



**Testung verschiedener Strategien für die Regeneration
von Knorpeldefekten im *Ex vivo*-Testsystem**

**Evaluation of cartilage regeneration strategies
in an osteochondral *ex vivo* cartilage defect model**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Klinische Wissenschaften

Vorgelegt von
Alexa Buss aus Oldenburg (Oldb.)

Würzburg, 2021

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Otto

1. Betreuer: Prof. Dr. Heike Walles

2. Betreuer: Prof. Dr. Torsten Blunk

3. Betreuer: Dr. Franziska Ehlicke

4. Betreuer: Prof. Dr. André Steinert

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VI
Summary.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung alternativer Behandlungskonzepte für Knorpelerkrankungen im sozialdemographischen Kontext.....	1
1.2 Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels	3
1.2.1 Chondrozyten und Extrazellulärmatrix (EZM)	4
1.2.2 Zonale Gliederung des Gelenkknorpels.....	6
1.2.3 Metabolismus des hyalinen Gelenkknorpels	8
1.3 Einteilung der Knorpelschäden.....	8
1.4 Status Quo der regenerativen Knorpeltherapie	10
1.5 Mesenchymale Stammzellen und Chondrozyten in der Knorpelregeneration	11
1.6 Osteochondrales <i>Ex vivo</i> -Testsystem (EVTS)	13
1.7 Bern-Score und ICRS-II-Score	15
2 Ziel dieser Arbeit	19
3 Material	21
3.1 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur	21
3.2 Lösungen für die Histologie	24
3.3 Lösungen für die Analyse des Proteoglykan und DNA-Gehalts.....	27
3.4 Weitere Chemikalien und Reagenzien für die Laborarbeit	28
3.5 Übersicht der verwendeten Geräte.....	29
4 Methoden.....	30
4.1 Übersicht der getesteten Behandlungsstrategien und Analysemethoden	30
4.2 Zellkultur	31
4.2.1 Chondrozytenisolation aus porcinem Knorpelgewebe	31
4.2.2 Zellzahlbestimmung nach Trypanblau-Methode	32

4.2.3	Passagieren, Ablösen und Zellzahlbestimmung der porcinen mesenchymalen Stammzellen	33
4.2.4	Mesenchymale Stammzellendifferenzierung.....	33
4.3	Analyse von Oberflächenantigenen auf porcinen mesenchymalen Stammzellen	34
4.4	Isolierung osteochondraler Explantate (OCE)	35
4.4.1	OCE-Isolierung aus humanem Material nach Kniegelenkersatz-Operation	36
4.4.2	OCE-Isolierung aus humanem Material eines Körperspenders postmortem	37
4.5	Herstellung der Hydrogele und Inkulturnahme der osteochondralen Explantate	38
4.6	Anverdauen von porcinen Knorpelschnipseln.....	39
4.7	Papain-Verdau und DMMB-Assay (GAG-Assay)	40
4.8	Bestimmung der Zellvitalität.....	42
4.9	Histologische Analyse	42
4.9.1	Kunststoffeinbettung.....	42
4.9.2	Entplastung der Kunststoffschnitte.....	43
4.9.3	Safranin-O-/Fast-Green-Färbung.....	44
4.9.4	Immunhistologische Färbungen – Aggrekan, Kollagene I, II und X.....	45
5	Ergebnisse	47
5.1	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	47
5.2	FACS-Analyse.....	48
5.3	Auswachsen von Knorpelzellen aus anverdauten Knorpelschnipseln	49
5.4	Porcines <i>Ex vivo</i> Testsystem: Vitalitätsbestimmung.....	50
5.5	Histologie, Immunhistologie und Scoring.....	52
5.5.1	Histologische Färbungen der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur im Kollagenhydrogel	53
5.5.2	Bern- und ICRS-II-Scoring der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur im Kollagenhydrogel	55
5.5.3	Histologische Färbungen der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur und Knorpelschnipsels im Kollagenhydrogel	57

5.5.4	Bern- und ICRS-II-Scoring der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur und Knorpelschnipsels im Kollagenhydrogel	59
5.6	DMMB-Assay (GAG-Assay).....	59
6	Diskussion und Ausblick	63
6.1	Osteochondrales <i>Ex-vivo</i> -Testmodell mit definierter Defekttiefe	64
6.2	Einfluss der Wahl des Zellphänotyps auf die Knorpelreparatur	65
6.3	Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die Knorpelreparatur	66
6.4	Einfluss der Zugabe von Knorpelschnipsel in der Knorpelreparatur	68
6.5	Limitationen des porcinen <i>Ex vivo</i> Testsystem.....	69
6.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	70
7	Literaturverzeichnis.....	72
	Lebenslauf.....	A
	Affidavit	C
	Danksagung	D

Zusammenfassung

Die Degeneration des Gelenkknorpels ist Hauptursache für chronische Schmerzen und eine dadurch bedingte Einschränkung der Lebensqualität. Für die Sozialversicherungssysteme ist dies mit steigenden Kosten verbunden. Gegenwärtige Behandlungsoptionen wie die Mikrofrakturierung oder die (matrix-assoziierte) Autologe Chondrozytentransplantation (M-) ACT führen zu einem minderwertigen Reparaturgewebe aus Faserknorpel mit unzureichenden mechanischen Eigenschaften an der Defektstelle. Es besteht ein Bedarf an der Entwicklung und Testung neuer Knorpeltherapien, die ein funktionelles Reparaturgewebe für nachhaltige Beschwerdefreiheit erzeugen. Das hier verwendete kürzlich etablierte osteochondrale *Ex vivo*-Testsystem (EVTS) eignet sich zur Evaluation unterschiedlicher zellbasierter Behandlungsansätze für die Knorpelregeneration.

Aus der medialen Femurkondyle von Schweinen wurden zylindrische 8 mm große osteochondrale Explantate (OCE) isoliert. Es wurden Knorpel-Knochendefekte und reine Knorpeldefekte kreiert und mit autologen Schweine-Chondrozyten (CZ) bzw. einer Mischung aus CZ und mesenchymalen Stammzellen (MSC) gefüllt, die in Kollagen Typ I Hydrogel eingebettet waren. Nach vierwöchiger Kultivierung wurden die Proben histologisch und immunhistochemisch gefärbt (Safranin-O-Färbung, Kollagen Typ II, Aggrecan), die Zellvitalität (Lebend-Tot-Färbung) überprüft und die extrazelluläre Matrixproduktion analysiert.

Nach vierwöchiger Kultur im EVTS in Normoxie und Hypoxie zeigten sich die in Kollagen-I-Hydrogel eingebetteten Zellen lebensfähig. Die Auswertung der verschiedenen Ansätze erfolgte über den standardisierten ICRS-II-Score der International Cartilage Repair Society (ICRS) mit drei unabhängigen Bewertern. Insgesamt resultierten bessere Ergebnisse im Hinblick auf die Matrixsynthese in den Monokulturen aus CZ im Vergleich zu den Co-Kulturen aus CZ und MSCs. Da dieser Unterschied nicht groß war, könnten MSCs zur Einsparung autologer CZ eine Alternative in der Behandlung von Knorpeldefekten darstellen. Hypoxie spielte eine Rolle bei reinen Knorpeldefekten, nicht bei Knorpel-Knochendefekten. Dies bestätigt die Bedeutung des physiologischen hypoxischen Milieus des Gelenkknorpels, das einen niedrigen Sauerstoffgehalt von 2-5

% aufweist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlichen Faktoren aus Zellkombination, Knorpeldefektgröße und Kultivierung in Hypoxie oder Normoxie Einfluss auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix haben. Weiterhin fehlt jedoch das Verständnis für die genauen Mechanismen des Knorpelregenerationsverhaltens. *Ex vivo*-Testsysteme können dabei helfen ein weiteres Verständnis zu erlangen und entsprechende Behandlungsstrategien zu evaluieren.

Summary

Degeneration of articular cartilage is a major cause of chronic pain - impairing the quality of life and rising health care costs. Current treatment options like microfracture, ACT or MACT result in fibrocartilaginous repair tissue with insufficient mechanical properties at the defect site. Hence, new cartilage therapies generating functional repair tissue need to be developed and tested. Here we used a recently established *ex vivo* osteochondral model to evaluate the therapeutic potential of several cell-based cartilage regeneration approaches.

Reproducible cylindrical 8 mm osteochondral explants (OCE) were isolated from porcine medial condyles. Full-thickness and cartilage-only defects were created and filled with autologous porcine chondrocytes respectively a mixture of chondrocytes and mesenchymal stem cells, embedded in collagen type I hydrogel. After static culture for four weeks, samples were analyzed for cell viability (live/dead staining) and extracellular matrix production, using immunohistochemical staining (Safranin-O-staining, collagen type II, aggrecan).

Embedded cells remain viable after four weeks culture in *ex vivo* osteochondral model. Outcome of different cartilage regeneration approaches were compared using the recommended guidelines proposed by the International Cartilage Repair Society (ICRS) and ICRS-II-score with three independent evaluators. Overall, the monocultures from CZ performed better than the co-cultures from CZ and MSCs. Since this difference was not large, MSCs could be an alternative in the treatment of cartilage defects to save autologous CZ. Hypoxia played a role in pure cartilage defects, but not in cartilage-bone defects. This confirms the importance of the physiological hypoxic milieu of the articular cartilage, which has a low oxygen content of 2-5 %.

The results show that the different factors from cell combination, cartilage defect size and cultivation in hypoxia or normoxia influence the formation of the extracellular matrix. However, there is still no understanding of the exact mechanisms of cartilage regeneration behavior. *Ex vivo* test systems can help to gain further understanding and to evaluate appropriate treatment strategies.

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AK	Antikörper
AMIC	Autologe Matrixassoziierte Chondrozyten Transplantation
Anti-Anti	Antibiotic-Antimycotic
CZ	Chondrozyten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	1,9-Dimethyl-Methylene Blue
EVTS	<i>Ex vivo</i> Testsystem
EZM	Extrazellulärmatrix
FKS	Fetales Kalberserum
GAG	Glykosaminoglykane
hbFGF	Human Basic Fibroblast Growth Factor
HG	Hydrogel
HIF	Hypoxie induzierende Faktoren
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICRS	International Cartilage Repair Society
ITS	Insulin Transferrin Selenium
KKD	Knochen-Knorpeldefekt
KD	Knorpeldefekt
M-ACT	Matrixassoziierte ACT
pChon	Porcine Chondrozyten
pMSC	Porcine Mesenchymale Stammzellen
pMix	Co-Kultur aus pMSC und pChon
OA	Osteoarthritis
OATS	Knorpel-Knochen-Transplantation
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PG	Proteoglykane
RT	Raumtemperatur
TGF- β 3	Transforming Growth Factor beta 3
VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser
VF	Verdünnungsfaktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Organisation des Gelenkknorpels. Reproduziert mit Erlaubnis von Heinegard <i>et al.</i> [27] Copyright © 2010, Springer Nature.	5
Abbildung 2: Zonale Organisation des hyalinen Gelenkknorpels. (a) Osteochondraler Gewebeschnitt aus dem Metacarpophalangealgelenk eines Kaninchens zur Veranschaulichung der zonalen Organisation der Chondrozyten in der superfiziellen, mittleren und tiefen Zone von hyalinem Knorpel. (b) Zonale Organisation der Kollagenfasern in den drei Schichten. Rechts ist eine Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen dem Sauerstoffgehalt und ausgewählten Proteinen und Enzymen des hyalinen Gelenkknorpels in den unterschiedlichen Zonen dargestellt. Zusätzlich ist die Präsenz Hypoxie induzierender Faktoren (HIFs), die wichtig für die Aufrechterhaltung der physiologischen Knorpelhomöostase sind, gezeigt. Reproduziert mit Erlaubnis von Taheem <i>et al.</i> [32] unter der Lizenzvereinbarung "Creative Commons Attribution 4.0" (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).	7
Abbildung 3: <i>Ex vivo</i> Kultursystem der osteochondralen Explantate (OCE). (a) EVTS in der Sechs-Well-Platte mit OCE in Inserts (b) Kompartimentierung des Inserts für spezifisches Knochen- und Knorpelmedium. Adaptiert von Schwab <i>et al.</i> 2017 [18] mit Erlaubnis unter der Lizenzvereinbarung Creative Commons Attribution 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).	14
Abbildung 4: Porcines osteochondrales Explantat (OCE), (a) OCE Seitenansicht mit Knorpel und Knochengewebe, (b) Aufsicht des OCE zeigt den Knorpel, (c) OCE mit Knochen-Knorpel-Defekt und (d) OCE mit Knorpeldefekt im Querschnitt.	15
Abbildung 5: Übersicht unterschiedlicher histologischer Scoring-Systeme für Knorpelgewebe mit der Unterteilung in <i>ex vivo</i> bzw. Tissue engineered-basierter Knorpelreparatur (u.a. Bern-Score) und <i>in-vivo</i> -Scoring-Systeme für <i>In vivo</i> -Knorpelreparatur (u.a. ICRS II). Reproduziert mit Erlaubnis von Rutgers <i>et al.</i> [65] Copyright © 2009 Osteoarthritis Research Society International mit Erlaubnis von Elsevier Ltd.	17
Abbildung 6: Übersicht über die verwendeten Methoden für Ansatz I und II.	30
Abbildung 7: Übersicht über die verwendeten Methoden für Ansatz III mit zusätzlichen Knorpelschnipseln (KS) im Kollagen I Hydrogel.	31
Abbildung 8: Isolation der osteochondralen Explantate (OCE). (a) Freilegen der Gelenkflächen, (b) und (c) Bohren und Entnahme der OCE, (d) mediale Kondyle nach Bohren der OCE (8 mm) und laterale Kondyle mit abgeschabtem Knorpelgewebe, (e) mediale Kondyle nach Herauslösen der OCE.	35
Abbildung 9: Porcines osteochondrales Explantat (a) Außen- bzw. Seitenansicht, (b) Ansicht von oben, (c) und (d) OCE mit Knochen-Knorpel-Defekt im Querschnitt und von oben. Scale bar 5 mm.	36

Abbildung 10: Humanes Kniegelenksgewebe: (a) nach einer Knie-TEP einer 74-jährigen Patientin, (b) Zustand nach Bohren und Entnahme der osteochondralen Explantate (OCE), (c) humane OCE.....	37
Abbildung 11: Anverdaute Knorpelschnipsel in Basismedium.....	39
Abbildung 12: Histologie der Stammzellendifferenzierung (40x) mit (a) Adipogener Differenzierung (Oilred-O-Färbung) und Negativkontrolle (b), (c) osteogener Differenzierung (Alizarin-Red-Färbung) und Negativkontrolle (d) und (e) chondrogener Differenzierung (Alcianblau-Färbung) und Negativkontrolle (f). Scale bar 500 µm.	47
Abbildung 13: FACS-Analyse der Marker CD29 ⁺ , CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD31 ⁻ , CD166 ⁻ Oberflächenmarker als typische Oberflächenmarker zum Nachweis von mesenchymalen Vorläuferzellen isoliert aus Knochenmark.....	48
Abbildung 14: Auswachsen von Knorpelzellen in Basismedium an (a) Tag 1, (b) Tag 6, (c) Tag 14 und (d) Tag 21. Pfeile deuten auf einzelne auswachsende Chondrozyten hin. Scale bar 200 µm.....	49
Abbildung 15: Live-Dead Analyse der OCE mit einer Auswahl an Bildern von Ansatz I und II an Tag 0 mit Kollagen I Hydrogel und pChon im Knorpel-Knochendefekt (a). pChon im Knorpeldefekt (b), pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knochen-Knorpeldefekt (c) und pMix im Knorpeldefekt (d). Scale bar 100 µm.	50
Abbildung 16: Live-Dead-Analyse der OCE mit einer Auswahl an Bildern von Ansatz I und II (Duplikat) mit Kollagen I Hydrogel an Tag 28 nach Kultivierung in Normoxie (oben, a-d) und Hypoxie (unten, e-h); a und e: pChon im Knochen-Knorpeldefekt, b und f: pChon im Knorpeldefekt, c und g: pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knochen-Knorpeldefekt und d und h: pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knorpeldefekt (c). Scale bar 100 µm.....	50
Abbildung 17: Ansatz III Live-Dead-Analyse der OCE an Tag 0 mit Knorpelschnipseln im Kollagen I Hydrogel mit pChon im Knochen-Knorpeldefekt (a), pChon im Knorpeldefekt (b) und pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knorpeldefekt. Scale bar 100 µm.	51
Abbildung 18: Live-Dead-Analyse der OCE von Ansatz III an Tag 28 mit Knorpelschnipseln mit pChon im Knochen-Knorpeldefekt in Kultivierung in Normoxie (a) und Hypoxie (b-d): pChon im Knorpeldefekt (b), pChon im Knochen-Knorpeldefekt (c) und pMix-Kultur aus pMSC und pChondrozyten im Knorpeldefekt (d). In Abbildung b und c, den Knorpeldefekten, sind die Knorpelschnipsel zu erkennen. Scale bar 100 µm.	51
Abbildung 19: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) im Knorpeldefekt, Normoxie vs. Hypoxie (20x) von Ansatz I/II an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 µm.....	54

Abbildung 20: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) im Knochen-Knorpeldefekt, Normoxie vs. Hypoxie (20x) von Ansatz I/II an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 μm	55
Abbildung 21: Ansatz III: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) mit Knorpelschnipseln (KS) im Knochen-Knorpel-Defekt (KKD) und Knorpeldefekt (KD), Normoxie vs. Hypoxie (20x) an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 μm	58
Abbildung 22: Quantifizierung des Proteoglykan (GAG) und DNA Gehalts im Kollagen Typ I Hydrogel von Ansatz I und II (Mittelwerte) an Tag 0 und Tag 28 (jeweils Hypoxie "H" und Normoxie "N"). Neben der GAG und DNA-Menge pro Konstrukt sind in der untersten Graphik die GAG Werte zu den jeweiligem DNA-Wert normalisiert dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte inklusive Fehlerbalken, die den Wert von Ansatz I und II angeben. KKD = Knochen-Knorpeldefekt, KD = Knorpeldefekt.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Integration des ICRS-II-Score [63] in das Bewertungsschema des Bern-Scores [64].	18
Tabelle 2: Übersicht der Kulturmedien und der Medienzusätze	21
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen für die FACS-Analyse.	22
Tabelle 4: Medienzusammensetzung für die Stammzellendifferenzierung.	22
Tabelle 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.	23
Tabelle 6: Bestimmung der Zellvitalität.	24
Tabelle 7: Gel-Neutralisationslösung zur Herstellung der Kollagen-I-Hydrogele.	24
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien für die Kunststoffeinfettung (Technovit 9100).	24
Tabelle 9: Verwendete Lösungen zur Kunststoffeinfettung.	25
Tabelle 10: Verwendete Lösungen zur Safranin O-/Fast-Green-Färbung.	25
Tabelle 11: Zusammensetzung der Lösungen für die Safranin O-/Fast-Green-Färbung.	25
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Reagenzien für die Immunhistologie.	26
Tabelle 13: Verwendete Lösungen für die Immunhistologie.	26
Tabelle 14: Verwendete Antikörper für die Immunhistologie.	26
Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme für die Immunhistologie.	27
Tabelle 16: Chemikalien und Lösungen für Papain-Verdau für DMMB-Assay.	27
Tabelle 17: Chemikalien und Lösungen für DMMB-Assay zur Quantifizierung der Proteoglykane.	28
Tabelle 18: Liste aller verwendete Chemikalien und Reagenzien in der Histologie.	28
Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Geräte.	29
Tabelle 20: Überblick aller Behandlungsstrategien unter Angabe des Zelltyps (pChon, pMix), der Defekttiefe (Knorpel- (1 mm) und Knochen-Knorpeldefekt (full-thickness)), des Sauerstoffgehalts und des Füllmaterials (Kollagen I), die in Ansatz I und II (Duplikat) verwendet wurden.	39
Tabelle 21: Standardkurve für DMMB Assay.	41
Tabelle 22: Ablauf der Dehydrierung und Infiltration der OCE für die Kunststoffeinfettung.	43
Tabelle 23: Entplastung der mit Technovit 9100 neu eingebetteten Schnitte.	44
Tabelle 24: Ablauf der Dehydrierung und Infiltration der OCE für die Kunststoffeinfettung.	44
Tabelle 25: Entwässerung der Gewebeschnitte.	45
Tabelle 26: Übersicht über die ersten beiden Ansätze (Ansatz I und II) mit den Mittelwerten aus der Auswertung mit dem ICRS-II-/Bern-Score (maximal 18 Punkte) nach 28 Tagen Kultur (n=2 Proben, 3 Bewerter).	56

Tabelle 27: Übersicht über den dritten Ansatz (Ansatz III) mit Knorpelschnipseln (S) im zellbeladenen Kollagen-I-HG and Tag 28 mit den Mittelwerten aus der Auswertung mit dem ICRS-II-/Bern-Score (maximal 18 Punkte).....	59
Tabelle 28: GAG, DNA und GAG/DNA Werte aus Ansatz I und II inklusive der Berechnung des Mittelwertes beider Ansätze. KKD = Knochen-Knorpeldefekt, KD = Knorpeldefekt, I = Ansatz I, II = Ansatz II.....	62

1 Einleitung

1.1 Bedeutung alternativer Behandlungskonzepte für Knorpelerkrankungen im soziodemographischen Kontext

Die Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels ist eine der Hauptursachen für chronischen Schmerz, Mobilitätsverlust und einer dadurch bedingten Einschränkung der Lebensqualität verbunden mit steigenden Kosten für die Sozialversicherungssysteme. In Deutschland leiden ca. 30 % der weiblichen und fast 20 % der männlichen Bevölkerung an Arthrose [1, 2]. Für die Behandlung und die Folgen degenerativer Gelenkerkrankungen müssen in Deutschland von den Kostenträgern jedes Jahr ca. 15 Milliarden Euro aufgebracht werden, was in etwa 7 % der Gesamtkosten im Deutschen Gesundheitssystem ausmachen [3].

Die Degeneration des Gelenkknorpels ist ein Schlüsselfaktor in der Ausbildung einer Osteoarthritis (OA). OA wird in der Literatur beschrieben als degenerative Arthritis, degenerative Gelenkerkrankung oder Osteoarthrose. Allen gemeinsam ist die Zerstörung des hyalinen Gelenkknorpels bis auf den subchondralen Knochen [4]. An dieser Stelle ist es wichtig zu verstehen, dass ein altersbedingt degenerativ verändertes Gelenk nicht automatisch auch osteoarthrotisch, sprich entzündlich, verändert sein muss. Degeneration beschreibt lediglich die Abnutzung eines Gelenks, die mit einem Struktur- und Funktionsverlust einhergeht [5]. Ein stattgehabtes Trauma des Kniegelenks erhöht dabei die Wahrscheinlichkeit einer späteren Osteoarthritis. So entwickeln ca. 14 % der Menschen mit einer Knieverletzung im selben Kniegelenk bis zum höheren Lebensalter (ca. 65 Jahre) einer Osteoarthritis [6]. Zusätzlich kann der moderne Lebenswandel, der insbesondere in den Industrieländern von einem durch Bewegungsarmut und Fehlernährung geprägten Alltag charakterisiert ist, den degenerativen Prozess beschleunigen und die Entstehung einer OA begünstigen. So besteht ein direkter Zusammenhang mit der Ausbildung und dem Ausmaß des Metabolischen Syndroms, u. a. bestehend aus Adipositas, Hypertonie, Diabetes Mellitus und Hypercholesterinämie [7].

Bewegung ist nicht nur Voraussetzung für den Erhalt der gelenkstabilisierenden Muskulatur. Die mechanische Reizung des nicht durchbluteten und über Diffusion

versorgten Gelenkknorpels ist wesentlich für den Erhalt seiner physiologischen Gewebestruktur, die ein schmerzfreies und nahezu reibungsloses Gleiten der Gelenkflächen ermöglicht [8].

Die Erforschung der Faktoren, die eine alters- und stoffwechselbedingte Störung des physiologischen Knorpelmilieus auslösen, z. B. die übermäßige Produktion an matrixabbauenden Enzymen durch die Chondrozyten wie Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Aggrecanasen [9] sowie der Einfluss der Hypoxie-induzierenden Faktoren (HIF), die u. a. an der Regulation von Entzündungsmediatoren und Transkriptionsfaktoren beteiligt sind [10], zählt zu den aktuell großen wissenschaftlichen Herausforderungen. Hinzu kommen Einflussfaktoren, wie das Alter, Bewegungsmangel, erhöhter Body-Maß-Index (BMI) oder das weibliche Geschlecht [11], was einen hormonellen Einfluss nahelegt sowie die Bedeutung der Körperfett-Körpermuskulatur-Relation hervorhebt.

Aufgrund dieser hohen Komplexität der Einflussfaktoren bei der Entstehung einer Osteoarthritis erscheint es sinnvoll, sich zunächst auf das Reparatur- und Regenerationsverhalten isolierter Knorpelschäden zu konzentrieren und mögliche Erkenntnisse auf die Prävention und Behandlung von degenerativen Gelenkveränderungen anzuwenden [12]. Gleichermaßen besteht die therapeutische Herausforderung bei der Behandlung eines isolierten, durch ein Trauma verursachten Knorpeldefekts in einem noch nicht degenerativ veränderten Gelenk, darin, die Entstehung prä-osteoarthritischer Veränderungen und die spätere Ausbildung einer manifesten Osteoarthrose zu verhindern oder mindestens hinauszuzögern [13]. Degenerative und traumatisch bedingte Gelenkerkrankungen werden vornehmlich von Ärzten aus den Bereichen Orthopädie, Traumatologie und Sportmedizin behandelt [14]. Prominente chirurgische Verfahren, wie die Mikrofrakturierung oder die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT), wirken zwar kurzfristig, und dies vor allem bei jungen Patienten, können aber nur in wenigen Fällen eine langfristige Beschwerdefreiheit vorweisen [15].

Folgerichtig besteht ein Bedarf an der Entwicklung alternativer Behandlungskonzepte. Die avaskuläre, anervale und alymphatische Natur des hyalinen Gelenkknorpels sowie

die Tatsache, dass Knorpelgewebe nur eine Zellart, die Chondrozyten, besitzt, prädisponiert ihn für den Bereich des Tissue Engineering [16]. Zusätzlich sind mesenchymale Stammzellen (MSC) durch ihr multiples Differenzierungsverhalten eine potentielle Option in der Gewebereparatur. Jedoch hat sich trotz der Etablierung ihrer Isolierung bereits Ende der 1980er Jahre keine Therapieoption entscheidend durchsetzen können [17], was auch an den fehlenden Möglichkeiten der klinischen Testung liegt. Um diesem Problem zu begegnen wird in dieser Arbeit ein kürzlich etabliertes osteochondrales *Ex vivo*-Testsystem (EVTS) genutzt [18]. Es bietet den Vorteil unterschiedliche Materialien als Füllung für künstlich geschaffene Defekte unter unterschiedlichen Bedingungen über einen längeren Zeitraum zu evaluieren. Als Donor der osteochondralen Explantate (OCE) wurden Knie von 6-9 Monate alten Schweinen gewählt, die jederzeit verfügbar und vergleichbar sind und dadurch den Vorteil der Reproduzierbarkeit haben. Die Verwertung von humanem Material aus Knie-TEP-Operationen hat sich als nicht valide sowie im Handling schwierig und nicht vergleichbar gezeigt. Zusätzlich ist das Material begrenzt und nicht planbar verfügbar sowie das Gewebe oftmals osteoarthrotisch verändert. Gleiches gilt für die Kultivierung humaner OCE aus kürzlich verstorbenen Körperspendern.

In dieser Arbeit soll das Regenerationspotential von in Kollagen-I-Hydrogel (HG) eingebetteten Zellen (porcine MSC (pMSC) und porcine Knorpelzellen (pChon)) unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie unter der Zugabe von Knorpelschnipseln in das HG getestet werden.

1.2 Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels

Knorpelgewebe gehört zum Stützgewebe des menschlichen Körpers. Der hyaline Gelenkknorpel bedeckt mit wenigen Ausnahmen alle Gelenkflächen und ist etwa 2 bis 4 mm dick. Die Grundbestandteile sind die Chondrozyten (Knorpelzellen), Proteoglykane (PG), Kollagenfibrillen und Wasser. Die Chondrozyten machen dabei lediglich 2 % des Gewebes aus. Sie sind stoffwechselaktive Zellen, die für die Gewebemöostase wichtig sind [19]. Der Hauptbestandteil bildet die Extrazellulärmatrix (EZM), die vor allem aus PG und Kollagenfibrillen besteht und dadurch eine hohe Wasserbindungsfähigkeit

besitzt [20]. Das Zusammenwirken zwischen Knorpelzellen und EZM ist ursächlich für die feste und druckelastische Konsistenz des Gelenkknorpels [21].

1.2.1 Chondrozyten und Extrazellulärmatrix (EZM)

Der zelluläre Anteil des Gelenkknorpels macht nur etwa 2 % des Gesamtvolumens aus [22]. Chondrozyten entwickeln sich aus Mesenchymzellen, die zu Chondroblasten differenzieren. Sobald die Chondroblasten beginnen EZM zu produzieren, werden sie zu Chondrozyten, die durch die zunehmende Matrix auseinandergedrängt werden und proliferieren. Dieses interstitielle Wachstum, also das Wachstum von innen heraus, findet ausschließlich in der frühen Phase der Knorpelentwicklung und in der Wachstumsplatte des Knochens statt. Nach Abschluss des Wachstums bilden die Chondrozyten sogenannte isogene Gruppen aus Knorpelzellen, die alle aus denselben Chondrozyten entstanden sind. Sie sind verantwortlich für den langsamen, aber stetigen Umsatz der EZM [23]. Diese reifen, ausdifferenzierten Zellen des gesunden Knorpels sind mitotisch nahezu inaktiv und deshalb nur begrenzt regenerationsfähig [24]. Je nach Knorpelart und biomechanischer Beanspruchung variiert die Zusammensetzung der EZM. So besitzt der elastische Knorpel zusätzlich Netze elastischer Fasern.

Der Faserknorpel besitzt einen hohen Anteil an Kollagenfasern, was ihm, ähnlich dem straffen Bindegewebe, eine hohe Zugfestigkeit verleiht. In beiden Knorpeltypen überwiegen Kollagenfasern vom Kollagen-Typ I [23].

Im hyalinen Gelenkknorpel, der als Stoßdämpfer in unseren Gelenken fungiert, ist die Bedeutung der Druckelastizität besonders hoch. Dies spiegelt sich in der Zusammensetzung seiner EZM wider. Sie besteht im Wesentlichen aus Kollagenfasern vom Typ II sowie IX und XI, die sich zu einem dreidimensionalen Maschenwerk aus Kollagenfibrillen zusammenlagern und für mechanische Stabilität und strukturelle Integrität sorgen [25].

Die physikochemischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, z. B. die reversible Wasserbindungsfähigkeit, ermöglichen die polyanionischen, also stark negativ geladenen, Proteoglykane [21]. Das wichtigste Proteoglykan des hyalinen Knorpels ist das Aggrecan, dessen Moleküle sich mit Hyaluronan zu riesigen Molekülkomplexen aus

über 100 Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten zusammenlagern und in der Literatur als „Flaschenbürste“ beschrieben werden (Abbildung 1). Hyaluronan dient als nicht komprimierbares, visköses Gel als Wasserspeicher und ist Hauptgrund für den in der EZM mit 60-80 % sehr hohen Wasseranteil im hyalinen Knorpel. Seine negativen Ladungen bewirken einen passiven Wassereinstrom bis das kollagene Netzwerk gespannt ist und sind ursächlich für die prallelastische Konsistenz des Gelenkknorpels [26].

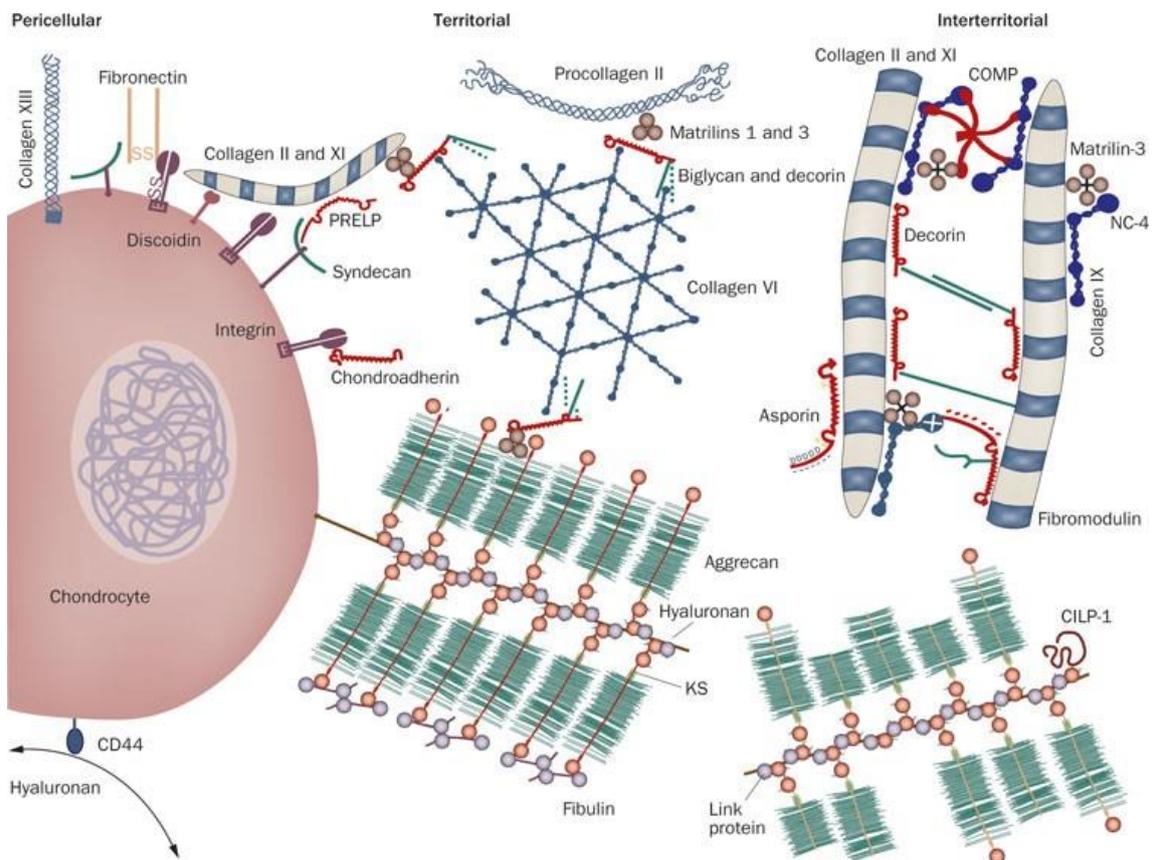


Abbildung 1: Molekulare Organisation des Gelenkknorpels. Reproduziert mit Erlaubnis von Heinegard *et al.* [27] Copyright © 2010, Springer Nature.

Hyaliner Gelenkknorpel ist gefäßfrei, so dass er nicht wie anderes Gewebe über Kapillaren mit Sauerstoff versorgt werden kann. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Sauerstoffkonzentration im Gelenkknorpel 0,5 % bis 10 % (4-70 mmHG) [28]. Die hypoxischen Verhältnisse induzieren darüber hinaus die Expression von Hypoxie induzierenden Faktoren (HIF), die verschiedene Funktionen, beispielsweise die Förderung der EZM-Synthese, die Inhibierung der Apoptose sowie die Regulation von

Entzündungsmediatoren und Transkriptionsfaktoren, ausfüllen. Es wird deshalb angenommen, dass viele Mechanismen in osteoarthrotisch veränderten Gelenken mit der degenerativ, traumatisch oder auch operativ (z. B. durch die Mikrofrakturierung) bedingten Vaskularisierung und Ausbildung eines fibrocartilaginären Knorpels einhergehen [10].

1.2.2 Zonale Gliederung des Gelenkknorpels

Um den hohen mechanischen Ansprüchen gerecht zu werden, ist der hyaline Gelenkknorpel in Zonen untergliedert (Abbildung 2b), die vom arkadenartigen Aufbau der Kollagenfibrillen bestimmt werden [29]. In der oberflächlichen Tangentialzone (Zone I), die in etwa 10-20 % des Gesamtvolumens ausmacht, verlaufen die Knorpelzellen und Kollagen-II-Fibrillen tangential zur Oberfläche und sind trajektoriell, d. h. in Richtung der stärksten Zugspannungen, ausgerichtet. Dies sorgt für eine maximale Oberflächenstabilität. Die Zugfestigkeit in den oberen Schichten ist durch einen im Vergleich höheren Kollagengehalt bedingt. Dieser nimmt mit zunehmendem Abstand von der Knorpeloberfläche ab. Die oberflächliche Tangentialzone ist in 10-20 % der Knorpelarthrosen betroffen. Die mittlere Transitorialzone (Zone II) ist mit einem Volumenanteil von 40-60 % am dicksten und gilt als Übergangszone von der Tangential- in die Radiärzone. Die Kollagen-II-Fibrillen sind scherengitterartig angeordnet, die Zellen liegen in kleinen isogenen Gruppen zusammen und sind säulenartig angeordnet. Die Mittelschicht dient als erster Kompensator von Druckkräften [19]. Die tiefste Schicht, die Radiärzone (Zone III) macht 30 % der Knorpeldicke aus. Sie sorgt für die Verankerung in der subchondralen Knochenschicht. Die Kollagen-II-Fibrillen zeigen einen radiären Verlauf und sind wie die Knorpelzellen senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet [30]. Die Radiärzone wird nach unten hin durch die sogenannte Tide-Mark, die ehemalige Wachstumsfuge, begrenzt. Sie ist die Grenze zwischen nichtkalzifiziertem und kalzifiziertem Knorpelgewebe. In der kalzifizierten Zone, die etwa 3-9 % der Knorpeldicke ausmacht, befinden sich hypertrophe Knorpelzellen die Kollagen X produzieren. Ihre Stoffwechselaktivität ist gering. Die tiefe Zone des mineralisierten

Knorpels (Zone IV) hat von allen Schichten den höchsten Anteil an Proteoglykanen, was die höchste Drucksteifigkeit ermöglicht [31].

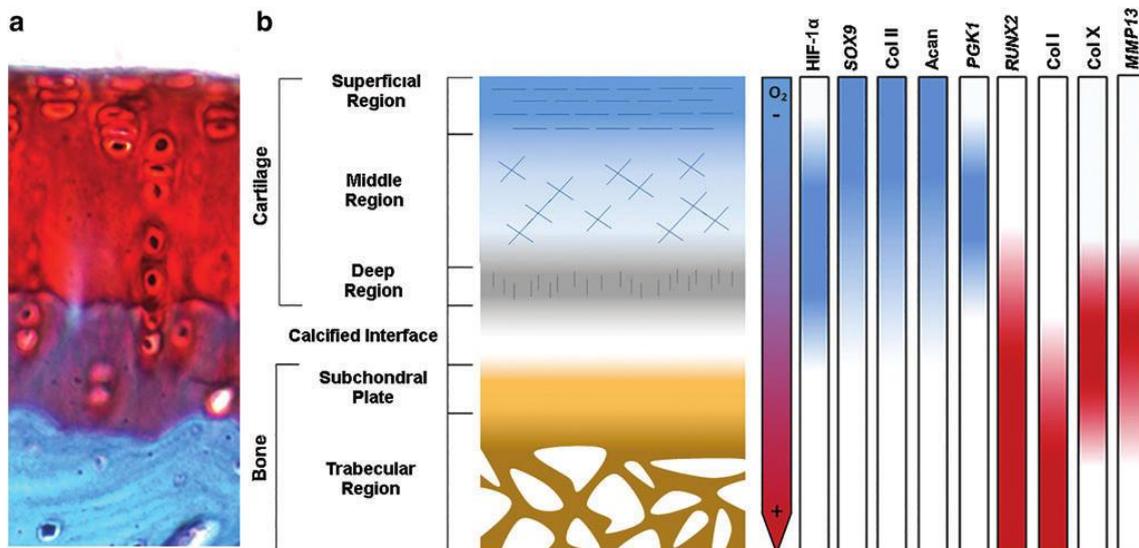


Abbildung 2: Zonale Organisation des hyalinen Gelenkknorpels. (a) Osteochondraler Gewebeschnitt aus dem Metacarpophalangealgelenk eines Kaninchens zur Veranschaulichung der zonalen Organisation der Chondrozyten in der superfiziellen, mittleren und tiefen Zone von hyalinem Knorpel. (b) Zonale Organisation der Kollagenfasern in den drei Schichten. Rechts ist eine Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen dem Sauerstoffgehalt und ausgewählten Proteinen und Enzymen des hyalinen Gelenkknorpels in den unterschiedlichen Zonen dargestellt. Zusätzlich ist die Präsenz Hypoxie induzierender Faktoren (HIFs), die wichtig für die Aufrechterhaltung der physiologischen Knorpelhomöostase sind, gezeigt. Reproduziert mit Erlaubnis von Taheem *et al.* [32] unter der Lizenzvereinbarung "Creative Commons Attribution 4.0" (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

Dieser hochspezialisierte Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels macht die Schwierigkeit einen adäquaten Knorpelersatz zu entwickeln, deutlich. Das Zusammenspiel der Kollagenfibrillen und Proteoglykane ist entscheidend für die Biomechanik der Gelenke und wesentliche Voraussetzung für deren nahezu reibungslose und schmerzfreie Funktionstüchtigkeit. Bisher ist es nicht gelungen diese Zonengliederung zu imitieren und entsprechend einen Knorpelersatz mit adäquaten biomechanischen Eigenschaften eines hyalinen Gelenkknorpels zu entwickeln [33].

1.2.3 Metabolismus des hyalinen Gelenkknorpels

Die Nährstoffversorgung der weit auseinanderliegenden und isolierten Knorpelzellen erfolgt über lange Diffusionsstrecken durch die EZM hindurch und geht i. d. R. vom Perichondrium, der Knorpelhaut, aus. Dies gilt für die meisten elastischen und hyalinen Knorpel, jedoch nicht für den hyalinen Gelenkknorpel. Dieser wird hauptsächlich über Diffusion und Konvektion von der Synovia, der Gelenkflüssigkeit, die von der Gelenkkapsel gebildet wird, sowie über den subchondralen Knochen versorgt. Die Konvektion, d. h. die Be- und Entlastung und der damit verbundene Ein- und Ausstrom der EZM sind verantwortlich dafür, dass bei jedem Schritt das Drei- bis Fünffache des Körpergewichts absorbiert werden kann [30]. Es ist festzuhalten, dass die avaskuläre Natur des Gelenkknorpels und insbesondere seine im Verhältnis zur EZM geringe Anzahl an hochspezialisierten und zudem frühzeitig ausdifferenzierten Knorpelzellen, die Regenerationsfähigkeit begrenzen und ursächlich für degenerative Veränderungen in Gelenken sind [24]. Durch Ausschüttung verschiedener Enzyme erhalten die Chondrozyten die Homöostase der EZM. Sie bilden u. a. Proteine und Glykosaminoglykane sowie eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Regulatorproteinen, beispielsweise TGF- β und Insulin-like-growth-Factor [19]. Dementsprechend führt der altersbedingte Abbau der Chondrozyten zum Verlust der Synthese der Gelenkflüssigkeit (Synovia) und damit der Nährstoffversorgung des hyalinen Gelenkknorpels [21]. Zusätzlich können proinflammatorische Zytokine, beispielsweise IL-1 und TNF-alpha, die durch entzündliche Prozesse (z. B. rheumatische Erkrankungen) und traumatische Einflüsse entstehen, wie Meniskusschäden oder Kreuzband-Rupturen, degenerative Veränderungen einleiten [27].

1.3 Einteilung der Knorpelschäden

Im Bereich der Orthopädie, Traumatologie und Sportmedizin gehören Gelenkknorpelschäden zu den häufigsten Erkrankungen. Als flächenmäßig größtes Gelenk des Körpers ist das Knie am häufigsten betroffen. Prädilektionsstelle sind mit über 50 % der Fälle die Femurkondylen [4]. Je nach Belastung der Gelenkflächen ist der Knorpel dort unterschiedlich dick. In der Belastungszone der medialen Femurkondyle, in

über 60 % der Fälle Ort hyaliner Knorpeldefekte im Kniegelenk, ist er bis zu 4mm dick [24].

Die Einteilung der Knorpelschäden erfolgt nach der „International Cartilage Repair Society“ (ICRS) in vier Grade [61]:

- I. Grad: erweichter Knorpel
- II. Grad: Läsionstiefe <50 % der Knorpeldicke, oberflächliche Auffaserung nachweisbar
- III. Grad: Läsionstiefe >50 % der Knorpeldicke, durch Spalt- und Rissbildung bis an den subchondralen Knochen charakterisiert
- IV. Grad: vollständige Knorpelläsion, der Knochen liegt frei

Älteren Patienten (> 60 Jahre) kann mit einem künstlichen Gelenkersatz die durch Schmerzen und Mobilitätsverlust verlorengegangene Lebensqualität zurückgegeben werden. Allein im Jahr 2018 wurden in deutschen Krankenhäusern insgesamt 190 000 künstliche Kniegelenke implantiert. Davon entfielen ca. 86 % auf die Altersgruppe über 60 Jahre [34]. Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit der Prothesen (ca. 15 Jahre) sollte diese Behandlung für junge Patienten nur im äußersten Fall eine Option sein. Die Bedeutung der Entwicklung neuer und nachhaltiger Behandlungsalternativen wird ersichtlich.

Stadien I und II lassen sich konservativ über physiotherapeutische Maßnahmen wie Muskelaufbau und Propriozeptionstraining behandeln. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Validität vor allem bei älteren Menschen, um die biosynthetische Aktivität des Knorpelgewebes zu erhalten [35]. Erst ab Stadium III ist die Gelenkphysiologie derart gestört, dass operative Therapieverfahren Anwendung finden. Dabei müssen zwei Patientengruppen unterschieden werden. Zum einen Patienten über 60 Jahre, bei denen ein künstlicher Gelenkersatz die Therapie der Wahl ist. Die andere Gruppe bilden jüngere Patienten, die oftmals aufgrund eines Traumas einen Knorpelschaden erlitten haben. Um diese Patienten zu behandeln, haben sich in den letzten Jahren unterschiedliche Behandlungskonzepte etabliert, wie die Mikrofrakturierung, Debridement, Mosaikplastik, ACT und AMIC. Aktuelle Goldstandards in der Behandlung großer Defekte (ICRS Grad III/IV, Defektgröße > 2,5 cm³) sind die Autologe

Chondrozytentransplantation (ACT) und Mikrofrakturierung. Allen gemeinsam ist, dass sie kurzfristig vor allem schmerzlindernd wirken [36], mittel- bis langfristig allerdings (ab zwei Jahre postoperativ) die Beschwerden wieder auftreten [37-39].

1.4 Status Quo der regenerativen Knorpeltherapie

Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, degenerativen oder traumatisch geschädigten Gelenkknorpel adäquat zu ersetzen. Allen heute routinemäßig durchgeführten Therapieansätzen ist gemein, dass sich im postoperativen Heilungsverlauf minderwertiger Faserknorpel (v. a. Kollagen-Typ I) bildet, der den biologischen und mechanischen Ansprüchen eines normalen Gelenkknorpels (v. a. Kollagen-Typ II) nicht standhält. Bereits zwei Jahre nach einer operativen Behandlung ist beim Patienten mit einem Wiederauftreten der Beschwerden zu rechnen [37, 38]. Das Ziel der operativen Reparaturmethoden ist grundsätzlich, das geschädigte Gewebe mit einem Ersatzgewebe zu füllen, um Schmerzen zu lindern und die Belastbarkeit wieder zu steigern. Aktuell sind die klassischen operativen Behandlungen zum einen knochenmarkstimulierende Techniken wie die Mikrofrakturierung, die bei größeren Defekten als sogenannte AMIC-Technik (Autologe Matrixinduzierte Chondrogenese) auch in Kombination mit Biomaterialien durchgeführt wird. Zum anderen gibt es Verfahren, die auf der Transplantation von autologem Gewebe basieren, wie die sog. Mosaikplastik bzw. OATS (Knochen-Knorpel-Transplantation) und die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) [30].

In dieser Arbeit sollen zu den oben genannten Methoden Behandlungsalternativen untersucht werden. Dabei ist vor dem Hintergrund des Tissue Engineering insbesondere die ACT interessant, da sie auf der einen Seite als Goldstandard in der Knorpelersatztherapie bei Defektgrößen von 1-5 cm² gilt, die mittlerweile seit über 20 Jahren durchgeführt wird [40], auf der anderen Seite jedoch trotz umfassender Datenlage unterschiedliche Ergebnisse bezüglich einer nachhaltig erfolgreichen Behandlung vorweist [41]. Als kleinster gemeinsamer Nenner kann aufgeführt werden, dass die ACT kurzfristig Schmerzen und Beschwerden lindern kann und erfolgsversprechender bei jungen Patienten mit beginnenden osteoarthrotischen

Beschwerden ist. Bei älteren kann die ACT als Übergangsmethode eingesetzt werden, um einen zu frühen Gelenkersatz zu verhindern [12]. Bei Sportlern zeigt die ACT postoperativ die höchste Return-to-sports-Rate auch in Bezug auf die Intensität des Sports. Hier ist die Mikrofrakturierung zusammen mit der OATS unterlegen, allerdings konnte bei beiden Methoden eine schnellere Rückkehr zur Sportfähigkeit festgestellt werden [42].

Nachteile der ACT sind die Komorbiditäten, Risiken und Kosten von zwei Operationen (OP). In der ersten OP wird Knorpelgewebe aus einem weniger belasteten Gelenkteil entnommen (Komorbidität) und die Knorpelzellen isoliert. Nach der Kultivierung zur Expansion der Zellzahl werden sie dann in einer zweiten OP in den Knorpeldefekt gefüllt [43]. Die nach wie vor bestehenden Hauptprobleme sind hier, wie auch in der gesamten Knorpelersatzforschung, dass 2D-dedifferenzierte Chondrozyten bei Einsatz in eine 3D-Kultur zu Faserknorpel generieren anstatt zu hyalinem Knorpel mit zonaler Gliederung [33]. Weiterhin besteht Unklarheit darüber, welche Mechanismen an der Regeneration des Gewebes tatsächlich beteiligt sind [38]. Aktuell wird die Bedeutung der Hypoxie induzierenden Faktoren (HIFs) diskutiert, speziell HIF-1alpha, deren Ausschüttung im hypoxischen Gelenkknorpel neben prochondrogenen Enzymen und Proteinen, zum Beispiel Sox9 und Proteoglykane, hoch ist und die physiologische Homöostase stabilisiert. Mit steigendem Sauerstoffgehalt sinkt entsprechend deren Expression und es werden vermehrt proosteogene Proteine und Enzyme ausgeschüttet [32, 44].

1.5 Mesenchymale Stammzellen und Chondrozyten in der Knorpelregeneration

Tissue-Engineering-basierte therapeutische Methoden, bei denen aus Zellen und Biomaterialien strukturell und funktionell kompetentes Gewebe hergestellt wird, spielen hinsichtlich der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels besonders bei traumatisch geschädigtem Gewebe eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien [45]. Unter bestimmten Bedingungen können mesenchymale Stammzellen (MSCs) in verschiedene Gewebearten differenzieren, u. a. Knorpel-, Fett- und Knochengewebe. Dedifferenzierung bedeutet, dass sich differenzierte Zellen, beispielsweise Chondrozyten, phäno- und genotypisch

verändern. Dies ist der Fall, wenn Chondrozyten im Monolayer in Normoxie kultiviert werden. Dabei dedifferenzieren sie zu einem Fibroblasten ähnlichen Phänotyp, der in der Bildung eines im Vergleich zum hyalinen Gelenkknorpel funktionell minderwertigen Faserknorpel resultiert [46, 47]. Eine Kultivierung in Hypoxie ist dementsprechend ein Ansatz, um einer Dedifferenzierung vorzubeugen [48].

Chondrogene Progenitorzellen sind beispielsweise in der Lage, die für die biomechanischen Eigenschaften essentielle EZM zu produzieren [49]. Sie kommen im Stroma, dem Stützgerüst verschiedener Organe, im peripheren Blut sowie dem Knochenmark vor. Aus letzterem werden sie in der Regel für wissenschaftliche Zwecke gewonnen [50]. Die Unterscheidung chondrogener Progenitorzellen von hämatopoetischen Stammzellen oder MSCs erfolgt über die zellspezifischen Oberflächenmarker, die sog. CD-Marker (Cluster of differentiation). Typische positive MSC-Marker sind u. a. CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 in Abwesenheit von u.a. CD45, CD34, CD14 [51-53]. Chondrozytenspezifische Marker und Marker für MSCs mit positivem chondrogenem Potenzial sind CD151, CD166 und CD44. Die Proliferationsrate bezüglich der Zellverdopplungszeit und der chondrogenen EZM Synthese nimmt mit dem Alter ab [54]. Dieser Umstand könnte in Zukunft bei der Zellauswahl und Durchführung von Transplantationsverfahren eine Rolle spielen, da möglicherweise chondrogene Vorläuferzellen den ausgereiften ausdifferenzierte Chondrozyten und den MSCs bezüglich der chondrogenen Differenzierung und EZM-Bildung überlegen sein könnten [55]. Aus diesem Grund sollten in der Behandlung eines Knorpeldefekts im frühen Stadium einer OA idealerweise Chondrozytenprogenitorzellen von jungen Individuen (< 40 Jahren) bei einer allogenen Zellbehandlung zum Einsatz kommen [12]. In einem Kaninchen-Modell konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Beimischung allogener Knorpelschnipsel zu einer besseren Defektheilung führte [56]. In einer klinischen Studie an Patienten im Durchschnittsalter von 30 Jahren konnte ein zufriedenstellendes Ergebnis im Hinblick auf Schmerzreduzierung und Kniefunktion gezeigt werden [57].

Durch die Verwendung von Co-Kulturen aus MSCs und Chondrozyten ist von einem Stimulus auf die Chondrozytenproliferation auszugehen. Dabei wird eher von einer

trophischen Rolle der MSCs und der Matrixproduktion ausgegangen als auf eine tatsächliche chondrogene Differenzierung der MSCs [58, 59]. Weiterhin fehlt ein genaues Verständnis der Mechanismen, die einer Wiederherstellung des Knorpels zugrunde liegen. Es ist unklar, ob die MSCs selbst zu Chondrozyten differenzieren oder möglicherweise nur ein Trigger für die Differenzierung anderer Zellen in der Mikroumgebung sind [60]. In diesem Zusammenhang wird zunehmend die Bedeutung der Hypoxie bei der chondrogenen Differenzierung durch die Ausschüttung Hypoxie induzierender Faktoren (HIFs) diskutiert [32]. Die Bedeutung der Hypoxie, auch Physioxia genannt, bei der Kultivierung und Verwendung von MSCs und MSC-Chondrozyten Co-Kulturen bezüglich der Synthese von EZM ist bereits gut untersucht [61].

In Anlehnung an oben beschriebene Erkenntnisse sollen in dieser Arbeit das Reparationsverhalten von porcinen MSCs (pMSC) und Chondrozyten (pChon) in Kollagen-I-Hydrogel als Trägermatrix in chondralen Defekten evaluiert werden. Zusätzlich werden Knorpelschnipsel desselben Donors in das zellbestückte HG zugeführt. Aufgrund der Komorbiditäten und der umstrittenen Langzeitergebnisse bei der ACT bzw. M-ACT mit einer zusätzlichen Matrix besteht ein Bedarf an alternativen Tissue-engineering-basierten Behandlungsmethoden. Zusätzlich existieren bisher nur vereinzelt Fallberichte über die Anwendung beim Menschen. Für die Durchführung langfristiger Tests eignet sich folgerichtig das kürzlich etablierte osteochondrale *Ex vivo*-Testsystem [18].

1.6 Osteochondrales *Ex vivo*-Testsystem (EVTS)

Etwa 90 % der routinemäßig eingesetzten operativen Verfahren können keinen hohen Evidenznachweis erbringen [62]. Umso bedeutender ist die Etablierung von Testsystemen, um den Erkenntnisstand der Interaktion der beteiligten Zellarten im Knorpelgewebe voranzutreiben, auf deren Basis neue Therapien entstehen können. Dies ist vor dem Hintergrund des demographischen Wandels und einer damit verbundenen Verknappung der Ressourcen im Gesundheitssystem entscheidend, um den steigenden Anforderungen der Kostenträger an Wirksamkeitsnachweisen neuer und bereits etablierter Maßnahmen gerecht zu werden.

Am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM) des Universitätsklinikums Würzburg ist ein entsprechendes *Ex Vivo* Testsystem (EVTS, Abbildung 3) im Rahmen des EU-Projekts HydroZONES etabliert worden [18].

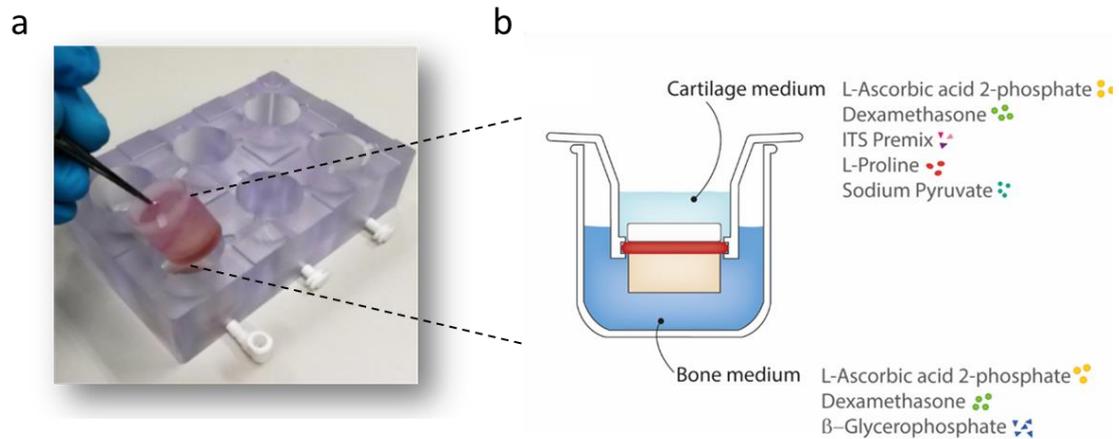


Abbildung 3: *Ex vivo* Kultursystem der osteochondralen Explantate (OCE). (a) EVTS in der Sechswellplatte mit OCE in Inserts (b) Kompartimentierung des Inserts für spezifisches Knochen- und Knorpelmedium. Adaptiert von Schwab *et al.* 2017 [18] mit Erlaubnis unter der Lizenzvereinbarung Creative Commons Attribution 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die LifeTec-Group BV (Eindhoven; Niederlande) hat eine spezielle Wellplatte mit sechs Vertiefungen entwickelt. In jeder Vertiefung kommt ein spezielles Insert zum Einsatz, das den Knorpel- und den Knochenanteil der osteochondralen Explantate (OCE) für eine gezielte Nährstoffversorgung jeweils kompartimentiert. Die OCE können dadurch über einen definierten Zeitraum unter standardisierter physiologischer Nährstoffversorgung statisch kultiviert werden. Des Weiteren erlaubt das EVTS die Modifizierung des OCE. Durch eine Biopsiestanze (Defekte bis auf den Knochen) oder durch eine spezielle Verwundmaschine (ARTcut®; Fraunhofer ISC; Würzburg) können gezielt Knorpeldefekte gesetzt werden. Dabei kann die Realisierung unterschiedlicher Defekttiefen Aufschluss über den Einfluss von Knochengewebe (Knochen-Knorpel-Defekt) bzw. Knorpelgewebe (Knorpeldefekt) auf das Regenerationsverhalten der Zellen im verwendeten defektfüllenden Material geben (Abbildung 4). Gleichzeitig kann ein Vergleich mit bereits

etablierten Behandlungsmethoden erfolgen, beispielsweise der ACT oder Mikrofrakturierung bei Knorpel-Knochen-Defekten.

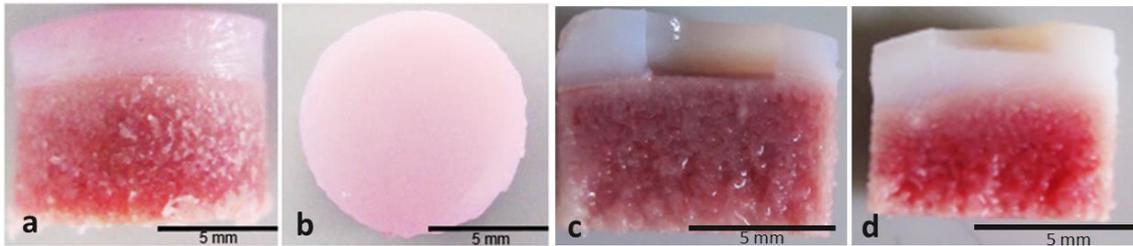


Abbildung 4: Porcines osteochondrales Explantat (OCE), (a) OCE Seitenansicht mit Knorpel und Knochengewebe, (b) Aufsicht des OCE zeigt den Knorpel, (c) OCE mit Knochen-Knorpel-Defekt und (d) OCE mit Knorpeldefekt im Querschnitt.

Als Füllmaterial der Defekte wurde ein Kollagen-I-Hydrogel (HG) als Trägersubstanz verwendet. Das HG wurde zum einen mit porcinen Knorpelzellen (pChon) und zum anderen mit einer Mischung aus porcinen mesenchymalen Stammzellen (pMSC) und porcinen Knorpelzellen (pMix) modifiziert. Um den physiologischen Ansprüchen des Knorpelgewebes gerecht zu werden, sind die OCE unter unterschiedlichen Bedingungen (Normoxie vs. Hypoxie) kultiviert worden. Aufgrund der physiologischen Adaption von Knorpelzellen an einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (im Mittel ca. 5 %) erfolgte die Kultivierung auch unter hypoxischen Bedingungen [10]. Im Anschluss an die Kultivierung erfolgten immunhistologische Antikörperfärbungen mit Aggrekan und Kollagen II zum Nachweis einer gewebespezifischen Matrixbildung sowie mit Kollagen X und Kollagen I für das Vorhandensein gewebeunspezifischer bzw. dedifferenzierter Zellen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des ICRS-II-Scores [63] und des Bern-Scores [64, 65], die für diese Arbeit zusammengeführt wurden.

1.7 Bern-Score und ICRS-II-Score

Für die Auswertung der histologischen Ergebnisse wurden zum einen die standardisierten Leitlinien der International Cartilage Repair Society (ICRS-II-Score) [63] und zum anderen die des Bern-Score [65] genutzt. Die Verbindung beider Scoring-Systeme ermöglichte eine Verbindung zwischen dem Tissue Engineering und der

klinischen Praxis (Abbildung 5). Der Bern-Score ist ein klassisches histologisches Scoring für *in vitro* gezüchteten Knorpel. Über die Safranin-O-Fast-Green-Färbung bietet er die Möglichkeit der Bewertung des Proteoglykan (PG)- bzw. Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalts als Nachweis für die Ausbildung der EZM [64].

Der ICRS-II-Score bietet als Scoring-System für *in vivo* behandeltes Knorpelgewebe eine Transfermöglichkeit in die klinische Praxis. Für die Objektivierbarkeit der Ergebnisse erfolgt die Bewertung über ein visuelles Assessmentsystem (VAS) der verschlüsselt kodierten Proben, bei dem drei BewerterInnen die histologischen Färbungen der osteochondralen Explantate nach unterschiedlichen Kriterien beurteilen. In Ergänzung zum Bern-Score werden im ICRS-II-Score immunhistologische Färbungen mit Aggrekan, Kollagen-II, Kollagen-I und Kollagen-X Antikörpern durchgeführt [63].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ICRS-II-Score in den Bern-Score integriert (Abbildung 5), so dass alle Färbungen in einem kombinierten Scoring-System zusammengefasst werden konnten. Folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen Bewertungskriterien, wie die Ausbildung der entsprechenden Färbung sowie die Zellmorphologie. Für die immunhistologischen Färbungen aus dem ICRS-II-Score wird die Ausbildung der Matrix bestimmt (A, Tabelle 1). Für die Kollagen-I und Kollagen X Färbung wurde das Bewertungssystem umgekehrt, da beide Kollagene für eine vermehrte Kalzifizierung des Knorpels an der Tight-Mark und für die Ausbildung einer vermehrten Verknöcherung bzw. Faserknorpelbildung sprechen. Insgesamt konnten 18 Punkte erreicht werden.

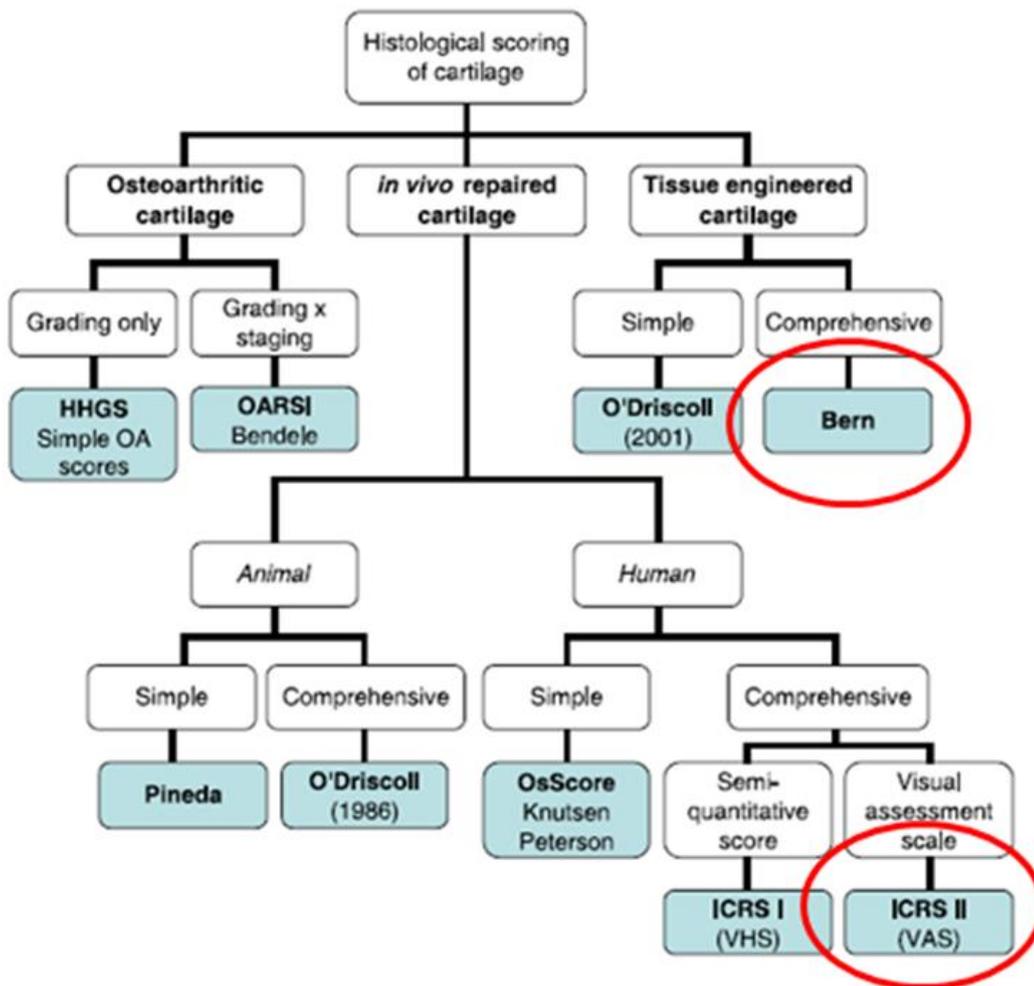


Abbildung 5: Übersicht unterschiedlicher histologischer Scoring-Systeme für Knorpelgewebe mit der Unterteilung in *ex vivo* bzw. Tissue engineered-basierter Knorpelreparatur (u.a. Bern-Score) und *in-vivo*-Scoring-Systeme für *In vivo*-Knorpelreparatur (u.a. ICRS II). Reproduziert mit Erlaubnis von Rutgers *et al.* [65] Copyright © 2009 Osteoarthritis Research Society International mit Erlaubnis von Elsevier Ltd.

Tabelle 1: Integration des ICRS-II-Score [63] in das Bewertungsschema des Bern-Scores [64].

A	Gleichmäßigkeit und Dunkelheit der Safranin O–fast green-Färbung	
	Keine Färbung	0
	Schwache Färbung der schlecht gebildeten Matrix	1
	Mäßig gleichmäßige Färbung	2
	Dunkle Färbung	3
B	Zellmorphologien dargestellt	
	Kondensierte / nekrotische / pyknotische Körper	0
	Spindelförmig, faserig	1
	Gemischt Spindelförmig, faserig mit abgerundeter chondrogener Morphologie	2
	Mehrheit gerundet / chondrogen	3
Erweiterung/Kombination mit Immunhistologie aus ICRS-II-Scoring		
C	Gleichmäßigkeit und Dunkelheit der Aggrekan-Färbung	
	Keine Färbung	0
	Schwache Färbung der schlecht gebildeten Matrix	1
	Mäßig gleichmäßige Färbung	2
	Dunkle Färbung	3
D	Gleichmäßigkeit und Dunkelheit der Kollagen II-Färbung	
	Keine Färbung	0
	Schwache Färbung der schlecht gebildeten Matrix	1
	Mäßig gleichmäßige Färbung	2
	Dunkle Färbung	3
E	Gleichmäßigkeit und Dunkelheit der Kollagen I-Färbung	
	Keine Färbung	3
	Schwache Färbung der schlecht gebildeten Matrix	2
	Mäßig gleichmäßige Färbung	1
	Dunkle Färbung	0
F	Gleichmäßigkeit und Dunkelheit der Kollagen X-Färbung	
	Keine Färbung	3
	Schwache Färbung der schlecht gebildeten Matrix	2
	Mäßig gleichmäßige Färbung	1
	Dunkle Färbung	0
	Total 18 Punkte	

2 Ziel dieser Arbeit

Die Degeneration des Gelenkknorpels ist Hauptursache für chronische Schmerzen und eine dadurch bedingte Einschränkung der Lebensqualität. Für die Sozialversicherungssysteme ist dies mit steigenden Kosten verbunden. Gegenwärtige Behandlungsoptionen wie die Mikrofrakturierung oder die (matrixassoziierte) Autologe Chondrozytentransplantation (M-)ACT führen zu einem minderwertigen Reparaturgewebe aus Faserknorpel mit unzureichenden mechanischen Eigenschaften an der Defektstelle. Es besteht ein Bedarf an der Entwicklung und Testung neuer Knorpeltherapien, die ein funktionelles Reparaturgewebe für nachhaltige Beschwerdefreiheit erzeugen. Das in dieser Arbeit verwendete kürzlich etablierte osteochondrale *Ex vivo*-Testsystem (EVTS) eignet sich zur Evaluation unterschiedlicher zellbasierter Behandlungsansätze für die Knorpelregeneration [18]. Da der Aufbau eines humanen osteochondralen Testsystems (zylinderförmige Knorpel-Knochen-Gewebestücke aus humanem Material) dem klinischen Alltag am nächsten käme, jedoch die Spendervariabilität sehr hoch ist und die Verfügbarkeit begrenzt, sollen porcine osteochondrale Explantate (OCE) zum Einsatz kommen.

Ziel dieser Arbeit ist die Testung alternativer Materialkombinationen in Anlehnung an die M-ACT für die regenerative Behandlung von Knorpeldefekten. Als Matrix wird Kollagen-I-Hydrogel (HG) in einem ersten Ansatz (plus Duplikat) mit porcinen Chondrozyten (pChon) sowie mit einem Mix von pChon und pMSCs beladen (pMix). In einem dritten Ansatz aus den besten Ergebnissen aus Ansatz I und II (Duplikat) werden dem zellbeladenen Kollagen-I-Hydrogel anverdaute Knorpelschnipsel beigemischt als Trigger für eine physiologische Knorpelhomöostase. Neben der Zellart (pChon vs. pMix) soll der Einfluss der Defekttiefe (Knochen-Knorpeldefekt vs. Knorpeldefekt) und die Art der Kultivierung (Normoxie vs. Hypoxie) auf das Regenerationsverhalten von Knorpelgewebe untersucht werden.

Die Auswertung der unterschiedlichen Materialkombinationen soll über eine Kombination aus Bern- und ICRS-II-Score erfolgen. Ziel ist eine objektive Bewertung der Ergebnisse von drei Personen auf Grundlage histologischer (Safranin-O-Färbung) und immunhistologischer Färbungen (Aggrekan, Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X) der OCE.

Dies ermöglicht zum einen die Übertragung in die klinische Praxis und zum anderen die Annäherung eines *Ex vivo*-Testsystems an den klinischen Alltag.

3 Material

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden aufgelistet und beschrieben.

3.1 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Nachfolgend sind alle Materialien, Chemikalien und Reagenzien gelistet, die im Rahmen dieser Arbeit für Zellkultur und Analysen zum Einsatz kamen.

Tabelle 2: Übersicht der Kulturmedien und der Medienzusätze

Mediumkomponente	Hersteller	Bestellnummer
Antibiotic-Antimycotic	Gibco	15240062
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	G9422
Dexamethason	Sigma-Aldrich	D4902
DMEM high glucose	Gibco	32430-027
FKS	Gibco	10270106
hbFGF	Sigma-Aldrich	106096-93-9
IBMX	Applichem	A0695.0001
Indomethacin	Sigma	I8280-5G
Insulin	Sigma	I9278-5ML
ITS(+)-Premix	BD	354352
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation	LS004176
L-Ascorbinsäure	Wako	013-19641
L-Prolin	Sigma-Aldrich	P5607
Natriumpyruvat	Gibco	11360
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen	15140
TGF- β 3	R&D Systems	100-B-010

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen für die FACS-Analyse.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Bestellnummer
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth	8076.2
PBS (10xPulver)	Sigma-Aldrich	D8537
FcR-Block	Miltenyl	130-059-901
Antikörper		
CD29+	BioLegend	303004
CD34-	BD Pharmingen	560942
CD44+ H-CAM	BD Pharmingen	550989
CD90+ Thy-1	BD Biosciences	BD555597
CD166	BD Biosciences	BD560903
CD73	BD Pharmingen	500257
CD31	Miltery	130-092-653
IgG1,K	BD Pharmingen	555750

Tabelle 4: Medienzusammensetzung für die Stammzellendifferenzierung.

Medium	Komponente	Endkonzentration
Adipogene Differenzierung	DMEM <i>high glucose</i>	
	FKS	10 % (v/v)
	Antibiotic-Antimycotic	100 µM
	Dexamethason	1 µM
	IBMX	500 µM
	Insulin	1 µg/mL
	Indomethacin	100 µM
Osteogene Differenzierung	DMEM <i>high glucose</i>	
	Antibiotic-Antimycotic	1 % (v/v)
	FKS	10 % (v/v)
	L-Ascorbinsäure	50 µg/ml
	β-Glycerophosphat	10 mM
	Dexamethason	100 nM
Chondrogene Differenzierung	DMEM <i>high glucose</i>	
	Antibiotic-Antimycotic	1 % (v/v)
	Dexamethason	100 nM
	L-Ascorbinsäure	50 µg/ml
	L-Prolin	40 µg/ml
	ITS(+)-Premix	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 mM
	TGF-β3	10 ng/ml

Tabelle 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Medium	Komponente	Endkonzentration
Stammzellmedium	DMEM <i>high glucose</i>	
	FKS	10 % (v/v)
	Penicillin-Streptomycin	2 % (v/v)
	hbFGF	1ng/ μ L (1:1.000 aus Stammlösung)
Knochenmedium	DMEM <i>high glucose</i>	
	FKS	10 % (v/v)
	Antibiotic-Antimycotic	1 % (v/v)
	Penicillin-Streptomycin	1 % (v/v)
	Dexamethason	100 nM
	L-Ascorbinsäure	50 μ g/ml
	β -Glycerophosphat	10 mM
Knorpelmedium	DMEM <i>high glucose</i>	
	Antibiotic-Antimycotic	1 % (v/v)
	Penicillin-Streptomycin	1 % (v/v)
	Dexamethason	100 nM
	L-Ascorbinsäure	50 μ g/ml
	L-Prolin	40 μ g/ml
	ITS(+)-Premix	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 mM
Chondrozyten Hydrolysemedium	DMEM <i>high glucose</i>	
	FKS	10 % (v/v)
	Antibiotic-Antimycotic	2 % (v/v)
	Penicillin-Streptomycin	2 % (v/v)
	Kollagenase Typ II	0.5 % (v/v)
Basismedium u. a. zur Aufbewahrung der OCE nach der Isolierung Tag 0 bis Tag 1	DMEM high glucose	
	FKS	10 % (v/v)
	Antibiotic-Antimycotic	2 % (v/v)
	Penicillin-Streptomycin	2 % (v/v)

Tabelle 6: Bestimmung der Zellvitalität.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Calcein AM	Invitrogen (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells)	2 µM
Ethidium homodimer-1	Invitrogen (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, 46043, Sigma Aldrich)	4 µM

Tabelle 7: Gel-Neutralisationslösung zur Herstellung der Kollagen-I-Hydrogele.

HG-Komponente	Konzentration	Hersteller
Gel-Neutralisationslösung (GNL, pH 8,5)		
DMEM high glucose (GlutaMax™) (2x)		Gibco 61965-026
HEPES	0,09 M	Sigma H3375
FCS	3 % (v/v)	Bio&Sell FCS.ADD.0500
Chondroitinsulfat	0,05 mg/ml	Sigma, C4384

3.2 Lösungen für die Histologie

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien für die Kunststoffeinbettung (Technovit 9100).

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Basislösung	Heraeus Kulzer	66006735
Härter 1	Heraeus Kulzer	64715444
Härter 2	Heraeus Kulzer	66039185
PMMA-Pulver	Heraeus Kulzer	66010251
Regler	Heraeus Kulzer	66039184

Tabelle 9: Verwendete Lösungen zur Kunststoffeinbettung.

Lösung	Komponente
Prä-Infiltrationslösung I	200 ml Basislösung 200 ml Xylol
Prä-Infiltrationslösung II	200 ml Basislösung 1 g Härter 1
Prä-Infiltrationslösung III	200 ml Basislösung (entstabilisiert) 1 g Härter 1
Infiltrationslösung	250 ml Basislösung (entstabilisiert) 20 g PMMA-Pulver 2 g Härter 1
Stammlösung A	500 ml Basislösung (entstabilisiert) 80 g PMMA-Pulver 4 g Härter 1
Stammlösung B	50 ml Basislösung (entstabilisiert) 4 ml Härter 2 2 ml Regler

Tabelle 10: Verwendete Lösungen zur Safranin O-/Fast-Green-Färbung

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Xylol	Merck	1086612500
Essigsäure	Merck	1.00056.2500
Weigert's Iron Hämatoxylin Set	Sigma	HT1079-1 set
Salzsäure 37 %	Sigma	258148
Fast green	Sigma	F-7258
Safranin O	Sigma	84120

Tabelle 11: Zusammensetzung der Lösungen für die Safranin O-/Fast-Green-Färbung.

Lösung	Komponenten
Weigert's Iron Hämatoxylin	Stocklösung
Fast Green	0,1 g Fast Green 1000 ml VE-Wasser
Essigsäure 1 %	1 ml Essigsäure VE-Wasser 99 ml
Essigalkohol 1 %	37 % Salzsäure (1 ml) 70 % Ethanol (99 ml)
Safranin-O 0,1 %	0,1 g Safranin O 100 ml VE-Wasser

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Reagenzien für die Immunhistologie.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
DCS Super Vision 2 HRPPolymer-Kit	DCS	PD000KIT
Entellan	Merck	1079610500

Tabelle 13: Verwendete Lösungen für die Immunhistologie.

Lösung	Komponente
Waschpuffer	PBS 0,5 % (v/v) Tween-20
DAPI-Arbeitslösung	DAPI (1 µg/ml) in PBS
DCS HRP-Polymer-Reagenz (Label)	Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus-/Kaninchen-AK
DAB-Lösung	1 ml DAB-Substratpuffer 1 Tropfen DAB-Konzentrat

Tabelle 14: Verwendete Antikörper für die Immunhistologie.

Antikörperart	Antikörper	Wirt/Isotyp	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Primär- antikörper	Aggrecan	Maus/IgG	Invitrogen	1mg/ml	1:2000
	Kollagen Typ II	Maus/IgG	MP	1mg/ml	1:1000
	Kollagen Typ X	Maus/IgG	Sigma Aldrich	1mg/ml	1:4000
	Kollagen Typ I	Kaninchen/IgG	abcam	1mg/ml	1:1000
Sekundär- antikörper	DCS Polymer- Enhancer (Link)	Anti-Maus u. Anti- Kaninchen/ IgG	DCS	-	-

Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme für die Immunhistologie.

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich	H4272
Pepsin	Sigma-Aldrich	P7012-1G
Pronase	Sigma-Aldrich	10165921001

3.3 Lösungen für die Analyse des Proteoglykan und DNA-Gehalts

Tabelle 16: Chemikalien und Lösungen für Papain-Verdau für DMMB-Assay.

Pufferlösungen	Zusammensetzung	Endkonzentration
Phosphatpuffer (pH 6,5)	Lösung 1: NaH ₂ PO ₄ in milliQ-Wasser	5 mM
	Lösung 2: NaH ₂ PO ₄ in milliQ-Wasser gemischt mit 5 Teilen Lösung 1 und 4 Teilen Lösung 2	5000 mM
Papainverdau-Puffer	L-Cystein EDTA Phosphatpuffer Papain Ultrareines Wasser	5 mM 500 mM 100 mM 140 µg/ml
Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Bestellnummer
Sodium Dihydrogen Phosphate/ Sodium Phosphat monobasic (NaH ₂ PO ₄ ; MW 119.98)	Sigma	S3139
Di-Sodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄ ; MW 141.96)	AppliChem	A1046
Ethylendiamintetraacetic Säure EDTA (MW 380)	Sigma	E5134-1KG
L-Cystein (C ₃ H ₇ NO ₂ S•HCl; MW 157,6)	Carl Roth	3468.1
Papain von Papaya Latex	Sigma	P4762
Chondroitinsulfat Natrium Salz von Haiknorpel	Sigma	P4384-250mg

Tabelle 17: Chemikalien und Lösungen für DMMB-Assay zur Quantifizierung der Proteoglykane.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Bestellnummer
1,9-Dimethylenmethylen blau (DMMB, MW 347.91)	Sigma	34108
Glycin (MW 75.07)	Sigma	G8898
Natriumchlorid (MW 58.44)	Sigma	57653

3.4 Weitere Chemikalien und Reagenzien für die Laborarbeit

Tabelle 18: Liste aller verwendete Chemikalien und Reagenzien in der Histologie.

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller	Bestellnummer
2-Methoxyethylacetat	VWR	8.06061.1000
Aceton	Roth	5025.1
Antikörperverdünnungslösung	DCS	ALI20R500
Ethanol 96 %, vergällt	Roth	T171.3
Essigsäure	Merck	1.00056.2500
Ethanol absolut	Roth	9065.2
Hämatoxylin	Chroma	2E-032
Histofix (4 % Formaldehydlösung)	Roth	P087.3
Isopropanol	Roth	6752.1
PBS	Sigma-Aldrich	D8537
Tween-20	VWR	8.22184.0500
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth	8070.2
Xylol	Roth	9713.3

3.5 Übersicht der verwendeten Geräte

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller	Software
Akkuboehrschrauber	Bosch	-
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg	FlowJo V10
Mikroskop: Keyence BZ 9000	Keyence	BLZ viewer
Mikrotom: Hartschnittmikrotom	Leica	-
Reader: InfiniteR 200 PRO NanoQuant	Tecan Deutschland GmbH	Tecan i-control V 2.11
Säge: PROXXON KS 230	PROXXON	-
Trepanfräse (Ø 8 mm)	MF-Dental (F229L080)	-
Zentrifuge: Multifuge X12 -	Thermo Scientific	-

4 Methoden

4.1 Übersicht der getesteten Behandlungsstrategien und Analysemethoden

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 6 und 7) ist eine Übersicht der einzelnen Ansätze zur Behandlung von reinen Knorpeldefekten und Knochen-Knorpeldefekten im EVTS inklusive der Analysemethoden dargestellt.

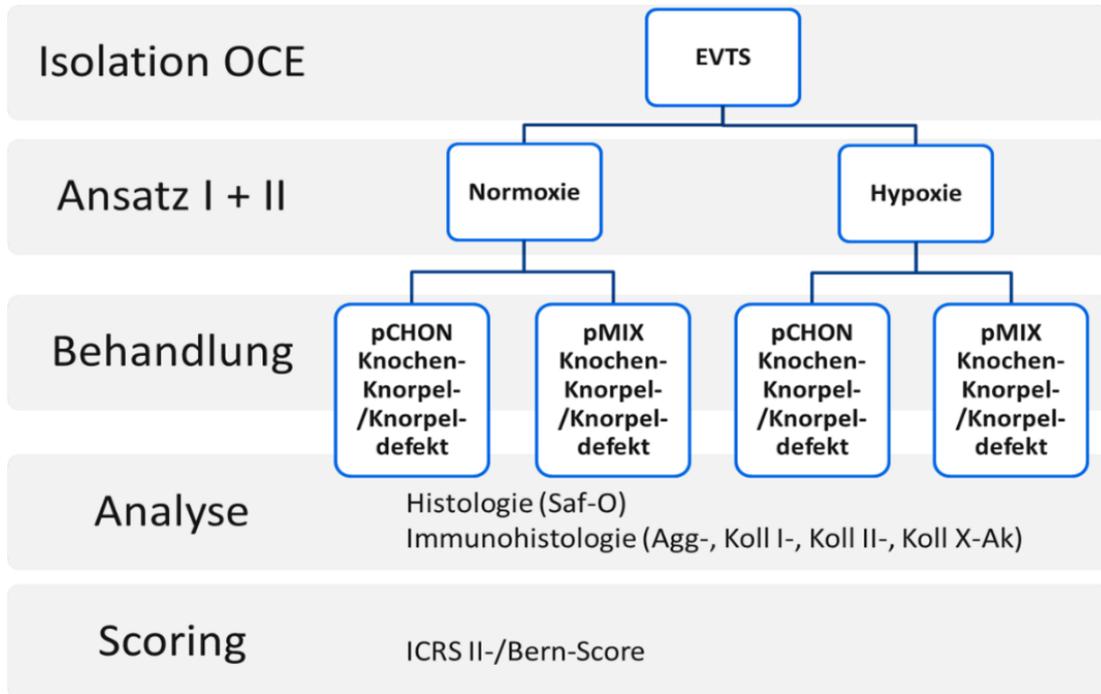


Abbildung 6: Übersicht über die verwendeten Methoden für Ansatz I und II.

In Ansatz I und II (Abbildung 6) wurden Knorpel und Knochen-Knorpeldefekte des EVTS mit pChon bzw. pMix behandelt und unter Normoxia als auch Hypoxie kultiviert. In Ansatz III (Abbildung 7) wurden ausgewählte Behandlungsstrategien aus Ansatz I und II unter Zugabe von Knorpelschnipseln im Kollagen I Hydrogel mit pChon bzw. pMix unter gleichen Bedingungen kultiviert.

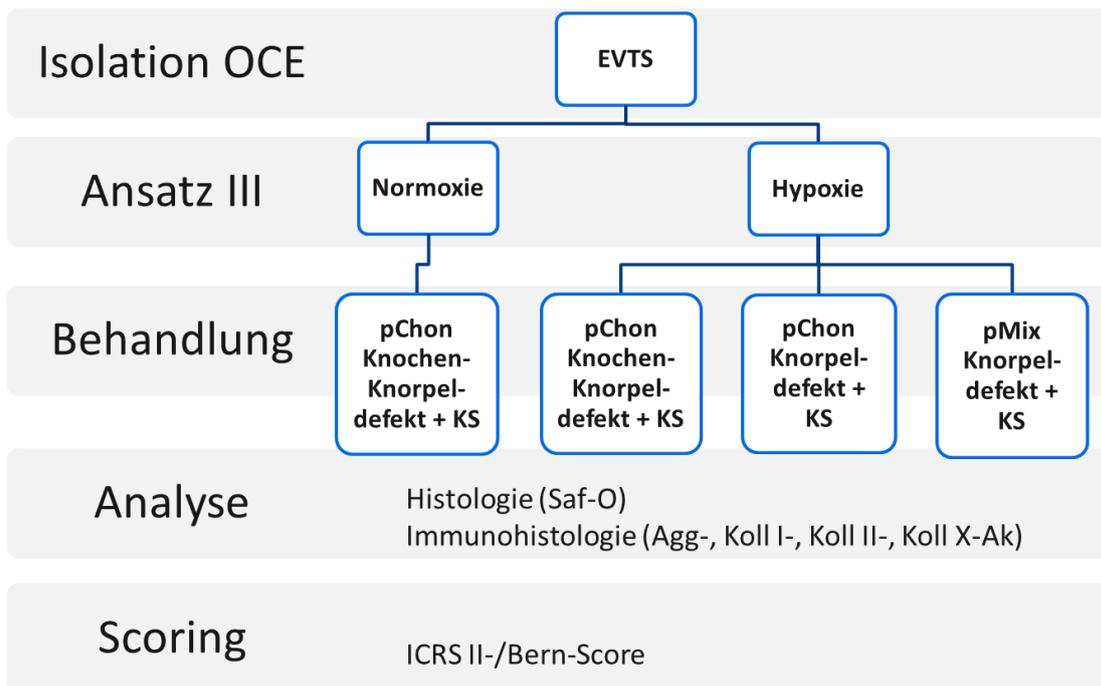


Abbildung 7: Übersicht über die verwendeten Methoden für Ansatz III mit zusätzlichen Knorpelschnipseln (KS) im Kollagen I Hydrogel.

4.2 Zellkultur

Um das Potential und die Parameter der unterschiedlichen Regenerationsstrategien - Normoxie vs. Hypoxie, Knorpeldefekt vs. Knochen-Knorpeldefekt, Chondrozyten vs. Chondrozyten/MSCs – bewerten zu können, erfolgte die Isolation und Kultivierung der MSCs, CZ und der OCE über 28 Tage unter sterilen und weitestgehend physiologischen Bedingungen in einem Brutschrank mit 37 °C, 5 % CO₂ und mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

4.2.1 Chondrozytenisolation aus porcinem Knorpelgewebe

Vor der Isolation der osteochondralen Explantate (OCE) aus der medialen Kondyle von drei Schweineknieen wurden aus der *in vivo* mechanisch weniger belasteten lateralen Kondyle Knorpelgewebe entnommen. Mithilfe eines Skalpells und einer Pinzette erfolgte die Entnahme rautenförmiger Knorpelschnipsel, die anschließend in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit einer PBS-Lösung mit 2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 2 % (v/v) Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti) zweimal gewaschen und

über Nacht (+/- 16 h) auf einen Rollermischer in einen Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %iger Luftfeuchtigkeit verdaut wurden. Das Chondrozyten Hydrolysemedium (Tabelle 5) bestand aus einer 0,5 %igen Kollagenase-Lösung auf Basis des Knochenmediums. 10 ml des Chondrozyten Hydrolysemediums wurden auf 1 g Knorpelgewebe gegeben.

Am folgenden Tag wurde die Zellsuspension in 10 ml-Portionen durch ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gegeben und jeweils mit 10 ml frischem Knochenmedium aufgefüllt. Anschließend erfolgte zunächst eine Zentrifugation für 10 min. bei 425 g. Nach Absaugen des Mediums und erneuter Resuspension mit diesmal 20 ml wurde abermals für 7 min. bei 425 g zentrifugiert. Nach wiederholtem Absaugen und Resuspendieren der entstandenen Zellpellets mit 10 ml Basismedium (Tabelle 5) erfolgte die Überführung in ein 50 ml-Reaktionsgefäß und die Zellzahlbestimmung nach der Trypanblaumethode.

4.2.2 Zellzahlbestimmung nach Trypanblau-Methode

Zur Ermittlung der Chondrozytenzellzahl wurde mit einem Verdünnungsfaktor (VF) von 1:2 die Suspension mit Trypanblau verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurden für die Auszählung mithilfe der Neubauer-Zählkammer genutzt und in vier Großquadranten mit folgender Formel ausgezählt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) \times VF = \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$$

Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte durch Multiplikation der Zellzahl/ml der Resuspension:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Chondrozyten in Basismedium bis zur Einbettung in die Kollagen-I-Hydrogele und Inkulturnahme im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.3 Passagieren, Ablösen und Zellzahlbestimmung der porcinen mesenchymalen Stammzellen

Am zweiten Tag erfolgte neben der Zellzahlbestimmung der Chondrozyten auch die der porcinen mesenchymalen Stammzellen (pMSC). Die pMSC befanden sich in Passage 2 bis 3. Jeweils ca. 10 Tage vor jedem Ansatz wurden eine Millionen pMSC (Passage 1) aufgetaut. Cryoröhrchen mit MSCs (1 Mio. Zellen/ml) wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, gemischt mit 9 ml Basismedium, zentrifugiert (500 g, 5 min.), in 40ml DMEM-basierten Medium mit 10 % FCS, 1 % PenStrep und hbFGF (1:1000) resuspendiert und in einer T150-Flasche ausgesät. Alle drei Tage fand ein Mediumwechsel statt. Bis zum Tag der osteochondralen Isolation wurden sie entsprechend ihrer Konfluenz ein- bis zweimal abgelöst und in T150-Flaschen ausgesät. Für die Ablösung der pMSC wurde zunächst das Medium aus der T150-Flasche abgesaugt und 15ml Waschpuffer zugegeben (0,2 % EDTA in PBS). Nach Absaugen erfolgte die Ablösung der Zellen durch 10 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (0,05 % in PBS/EDTA) und eine Inkubation für 3-5 min. in 37 °C in T150-Flaschen. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen mittels Lichtmikroskop kontrolliert und ggf. die Ablösung durch vorsichtiges Anschlagen der T150-Flasche forciert.

Durch Zugabe von 2ml FKS wurde die Enzymreaktion abgestoppt, durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die T150-Flaschen wurden zusätzlich nochmals mit Waschpuffer gespült und die Resuspension ebenfalls in Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend fand die Zentrifugation bei 500 g für 5 min. statt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und Zellen in Basismedium resuspendiert. Zuletzt erfolgte die Zellzahlbestimmung mit der Trypanblau-Methode.

4.2.4 Mesenchymale Stammzellendifferenzierung

MSCs, isoliert aus dem Knochenmark des Beckenkamms von 4-6 Monate alten deutschen Landschweinen (Schweinefarm Niedermeyer, Dettelbach, Deutschland), wurden zum Nachweis ihrer multipotenten Eigenschaften in Richtung Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten *in vitro* differenziert.

Zur Durchführung wurden die pMSCs für die osteogene und adipogene Differenzierung auf Glasplättchen (12x12 mm) in einer 24-Wellplatte ausgesät. Pro Well wurden 50 000 Zellen ausgesät und mit 500 µL Stammzellmedium aufgefüllt und für die osteogene Differenzierung 28 Tage und die adipogene Differenzierung 14 Tage kultiviert (37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) mit einem Mediumwechsel alle 2-3 Tage. Es wurden jeweils drei Negativproben (keine Differenzierung) und drei Positivproben (adipogene bzw. osteogene Differenzierung) vorbereitet. Das Medium der Negativkontrollen entsprach dem Stammzellmedium (Tabelle 5), das des Differenzierungsansatzes, dem osteogenen bzw. adipogenen Differenzierungsmedium (Tabelle 4). Die Kultivierung der pMSCs für die osteogene Differenzierung erfolgte über 28 Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit), die der adipogenen Differenzierung über 14 Tage mit jeweiligem Mediumwechsel alle 2-3 Tage (3x wöchentlich).

Für die chondrogene Differenzierung der pMSCs wurden elf 15 ml-Zentrifugenröhrchen verwendet, fünf Negativproben und sechs Positivproben. Pro Röhrchen wurden 250 000 Zellen ausgesät und mit jeweils 500 µl chondrogenem Differenzierungsmedium aufgefüllt und zur Pelletierung zentrifugiert (425 g, 5 min.). Das Differenzierungsmedium (Tabelle 4) für die chondrogene Differenzierung (Positivprobe) enthielt zusätzlich TGF-β, jenes der Negativkontrolle hingegen nicht. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage (2x wöchentlich).

4.3 Analyse von Oberflächenantigenen auf porcinen mesenchymalen Stammzellen

Für die Durchflusszytometeranalyse (FACS-Analyse) ausgewählter MSC-spezifischer Oberflächenantigene (CD 29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD31⁻, CD73⁺, CD166⁻) auf den expandierten Zellen wurde zunächst die Zellzahl der zu untersuchenden Zellen bestimmt und eine Gesamtzellzahl von 500 000 MSCs für jede Färbung in FACS-Röhrchen pipettiert mit 3 ml FACS-Puffer (2 mM EDTA und 0.5 % BSA in PBS) bestehend aus PBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % BSA gewaschen und zentrifugiert (425 g, 5 min.). Anschließend erfolgte das Blocken der Zellen mit FcR-Block, in dem das Zellpellet mit 80 µl FACS-Puffer und 1µl FcR-Block aufgenommen und für 15 min. bei 4 °C inkubiert wurde (20 µl FcR-Block/10⁷ Zellen). Das Blocken hatte den Zweck die spezifische Antikörperbindung zu erhöhen. Anschließend wurde erneut mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (425 g, 5

min.). Für die Färbung der Oberflächenproteine wurden die Pellets in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und die entsprechenden FACS-Antikörper (5 µl) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 30 min. bei 4°C. Danach wurde erneut für 5 min. zentrifugiert und anschließend das Pellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert bevor die Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden konnten.

4.4 Isolierung osteochondraler Explantate (OCE)

Das im Rahmen des EU-Projektes HydroZONES (<https://www.hydrozones.eu/>) am Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM) etablierte porcine osteochondrale *Ex vivo* Testsystem (EVTS) erfüllt die im humanen Testsystem fehlenden Voraussetzungen der Validität und Reproduzierbarkeit [18]. Die Schweineknie für die Isolierung der osteochondralen Explantate (OCE) wurden von einem lokalen Würzburger Schlachter bezogen. Es handelte sich um 6 bis 9 Monate alte deutsche Landschweine.

Aus der medialen Schweinekondyle erfolgte die Isolation der OCE für die Kultivierung über 28 Tage in Normoxie und Hypoxie. Dafür wurden mit einem Bohrer osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von 8 mm gesetzt und anschließend ausgebrochen (Abbildung 8).

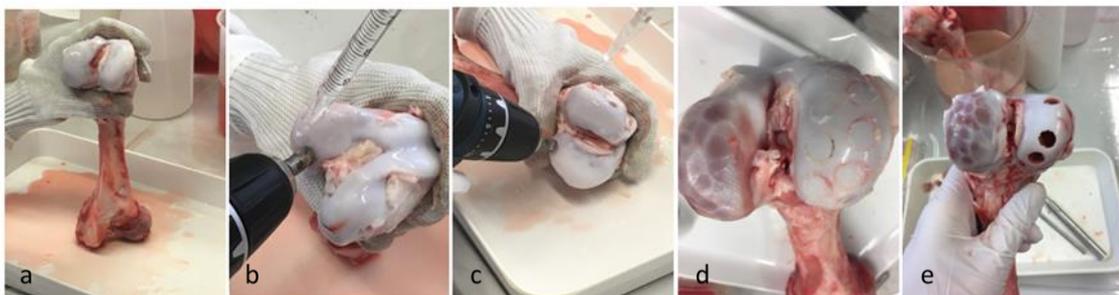


Abbildung 8: Isolation der osteochondralen Explantate (OCE). (a) Freilegen der Gelenkflächen, (b) und (c) Bohren und Entnahme der OCE, (d) mediale Kondyle nach Bohren der OCE (8 mm) und laterale Kondyle mit abgeschabtem Knorpelgewebe, (e) mediale Kondyle nach Herauslösen der OCE.

Durch das Zurechtsägen wurde die Knochenhöhe (3 mm) der OCE angepasst. Das gleichzeitige Spülen mit einer Lösung aus PBS mit 2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

(Pen/Strep) und 2 % (v/v) Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti) verhinderte eine Gewebeschädigung und Kontamination. Die fertigen OCE wurden bis zur weiteren Verwendung in Basismedium gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Defektsetzung. Mit einer Biopsiestanze wurden Knorpel-Knochen-Defekte mit einem Durchmesser von 4 mm generiert (Abbildung 9). Die Knorpel-Defekte generierte eine spezielle Verwundungsmaschine/Wundfräse (ArtCut®).

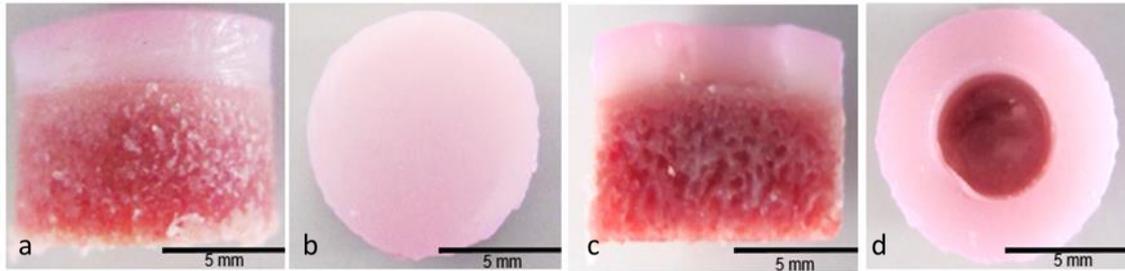


Abbildung 9: Porcines osteochondrales Explantat (a) Außen- bzw. Seitenansicht, (b) Ansicht von oben, (c) und (d) OCE mit Knochen-Knorpel-Defekt im Querschnitt und von oben. Scale bar 5 mm.

Anschließend wurden die OCE dreimal in PBS-Lösung mit 2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 2 % (v/v) Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung am folgenden Tag in einer 24-Wellplatte mit Knorpelmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

4.4.1 OCE-Isolierung aus humanem Material nach Kniegelenksersatz-Operation

Um nah an der klinischen Praxis zu bleiben, wurde humanes Material aus einer Kniegelenksersatz-Operation (Knie-TEP = Knie-Totalendoprothetik) isoliert. Hauptprobleme dabei waren begrenztes und beschädigtes Material aufgrund der osteoarthrotischen Vorschädigung sowie der Gewebeschäden durch den operativen Eingriff. Eine adäquate Isolierung und eine ausreichende Anzahl von OCE für eine sinnvolle Kultivierung über vier Wochen waren nicht möglich. Aus beiden Femurkondylen konnten nur ca. 2-4 OCE isoliert werden. Neben der begrenzten Materialmenge war zusätzlich durch die Inhomogenität der Spender bezüglich Alter,

Geschlecht und Degenerationsstatus keine vergleichbaren Ergebnisse in der histologischen Auswertung zu erwarten (Abbildung 10).

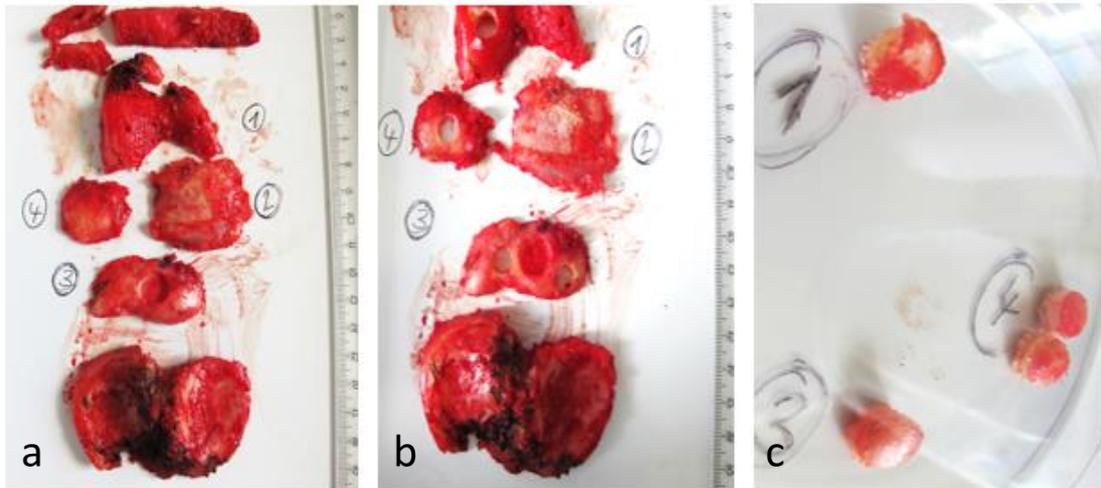


Abbildung 10: Humanes Kniegelenksgewebe: (a) nach einer Knie-TEP einer 74-jährigen Patientin, (b) Zustand nach Bohren und Entnahme der osteochondralen Explantate (OCE), (c) humane OCE.

4.4.2 OCE-Isolierung aus humanem Material eines Körperspenders postmortem

Als humane Alternative zum Material aus Kniegelenkersatzoperationen wurde die Isolierung von osteochondralen Explantaten postmortem aus Körperspendern getestet. Eine Knorpelgewinnung aus der medialen und lateralen Femurkondyle sowie das Isolieren von Knorpelzellen war grundsätzlich möglich. Jedoch ist auch hier die Verfügbarkeit des Materials von Körperspendern begrenzt und nicht planbar. Da für die Etablierung in die klinische Praxis die langfristige und wiederholbare Testung von Materialien entscheidend ist, war der Umstieg von humanen auf verlässlich verfügbares tierisches Material die Konsequenz. Dennoch könnte ein humanes Testsystem sinnvoll sein. Sollte eine Material-Zell-Kombination im porcinen Testsystem vielversprechende Ergebnisse erzielen, könnte dies ein Argument für den Start einer klinischen Studie mit humanem Material sein.

4.5 Herstellung der Hydrogele und Inkulturnahme der osteochondralen Explantate

Für die Herstellung von Kollagen-I-Hydrogel (HG) wurde Kollagen-I-Stocklösung (10 mg/ml Kollagen gelöst in Essigsäure, isoliert aus Rattenschwänzen am Lehrstuhl) mit 0,1 %iger Essigsäure auf 4,5 mg/ml verdünnt. Kollagen I-Hydrogel bietet sich als Trägermatrix an, da es unterstützend in der Defektheilung wirkt und es bereits als klinisches Produkt in der Praxis zur Behandlung kleiner Defekte eingesetzt wird (z. B. CaReS-IS®, Arthro Kinetics AG, Deutschland) [66, 67].

Pro Knochen-Knorpel-Defekt war eine Füllmenge von 30-40 µl, für Knorpeldefekte 15 µl notwendig. Für die Beladung des HG mit einer Reinkultur aus porcinen Chondrozyten und einer Mixkultur aus 80 % pMSC und 20 % porcinen Chondrozyten wurden jeweils 20 Mio. Zellen/ml kalkuliert. Bevor das HG direkt in die Defekte pipettiert wurde, erfolgte die Resuspension der Zellen in Gelneutralisationslösung (GNL) im Verhältnis 1 zu 2, das heißt mit zwei Teilen HG und einem Teil GNL.

Benötigt wurden insgesamt jeweils 64 OCE für Ansatz I und II (Duplikat). Die Anzahl kam aufgrund der geplanten Analysen zustande. Je Ansatz wurden zwei OCE für die Histologie und je ein OCE für die Lebend-Tot-Färbung und den GAG/DNA-Verdau benötigt. Die Hälfte der OCE (32 Stück) war für die Analysen an Tag 0. Die anderen 32 OCE wurden für 28 Tage kultiviert – 16 OCE unter normoxischen (37°C, 5 % CO₂ und 95 %iger Luftfeuchtigkeit) und 16 OCE unter hypoxischen Bedingungen in einem Hypoxiebeutel mit 2 %igem Sauerstoffgehalt. Tabelle 20 zeigt eine Übersicht über Ansatz I und II (Duplikat). Das Duplikat wurde zehn Tage nach Ansatz I gestartet.

Tabelle 20: Überblick aller Behandlungsstrategien unter Angabe des Zelltyps (pChon, pMix), der Defekttiefe (Knorpel- (1 mm) und Knochen-Knorpeldefekt (full-thickness)), des Sauerstoffgehalts und des Füllmaterials (Kollagen I), die in Ansatz I und II (Duplikat) verwendet wurden.

Nr. Ansatz	Zelltyp	Defekttiefe	O2-Gehalt	Füllmaterial
1	pCHON	Full-thickness	Normoxie	Kollagen I
2	pCHON	1 mm	Normoxie	Kollagen I
3	pCHON	Full-thickness	Hypoxie	Kollagen I
4	pCHON	1 mm	Hypoxie	Kollagen I
5	pMSC + pCHON	Full-thickness	Normoxie	Kollagen I
6	pMSC + pCHON	1 mm	Normoxie	Kollagen I
7	pMSC + pCHON	Full-thickness	Hypoxie	Kollagen I
8	pMSC + pCHON	1 mm	Hypoxie	Kollagen I

4.6 Anverdauen von porcinen Knorpelschnipseln

Um den optimal anverdauten Zustand von Knorpelgewebe herauszufinden, wurden unterschiedliche Kollagenase-Konzentrationen getestet. Die optimale Konzentration ergab die Verdünnung von 500 U/ml Kollagenase zu 100 U/ml mit DMEM + 2 % AntiAnti. Nach ca. 16 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂ und 95 %iger Luftfeuchtigkeit) waren die Knorpelschnipsel in dem Maße anverdaut, dass sie gut zu verarbeiten waren (Abbildung 11). Die Vorbereitung des Kollagen-I-Hydrogels erfolgte wie in Ansatz I und II.



Abbildung 11: Anverdauter Knorpelschnipsel in Basismedium.

Neben dem Anverdau galt es das Verhalten der Knorpelschnipsel im Kollagen-I-Hydrogel (HG) zu testen sowie das Einbringen in den Defekt. Dafür wurden Lochplatten als Defektschablone verwendet und auf einen Objektträger befestigt. Zur besseren Handhabung wurden sie in eine Petrischale gelegt.

Zuerst wurden die anverdauten Knorpelschnipsel in den Defekt gegeben, so dass der Defektboden, ca. 4 mm, bedeckt war. Das für den Testlauf zellfreie HG mit GNL wurde darauf pipettiert und es fand ein vorsichtiges Verrühren der Knorpelschnipsel mit dem HG mit der Pipettenspitze statt. Anschließend wurde die Petrischale geschlossen und in den Inkubator gestellt.

4.7 Papain-Verdau und DMMB-Assay (GAG-Assay)

Glycosaminoglykane (GAGs) gehören zu den wichtigsten Komponenten der EZM von artikulärem Knorpel. Durch ihre kovalente Bindung an bestimmte Proteine bilden sie die Proteoglykane (PG), die besonders im Knorpel, in Form von Aggrekan, durch ihre hohe Wasserbindungsfähigkeit und der Formation der Kollagenfibrillen die physiologische Funktion der Stoßdämpfung und Druckabsorption bewirken. DMMB (Dimethyl-Methylen-Blau) bindet an die sulfatierten GAGs. Es ist eine der am häufigsten angewendeten Methode zur GAG-Quantifizierung [68].

Für die Quantifizierung des DNA- und GAG-Gehalts (DMMB-Assay) erfolgte zur Vorbereitung der entsprechenden Lösungen zunächst der Papain-Verdau. Dafür wurden ein Papain-Verdau-Puffer (Tabelle 16) bestehend aus 100 mM Phosphatpuffer, 5 mM L-Cystein und 500 mM EDTA verwendet. Der Papainverdau-Puffer wurde bei 4 °C gelagert. Für den Papain-Verdau wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Proben bzw. Hydrogele (HG) mit PBS gewaschen und in -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Trocknung über Nacht im Lyophilisator. Vor dem Verdau wurde der Papain-Verdau-Puffer mit 140 µg/ml Papain-Enzym versetzt. Die lyophilisierten HG kamen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß, wurden mit Papain-Verdau-Lösung bedeckt (Knorpeldefekt 0,25 ml, Knochen-Knorpeldefekt 0,5 ml) und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Bis zur Vermessung erfolgte die Lagerung der Proben bei -20 °C.

Für die Bestimmung des GAG-Gehalts wurden alle Proben in Duplikaten gemessen. Der

Leerwert betrug 100 µl Aqua-Bidest und die Standards (im Kit enthalten 100 µg/ml) wurden entsprechend der in Tabelle 21 aufgelisteten Konzentrationen pipettiert. Für jede Probe wurden 50 µl verwendet und in jedes Zentrifugenröhrchen (Proben, Standards und Leerwert) 0,5 ml Färbelösung (dye reagent) gemischt und invertiert. Anschließend wurden sie für 30 min. auf einen Schüttler gestellt und für 10 min. bei 12.000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte die vorsichtige Entfernung des Überstands.

Tabelle 21: Standardkurve für DMMB Assay.

	µg GAG	µg Standard	µl Aqua Bidest
Leerwert	0	0	100
Standard	1	10	90
Standard	2	20	80
Standard	3	30	70
Standard	4	40	60
Standard	5	50	50

Daraufhin wurden 0,5 ml Dissoziationslösung in jedes Zentrifugenröhrchen gegeben, gevortext und für 10 min. ruhen gelassen, bis der gebundene Farbstoff vollständig gelöst war. Zum Schluss wurden 200 µl von jeder Probe (in Duplikaten) auf eine transparente 96-Well-Platte aufgetragen. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 656 nm im TECAN Sunrise. Die GAG-Konzentration konnte nun mit Hilfe der Standard-Kurve ermittelt werden.

Der DNA-Gehalt in den Hydrogelen wurde mittels des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (7589, Molecular probes Invitrogen detection Technologies) nach Herstellerangaben bestimmt. DNA Standards (0.25 ng/ml – 100 ng/ml) und Proben (Duplikate, 100 µl/well) wurden in eine schwarze, lichtundurchlässige 96-Well-Platte pipettiert, 100 µl/well Quant Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent hinzugefügt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 5 min inkubiert. Anschließend folgte die Messung der Fluoreszenz (Excitation/Emission 480 nm/525 nm) im TECAN Sunrise. Basierend auf der Standardkurve und der Subtraktion des Blank-Wertes, wurden die DNA-Werte der einzelnen Proben kalkuliert.

Im letzten Schritt wurden die GAG Werte einer Probe auf den DNA-Gehalt normalisiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert der GAG/DNA Werte berechnet und inklusive Standardabweichung dargestellt.

4.8 Bestimmung der Zellvitalität

Für die Bestimmung der Zellvitalität im Hydrogel der Proben an Tag 0 und Tag 28 kam die Lebend-Tot-Färbung (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit von Invitrogen) zur Anwendung. Ethidium homodimer-1 (4µM) markiert den Zellkern toter Zellen und Calcein AM (2µM) färbt das Zytoplasma von lebenden Zellen.

Nach Pipettieren der angegebenen Endkonzentration in Knorpelmedium und anschließender Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20min., wurden die OCE einmal in PBS gewaschen und am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000 (Biorevo) mikroskopiert (Wellenlängen: 494 nm/517 nm und 517 nm /617 nm, Filter: GFP/TRITC).

4.9 Histologische Analyse

4.9.1 Kunststoffeinfbettung

Zum Einbetten der gesamten OCE inklusiver HG an Tag 0 und Tag 28 diente die Kunststoffeinfbettung (Technovit 9000 neu), die das Einbetten und anschließende Schneiden von nicht dekalzifiziertem Knochengewebe ermöglicht. Zunächst wurden die OCE für 24 h in Formaldehydlösung fixiert, bevor sie für weitere 24 h in VE-Wasser überführt wurden. Anschließend erfolgten die Dehydrierung und Infiltration nach dem Ablauf, der in Tabelle 22 zusammengefasst ist.

Tabelle 22: Ablauf der Dehydrierung und Infiltration der OCE für die Kunststoffeinbettung.

Dehydrierungs-/ Infiltrationsstufe	Dauer	Vorgang
Ethanol 70 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Ethanol 80 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Ethanol 96 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Ethanol 96 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Isopropanol 99,8 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Isopropanol 99,8 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Isopropanol 99,8 %	≥ 3 h (RT)	Dehydrieren
Xylol I	≥ 16 h (RT)	Dehydrieren
Xylol II	≥ 16 h (RT)	Dehydrieren
Prä-Infiltrationslösung I	≥ 24 h (4 °C)	Infiltration
Prä-Infiltrationslösung II	≥ 24 h (4 °C)	Infiltration
Prä-Infiltrationslösung III	≥ 24 h (4 °C)	Infiltration
Infiltrationslösung	≥ 48 h (4 °C)	Infiltration

In der Infiltrationslösung erfolgte die Evakuierung der OCE bei 200 mbar für 3 Minuten. Anschließend fand die Polymerisation in speziellen Einbettformen mit einem Gemisch aus Stammlösung A und B (Verhältnis 9:1) statt. Dafür wurde wiederum bei 200 mbar insgesamt 3-mal für jeweils 3 min. in einem 4 °C vorgekühltem Exsikkator evakuiert. Danach erfolgte die Polymerisation luftdicht bei 7°C für mindestens 24h

4.9.2 Entplastung der Kunststoffschritte

Zur Vorbereitung der eingebetteten Proben für histologische Färbungen, wurden zunächst 3 µm dicke Schnitte mit dem Hartschnittmikrotom hergestellt, diese auf einen beschichteten Objektträger gelegt, mit 60 %igem Ethanol bedeckt und mit einer Polyethylenfolie bedeckt. Anschließend wurden die Objektträger in eine Schnittpresse gelegt und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

Nach dem Auskühlen auf Raumtemperatur wurde die Folie entfernt und direkt vor dem Beginn einer histologischen Färbung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten wie folgt (Tabelle 23) entplastet:

Tabelle 23: Entplastung der mit Technovit 9100 neu eingebetteten Schnitte.

Chemikalie	Dauer
Xylol	20 min.
Xylol	20 min.
2-Methoxyethylacetat	20 min.
2-Methoxyethylacetat	20 min.
Aceton reinst	5 min.
Aceton reinst	5 min.
VE-Wasser	5 min.
VE-Wasser	5 min.

4.9.3 Safranin-O-/Fast-Green-Färbung

Für die Beurteilung der Matrixbeschaffenheit des Knorpelgewebes bezüglich des Gehalts an Proteoglykanen (PG) bzw. der Glycosaminoglykane (GAG), und Kollagenen, erfolgte die Färbung mit Safranin-O (PG) und Fast-Green (Kollagen). Die Färbung der entplasteten Schnitte erfolgte nach dem Protokoll, das in Tabelle 24 aufgelistet ist. Nach Abschluss der Färbung erfolgte das Eindecken mit Entellan® und das Trocknen der Gewebeschnitte unter dem Abzug über Nacht.

Tabelle 24: Ablauf der Dehydrierung und Infiltration der OCE für die Kunststoffeinbettung.

Chemikalie	Dauer
Weigert's Eisen Hämatoxylin	8 min.
Leitungswasser	5 sek.
Fast Green-Lösung	2 min.
Essigsäure 1 %	1 min.
Safranin-O-Lösung 0,1 %	8 min.
Ethanol 70 %	5 sek.
Ethanol 96 %	5 sek.
Ethanol 100 %	5 sek.
Ethanol 100 %	5 sek.
Xylol	3 min.
Xylol	3 min.

4.9.4 Immunhistologische Färbungen – Aggrekan, Kollagene I, II und X

Über die Immunhistologie sollte mithilfe der entsprechenden Antikörper der Nachweis des gelenkknorpeltypischen PG Aggrekan sowie Kollagen Typ II erfolgen. Für die kalzifizierende Übergangszone erfolgte die Kollagen X-Färbung. Als Kontrolle erfolgte die Kollagen Typ I-Färbung mit Antikörpern vom Kaninchen.

Es folgte die enzymatische Demaskierung bei 37 °C mit Pronase (30 min.) für die Aggrekan- und Kollagen X-Antikörper und mit Hyaluronidase (15 min.) und Pepsin (30 min.) für die Kollagen II- und Kollagen-I-Ak. Anschließend erfolgte jeweils eine 5 min. Behandlung mit Waschpuffer, das Blocken mit 3 % (v/v) H₂O₂ (in VE-Wasser) für 10 min. und mit 5 % (w/v) BSA-Lösung (in PBS) für 30 min., um die zelleigene Peroxidase zu blocken. Anschließend wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst 3-mal 5 min. mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Sekundärantikörpern lichtgeschützt für 10 min. inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die ebenfalls lichtgeschützte Inkubation mit HRP-Polymer-Reagenz für 20 min. und die Schnitte wurden erneut 3-mal 5 min. in Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte das Einfärben mit DAB für ca. 45 sek. bis eine Braunfärbung zu erkennen war und das Überführen in Waschpuffer, um die Reaktion der Umwandlung des DAB-Substrats abzustoppen. Für die Darstellung der Zellkerne erfolgte für 30 sek. die Gegenfärbung mit Hämatoxylin mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser für ca. 90 sek.. Es folgte die Überführung in VE-Wasser und die Entwässerung (Tabelle 25) wurde gestartet:

Tabelle 25: Entwässerung der Gewebeschnitte.

Chemikalie	Dauer
Ethanol 70 %	10 sek.
Ethanol 70 %	2 min.
Isopropanol	2 min.
Xylol	3 min.
Xylol	3 min.

Anschließend erfolgten das Eindecken mit Entellan® und das Austrocknen der Gewebeschnitte unter dem Abzug über Nacht.

5 Ergebnisse

5.1 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

MSCs (adulte mesenchymale Stammzellen) besitzen die Fähigkeit *in vitro* unter dem Einfluss von bestimmten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren u. a. in Fett-, Knochen- und Knorpelzellen zu differenzieren. Die Fähigkeit von MSCs adipogen, osteogen und chondrogen zu differenzieren ist ein Nachweis der Multipotenz von MSCs. Aus diesem Grund ist für die Aus- und Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit der Nachweis des MSC Differenzierungsverhaltens als Nachweis des MSC Phänotyps von Bedeutung.

Die Positivproben zeigten in rot angefärbte Lipidtröpfchen der adipogen differenzierten MSCs (Abbildung 12a). In der Negativkontrolle der adipogenen Differenzierung sind nur vereinzelt angefärbte Lipidtröpfchen zu erkennen (Abbildung 12b). Die Positivproben der osteogenen Differenzierung zeigten eine deutliche Rotfärbung der osteogen differenzierten Zellen (Abbildung 12c) im Gegensatz zu den schwach angefärbten Proben der Negativkontrolle (Abbildung 12d), in der nur wenige Zellen sichtbar sind. Die chondrogene Differenzierung zeigt in der Positivkontrolle (Abbildung 12e) eine deutlichere Einfärbung der glycosaminoglykanreichen EZM in blau, die in der Negativkontrolle nur schwach ausgeprägt war (Abbildung 12f).

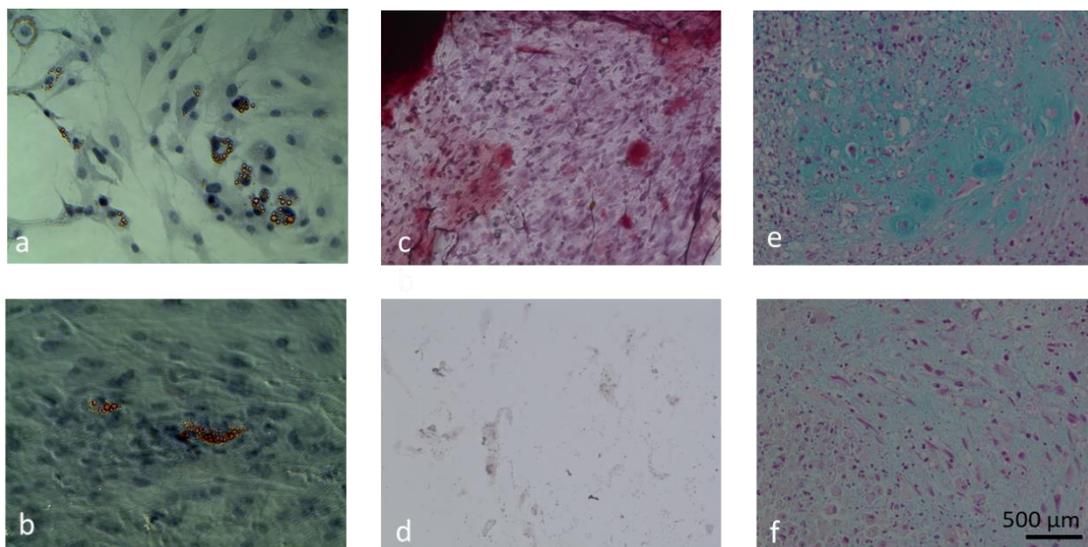


Abbildung 12: Histologie der Stammzellendifferenzierung (40x) mit (a) Adipogener Differenzierung (Oilred-O-Färbung) und Negativkontrolle (b), (c) osteogener Differenzierung (Alizarin-Red-Färbung) und Negativkontrolle (d) und (e) chondrogener Differenzierung (Alcianblau-Färbung) und Negativkontrolle (f). Scale bar 500 µm.

5.2 FACS-Analyse

Zur weiteren Bestätigung, dass es sich bei in dieser Arbeit verwendeten Zellen um MSCs handelt, wurden die Zellen zum Nachweis mit unterschiedlichen Antikörpern gegen die typischen Oberflächenproteine (CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD166⁻, CD31⁻) analysiert (Abbildung 13) [53, 69].

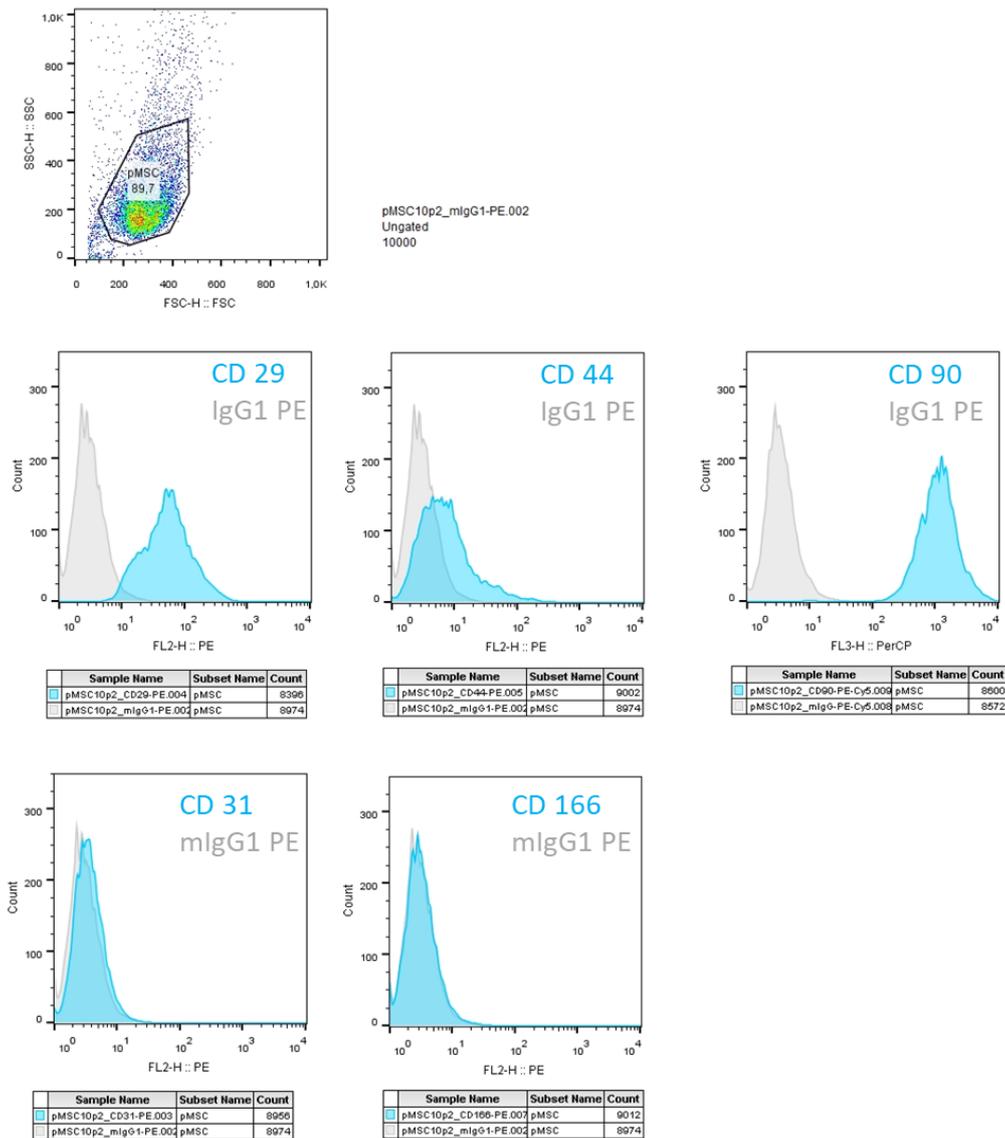


Abbildung 13: FACS-Analyse der Marker CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD31⁻, CD166⁻ Oberflächenmarker als typische Oberflächenmarker zum Nachweis von mesenchymalen Vorläuferzellen isoliert aus Knochenmark.

Abbildung 13 zeigt, dass alle Antigene auf der MSC-Oberfläche nachgewiesen werden konnten. Allerdings ist eine deutliche Überlappung der CD44 positiven Zellen mit denen, die mit dem Isotypen mlgG1 gefärbt sind, zu sehen.

5.3 Auswachsen von Knorpelzellen aus anverdauten Knorpelschnipseln

Vor der in Ansatz III geplanten Modifizierung des Kollagen-I-Hydrogels mit anverdauten Knorpelschnipseln wurde das Auswachspotential der Knorpelzellen aus der anverdauten Matrix getestet. Ab Tag 6 konnte an mehreren Stellen der Knorpelschnipsel ein progredientes Auswachsen von Knorpelzellen beobachtet werden (Abbildung 14).

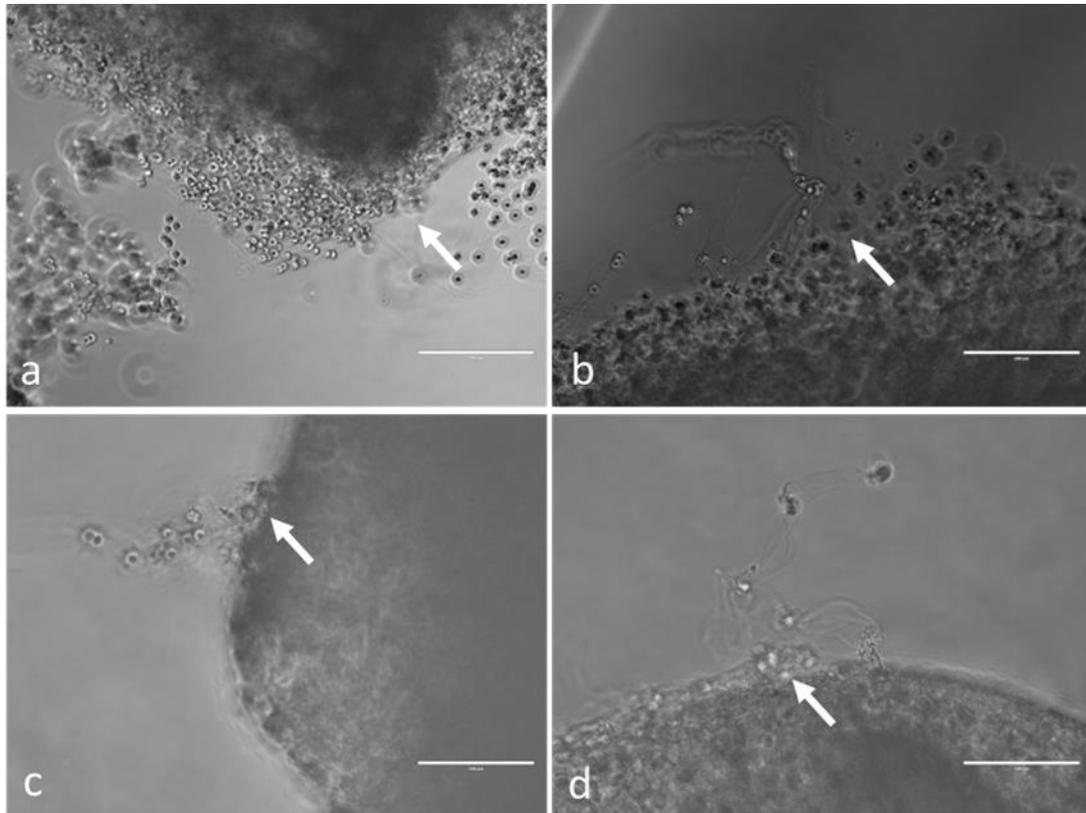


Abbildung 14: Auswachsen von Knorpelzellen in Basismedium an (a) Tag 1, (b) Tag 6, (c) Tag 14 und (d) Tag 21. Pfeile deuten auf einzelne auswachsende Chondrozyten hin. Scale bar 200 μm .

5.4 Porcines *Ex vivo* Testsystem: Vitalitätsbestimmung

An Tag 0 und an Tag 28 der Ansätze I und II (Duplikat) bis III erfolgte eine Vitalitätsbestimmung mit der LIVE/DEAD®-Färbung (Lebend-Tot-Färbung) von Invitrogen, um die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Abbildung 15 und 16 zeigen eine Auswahl an Bildern stellvertretend für Ansatz I und II. Die Fluoreszenzaufnahmen der OCE mit Knochen-Knorpel-Defekt und Knorpel-Defekt und Kollagen-I-Hydrogel mit Chondrozytenkultur und Mixkultur aus pMSC und Chondrozyten zeigen deutliche Vitalität (lebende Zellen: grün). Es sind wenige tote Zellen zu erkennen (tote Zellen: rot).

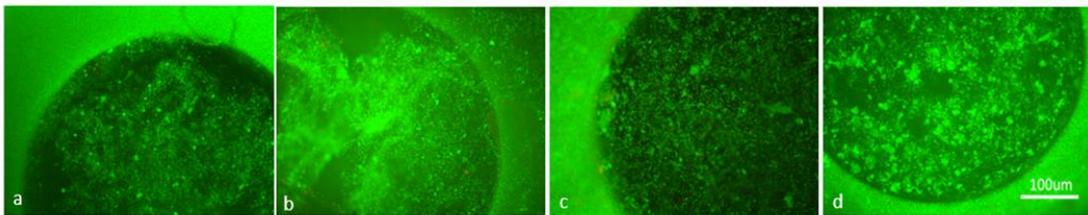


Abbildung 15: Live-Dead Analyse der OCE mit einer Auswahl an Bildern von Ansatz I und II an Tag 0 mit Kollagen I Hydrogel und pChon im Knorpel-Knochendefekt (a). pChon im Knorpeldefekt (b), pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knochen-Knorpeldefekt (c) und pMix im Knorpeldefekt (d). Scale bar 100 µm.

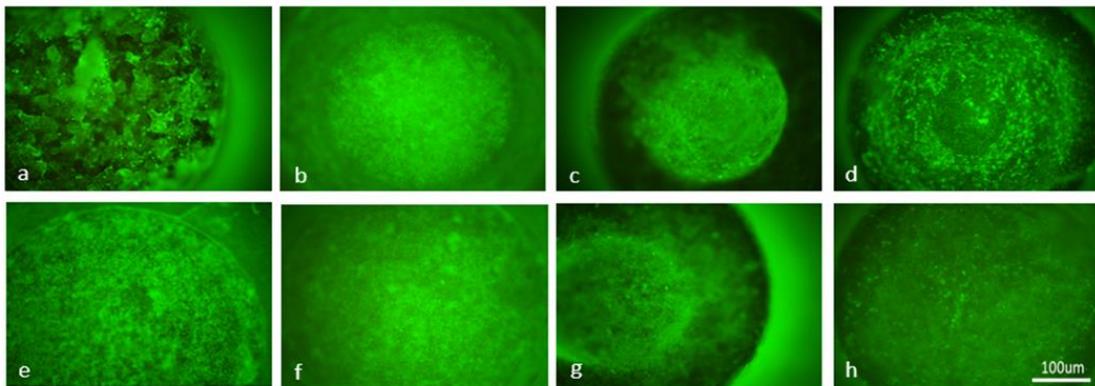


Abbildung 16: Live-Dead-Analyse der OCE mit einer Auswahl an Bildern von Ansatz I und II (Duplikat) mit Kollagen I Hydrogel an Tag 28 nach Kultivierung in Normoxie (oben, a-d) und Hypoxie (unten, e-h); a und e: pChon im Knochen-Knorpeldefekt, b und f: pChon im Knorpeldefekt, c und g: pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knochen-Knorpeldefekt und d und h: pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knorpeldefekt (c). Scale bar 100 µm.

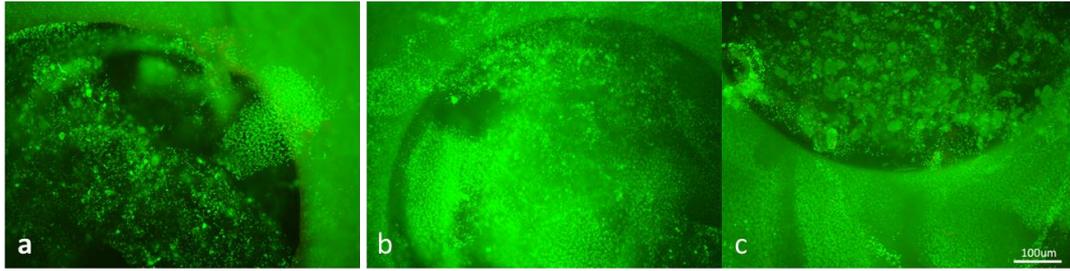


Abbildung 17: Ansatz III Live-Dead-Analyse der OCE an Tag 0 mit Knorpelschnipseln im Kollagen I Hydrogel mit pChon im Knochen-Knorpeldefekt (a), pChon im Knorpeldefekt (b) und pMix-Kultur aus pMSC und pChon im Knorpeldefekt. Scale bar 100 µm.

Die OCE mit den anverdauten Knorpelschnipseln zeigen erwartungsgemäß eine Inhomogenität (Abbildung 17 und 18).

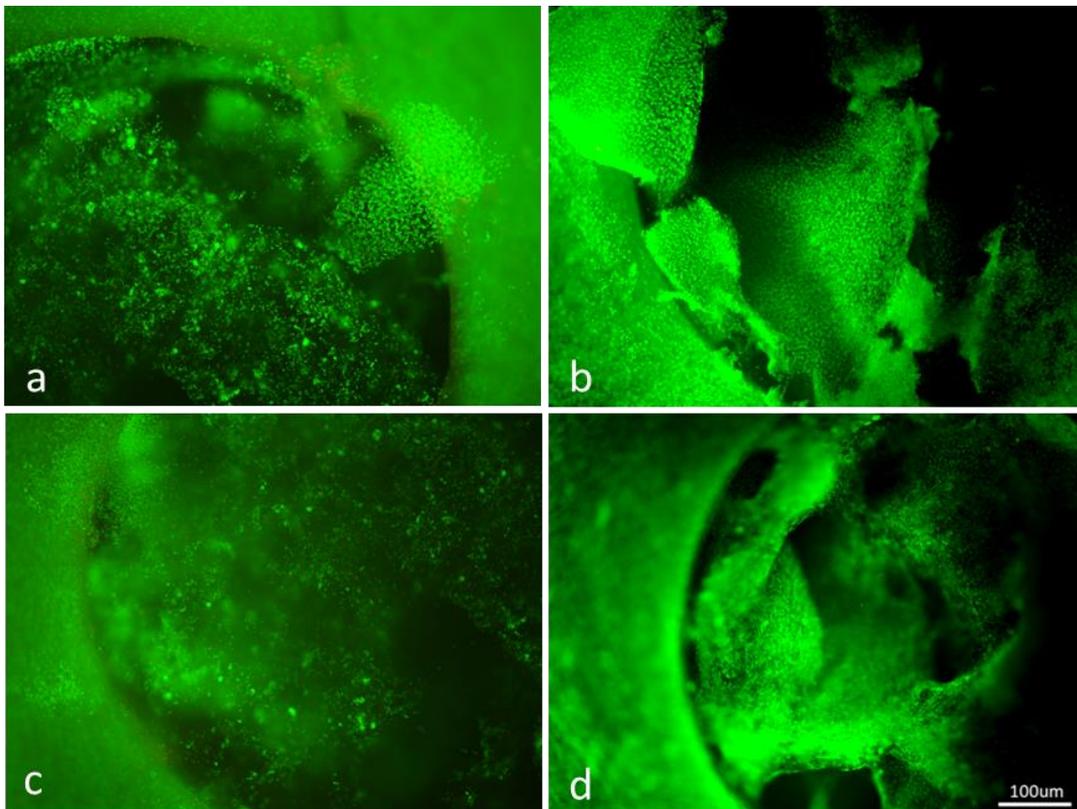


Abbildung 18: Live-Dead-Analyse der OCE von Ansatz III an Tag 28 mit Knorpelschnipseln mit pChon im Knochen-Knorpeldefekt in Kultivierung in Normoxie (a) und Hypoxie (b-d): pChon im Knorpeldefekt (b), pChon im Knochen-Knorpeldefekt (c) und pMix-Kultur aus pMSC und pChondrozyten im Knorpeldefekt (d). In Abbildung b und c, den Knorpeldefekten, sind die Knorpelschnipsel zu erkennen. Scale bar 100 µm.

5.5 Histologie, Immunhistologie und Scoring

Zum Nachweis von knorpel- und knochenspezifischen Bestandteilen (Kollagen I, II und X, Aggrekan) in den OCE wurden histologische Antikörperfärbungen durchgeführt.

Zusätzlich zu den immunhistologischen Färbungen wurden Schnitte von jeder Probe mit Hämatoxylin für den Nachweis der basophilen Zellkerne gefärbt. Diese Kombination ermöglichte die Bewertung der Zellkern-Matrix-Relation. Diese sollte aus physiologischer Sicht zu Gunsten der Zellmatrix ausfallen, da wie in der Einleitung beschrieben der hyaline Gelenkknorpel durch eine geringe Zelldichte und eine stark ausgeprägte Matrix charakterisiert ist, was seine biomechanischen Eigenschaften erklärt. Zusätzlich variiert im gesunden Gewebe das Vorkommen der Matrixmoleküle je nach Schicht, was Aufschluss über die zonale Gliederung des Gelenkknorpels geben kann. Die Rekonstruktion dieser zonalen Gliederung ist bisher nicht gelungen und ist eine der Hauptherausforderungen in der Knorpelforschung [33]. Die Konzentration galt deshalb der allgemeinen Beschaffenheit der Matrix mit ihren typischen Molekülen sowie der Zell-Matrix-Relation.

Die Safranin-O-Färbung und die Aggrekan-Antikörper-Färbung dient der Darstellung der Glykosaminoglykane (GAG), speziell der Proteoglykane (PG) des hyalinen Knorpels. Aggrekan ist dabei das Hauptproteoglykan. Ein weiteres wesentliches Matrixmolekül ist Kollagen II, das mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurde. Der Kollagen-I-Antikörper diente der Überprüfung der Bildung von Kollagen-I-Fasern, die ein Hinweis zur Ausbildung eines minderwertigen Faserknorpels gegeben hätte. Ähnlich verhielt es sich mit dem Kollagen-X-Antikörper. Kollagen X befindet sich vorwiegend in der kalzifizierten Zone des Knorpels am Übergang zwischen Knorpel- und Knochengewebe. Deshalb ist es positiv zu bewerten, dass in keinem der histologischen Schnitte eine auffällige Bindung von Kollagen I und Kollagen X nachgewiesen werden konnte. Die Bindung von Aggrekan- sowie Kollagen-Antikörpern wurde anhand der Braunfärbung bewertet, die durch das Überschichten der Gewebeschnitte mit DAB (Diaminobenzidin) entsteht.

5.5.1 Histologische Färbungen der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur im Kollagenhydrogel

Die hier gezeigten histologischen Färbungen entsprechen einer Auswahl an Bildern, die von drei unabhängigen Bewertern zum Scoring ausgewertet wurden. Die Bewertung erfolgte verblindet. In Abbildung 19 und 20 sind die Färbungen jeweils eines der beiden Duplikate aus Ansatz I/II dargestellt.

Der positive Nachweis der Antikörperfärbung, das Vorhandensein eines Matrixproteins, ist an der Braunfärbung zu erkennen. Jede Abbildung vergleicht die beiden Behandlungsstrategien (pChon und pMix) an Tag 0 und Tag 28 (Normoxie und Hypoxie). Eine Abbildung zeigt die Ergebnisse jeweils einer Defekttiefe (Knorpeldefekt und Knochen-Knorpeldefekt). Bei den Knorpeldefekten wurde Kollagen II in der Gruppe Tag 28 pChon Normoxie am meisten gebildet, gefolgt von pChon Hypoxie. Aggrekan hingegen war am meisten präsent in pMix Hypoxie, gefolgt von pChon Hypoxie und pMix Normoxie an Tag 28. Bis auf das Sample Tag 28 pMix Normoxie wurde wenig bis gar kein Kollagen X produziert, welches ein Marker für die in der Knorpelregeneration nicht gewünschte Kalzifizierung ist. Eine schwache Safranin-O positive Färbung war nur bei Tag 28 pChon Normoxie präsent.

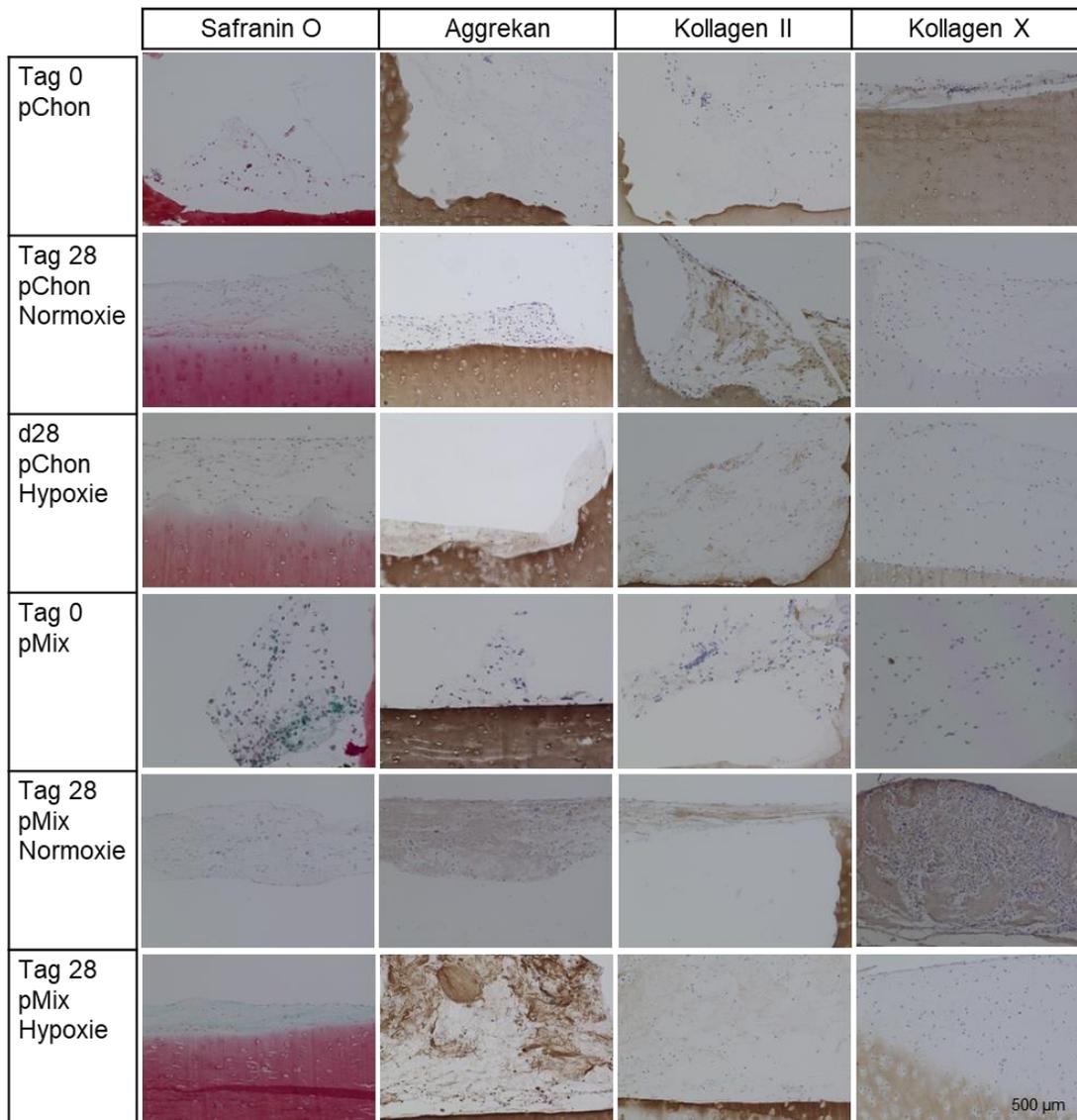


Abbildung 19: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) im Knorpeldefekt, Normoxie vs. Hypoxie (20x) von Ansatz I/II an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 µm.

In Abbildung 20 zeigt sich eine positive Antikörperfärbung vor allem an Tag 28 pChon Normoxie in der Aggrekan- und Kollagen II-Färbung. Aggrekan war auch in der Gruppe pChon Hypoxie etwas synthetisiert. In den übrigen Gruppen waren diese Proteine nur sehr schwach gefärbt. Kollagen X war in allen Gruppen nur schwach bis gar nicht gefärbt. Auch die Safranin-O Färbung resultierte in einer schwachen Färbung im Bereich des Defekts, die sich hauptsächlich auf die perizelluläre Region beschränkt.

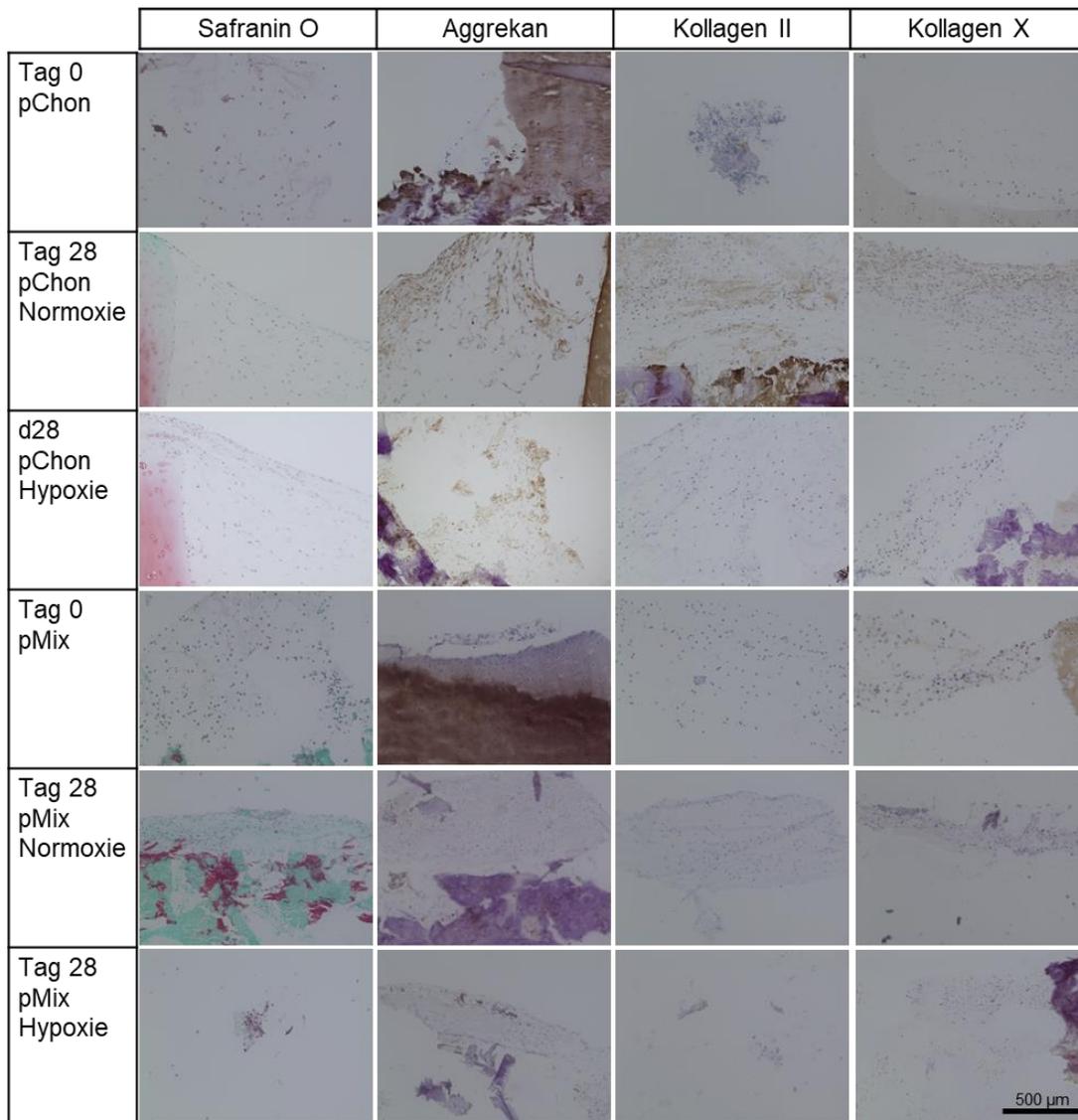


Abbildung 20: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) im Knochen-Knorpeldefekt, Normoxie vs. Hypoxie (20x) von Ansatz I/II an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 μ m.

5.5.2 Bern- und ICRS-II-Scoring der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur im Kollagenhydrogel

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse des Scorings gezeigt (Tabelle 26), die für die Auswahl der Materialkombination für Ansatz III herangezogen wurden, in dem das Kollagen-I-HG neben den Zellen durch Knorpelschnipsel ergänzt wurde.

Die histologische Evaluation der porcinen osteochondralen Explantate (OCE) mit unterschiedlichen Zelltypen (Monokultur mit porcinen Chondrozyten (pChon) vs. Mixkultur (pMix) mit porcinen MSCs und pChon) in Kollagen I Hydrogel (HG), unterschiedlicher Defekttiefe (Knochen-Knorpel- vs. Knorpeldefekt) und Sauerstoffgehalt (Normoxie vs. Hypoxie) erfolgte durch drei unabhängige Bewerter nach dem ICRS-II-/Bern-Score. Zunächst wurden die ersten beiden unabhängig voneinander und zeitversetzt gestarteten Ansätze nach 28 Tagen Kultivierung ausgewertet. Maximal konnten 18 Punkte erreicht werden.

Tabelle 26: Übersicht über die ersten beiden Ansätze (Ansatz I und II) mit den Mittelwerten aus der Auswertung mit dem ICRS-II-/Bern-Score (maximal 18 Punkte) nach 28 Tagen Kultur (n=2 Proben, 3 Bewerter).

Zelltyp	Defekttiefe	O ₂ -Gehalt	Füllmaterial	Mittelwert d28	Standardabweichung
pChon	Knochen-Knorpeldefekt	Normoxie	Kollagen I	11,833	1,722
pChon	Knorpeldefekt	Normoxie	Kollagen I	11,500	0,548
pChon	Knochen-Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I	10,667	1,751
pChon	Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I	11,833	1,722
pMIX	Knochen-Knorpeldefekt	Normoxie	Kollagen I	8,833	1,472
pMIX	Knorpeldefekt	Normoxie	Kollagen I	8,000	3,578
pMIX	Knochen-Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I	8,333	1,966
pMIX	Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I	11,333	2,875

Die gemittelten Scoring-Werte reichten von 8,0 in der pMix-Kultur in Normoxie bis zu 11,8 in der pChon-Monokultur in Normoxie (Knochen-Knorpel-Defekt) und in Hypoxie

(Knorpeldefekt). Nur unwesentlich geringer fielen die Scores für die pChon-Monokultur in Normoxie (Knorpeldefekt) mit 11,5 und pMix-Kultur in Hypoxie (Knorpeldefekt) mit einem Mittelwert von 11,3 aus. Unter 10 Scoringpunkten blieben die anderen pMix-Kulturen. Zusammenfassend haben die Monokulturen die höheren Werte erzielt als die pMix Behandlung. Ein positiver Effekt der Hypoxie gegenüber Normoxie zeigte sich im Knorpeldefekt der pMix-Gruppe.

5.5.3 Histologische Färbungen der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur und Knorpelschnipsels im Kollagenhydrogel

In Abbildung 21 sind die histologischen Bilder aus Ansatz III dargestellt. Es werden die beiden Behandlungsstrategien (pChon und pMix) an Tag 0 und Tag 28 (Normoxie und Hypoxie) verglichen im Knorpeldefekt und Knochen-Knorpeldefekt.

Im Vergleich zu Abbildung 19 und 20 zeigen sich in Abbildung 21 eine stärkere Braunfärbung der Antikörper Kollagen II und Aggrekan. Dies deckt sich mit den insgesamt höheren Ergebnissen im Scoring. Jedoch zeigen sich auch in den Kollagen X-Färbungen ein höherer Anteil an positiver Färbung. Insgesamt wurde in der Gruppe pChon Hypoxie im Knochen-Knorpeldefekt an Tag 28 am meisten Aggrekan und in pChon Hypoxie im Knorpeldefekt am meisten Kollagen II produziert. Im Vergleich der beiden Zellarten im Hydrogel resultierte eine stärkere Braunfärbung in der Gruppe pMix mit Schnipseln als pChon mit Schnipseln. Eine Rotfärbung zum Nachweis von Proteoglykanen war in diesem Ansatz nach 28 Tagen Kultur in allen Gruppen zu sehen (Safranin O Färbung).

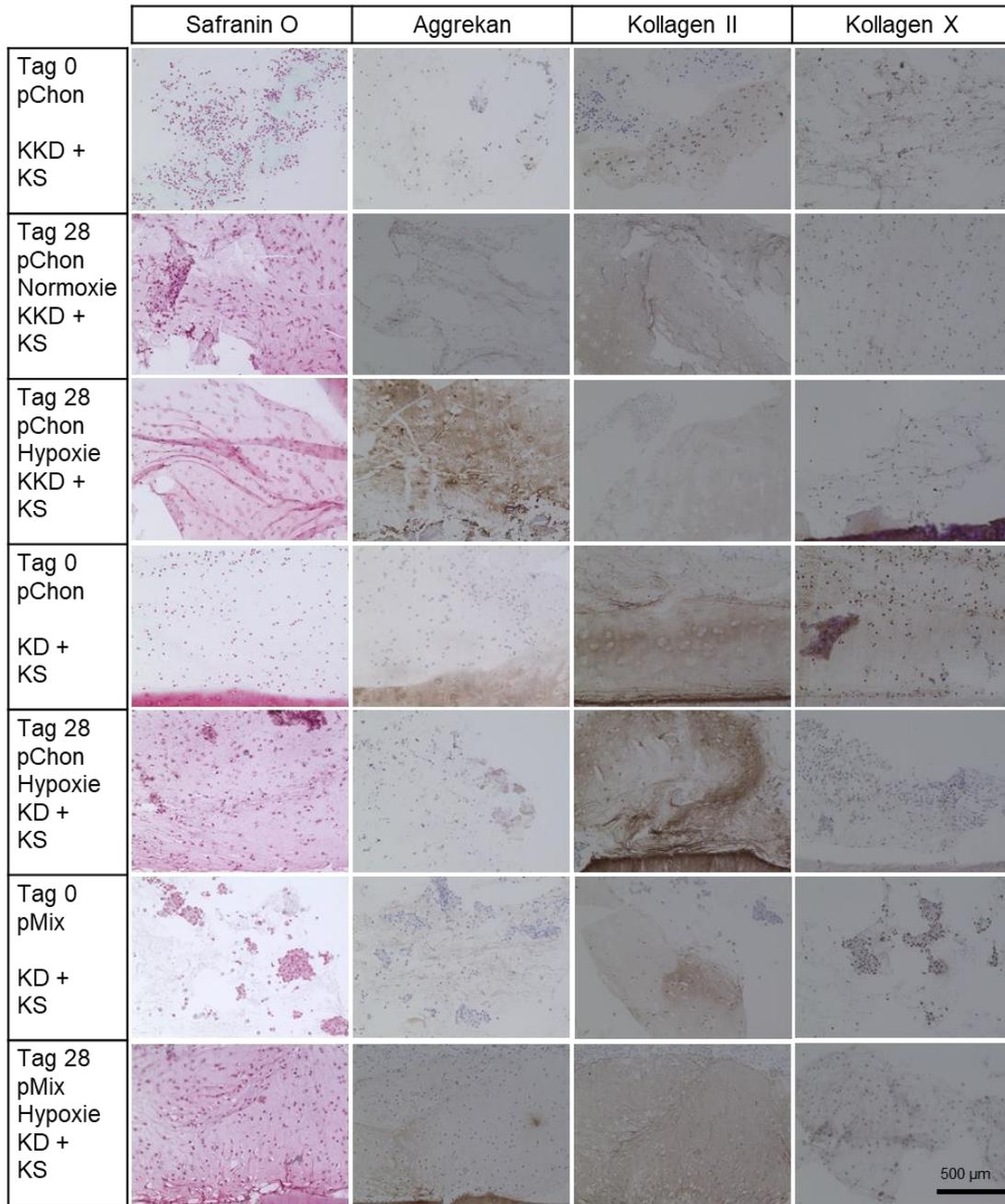


Abbildung 21: Ansatz III: pChondrozyten-Monokultur (pChon) und pMix-Kultur (pMSC + pChon) mit Knorpelschnipseln (KS) im Knochen-Knorpel-Defekt (KKD) und Knorpeldefekt (KD), Normoxie vs. Hypoxie (20x) an Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28). Scale bar 500 µm.

5.5.4 Bern- und ICRS-II-Scoring der Behandlung der Defekte mit Chondrozyten-Mono- und Co-Kultur und Knorpelschnipsels im Kollagenhydrogel

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse des Bern- und ICRS-II Scoring von Ansatz III (Tabelle 27) zusammengefasst. Im Vergleich zu Ansatz I und II fielen die Unterschiede in den Mittelwerten geringer aus. Der höchste Scoring Wert in Ansatz III wurde mit pChon in Knochen-Knorpeldefekt unter Hypoxie erzielt, gefolgt von pChon im Knochen-Knorpeldefekt unter Normoxie.

Tabelle 27: Übersicht über den dritten Ansatz (Ansatz III) mit Knorpelschnipseln (S) im zellbeladenen Kollagen-I-HG and Tag 28 mit den Mittelwerten aus der Auswertung mit dem ICRS-II-/Bern-Score (maximal 18 Punkte).

	Zelltyp	Defekttiefe	O ₂ -Gehalt	Füllmaterial	Mittelwert d28	Standardabweichung
Ansatz III Kol HG mit Schnipsel	pChon	Knochen-Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I S	12,167	1,602
	pChon	Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I S	11,667	1,633
	pChon	Knochen-Knorpeldefekt	Normoxie	Kollagen I S	11,833	1,472
	pMIX	Knorpeldefekt	Hypoxie	Kollagen I S	11,500	2,510

5.6 DMMB-Assay (GAG-Assay)

DMMB (Dimethyl-Methylen-Blau) bindet an die sulfatierten Glycosaminoglycane (GAGs). Es ist die häufigste angewendete Methode zur GAG-Quantifizierung [68]. GAGs sind eine der wichtigsten Komponenten der EZM und geben Auskunft über die Qualität und Spezifität des entwickelten Gewebes.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der GAG-Quantifizierung der ersten beiden Ansätze. Dargestellt sind die gesamtmenge GAG bzw. DNA in den Hydrogelen an Tag 0 und nach 28 Tagen Kultur unter Hypoxie und Normoxie.

An Tag 28 resultierte der höchste GAG-Gehalt in der pChon Monokultur des Knochen-Knorpeldefekts gefolgt von pMix im Knochen-Knorpeldefekt und pMix im Knorpeldefekt. Weiterhin war der GAG-Gehalt im Knochen-Knorpel Defekt der pChon Gruppe höher als im Knorpeldefekt (Abbildung 22, Tabelle 28).

Der höchste DNA-Gehalt zeigte sich ebenfalls in der Monokultur des Knochen-Knorpeldefekts in Normoxie und Hypoxie an Tag 28. Für die pMix-Kultur resultierten vergleichbare DNA-Werte. Tendenziell war ein Rückgang des DNA-Gehalts an Tag 0 auf Tag 28 zu erkennen, bis auf pChon-Behandlung im Knochen-Knorpeldefekt.

Es ist festzuhalten, dass in den zwei Ansätzen stark unterschiedliche Werte für GAG und DNA resultieren. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse – der Vergleich der Mittelwerte – nur als Tendenz interpretiert werden.

Betrachtet man zusätzlich die GAG/DNA-Relation, erzielten die pMix-Kulturen ein im Durchschnitt besseres Ergebnis als die pChon-Kulturen. Der geringere Sauerstoffgehalt unter hypoxischen Bedingungen scheint einen positiven Stimulus auf den GAG/DNA Gehalt in beiden pMix-Kulturen zu haben.

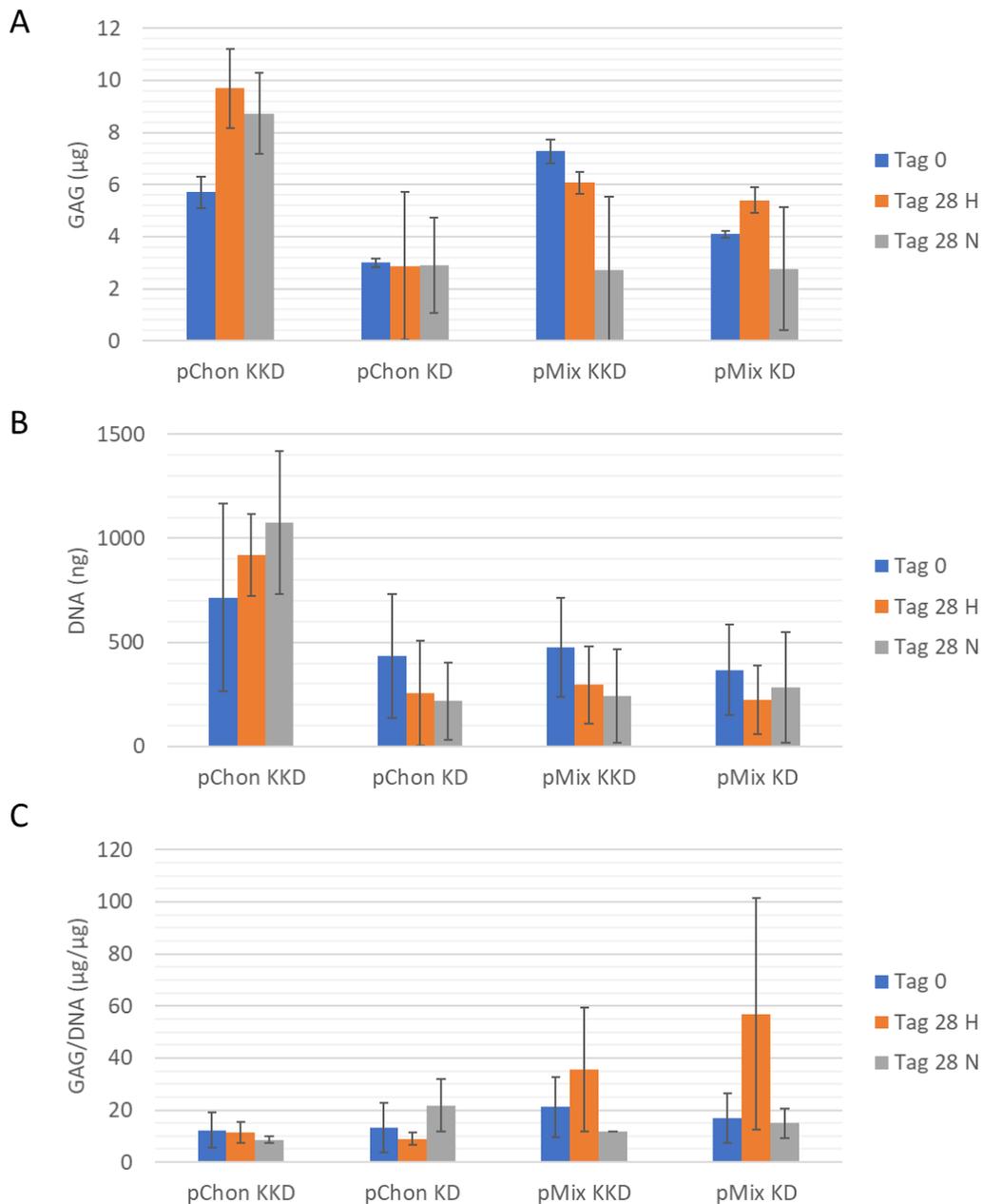


Abbildung 22: Quantifizierung des Proteoglykan (GAG) und DNA Gehalts im Kollagen Typ I Hydrogel von Ansatz I und II (Mittelwerte) an Tag 0 und Tag 28 (jeweils Hypoxie "H" und Normoxie "N"). Neben der GAG und DNA-Menge pro Konstrukt sind in der untersten Graphik die GAG Werte zu den jeweiligem DNA-Wert normalisiert dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte inklusive Fehlerbalken, die den Wert von Ansatz I und II angeben. KKD = Knochen-Knorpeldefekt, KD = Knorpeldefekt.

Tabelle 28: GAG, DNA und GAG/DNA Werte aus Ansatz I und II inklusive der Berechnung des Mittelwertes beider Ansätze. KKD = Knochen-Knorpeldefekt, KD = Knorpeldefekt, I = Ansatz I, II = Ansatz II.

Zeitpunkt	Probe	GAG	GAG Mittelwert	DNA	DNA Mittelwert	GAG/DNA	GAG/DNA Mittelwert
		µg	µg	ng	ng	µg/µg	µg/µg
Tag 0	pChon KKD I	6,29	5,70	1164,92	715,72	5,40	12,29
	pChon KKD II	5,11		266,53		19,18	
	pChon KD I	2,83	2,99	730,51	434,43	3,87	13,34
	pChon KD II	3,16		138,36		22,80	
	pMix KKD I	6,82	7,28	713,79	475,20	9,56	21,14
	pMix KKD II	7,74		236,60		32,71	
	pMix KD I	4,22	4,09	584,03	366,75	7,22	16,86
	pMix KD II	3,96		149,46		26,50	
Tag 28 Normoxie	pChon KKD I	10,27	8,72	1417,22	1074,01	7,25	8,53
	pChon KKD II	7,17		730,80		9,81	
	pChon KD I	1,08	2,91	34,07	218,17	31,75	21,76
	pChon KD II	4,74		402,28		11,78	
	pMix KKD I	5,52	2,73	465,03	240,52	11,86	11,86
	pMix KKD II	-		16,02		-	
	pMix KD I	0,40	2,76	19,27	283,66	20,67	15,01
	pMix KD II	5,13		548,06		9,35	
Tag 28 Hypoxie	pChon KKD I	11,22	9,70	724,93	921,06	15,48	11,40
	pChon KKD II	8,17		1117,20		7,31	
	pChon KD I	0,03	2,87	4,50	256,53	6,50	8,87
	pChon KD II	5,71		508,56		11,23	
	pMix KKD I	6,49	6,07	109,44	295,68	59,30	35,51
	pMix KKD II	5,65		481,91		11,72	
	pMix KD I	5,91	5,40	58,34	224,16	101,29	56,93
	pMix KD II	4,90		389,99		12,56	

6 Diskussion und Ausblick

Die Wahl einer geeigneten Behandlungsoption und das Ausmaß der Knorpelregeneration hängen von Größe und Tiefe des Knorpeldefekts und damit von der Schwere der Schädigung des Gewebes ab. Chondrozyten haben keinen direkten Kontakt zu Blut- und Lymphgefäßen und sind dementsprechend auf einen anaeroben Stoffwechsel angewiesen [70]. Durch diese Avaskularität und dadurch eine auf Diffusion beschränkte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie die Unfähigkeit Stoffwechselendprodukte aktiv abzutransportieren, ist die Reparatur- und Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels stark begrenzt. Die spezielle Anordnung der Chondrozyten, die in Lakunen eingeschlossen und dadurch nicht in der Lage sind auszuwandern und Heilungsprozesse in geschädigten Knorpelbereichen zu initiieren, erschweren dies zusätzlich [71].

Vor allem die Behandlung großer Defekte mit autologen Zellen ist aufgrund der hohen Anzahl von Chondrozyten, die für die gegenwärtig führende Behandlungsmethode der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT) benötigt werden, begrenzt.

Alle Behandlungsmethoden sind darauf ausgerichtet, die Schmerzen des Patienten zu reduzieren und die Kniefunktion bestmöglich zu erhalten oder wiederherzustellen. Die Defektreparatur erfolgt hierbei durch ein knorpelartiges Gewebe, das sich allerdings als fibröser Knorpel in der Zusammensetzung vom hyalinen Gelenkknorpel in Zonalität und somit in den mechanischen Eigenschaften unterscheidet [72-77]. Fibröser Knorpel besteht hauptsächlich aus Kollagen I und nicht wie hyaliner Knorpel aus Kollagen II [78]. In dieser Arbeit wurde ein kürzlich etabliertes osteochondrales *Ex-vivo*-Testmodell (EVTS) modifiziert [18], um zellbasierte Behandlungsstrategien in Abhängigkeit der Defekttiefe (Knorpeldefekt vs. Knochen-Knorpel-Defekt) und des Sauerstoffgehalts (Normoxie vs. Hypoxie) in einem klinisch relevanten Modell gegenüberzustellen. Das EVTS stellt ein 3D Modell dar und ermöglicht, den Einfluss unterschiedlicher Parameter auf das Regenerationsverhalten von Knorpelgewebe zu untersuchen. In drei Ansätzen (Ansätze I + II (Duplikat) und III mit Knorpelschnipseln) wurden verschiedene Zelltypen - zum einen eine Monokultur mit porcinen Chondrozyten (pChon) und zum anderen eine Co-Kultur mit 20 % pChons und 80 % pMSCs (pMix) - in Kollagen Typ I Hydrogel

eingebettet. Diese zellbeladenen Hydrogele wurden in chondrale (Knorpeldefekte) und osteochondrale (Knochen-Knorpel-Defekt) Defekte implantiert.

6.1 Osteochondrales *Ex-vivo*-Testmodell mit definierter Defekttiefe

Der subchondrale Knochen im osteochondralen Gewebe hat einen bedeutenden Einfluss auf die Knorpelhomöostase und vermutlich auch auf die Knorpeldefektheilung. In Studien zur Knorpelregeneration im Knochen-Knorpeldefekt von bovinen und equinen osteochondralen Explantaten wurde eine erhöhte Knorpelmatrixbildung auf den Kontakt des Explantats mit dem Knochen zurückgeführt [79, 80]. Aus diesem Grund stellt das *Ex vivo* osteochondrale Testsystem ein gutes Modell dar, um die Knorpeldefektheilung in einer komplexeren Umgebung als bei *in vitro* Modellen zu analysieren. Neben der Testung an einem Explantat bleibt in diesem Testsystem der Austausch von Knochen- und Knorpelgewebe wie in natura möglich.

Die gewebespezifische Nährstoffversorgung, die mit dem hier verwendeten 6-Well System ermöglicht wurde, kann eine frühzeitige Degeneration des Knorpels während der *ex vivo* Kultur verhindern [18]. Um die Defektreparatur an einem möglichst intakten Explantat zu untersuchen, ist dies von zentraler Bedeutung.

Der direkte Vergleich zellbasierter Behandlungsstrategien in einem *ex vivo* Modell mit zwei verschiedenen Defekttiefen (Knorpeldefekt und Knochen-Knorpeldefekt) wurde bislang noch nicht erforscht. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit hat die Defekttiefe einen Einfluss auf die Reparatur des Defekts. Diese Resultate bedürfen weiterer Experimente, um den Zusammenhang der Defektheilung und der Defekttiefe besser zu verstehen. Eine Induzierung von unterschiedlichen Knorpeldefekttiefen im *Ex vivo* Modell ist von großem Interesse, um die verschiedenen pathologischen Defekte im klinischen Alltag auch *ex vivo* zu untersuchen. Der Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten Verwundungsmaschine bietet den Vorteil, reproduzierbare Knorpeldefekte an den osteochondralen Explantaten zu setzen. Dabei war es wichtig, das umliegende Gewebe möglichst nicht durch Reibung oder das Bohren zu beschädigen. In den Leben-tot Färbungen wurde kein negativer Einfluss im Hinblick auf Vitalität der Chondrozyten im übrigen Gewebe der Explantate nachgewiesen. Der

Aufbau der Verwundungsmaschine ermöglichte es zudem, Defekte in einer geschlossenen Umgebung zu setzen und bietet die Möglichkeit dies auch unter sterilen Bedingungen durchzuführen.

Die Oberfläche jeder osteochondralen Probe wurde mit Hilfe einer Lichtschranke, die am Bohrkopf montiert ist, detektiert. Basierend auf der tatsächlichen Höhe der Probenoberfläche wurde der chondrale Defekt somit reproduzierbar in die Explantate gebohrt. Diese Art einen wenige Millimeter tiefen Defekt in ein hartes Gewebe wie das von Knorpel zu induzieren, wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Der Aufbau dieser Verwundungsmaschine wurde bisher nur für die Verwundung von Hautmodellen verwendet [81].

6.2 Einfluss der Wahl des Zellphänotyps auf die Knorpelreparatur

Aufgrund der geringen Anzahl an Chondrozyten im Knorpel und deren mit dem Alter zurückgehenden metabolischen Aktivität, werden alternative Zellquellen für die Knorpelbehandlung erforscht. Ein Fokus liegt auf der Testung von MSCs in Co-Kultur mit Chondrozyten [17, 58, 59].

In dieser Arbeit konnte eine stimulierende Wirkung der pMix-Behandlung ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Knorpelmatrixproduktion beobachtet werden. Scoringergebnisse der pMix Behandlung waren denen der pChon nur leicht unterlegen, und haben somit Potential in der Behandlung von Knorpeldefekten gezeigt. Der stimulative Effekt der Co-Kultur von MSCs und Chondrozyten wurde in mehreren *in vitro* und *in situ* Studien gezeigt [59, 82-84]. Neben einer Zunahme in der Produktion von Knorpelmatrix und einer stärkeren chondrogenen Differenzierung von MSCs kann durch die Co-Kultur sogar die hypertrophe Differenzierung von hMSCs reduziert werden [59, 85-87]. Im Widerspruch hierzu wird in den vergangenen Jahren eher von einer trophischen Rolle der MSCs auf die Chondrozyten ausgegangen und weniger von einer chondrogenen Differenzierung der MSCs in der Co-Kultur [58, 59]. Nach wie vor ist dabei unklar, ob die MSCs selbst zu Chondrozyten differenzieren oder möglicherweise nur ein Trigger für die Differenzierung anderer Zellen in der Mikroumgebung sind [60].

Für einen weiteren Erkenntnisgewinn wäre eine Möglichkeit in weiteren Versuchen den pMSC-Anteil zu erhöhen oder auch zu erniedrigen und zusätzlich mit und ohne Wachstumsfaktoren zu stimulieren.

Ein möglicher Vorteil der Anwendung von MSCs könnte der Wegfall der Komorbidität und der zweiten Operation bei dem aktuellen Goldstandard der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT) sein, was mit insgesamt geringeren Kosten sowie einem verminderten Infektionsrisiko durch den operativen Eingriff einhergeht. Wenn man bedenkt, dass jedes Trauma die Ausbildung osteoarthritischer Veränderungen begünstigt [27], könnten die leicht schlechteren Scoringergebnisse den Vorteil einer allogenen MSC-Transplantation von nur einer OP gegenüber einer autologen Chondrozytentransplantation mit Komorbidität und zwei operativen Eingriffen ausgleichen.

Die Behandlung mit der MSC-Chondrozyten Co-Kultur würde es sogar ermöglichen, diese in einer 1-Schritt Operation zu isolieren und direkt in den Knorpeldefekt zu injizieren. Dies wird durch die reduzierte Anzahl der Chondrozyten (20 %) bei einer Co-Kultur mit MSC ermöglicht. Ein weiterer Vorteil, der sich aus der deutlich reduzierten Anzahl an Chondrozyten (in dieser Arbeit 20 %) ergibt, ist die Vermeidung der Chondrozyten Dedifferenzierung während einer *in vitro* Expansion [88].

6.3 Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die Knorpelreparatur

Neben der unterschiedlichen Zellkombinationen und der Defekttiefe wurde als weiterer Parameter der Einfluss des Sauerstoffgehalts (Normoxie: 20 % O₂, Hypoxie: 2 % O₂) während der *Ex-vivo*-Kultur auf die Ausbildung einer chondrogenen Matrix im Defekt untersucht.

Chondrozyten des hyalinen Knorpels sind hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Der Sauerstoffgehalt im avaskulären Knorpel wird mit 2-5 %, in der Synovialflüssigkeit und der Synovialkapsel mit 6.5-9.0 % beschrieben [89-91]. Im Knochenmark des subchondralen Knochens beträgt der Sauerstoffgehalt über 7 % [92, 93].

Der geringere Sauerstoffgehalt (Hypoxie) im Knorpel stellt einen wichtigen Faktor der Homöostase des Knorpelgewebes dar. Durch den niedrigen Sauerstoffgehalt werden

sogenannte Hypoxie-induzierende Faktoren (HIFs) ausgeschüttet, die durch Translokation in den Zellkern die Ausschüttung von Zielgenen bewirken (z. B. Hypoxia-responsive element) und dadurch Auswirkung auf die Differenzierung von Progenitorzellen (Vorläuferzellen) bereits während der Entwicklung sowie auf die Ausbildung der EZM und des korrekten Phänotyps der Zellen haben. Mit einfachen Worten erklärt verhindert ein geringer Sauerstoffgehalt die Degradation der HIFs [94]. Folglich wird angenommen, dass die Ausschüttung von HIFs positiv auf Knorpelzellen und die EZM-Bildung wirkt und die Bildung von Knochengewebe und einer Hypertrophie des Gewebes verhindert [10, 32].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beim Scoring eine Tendenz beobachtet, dass hypoxische Bedingungen bei Knorpeldefekten einen Einfluss auf die Matrixbildung haben. Die Mittelwerte in Knorpeldefekten unter hypoxischen Kulturbedingungen fielen gleich oder höher aus als die der Knochen-Knorpel-Defekte bei Normoxie. Daraus könnte abgeleitet werden, dass solange gesundes Knorpelgewebe als Trigger Kontakt zum Füllungsmaterial hat, der niedrige Sauerstoffgehalt eine Rolle spielt. Möglicherweise aufgrund der HIFs, denen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der chondrogenen Homöostase zugeschrieben wird [10, 32]. Sobald jedoch vaskularisiertes Knochengewebe Kontakt zum zellbeladenen Hydrogel (HG) hat, verliert der Sauerstoffgehalt seinen Einfluss. Dies kann damit erklärt werden, dass sobald ein Knorpeldefekt weiter voranschreitet und schließlich in den subchondralen Knochen vordringt, der Sauerstoffgehalt ansteigt, da der Knochen vaskularisiert ist [95]. Folglich ist ein Unterschied im Sauerstoffgehalt bei Knorpeldefekten im Vergleich zu Knochen-Knorpeldefekten zu erwarten. Der positive Einfluss eines geringen Sauerstoffgehalts in Bezug auf ein erhöhtes chondrogenes Differenzierungsverhalten von hMSCs ist *in vitro* bereits belegt worden [90, 96]. Pattappa *et al.* beschrieb eine erhöhte Proteoglykansynthese und Kollagen II Produktion in der Gruppe, die unter physioxischen Bedingungen, verglichen zu Normoxie, *in vitro* kultiviert wurden [96].

6.4 Einfluss der Zugabe von Knorpelschnipsel in der Knorpelreparatur

In Ansatz I und II konnte der Einfluss der unterschiedlichen Zellkombinationen und der Defekttiefe mit dem zusätzlichen Parameter des Sauerstoffgehalts (Normoxie: 20 % O₂, Hypoxie: 2 % O₂) während der *Ex-vivo*-Kultur auf die Ausbildung einer chondrogenen Matrix im Defekt bereits gezeigt werden. Im dritten Ansatz wurden nun zusätzlich als Trigger Knorpelschnipsel in eine Auswahl an Explantatkombinationen hinzugefügt. Dies waren bei den Knochen-Knorpeldefekten die in Normoxie und Hypoxie kultivierten Monokulturen mit pChon und bei den Knorpeldefekten die Monokulturen mit pChon und die Mixkulturen aus pMSC und pChon.

Bei den Ergebnissen aus Ansatz I und II konnte davon ausgegangen werden, dass das zusätzliche Vorhandensein von Knorpelgewebe einen positiven Einfluss auf die Matrixbildung haben muss. So konnte bereits in einem Kaninchen-Modell nachgewiesen werden, dass die Beimischung allogener Knorpelschnipsel zu einer besseren Defektheilung führte [56]. Zusätzlich zeigte eine klinische Studie an Patienten im Durchschnittsalter von 30 Jahren ein zufriedenstellendes Ergebnis im Hinblick auf Schmerzreduzierung und Kniefunktion [57]. Da die Proliferationsrate bezüglich der Zellverdopplungszeit und der chondrogenen EZM Synthese mit dem Alter abnehmen [54], könnte dieser Umstand in Zukunft speziell Berücksichtigung beim aktuellen Goldstandard der ACT mit Möglichkeit einer entsprechenden Modifizierung des Verfahrens durch die Zugabe von allogenen oder auch autologen Knorpelzellen, beispielsweise wenn im Rahmen des Eingriffs verfranzter Knorpel abgetragen wird, zum Tragen kommen. Hier wiederum könnten jedoch bei der Zellauswahl chondrogene Vorläuferzellen den ausgereiften autologen ausdifferenzierten Chondrozyten und den MSCs bezüglich der chondrogenen Differenzierung und EZM-Bildung überlegen sein [55].

Es lässt sich festhalten, dass das Vorhandensein von Knorpelgewebe, sei es im Knorpeldefekt oder durch die Zufuhr von Knorpelschnipseln oder bestenfalls der Kombination aus beidem, durchgehend einen positiven Einfluss auf die Matrixbildung hatte. Selbst der pro-osteogene Einfluss der Normoxie hinsichtlich der Bildung eines

fibrinösen Ersatzknorpels im Knorpel-Knochendefekt konnte im dritten Ansatz durch die Zufuhr von Knorpelschnipseln möglicherweise reduziert werden.

Der Vorteil einer vermehrten Präsenz des Knorpelgewebes in Form von Knorpelschnipseln auf die Matrixproduktion zeigte sich auch in den Knorpeldefekten in den Monokulturen und der Mixkultur aus MSC und pChon. Diese Ergebnisse bestätigen die in der aktuellen Literatur geführte Diskussion über die Bedeutung des Knorpelgewebes als Trigger. Fraglich ist dabei nach wie vor, ob als Trigger für die MSCs für die Differenzierung in Knorpelzellen oder als ein Trigger für die Chondrozyten selbst und die Initiierung autologer Regenerationsprozesse. In der Literatur wird eher von einer trophischen Rolle der MSCs und der Matrixproduktion ausgegangen als auf eine tatsächliche chondrogene Differenzierung der MSCs [58, 59]. Weiterhin ist unklar, ob die MSCs selbst zu Chondrozyten differenzieren oder möglicherweise nur ein Trigger für die Differenzierung anderer Zellen in der Mikroumgebung sind [60].

Die Diskussion wer wen wie beeinflusst ist bereits Gegenstand aktueller Forschung und wird in Zukunft wesentlicher Ansatzpunkt neuer Teststrategien sein. Auch hierfür bieten Tissue Engineering inspirierte *Ex vivo* Testmodelle zweifelsohne eine Grundlage für die klinische Testung unter Berücksichtigung und Integration der nötigen Grundlagenforschung.

6.5 Limitationen des porcinen *Ex vivo* Testsystem

Das in den vorherigen Kapiteln beschriebene *Ex vivo* Modell zeigte konsistente Ergebnisse mit der Literatur, soweit diese vergleichbar waren. Allerdings stellt die Verwendung des porcinen Materials in dem genannten Modell eine Limitation der Studien dar. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit parallel humanes Material, entweder von Patienten, die ein künstliches Kniegelenk bekamen, oder von Körperspendern aus der Anatomie, charakterisiert. Ein Nachteil der Verwendung von humanem Material ist die begrenzte Verfügbarkeit. Zudem leiden die Patienten, die eine Knieprothese erhalten an Osteoarthrose im späten Stadium. Somit weist das Material aus der Klinik einen stark inflammatorischen und degenerierten Phänotyp auf. In einer kürzlichen Studie mit humanen osteochondralen Explantaten wurde von einem

Rückgang der Zellvitalität im Explantat mit zunehmender Kulturdauer über insgesamt 4 Wochen berichtet [97]. Diese Studie bekräftigt die Entscheidung, dass humanes Material für die Testung neuer Knorpelbehandlungsstrategien nicht die optimale Spezies für den Aufbau des *Ex vivo* Testsystems darstellt.

Eine weitere Limitation des osteochondralen EVTS ist der fehlende mechanische Reiz auf das Knorpelgewebe. Die trajektorielle Ausrichtung der EZM und der Stoffwechsel sind abhängig von der biomechanischen Stimulation. Für einen Transfer in die klinische Praxis wäre die Weiterentwicklung des EVTS wünschenswert, um die komplexen Bedingungen im Kniegelenk simulieren zu können [98, 99].

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Das *Ex vivo* osteochondrale Testsystem stellt eine Plattform zur Testung verschiedener Behandlungsstrategien unter kontrollierten Bedingungen dar. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das umgebende Gewebe der osteochondralen Explantate die Bildung von Knorpelmatrix in den zellbeladenen Hydrogelen, ohne endogene Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- β unterstützt hat. Das osteochondrale Explantat unterstützt nicht nur die Matrixbildung sondern stellt eine natürliche Quelle von weiteren Zellen (Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten) dar. Diese tragen vermutlich zur Stimulation der Defektheilung bei.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Defekttiefe eine entscheidende Rolle bei der Defektregeneration spielt. Dennoch ist der genaue Mechanismus, der den Erfolg eines Behandlungsansatzes beeinflusst, nicht bekannt. Nach wie vor sind die Mechanismen der Knorpeldegeneration und -regeneration nicht ausreichend verstanden. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der Veränderungen der Knorpelhomöostase bei degenerativen Prozessen, einer Osteoarthritis oder bedingt durch ein Trauma. Mesenchymale Stammzellen bieten das Potential zur Regeneration. Allerdings braucht es weitere Vergleiche und Evaluationen verschiedener Zell- und Materialkombinationen, um das Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsverhalten der MSCs besser zu verstehen.

Um nachhaltige Behandlungsstrategien in die klinische Praxis zu integrieren, bedarf es

weiterer langfristiger Studien. Ein wichtiger Faktor könnte die Integration der mechanischen Reizung während der Kultivierung in Hypoxie sein. Schaut man sich die Biomechanik des Kniegelenks an, so erfährt der Knorpel durch Bewegung Kompression, und Scherung [100]. Die Applikation mechanischer Reize wird in der Literatur als kritischer Faktor in Bezug auf den Knorpelmetabolismus und somit der Aufrechterhaltung der Matrixeigenschaften diskutiert. In verschiedenen Arbeiten wurde eine vermehrte Knorpelmatrixbildung nach mechanischer Stimulation gezeigt [98, 101, 102].

Ein weiterer Aspekt, der mit diesem Testsystem beleuchtet werden kann, ist der Vergleich der Defektheilung in gesundem und entzündlichem Milieu. Für diese Testung können pro- und antiinflammatorische Zytokine in das Kulturmedium hinzugefügt werden und deren Auswirkung auf die Knorpeldegeneration oder die Knorpelmatrixbildung im Defektmodell untersucht werden.

Aus der klinischen Perspektive bieten aktuelle Behandlungsmethoden wie die (M-)ACT eine kurzfristige Linderung jedoch keine nachhaltige Schmerzfreiheit und adäquate Belastbarkeit des geschädigten Gelenks. Die Verwendung allogener mesenchymaler Stammzellen in der chirurgischen Praxis ist ein Ansatz, um zumindest die Nachteile der (M-)ACT mit Komorbiditäten, Risiken und Kosten zweier Operationen zu verringern. Insgesamt sollte in der Diskussion sinnvoller operativer Behandlungen bei jedem Patienten nie die Bedeutung und der Nutzen einer konservativen Therapie mit individueller Rehabilitation und gezielter Physiotherapie sowie gegebenenfalls einer Gewichtsreduktion vernachlässigt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut, R., *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010"*. 2012, Robert Koch-Institut. p. 188.
2. Postler, A., et al., *Prevalence and treatment of hip and knee osteoarthritis in people aged 60 years or older in Germany: an analysis based on health insurance claims data*. *Clinical interventions in aging*, 2018. **13**: p. 2339-2349.
3. Schewe, B., J. Fritz, and K. Weise, *Knorpelverletzungen am Kniegelenk*. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 2008. **3**(2): p. 77-94.
4. Poulet, B. and K.A. Staines, *New developments in osteoarthritis and cartilage biology*. *Curr Opin Pharmacol*, 2016. **28**: p. 8-13.
5. Richmond, S.A., et al., *Are joint injury, sport activity, physical activity, obesity, or occupational activities predictors for osteoarthritis? A systematic review*. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2013. **43**(8): p. 515-B19.
6. Gelber, A.C., et al., *Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(5): p. 321-8.
7. Zhuo, Q., et al., *Metabolic syndrome meets osteoarthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(12): p. 729-37.
8. Maffulli, N. and J.B. King, *Effects of physical activity on some components of the skeletal system*. *Sports Med*, 1992. **13**(6): p. 393-407.
9. Greene, M.A. and R.F. Loeser, *Aging-related inflammation in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. **23**(11): p. 1966-71.
10. Fernandez-Torres, J., et al., *Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. **21**(12): p. 2800-2810.
11. Carnes, J., et al., *Knee cartilage defects in a sample of older adults: natural history, clinical significance and factors influencing change over 2.9 years*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. **20**(12): p. 1541-7.
12. Brittberg, M., et al., *Cartilage repair in the degenerative ageing knee*. *Acta Orthop*, 2016. **87**(sup363): p. 26-38.
13. Ryd, L., et al., *Pre-Osteoarthritis: Definition and Diagnosis of an Elusive Clinical Entity*. *Cartilage*, 2015. **6**(3): p. 156-65.
14. Widuchowski, W., J. Widuchowski, and T. Trzaska, *Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies*. *Knee*, 2007. **14**(3): p. 177-82.
15. Schindler, O.S., *Current concepts of articular cartilage repair*. *Acta Orthop Belg*, 2011. **77**(6): p. 709-26.
16. Archer, C.W. and P. Francis-West, *The chondrocyte*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(4): p. 401-4.
17. Caplan, A.I., *Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How*. *Stem Cells Int*, 2015. **2015**: p. 628767.
18. Schwab, A., et al., *Ex vivo culture platform for assessment of cartilage repair treatment strategies*. *ALTEX*, 2017. **34**(2): p. 267-277.
19. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. *Sports Health*, 2009. **1**(6): p. 461-8.
20. Buckwalter, J.A., H.J. Mankin, and A.J. Grodzinsky, *Articular cartilage and osteoarthritis*. *Instr Course Lect*, 2005. **54**: p. 465-80.

21. Mow, V.C., et al., *Biphasic indentation of articular cartilage--II. A numerical algorithm and an experimental study*. J Biomech, 1989. **22**(8-9): p. 853-61.
22. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. **33**(2): p. 295-306.
23. Muir, H., *The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. Bioessays, 1995. **17**(12): p. 1039-48.
24. Rai, V., et al., *Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(8): p. 2343-2354.
25. Maroudas, A., *Physicochemical properties of cartilage in the light of ion exchange theory*. Biophys J, 1968. **8**(5): p. 575-95.
26. Bora, F.W., Jr. and G. Miller, *Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis*. Hand Clin, 1987. **3**(3): p. 325-36.
27. Heinegard, D. and T. Saxne, *The role of the cartilage matrix in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 50-6.
28. Strobel, S., et al., *Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. R34.
29. Izadifar, Z., X. Chen, and W. Kulyk, *Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair*. J Funct Biomater, 2012. **3**(4): p. 799-838.
30. Steinwachs, M., et al., *Regenerative Knorpeltherapie*. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2014. **9**(04): p. 279-301.
31. Guilak, F. and V.C. Mow, *The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage*. J Biomech, 2000. **33**(12): p. 1663-73.
32. Taheem, D.K., G. Jell, and E. Gentleman, *Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Osteochondral Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2020.
33. Mobasher, A., et al., *Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions*. Maturitas, 2014. **78**(3): p. 188-98.
34. Radtke, R. *Implantationen künstlicher Kniegelenke in deutschen Krankenhäusern nach Alter 2018 2019*; Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/785126/umfrage/implantatione-n-kuenstlicher-kniegelenke-in-deutschen-krankenhaeusern-nach-alter/>.
35. Plumb, M.S. and R.M. Aspden, *The response of elderly human articular cartilage to mechanical stimuli in vitro*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(12): p. 1084-91.
36. Goyal, D., et al., *Evidence-based status of microfracture technique: a systematic review of level I and II studies*. Arthroscopy, 2013. **29**(9): p. 1579-88.
37. Moseley, J.B., Jr., et al., *Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients*. Am J Sports Med, 2010. **38**(2): p. 238-46.

38. de Vries-van Melle, M.L., et al., *An osteochondral culture model to study mechanisms involved in articular cartilage repair*. Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(1): p. 45-53.
39. Solheim, E., et al., *Osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee: results at 5 to 9 years*. Knee, 2010. **17**(1): p. 84-7.
40. Harris, J.D., et al., *Autologous chondrocyte implantation: a systematic review*. J Bone Joint Surg Am, 2010. **92**(12): p. 2220-33.
41. Macmull, S., et al., *Autologous chondrocyte implantation in the adolescent knee*. Am J Sports Med, 2011. **39**(8): p. 1723-30.
42. Niemeyer, P., et al., *Autologe Knorpelzelltransplantation*. Arthroskopie, 2016. **29**(2): p. 101-107.
43. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
44. Amarilio, R., et al., *HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis*. Development, 2007. **134**(21): p. 3917-28.
45. Grassel, S. and N. Ahmed, *[Use of bone marrow mesenchymal stem cells for ex vivo cartilage regeneration]*. Orthopade, 2007. **36**(3): p. 227-35.
46. Duan, L., et al., *Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy*. Am J Transl Res, 2015. **7**(2): p. 194-208.
47. Duval, E., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(10): p. 3038-48.
48. Adesida, A.B., A. Mulet-Sierra, and N.M. Jomha, *Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells*. Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(2): p. 9.
49. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
50. Randau, T.M., S. Gravius, and A. Nussler, *[Stem cell-based therapy in orthopaedics and trauma surgery - current concepts]*. Z Orthop Unfall, 2014. **152**(4): p. 320-7.
51. Bruder, S.P., et al., *Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(4): p. 655-63.
52. Wiesmann, A., et al., *Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation*. Head Face Med, 2006. **2**: p. 8.
53. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.

54. Barbero, A., et al., *Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(6): p. 476-84.
55. Wang, K., et al., *Chondrogenic Progenitor Cells Exhibit Superiority Over Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes in Platelet-Rich Plasma Scaffold-Based Cartilage Regeneration*. Am J Sports Med, 2019. **47**(9): p. 2200-2215.
56. Bonasia, D.E., et al., *The use of autologous adult, allogenic juvenile, and combined juvenile-adult cartilage fragments for the repair of chondral defects*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016. **24**(12): p. 3988-3996.
57. Massen, F.K., et al., *One-Step Autologous Minced Cartilage Procedure for the Treatment of Knee Joint Chondral and Osteochondral Lesions: A Series of 27 Patients With 2-Year Follow-up*. Orthop J Sports Med, 2019. **7**(6): p. 2325967119853773.
58. Wu, L., et al., *Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(15-16): p. 1542-51.
59. Scalzone, A., et al., *The interplay between chondrocyte spheroids and mesenchymal stem cells boosts cartilage regeneration within a 3D natural-based hydrogel*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14630.
60. Randau, T.M., et al., *The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72973.
61. Meretoja, V.V., et al., *The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds*. Biomaterials, 2013. **34**(17): p. 4266-73.
62. Steinwachs, M.R., et al., *Current treatment for cartilage damage in the patellofemoral joint*. Orthopade, 2008. **37**(9): p. 841-7.
63. Hoemann, C., et al., *International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials*. Cartilage, 2011. **2**(2): p. 153-72.
64. Grogan, S.P., et al., *Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage*. Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2141-9.
65. Rutgers, M., et al., *Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(1): p. 12-23.
66. Efe, T., et al., *Cell-free collagen type I matrix for repair of cartilage defects-clinical and magnetic resonance imaging results*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(10): p. 1915-22.
67. Andereya, S., et al., *[First clinical experiences with a novel 3D-collagen gel (CaReS) for the treatment of focal cartilage defects in the knee]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2006. **144**(3): p. 272-80.
68. Kubaski, F., et al., *Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry*. Mol Genet Metab, 2017. **120**(1-2): p. 67-77.
69. Mushahary, D., et al., *Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells*. Cytometry A, 2018. **93**(1): p. 19-31.

70. Linn, F.C. and L. Sokoloff, *MOVEMENT AND COMPOSITION OF INTERSTITIAL FLUID OF CARTILAGE*. Arthritis Rheum, 1965. **8**: p. 481-94.
71. Goggs, R., et al., *Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis*. Vet J, 2003. **166**(2): p. 140-58.
72. Lamplot, J.D., K.A. Schafer, and M.J. Matava, *Treatment of Failed Articular Cartilage Reconstructive Procedures of the Knee: A Systematic Review*. Orthop J Sports Med, 2018. **6**(3): p. 2325967118761871.
73. Merkely, G., et al., *Clinical Outcomes after Revision of Autologous Chondrocyte Implantation to Osteochondral Allograft Transplantation for Large Chondral Defects: A Comparative Matched-Group Analysis*. Cartilage, 2019: p. 1947603519833136.
74. Wylie, J.D., et al., *Failures and Reoperations After Matrix-Assisted Cartilage Repair of the Knee: A Systematic Review*. Arthroscopy, 2016. **32**(2): p. 386-92.
75. Mithoefer, K., et al., *Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis*. Am J Sports Med, 2009. **37**(10): p. 2053-63.
76. Kreuz, P.C., et al., *Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(11): p. 1119-25.
77. Carey, J.L., *Fibrocartilage Following Microfracture Is Not as Robust as Native Articular Cartilage: Commentary on an article by Aaron J. Krych, MD, et al.: "Activity Levels Are Higher After Osteochondral Autograft Transfer Mosaicplasty Than After Microfracture for Articular Cartilage Defects of the Knee. A Retrospective Comparative Study"*. JBJS, 2012. **94**(11).
78. Horas, U., et al., *Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85**(2): p. 185-92.
79. Mouser, V.H.M., et al., *Ex vivo model unravelling cell distribution effect in hydrogels for cartilage repair*. ALTEX, 2018. **35**(1): p. 65-76.
80. de Vries-van Melle, M.L., et al., *Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in an osteochondral environment is mediated by the subchondral bone*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(1-2): p. 23-33.
81. Rossi, A., et al., *Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding*. J Vis Exp, 2015(96).
82. Chen, M.J., et al., *Inducing chondrogenesis in MSC/chondrocyte co-cultures using exogenous TGF- β : a mathematical model*. J Theor Biol, 2018. **439**: p. 1-13.
83. Deszcz, I., et al., *Utility of direct 3D co-culture model for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on hyaluronan scaffold (Hyaff-11)*. Regen Biomater, 2020. **7**(6): p. 543-552.
84. Acharya, C., et al., *Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation*. J Cell Physiol, 2012. **227**(1): p. 88-97.
85. Chen, M.J., et al., *Inducing chondrogenesis in MSC/chondrocyte co-cultures using exogenous TGF- β : a mathematical model*. Journal of Theoretical Biology, 2018. **439**: p. 1-13.

86. Bian, L., et al., *Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage*. Tissue engineering. Part A, 2011. **17**(7-8): p. 1137-1145.
87. Kim, T.W., et al., *Direct Coculture of Human Chondrocytes and Synovium-Derived Stem Cells Enhances In Vitro Chondrogenesis*. Cell journal, 2018. **20**(1): p. 53-60.
88. Aigner, T., et al., *Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1993. **63**(4): p. 205-11.
89. Lund-Olesen, K., *Oxygen tension in synovial fluids*. Arthritis Rheum, 1970. **13**(6): p. 769-76.
90. Pattappa, G., et al., *The Importance of Physioxia in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis and the Mechanisms Controlling Its Response*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3).
91. Zhou, S., Z. Cui, and J.P.G. Urban, *Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage–bone interface: A modeling study*. Arthritis & Rheumatism, 2004. **50**(12): p. 3915-3924.
92. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
93. Anderson, D.E., et al., *Responses to altered oxygen tension are distinct between human stem cells of high and low chondrogenic capacity*. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**(1): p. 154.
94. Kremer, A., et al., *Ciclopirox olamine promotes the angiogenic response of endothelial cells and mesenchymal stem cells*. Clin Hemorheol Microcirc, 2019. **73**(2): p. 317-328.
95. Filipowska, J., et al., *The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning*. Angiogenesis, 2017. **20**(3): p. 291-302.
96. Pattappa, G., et al., *Physioxia Has a Beneficial Effect on Cartilage Matrix Production in Interleukin-1 Beta-Inhibited Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis*. Cells, 2019. **8**(8).
97. Kleuskens, M.W.A., et al., *An ex vivo human osteochondral culture model*. J Orthop Res, 2020.
98. Kock, L.M., K. Ito, and C.C. van Donkelaar, *Sliding indentation enhances collagen content and depth-dependent matrix distribution in tissue-engineered cartilage constructs*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(17-18): p. 1949-59.
99. Cochis, A., et al., *Bioreactor mechanically guided 3D mesenchymal stem cell chondrogenesis using a biocompatible novel thermo-reversible methylcellulose-based hydrogel*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45018.
100. Schätti, O., et al., *A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. Eur Cell Mater, 2011. **22**: p. 214-25.
101. Vinardell, T., et al., *Chondrogenesis and Integration of Mesenchymal Stem Cells Within an In Vitro Cartilage Defect Repair Model*. Annals of Biomedical Engineering, 2009. **37**(12): p. 2556.

102. Guilak, F., et al., *The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair*. Clin Orthop Relat Res, 2004(423): p. 17-26.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Evaluation of cartilage regeneration strategies in an osteochondral *ex vivo* cartilage defect model" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, März 2021

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Testung verschiedener Strategien für die Regeneration von Knorpeldefekten im *Ex vivo*-Testsystem“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, März 2021

Unterschrift

Danksagung

Ich danke meinen Betreuern, vor allem Dr. Andrea Schwab und Dr. Franziska Ehlicke, für die intensive Einarbeitung in die Laborarbeit und Unterstützung im operativen Bereich. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Heike Walles für Ihr Vertrauen und die Möglichkeit einer experimentellen Doktorarbeit. Prof. Dr. Torsten Blunk danke ich für die konstruktive und fruchtbare Diskussion meiner Arbeit in der finalen Phase.

Prof. Dr. André Steinert danke ich die Bereitstellung des humanen Materials aus Knie TEP OPs. Ebenfalls danke ich dem anatomischen Institut Würzburg für die Bereitstellung von humanem Material aus Körperspendern.

Der GSLS danke ich für das Stipendium und die Möglichkeit des wissenschaftlichen experimentellen Arbeitens während des Medizinstudiums sowie die administrative Unterstützung.

Dem Lehrstuhl TERM danke ich für eine großartige, kollegiale und produktive tägliche Unterstützung im Laboralltag.

Ich danke meinen Eltern, Rosemarie Buss und Dr. med. Volkert Buss, dass sie mich von Anfang an darin bestärkt haben, meinen eigenen Weg zu gehen und auch auf Umwegen oder bei Unwägbarkeiten an meinen Zielen festzuhalten.

Ich danke meiner besten Freundin, Anne Schubert, für alles, für die mentale Unterstützung und ihren Zuspruch, bei mir selbst zu bleiben und meinen Stärken zu vertrauen.