operativ sind Operationsverfahren wie die OATS oder ACI und MACI als Standardverfahren etabliert. Der kritische Punkt für die langfristige klinische Entwicklung von Patienten mit Knorpeldefekten ist die laterale Integration des eingebrachten Knorpeltransplantats in den umliegenden Knorpeldefekt in der Einheilungsphase nach der operativen Therapie. Nur wenn die Integrationszone zwischen Transplantat und Defektrand mit funktionellem Knorpelgewebe gefüllt wird, kann eine stabile Bindung entstehen, die den biomechanischen Ansprüchen an die Knorpeloberfläche eines Gelenks gerecht wird. Jedoch zeigen die aktuell etablierten Therapieoptionen oft inkonstante Langzeitergebnisse mit teils schlechtem klinisch funktionellem „Outcome“ (Bouwmeester et al. 1997; Freed et al. 1993; Chen et al. 1999; Knutsen et al. 2004). Im Rahmen von in vivo Untersuchungen wurde als

Grund hierfür bereits öfter die unvollständige laterale Integration gegenüberliegender Knorpelwundflächen beschrieben (Niemeyer et al. 2008; Petersen et al. 2008).

Experimentell jedoch konnte die laterale Integration von Knorpelgewebe bei in vitro Untersuchungen im bovinen Modell für adulten und juvenilen Gelenkknorpel bereits früh nachgewiesen werden (Reindel et al. 1995). Bekannt ist auch, dass die Integration von Gelenkknorpel in vitro vor allem von der Kollagenquervernetzung abhängt (Ahsan et al. 1999; DiMicco und Sah 2001; Englert et al. 2005). Experimentell konnte dieser Zusammenhang unter anderem durch die Inhibierung der Kollagenquervernetzung durch die Hemmung des Enzyms Lysyloxidase und dessen negative Auswirkung auf die Integration gezeigt werden (Ahsan et al. 1999).

In einem Experiment aus 2005 zeigten McGowan und Sah daraufhin, dass eine reversible Hemmung der Lysyloxidase zu einer Aufspeicherung von unreifem Kollagen vor dessen Quervernetzung und Ausbildung der Kollagenfibrille als Quartärstruktur führte. Gewebegruppen mit einer solchen Vorbehandlung zeigten nach Entfernung der Inhibierung eine schnellere und mechanisch stabilere Integration im Vergleich zu unbehandelten Gruppen (McGowan und Sah 2005). Durch die Modulation der Integration in diesen Arbeiten zeigten sich Hinweise, dass die Integration von Gelenkknorpel nicht nur von der Menge und mechanischen Qualität der Kollagenquervernetzungen, sondern auch direkt von der Kollagensynthese abhängt (DiMicco und Sah 2001; McGowan und Sah 2005).

Schlüsselpunkte der Kollagensynthese als mögliche Modulationsschnittstellen für eine integrationssteigernde Behandlung des Knorpels im Defektbereich des Patienten und des autologen oder allogenen (Zell-)Transplantats zu identifizieren ist wissenschaftlich immer noch von großer Bedeutung für die Verbesserung der derzeitigen therapeutischen Maßnahmen (Boushell et al. 2017, Cohen 1985).

In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund durch die Modulation der Kollagen Prolyl 4-Hydroxylase die direkte Abhängigkeit der Integration von der Neusynthese des Kollagens untersucht. In anderen Geweben ist CP4H als therapeutischer Zielpunkt für die Modulation der Kollagensynthese durch kompetitive Hemmung mittels EDHB bereits beforscht und etabliert (Vasta et al. 2016; Vasta und Raines 2018). In dieser Arbeit erfolgte, wie unter 3.3.1 beschrieben, die Hemmung der Kollagensynthese, anders als in den vorherigen

Untersuchungen von Ahsan et al. (1999), DiMicco und Sah (2001) sowie McGowan und Sah (2005) deutlich vor Ausbildung der Kollagenquervernetzungen. Ferner wurde der Versuch unternommen die Syntheseleistung der Prolyl 4-Hydroxylase durch Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration in vitro positiv zu beeinflussen, um die Kollagensynthese und konsekutiv die laterale Integration des Knorpelgewebes zu verbessern.

3.7 Zielsetzung

Die laterale Integration stellt ein großes Problem in der Knorpelintegration und damit in der klinischen Behandlung von Knorpelschäden dar. Die ECM-Synthese im Defektbereich des Knorpelgewebes spielt hierbei eine wesentliche Rolle. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Integration von Gelenkknorpel direkt von der Kollagensynthese abhängig ist (Ahsan et al. 1999; DiMicco und Sah 2001; Englert et al. 2005; McGowan und Sah 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher die bewusste Einflussnahme auf die Kollagensynthese in vitro, um die Abhängigkeit der Knorpelintegration von der Neusynthese des Kollagens zu untersuchen. Ascorbinsäure ist ein wichtiger Cofaktor der Kollagen Prolyl 4-Hydroxylase (CP4H), eines Schlüsselenzymkomplexes der Kollagensynthese. Im Rahmen der Versuche erfolgte daher die Modulation der Kollagensynthese auf zwei Arten: Variation der Ascorbinsäurekonzentration im Kulturmedium zur positiven Beeinflussung der Kollagensynthese und Inhibierung der CP4H, um die Kollagensynthese negativ zu beeinflussen.

Nach der Kultivierung erfolgten biomechanische und histologische Untersuchungen zur genauen Analyse der ECM-Synthese und der Integrationsstärke, sowie von deren Zusammenhang.

Das in dieser Arbeit hierfür verwendete Disc-Ring-Modell ist ein etabliertes biomechanisches Verfahren zur experimentellen Untersuchung der lateralen Integration in vitro (Obradovic et al. 2001; Theodoropoulos et al. 2011; van de Breevaart Bravenboer et al. 2004). Zur initialen Fixierung des Knorpelzylinders im Defekt wurde in dieser Arbeit langzeitstabiler Fibrinkleber verwendet. Fibrinkleber bietet hierbei ein optimales Milieu für die Proliferation von Knorpelzellen sowie deren Matrixsynthese ohne Beeinflussung der biomechanisch messbaren

Integrationswerte (Andjelkov et al. 2016; Eyrich et al. 2007; Lazarini et al. 2017; Scotti et al. 2010).

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Substanz	Artikelnummer	Hersteller	Ort/Land
Knorpelgewebe	-	Metzgerei Hollerbach	Rimpar, Deutschland
Nährmedium (DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	RNBF3518	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ascorbinsäure (L-Ascorbic acid 2-phosphate)	A8960-5G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethyl 3,4-Dihydroxybenzoat (EDHB)	E24859-5G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Prolin (L-Proline)	120M0161V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
HEPES	SLBK4457V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Gibco	USA
Nicht essentielle Aminosäuren (MEM NEAA-Non-Essential Amino Acids)	11140-035	Gibco	UK
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	14190-094	Gibco	USA
Rinderserumalbumin	SLBL0253V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Hematoxylin	031M0208V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mayer's Hematoxylin Solution	SLBG6495V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eosin (Eosin Solution Alcoholic with Phloxine)	040M4352	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Formalin	-	-	-
Entellan®	1.07961.0500	Merck	Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	SZBG1610V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Essigsäure 99,8%	SZBC0270V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Salzsäure	P074.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure	A2520,0500	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure Standard-Lösung	SZBB0060V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	6724092.00.00	Bernd Braun Chemicals	Rottweil, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8%	K928.4	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100	80M011289V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Xylene	SZBE2830V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Farbstoff zur Gewebemarkierung	500BL	Richard-Allan Scientific	USA
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid)	MKBR4419V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisen (III) Chlorid	SZBB3260V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aprotinin (Trasylo [®])	AUTH/2107/3/08	Baxter GmbH	Unterschleißheim, Deutschland

Proteinkinase K	P6556	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Fibrinogen (bovine plasma)	9001-32-5	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Thrombin (TissuCol® Kit Immuno)	VNT1P012	Baxter GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Histologischer Farbstoff (Fast Green)	120M1516V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Safranin O	090M0039V	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Col I -Antikörper (mAB, mouse abcam ab6308; Schwein)	ab6308	abcam	USA
Col II -Antikörper (pAB, rabbit abcam ab34712; Schwein)	ab34712	abcam	USA
Sekundärer Antikörper, goat-anti-rabbit Cy3 (rot)	111-165-003	Jackson Immuno Research Lab.	USA
Sekundärer Antikörper, donkey-anti-mouse Cy3 (rot)	715-165-150	Jackson Immuno Research Lab.	USA
Eindeckmedium (DAPI Mounting Medium)	Ab104139	abcam	USA
Verdünnungslösung (Dako REAL Antibody Diluent)	S202230-2	Agilent Technologies	USA
Wärmebecken	Typ 24900	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Materialprüfmaschine BZ020/TH2A	176877	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
Kraftaufnehmer	Z6fD1	Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH	Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS-Fetal Calf Serum)	10500-064	Gibco	USA
Vorrichtung zum Zurechtschneiden der Knorpelkonstrukte	-	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Vorrichtung zum Stanzen der Knorpelkonstrukte	-	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Haltevorrichtungen zur biomechanischen Testung	-	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Ausrichteeinheit zur biomechanischen Testung der Knorpelkonstrukte	-	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Spitzröhrchen (Falcon® Centrifuge Tubes)	352070	Corning	USA
Zellkulturtestplatte 24F	92048	TPP	Trasadingen, Schweiz
Kulturplatte (Nunclon Delta Surface)	144972	Thermo Scientific	Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen	FALC3511178	Falcon	Deutschland
Filterpapier, 240mm	FF24	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Verschlussfolie (Parafilm M®)	P7793-1EA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Terralin®	10200	Schülke & Mayr UK Ltd	UK
Skalpelle diverser Größen	219AABZX00136000	Feather	Japan
Skalpelle diverser Größen	-	Braun	Puchheim, Deutschland
Laborpipetten diverser Größen	5ml: 606180	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland

	10ml: 607180 25ml: 760180 50ml: 768180		
Rasierklingen (Single Edge Blades)	61-0117	Personna/GEM	USA
Mikrotom Klingen	Type N35	Feather	Japan
Deckgläser	-	R. Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Histologieschnitte (Histoslide 2000 R)	00721229	Leica Instruments GmbH	Nussloch, Deutschland
Histologieschnitte (TRUBOND 380 Microscope Slides)	TRU-scientific	0380B	Japan
Biopsy Punch 3mm weiß	5011091105036	Smithkline Beecham Ltd.	UK
Biopsy Punch 6mm weiß	5011091105005	Smithkline Beecham Ltd.	UK
Biopsy Punch 3,5mm grün	48351	Kai medical GmbH	Solingen, Deutschland
Akupunkturnadeln mit Silbergriff ohne Führungsröhrchen 0,2 x 15 mm	MEG 148301	megro	Wesel, Deutschland
Prüfsoftware TestXpert II	-	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
Microsoft Word	-	Microsoft Corp.	USA
Microsoft PowerPoint	-	Microsoft Corp.	USA
JMP®,	Version 12.1.0	SAS Institue Inc.	USA

4.2 Probenpräparation

Um die Knorpelintegration zu untersuchen wurde ein Disc-Ring-Modell verwendet. Nach der Herstellung der Konstrukte wurden diese in verschiedenen Gruppen kultiviert und anschließend mittels Push-out-Tests die mechanische Integrationsstärke gemessen. Zudem wurden histologische Untersuchungen der Integrationszone durchgeführt, um die Abhängigkeit der Integration von der Kollagensynthese auf den Integrationsprozess zu beurteilen.

Die Herstellung der Knorpelkonstrukte folgte nach den Vorversuchen einem strengen Algorithmus, um standardisierte Knorpelkonstrukte herzustellen.

Algorithmus zur Herstellung der „Push-out-Konstrukte“:

1. *Extrahieren des Knorpels aus dem Ferkelknie*
2. *Ausstanzen der Knorpelzylinder*

-
3. *Zuschneiden der Knorpelzylinder*
 4. *Markierung der Knorpelscheiben*
 5. *Ausstanzen des Kern-Defekts*
 6. *Fixierung des Kernstücks innerhalb des Defekts*

1. Extrahieren des Knorpels aus dem Ferkelknie:

Der Knorpel für die Herstellung der Konstrukte stammt aus den Femurkondylen der Hinterläufe von Spanferkeln im Alter zwischen 8 und 12 Wochen. Die Tiere wurden von einer regionalen Metzgerei bezogen und standen unter der gesetzlich vorgeschriebenen tierärztlichen Kontrolle. Am Tag der Schlachtung erfolgte die Extrahierung des Knorpels über eine Kapsulotomie. Während des Vorgangs wurde das Kniegelenk mit einer Lösung aus PBS mit 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin gespült.

2. Ausstanzen der Knorpelzylinder:

Nach Inzision und stumpfer Exzision einer Knorpelplatte folgte das Ausstanzen der Knorpelzylinder via Biopsie Punch mit einem Durchmesser von 6 mm. Nach der Extraktion wurden die Knorpelzylinder in einer 48-Well Mikrotiterplatte mit oben genannter Lösung feucht gehalten.

3. Zuschneiden der Knorpelzylinder:

Das Zuschneiden der Zylinder auf eine Höhe von 1 mm wurde in einer speziell angefertigten Schneidevorrichtung durchgeführt (Abb. 1).



Abb. 1: Schneidevorrichtung; einliegender Knorpelzylinder und eingebrachte Rasierklinge als Anlagefläche

Die Schneidevorrichtung hat, wie auf Abbildung 1 und 2 ersichtlich, mehrere Einkerbungen für Rasierklingen mit verschiedenen Abständen von 0,25 bis ca 1,75 mm. Das Zuschneiden erfolgte in je drei Schritten. Der Knorpelzylinder wurde in die dafür vorgesehene Auskerbung gelegt und an beiden Enden jeweils ein 0,25 bis 0,55 mm großes Stück entfernt, je nach Ausgangsdicke des initialen Knorpelzylinders. Hierfür wurde der Knorpel jeweils mit der zu schneidenden Seite an eine Rasierklinge gedrückt, welche als Anlagefläche diente. Hierdurch entstand eine planare Anlagefläche des Knorpelzylinders für den weiteren Schneideprozess. Von der ostealen Seite wurde dann im nächsten Schritt erneut ein ca. 0,5 mm großes Stück abgeschnitten, damit möglichst die komplette subchondrale Platte und gelenkseitig die superfizielle Zone entfernt werden konnte. Im dritten Schritt wurde der Zylinder dann in Knorpelscheiben mit Höhe von 1 mm geschnitten (Abb. 1, 2).

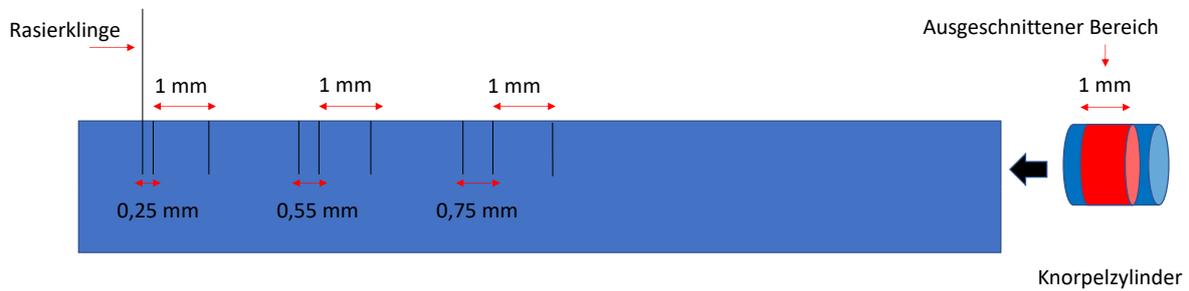


Abb. 2: Schneidevorrichtung; Schematische Zeichnung, Seitenansicht mit Knorpelzylinder

4. Markierung der Knorpelscheiben:

Mithilfe von verdünntem Methylenblau wurden die Knorpelscheiben dann mit einer Linie markiert (Abb. 3).

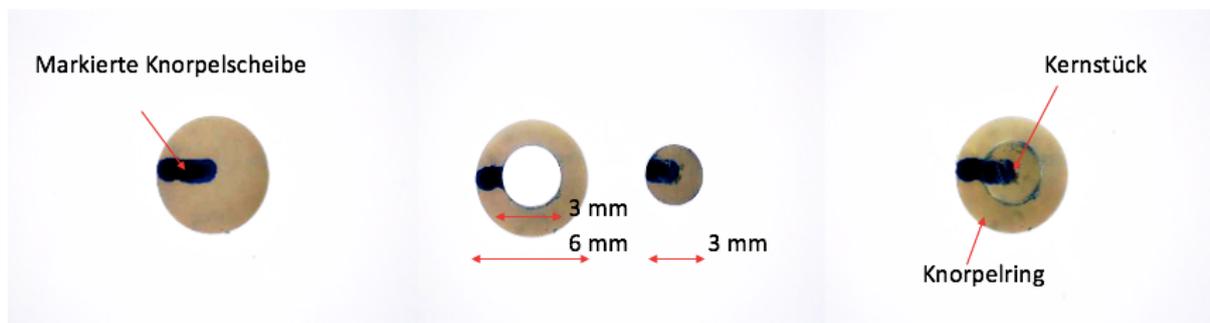


Abb. 3: „Push-out-Konstrukt“ nach dem Schneidevorgang mit Höhe von 1 mm mit Methylenblau markiert; Markierter Knorpelring und Kernstück nach dem Stanzvorgang; Zusammengesetztes Konstrukt mit ausgerichteter Markierung

5. Ausstanzen des Kern-Defekts:

Danach wurden die Knorpelscheiben in die Haltevorrichtung der speziell angefertigten Stanzvorrichtung gelegt, die Haltevorrichtung zusammengesteckt und auf das Stanzmodul montiert. Hier wurde dann in Führung durch das Modul das Kernstück („Core“) mit einem Biopsie Punch ausgestanzt (Abb. 4).

Die vorher gesetzte Markierung diente nun als Orientierungshilfe zum identischen Einsetzen und Ausrichten des „Cores“ im Knorpelring (Abb. 3).

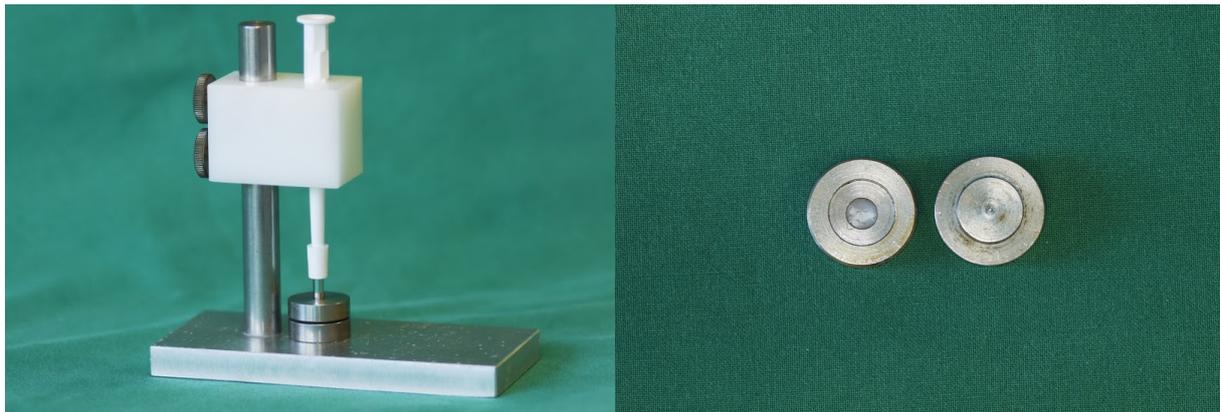


Abb. 4: Stanzvorrichtung; Stanzmodul mit montierter Haltevorrichtung, getrennte Teile der Haltevorrichtung mit eingebrachter Probe

Durch die in Abbildung 1, 2 und 4 dargestellten, speziell angefertigten Vorrichtungen war es möglich reproduzierbar einen mittigen, rechtwinklig zur Oberfläche verlaufenden Stanzkanal des Kernstücks zu garantieren und somit etwaige Fehlerquellen in der anschließenden mechanischen Messung zu beseitigen.

Zur Herstellung der „Push-out-Konstrukte“ innerhalb dieses Versuchsaufbaus wurden jeweils Kernstücke mit dem Durchmesser 3 mm und via Biopsie Punch ausgestanzt.

6. Fixierung des Kernstücks innerhalb des Defekts:

Die Kernstücke mit dem Durchmesser 3 mm wurden in den 3 mm breiten Defekt der Knorpelringe eingesetzt und mittels langzeitstabilem Fibringel mit einer Fibrinogenkonzentration von 50 mg/ml geklebt (Eyrich et al. 2007).

Die gestanzten Knorpelringe wurden zum Kleben in 5er Gruppen auf eine Teflonplatte gelegt. Die nach dem Stanzen in PBS feucht gehaltenen Discs und Cores wurden zuvor getrocknet. In einem Durchgang wurde nun jeweils 3,5 µl der angesetzten Fibrinkomponente (1024,8 mg Fibrinogen (76,5 % Protein, 91,2 % clottable), 7,15 ml Aprotinin-Lösung, 102,5 mg NaCl) in den Defekt des Knorpelrings pipettiert. Nun wurde die Pipettenspitze getauscht. Anschließend wurden 3,5 µl Thrombinkomponente (Baxter thrombin dilution buffer: 4,44 mg/ml CaCl₂ (M = 110,98 g/mol), 10 mg/ml NaCl (M = 58,44 g/mol), 3 mg/ml Glycin (C₂H₅NO₂, M = 75,07 g/mol), 30 mg Thrombin S Lyophilisats aus TissuCol® Kit in 50 ml Puffer) in den mit Fibrin gefüllten Defekt gegeben und per Pipette vermischt. Das Kernstück wurde anschließend im Defekt platziert. Der überschüssige Fibrinkleber wurde dann mit einem Präzisionstuch entfernt. Dieser Vorgang wurde im Anschluss für die restlichen 4 Discs wiederholt.

Abschließend wurden die geklebten Konstrukte auf der Teflonplatte aufliegend für 30 Minuten in einer mit feuchtem Papier ausgelegte Zellkulturschale in einem Inkubator bei 37° C inkubiert, um den Fibrinkleber aushärten zu lassen.

Vor der Gewebekultivierung wurden die Konstrukte in einer 48-well-Mikrotiterplatte dreimalig mit PBS gewaschen.

4.3 Kultivierung

Zur In-vitro-Kultivierung wurde ein standardisiertes chondrogenes Nährmedium benutzt. Das Standardmedium bestand aus DMEM mit einem Glukosegehalt von 4500 mg/l, 0,1 % Prolin (50 mg/ml), 0,1 % (50 mg/ml) Ascorbinsäure (L-Ascorbic acid 2-phosphate) (50 mg/ml), 1 % Penicillin (100 U/ml), 1 % Streptomycin (0,1 mg/ml), 1 % NEAA (Non Essential Amino Acids) (0,1 mM), 1 % 1 M HEPES-Puffer (2-(4- (2-Hydroxyethyl)-1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure) (10 mM) sowie 10 % FCS (Fetal Calf Serum).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 5 verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ascorbinsäure und Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) im Kulturmedium für jeweils 7, 14 und 21 Tage im Inkubator (37° C, 5 % CO₂) kultiviert.

Neben der Gruppe mit der Konzentration von 50 µg Ascorbinsäure/ml wurde eine Gruppe mit einer Konzentration von 100 µg Ascorbinsäure/ml und 2 Gruppen mit jeweils 50 µg Ascorbinsäure/ml und dem Zusatz des Kollagensyntheseinhibitors EDHB in verschiedener Konzentration kultiviert und anschließend untersucht. Hierbei wurde EDHB in einer Gruppe mit einer niedrigen Konzentration von 0,05 mM und in der zweiten Gruppe mit einer hohen Konzentration von 0,2 mM zugesetzt.

Überblick der unterschiedlichen Gruppen:

Gruppe „*w/o Ascorbinsäure*“ ohne den Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium

Gruppe „*50 µg/ml Ascorbinsäure*“

Gruppe „*100 µg/ml Ascorbinsäure*“

Gruppe „*50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB*“

Gruppe „*50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB*“

Jedes Knorpelkonstrukt wurde in 1,5 ml Medium kultiviert, welches dreimal pro Woche gewechselt wurde.

4.4 Biomechanisches Messverfahren

4.4.1 Materialprüfmaschine

Um die Integrationsstärke der unterschiedlichen Knorpelkonstrukte biomechanisch zu messen, wurde eine Prüfmaschine vom Typ Zwick-Roell-BZ020/TH2A (Werksnummer: 176877) verwendet (Abb. 5).

4.4.2 Aufbau und Durchführung

Der Grundaufbau besteht aus einem Lastrahmen, welcher eine vertikale, bewegliche Traverse trägt und aus einer Grundplatte mit Haltevorrichtung für die Probe (Abb. 5). An der beweglichen Traverse wurde ein Kraftaufnehmer montiert. An diesem konnte die Halterung des Messstiftes befestigt werden. Der Kraftaufnehmer der Firma HBM (Modellnummer: Z6FD1) gehört zu der Genauigkeitsklasse D1 mit einer maximalen Last von 10 kg (Emax) bei

einem Mindestteilungswert (V_{\min}) von 0,0360 %. Mit dieser Messvorrichtung können Kräfte bis zu 98,1 N gemessen werden.

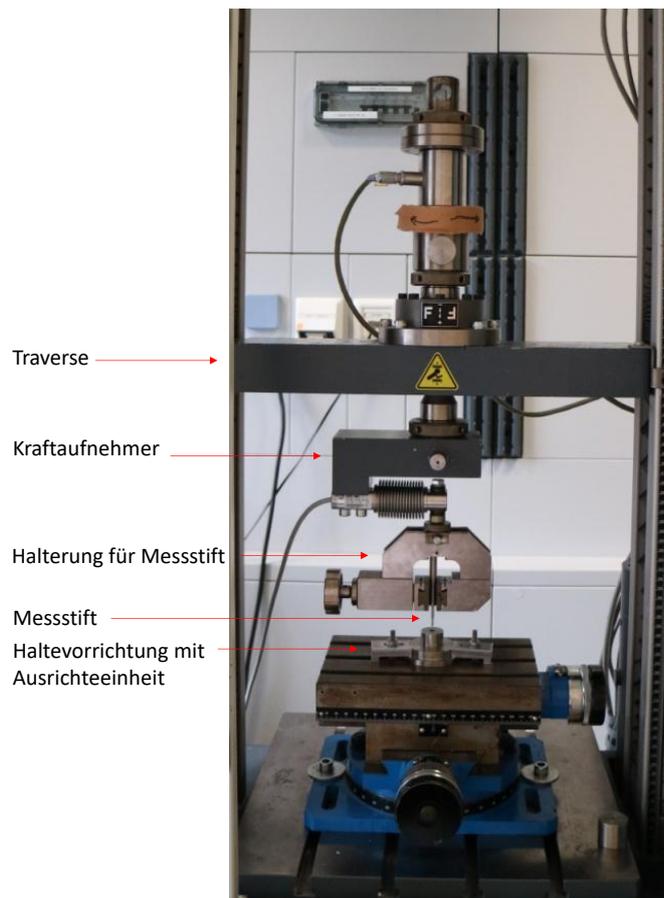


Abb. 5: Materialprüfmaschine mit Haltevorrichtung der Probe und Ausrichteeinheit nach Abschluss der Kalibrierung

Der speziell angefertigte Messstift (Durchmesser 2 mm, Feinmechanik Sauer, Würzburg, Deutschland) sollte in diesem Versuchsaufbau senkrecht auf das Kernstück des kultivierten Knopelkonstrukts (Durchmesser 3 mm) treffen, Druck auf dieses ausüben, um somit die Kraft zu ermitteln, welche benötigt wird um den „Core“ des Konstruktes senkrecht gegen den Knorpelring zu verschieben (Abb. 5, 6, 7).

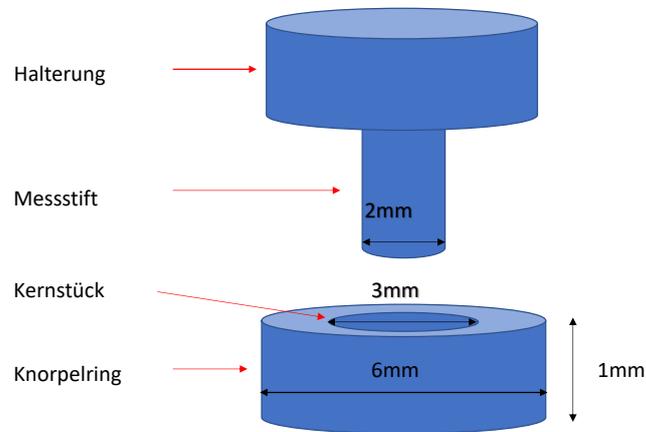


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

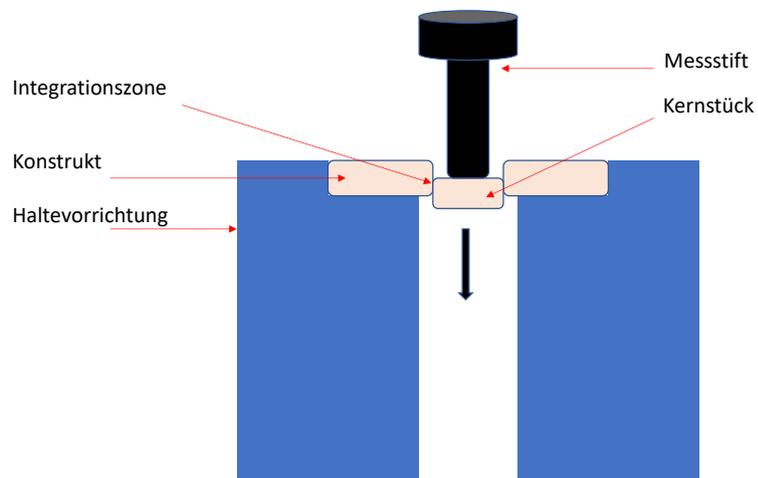


Abb. 7: Schematische Darstellung des Messvorgangs

Auf die Grundplatte auf dem Boden der Prüfmaschine wurde eine Haltevorrichtung zur korrekten Ausrichtung der Konstrukte via Feststellschrauben fixiert. Durch die

Haltevorrichtung konnte reproduzierbar eine Ausrichtung der Probe im 90° Winkel zur Grundplatte gewährleistet werden. Die für das Konstrukt eingearbeitete Vertiefung hatte einen entsprechenden Durchmesser von 6 mm und eine Tiefe von 5 mm, sodass das Konstrukt passgenau einlag. So konnte gewährleistet werden, dass es während des Prüfvorganges zu keiner Dislokation der Probe kam. Die Kalibrierung des Messstiftes in einer rechtwinkligen Lage in der Haltevorrichtung erfolgte mittels einer speziell angefertigten Ausrichtungseinheit, welche in Form einer „Kappe“ auf die Haltevorrichtung der Probe aufgesetzt wurde. Exakt mittig dieser Ausrichtungseinheit befand sich eine Öffnung mit dem Durchmesser des Messstiftes (Abb. 8).

Im Rahmen der Vorbereitungen des Messvorgangs und Kalibrierung der Messeinheit wurde der Messstift in die Ausrichtungseinheit eingesetzt und die beweglichen Traverse an den Messstift angefahren. Der Stift konnte so in der vorgegebenen 90° Ausrichtung fixiert und die exakte Ausrichtung der Messvorrichtung eingestellt werden.

Die zusammengesetzte Haltevorrichtung wurde anschließend mittels Feststellschrauben auf der Grundplatte der Prüfmaschine fixiert und abschließend die Ausrichteeinheit von der Haltevorrichtung der Probe entfernt.

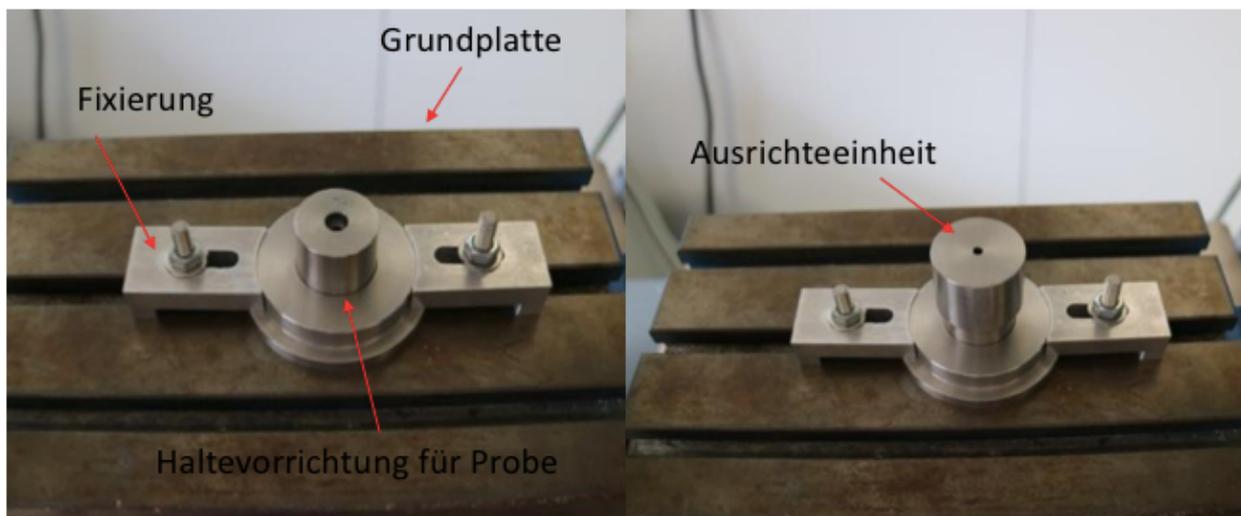


Abb. 8: Aufbau zur Kalibrierung im Rahmen der Vorbereitungen der Messvorgänge

Die Daten wurden über die Prüfsoftware TestXpertII® ausgewertet. In der Prüfvorschrift der Software konnten unter anderem die Startposition und die Anfahrtsgeschwindigkeit

programmiert werden. Die Geschwindigkeit, mit welcher der Messstift auf die Probe trifft, kann hierbei zwischen 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ und 500 mm/min eingestellt werden. Die endgültig in der Prüfvorschrift festgelegte Anfahrtsgeschwindigkeit betrug 10 mm/min . Im Rahmen der Vorversuche wurden unterschiedliche Anfahrtsgeschwindigkeiten verglichen. Diese zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Messwerte. Das Programm zeigte die im Sinne eines „load to failure“-Prinzips ermittelten Werte der maximalen Kraft zum „Push-out“ des Kernstücks (F_{max}) in Newton sowie die nominelle Verformung bei F_{max} in Millimetern mit der dazugehörigen Kurvengrafik (Abb. 9, 10). Vor jeder biomechanischen Messung wurde individuell mittels Feinmessgerät die Höhe der Proben ermittelt und in der Prüfsoftware eingetragen. Die ermittelten Werten, normiert auf die Fläche der Grenzflächen, sind repräsentativ für die Integrationsstärke.

Die oben genannten Gruppen wurden jeweils nach einer Kultivierungsdauer von 7, 14 und 21 Tagen biomechanisch getestet. Zudem erfolgte die mechanische Testung von Bezugsgruppen zur Untersuchung der Adhäsionskraft des Fibrinklebers.

4.4.3 Messkurve & Berechnung der Adhäsionskraft

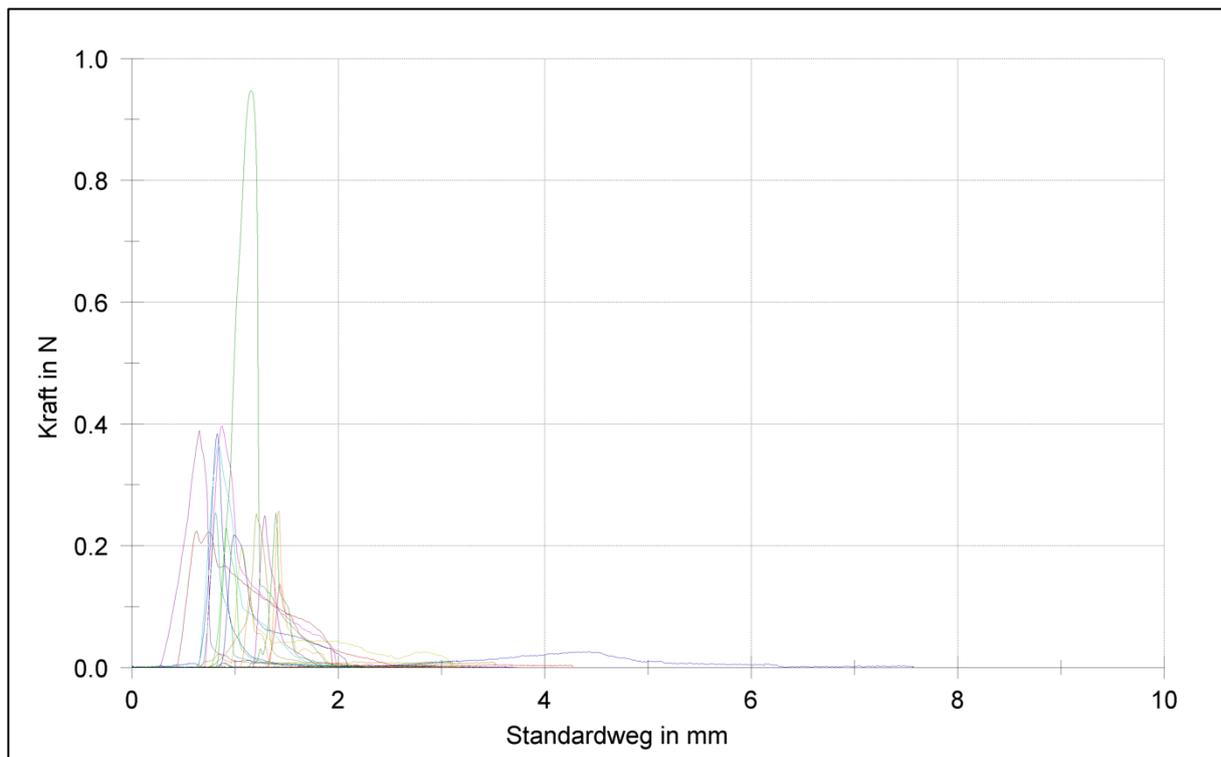


Abb.9: Messkurven einer Versuchsgruppe in der Auswertungssoftware TestXpertII®

Abbildung 9 veranschaulicht den Kurvenverlauf einer Messung in der Prüfsoftware TestXpertII® während eines Messvorgangs mit mehreren Proben. Die Kurven der einzelnen Messdurchläufe werden zur Differenzierung in verschiedenen Farben dargestellt. Die Kurvenverläufe zeigten jeweils einen ähnlichen, typischen Verlauf, welcher im Folgenden genauer erläutert wird.

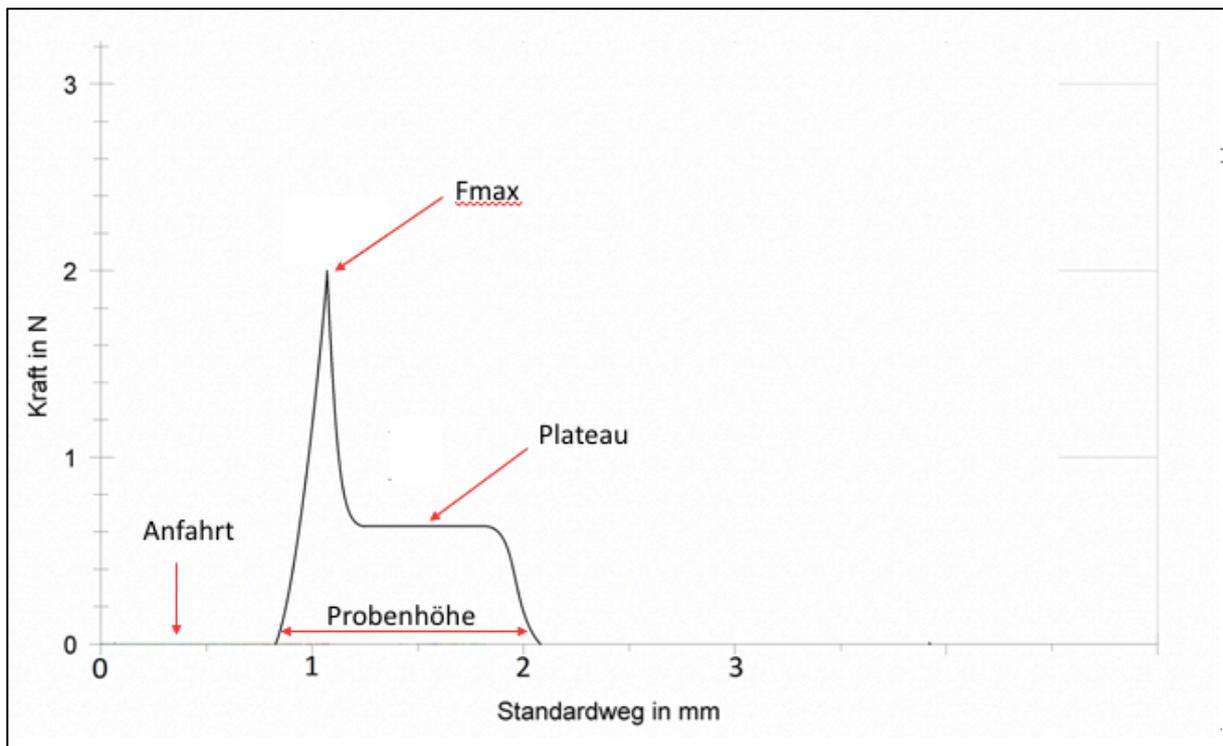


Abb. 10: Schematische Messkurve in der Auswertungssoftware TestXpertII® mit Beschriftung der Kurvengrafik

Abbildung 10 zeigt schematisch den Kurvenverlauf einer Messung in der Prüfsoftware TestXpertII® während eines Messvorgangs. Auf der Y-Achse wurde die Kraft in Newton und auf der X-Achse der Standardweg in mm angegeben.

Der typische Kurvenverlauf bestand aus dem Anfahrtsweg, einer aufsteigenden Kurve, welche im Sinne einer „load to failure“ in der maximal gemessenen Kraft F_{max} gipfelt, sowie einer hiernach folgenden gleichbleibenden Kraft („Plateau“).

Der, auf die Y-Achse bezogen, gemessene Wert F_{max} entsprach der Kraft, welche benötigt wurde, um die Adhäsion, welche durch die Integration entstand, zu lösen. Das in Abbildung 15 dargestellte Plateau entsprach der konstanten Kraft, die nach dem Lösen der Integrationsstärke

benötigt wurde, um das Kernstück komplett aus dem Knorpelring zu schieben. Die auf der X-Achse angegebene Strecke in mm entsprach in den Versuchen dem Anfahrtsweg sowie dem Weg, um das Kernstück komplett aus dem Knorpelring zu drücken. Dieser Weg entsprach der jeweiligen Probenhöhe, welche vor jeder biomechanischen Messung individuell gemessen wurde. Aus der jeweiligen Probenhöhe wurde die Integrationsfläche berechnet. Diese entsprach hierbei der Mantelfläche (M) des Knorpelkerns in mm²:

$$M=2\pi \times r \times h$$

Aus dem Wert F_{max}, angegeben in Newton, wurde anschließend unter Einberechnung der vorher berechneten Integrationsfläche die Adhäsionskraft errechnet. Die Adhäsionskraft wurde in kPa angegeben.

$$\text{Adhäsionskraft (kPa)} = \frac{\text{Fmax (N)}}{\text{Integrationsfläche (mm}^2\text{)} * 1000}$$

4.5 Überprüfung der Vitalität

Als Vitalitätstest wurde ein MTT-Tetrazolium Reduktions-Assay durchgeführt. Der MTT-Test ermöglichte eine Einschätzung der Vitalität der Gewebekulturen im Anschluss an die biomechanische Testung (Riss et al. 2004).

Hierzu wurde eine Stammlösung („staining solution“) angesetzt. Diese setzte sich aus 5 mg MTT/ ml in destilliertem Wasser, welches durch 0,2 µm Filterpapier steril filtriert wurde, zusammen. Die biomechanisch getesteten Konstrukte wurden im Anschluss in einer Mikrotiterplatte in 400 µl Nährmedium mit 40 µl „MTT-staining-solution“ auf einem Orbitalshaker bei 37° C für mindestens zwei Stunden inkubiert.

Mit Hilfe des MTT-Tests wird die Aktivität der Dehydrogenasen in den Mitochondrien getestet. Nach Zugabe von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) nehmen die vitalen Zellen die Färbelösung als Substrat auf und wandeln sie in das dunkelblaue Formazan um. Vitale Konstrukte zeigen sich blau verfärbt, avitale Konstrukte zeigen sich ohne bzw. mit geringer blauer Färbung.

Im Rahmen der Versuchsgruppe „D0“ wurde zur Qualitätskontrolle des MTT-Assays im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine zweite Gruppe als Negativkontrolle (Tot-CTRL) getestet. In der Negativkontrollgruppe wurden mehrere Knorpelscheiben dreimalig bei -80°C eingefroren, um alle Knorpelzellen des Konstrukts abzutöten.

In den Vorversuchen wurde zudem eine photometrische Messung der optischen Dichte zur genaueren Bestimmung der Zytotoxizität durchgeführt. Hierzu wurden die Konstrukte in $400\ \mu\text{l}$ Nährmedium mit $40\ \mu\text{l}$ „staining solution“, wie bereits beschrieben, bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Die „staining solution“ wurde entfernt und eine „solubilization solution“ (10 % Triton X-100 und 0,1 N HCL in 2-Propanol) hinzugegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Konstrukte über Nacht inkubiert. Die optische Dichte der Lösung wurde durch eine Absorptionsphotometrie bei einer Wellenlänge von 570 nm ermittelt, um die Menge des herausgelösten Farbstoffes zu quantifizieren.

4.6 Histologie

Ein Teil der Proben wurde für histologische Untersuchungen präpariert. Die Stichproben wurden hierfür zunächst über Nacht in 3,7 % Formalin fixiert. Die formalinfixierten Proben wurden dann in Paraffin eingebettet und im Mikrotom Querschnitte mit einer Schnittdicke von $2\ \mu\text{m}$ angefertigt. Die Schnitte wurden auf die Objektträger aufgezogen, im warmen Wasserbad geglättet und anschließend bis zu 12 Stunden in einem Ofen bei 45°C getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe. Die entparaffinierten Schnitte wurden dann mit Safranin-O zur Darstellung des Proteoglykangehalts (Lillie und Fullmer 1976) und mittels Antikörperfärbung zur Darstellung von Kollagen Typ I und II angefärbt.

Safranin-O:

Wie bereits beschrieben sind Proteoglykane Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und lassen sich mittels Safranin-O-Färbung darstellen. Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Protokoll „Safranin-O-Färbung“:

1. Spülung in destilliertem Wasser für 1 min
2. Weigert`s Hematoxylin für 6 min
3. Eintauchen in destilliertes Wasser
4. Eintauchen in 0,5 % Salzsäure-Ethanol
5. Spülung unter laufendem Leitungswasser für 5 min
6. 0,02 % „Fast Green“ für 4 min
7. 3 x Eintauchen in 1 % Essigsäure
8. 0,1 % Safranin-O für 6 min
9. 10 x Eintauchen in 95 % Ethanol
10. 20 x Eintauchen in 100 % Propanol
11. Xylol für 2 min
12. Aufkleben der Deckgläser auf die Objektträger mittels Entellan®

Immunohistochemische (IHC) Färbung für Kollagen I und Kollagen II:

Zur Darstellung von Kollagen I und II in der Integrationszone erfolgte eine immunhistochemische Antikörper (AK)-Färbung. Auf die fixierten Gewebeschnitte wurde zuerst der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der entsprechende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper (IgG des Primär-Antikörpers) appliziert und für 1h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte dann noch eine Kernfärbung und das Eindeckeln mit DAPI Mounting Medium (1:1000). Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte lichtgeschützt eingedeckt und dunkel bei 4° C gelagert. Die Färbung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Protokoll IHC- Färbung für Kollagen I und Kollagen II:

1. Andau in Proteinase K Lösung für 10 min
2. 1 % BSA in PBS für 20 min
3. Primärer Antikörper für mind. 2h in feuchter Kammer inkubieren

Kollagen I:

1:800 Col I -AK (mAB, mouse abcam ab6308; Schwein) in Antibody Diluent (DAKO S2022)

Kollagen II:

1:400 Col II -AK (pAB, rabbit abcam ab34712; Schwein) in Antibody Diluent (DAKO S2022)

4. 3x3 min PBS
5. Sekundärer Antikörper für 1 h in feuchter Kammer inkubieren

Kollagen I:

1:400 donkey-anti-mouse Cy3 (rot) (dianova, Jackson ImmunoResearch 715-165-150)

Kollagen II:

1:400 goat-anti-rabbit Cy3 (rot) (dianova, Jackson ImmunoResearch 111-585-008)

6. Eindeckeln mit DAPI Mounting Medium (1:1000)

4.7 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der durch TestXpertII® erstellten Messdaten erfolgte mit MicrosoftExcel® und JMP®. Mit MicrosoftExcel® wurden Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Integrationskraft in Bezug auf die Integrationsfläche errechnet. Zudem wurden mit diesem Programm Diagramme und Grafiken erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels JMP®, Version 12.1.0, SAS Institute Inc., Cary, NC. Die Signifikanzberechnung wurde mittels „Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen Wert von $p \leq 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche wurde der Algorithmus der Herstellung der „Push-out-Konstrukte“ etabliert.

Algorithmus zur Herstellung der „Push-out-Konstrukte“:

1. *Extrahieren des Knorpels aus dem Ferkelknie*
2. *Ausstanzen der Knorpelzylinder*
3. *Zuschneiden der Knorpelzylinder*
4. *Markierung der Knorpelscheiben*
5. *Ausstanzen des Kern-Defekts*
6. *Fixierung des Kernstücks innerhalb des Defekts*

Die Fixierung des Kernstücks (Schritt 6/6) im Disc-Ring-Modell stellte bei der Festlegung der Standards im Algorithmus zunächst ein Problem dar, welches im Laufe der Vorversuche gelöst werden konnte. Die Fixierung erfolgte im Rahmen der Vorversuche mit zwei unterschiedlichen Methoden.

Neben der im endgültigen Versuchsaufbau gewählten Methode mittels Fibrinkleber wurde die Möglichkeit einer manuellen Fixierung erprobt. Diese manuelle Fixierung erfolgte mit Akkupunkturadeln im „press-fit“-Modell (Obradovic et al. 2001).

Der Ablauf der Probenpräparation beider Methoden unterscheidet sich in den Schritten 5/6 („*Ausstanzen des Kern-Defekts*“) und Schritt 6/6 („*Fixierung des Kernstücks innerhalb des Defekts*“) wesentlich. Die Unterschiede werden im Folgenden jeweils beschrieben.

5.1.1 „Press-fit“-Modell

Im Rahmen der Vorversuche mit manueller Fixierung des Kernstücks wurde das 3,5 mm messende Kernstück mittels 2 im 90° Winkel zueinander eingebrachten Akkupunkturadeln im

Knorpelring verankert. Die Akkupunkturnadeln bestanden aus sterilem, medizinischem Edelstahl mit einem kupferhaltigen Griff (Abb. 10).

Wie in den Abbildungen 11 und 12 ersichtlich wurden die 3.5 mm Kernstücke hierzu händisch in den Knorpelring gedrückt und in eine speziell hierfür angefertigte Haltevorrichtung eingebracht. Die U-förmige Vorrichtung aus Polyethylen hatte eine Einkerbung mit der Höhe von 1 mm und war flexibel, sodass eine vorübergehende Fixierung des Konstruktes gegeben war. Die endgültige Fixation gelang dann durch die eingebrachten Akkupunkturnadeln.

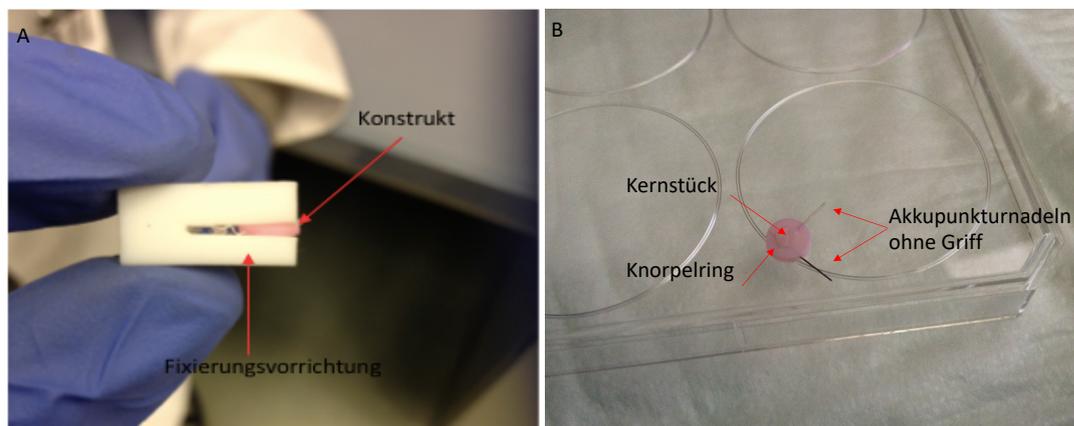


Abb. 11: Foto der U-förmigen Fixierungsvorrichtung aus Polyethylen mit vorübergehend fixiertem „press-fit“-Konstrukt und Foto der manuellen Fixierung durch 2 Akkupunkturnadeln

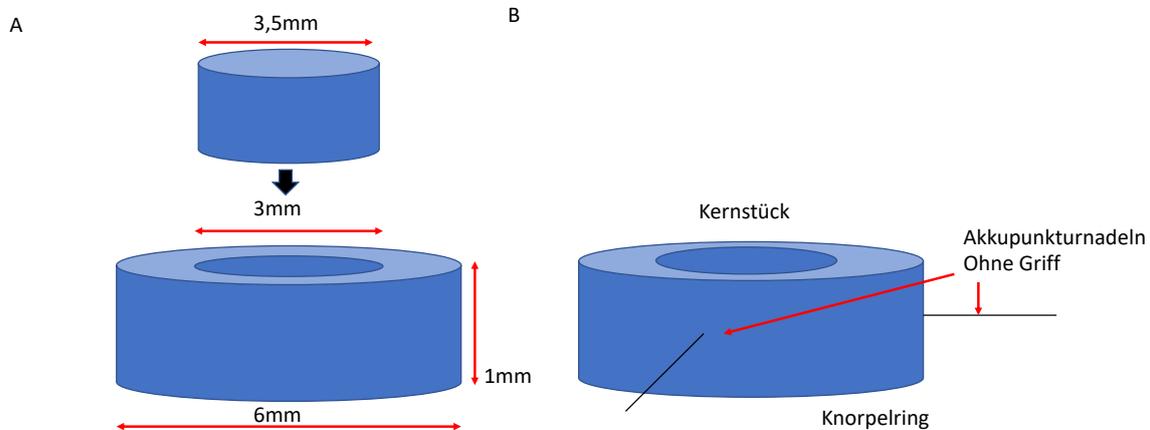


Abb. 12: Schematische Zeichnung des „press-fit“-Modells und der manuellen Fixierung durch 2 Akkupunkturadeln

Im Rahmen der ersten Kultivierung wurden die Griffe der Akkupunkturadeln noch nicht entfernt. Es zeigte sich hier jedoch beim Wechsel des Nährmediums an Tag 4, dass dies - ersichtlich an seiner unveränderten Farbe - nicht wie üblich umgesetzt wurde. Angesichts des Verdachts, dass die Konstrukte aufgrund einer Reaktion mit den nickelhaltigen Griffen nicht mehr vital waren, führten wir einen Versuch mit anschließender Vitalitätskontrolle mittels MTT-Assay durch.

Neben der 4 Tage mit Nickelgriffen kultivierten Gruppe („Griff“), aus der 4 Stichproben getestet wurden, wurden jeweils eine Kontrollgruppe ohne Fixierung („Ctrl“) und eine Gruppe mit Fixierung mittels Akkupunkturadeln nach Entfernung des Griffs („Nadel“) nach einem Tag untersucht. Zudem wurde eine Gruppe mit den entfernten Griffen für einen Tag (n=4) kultiviert und untersucht.

Es zeigte sich hier im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei den Konstrukten, welche mittels Akkupunkturadeln ohne Griff kultiviert wurden, zum Untersuchungszeitpunkt („d1“) keine Abnahme der Zellvitalität. Die mit dem nickelhaltigen Griff kultivierte Gruppe zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der „Nadel“-Gruppe jedoch mit einer deutlichen Reduzierung der Absorption bzw. der Vitalität.

Die Unterschiede der „Nadel“-Gruppe und der Kontrollgruppe gegenüber der „Griff“-Gruppe erwiesen sich im MTT-Assay mit einem p-Wert von je $< 0,001$ als signifikant. Bei den Werten der Kontrollgruppe zeigte sich gegenüber der „Nadel“-Gruppe hingegen kein signifikanter Unterschied (Abb. 13).

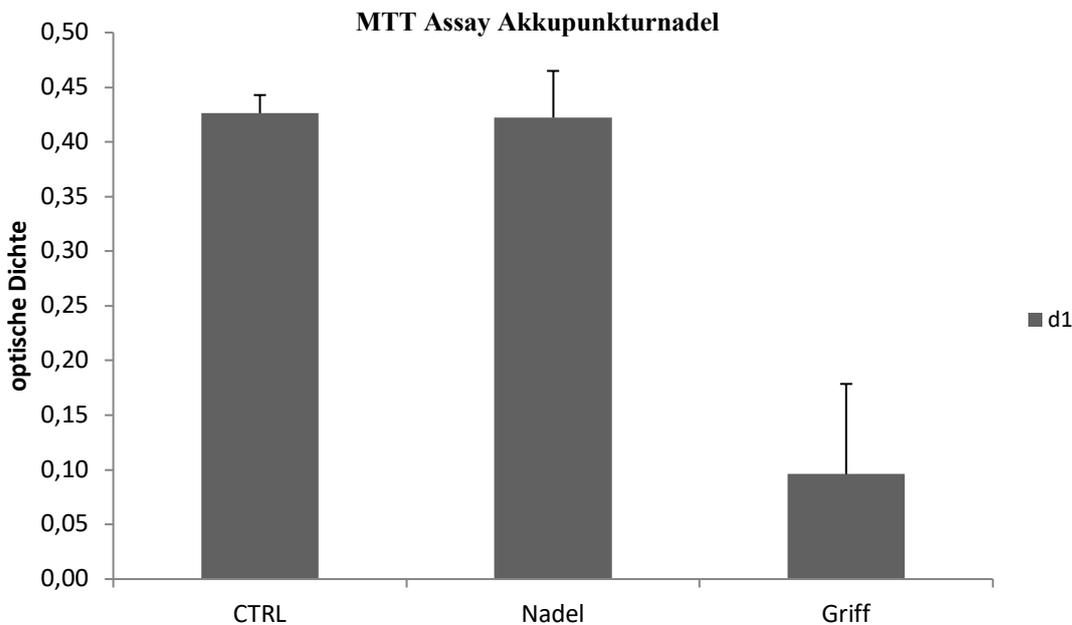


Abb. 13: Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT-Assay; **Gruppen:** Kontrolle, Nadel und Griff

Auch im weiteren Ablauf zeigten sich Probleme mit der manuellen Fixierungsmethode. Nach der Kultivierung mussten die Nadeln zur Vorbereitung der biomechanischen Messung entfernt werden. Hierbei kam es zu einer nicht zu standardisierenden Manipulation am Kernstück. Teils lockerte sich dies schon makroskopisch deutlich. Der Einfluss der Manipulation auf die Adhäsionswerte in der folgenden Push-out-Messung waren nicht objektivierbar oder abschätzbar.

In Zusammenschau der Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen entschieden wir uns für eine alternative Fixierungsmethode mittels Fibrinkleber, welche sich während der Vorversuche als geeignet zeigte.

5.1.2 Fibrinkleber

Ohne Fixierung durch die Akkupunkturadeln drückte sich der Knorpelkern mit 3,5 mm Durchmesser aufgrund der hohen zirkulären Kraft aus dem Defekt. Aus diesem Grund wurde schon im Rahmen der Vorversuche mit Fibrinkleber ein 3 mm messender „Core“ verwendet.

Zuerst wurde eine Versuchsreihe mit, wie in 4.3 beschrieben, mittels Fibrinkleber behandelten Konstrukten in 2 Gruppen für 28 Tage durchgeführt. Die erste Gruppe mit $n=7$ wurde ohne den Zusatz von Ascorbinsäure im Nährmedium kultiviert, die zweite Gruppe ($n=8$) wurde mit $50\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure im Nährmedium kultiviert. Die Gruppen wurden nach 28 Tagen Kultivierungsdauer mittels MTT im Hinblick ihrer Vitalität untersucht. Der MTT-Assay zeigte in beiden Gruppen gleich vitalen Knorpel.

Im Rahmen dieser Vorversuche zeigte sich, dass der Versuchsaufbau mit Verwendung von Fibrinkleber zur Fixierung des Kernstücks im Disc-Ring-Modell dazu geeignet war eine fehlerfreie und reproduzierbare Messung durchzuführen. Nach 28 Tagen Kultivierung mit Fibrinkleber waren die Konstrukte vital, sodass die geplante Kultivierung unter den in 4.4 genannten Kultivierungsbedingungen für die geplante Dauer von 7, 14 und 21 Tage durchgeführt werden konnte.

Als Bezugsgruppen wurden zuerst die Gruppen „D0 Nativ“ als native Gruppe und „D0 Fibrin“ getestet. Die Gruppe „D0 Nativ“ wurde ohne Kultivierung (Tag 0) und ohne Fixierung mittels Fibrinkleber direkt nach der Probenpräparation als Bezugs-/ Kontrollgruppe biomechanisch untersucht und Stichproben für die Histologie gewonnen. Die Gruppengröße der biomechanischen Messung von „D0 Nativ“ belief sich auf $n= 43$. Die Gruppe „D0 Fibrin“ mit $n= 8$ wurde nach der Probenpräparation und Fixierung mit Fibrin ohne anschließende Kultivierung (Tag 0) untersucht.

Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Adhäsionskraft beider Gruppen mit 3,17 kPa für die nativ gemessene Gruppe „D0 Nativ“ und 12,32 kPa für die mit Fibrinkleber behandelte Gruppe „D0 Fibrin“ mit $p > 0,0001$ (Abb. 14).

In die weiteren Versuche wurde die mit Fibrinkleber fixierte Gruppe als Referenz ohne weitere Kultivierung (Tag 0) integriert und ist in der grafischen Darstellung ab 5.2.1 jeweils als Bezugsgruppe „D0“ abgebildet.

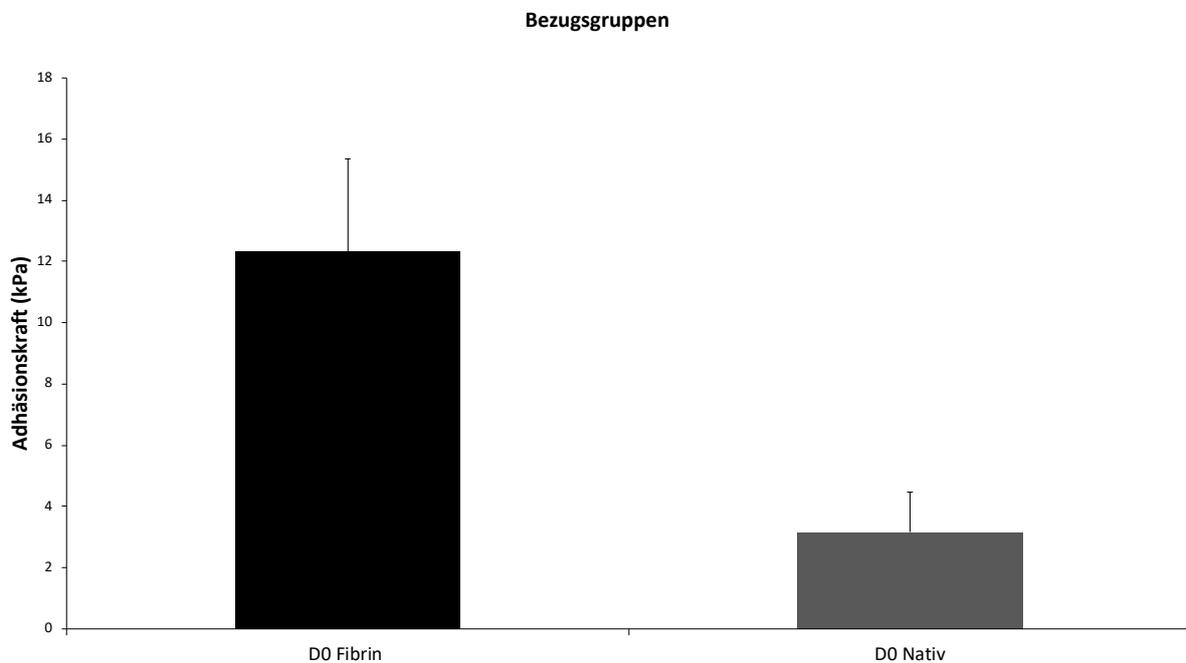


Abb. 14: Grafische Darstellungen der gemessenen Adhäsionskraft der Bezugsgruppen „D0 Fibrin“ und „D0 Nativ“ in kPa

5.2 Kontrolle der Vitalität

Die hergestellten Knorpelkonstrukte wurden zur Untersuchung der Vitalität nach der Kultivierung, wie schon im Material und Methoden Teil unter Kapitel 4.6 beschrieben, mittels MTT-Assay untersucht. Die untersuchten „Push-out-Konstrukte“ aller Gruppen waren nach den Versuchen jeweils makroskopisch vital mit deutlicher blauen Anfärbung des kompletten Knorpelrings und des Kernstücks. Es zeigte sich kein Hinweis auf Toxizität der Zusatzstoffe Ascorbinsäure und EDHB in den verwendeten Konzentrationen.

5.3 Biomechanische Untersuchung

In den Vorversuchen zeigte sich, dass Ascorbinsäure für die Integration essentiell ist. Ohne Ascorbinsäure im Nährmedium blieb das Gewebe zwar vital, jedoch zeigte sich kaum messbare mechanische Integration. Um eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Kollagensynthese und auf die Integration zu untersuchen, wurden die unter 4.4 genannten 5 Gruppen jeweils in 3 unabhängigen biologischen Versuchen mit unterschiedlichen Laufzeiten mit den Endpunkten von 7, 14 und 21 Tagen inkubiert. Die biomechanischen Ergebnisse der einzelnen Versuche sind jeweils in den Abbildungen 15 bis 17 graphisch dargestellt. Aufgrund der Korrelation wurden die Ergebnisse aller Versuche in Abbildung 18 zusammengefasst.

Um den Einfluss der Kollagensynthese auf die Integration in langzeitstabilem Fibrinkleber zu untersuchen, erfolgten im Anschluss an die Kultivierung biomechanische Messungen. Die Daten zeigten dabei den deutlichen Effekt von Ascorbinsäure auf die Integration von nativem Gelenkknorpel auf zwei Weisen; durch die Abwesenheit von Ascorbinsäure im Kulturmedium in der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ und durch die Blockierung der Kollagensynthese durch den Kollagensyntheseinhibitor EDHB.

5.3.1 Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Integration

In den Gruppen mit 7 Tagen Kulturdauer zeigten sich signifikant höhere Adhäsionswerte bei den mit Ascorbinsäure kultivierten Gruppen im Vergleich zu der Gruppe ohne Zusatz von Ascorbinsäure („w/o Ascorbinsäure“) mit $p= 0,0024$ für die Gruppe mit $50 \mu\text{g/ml}$ und $p= 0,0122$ für $100 \mu\text{g/ml}$. Die zwei Gruppen mit den differenten Ascorbinsäurekonzentrationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in den gemessenen Adhäsionswerten mit $p= 0,3179$.

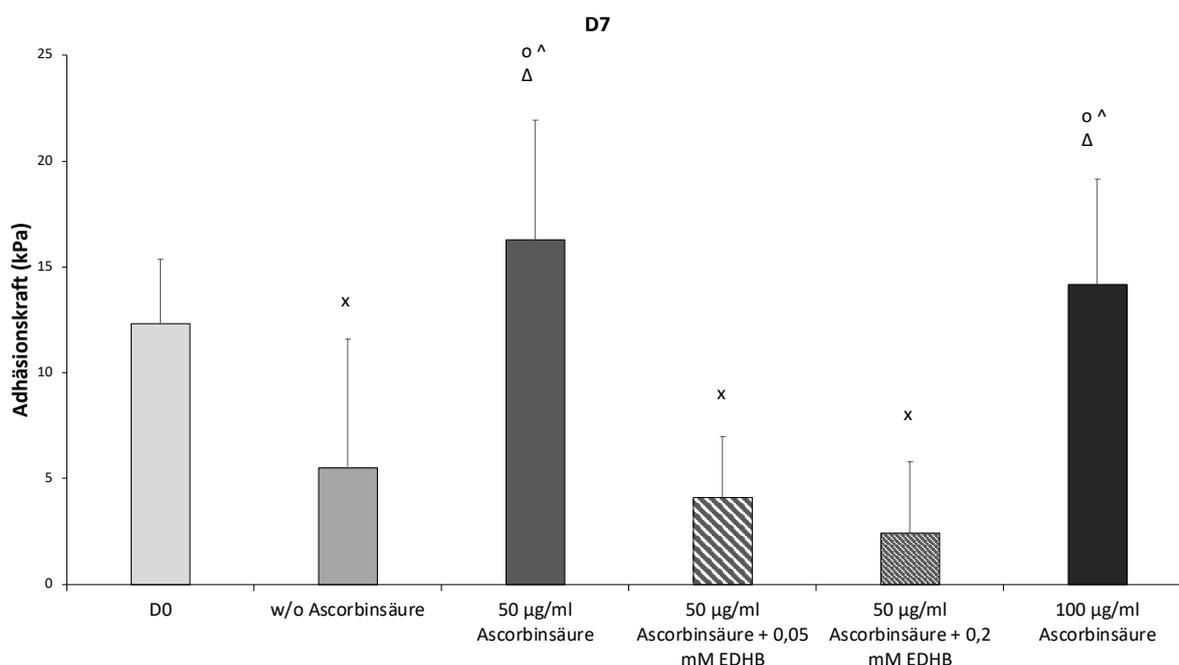


Abb. 15: Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 7; **Gruppen:** Bezugsgruppe „D0“, Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ ohne den Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure“, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“, Gruppe „100 µg/ml Ascorbinsäure“. **Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0.05$) sind wie folgt gekennzeichnet:** x= signifikant zu den Werten von „D0“, Δ= signifikant zu den Werten von „w/o Ascorbinsäure“, ^= signifikant zu den Werten von „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“, o= signifikant zu den Werten von 50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB

Im Vergleich der Adhäsionswerte der Gruppen mit Ascorbinsäure zu der Bezugsgruppe „D0“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied, jedoch wiesen die mit Ascorbinsäure kultivierten Gruppen mit je 16,28 und 14,17 kPa Adhäsionskraft leicht erhöhte Durchschnittswerte als „D0“ (12,32 kPa) auf. Die Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ (n=7) zeigte mit $p=0,0428$ im Vergleich zu der Gruppe „D0“ an Tag 7 signifikant niedrigere Adhäsionswerte.

Die Gruppen mit 50 µg/ml Ascorbinsäure und Zusatz von EDHB (0,05 mM mit n=12 und 0,2 mM mit n=8) zeigten zu der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu den Gruppen mit Ascorbinsäure, sowie zu der Bezugsgruppe „D0“ jedoch zeigten die beiden Gruppen mit Zusatz von EDHB jeweils signifikant niedrigere Mittelwerte in der gemessenen Adhäsionskraft mit je $p < 0,0001$ (Abb. 17).

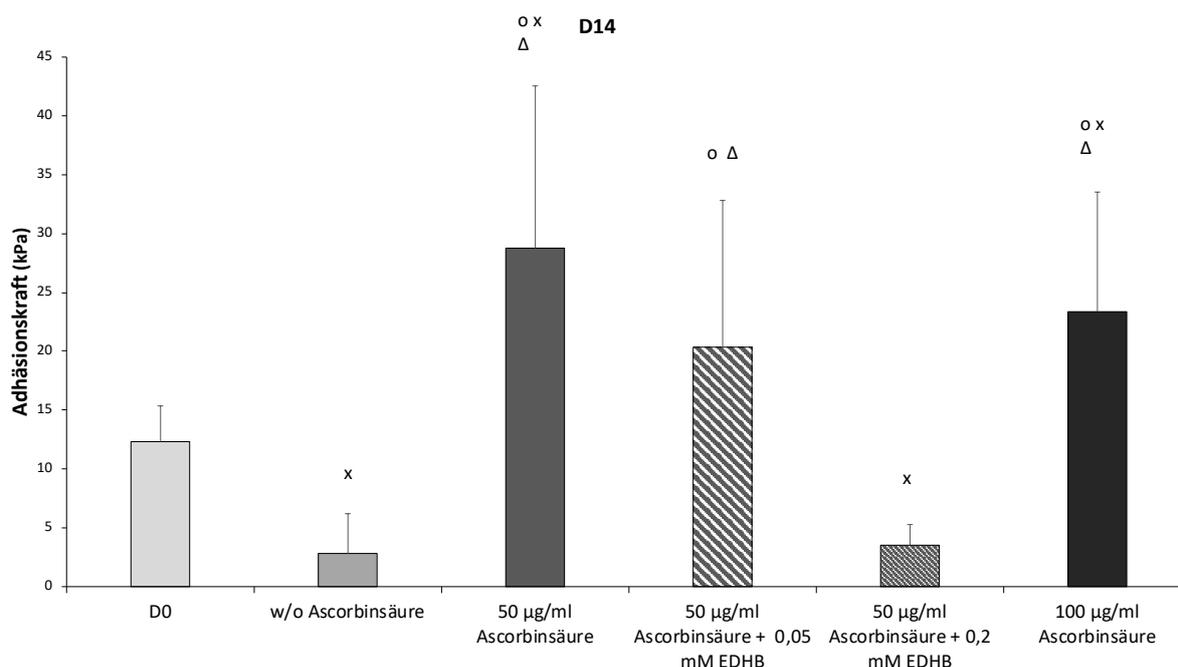


Abb. 16: Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 14; **Gruppen:** Bezugsgruppe „D0“, Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ ohne den Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure“, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“, Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“, Gruppe „100 µg/ml Ascorbinsäure“. **Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0.05$) sind wie folgt gekennzeichnet:** x= signifikant zu den Werten von „D0“, Δ= signifikant zu den Werten von „w/o Ascorbinsäure“, o= signifikant zu den Werten von 50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB

An Tag 14 zeigte sich, wie in Abbildung 16 ersichtlich, weiterhin ein Unterschied zwischen den mit Ascorbinsäure kultivierten Gruppen (je n=12) zu der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ (n=16) und der Bezugsgruppen „D0“ bei, mit jeweils $p < 0,0001$, signifikant höheren Adhäsionswerten der Ascorbinsäuregruppen. Die beiden Gruppen mit Ascorbinsäurezusatz zeigten erneut mit 28,77 kPa und 23,37 kPa und $p = 0,2311$ keine signifikante Differenz der Integrationswerte.

Die Gruppen mit Zusatz von 0,2 und 0,05 mM EDHB zeigten mit $p < 0,0001$ an Tag 14 einen signifikanten Unterschied der Integrationswerte zueinander, wobei die höher konzentrierte Gruppe mit 0,2 mM EDHB im Vergleich deutlich niedrigere Adhäsionswerte zeigte. Die Gruppe 0,05 mM Zusatz von EDHB zeigte zu der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ signifikant

höhere Werte mit $p < 0,0001$, jedoch zu „D0“ und den beiden Ascorbinsäuregruppen mit 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ keine signifikante Differenz. Die Gruppe mit 0,2 mM EDHB zeigte mit $p = 0,0002$ signifikant niedrigere Adhäsionswerte in Bezug auf die Bezugsgruppe „D0“.

Die Gruppen „50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“ und „w/o Ascorbinsäure“ zeigten weiterhin mit 3,52 kPa und 2,82 kPa untereinander ähnliche Adhäsionswerte ohne signifikanten Unterschied. Im Vergleich zu den Gruppen „50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure“ und „100 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure“ jedoch zeigten beide, jeweils mit $p < 0,0001$, signifikant niedrigere Werte in Bezug auf die Integrationsstärke.

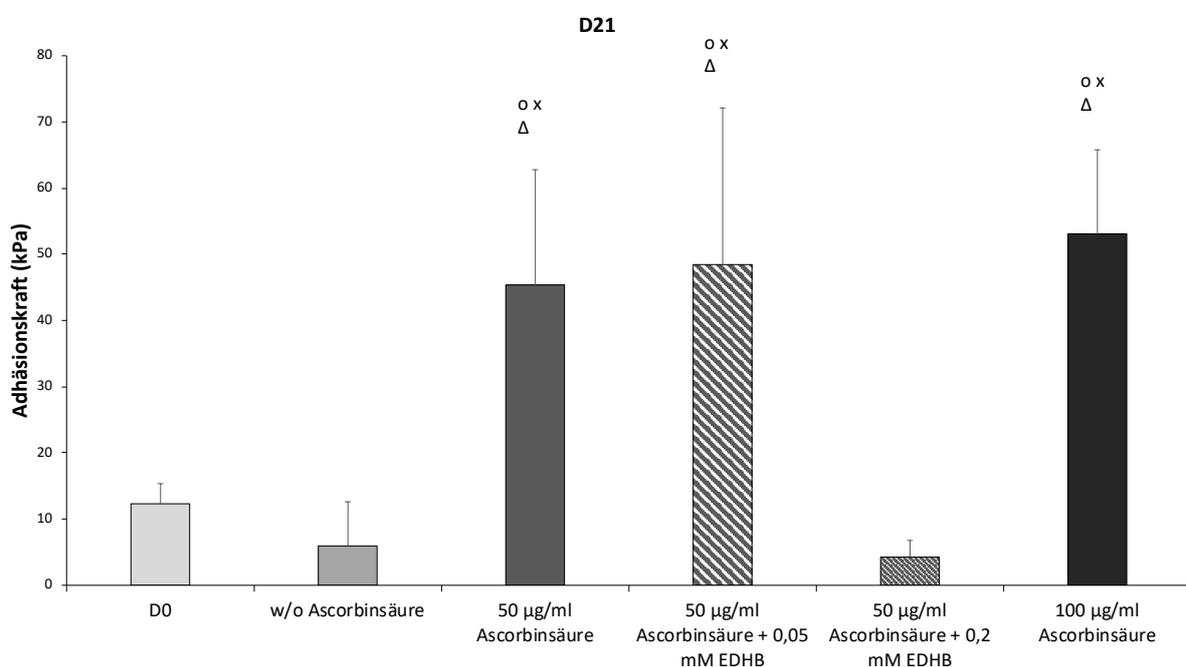


Abb. 17: Biomechanische Untersuchung der Adhäsionskraft in kPa an Tag 21; **Gruppen:** Bezugsgruppe „D0“, Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ ohne den Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium, Gruppe „50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure“, Gruppe „50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“, Gruppe „50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“, Gruppe „100 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure“. **Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0,05$) sind wie folgt gekennzeichnet:** x= signifikant zu den Werten von „D0“, Δ= signifikant zu den Werten von „w/o Ascorbinsäure“, o= signifikant zu den Werten von 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB

An Tag 21 zeigten sich jeweils signifikant höhere Adhäsionswerte bei den Gruppen mit Zusatz von Ascorbinsäure (50 $\mu\text{g/ml}$ mit $n = 10$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ mit $n = 9$) und der Gruppe „50 $\mu\text{g/ml}$

Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“ im Vergleich sowohl zu der Bezugsgruppe „D0“ (n=10), zu der Gruppe ohne Zusatz von Ascorbinsäure „w/o Ascorbinsäure“ (n=10) und zu der Gruppe „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“, jeweils mit einer Signifikanz von $p > 0,0001$. Die Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure und mit Zusatz von 0,05 mM EDHB zeigten mit Werten von 48,45 kPa, 45,37 kPa und 53,1 kPa gegeneinander keine signifikante Differenz.

Die Gruppen „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“, „w/o Ascorbinsäure“ und „D0“ zeigten sich an Tag 21, anders als an Tag 7 und 14, untereinander ohne signifikanten Unterschied in der biomechanisch messbaren Integration (Abb. 19).

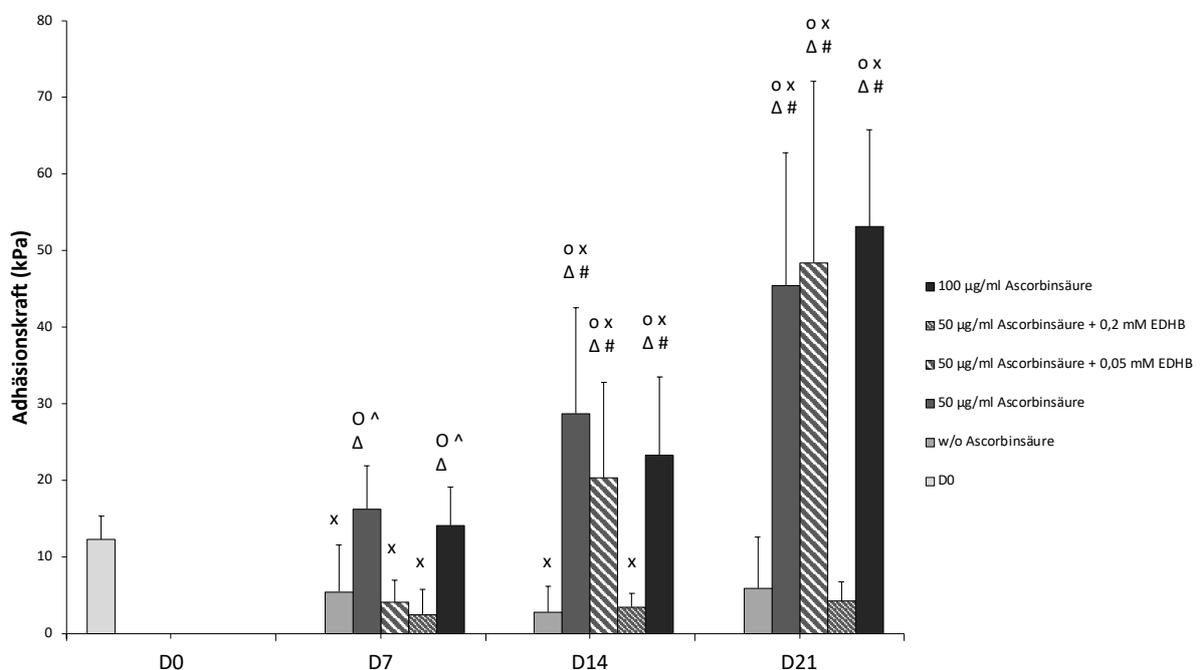


Abb. 18: Zusammenfassende Darstellung der biomechanischen Untersuchungen der Adhäsionskraft (kPa) aller Gruppen an Tag 0, 7, 14 und 21; **Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0,05$) sind wie folgt gekennzeichnet:** x= signifikant zu den Werten von „D0“, Δ= signifikant zu den Werten von „w/o Ascorbinsäure“, ^= signifikant zu den Werten von „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“, o= signifikant zu den Werten von 50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB, #= signifikant zu dem Wert derselben Gruppe zum vorherigen Zeitpunkt

Abbildung 18 zeigt noch einmal zusammenfassend die biomechanisch getesteten Gruppen an Tag 7, 14 und 21. Die mit EDHB kultivierten Gruppen zeigten im Gesamtüberblick im direkten

Vergleich an Tag 7 noch keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsionsstärke. An Tag 14 und 21 zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einer Steigerung der Werte der Gruppe mit der niedrigeren Konzentration von 0,05 mM. Die Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure zeigten sich an Tag 7 noch mit signifikantem Unterschied zu der Gruppe mit niedrig dosiertem EDHB-Zusatz. Ab Tag 14 gibt es keine signifikante Differenz der drei Gruppen untereinander. Jedoch zeigten sich ab Tag 14 signifikant höhere Werte dieser Gruppen im Vergleich zu der Gruppe mit hoch dosiertem EDHB (0,2 mM). Die Gruppen ohne Ascorbinsäure und mit Zusatz von 0,2 mM EDHB zeigten sich zu allen Testzeitpunkten ohne signifikanten Anstieg der Integrationswerte.

Als Bezugsgruppe wurde, wie unter 5.1.2 beschrieben, „D0 Fibrin“ als Bezugsgruppe in den Abbildungen 15 bis 18 als „D0“ grafisch dargestellt. „D0 Nativ“ wurde als weitere Referenzgruppe, welche weder geklebt noch kultiviert wurde, nicht grafisch dargestellt. An Tag 7, 14 und 21 zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der ohne Zusatz von Ascorbinsäure kultivierten Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ und der Gruppe „D0 Nativ“.

5.3.2 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Integration

Dargestellt in Abbildung 19 ist der Mittelwert der gemessenen Adhäsionskraft in kPa als Maß für die Integration in Abhängigkeit von der Dauer der Gewebekultivierung.

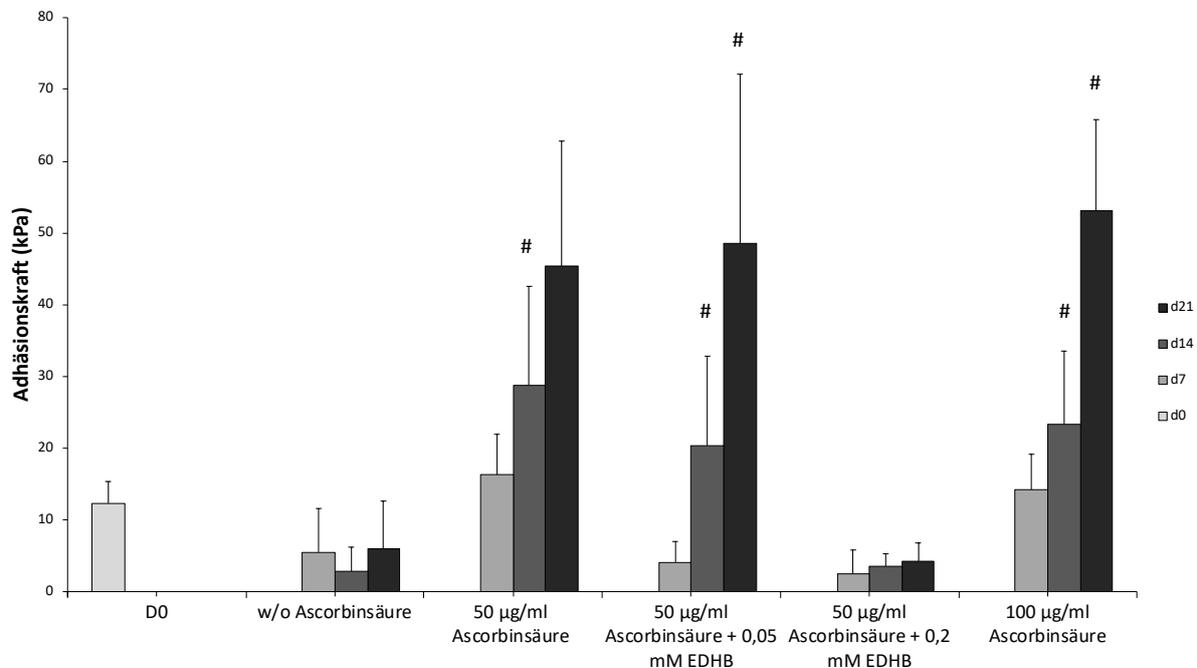


Abb. 19: Grafische Darstellungen der gemessenen Adhäsionskraft (kPa) innerhalb der getesteten Gruppen an Tag 0, 7, 14 und 21; **Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0.05$) sind wie folgt gekennzeichnet: #=** signifikant zu dem Wert derselben Gruppe zum vorherigen Zeitpunkt

Für die Gruppe ohne Ascorbinsäure im Nährmedium zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Werte an Tag 7, 14 und 21 zueinander. Für die Gruppe mit hohem Zusatz von EDHB im Nährmedium mit 0,2 mM zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Werte an Tag 7, 14 und 21 zueinander.

In der Gruppe mit dem niedrig dosierten Zusatz von EDHB (0,05 mM) im Nährmedium kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Adhäsionswerte von Tag 7 mit 4,11 kPa auf 20,35 kPa an Tag 14 und 48,45 kPa an Tag 21 mit jeweils $p < 0,0001$.

Die Gruppen mit 50 µg/ml Ascorbinsäure im Nährmedium zeigte einen signifikanten Anstieg der Integrationswerte von Tag 7 auf Tag 14 ($p= 0,0274$) und Tag 7 auf Tag 21 ($p= 0,0001$). Die Steigerung der Werte von Tag 14 auf Tag 21 war mit $p < 0,07$ nicht signifikant.

Die Gruppe mit 100 µg/ml Ascorbinsäure im Nährmedium zeigte einen signifikanten Anstieg der Integration von Tag 7 auf Tag 14 ($p= 0,0347$), von Tag 7 auf Tag 21 ($p < 0,0001$) und von Tag 14 auf Tag 21 ($p= 0,0003$) (Abb. 19).

5.4 Histologische Untersuchung

Zur Untersuchung der Integrationszone zwischen Kernstück und Knorpelring wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt. Um die kollagenen Fasern darzustellen, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ II bestehen, wurde eine immunhistochemische Färbung auf Kollagen Typ I und II durchgeführt. Zur histologischen Untersuchung der Proteoglykane als Hauptbestandteil der gallertartigen extrazellulären Matrix erfolgte eine Safranin-O-Färbung.

5.4.1 Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Glykosaminoglykansynthese

D7

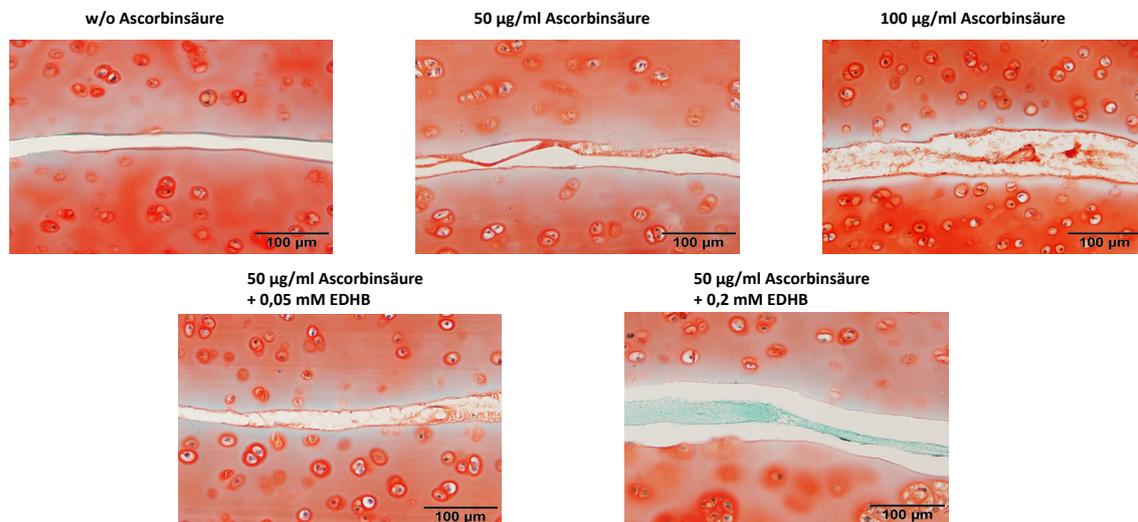


Abb. 20: Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 7; Histologische Schnitte wurden auf Glykosaminoglykane mit Safranin-O gefärbt. Größenmaßstab 100µm

Die Safranin-O-Färbungen an Tag 7 zeigten den unterschiedlichen Gehalt an Glykosaminoglykanen (GAG) im Defektpalt zwischen Ring und Kern. Der Defekt war bei den Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“ nicht gefärbt. Hier zeigte sich lediglich der Fibrinkleber als bläuliche Struktur im Spalt. Bei den Gruppen „50 µg/ml Ascorbinsäure“, „100 µg/ml Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,05 mM EDHB“ zeigte sich der Defekt nur noch rudimentär mit Kleber gefüllt. Bei diesen Gruppen war zu diesem Zeitpunkt bereits eine Matrixbildung im Sinne einer Extrazellulärmatrixsynthese zu erkennen (Abb. 20).

D14

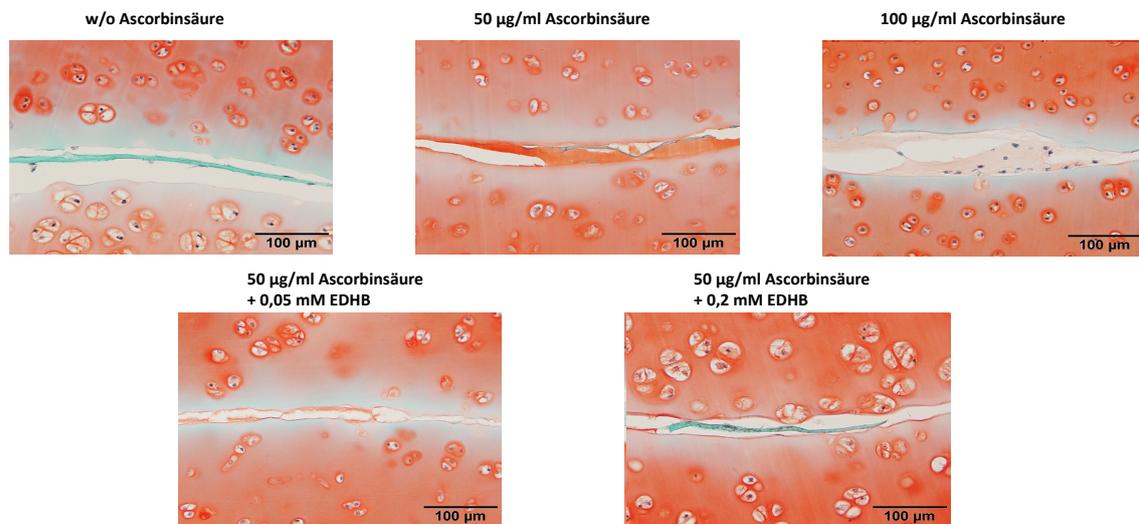


Abb. 21: Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 14; Histologische Schnitte wurden auf Glykosaminoglykane mit Safranin-O gefärbt. Größenmaßstab 100µm

An Tag 14 zeigte sich ebenfalls eine Anfärbung der Matrix im Defektbereich bei den Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure und 50 µg/ml Ascorbinsäure mit Zusatz von 0,05 mM EDHB im Sinne einer zunehmenden Matrixsynthese. Die Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + 0,2 mM EDHB“ zeigten histologisch weiterhin keinen Nachweis einer Proteoglykansynthese. Auch an Tag 14 zeigten sich bei diesen beiden Gruppen rudimentäre Fibrinkleberreste als bläuliche Struktur im Defektpalt (Abb. 21).

D21

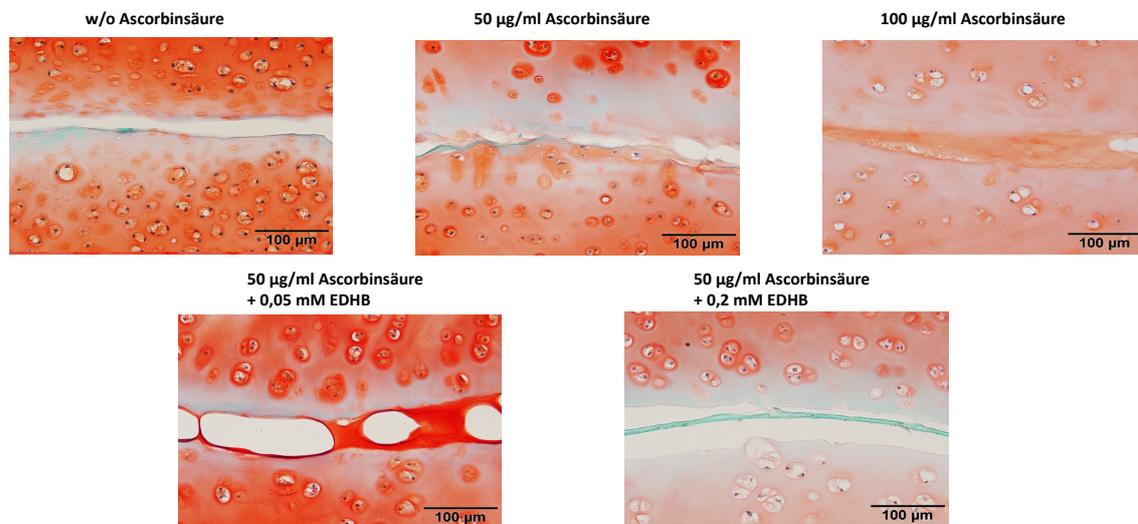


Abb. 22: Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 21; Histologische Schnitte wurden auf Glykosaminoglykane mit Safranin-O gefärbt. Größenmaßstab 100µm

Abbildung 22 zeigt bei den Gruppen mit 50 und 100 µg/ml Ascorbinsäure eine kompakte Matrixbildung im Defektspace an Tag 21. Bei der Gruppe mit niedrig dosiertem EDHB zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine eindeutige ECM-Synthese. Zudem zeigte sich bei diesen drei Gruppen an Tag 21, wie auch schon an Tag 14, eine vermehrte Migration von Knorpelzellen in den mit Extrazellulärmatrix gefüllten Defektbereich. Bei den Gruppen ohne Ascorbinsäure und mit hoch dosiertem EDHB zeigten sich auch nach 21 Tagen keine histologisch nachweisbare Extrazellulärmatrix im Defektspace.

5.4.2 Einfluss der Ascorbinsäure- und EDHB-Konzentration auf die Kollagensynthese

Die in Abbildungen 23 bis 25 dargestellten Bilder der histologischen Präparate der Kollagen Typ II-Färbung zeigen den unterschiedlichen Gehalt an Kollagen im Defektspace zwischen Ring und Kernstruktur. Die Kollagen Typ II Immunhistochemie zeigte bei den beiden Gruppen mit

Zusatz von Ascorbinsäure im Nährmedium eine starke Färbung, kennzeichnend für die Bildung einer Kollagenmatrix im Bereich der Integrationszone.

D7

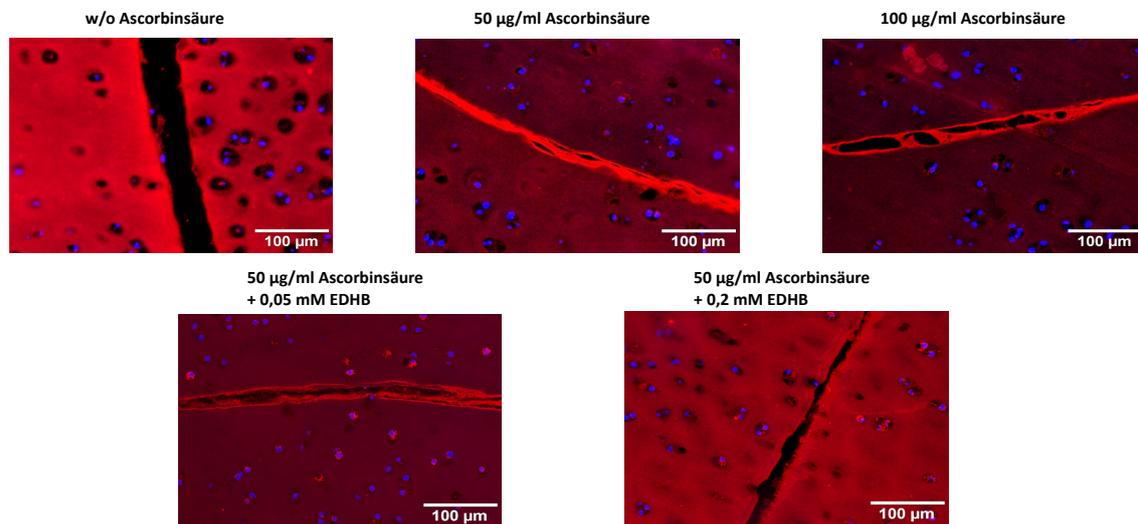


Abb. 23: Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 7; Größenmaßstab 100µm

Nach 7 Tagen zeigte sich bei den mit 50 und 100 µg/ml Ascorbinsäure kultivierten Präparaten der immunhistochemische Nachweis einer kollagenen Matrixbildung im Defektspace. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den Präparaten der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ keine Kollagenmatrix. Im Bereich der neu gebildeten Matrix im Defektspace zeigten sich bei den Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure Knorpelzellen, zu erkennen an den blau gefärbten Zellkernen.

Unter dem Einfluss von EDHB zeigte sich an Tag 7 bei einer hohen Konzentration des Kollagensyntheseinhibitors („0,2 mM EDHB“) histologisch keine eindeutige Kollagensynthese im Defekt, vergleichbar mit der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“. Unter dem Zusatz einer niedrigen Konzentration EDHB („0,05 mM EDHB“) jedoch zeigte sich nach 7 Tagen eine Kollagensynthese im Randbereich des Defektspace (Abb. 23). Verglichen mit der Matrixbildung der Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure zeigte sich diese eher randständig, im Defektspace zeigte sich eine geringere Färbung, beziehungsweise vergleichsweise weniger Kollagenmatrix.

D14

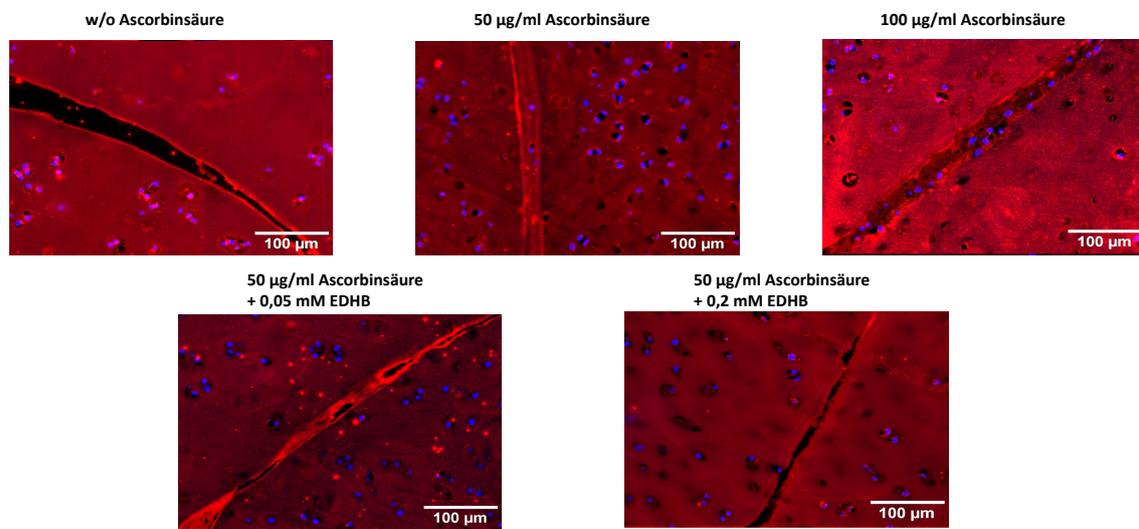


Abb. 24: Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 14; Größenmaßstab 100µm

In der Abbildung 24 lässt sich bei den mit Ascorbinsäure sowie niedrig dosiertem EDHB-Zusatz kultivierten Präparaten nach 14 Tagen eine kompakte Matrixbildung erkennen. Dies zeigte sich in nahezu der gesamten Zirkumferenz des Defektpaltes. Im Bereich der neu gebildeten Matrix im Defektpalt zeigten sich bei der Gruppe mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure Chondrozyten, zu erkennen an den blau gefärbten Zellkernen in der 20-fachen Vergrößerung. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den Präparaten der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ und den Präparaten der hochdosierten EDHB-Gruppe keine Kollagenmatrix im Defektbereich.

D21

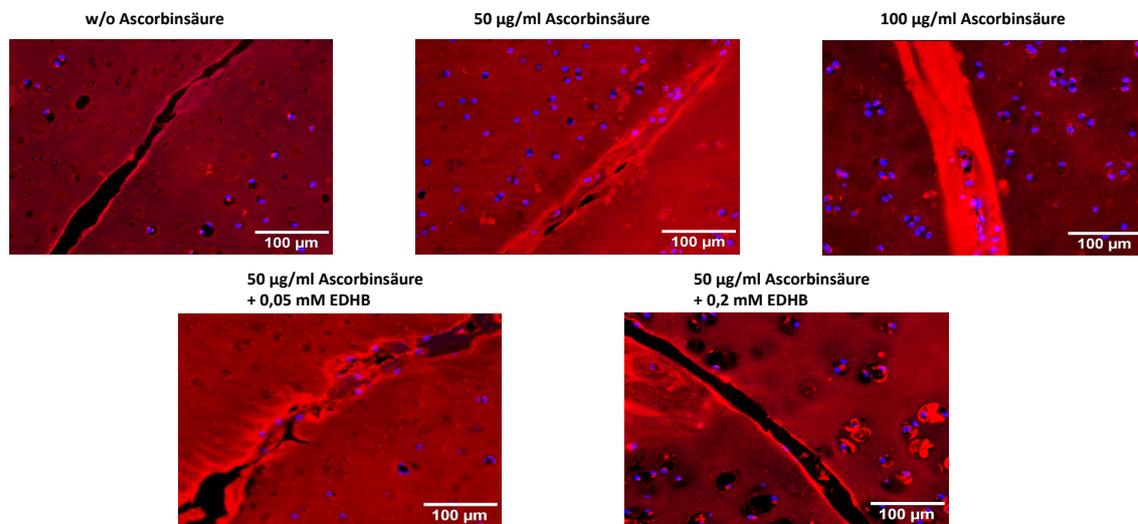


Abb. 25: Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 21; Größenmaßstab 100µm

Abbildung 25 zeigt ebenfalls eine kompakte Matrixbildung in nahezu der gesamten Zirkumferenz des Defektspaltes an Tag 21 des Kultivierungsprozesses bei einer Konzentration von 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure im Nährmedium. Im Vergleich dazu zeigen die Abbildungen der histologisch untersuchten Gruppe ohne Ascorbinsäurezusatz auch an Tag 21 keine Matrixbildung. Im Bereich der neu gebildeten Matrix im Defektspalt zeigten sich auch an Tag 21 bei der Gruppe mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure Chondrozyten in der 20-fachen Vergrößerung.

Auch an Tag 21 zeigte sich bei der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ und der Gruppe mit hochdosiertem Zusatz von EDHB weiterhin keine suffiziente Kollagensynthese in der histologischen Untersuchung. Die Gruppe mit Zusatz von 0,05 mM EDHB zeigte eine Färbung im Bereich der Zirkumferenz des Defekts ähnlich der Gruppen mit 50 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure zu diesem Zeitpunkt. Zusätzlich zeigte sich auch hier eine Migration von Knorpelzellen im Bereich der neu gebildeten Kollagenmatrix (Abb. 25).

5.4.3 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Glykosaminoglykansynthese

Zwischen den Gruppen „50 µg/ml Ascorbinsäure“, „100 µg/ml Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + EDHB 0,05 mM“ zeigte sich in der Safranin-O-Färbung im Vergleich histologisch kein eindeutiger Unterschied in Bezug auf die Nachweisbarkeit der Synthese der gallertartigen Extrazellulärmatrix im Laufe der Kultivierung. Jedoch zeigte sich bei diesen Gruppen im Zeitverlauf eine zunehmende Füllung des Defektspalts im Bereich der kompletten Zirkumferenz des Defekts. Die Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + EDHB 0,2 mM“ zeigten in der histologischen Untersuchung weder an Tag 7, 14 und 21 eine relevante Glykosaminoglykansynthese (Abb. 26).

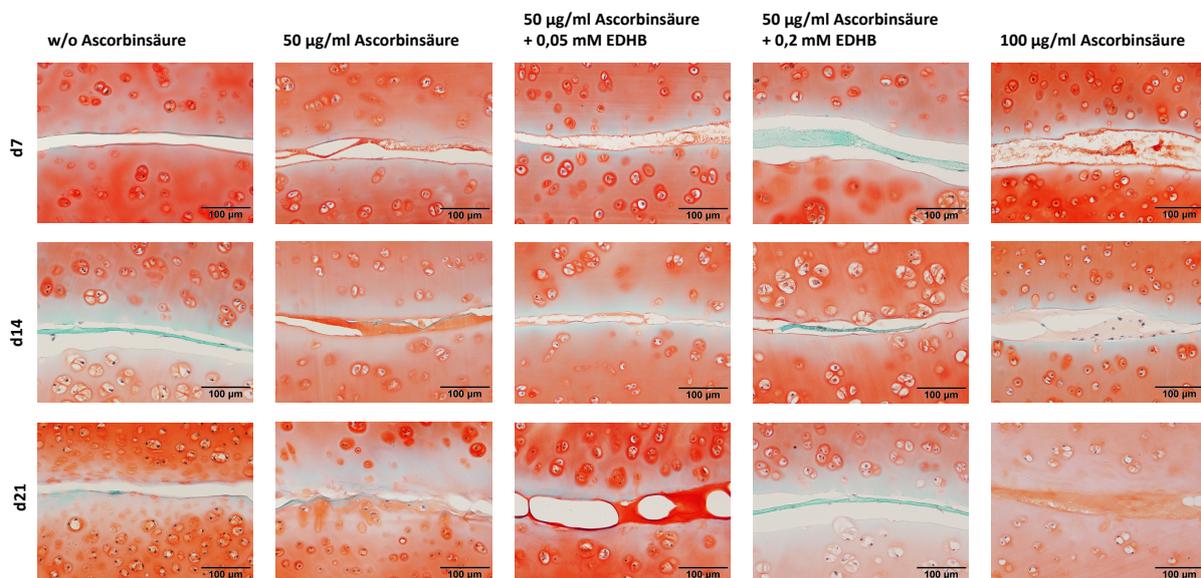


Abb. 26: Histologische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern an Tag 7, 14 und 21; Histologische Schnitte wurden auf Glykosaminoglykane mit Safranin-O gefärbt. Größenmaßstab 100µm

5.4.4 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Kollagensynthese

Zwischen den Gruppen mit 50 µg/ml Ascorbinsäure und 100 µg/ml Ascorbinsäure zeigte sich im Vergleich kein konzentrationsabhängiger Unterschied in Bezug auf die immunhistochemische Nachweisbarkeit der Kollagensynthese während der

Kultivierungsdauer. Im Vergleich zu den beiden oben genannten Gruppen zeigte die Gruppe mit Zusatz von 0,05 mM EDHB histologisch jedoch einen Unterschied an Tag 7 bezüglich der Matrixmenge im Defektspalt. An Tag 14 und 21 zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich dieser drei Gruppen. Bei den Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + EDHB 0,2 mM“ zeigte sich histologisch weder an Tag 7, 14 und 21 eine nennenswerte Kollagensynthese (Abb. 27).

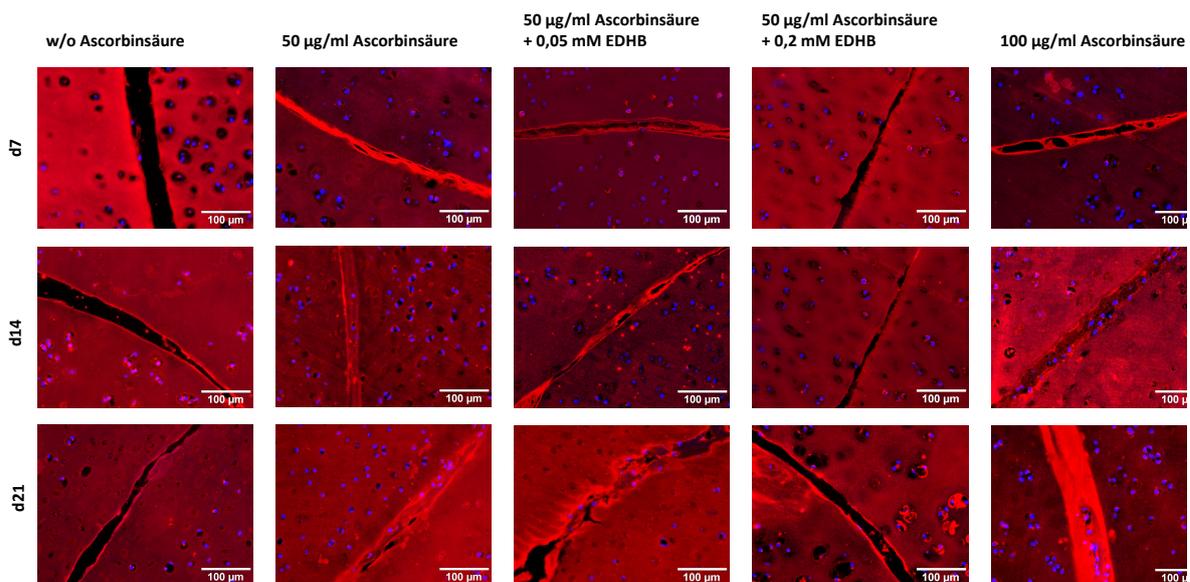


Abb. 27: Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ II-Färbung an Tag 7, 14 und 21; Größenmaßstab 100µm

In den immunhistochemischen Untersuchungen der Proben ließ sich in keiner der untersuchten Gruppen an Tag 7, 14 oder 21 in der Integrationszone Kollagen Typ I nachweisen (Abb. 28).

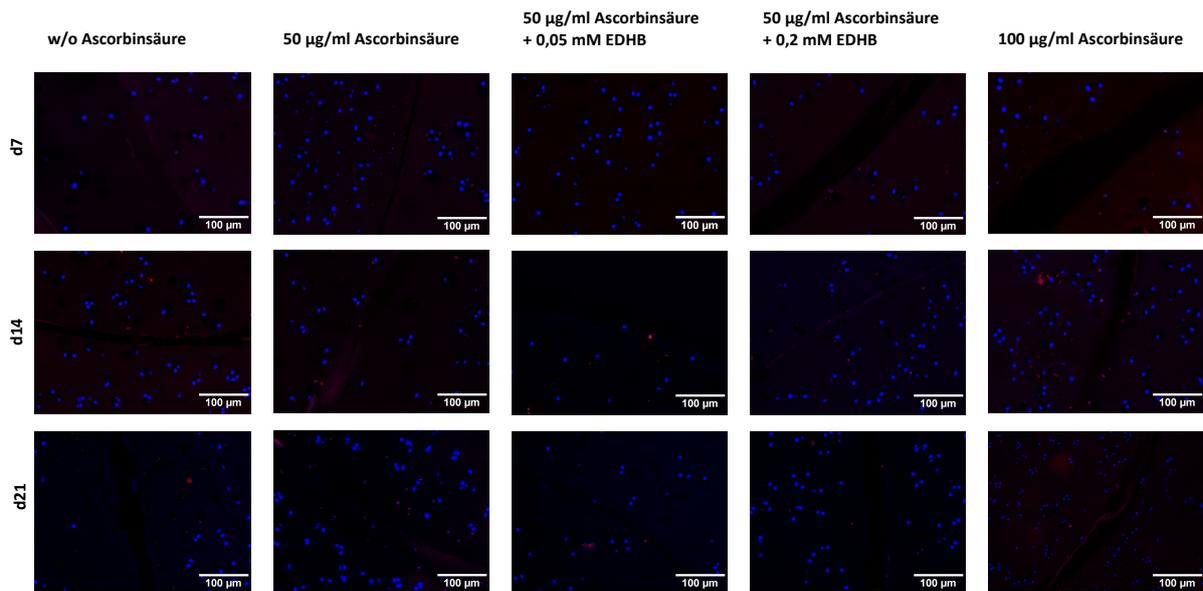


Abb. 28: Immunhistochemische Darstellung der Integrationszone zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Kollagen-Typ I-Färbung an Tag 7, 14 und 21; Größenmaßstab 100µm

6 Diskussion

Knorpeldefekte chronisch degenerativer oder traumatischer Genese zeigen eine schlechte Heilungstendenz (CDC 2010). In-vivo-Versuche zeigten zumeist eine unvollständige Integration gegenüberliegender Knorpeloberflächen. Aus diesem Grund wurde begonnen die Mechanismen der Gelenkknorpelintegration in vitro zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass der Grad der Integration von Gelenkknorpel in vitro hauptsächlich durch zwei Faktoren bestimmt wird: Zellvitalität und die Synthese, Ausrichtung und Quervernetzung von Kollagen (DiMicco und Sah 2001; DiMicco et al. 2002; Gilbert et al. 2009; Reindel et al. 1995; Theodoropoulos et al. 2016; Tognana et al. 2005). Zudem konnten Faktoren identifiziert werden, welche die Integration sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können. Unter anderem hemmen bestimmte Bestandteile der Synovialflüssigkeit durch Bindung an die Knorpeloberfläche sowie die Beeinflussung bestimmter zellulärer Prozesse im Rahmen der Kollagensynthese, die mechanische Quervernetzung der Kollagenfasern und schlussendlich die Integration (Englert et al. 2005; Khan et al. 2011; Tognana et al. 2005; Vasta et al. 2016).

Da die Kollagensynthese und -quervernetzung essentiell für die Integration von Gelenkknorpel zu sein scheinen, wurden in dieser Arbeit zur weiteren Analyse der Mechanismen der Gelenkknorpelintegration mit Ascorbinsäure und EDHB der konzentrationsabhängige Einfluss kollagensynthesefördernder und -hemmender Substanzen biomechanisch und histologisch untersucht.

6.1 Vorversuche

In den Vorversuchen wurden die optimalen Fixierungs- und Kulturbedingungen für die Knorpelkonstrukte herausgearbeitet und an das Disc-Ring-Modell nach Obradovic angepasst (Obradovic et al. 2001). Das vielfach verwendete und etablierte Push-out-Testverfahren zur biomechanischen Messung der Adhäsionskraft als Indikator für die Integration wurde im Vorfeld in diesem Modell bereits von anderen Forschungsgruppen, u.a. Hunter und Levenston, Moretti et al., sowie Sitterle et al. verwendet und jeweils modifiziert (Hunter und Levenston 2002; Hunter und Levenston 2004; Moretti et al. 2005; Sitterle et al. 2009; van de Breevaart Bravenboer et al. 2004). Eine mögliche Fehlerquelle des Disc-Ring-Modells ist das

Gewebewachstum über die Integrationszone hinaus (Moretti et al. 2005). Dies kann zu einer konkaven Oberfläche und damit zu Ungenauigkeiten im Messverfahren sowie zu einer Überschätzung der gemessenen Integrationswerte durch den sogenannten „press-fit“-Effekt führen. Des Weiteren kann es durch eine mechanische Verkeilung des Knorpelzylinders im Ring in diesem Versuchsmodell zu verzerrt hohen Ergebnissen in der biomechanischen Testung kommen (Moretti et al. 2005; Obradovic et al. 2001). Um dies zu verhindern, muss in der Probenvorbereitung (Ausstanzen von Disc und Ring) hochpräzise gearbeitet werden. Dies war in den vorliegenden Experimenten gewährleistet, was in vorangegangenen Untersuchungen validiert wurde (Kossmann 2019). Daher ermöglichte das bereits etablierte „Disc-Ring“-Modell eine aussagekräftige und vergleichbare Einordnung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.

Bei den ersten Vorversuchen wurde das 3,5 mm messende Kernstück in „press-fit“-Technik und mittels Akkupunktornadeln im 3 mm messenden Defekt fixiert. Die Präparation des Knorpelkonstrukts ist unter 4.2 ausführlich erklärt. Im Ablauf der Vorversuche zeigten sich vielfältige Probleme mit der manuellen Fixierungsmethode via Akkupunktornadeln. Aufgrund der unter 5.1.1 dargestellten nicht objektivierbaren Manipulation am Kernstück im Rahmen der Entfernung der Akkupunktornadeln vor der biomechanischen Messung erfolgten die weiteren Untersuchungen mit der Fixierungsmethode mittels Fibrinkleber, welche sich, wie unter 5.1.2 beschrieben, während der Vorversuche als geeignet erwies. In den darauffolgenden Versuchen wurde zur Fixierung des Kernstücks im Knorpelring Fibrinkleber genutzt. Es zeigt sich an Tag 0 im Vergleich zu den nicht mit Fibrinkleber fixierten Konstrukten eine signifikante Adhäsionskraft durch den Kleber vor Beginn der Kultivierung (Abb. 14).

Eine Überschätzung der mechanischen Quervernetzung durch die zu Anfang der Kultivierungsphase gemessenen Konstrukte ist denkbar. Der Einfluss der Fixierung auf die biomechanisch gemessene Integrationsstärke durch den noch nicht vollständig stattgefundenen Abbau des Fibrinklebers ist nicht sicher eruiierbar. Jedoch zeigten sich im weiteren Verlauf in den histologischen Schnitten schon zu Beginn der Kultivierung an Tag 7 lediglich Rückstände des Fibrinklebers, teils mit eingewanderten Chondrozyten.

In früheren Studien zeigte sich ebenfalls sowohl in vivo als auch in vitro ein früher, extensiver Abbau von Fibrin, bzw. Fibrinkleber in Knorpelkonstrukten bereits vor Knorpelgewebbildung, wenn diese nicht mit hohen Dosen antifibrinolytischer Substanzen

stabilisiert wurden (Homminga et al. 1993; Meinhart et al. 1999; Ronziere et al. 1997; van Susante et al. 1999). Fibrinkleber wird zudem bereits in der Literatur als nicht toxisch beschrieben und unterstützt die Chondrozyten als Trägermedium bei der Organisation und damit in Bezug auf den Reifeprozess hin zum hyalinen Gelenkknorpel. In diesen Studien zeigten sich Knorpelzellen in Fibrin(-kleber) vital mit ausreichender Bildung einer Extrazellulärmatrix sowie normaler Reifung (Homminga et al. 1993; Meinhart et al. 1999; Tamer et al. 2008; van Susante et al. 1999). In-vitro- und in-vivo-Experimente haben gezeigt, dass Fibrinkleber als Adhäsionsmittel in Versuchen bezüglich integrativer Prozesse geeignet ist und durch seine prochondrogenen Charakteristika die Invasion von Chondrozyten sowie deren Syntheseleistung unterstützt (Chang et al. 2007; Kaplonyi et al. 1988; Kim et al. 2010; Lazarini et al. 2017; Scotti et al. 2010; Tamer et al. 2008).

In unseren Versuchen zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen der zu Beginn gemessenen Adhäsionskraft an Tag 0 mit Fibrinkleberbehandlung „D0 Fibrin“ zu den weiteren gemessenen Integrationswerten an Tag 7, 14 und 21 sowie zu der gemessenen Adhäsionskraft der Gruppe „D0 Nativ“ an Tag 0, die vernachlässigbar geringe Werte aufwies. Die Integrationswerte der nicht mit Ascorbinsäure kultivierten Gruppen an Tag 7, 14 und 21 zeigten sich signifikant niedriger oder ohne signifikanten Unterschied zu denen der Referenzgruppe „D0“ (Abb. 18). Eine Überschätzung der gemessenen Integrationswerte ist zusammenfassend daher auch retrospektiv nicht gegeben.

In Zusammenschau der Ergebnisse war es durch die Präparation des Knorpelkonstruktes mit Fibrinkleber im „Disc-Ring“ Modell insgesamt möglich nach der Kultivierung reproduzierbare biomechanische Integrationswerte durch das etablierte Push-out-Verfahren zu messen, auszuwerten und zu interpretieren.

6.2 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Integration von nativem Knorpelgewebe in vitro

Ascorbinsäure wird als wichtiger Cofaktor bei der Hydroxylierung von Prolin in der Kollagensynthese benötigt (Grant und Prockop 1972, Vasta et al. 2016). Zudem wirkt es protektiv auf die Chondrozyten und wird aus diesen Gründen standardmäßig in verschiedenen

Konzentrationen in Knorpelzell- und gewebskulturen eingesetzt (Malicev et al. 2000; Murad et al. 1981; Omata et al. 2012; Ronziere et al. 1997). Vitamin C kann in Zellkulturen in höheren Konzentrationen um 100 μM Chondrozyten vor oxidativem Stress schützen und die Dedifferenzierung von Chondrozyten zu Typ I Faserknorpel inhibieren - dieser besitzt im Vergleich zu hyalinem Knorpel nicht dieselben biomechanischen Eigenschaften. In hohen Konzentrationen von über 150 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure im Serum wird in der Literatur jedoch ebenfalls von der Induzierung einer Apoptose der Knorpelzellen berichtet (Chang et al. 2015, Malicev et al. 2000).

In unseren Untersuchungen zeigten sich ohne die Anwesenheit von Ascorbinsäure während des Kultivierungsprozesses biomechanisch keine Hinweise auf Integration. An Tag 7, 14 und 21 zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der ohne Zusatz von Ascorbinsäure kultivierten Gruppe „w/o Ascorbinsäure“ und der Bezugsgruppe „D0 Nativ“, welche weder geklebt noch kultiviert wurde. Im Vergleich zur geklebten, nicht kultivierten Gruppe „D0 Fibrin“, ab 5.1.2 als „D0“ bezeichnet, zeigten sich signifikant niedrigere Adhäsionswerte an Tag 7 und 14 gemessenen Gruppen ohne Ascorbinsäurezusatz.

In Anwesenheit von Ascorbinsäure bei den kultivierten Gruppen zeigten sich zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere biomechanische Werte im Vergleich zu der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“, hinweisend für einen stattgefundenen integrativen Prozess (Abb. 18). An Tag 7 zeigte sich biomechanisch noch kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Ascorbinsäure kultivierten Gruppen und der nicht kultivierten, mit Fibrinkleber behandelten Gruppe „D0 Fibrin“. Hier ist bezogen auf den Ausgangswert an Tag 0 von einem Verlust der adhäsiven Kräfte des Fibrinklebers in den ersten Tagen der Kultivierung auszugehen. Diese messbare Minderung der Adhäsionskraft ist, wie bereits beschrieben, an den Gruppen „Fibrin“ und „w/o Ascorbinsäure“ an Tag 7 zu sehen. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Verlust der Adhäsionskraft durch den Abbau des Fibrinklebers durch die integrativen Prozesse mit anhaltender Produktion von Extrazellulärmatrix, d.h. Kollagen und GAG, in Anwesenheit von Ascorbinsäure ausgeglichen wird (Kaplonyi et al. 1988; Meinhart et al. 1999; Pizzute et al. 2016; van Susante et al. 1999). Dies zeigt sich in dieser Arbeit auch histologisch mit bereits an Tag 7 nachweisbarer GAG- und Kollagendeposition bei rudimentären Fibrinkleberresten im Defektpalt. Migrierte Chondrozyten zeigten sich hierbei sowohl in der neu synthetisierten Matrix sowie in den Fibrinkleberresten (Abb. 26, 27).

In den Abbildungen 23 bis 25 sowie 27 und 28 ist die immunhistochemische Färbung zum qualitativen Nachweis von Kollagen Typ I und II in den verschiedenen Gruppen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten an Tag 7, 14 und 21 zu sehen. Durch diese Färbungen sollte die Qualität der Kollagene und deren Verteilung in der Integrationszone im Verlauf der Gewebekultur dargestellt werden. Histologisch zeigte sich schon an Tag 7 und fortbestehend auch an Tag 14 und 21 in der Kollagen Typ II-Färbung ein Unterschied an synthetisiertem Kollagen im Defektspalt zwischen Ring und Kernstück bei den Gruppen mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure im Nährmedium. Hier zeigte sich an Tag 7, 14 und 21 bei den Gruppen mit dem Zusatz von Ascorbinsäure eine starke Färbung, kennzeichnend für die Ausbildung einer hyalinen Knorpelmatrix im Bereich der Integrationszone (Abb. 27). Bei der histologischen Untersuchung der Proben ließ sich jedoch in keiner der untersuchten Gruppen in der Integrationszone die Synthese von Kollagen Typ I, als Marker für unerwünschten Faserknorpel, nachweisen (Abb. 28). Hinweise auf faserknorpeliges, mechanisch minderwertiges Ersatzgewebe im Sinne einer chondrogenen Narbe zeigen sich somit in dieser Arbeit nicht. Die histologischen Ergebnisse korrelieren mit unseren biomechanischen Ergebnissen und decken sich mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen als histologische Zeichen einer lateralen Integration bei Knorpeldefekten (He et al. 2014; Shapiro et al. 1993).

In der Safranin-O-Färbung zeigte sich an Tag 7, 14 und 21 eine Matrixbildung im Sinne einer Glykosaminoglykansynthese bei den Gruppen, welche mit Vitamin C kultiviert wurden. Zudem zeigte sich an Tag 14 und 21 eine vermehrte Migration von Knorpelzellen in den mit Extrazellulärmatrix gefüllten Defektspalt. Bei den Gruppen ohne Zusatz von Ascorbinsäure zeigten sich sowohl an Tag 7, 14 und 21 lediglich teils rudimentäre Reste des Fibrinklebers ohne eindeutige Zeichen einer Matrixbildung (Abb. 26).

Es wurden Untersuchungen mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Ascorbinsäure als Zusatz im Nährmedium durchgeführt. Hierbei fand sich kein eindeutiger Hinweis auf eine Verbesserung der Integration in Bezug auf eine der beiden Konzentrationen. Beide Gruppen zeigten im Vergleich an Tag 7, 14 und 21 keinen signifikanten Unterschied in den biomechanisch gemessenen Integrationswerten oder der histologischen Merkmale der Integration.

6.3 Einfluss der Kombination von Ascorbinsäure und EDHB auf die Integration von nativem Knorpelgewebe in vitro

Es ist bekannt, dass EDHB die Kollagensynthese durch die Inhibition des Enzyms CP4H und damit der posttranslationalen Modifikation von Protokollagen zu Prokollagen hemmt. Reduzierte Ascorbinsäure reaktiviert CP4H und fungiert somit als wichtiger Cofaktor. Dieser Schritt wird durch die „Fe(II)- and AKG-dependent dioxygenase“- Familie („FAKGD“), zu der auch EDHB gehört, kompetitiv gehemmt. Dieser Effekt von CP4H als Zielpunkt für die Modulation der Kollagensynthese durch kompetitive Hemmung mittels EDHB in anderen Zell- und Gewebekulturen ist bereits in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen beschrieben (De Jong et al. 1982; Pizzute et al. 2016; Vasta et al. 2016; Vasta und Raines 2016; Vasta und Raines 2018; Wang et al. 2002). Das „Crosslinking“ der Kollagenfasern als beeinflussbarer Faktor für die Integration von Knorpelgewebe wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten untersucht (Ahsan et al. 1999; Clark et al. 2002; DiMicco und Sah 2001; Petersen et al. 2008). In dieser Arbeit erfolgte die Hemmung der Kollagensynthese, anders als in den vorherigen Untersuchungen von Ahsan et al. (1999), DiMicco und Sah (2001) sowie McGowan und Sah (2005), jedoch deutlich vor Ausbildung der Kollagenquervernetzungen.

In den Untersuchungen zeigte sich bei hochdosiertem Zusatz von EDHB an Tag 7 kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe mit niedriger Dosierung von EDHB in Bezug auf die gemessene Adhäsionskraft. Histologisch zeigte sich im Vergleich zu der Gruppe mit 50 µg/ml Ascorbinsäure eine verminderte Kollagensynthese im Defektspace. Im Randbereich des Defektes zeigte sich bei niedrigem EDHB-Zusatz jedoch neu gebildete Kollagenmatrix (Abb. 23, 27).

An Tag 14 und 21 zeigten sich signifikant niedrigere Adhäsionswerte bei der Gruppe mit hoch dosiertem EDHB Zusatz zu der niedrig dosierten Gruppe sowie zur Gruppe mit 50 µg/ml Ascorbinsäure. Die Werte der Gruppe „D0 Fibrin“ waren im Vergleich ebenfalls signifikant höher. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zu der Gruppe „w/o Ascorbinsäure“. Histologisch zeigte sich hier ebenfalls ein deutlicher Unterschied. Die niedrig dosierte EDHB-Gruppe zeigte den immunhistologischen Nachweis einer Kollagensynthese vergleichbar mit den Gruppen mit 50 und 100 µg/ml Ascorbinsäure zu diesem Zeitpunkt. Die Gruppe mit hoch dosiertem EDHB zeigte histologisch keine Zeichen einer Kollagensynthese (Abb. 24, 25, 27). In den Abbildungen 23-25 und 27 füllt Kollagen Typ II konzentrationsunabhängig in den

Gruppen mit Ascorbinsäurezusatz sowie bei niedrig dosiertem EDHB im Kulturverlauf zunehmend flächig große Anteile des Defektpaltes. In der Defektzone sowohl der Gruppe ohne Ascorbinsäure als auch mit hoch dosiertem EDHB-Zusatz lässt sich dies nicht nachweisen. Im Bereich der Integrationszone korreliert die Menge an GAG (Abb. 20, 21, 22, 26) sowie der Nachweis von Chondrozyten in Bezug auf Kultivierungsbedingung und -dauer weitestgehend. Knorpelzellen in der Integrationszone zeigten sich in beiden Färbungen vermehrt an Tag 14 und 21 (Abb. 26, 27).

Die Glykosaminoglykansynthese der niedrig dosierten EDHB-Gruppe, stellvertretend für die Bildung der gallertartige Extrazellulärmatrix, zeigte sich zu allen 3 Untersuchungszeitpunkten ohne eindeutigen histologischen Unterschied zu den Gruppen mit 50 µg/ml Ascorbinsäure und 100 µg/ml Ascorbinsäurezusatz. Die Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und die hoch dosierte Gruppe mit einer EDHB Konzentration von 0,2 mM zeigten keine GAG-Synthese (Abb. 26). Der hiermit gezeigte positive Effekt von Ascorbinsäure auch auf die gallertartige ECM-Synthese steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen (Kao et al. 1990).

Die Extrazellulärmatrix ist ein komplexes Netzwerk, welche die Migration und Syntheseleistung der umliegenden Knorpelzellen maßgeblich beeinflusst. Die verschiedenen Bestandteile, wie u.a. die Glykosaminoglykane und Kollagene beeinflussen sich hier gegenseitig in komplexen Abläufen quantitativ sowie qualitativ (Pizzute et al. 2016; Scotti et al. 2010; Trappmann et al. 2012). Die dosisabhängige Hemmung der Synthese, sowohl der gallertartigen als auch bindegewebigen Extrazellulärmatrixanteile, führte in dieser Arbeit zu einer verminderten bzw. nicht vorhandenen Kollagen- und Glykosaminoglykandeposition im Defektpalt bzw. in der Integrationszone. Eine hoch dosierte Hemmung der ECM-Synthese durch EDHB führte wie die Abwesenheit von Ascorbinsäure weder histologisch noch biomechanisch zu Anzeichen von Integration. Interessant ist hierbei die Beobachtung, dass in beiden Fällen der Defektpalt histologisch leer erschien. Histologisch ließen sich wie hier bereits beschrieben weder Kollagen, GAG noch Chondrozyten nachweisen. Aufgrund der nicht vorhandenen Stützstruktur der ECM ist davon auszugehen, dass es aufgrund der nicht möglichen Migration und Einnistung der Knorpelzellen zu keiner weiteren Matrixsynthese und Füllung des Defekts von außen nach innen kommen kann. Bei der Beobachtung der niedrig dosierten EDHB-Gruppe an Tag 7 kommt es sowohl histologisch als auch biomechanisch zu einem verlangsamten „Anlaufen“ der Syntheseleistung durch die kompetitive Hemmung. An

Tag 14 und 21 zeigte sich dann kein Unterschied zu den nicht gehemmten Gruppen, da bei ausreichender zellulärer Infrastruktur eine weitere, stetig wachsende Migration und Syntheseleistung der Knorpelzellen von außen möglich ist. Eine initiale Migration in das Fibrin als Beginn dieser Kaskade zeigte sich histologisch bei den Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + EDHB 0,2 mM“ nicht. Diese Beobachtungen der Abhängigkeit der lateralen Integration des Knorpels vom Effekt der Ascorbinsäure auf die ECM-Synthese werden unterstützt durch bisher in der Literatur beschriebene Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen. Diese zeigten zum einen eine Förderung der ECM-Synthese von Chondrozyten durch die Kultivierung mit Ascorbinsäure, sowie zum anderen eine Hemmung der Syntheseleistung unter Einfluss von CP4H-Hemmern bzw. EDHB in Knorpel und weiteren Gewebearten (Clark et al. 1995; Pizzute et al. 2016; Vasta und Raines 2016).

In früheren Arbeiten zeigte sich Integration nur bei Vitalität des implantierten Knorpels (Gilbert et al. 2009; Theodoropoulos et al. 2011). Fibrinkleber, EDHB und Ascorbinsäure hatten in der vorliegenden Studie in den verwendeten Konzentrationen keinen toxischen Effekt. Auch aufgrund der Migration der Chondrozyten in den Defektspace sowie die im Verlauf zunehmende Synthese ist von einer Vitalität der Knorpelzellen auszugehen. In den MTT-Färbungen der untersuchten Knorpelkonstrukte zeigten sich diese, wie unter 5.2 beschrieben, vital. Dies zeigte sich auch für die Gruppen „w/o Ascorbinsäure“ und „50 µg/ml Ascorbinsäure + EDHB 0,2 mM“, bei denen aufgrund der Abwesenheit oder Hemmung der Extrazellulär-matrixsynthese, keine Integration zu verzeichnen war.

6.4 Einfluss der Kultivierungsdauer unter Ascorbinsäure und EDHB auf die Integration von nativem Knorpelgewebe in vitro

Bei vorherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der In-vitro-Integration von Knorpelgewebe in Defekte hatte die Kultivierungsdauer gewichtigen Einfluss auf die histologisch und biomechanisch messbaren Integrationswerte (Obradovic et al. 2001; Theodoropoulos et al. 2011; Tognana et al. 2005). Bei einer dieser Arbeiten zeigte sich eine Zunahme des Gewebsvolumens bei verschlechterter mechanisch messbarer Integration durch eine Verlängerung der Gewebekulturdauer (Obradovic et al. 2001). Eine Verlängerung der Kulturdauer hatte in der vorliegenden Arbeit jedoch einen signifikant steigernden Effekt auf

die mechanische Integration in den dargestellten Untersuchungen (Abb. 19). Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen, welche mit mittels Tissue Engineering hergestellten Knorpelkonstrukten ebenfalls in einem Disc-Ring-Modell durchgeführt wurden (Theodoropoulos et al. 2011; Tognana et al. 2005). Bei den Gruppen ohne erkennbare Integrationsprozesse zeigte sich kein Einfluss der Kulturdauer (Abb. 26, 27). Die histologische Integration korrelierte, wie bereits beschrieben, hierbei mit den mechanischen Integrationswerten im Push-out-Testverfahren (Abb. 19).

7 Zusammenfassung

Die unzureichende laterale Integration von Knorpel ist heutzutage in der operativen Versorgung von Gelenkknorpel immer noch ein großes Problem. Klinisch zeigen Patienten mit posttraumatischen oder chronisch-degenerativen Gelenkknorpeldefekten oft ungünstige Krankheitsverläufe mit anhaltender Schmerzsymptomatik. Etablierte moderne Operationsverfahren wie die OATS oder die ACI/MACI zeigen bei unzureichender Integration des Transplantats häufig nicht zufriedenstellende postoperative Ergebnisse. Zur Optimierung der Behandlungsmöglichkeiten ist ein besseres Verständnis der Knorpelintegration und eine mögliche Verbesserung der Integrationsprozesse von großer klinischer Bedeutung.

Die Integration von Gelenkknorpel ist von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig. Ein Faktor ist die ECM-Synthese. Ein Schlüsselenzym in der Kollagensynthese ist die Kollagen Prolyl 4-Hydroxylase (CP4H). Ascorbinsäure stellt einen wichtigen Cofaktor dieses Enzyms dar.

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Knorpelintegration von der Neusynthese von Kollagen im Defektbereich *in vitro* untersucht. Hierzu wurden native Knorpelimplantate mittels langzeitstabilen Fibringels in einem Disc-Ring-Modell stabilisiert, in verschiedenen Gruppen *in vitro* kultiviert und im Anschluss biomechanisch und histologisch untersucht. Im Rahmen der Kultivierung wurde zur Analyse des Einflusses der Neusynthese von Kollagen auf die Integration die Syntheseleistung auf zwei Wegen moduliert. Die positive Beeinflussung der Synthese erfolgte über eine Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Ascorbinsäure. Zur Hemmung der Kollagensynthese wurde der kompetitive CP4H-Hemmer Ethyl 3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) verwendet.

Die Gruppen mit Ascorbinsäure als Zusatz zum Medium und ohne, bzw. mit gering dosiertem EDHB-Zusatz als Kollagensyntheseinhibitor lieferten nach der Kultivierung in diesem Integrationsmodell biomechanisch die besten Adhäsionswerte. Auch histologisch und immunhistochemisch zeigten diese Gruppen eine deutlich gesteigerte ECM-Synthese mit zunehmender Füllung der Defektzone mit Kollagen Typ II und einer Glykosaminoglykanmatrix während der Kultivierung. Bei den Gruppen ohne Ascorbinsäurezusatz oder mit hoch dosiertem EDHB zeigten sich weder biomechanisch noch immunhistochemisch Zeichen einer

Kollagensynthese und/oder Integration. Ein konzentrationsabhängiger Effekt zwischen 50 und 100 µg/ml Ascorbinsäure zeigte sich in unseren Untersuchungen nicht.

Auch die Kultivierungsdauer zeigte sich als wesentlicher Faktor für die Integration bei den Gruppen, bei denen sich Integrationsprozesse zeigten. Eine steigende Kultivierungsdauer ging einher mit steigenden Integrationswerten. Bei den Gruppen ohne Ascorbinsäure oder mit hochdosierter Hemmung der Kollagensynthese zeigte sich auch bei zunehmender Kultivierungsdauer keine messbare Integration.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Untersuchung der Integration von nativem Gelenkknorpel in einem Setting mit Disc-Ring-Modell in Kombination mit langzeitstabilem Fibrinkleber unter standardisierten Bedingungen möglich ist. Ascorbinsäure als Cofaktor der CP4H zeigte sich in der In-vitro-Kultur dabei als essentieller Zusatz für die Integration von Knorpelgewebe. Die erzielten Ergebnisse unterstützen die bestehende Literatur und deuten darauf hin, dass bei Verletzungen des Gelenkknorpels die Neusynthese von Kollagen Typ II im Defektbereich eine wichtige Rolle in der lateralen Integration von Knorpelgewebe spielt.

8 Literaturverzeichnis

1. Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, Amiel D, Sah RL. *Integrative cartilage repair: inhibition by beta-aminopropionitrile*. Journal of Orthopaedic Research. 1999; 17(6):850-57.
2. Alford JW, Cole BJ. *Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions*. American Journal of Sports Medicine. 2005; 33:443-60.
3. Andjelkov, N., Hamberg, H. & Bjellerup, P. *No outgrowth of chondrocytes from non-digested particulated articular cartilage embedded in commercially available fibrin matrix: an in vitro study*. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2016; 11(1):23.
4. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. *Empfehlungen zur Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen*. 2008; 3. Auflage.
5. Aspberg A. *The different roles of aggrecan interaction domains*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2012; 60(12):987-96.
6. Athens AA, Makris EA, Hu JC. *Induced collagen cross-links enhance cartilage integration*. PLoS ONE. 2013; 8 (4):e60719.
7. Baumgaertner MR, Cannon WD, Jr., Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC. *Arthroscopic debridement of the arthritic knee*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1990; 253:197-202.
8. Bernholt JH. *Cartilage repair using microfracture technique*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin. 2003; 54(6):218-21.
9. Bouillon B, Tiling T, Shafizadeh S. *The effect of arthroscopic lavage and mechanical debridement in the therapy of osteoarthritis*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin. 2003; 54(6):215-17.
10. Boushell MK, Hung CT, Hunziker EB, Strauss EJ, Lu HH. *Current strategies for integrative cartilage repair*. Connective Tissue Research. 2017; 58(5):393-406.
11. Bos PK, Kops N, Verhaar NH, van Osch GJ. *Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment*. Osteoarthritis and Cartilage. 2008; 16(2):204-11.
12. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, van der Linden AJ, Bulstra SK. *Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee*. International Orthopaedics. 1997; 21(5):313-17.

13. Buckwalter JA. *Articular cartilage: injuries and potential for healing*. The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy. 1998; 28(4):192-202.
14. Buckwalter JA. *Articular cartilage injuries*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2002; 402:21-37.
15. Buckwalter JA, Mankin HJ. *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. AAOS Instructional Course Lectures. 1997; 47:477-86.
16. Buckwalter JA, Mankin HJ. *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. AAOS Instructional Course Lectures. 1998; 47:487-504.
17. Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB. *Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage*. Der Unfallchirurg. 2001; 104(9):798-807.
18. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. The New England Journal of Medicine. 1994; 331(14):889-95.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Public Health Service U. S., Department of Health and Human Services. *Osteoarthritis and you. Patient information from the CDC*. Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy. 2010; 24(4):430-31.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Public Health Service U. S., Department of Health and Human Services. *Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation-United States, 2010-2012*. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2013; 62(44):869-73.
21. Chang J, Rasamny JJ, Park SS. *Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin sealant*. Archives of Facial Plastic Surgery. 2007; 9(3):161-6.
22. Chang, Z, Huo, L, Li P, Wu Y, Zhang P. *Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress*. Molecular Medicine Reports. 2015; 5(12):7086-92.
23. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. *Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options*. American Journal of Orthopedics. 1999; 28(2):88-96.
24. Clark AG, Rohrbaugh AL, Otterness I, Kraus VB. *The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants*. Matrix Biology. 2002; 21(2):175-84.

25. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. *Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta*. Journal of Cell Science. 1995; 108:1251–61.
26. Cohen IK. *Can collagen metabolism be controlled: Theoretical considerations*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 1985; 25:410–12.
27. De Jong L, Albracht SPJ, Kemp A. *Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron: The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation*. Biochimica et Biophysica Acta. 1982; 704:326–32.
28. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis and Cartilage. 2000; 8:309-34.
29. Dell'accio F, Vincent TL. *Joint surface defects: clinical course and cellular response in spontaneous and experimental lesions*. European Cells & Materials. 2010; 20:210-7.
30. Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. *S2K-Leitlinie Gonarthrose*. 2018; 4. Auflage.
31. DiMicco MA, Sah RL. *Integrative cartilage repair: adhesive strength is correlated with collagen deposition*. Journal of Orthopaedic Research. 2001; 19:1105-12.
32. DiMicco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL. *Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism*. Osteoarthritis and Cartilage. 2002; 10:218-25.
33. Dunkin BS, Lattermann C. *New and Emerging Techniques in Cartilage Repair: MACI*. Operative Techniques in Sports Medicine. 2013; 21(2):100-07.
34. Englert C, McGowan KB, Klein TJ, Giurea A, Schumacher BL, Sah RL. *Inhibition of integrative cartilage repair by proteoglycan 4 in synovial fluid*. Arthritis & Rheumatology. 2005; 52:1091-99.
35. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. *Toward a molecular understanding of skeletal development*. Cell. 1995; 80:371-78.
36. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. *Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?* European Cells & Materials. 2006; 12:57-63.
37. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G., Wenzel M, Staudenmaier R, Göpferich A, Blunk, T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. Biomaterials. 2007; 28(1):55-65.

38. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. *Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers*. Journal of Biomedical Materials Research. 1993; 27:11-23.
39. Gilbert SJ, Singhrao SK, Khan IM, Gonzalez LG, Thomson BM, Burdon D, Duance VC, Archer CW. *Enhanced tissue integration during cartilage repair in vitro can be achieved by inhibiting chondrocyte death at the wound edge*. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2009; 15(7):1739-49.
40. Gobbi A, Karnatzikos G, Kumar A. *Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2014; 22(9):1986-96.
41. Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. *Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2005; 13(3):213-21.
42. Gomoll AH. *Microfracture and augments*. The Journal of Knee Surgery. 2012; 25(1):9-15.
43. Grant ME, Prockop DJ. *The Biosynthesis of Collagen. 2*. The New England Journal of Medicine. 1972; 286(5):242-49.
44. Ha CW, Park YB, Kim SH, Lee HJ. *Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair*. Arthroscopy. 2019; 35(1):277–88.
45. He Y, Siebuhr AS, Brandt-Hansen NU, Wang J, Su D, Zheng Q, Simonsen O, Petersen KK, Arendt-Nielsen L, Eskehave T, Hoeck HC, Karsdal MA, Bay-Jensen AC. *Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation*. BMC Musculoskeletal Disorders. 2014; 15:309.
46. Homminga GN, Buma P, Koot HWJ, van der Kraan P. *Chondrocyte behavior in fibrin glue*. Acta Orthopaedica Scandinavica. 1993; 64:441–45.
47. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. *Cell-based tissue engineering strategies used in clinical repair of articular cartilage*. Biomaterials. 2016; 98:1-22.
48. Hunter CJ, Levenston ME. *Native/engineered cartilage adhesion varies with scaffold material and does not correlate to gross biochemical content*. Transactions of the 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2002; 27:479.

49. Hunter CJ, Levenston ME. *Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model*. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2004; 10(5-6):736-46.
50. Hunziker EB, Driesang IM, Morris EA. *Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2001; 391:171-81.
51. Jähne J, Königsrainer A, Schröder W, Südkamp NP. *Was gibt es Neues in der Chirurgie?: Berichte zur chirurgischen Fort- und Weiterbildung*. Landsberg am Lech: ecomed Medizin. Jahresband 2013:35-49.
52. Johnson DH, Pedowitz RA. *Practical Orthopaedic Sports Medicine and Arthroscopy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 1. Auflage.
53. Kao J, Huey G, Kao R, Stern R. *Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in cultured fibroblasts*. Experimental and Molecular Pathology. 1990; 53:1-10.
54. Kaplonyi G, Zimmerman I, Frenyo AD, Farkas T, Nemes G. *The use of fibrin adhesive in the repair of chondral and osteochondral injuries*. Injury. 1988; 19(4): 267-72.
55. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. *Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review*. European Cells & Materials. 2008; 16:26-39.
56. Khan IM, Gonzalez LG, Francis L, Conlan RS, Gilbert SJ, Singhrao SK, Burdon D, Hollander AP, Duance VC, Archer CW. *Interleukin-1 β enhances cartilage-to-cartilage integration*. European Cells & Materials. 2011; 22:190-201.
57. Kim HK, Moran ME, Salter RB. *The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits*. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1991; 73 (9):1301-15.
58. Kim MK, Choi SW, Kim SR, Oh IS, Won MH. *Autologous chondrocyte implantation in the knee using fibrin*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2010; 18(4):528-34.
59. Kish G, Modis L, Hangody L. *Osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral lesions of the knee and talus in the athlete. Rationale indications, techniques an results*. Clinics in Sports Medicine. 1999; 18:45-66.

-
60. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. *Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial.* The Journal of Bone & Joint Surgery. 2004; 86(A):455-64.
 61. Kossmann A. (2019) *Knorpelintegration - Etablierung eines Push-out-Modells und Untersuchung von BioGlue® als Knorpeladhäsivum.* Dissertationschrift. Würzburg: Medizinische Fakultät Julius-Maximilians-Universität.
 62. Kraeutler MJ, Belk JW, Purcell JM, McCarty EC. *Microfracture Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Systematic Review of 5-Year Outcomes.* American Journal of Sports Medicine. 2018; 46(4):995–99.
 63. Lane JG, Tontz WL Jr., Ball ST, Massie JB, Chen JC, Bae WC, Amiel ME, Sah RL, Amiel D. *A morphologic, biochemical and biomechanical assesment of short-term effects of osteochondral autograft plug transfer in an animal model.* Arthroscopy. 2001; 17:856-63.
 64. Lazarini M, Bordeaux-Rego P, Giardini-Rosa R, Duarte ASS, Baratti MO, Zorzi AR, de Miranda JB, Lenz Cesar C, Luzo Â, Olalla Saad ST. *Natural Type II Collagen Hydrogel, Fibrin Sealant, and Adipose-Derived Stem Cells as a Promising Combination for Articular Cartilage Repair.* Cartilage. 2017; 8(4):439-43.
 65. Lefebvre V, Smits P. *Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.* Birth Defects Research. 2005; 75:200-12.
 66. Lillie RD, Fullmer HM. *Histopathologic techniques and practical histochemistry.* New York: McGraw-Hill. 1976; 4. Auflage:559-610
 67. Lim HC, Bae, JH, Song SH, Park YE, Kim, SJ. *Current Treatments of Isolated Articular Cartilage Lesions of the Knee Achieve Similar Outcomes.* Clinical Orthopaedics an Related Research. 2012; 470(8):2261-67.
 68. Lolli A, Penolazzi, L, Narcisi R, van Osch GJVM, Piva R. *Emerging potential of gene silencing approaches targeting anti-chondrogenic factors for cell-based cartilage repair.* Cellular and Molecular Life Sciences. 2017; 74(19):3451-65.
 69. Majamaa K, Gunzler V, Hanauske-Abel HM, Myllylä R, Kivirikko KI. *Partial identity of the 2- oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase.* Journal of Biological Chemistry. 1986; 261(17):7819-23.

70. Malicev E, Woyniak G, Knezevic M, Radosavljević D, Jeras M. *Vitamin C induced apoptosis in human articular chondrocytes*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 2000; 440(5):46-8.
71. Mankin HJ. *Localisation of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. III. Mature articular cartilage*. The Bone & Joint Journal. 1963; 45A:529-40.
72. Mankin HJ. *The response of articular cartilage to mechanical injury*. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1982; 64(3):460-66.
73. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. *Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation*. European Journal of Radiology. 2006; 57(1):24-31.
74. Matsunaga D, Akizuki S, Takizawa T, Yamazaki I, Kuraishi J. *Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis*. The Knee. 2007; 14(6):465-71.
75. McGowan KB, Sah RL. *Treatment of cartilage with β -aminopropionitrile accelerates subsequent collagen maturation and modulates integrative repair*. Journal of Orthopaedic Research. 2005; 23(3):594-601.
76. Meinhart J, Fussenegger M, Höbling W. *Stabilization of fibrin- chondrocyte construct for cartilage reconstruction*. Annals of Plastic Surgery. 1999; 42:673–78.
77. Messner K, Gillquist J. *Cartilage repair. A critical review*. Acta Orthopaedica Scandinavica. 1996; 67(5):523-29.
78. Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P. *The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee*. Deutsches Ärzteblatt. 2010; 107(9):152-62.
79. Minas T, Nehler S. *Current concepts in the treatment of articular cartilage defects*. Orthopedics. 1997; 20:525-38.
80. Moretti M, Wendt D, Schaefer D, Jakob M, Hunziker EB, Heberer M, Martin I. *Structural characterization and reliable biomechanical assessment of integrative cartilage repair*. Journal of Biomechanics. 2005; 38:1846-54.
81. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. *Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures*. Biomaterials. 1992; 13(2):67-97.
82. Muir H. *The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. BioEssays. 1995; 17(12):1039-48.

83. Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR. *Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 1981; 78:2879–82.
84. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, Steinwachs M. *Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint*. American Journal of Sports Medicine. 2008; 36:2091-99.
85. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. *Integration of engineered cartilage*. Journal of Orthopaedic Research. 2001; 19(6):1089-97.
86. Omata S, Sonokawa S, Sawae Y, Murakami T. *Effects of both vitamin C and mechanical stimulation on improving the mechanical characteristics of regenerated cartilage*. Biochemical Biophysical Research Communications. 2012; 424:724–29.
87. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. *Basic science of articular cartilage and osteoarthritis*. Clinics in Sports Medicine. 2005; 24(1):1-12.
88. Pendleton A Arden N, Dougados M, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Cluzeau F, Cooper C, Dieppe PA, Günther KP, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis PM, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Mola EM, Pavelka K, Serni U, Swoboda B, Verbruggen AA, Weseloh G, Zimmermann-Gorska I. *EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)*. Annals of the Rheumatic Diseases. 2000; 59(12):936-44.
89. Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, Adamietz P, Baumbach K, Stork A, Rueger JM, Poertner R, Amling M, Meenen MN. *Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2008; 19:2029-38.
90. Pizzute T, Zhang Y, He F, Pei M. *Ascorbate-dependent impact on cell-derived matrix in modulation of stiffness and rejuvenation of infrapatellar fat derived stem cells toward chondrogenesis*. Biomedical Material. 2016; 11(4):045009.
91. Rabenberg M. *Gesundheitsberichtserstattung des Bundes. „Arthrose“*. Robert Koch-Institut Berlin. 2013; 54.

92. 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*. Journal of Orthopaedic research. 1995; 13(5):751-60.
93. Reines BP. *Is rheumatoid arthritis premature osteoarthritis with fetal-like healing?*. Autoimmun Reviews. 2004; 3:305-11.
94. Riboh, JC, Cvetanovich, GL, Cole BJ, Yanke AB. *Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee: a network meta-analysis*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2017; 25(12):3786–99.
95. Richter W. *Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration*. Journal of Internal Medicine. 2009; 266(4):390-405.
96. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2004.
97. Ronziere MC, Farjanel J, Freyria AM, Hartmann DJ, Herbage D. *Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture*. Osteoarthritis and Cartilage. 1997; 5:205-14.
98. Rudert M, Wirth CJ. *Cartilage regeneration and substitution*. Der Orthopäde. 1998; 27(5):309-21.
99. Sasaki T, Majamaa K, Uitto J. *Reduction of collagen production in keloid fibroblast cultures by ethyl-3,4-dihydroxybenzoate. Inhibition of prolyl hydroxylase activity as a mechanism of action*. Journal of Biological Chemistry. 1987; 262(19):9397-403.
100. Sato Y, Mera, H, Takahashi, D, Majima D, Iwasaki M, Wakitani S, Takagi M. *Synergistic effect of ascorbic acid and collagen addition on the increase in type 2 collagen accumulation in cartilage-like MSC sheet*. Cytotechnology. 2017; 69(3):405–16.
101. Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, Vitari F, Domeneghini C, Frascini G, Peretti GM. *Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2010; 18(10):1400-06.
102. Schulz RM, Bader A. *Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes*. European Biophysics Journal. 2007; 36(4-5):539-68.
103. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1993; 75:532-53.

-
104. Sitterle VB, Nishimuta JF, Levenston ME. *Photochemical approaches for bonding of cartilage tissues*. Osteoarthritis and Cartilage. 2009; 17:1649-56.
 105. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health. 2009; 1(6):461-68.
 106. SundarRaj N, Fite D, Ledbetter S, Chakravarti S, Hassell JR. *Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment*. Journal of Cell Science. 1995; 108(7):2663-72.
 107. Szirmai JA, v Boven-De Tyssonsk E, Gardell S. *Microchemical analysis of glycosaminoglycans, collagen, total protein and water in histological layers of nasal septum cartilage*. Biochimica et Biophysica Acta. 1967; 136(2):331-50.
 108. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. *Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engeneering Applications*. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2008; 14(2):199-215.
 109. Temenoff JS, Mikos AG. *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. Biomaterials. 2000; 21(5):431-40.
 110. Theodoropoulos JS, De Croos JN, Park SS, Pilliar R, Kandel RA. *Integration of tissue-engineered cartilage with host cartilage: an in vitro model*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2011; 469(10):2785-95.
 111. Theodoropoulos JS, DeCroos AJ, Petrera M, Park S, Kandel RA. *Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2016; 24(6):2055–64.
 112. Tognana E, Chen F, Padera RF, Leddy HA, Christensen SE, Guilak F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. *Adjacent tissues (cartilage, bone) affect the functional integration of engineered calf cartilage in vitro*. Osteoarthritis and Cartilage. 2005; 13:129-38.
 113. Thorogood PV, Hinchliffe JR. *An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb*. Journal of Embryology and Experimental Morphology. 1975; 33:581-606.
 114. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DGT, Li Y, Oyen ML, Cohen Stuart MA, Boehm H, Li B, Vogel V, Spatz JP, Watt FM, Huck WT. *Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate*. Nature Materials. 2012; 11(7):642–49.
 115. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. *Articular cartilage biology*. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2003; 11(6):421- 30.

116. Van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L, Verhaar JA, Weinans H, van Osch GJ. *Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model*. Arthritis Research & Therapy. 2004; 6:469–76.
117. Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. *TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads*. Osteoarthritis and Cartilage. 2009; 17(12):1539-45.
118. Van Susante JLC, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. *Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat*. Biomaterials. 1999; 20:1167–75.
119. Vasta JD, Andersen KA, Deck KM, Nizzi CP, Eisenstein RS, Raines RT. *Selective Inhibition of Collagen Prolyl 4 Hydroxylase in Human Cells*. ACS Chemical Biology. 2016; 11(1):193–99.
120. Vasta JD, Raines RT. *Human collagen prolyl 4-hydroxylase is activated by ligands for its iron center*. Biochemistry. 2016; 55:3224–33.
121. Vasta JD, Raines RT. *Collagen Prolyl 4-Hydroxylase as a Therapeutic Target*. Journal of Medicinal Chemistry. 2018; 61(23):10403-11.
122. Vincent TL, McLean CJ, Full LE, Peston D, Saklatvala J. *FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer*. Osteoarthritis and Cartilage. 2007; 15(7):752-63.
123. Vynios DH. *Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease*. BioMed Research International. 2014; 2014:452315.
124. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees*. Osteoarthritis Cartilage. 2002; 10(3):199-206.
125. Wang J, Buss JL, Chen G, Ponka P, Pantopoulos K. *The prolyl 4-hydroxylase inhibitor ethyl-3,4-dihydroxybenzoate generates effective iron deficiency in cultured cells*. FEBS Letters. 2002; 529:309–12.
126. Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. *Nutrition and degeneration of articular cartilage*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2013; 21(8):1751-62.

-
127. Watanabe H, Yamada Y, Kimata K. *Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function*. Journal of Biochemistry. 1998; 124(4):687-93.
 128. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. *Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies*. The Knee. 2007; 14(3):177-82.
 129. Zarnett R, Delaney JP, Driscoll SW, Salter RB. *Cellular origin and evolution of neochondrogenesis in major full-thickness defects of a joint surface treated by free autogenous periosteal grafts and subjected to continuous passive motion in rabbits*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1987; 222:267-74.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den folgenden Personen danken:

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk, welcher sich mit vielen Ideen, Flexibilität und Ausdauer der Betreuung dieser Arbeit widmete. Er vermittelte mir im Laufe dieser Promotion das wissenschaftliche Handwerkzeug, welches auch Grundlage weiterer Arbeiten werden sollte.

Ein weiterer Dank gilt auch Oliver Berberich und Alexander Kossmann für die Zusammenarbeit in den vielen Stunden im Labor.

Voller Dankbarkeit für die stetige Unterstützung bin ich auch meiner Frau, Lena Kiepe, meinem Sohn Anton sowie meinen Eltern Ursula Schlömer-Kiepe und Hermann Kiepe.

Curriculum Vitae

□ Persönliche Daten

Name: Felix Kiepe
Geburtstag: 23.08.1987
Geburtsort: Haselünne
Anschrift: Kirchröder Str. 106, 30625 Hannover
Email: felix.kiepe@me.com
Telefon: +4917631277648
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

□ Schulbildung

1994 - 1998 Besuch der Grundschule Hasebrink in Meppen
1998 - 2000 Besuch der Orientierungsstufe Johannesschule Meppen
2000 - 2007 Besuch des Windthorst-Gymnasium Meppen mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

□ Ausbildung

09/2007 – 05/2008 Zivildienst im Bereich Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Meppen e.V.
09/2007 – 09/2008 Absolvierung der staatlichen Prüfung für Rettungsanitäterinnen und Rettungsanitäter, an der Akademie für Gesundheitsberufe am Mathias-Spital in Rheine
10/2008 – 05/2009 Vorbereitungsjahr am Mc Daniel College Budapest und College International (Vollzeitstudium) zur Vorbereitung auf das Medizinstudium

Studium

- 09/2009 – 10/2010 Universität Pécs, Ungarn
- 10/2010 – 05/2016 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland
- 06/2016 Approbation

Berufstätigkeit

- Ab 07/2016 **Medizinischen Hochschule Hannover, Klinik für Neurochirurgie,
Hannover:** Assistenzarzt

Fort-und Weiterbildung

- 12/2018 **Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover**
Good Clinical Practice - Klinische Prüfungen mit Medizinprodukten nach SO
14155 und MPG
- 04/2019 **Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover**
Aufbaukurs für verantwortliche Prüfer, stellvertretende Prüfer und
leitendes/koordinierendes Prüfungspersonal in Klinischen Studien mit
Arzneimitteln
AMG/GCP
- 07/2019 – 09/2020 **Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover**
PI (Principal Investigator) der klinischen Phase III Studie (NOSTRA III),
„Efficacy of VAS203 in patients with moderate and severe traumatic brain
injury. A confirmed, placebo-controlled, randomized, double-blind,
multicentre study”

Mitgliedschaften

- Ab 05/2018 Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC)
- Ab 05/2018 Deutsche Gesellschaft für NeuroIntensiv- und Notfallmedizin (DGNI)

□ **Schriftenverzeichnis**

Kiepe F, Hermann EJ, Heissler HE, Henseler H, Vogt PM, Krauss JK: Multisegmental lumbar corporectomy and transcorporeal fixation for correction of extreme thoracolumbar kyphosis in myelomeningocele with chronic decubitus. *Pediatric Neurosurgery*. 2019;54:116-120.

□ **Poster**

Wild F, Kiepe F, Hanke JS, Schmitto JD, Haverich A, Krauss JK: Elective neurosurgical operations in patients with Left ventricular assist devices. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC); Würzburg, Germany

Kiepe F, Wild F, Hanke JS, Schmitto JD, Haverich A, Krauss JK: Neurosurgical emergencies in patients with left ventricular assist devices. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Würzburg, Germany

Berberich O, Kiepe F, Kossmann A, Böck T, Meffert R, Hölscher-Doht S, Richter W, Blunk T; Extracellular matrix development and cell invasion at the defect site in an in vitro model for cartilage integration. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2017; Düsseldorf, Germany

Berberich O, Kossmann A, Kiepe F, Böck T, Krähnke M, Meffert R, Hölscher-Doht S, Richter W, Blunk T; Lateral cartilage integration in an In Vitro Defect Model Utilizing Surgical Adhesives. European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2016; Upsala, Sweden

Berberich O, Kossmann A, Kiepe F, Böck T, Krähnke M, Meffert R, Hölscher-Doht S, Richter W, Blunk T; Lateral cartilage integration – ECM development in fibrin gels at the defect site in an in vitro model. ICRS 2016 – 13th World Congress; Naples, Italy

□ **Wissenschaftliche Vorträge**

06/2018

Vortrag 69. Jahrestagung der DGNC: „Multisegmental lumbar corporectomy and transcorporeal fixation for correction of extreme thoracolumbar kyphosis in myelomeningocele with chronic decubitus“.

Unterschrift