

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-,
Plastische und Wiederherstellungschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

**Vergleich des Redifferenzierungspotenzials von zonalen
Chondrozyten-Subpopulationen im 3D-Hydrogelmodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Johanna Rothaug
aus Bad Neustadt an der Saale

Würzburg, April 2021

Referent: Prof. Dr. Torsten Blunk

Korreferent: Prof. Dr. Regina Ebert

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. November 2021

Die Promovendin ist Ärztin

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Biologie des Knorpels	1
1.1.1	Entwicklung und Wachstum	1
1.1.2	Zusammensetzung und Funktion	2
1.1.3	Besonderheiten des Gelenkknorpels	4
1.2	Degenerative und traumatische Knorpeldefekte	8
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	8
1.2.2	Pathophysiologie	10
1.2.3	Einteilung	11
1.3	Therapeutische Ansätze in der klinischen Anwendung	12
1.3.1	Konservativ	12
1.3.2	Operativ	13
1.4	Tissue Engineering	16
1.4.1	Zellarten	17
1.4.2	Biomaterialien	18
1.4.3	Externe Stimuli	19
1.4.4	Bioprinting in der Medizin	20
1.4.5	Nachahmung der zonalen Organisation von Knorpel	21
1.5	Ziel der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Antikörper	27
2.1.5	Zellkulturmedien	28
2.1.6	Puffer und Lösungen	28

2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Isolation der Chondrozyten	29
2.2.2	Expansion.....	31
2.2.3	Herstellung der Hydrogele	32
2.2.4	Zellviabilitäts-Assay.....	34
2.2.5	Kryostatschnitte	35
2.2.6	Färbungen.....	36
2.2.7	Biochemische Analyse	38
2.2.8	Überblick über den Versuchsaufbau.....	40
2.2.9	Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Expansionsphase.....	42
3.1.1	Proliferationsrate	42
3.1.2	Zellvitalität.....	43
3.2	Zonale Subpopulationen in der Redifferenzierungsphase	44
3.2.1	Zellviabilität und -vitalität.....	44
3.2.2	DNA-Gehalt.....	45
3.2.3	Zellmorphologie	46
3.2.4	Matrixproduktion	47
3.3	Gemischte und zonale Gele in der Redifferenzierungsphase	54
3.3.1	Zellviabilität und -vitalität.....	54
3.3.2	DNA-Gehalt.....	55
3.3.3	Zellmorphologie	56
3.3.4	Matrixproduktion.....	57
3.4	Weitere Einflussfaktoren.....	60
3.4.1	Sauerstoffkonzentration in der Umgebung.....	61
3.4.2	Konfluenz in der Expansionsphase.....	66
3.4.3	Material des Hydrogels.....	71
3.4.4	Kryokonservierung der Zellen nach Collagenase-Verdau.....	77

4 Diskussion	83
4.1 Zonale Subpopulationen	84
4.2 Zonale Schichtung.....	89
4.3 Weitere Einflussfaktoren.....	91
4.4 Schlussfolgerung	94
5 Zusammenfassung	96
6 Literaturverzeichnis	97
Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
IV Danksagung	
V Lebenslauf	

1 EINLEITUNG

1.1 Biologie des Knorpels

Knorpel ist ein druckelastisches Gewebe, das an verschiedenen Stellen des menschlichen Körpers vorkommt. Es gibt drei verschiedene Arten von Knorpelgewebe, welche sich in der Zusammensetzung und Struktur ihrer Extrazellulärmatrix (EZM) unterscheiden. So sind die biomechanischen Eigenschaften den lokalen Anforderungen an das Gewebe angepasst [1]. Hyaliner Knorpel ist der häufigste Knorpeltyp im menschlichen Körper und findet sich unter anderem in den Atemwegen, den Wachstumsplatten und den Gelenken. Faserknorpel in Menisken und Zwischenwirbelscheiben enthält dicke Fibrillen aus Kollagen I, welche eine Zugfestigkeit des Gewebes bedingen. Elastischer Knorpel ist durch seine Netze aus elastischen Fasern nicht nur druck-, sondern auch biegeelastisch und kommt beispielsweise im äußeren Ohrknorpel vor [2]. In Bezug auf das Ziel dieser Arbeit konzentrieren sich die folgenden Abschnitte auf die Struktur und Eigenschaften von hyalinem Knorpel.

1.1.1 Entwicklung und Wachstum

Wie alle Binde- und Stützgewebe stammt Knorpel vom Mesoderm ab. Zunächst wandern undifferenzierte mesenchymale Zellen in die Extremitätenknospen ein. Dort proliferieren sie und kondensieren zur Knorpelanlage [3]. Signalwege, unter anderem über das Adhäsionsmolekül N-Cadherin, führen zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Die Zellen produzieren bereits in frühen Stadien EZM, zu Beginn vor allem Kollagen I und Fibronectin [4]. Die weitere Differenzierung der Zellen wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Sex determining region of Y - Box 9 (SOX9) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) reguliert [4]. Die Zellreifung über Progenitorzellen zu Chondroblasten und weiter zu Chondrozyten ist durch Akquirierung eines ausgedehnten endoplasmatischen Retikulums und die Vergrößerung und Konzentration des Golgi-Apparats gekennzeichnet. Diese Veränderungen stehen in direktem Zusammenhang zur Matrixsekretion [5]. Kollagen I und

Fibronektin werden durch spezifische Komponenten des hyalinen Knorpels wie Kollagen II und Aggrekan ersetzt [4], für die Homöostase und Erneuerung der EZM spielt Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β) eine bedeutende Rolle [6]. Durch kontinuierliche Ablagerung von EZM werden die Zellen weiter auseinander gedrängt, gemeinsam mit der Proliferation der Chondroblasten bedingt dies das interstitielle Wachstum des Knorpels [5]. Reife Chondrozyten haben nur ein begrenztes Potenzial zur Zellteilung [7]. Mit Ausnahme des Gelenkknorpels wird Knorpel von einer festen, bindegewebigen Haut, dem Perichondrium umgeben. Dieses besteht aus mehreren Schichten von aktiven Fibroblasten und undifferenzierten, fibroblastenähnlichen Zellen, die zur Chondrogenese fähig sind und so ein appositionelles Wachstum ermöglichen [8].

Während der Entwicklung der Gliedmaßen kommt es zunächst zur Bildung eines knorpeligen Skeletts und anschließend zur enchondralen Ossifikation der langen Röhrenknochen. Am Übergang von Knorpel zu Knochen hypertrophieren die Chondrozyten, lagern Calciumsalze in ihre Umgebung ein und gehen schlussendlich durch Apoptose unter [4]. Charakteristisch für diese kalzifizierende Hypertrophiezone ist die Expression von Kollagen X [4]. Blutgefäße wandern ein und verkalkter hypertropher Knorpel wird resorbiert und durch Knochen ersetzt. Der Knorpel an den Enden der gegenüberliegenden Knochen, den Gelenken, wird durch ruhende Chondrozyten gebildet [9].

1.1.2 Zusammensetzung und Funktion

Hyaliner Knorpel enthält im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben im menschlichen Körper weder Blutgefäße noch Nerven oder Lymphbahnen [10]. Seine einzigartigen biomechanischen Eigenschaften beruhen auf Wechselwirkungen zwischen der Matrix und den Chondrozyten, die das makromolekulare Gerüst des Knorpels bilden und stetig erneuern [11]. Die Belastung des Gewebes von außen erzeugt mechanische, elektrische und physikochemische Signale, die innerhalb der EZM weitergeleitet werden. Dies trägt dazu bei, die anabole und katabole Aktivität von Chondrozyten zu regulieren [12-14]. Chondrozyten sind der einzige Zelltyp, der in Knorpel vertreten ist. Dennoch nehmen sie nur einen kleinen Teil des Volumens

im Knorpel ein, im Mittel liegt die Zellvolumendichte bei 1-3 % [15]. Mehrere Chondrozyten und die ihnen direkt anliegende perizelluläre Matrix formen eine mechanische Einheit, ein Chondron [16]. Kollagen VI ist ein Schlüsselmolekül der perizellulären Matrix, welches die Chondrozyten in der EZM verankert und direkt mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagiert [17]. Die Chondrone sind von einer territorialen Matrix umgeben, die die Zellen mit einem korbartigen Geflecht aus dünnen Kollagenfibrillen vor mechanischen Belastungen schützt [10].

An die territoriale Matrix schließt sich die interterritoriale Matrix an, die den größten Anteil der EZM ausmacht und maßgeblich für die Viskoelastizität des Knorpels verantwortlich ist [10]. Die Hauptbestandteile sind Wasser (ca. 80 %), Proteoglykane (PRG) und Kollagene [18, 19]. Letztere sind eine heterogene Protein-Familie mit mindestens 27 Typen, von denen nur wenige im hyalinen Knorpel vorkommen, und machen in etwa zwei Drittel des Trockengewichts von Knorpel aus [20]. Im hyalinen Knorpel ist überwiegend (>90 %) Kollagen Typ II vertreten, das durch kovalente Quervernetzung seiner stabförmigen Moleküle zu Fibrillen aggregiert und damit dem Knorpel seine Zugfestigkeit und Steifheit verleiht [21]. Kollagen XI, ein weiteres fibrilläres Kollagen, bildet unter anderem den Kern der Typ II Fibrille und reguliert vermutlich deren Fibrillendurchmesser [22, 23]. Diese gemischten Fibrillen aus Kollagen II und XI sind kovalent an Kollagen IX gebunden, dessen abgewinkelter kurzer Arm in den perifibrillären Raum hineinragt und somit Bindungsstellen für andere Matrixmoleküle, beispielsweise PRG bereitstellt (Abb. 1.1) [24].

PRG machen etwa 10 % des Trockengewichts von Knorpel aus. Sie bestehen aus einem Kernprotein, an das eine variable Anzahl von sulfatierten Glykosaminoglykan (GAG) -Seitenketten kovalent gebunden ist. Neben kleineren PRG wie Decorin und Biglycan, die bei der Stabilisierung und Organisation von Kollagenfasern helfen und Wachstumsfaktoren binden, ist Aggrecan das häufigste und größte PRG in hyalinem Knorpel. Aggrecan ist kovalent mit über 100 Chondroitin- und Keratinsulfat-Ketten verbunden und darüber hinaus nichtkovalent über Linkprotein mit Hyaluronan (HA) zu riesigen Aggregaten von bis zu 1000 Aggrecan-Molekülen verknüpft [25, 26]. Durch das große Volumen der Aggregate sowie durch die vielen negativ geladenen Seitengruppen der GAG-Ketten, die mobile Kationen wie Na^+ und Ca^{2+} mit sich

führen, entsteht ein großer osmotischer Quelldruck, der Wasser in das Gewebe zieht. So kann Aggrekan das bis zu 50-fache seines Gewichts an Wasser aufnehmen, was allerdings durch die Zugfestigkeit des Kollagennetzwerks eingeschränkt wird [19, 27]. Wenn das Gewebe komprimiert wird, wird Wasser verdrängt, und die Konzentration an PRG steigt lokal an. Dies erzeugt ein erhöhtes Quellpotenzial, weswegen sich das Gewebe beim Entfernen der Druckbelastung durch Zurückziehen von Wasser wieder ausdehnt (Abb. 1.1) [13, 28]. Da die hohe PRG-Konzentration den Grad der Kompression des Knorpels begrenzt, kann sie außerdem dazu dienen, die Chondrozyten vor mechanischen Einflüssen zu schützen [29].

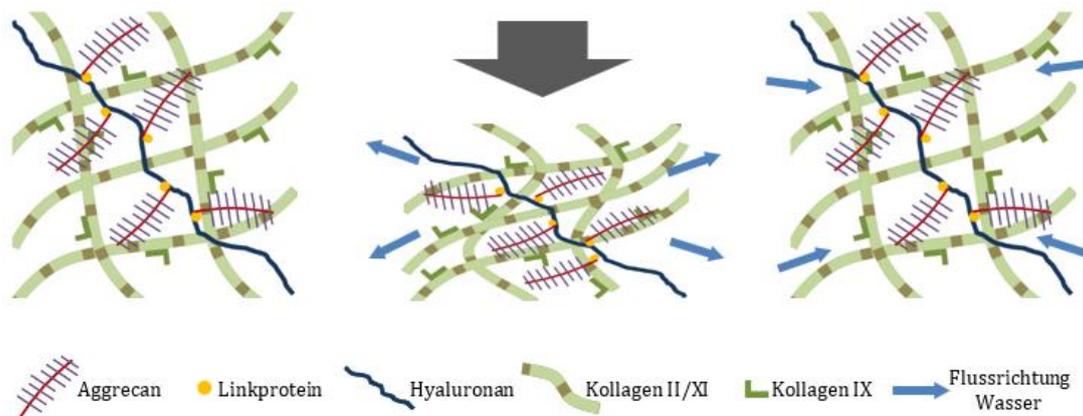


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der interterritorialen Extrazellulärmatrix in hyalinem Knorpel im Ruhezustand, unter Kompression und nach Beendigung der Kompression. Aggrekan-Moleküle sind durch Linkprotein nicht-kovalent an Hyaluronan geknüpft und bilden so große Aggregate. Fibrillen aus Kollagenen II und XI bilden ein zugfestes Netzwerk, an welches Kollagen IX angelagert ist. Links ist der Ruhezustand dargestellt. Bei Druck auf den Knorpel wird das EZM-Gerüst komprimiert und Wasser verdrängt. Fällt die Druckbelastung weg, wird Wasser durch den osmotischen Quelldruck der Aggrekan-Aggregate zurück ins Gewebe gezogen und es dehnt sich aus.

1.1.3 Besonderheiten des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel bedeckt und schützt die Knochenenden in Diarthrosen und fungiert als reibungsarme und belastbare Oberfläche für eine effiziente Gelenkartikulation. Der Reibungswiderstand zwischen den knorpeligen Gelenkflächen entspricht nur etwa einem Fünftel dessen von Eis auf Eis [30]. Außerdem muss Knorpel den großen Druck-, Scher- und Zugspannungen standhalten, die mit der Belastung und Gelenkbewegung während der Lebensdauer eines Individuums verbunden sind. Trotz seines beschränkten Regenerationspotenzials weist er dabei meist keine oder

nur geringe Zeichen von Beschädigung oder dauerhafter Verformung auf [10]. Diese einzigartigen Eigenschaften sind nicht zuletzt auf den zonalen Aufbau und die tiefenabhängig inhomogene Biomechanik zurückzuführen.

1.1.3.1 Zonaler Aufbau

Der nicht kalzifizierte Teil des Gelenkknorpels lässt sich in drei verschiedene Zonen aufteilen: eine oberflächliche (auch Tangentialfaserzone genannt), eine mittlere (auch Übergangszone genannt) und eine tiefe Schicht (auch Radiärzone genannt). Darunter folgt zunächst eine Schicht kalzifizierter Knorpel, der eine Verbindung zum subchondralen Knochen bildet. Der Übergang von nicht-kalzifiziertem zu kalzifiziertem Knorpel wird durch die Tidemark markiert (Abb. 1.2) [31]. Während diese dreischichtige Einteilung weit verbreitet ist, variiert die Definition der Schichthöhen jedoch je nach Autor, da die Übergänge fließend sind und die Grenzen nicht eindeutig festgelegt werden können. Die oberflächliche Schicht ist meist einheitlich als die obersten 10-20 % definiert. Teilweise wird die Übergangszone als die nächsten 10 % und die Radiärzone mit ca. 80 % als breiteste Zone definiert [15, 30, 32, 33]. In anderen Arbeiten ist die mittlere Zone mit 40-60 % der gesamten Knorpeldicke beschrieben und somit breiter als die darunter liegende tiefe Zone mit 30-40 % [10, 13, 23]. Die Eigenschaften, die den einzelnen Zonen zugeschrieben werden, sind wiederum sehr ähnlich.

In der oberflächlichen Zone ist die Zelldichte am höchsten, die Zellen sind klein, abgeflacht und die Chondrone bestehen aus einzelnen Zellen [15, 23]. Die Kollagenfibrillen sind zwar dünn im Durchmesser, aber dicht gepackt und tangential zur Knorpeloberfläche ausgerichtet. Dadurch werden punktuelle Druckbelastungen besser auf das benachbarte Gewebe umverteilt [34]. Außerdem korreliert die Kollagendichte stark mit der Widerstandsfähigkeit gegen Scherkräfte, die vor allem an der Knorpeloberfläche wirken [35]. Damit gleicht die oberflächliche Schicht einer kollagenen Membran mit einem relativ niedrigen PRG-Gehalt und einer geringen Durchlässigkeit für Flüssigkeiten und stellt so eine wichtige Barriere gegen den Flüssigkeitsfluss bei Kompression des Knorpels bereit (Abb. 1.2) [13].

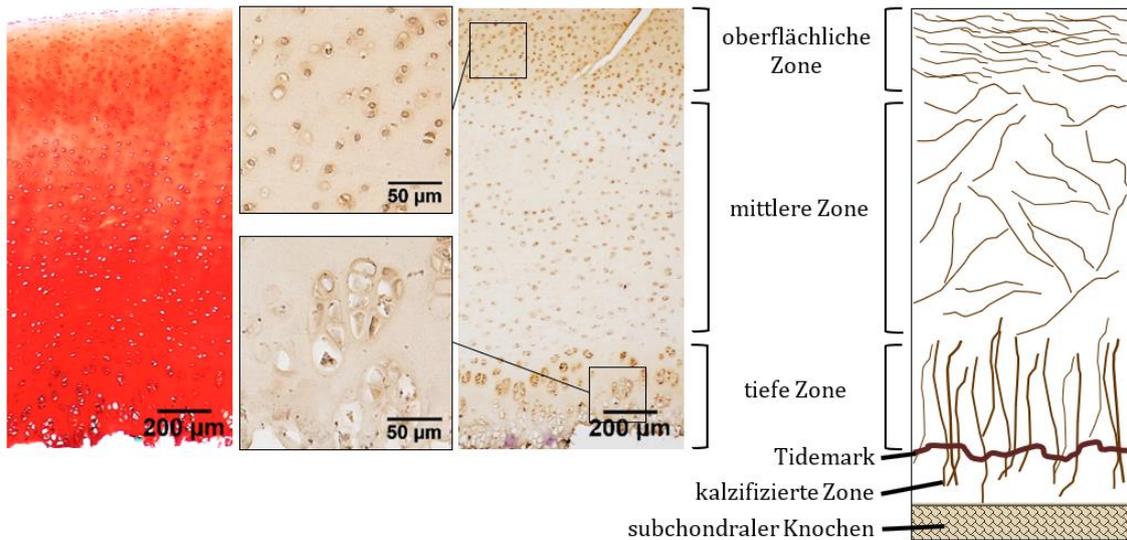


Abb. 1.2: Zonaler Aufbau des Gelenkknorpels mit longitudinalen Schnitten durch den Knorpel der Femurcondyle eines Schweins und schematischer Darstellung des Kollagenfaserungsverlaufs in den einzelnen Zonen. Links Darstellung des GAG-Gehalts in Safranin O-Färbung mit niedrigster Konzentration in der oberflächlichen Zone und höchster Konzentration in der tiefen Zone. Mittig immunhistochemische Färbung auf Kollagen II mit höchster Konzentration in der oberflächlichen Zone, außerdem Darstellung der unterschiedlichen Zellmorphologie in den einzelnen Zonen.

Je weiter man sich von der Knorpeloberfläche entfernt, desto geringer wird die Zellzahl. Dafür nehmen die Chondrozyten der tiefen Zone im Vergleich zu denen der oberflächlichen Zone das doppelte Volumen ein und sind bis zu zehnmal synthetisch aktiver [32]. In tieferen Schichten beinhalten die Chondrone jeweils fünf bis acht Chondrozyten, die säulenartig und senkrecht zur Oberfläche angeordnet sind [10, 15]. Der Kollagengehalt der EZM nimmt in der mittleren und tiefen Zone ab, jedoch nimmt der Durchmesser der Kollagenfibrillen zu. In der mittleren Zone sind die Fibrillen zufällig angeordnet und bieten einen Übergang zur tiefen Zone, in der sie senkrecht zur Gelenkfläche ausgerichtet sind [33]. Die Kollagenfibrillen der tiefen Zone scheinen miteinander zu größeren Bündeln verflochten zu sein und ziehen durch die Tidemark in den kalzifizierten Knochen, um eine starke Verankerung des Gewebes in den subchondralen Knochen zu gewährleisten [12, 23]. In der tiefen Zone besitzt der Knorpel die höchste Widerstandskraft gegenüber Kompressionskräften, was nicht nur auf die stärkeren Kollagenfibrillen, sondern maßgeblich auf den höheren PRG-Gehalt und niedrigeren Wassergehalt der tieferen Zonen zurückzuführen ist [10, 36]. Dadurch ist die Ladungsdichte, also die Anzahl der festen negativen

Ladungen geteilt durch den Gehalt an freiem Wasser, in der tiefen Zone am höchsten und das Gewebe komprimiert sich weniger bei Druckbelastung (Abb. 1.2) [34, 37].

1.1.3.2 Ernährung und Regeneration

Wie bereits erwähnt, ist Gelenkknorpel nicht vaskularisiert, daher muss die Versorgung der Chondrozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion aus umgebenden Quellen erfolgen. Im unreifen Knorpel stammen diese Nährstoffe vor allem aus Blutgefäßen im subchondralen Knochen, die teilweise bis in die untersten Schichten des Knorpels reichen [38]. Im reifen Knorpel scheint dieser Weg der Versorgung eine untergeordnete Rolle zu spielen [39, 40]. Der Großteil der Nährstoffe gelangt dann über die Synovialflüssigkeit, die den Gelenkspalt von Diarthrosen ausfüllt, in den Knorpel [39]. Dabei unterstützt der Wasserfluss während des Druckzyklus den Nährstofffluss von der Synovialflüssigkeit zu den Chondrozyten, was sich in der nachteiligen Auswirkung einer langfristigen Immobilisierung von Gelenken zeigt [29, 30].

Da auch Sauerstoff hauptsächlich über die Synovialflüssigkeit zu den Zellen diffundiert, entsteht ein Konzentrationsgradient von der oberflächlichen zur tiefen Zone. Die Sauerstoffkonzentration im Knorpel hängt vor allem von der Sauerstoffkonzentration in der Synovialflüssigkeit ab, aber auch von der Dicke der gesamten Knorpelschicht, der Zelldichte sowie des zellulären Sauerstoffverbrauchs und liegt meist zwischen 1-6 % [41, 42]. Aufgrund des limitierten Angebots an Sauerstoff basiert die Energiegewinnung von Chondrozyten vor allem auf Glykolyse unter anaeroben Bedingungen. Obwohl die Zellen dadurch sogar mehrere Tage ohne Sauerstoff überleben können, hemmen niedrige O_2 -Werte signifikant den Metabolismus der Chondrozyten und verändern die Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies, die als intrazelluläre Signalmoleküle wirken [41, 42]. Auf der anderen Seite führen die physiologisch hypoxischen Bedingungen zu einer vermehrten Verfügbarkeit von Hypoxie-induziertem Faktor 1 α (HIF1 α), welcher ebenfalls eine Schlüsselfunktion bei der Steuerung der Energieerzeugung, des Zellüberlebens und der Matrixsynthese erfüllt [43]. Der O_2 -Spiegel ist somit ein sensibles Gleichgewicht, und Verschiebungen in beide

Richtungen können negative Auswirkungen auf die Regenerationsfähigkeit von Knorpel haben.

Schon vor fast 300 Jahren war bekannt, dass das Regenerationspotenzial von Knorpel begrenzt ist [44]. Chondrozyten sind über ihre Synthesefähigkeit und eine Reihe von abbauenden Enzymen für die Entwicklung, Wartung und Reparatur der EZM verantwortlich. Während des gesamten Lebens wird der Gelenkknorpel zwar stetig, aber sehr langsam umgestaltet. Der PRG-Umsatz kann bis zu 25 Jahre dauern, während die Halbwertszeit von Kollagen auf mehrere Jahrzehnte bis zu 400 Jahren geschätzt wird [10]. Gemeinsam mit der Tatsache, dass reife Chondrozyten nicht zur Zellteilung fähig sind, erklärt dies, warum Defekte, die durch Traumata entstehen, nicht adäquat repariert werden können. Im Alter verringert sich zudem die Fähigkeit von Chondrozyten, den Gelenkknorpel zu erhalten und wiederherzustellen und es kommt zu einer veränderten Biomechanik, was wiederum das Risiko einer Degeneration der Gelenkknorpeloberfläche erhöht. Die fortschreitende Degeneration des Gelenkknorpels führt zu Schmerzen und Funktionsstörungen, die sich klinisch als Arthrose manifestieren [14].

1.2 Degenerative und traumatische Knorpeldefekte

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung und eine der führenden Ursachen für Behinderung sowohl in Deutschland als auch weltweit [45-48]. Grundsätzlich kann jedes Gelenk betroffen sein, am häufigsten sind jedoch Arthrosen in Knie, Hüfte und Finger. Die Angaben zur Prävalenz, die auf epidemiologischen Studien basieren, variieren zum Teil erheblich in Abhängigkeit der Definition von Arthrose, der untersuchten Population und der Erhebungsmethode. Es wird geschätzt, dass weltweit etwa 300 Millionen Menschen unter arthrotischen Veränderungen eines oder mehrerer Gelenke leiden [49]. In einer Studie des Robert Koch-Instituts von 2014 bis 2015 berichten 17,9 % der Erwachsenen ab 18 Jahren das Vorliegen einer Arthrose in den letzten 12 Monaten, wobei die Prävalenz bei Frauen mit 21,8 % höher liegt als bei Männern mit 13,9 %. In der Gruppe der über 65-Jährigen sind etwa die Hälfte

der Frauen und ein Drittel der Männer betroffen [46, 50]. Da diese Zahlen nur die Patienten widerspiegeln, die aufgrund von Beschwerden einen Arzt aufgesucht haben, ist anzunehmen, dass die tatsächliche Prävalenz der Erkrankung noch höher liegt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass bei mehr als 50 % aller durchgeführten Kniearthroskopien Gelenkknorpeldefekte festgestellt werden können, die häufig asymptomatisch sind [51, 52]. In den letzten Jahrzehnten nahm die Prävalenz der Arthrose merklich zu, und es wird in den nächsten Jahren mit einem weiteren deutlichen Anstieg gerechnet, nicht zuletzt durch den demographischen Wandel bedingt [46, 48, 50].

Neben den negativen Auswirkungen auf die Patienten, die sich vor allem in Schmerzen und Einschränkung der Alltagsfähigkeit äußern, stellt die Arthrose auch eine wirtschaftliche Belastung dar [46, 47]. Zusätzlich zu den direkten Kosten für ambulante und stationäre Behandlung sowie Rehabilitationsmaßnahmen fällt auch eine erhebliche Summe an indirekten Kosten an, die beispielsweise durch Arbeitsunfähigkeit entstehen. 2011 entfielen knapp 3,4 % aller Frühberentungen auf die Erstdiagnose einer Arthrose [50]. Insgesamt werden die Kosten in Zusammenhang mit Arthrose in Industrieländern auf 1-2,5 % des Bruttoinlandprodukts geschätzt [48].

In Anbetracht dieser Daten verwundert es nicht, dass zahlreiche Studien sich mit der Ätiologie dieser Gelenkerkrankung beschäftigen. Viele Risikofaktoren für die Entstehung von degenerativen Knorpelschäden wurden bereits identifiziert, allen voran Alter, weibliches Geschlecht und genetische Prädisposition [46-48]. Weitere Risikofaktoren haben in den einzelnen Gelenken ungleichen Einfluss. Schon seit den achtziger Jahren ist bekannt, dass sich Übergewicht besonders negativ auf die Entwicklung einer Gonarthrose auswirkt [53]. Koxarthrosen sind zu einem erheblichen Anteil auf angeborene Hüftdysplasien und kindliche Erkrankungen wie dem Morbus Perthes und der Epiphyseolysis capitis femoris zurückzuführen, die eine gestörte Gelenkmorphologie mit konsekutiver Fehlbelastung bedingen [53]. Im Sprunggelenk ist der häufigste auslösende Faktor für die Entwicklung einer Arthrose ein akutes Trauma, einschließlich Operationen [48]. Ob übermäßige sportliche Aktivität zu einer Arthrose führt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Jedoch wirkt sich

nach aktueller Datenlage beides ungünstig auf das Fortschreiten der Erkrankung bei bereits geschädigtem Knorpel aus [18, 47].

1.2.2 Pathophysiologie

Arthrose zeichnet sich auf molekularer Ebene durch einen Verlust der Homöostase im Knorpel aus und entsteht, wenn die Synthesekapazität von Chondrozyten durch Prozesse überfordert wird, die den Matrixabbau fördern. Dazu gehören abnormale mechanische Belastung und entzündungsfördernde Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α [54, 55]. Viele dieser Faktoren regen Chondrozyten dazu an, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, welche über intrazelluläre Signalwege die Expression von matrixabbauenden Enzymen hochregulieren. Übermäßige Werte dieser reaktiven Sauerstoffspezies verursachen nicht nur oxidative Zellschäden, sondern insbesondere auch eine Störung der Signalwege der Zellen [55]. In der Folge kommt es zu einer Degradierung der EZM. Der Gehalt an Aggrecan nimmt ab, jedoch kommt es kontraintuitiv zu einem erhöhten Wassergehalt der Matrix [19, 56]. Die zunehmende Schwellung und somit Aufweichung des arthrotischen Knorpels hängt stark mit dem Abbau des Kollagengerüsts zusammen [57]. Durch Proteolyse des perifibrillären Adapterproteins Kollagen IX verliert das Kollagenetzwerk an Stabilität [21, 24]. Zusätzlich kommt es zu einer direkten Denaturierung von Kollagen II [58]. Chondrozyten versuchen, die beschädigte Matrix durch Steigerung ihrer anabolen Aktivität zu reparieren, insbesondere die Kollagen II-Expression wird hochreguliert [56]. Da diese stimulierten Chondrozyten auch Kollagen X sezernieren, wird vermutet, dass eine Differenzierung zu hypertrophen Zellen resultiert, die nicht mehr in der Lage sind, eine funktionelle Knorpelmatrix zu synthetisieren [59, 60].

Die oberflächliche Zone des Knorpels weist als Erste Schäden auf, die als Frühzeichen von Knorpeldegeneration gewertet werden können [34, 56]. Das dichte Kollagenetzwerk lichtet sich und die Oberfläche des Knorpels raut sich auf. Da die oberflächliche Zone vor allem für die Lastenverteilung über eine größere Knorpelfläche wichtig ist, erhöhen sich bei ihrer Degeneration Spitzenspannungen, die in tieferen Zonen und im Knochen erreicht werden [34]. So kommt es zum verstärkten

Verschleiß der verbleibenden Knorpelareale und des subchondralen Knochens [30]. Die betroffenen Knochenzellen setzen als Antwort auf die erhöhte Belastung wiederum Zytokine frei, die in einem Circulus vitiosus zum fortschreitenden Knochenumbau und Knorpelabbau beitragen [61].

1.2.3 Einteilung

Arthrose ist keine einheitliche Entität, sondern vielmehr eine heterogene Erkrankung mit komplexer Pathologie. Sie kann anhand verschiedener Kriterien eingeteilt werden, beispielsweise nach den betroffenen Gelenken, der Ätiologie (traumatisch oder degenerativ) und dem Ausmaß des Knorpelschadens. Um letzteres zu quantifizieren, wurde bereits in den sechziger Jahren die Outerbridge-Klassifikation entwickelt, die das makroskopische Erscheinungsbild des Knorpels in der Arthroskopie beschreibt [62]. Später wurde dieses Bewertungssystem von der International Cartilage Repair Society (ICRS) überarbeitet und genauer spezifiziert (Tabelle 1.1). Weitere Scoring-Systeme basieren auf klinischer Präsentation, Bildgebung durch klassisches Röntgen oder Magnetresonanztomographie, histologischer Aufarbeitung des Gewebes [63-65] oder einer Kombination mehrerer Kriterien [66]. Neuere Studien beschäftigen sich intensiv mit der Anwendung von Ultraschallbiomikroskopie, mit der sich auch frühe Stadien der Degeneration detektieren lassen [65, 67].

Tabelle 1.1: Vereinfachte ICRS-Klassifikation von Gelenkknorpeldefekten basierend auf der Outerbridge-Klassifikation. Modifiziert von ICRS und [64].

ICRS-Grad	Beschreibung
0	Normaler Knorpel
1	Oberflächliche Fissuren/Risse, leichte Erweichung
2	Läsionen < 50 % der Knorpeltiefe
3	Läsionen > 50 % der Knorpeltiefe
4	Defekte bis in den subchondralen Knochen

In den letzten Jahren wurde zunehmend Fokus auf verschiedene Phänotypen der Arthrose gerichtet, in die unter anderem Attribute wie biomechanische Aspekte,

betroffenes Gewebe neben dem Knorpel, Komorbiditäten und klinische Präsentation einfließen. Durch Berücksichtigung dieser Profile verspricht man sich eine individuelle und gezielte Gesundheitsversorgung und somit bessere Therapieergebnisse [47, 68].

1.3 Therapeutische Ansätze in der klinischen Anwendung

Nach heutigem Kenntnisstand ist die Arthrose nicht heilbar. Daher fokussieren sich die Therapieziele auf Schmerzreduktion, Erhalt der Funktionsfähigkeit und ein möglichst langsames Fortschreiten der Gelenkdegeneration [45, 69]. Es stehen eine Reihe an konservativen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Führen diese nicht zum gewünschten Erfolg oder schreitet die Erkrankung weiter fort, muss zusätzlich auf eine operative Therapie zurückgegriffen werden. Welches Therapieregime bei einem Patienten angewandt wird, richtet sich unter anderem nach dessen Alter und Allgemeinzustand, den individuellen Ansprüchen an die körperliche Leistungsfähigkeit, den gelenkspezifischen Risikofaktoren und den relevanten Komorbiditäten [50].

Da die Therapieerfolge der Arthrose limitiert sind, sollten auch vermehrt Maßnahmen zur primären und tertiären Prävention ergriffen werden [69]. Dies beinhaltet zum Beispiel eine Verringerung der Risikofaktoren, damit weniger Menschen erkranken sowie Rehabilitationsmaßnahmen und Rezidivprophylaxe. Eine sekundäre Prävention, also ein Screening zur Früherkennung und rechtzeitigen Behandlung der Arthrose, hat sich im klinischen Alltag noch nicht etabliert.

1.3.1 Konservativ

Konservative Maßnahmen kombinieren meist medikamentöse und nichtmedikamentöse Therapieoptionen. Aufklärung und Beratung hinsichtlich Verhaltensänderungen wie Gewichtsreduktion und Aufnahme gelenkschonender Aktivitäten im Alltag bilden die Grundlage jeder erfolgreichen Behandlung. Hierbei kann auf Physiotherapie und orthopädische Hilfsmittel zurückgegriffen werden [50, 70]. Als weitere nichtmedikamentöse Behandlungsmöglichkeiten werden Akupunktur,

Nahrungsergänzungsmittel und Ozontherapie zur Reduktion von proinflammatorischen reaktiven Sauerstoffspezies angeboten, jedoch konnte bei den meisten dieser Anwendungen bisher keine signifikante Wirksamkeit nachgewiesen werden [69, 71, 72].

Die medikamentöse Therapie umfasst vor allem schmerzreduzierende Mittel und orientiert sich am Stufenschema der Weltgesundheitsorganisation WHO. Die am häufigsten eingesetzte Substanzgruppe sind nichtsteroidale Antiphlogistika, da sie zusätzlich eine entzündungshemmende Wirkung haben. Bei stärkeren Schmerzen empfehlen die Leitlinien den Einsatz von Opioidanalgetika und die intraartikuläre Gabe von Glukokortikoiden zur Therapieeskalation [49, 70]. Insgesamt steigt die Anzahl an Verschreibungen von Schmerzmitteln in Zusammenhang mit arthrotischen Beschwerden seit Jahren kontinuierlich an [45]. Diesem Trend sollte entgegen gewirkt werden, da diese Medikamente lediglich eine Symptomlinderung herbeiführen können und zudem ein weitreichendes Nebenwirkungspotenzial aufweisen. Daher konzentriert sich die Forschung aktuell auf neue Therapeutika, die gezielt die Knorpeldegeneration hemmen sollen. Dazu gehören unter anderem verschiedene Hormone und Immunsuppressiva, jedoch ist die Studienlage zur Wirksamkeit bislang unsicher [49, 70].

1.3.2 Operativ

Auch operativ stehen viele Therapieoptionen zur Verfügung. Die Wahl des chirurgischen Vorgehens richtet sich insbesondere nach der Größe und Tiefe des Defekts sowie möglichen Pathologien der angrenzenden Strukturen. Als Faustregel gilt, dass ein Defekt ab ICRS-Grad III-IV eine Operationsindikation darstellt [51]. Patienten mit kleinen, isolierten Knorpeldefekten können bereits von einer Spülung (Lavage), Entfernung von abgescherten Knorpelteilen (Shaving) und mechanischen Knorpelglättung (Debridement) profitieren, auch wenn dies lediglich eine symptomatische Therapie darstellt und meist nur eine kurzfristige Verbesserung herbeiführt [51, 73]. Bei den knochenmarkstimulierenden Techniken wie der Pridie-Bohrung, der Mikrofrakturierung und der Abrasionsplastik wird der subchondrale Knochen mehrmals penetriert. In die so gebildeten Defekte können pluripotente Stammzellen

aus dem Knochenmark einwandern und den Defekt mit neuem Knorpelgewebe auffüllen [73]. Dieses Narbengewebe enthält jedoch meist einen hohen Anteil an Kollagen I und besitzt minderwertige biomechanische Eigenschaften, weshalb es im Verlauf erneut zu einer Degeneration des betroffenen Areals kommen kann [30, 74, 75].

Ebenso können Knorpeldefekte durch Transplantation von autologen oder allogenen chondrogenen Materialien saniert werden. Die alleinige Deckung des Knorpel-schadens mit einem Periostlappen wurde vor über 30 Jahren entwickelt und erzielte zunächst vielversprechende Ergebnisse [73]. Aufgrund hoher Revisionsraten wegen Hypertrophie und Kalzifizierung des Transplantats hat diese Methode heute kaum noch klinische Relevanz [76, 77]. Bei der autologen osteochondralen Transplantation werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus wenig belasteten, gesunden Gelenkbe-reichen ausgestanzt und mosaikartig in den Defekt eingesetzt, was bei etwa 70-100 % der Patienten kurz- bis mittelfristig zu signifikanter Schmerzreduktion und verbesserter Funktion führt [30, 73]. Die limitierenden Faktoren dieser Behandlung sind vor allem eine folgende Inkongruenz der Gelenkflächen bei zu großen Trans-plantaten sowie die begrenzte Verfügbarkeit von Spendermaterial, sodass sie vor allem bei kleinen Defekten unter 4 cm² empfohlen wird [50, 77, 78]. Größere De-fekte können erfolgreich mit allogenen osteochondralen Material gefüllt werden, jedoch birgt dies ein höheres Abstoßungs- und Infektionsrisiko, außerdem ist die Überlebensrate der konservierten Chondrozyten in diesen Allografts vermindert [30, 73].

Die klinische Anwendung der autologen Chondrozytenimplantation (ACI) rückte 1994 nach einer Veröffentlichung von Brittberg et al. in den Fokus des öffentlichen Interesses [79] und wird seitdem stetig weiterentwickelt. Bei der klassischen ACI werden Chondrozyten aus minderbelasteten Gelenkarealen isoliert, für wenige Wo-chen *in vitro* proliferiert und in einer zweiten Operation als Zellsuspension unter einen aufgenähten Periostlappen in die Knorpelverletzung injiziert [77, 79]. Die Komplikationen einer möglichen Hypertrophie des Periostlappens und intraartiku-lärer Adhäsionen werden durch den Einsatz einer Kollagenmembran zur Abde-ckung des präparierten Defektbereichs reduziert [80, 81]. Bei der Matrix-

assoziierten ACI werden Trägermaterialien aus Kollagen I und III mit Knorpelzellen besiedelt. Statt mittels einer aufwendigen Naht wird das Präparat mittels Fibrinkleber in der Läsion befestigt. So kann der Eingriff auch in schwer zugänglichen Bereichen des Gelenks meist minimalinvasiv und mit kürzerer Operationsdauer durchgeführt werden [77, 80, 81]. In ca. 75 % der Fälle kann nach mehreren Jahren hyalinartiges Regenerationsgewebe nachgewiesen werden [73, 75]. Ob die höheren Kosten und die lange Genesungszeit von 6-12 Monaten nach einer ACI durch ein besseres Resultat gerechtfertigt sind, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Während manche Vergleichsstudien zwischen ACI und Mikrofrakturierung gleichwertige Ergebnisse im klinischen und radiologischen Outcome beschreiben [52, 82, 83], legen andere Studien einen signifikanten Vorteil der ACI gegenüber der Mikrofrakturierung besonders in größeren Defekten und im langfristigen Verlauf nahe [77, 80, 81]. Grundsätzlich sollten die oben genannten operativen Therapieoptionen mit einer Korrektur von begleitenden mechanischen Anomalien wie Bandinstabilität, Meniskuläsionen oder Beinachsenfehlstellungen kombiniert werden. So sollen möglichst physiologische Druckverhältnisse im Gelenk wiederhergestellt werden, die die Regeneration des Defekts positiv beeinflussen [30, 77, 78]. Ebenso wichtig ist eine gute Nachsorge. Es wurde gezeigt, dass kontinuierliche passive Mobilisierung für mehrere Wochen nach der Operation sowohl die Gefahr der postoperativen Bewegungseinschränkung reduziert als auch die Bildung von hyalinartigem Knorpel im Regenerationsgewebe fördert [30, 84].

Im Endstadium der Arthrose kann eine gelenkersetzende Operation notwendig werden. Diese Therapieoption ist vor allem älteren Patienten vorbehalten, da Endprothesen eine eingeschränkte Haltbarkeit aufweisen und sich im Laufe der Zeit lockern können, wobei ein Prothesenaustausch hohe Komplikationsraten und geringe Erfolgsaussichten mit sich bringt [49, 50, 73]. Als Ultima Ratio kann eine Arthrodesese, also eine Gelenkversteifung in Betracht gezogen werden, die jedoch mit starken Einbußen der Lebensqualität einhergeht.

1.4 Tissue Engineering

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse in der Transplantation von autologem oder allogenen Gewebe zur Gelenkflächenwiederherstellung weisen die oben beschriebenen, aktuell in der klinischen Anwendung befindlichen Techniken immer noch Einschränkungen in der Größe des behandelbaren Defekts und Komplikationen wie Transplantatinstabilität oder Verkalkung auf. Insbesondere ist es noch nicht gelungen, mit hohen Erfolgsraten hochwertigen hyalinen Knorpel zu regenerieren, weshalb die aktuellen Therapieoptionen nur ein Fortschreiten der Degeneration um einige Jahre hinauszögern, die Erkrankung jedoch nicht aufhalten oder heilen können [85]. Die genannten Probleme führten zur Entwicklung neuer Therapiestrategien im Bereich des Tissue Engineering (TE). Diese Disziplin basiert auf einer Kombination von Zellen, Biomaterialien und externen Stimuli, die auch als Trias des TE bezeichnet wird, um *in vitro* Knorpel zu züchten, der für die Gewebereparatur geeignet ist (Abb. 1.3) [86].

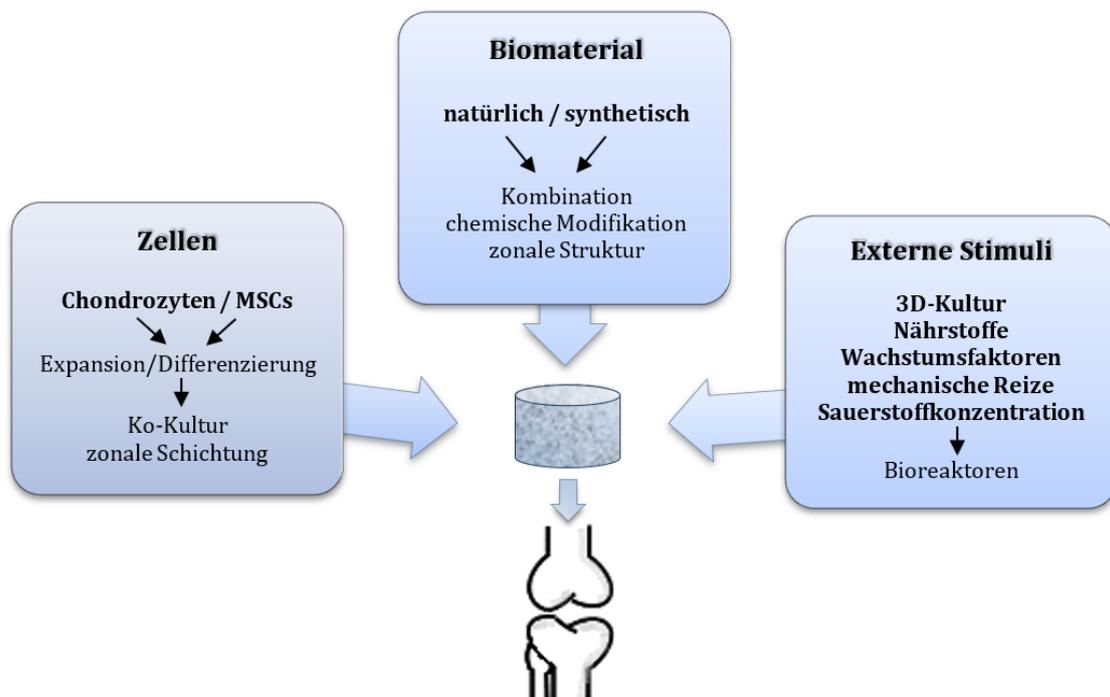


Abb. 1.3: Trias des Tissue Engineering zur Reparatur von Gelenkknorpel. Durch die Kombination aus chondrogenen Zellen, Biomaterialien aus natürlichen oder synthetischen Polymeren und verschiedenen externen Stimuli sollen *in vitro* Knorpelkonstrukte gezüchtet werden, die in die Gelenkknorpeldefekte des Patienten transplantiert werden können.

1.4.1 Zellarten

Die Zellarten, die zur Chondrogenese fähig sind und damit für TE von Gelenkknorpel geeignet sind, sind begrenzt. Als einzige in der klinischen Anwendung sind Ansätze mit autologen Chondrozyten [75]. Sie werden aus einer Biopsie von gesundem Gelenkknorpel isoliert und zeigen in dreidimensionaler (3D-) Zellkultur eine gut erhaltene Zellmorphologie und Produktion von EZM-Bestandteilen [87-89]. Um die Komplikation einer arthrotischen Veränderung an der Spenderstelle zu umgehen, kann auch der hyaline Knorpel des Nasenseptums, der zudem in einem minimalinvasiven Eingriff erreichbar ist, als Quelle für die Chondrozyten dienen [86]. Ein entscheidender Nachteil bei der Verwendung autologer Chondrozyten ist jedoch ihre begrenzte Verfügbarkeit. Um ausreichend Zellmaterial zu gewinnen, werden die frisch isolierten Chondrozyten zunächst meist in einer Monoschichtkultur expandiert. Die Instabilität ihres Phänotyps führt dabei allerdings zu einer Dedifferenzierung zu fibroblastenähnlichen Zellen. Dieser Vorgang ist nach Kultivierung in einem 3D-Modell zumindest teilweise reversibel [86, 90].

Auf der Suche nach alternativen Zelltypen zur Knorpelzüchtung beschäftigt sich die Wissenschaft mit Stammzellen. Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden in der regenerativen Medizin häufig eingesetzt. Sie können aus vielen Gewebearten wie beispielsweise Knochenmark, Fettgewebe und der Synovialmembran gewonnen werden und bis zu 40 Generationen ohne Differenzierung proliferieren [86, 91]. Durch verschiedene äußere Stimuli können sie in unterschiedliche Bindegewebe, darunter Knorpel und Knochen, differenzieren und sind daher auch für die Versorgung osteochondraler Defekte geeignet. Auf der anderen Seite tendieren sie zu Hypertrophie und Kalzifizierung und bergen ein gewisses, wenn auch geringes Entartungsrisiko [75, 92]. Aktuell werden Ko-Kulturen von MSC und Chondrozyten untersucht, da so die chondrogene Differenzierung der MSC gefördert wird und auf eine Expansion der Chondrozyten verzichtet werden kann [92, 93].

Neue Ansätze mit chondrogenen Progenitorzellen [94-96] und humanen induzierten pluripotenten Stammzellen [75, 86] ergeben bisher erfolgversprechende Resultate, eine fundierte Datenlage liegt jedoch noch nicht vor.

1.4.2 Biomaterialien

Die Grundvoraussetzungen eines Materials, das in den menschlichen Körper implantiert werden soll, ist Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit. Speziell für das TE von Gelenkknorpel muss es mechanischen Belastungen standhalten und eine Permeabilität für Nährstoffe und andere Botenstoffe aufweisen. Hydrogele werden oft favorisiert, da sie einen ähnlichen Wassergehalt wie natürliches Knorpelgewebe haben und eine gute Zellverteilung innerhalb der Matrix ermöglichen. In einer Reihe von Hydrogelen basierend auf natürlichen und synthetischen Polymeren konnte bereits eine Chondrogenese nachgewiesen werden, trotzdem wurden nur wenige erfolgreich in die Klinik überführt [86]. Natürliche Biomaterialien, bestehend aus Proteinen wie Kollagen [87] bzw. Polysacchariden wie Agarose [97] oder HA [98], sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Sie können die chondrogene Differenzierung von MSC sowie die Bildung von Knorpelgewebe *in vitro* fördern, zusätzlich kommt Agarose den viskoelastischen Eigenschaften des Knorpelgewebes nahe [91]. Insgesamt haben natürliche Biomaterialien den Vorteil, dass sie keine oder nur eine geringe Immunantwort auslösen und mit wenigen Ausnahmen eine gute Zelladhäsion zulassen. Nachteilig ist dagegen, dass eine vorzeitige Resorption zu Form- und Größenverlust führen kann und dass sie meist nur geringen mechanischen Belastungen standhalten [86, 93]. Eine chemische Modifizierung der Polymere durch Bindung verschiedener Substrate an ihre funktionellen Seitengruppen kann die Zellaffinität und die mechanischen Eigenschaften verbessern [91]. Dieses Prinzip nutzt man auch bei synthetischen Polymeren wie beispielsweise Polyethylenglycol. Hydrogele aus diesen synthetischen Materialien können standardisiert hergestellt werden und in ihren biomechanischen und chemischen Eigenschaften je nach Bedarf angepasst werden, sie erlauben allerdings keine ausreichende Zell-Matrix-Wechselwirkung [91, 99].

Aktuelle Studien tendieren dazu, natürliche und synthetische Biomaterialien zu kombinieren, um die jeweiligen Vorteile zu nutzen [100]. Ein vielversprechendes Material ist beispielsweise eine Kombination aus HA und Polyglycidol (PG), da beide Moleküle viele modifizierbare funktionelle Seitengruppen aufweisen [94, 99, 101].

1.4.3 Externe Stimuli

In der Entwicklung und während der gesamten Lebenszeit von nativem Gelenkknorpel wirken verschiedene biologische und umweltbedingte Einflüsse auf die Chondrozyten. Im TE versucht man, diese physiologischen Zustände zu imitieren und so die chondrogene Geweberegeneration zu fördern. Manche Ansätze, wie die Kultivierung der Zellen in einem 3D-Modell und die Sicherstellung einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen wurden bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt. Die Bandbreite an untersuchten Einflussfaktoren, gerade unter den biologischen Signalstoffen, ist enorm [102]. Daher sollen im Folgenden nur einige erläutert werden.

Wachstumsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Differenzierung aller Zellen des menschlichen Körpers. Im TE von Knorpel gehören Mitglieder der TGF- β -Familie definitiv zu den häufigsten eingesetzten Substanzen [93]. Es ist bewiesen, dass sie die chondrogene Differenzierung von MSC unterstützen und den Phänotyp von Chondrozyten und differenzierten MSC aufrechterhalten [91, 102]. Alternativ oder in Kombination können weitere chondrogene Signalmoleküle wie FGF eingesetzt werden [93]. Die Möglichkeiten, wie die Wachstumsfaktoren bereitgestellt werden, sind vielfältig. Neben der Zugabe einer freien Form in das Nährmedium [103] ist auch ein kovalenter Einbau in das Hydrogel möglich, wodurch die Reaktion der Zellen sogar verbessert werden kann [101]. Durch Gentransfer mittels viraler Vektoren kann die Expression von Wachstumsfaktoren durch die Zellen selbst erzielt werden. Außerdem kann man sich mit dieser Methode auch Transkriptionsfaktoren wie SOX9, den Hauptregulator der embryonalen Chondrogenese, zu Nutze machen [104].

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.2 beschrieben, trägt auch die physiologisch hypoxische Umgebung der Chondrozyten über den Signalweg mittels HIF1 α zur Steuerung der Zellmorphologie und Genexpression von Matrixmolekülen bei. Einige Studien konnten bereits nachweisen, dass humane Chondrozyten oder Vorläuferzellen, die hypoxischen (1-5 % Sauerstoff) Bedingungen ausgesetzt waren, mehr Kollagen II

bzw. weniger Kollagene I und X synthetisieren als ihre Vergleichsgruppen mit 20-21 % Sauerstoff in der Umgebung [89, 95].

Reife Chondrozyten im Gelenkknorpel sind ständig Druck- und Scherkräften ausgesetzt, auch die Knorpelentwicklung wird von diesen mechanischen Reizen beeinflusst. In Anbetracht dieser Tatsache wurde die Rolle mechanischer Stimuli bei der *in vitro*-Züchtung von Knorpel erwogen und bereits einige mechanosensitive Gene identifiziert [86, 93]. Mechanische Konditionierung kann ähnliche Effekte auf die Produktion von Kollagen II und GAG haben wie die Supplementierung von TGF β und zur Ausbildung von oberflächlichen Zonenmerkmalen im gezüchteten Knorpel führen [88, 103].

Um diese vielfältigen äußeren Einflüsse zu jedem Zeitpunkt der Zellkultur zu kontrollieren, hat der Einsatz von Bioreaktoren Einzug in das Feld des TE gehalten. Bioreaktoren eröffnen die Möglichkeit, Kulturbedingungen zu standardisieren, indem sie die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Temperatur, den pH-Wert überwachen und steuern [93]. Außerdem können Bioreaktoren so konzipiert werden, dass die Konstrukte einer kontinuierlichen oder intermittierenden Druckverformung bzw. hydrodynamischen Strömung ausgesetzt sind und so die *in vivo*-Biomechanik eines Gelenks nachahmen [88].

1.4.4 Bioprinting in der Medizin

Bioprinting gilt als zukunftssträchtige fortschrittliche Fertigungstechnologie, mit der organisierte 3D-Gewebekonstrukte mit komplexen Formen und exakt definierter Struktur erzeugt werden können. Zellen, Biomaterial und biologische Signalstoffe wie Wachstumsfaktoren können präzise und getrennt steuerbar platziert werden [85, 91]. Hydrogele eignen sich gut als Biotinte, da ihr hoher Wassergehalt eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zulässt. Um mechanische Stabilität zu gewährleisten, kann zusätzlich ein Gerüst aus einem starken, thermoplastischen Polymer in das Konstrukt integriert werden [99, 105]. Zellen können bereits vor dem Druck zur Biotinte gegeben werden und weisen nach dem Druckvorgang eine gute Viabilität für die Dauer der Kultur auf, wenn der Durchmesser der Drucknadeln groß genug ist, um hohe Scherkräfte zu vermeiden [96, 99]

Die Technologie des 3D-Bioprinting hat als aufstrebender Bereich des TE zunehmend Beachtung gefunden und wird in groß angelegten Studien weiterentwickelt. HydroZONES ist ein mittlerweile abgeschlossenes Projekt, das vom Klinikum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg koordiniert und von der EU finanziell unterstützt wurde [106]. Das internationale und interdisziplinäre Konsortium befasste sich intensiv mit gedruckten, hierarchischen Hydrogelen als zonale Implantate für die Reparatur von osteochondralen Defekten. Verschiedene Materialien wurden entworfen und hinsichtlich ihres Potenzials zur Zelldifferenzierung optimiert. Schließlich wurden zwei verschiedene 3D-gedruckte TE-Konstrukte im Tierversuch bewertet [94, 107]. Zwar konnten mit den zonalen Modellen bessere mechanische Eigenschaften, sprich eine höhere Steifigkeit, und eine gute laterale Integration der Implantate in den benachbarten Knochen bzw. Knorpel erzielt werden, jedoch ist die Strategie nach den Angaben des Konsortiums insgesamt für die Produktion von hyalinartigem Regenerationsgewebe noch nicht ausgereift [106].

1.4.5 Nachahmung der zonalen Organisation von Knorpel

Den Ansatz von HydroZONES, durch hierarchische Struktur im gezüchteten Konstrukt eine Annäherung an die charakteristischen Merkmale von nativem Gelenkknorpel zu erreichen, verfolgten bereits mehrere Studien. Dabei kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Bioreaktoren können unterschiedliche Kulturbedingungen in den oberflächlichen und tiefen Bereichen des gezüchteten Gewebes erzeugen, beispielsweise mithilfe von semipermeablen Membranen oder mechanischen Stimuli [88, 108]. Ebenso werden zunehmend hierarchische Konstrukte mit mehreren geschichteten Materialien [94, 100] oder zonal unterschiedlicher Faserausrichtung [90, 98, 103] getestet, um der tiefenabhängig inhomogenen Biomechanik des Gelenkknorpels näherzukommen. Alternativ bzw. zusätzlich können unterschiedliche Zelltypen in einem Konstrukt geschichtet werden. Dabei macht man sich die Unterschiede im chondrogenen Potenzial von Stamm- oder Progenitorzellen im Gegensatz zu reifen oder dedifferenzierten Chondrozyten zunutze, um variierende biomechanische Eigenschaften in den jeweiligen Zonen des gezüchteten Knorpels herbeizuführen [94, 107].

Aussichtsreiche Ergebnisse erhofft man sich auch von einem geschichteten Modell mit zonalen Subpopulationen von Chondrozyten, die aus den unterschiedlichen Knorpelschichten extrahiert wurden [97, 109-112]. Die Überlegung dahinter ist, dass Chondrozyten aus den verschiedenen Zonen EZM mit spezifischer Zusammensetzung und Struktur produzieren und das Konstrukt somit dem physiologischen hierarchischen Aufbau von Gelenkknorpel näherkommt. Obwohl diese spezifischen, tiefenabhängigen Verhaltensweisen *in vitro* seit über 30 Jahren bekannt sind [113], wurden bisher kaum *in vivo* Studien mit zonalen Chondrozyten durchgeführt [114]. Zudem wurde noch keine suffiziente Lösung für das Problem der begrenzten Verfügbarkeit dieses Zelltyps entwickelt. Um unter klinischen Umständen eine ausreichende Zellzahl zu erhalten, ist eine vorherige Expansion der autologen Chondrozyten mit resultierender Dedifferenzierung und Verlust des zonenspezifischen Phänotyps unabdingbar [115]. Einige Untersuchungen konnten zwar bereits zeigen, dass dieser Prozess durch anschließende 3D-Kultur theoretisch reversibel ist [114, 116, 117], allerdings gibt es dazu insgesamt noch wenig Daten. Insgesamt stellt die Suche nach den optimalen Kulturbedingungen, um die Chondrogenese der zonenspezifischen Chondrozyten zu begünstigen und funktionell und mechanisch hochwertige Knorpeltransplantate zu züchten, für die Forschung weiterhin ein Problem dar.

Unter anderem aus genannten Gründen hat der Ansatz der Nachahmung einer zonalen Schichtung in gezüchteten Konstrukten noch keinen Eingang in aktuelle klinische Behandlungsstrategien gefunden. Die bisher erzielten, begrenzten Erfolge bei der Wiederherstellung der nativen Gewebeorganisation des Gelenkknorpels spiegeln das Fehlen eines angemessenen Verständnisses der zonalen Knorpelanforderungen und seiner De- und Regenerationsfähigkeit wider [118].

1.5 Ziel der Arbeit

Autologe Chondrozyten stellen eine beliebte und häufig verwendete Zellart im TE von Knorpel dar und werden im Rahmen der ACI bereits seit über 25 Jahren in der Klinik eingesetzt. Seitdem gibt es viele neue Erkenntnisse, die zur stetigen Weiterentwicklung der gezüchteten Konstrukte geführt haben. Die Hypothese, dass nach

Knorpelzonen getrennte Zellisolation und anschließende Schichtung der Subpopulationen im Konstrukt zur Nachahmung der hierarchischen Organisation von nativem Knorpel und somit zu einer verbesserten Funktion führt, wurde bereits durch einige *in vitro*-Untersuchungen an primären, nicht expandierten Chondrozyten bekräftigt [97, 109-111]. Bislang konnte diese Erkenntnis noch nicht in die klinische Praxis übertragen werden, da noch wenige Untersuchungen mit expandierten zonalen Subpopulationen vorliegen. In den bisherigen Studien wurden zudem oft Wachstumsfaktoren eingesetzt. Diese wirken jedoch unterschiedlich auf die Subpopulationen [119] und erschweren damit einen Vergleich zwischen den Gruppen. Außerdem wurde bisher wenig Augenmerk auf den Einfluss einer zonalen Schichtung auf das Potenzial zur Chondrogenese gelegt.

In dieser Arbeit sollen die Unterschiede im Zellverhalten von expandierten Chondrozyten aus oberflächlicher und tiefer Knorpelzone sowie der Effekt einer zonalen Schichtung der beiden Subpopulationen in 3D-Kultur untersucht werden. Insbesondere werden Proliferation, Zellmorphologie und die Produktion knorpelspezifischer EZM-Komponenten analysiert. Dafür werden Chondrozyten aus den Hinterläufen von Schweinen nach Schichten getrennt isoliert und im Anschluss an eine Expansionsphase in Agarose-Hydrogelen kultiviert. Auf weitere externe Stimuli wie die Zugabe von Wachstumsfaktoren, die die Chondrogenese beeinflussen, wird verzichtet. In einem zweiten Schritt werden verschiedene Kulturbedingungen wie die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung, die Konfluenz des Zellrasens in der Monoschichtkultur sowie das Material des Hydrogels gezielt verändert, um deren Einfluss auf das Zellverhalten zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Auflistung der eingesetzten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Analysewaage	Ohaus	Zürich, CH
CO ₂ Inkubator (Hypoxie)	IBS Intera Biosciences	Fernwald, DE
CO ₂ Inkubator (Normoxie)	Binder	Tuttlingen, DE
Cryostat CM 3050S	Leica	Wetzlar, DE
Hämozytometer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH	Lauda, DE
Mikroskop BX51/DP71 Kamera	Olympus	Hamburg, DE
Mikroskop IX51/XC30 Kamera	Olympus	Hamburg, DE
Multistep-Pipette	Brand	Wertheim, DE
Pipetten Research Plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Reinraumwerkbank Typ-HS18	Heraeus	Hanau, DE
Mikroplattenlesegerät Tecan GENios pro	Tecan	Crailsheim, DE
Thermomixer comfort MTP	Eppendorf	Hamburg, DE
TissueLyser	Qiagen	Hilden, DE
UV-Handlampe	Hartenstein	Würzburg, DE
Wasserbad	Memmert	Schwabach, DE
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich	Tuttlingen, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
24-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE
96-Well-Platte	TPP	Trasadingen, CH
96-Well-Platte schwarz	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Cryovials CryoPure 2,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Falcon Zellfilter 100 µm	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Mikrotomklingen	Feather	Osaka, JP
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius AG	Göttingen, DE
Super Frost Objektträger	R. Langenbrinck	Emmendingen, DE
Zellkulturflaschen T175	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Auflistung der eingesetzten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Allyl-funktionalisiertes Polyglycidol (P(AGE-co-G))	PolyVation BV	Groningen, NL
Antikörper Verdünnungsmittel	DAKO	Hamburg, DE
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	München, DE
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	München, DE
Chloramin-T	Sigma-Aldrich	München, DE
Chondroitinsulfat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Collagenase II	Worthington	Lakewood, US
Diaminobenzidin Peroxidase Substrate Kit	BioLogo	Kronshagen, DE
Dimethylamino-Benzaldehyd	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma-Aldrich	München, DE

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	München, DE
DNA Natriumsalz aus Lachshoden	Sigma-Aldrich	München, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM/F-12)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Entellan	Merck	Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	München, DE
Fast Green	Sigma-Aldrich	München, DE
Fetales Kälberserum (FCS) 50K	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Fotoinitiator Irgacure 2959	BASF	Ludwigshafen, DE
Glycergel Mounting Medium	DAKO	Hamburg, DE
Glycin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	München, DE
Hoechst Dye 33258	Polysciences	Warrington, US
L-Hydroxyprolin	Merck	Darmstadt, DE
Live/Dead Assay Kit	PromoKine	Heidelberg, DE
Low-Melt Agarose	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
L-Cystein	Sigma-Aldrich	München, DE
Mayer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	München, DE
Nichtessenzielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Papainase	Worthington	Lakewood, US
Penicillin/Streptomycin (PS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Perchlorsäure	Merck	Darmstadt, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco A Tabletten	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Pikrinsäure	Appllichem	Darmstadt, DE
Prolin	Sigma-Aldrich	München, DE

Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Proteinase K (Digest-All 4)	Life Technologies	Karlsruhe, DE
Safranin O	Sigma-Aldrich	München, DE
Siriusrot Direct red 80	Sigma Aldrich	München, DE
Terralin Liquid Desinfektion	Schülke	Norderstedt, DE
Thiol-funktionalisiertes Hyaluronan (HA-SH)	PolyVation BV	Groningen, NL
TissueTek O.C.T.	Sakura Finetek	Zoeterwonde, NL
Tris	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Trypanblau	Sigma Aldrich	München, DE
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Life Technologies	Karlsruhe, DE
Tween 20	Applichem	Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt, DE
Weigert's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	München, DE

2.1.4 Antikörper

Die Verdünnung erfolgte jeweils mit Antikörper Verdünnungsmittel von DAKO.

Tabelle 2.4: Auflistung der eingesetzten primären Antikörper

Bezeichnung (Herkunft)	Verdünnung	Hersteller
Kollagen I (monoclonal IgG rabbit)	1:800	Abcam (ab34710)
Kollagen II (monoclonal IgG rabbit)	1:200	Abcam (ab34712)
Kollagen X (monoclonal IgG mouse)	1:50	eBioscience (X53)
Aggrekan (monoclonal IgG mouse)	1:300	Life (AHP0022)
Isotype (monoclonal IgG rabbit)	1:200	Dianova (DLN13121)
Isotype (monoclonal IgG mouse)	1:200	DAKO (X0931)

Tabelle 2.5: Auflistung der eingesetzten sekundären Antikörper

Bezeichnung (Herkunft)	Verdünnung	Hersteller
HRP anti-rabbit (polyclonal IgG goat)	1:100	DAKO (P0161)
HRP anti-mouse (polyclonal IgG rabbit)	1:100	DAKO (P0448)

2.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 2.6: Auflistung der eingesetzten Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chondrogenes Nährmedium	10 % FCS, 1 % PS, 1 % Nichtessenzielle Aminosäuren, 1 % HEPES, 0,04 mg/ml Prolin und 0,05 mg/ml Ascorbinsäure in DMEM/F-12
Proliferationsmedium	10 % FCS und 1 % PS in DMEM/F-12

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte, falls nicht anders angegeben, jeweils mit HCl oder NaOH.

Tabelle 2.7: Auflistung der eingesetzten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chloramin-T-Lösung	141 mg Chloramin-T, 8 ml pH 6-Puffer, 1 ml Isopropanol
Collagenase-Puffer	0,1 M HEPES, 0,12 M NaCl, 0,05 M KCl, 0,001 M CaCl ₂ und 0,005 M Glucose in dH ₂ O, auf pH 7,4 eingestellt und durch 0,2 µm Filter sterilisiert
Dimethylamino-Benzaldehyd-Lösung	1,5 g Dimethylamino-Benzaldehyd, 6 ml Isopropanol und 2,6 ml 60%ige Perchlorsäure

Bezeichnung	Zusammensetzung
Dimethylmethylenblau (DMMB)-Lösung	16 mg DMMB, für 16 h in 5 ml Ethanol gelöst, in vorbereitete Lösung aus 3,04 g Glycin und 2,37 g NaCl mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt und auf pH 3 eingestellt
PBE-Puffer	6,53 g Na ₂ HPO ₄ , 6,48 g NaH ₂ PO ₄ und 10 ml 500 mM EDTA mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und durch 0,2 µm Filter sterilisiert
PBE-Cystein-Puffer	17 mg L-Cystein in 20 ml PBE-Puffer
PBST	0,5 % Tween 20 in 1 l PBS
pH 6-Puffer	17 g NaOH, 25 g Zitronensäuremonohydrat, 60 g Natriumacetat Trihydrat, 6 ml Eisessig, 150 ml Isopropanol, 5 gtt Toluol mit dH ₂ O auf 750 ml aufgefüllt und auf pH 6 eingestellt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	10 Tabletten PBS in 1 l dH ₂ O
TEN-Puffer	0,1 M NaCl, 1 mM EDTA und 10 mM Tris in dH ₂ O, auf pH 7,4 eingestellt

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation der Chondrozyten

Als Spender für die Chondrozyten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dienten etwa acht bis zwölf Wochen alte Ferkel, verwertet wurde der Knorpel der Femurkondylen. Die Knochen der Hinterläufe inklusive des Kniegelenks wurden von einem naheliegenden Metzgereibetrieb (Metzgerei Hollerbach, Rimpar, Deutschland) geliefert. Es handelte sich dabei um Material, das im Rahmen der kommerziellen Schlachtung von Spanferkeln anfiel und im Fleischereibetrieb nicht weiterverarbeitet werden konnte. Die Verarbeitung des tierischen Materials mit Isolation der

Chondrozyten im Labor begann taggleich mit der Schlachtung. Insgesamt wurde der Knorpel von drei verschiedenen Donorgruppen, bestehend aus jeweils acht bis zehn Hinterläufen, in verschiedenen Versuchsreihen verarbeitet.

Alle für die folgenden Arbeitsschritte benötigten Instrumente waren entweder sterile Verbrauchsmaterialien oder wurden im Vorfeld zur Desinfektion in 70%igem Ethanol gebadet. Der Arbeitsbereich wurde zunächst mit Schülke Terralin Liquid desinfiziert und dann mit keimarmen Unterlagen bedeckt.

Nachdem die Gelenkkapsel eröffnet und der Knorpel der Femurkondylen freigelegt wurde, wurde dieser mit einem Skalpell an den Rändern inzidiert und danach als Ganzes mithilfe eines stumpfen Spatels vom darunterliegenden Knochen getrennt. Restliche kalzifizierte Bestandteile und Blutgefäße der Übergangszone wurden mit einem Skalpell abgeschnitten. Anschließend wurde die Knorpelplatte in kleinere Rechtecke unterteilt. Die oberflächliche und die tiefe Zone des Knorpels wurden voneinander getrennt, indem die Knorpelplatte auf halber Schichtdicke parallel zu ihrer Oberfläche in zwei Blätter gespalten wurde. So entstanden zwei etwa gleich hohe Schichten, die nicht den histologisch definierten Zonen des Knorpels (Abb. 1.2), sondern der oberflächlichen bzw. tiefen Zone jeweils mit Anteilen der mittleren Zone entsprechen. Dennoch werden im Folgenden die aus diesen beiden Schichten isolierten Chondrozyten vereinfacht als die zonalen Subpopulationen definiert und mit den in der englischen Literatur gebräuchlichen Begriffen „superficial zone chondrocytes“ (SZC) und „deep zone chondrocytes“ (DZC) bezeichnet.

Die Knorpelstücke der beiden Schichten wurden je in eine sterile Petrischale mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS) gegeben und darin mit einer Rasierklinge weiter zerkleinert.

Um die Chondrozyten von der EZM zu separieren, wurden die Knorpelstücke nach mehrmaligem Waschen mit PBS und 1 % PS nach Schichten getrennt in einer Collagenase-Lösung für 16 h bei 37 °C verdaut. Pro Gramm Knorpel wurden dafür 8 ml Collagenase-Puffer, versetzt mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) und 15 mg Collagenase II (360 U/mg), verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension durch ein 100 µm Zellsieb filtriert, um nicht verdaute, kalzifizierte Knorpelstücke zu entfernen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min bei 311 x g), die

überstehende Flüssigkeit anschließend vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in PBS mit 1 % PS aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das so gewonnene, gewaschene Zellpellet wurde in Proliferationsmedium aufgenommen und bis zu einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml verdünnt. Um die Zellzahl in der Lösung zu bestimmen, wurden 10 μ l der Suspension, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt, auf eine Neubauer-Platte gegeben und die Zellen unter dem BX51 Mikroskop ausgezählt. Da der Farbstoff Trypanblau von Zellen mit intakter Membran nicht aufgenommen wird, konnte so nicht nur die Quantität der Zellen in der Lösung bestimmt werden, sondern auch auf deren Vitalität geschlossen werden. Aus der dritten Lieferung von tierischem Material, also Donorgruppe C, wurden mehr Chondrozyten isoliert als für den anstehenden Versuch benötigt, die übrigen Zellen wurden kryokonserviert und später für weitere Versuchsreihen genutzt. Die vorerst unverwendete Zellsuspension wurde dazu mit 10 % Dimethylsulfoxid versetzt und nach Ursprungsschicht getrennt in mehrere Cryovials aufgeteilt. Diese wurden bis zur späteren Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach wenigen Wochen wurden die Proben in einem 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann, genau wie die direkt weiterverwendete, nicht kryokonservierte Suspension, der Expansionsphase zugeführt (siehe unten).

2.2.2 Expansion

Zunächst wurden die Zellen in einer Monoschichtkultur als Zellrasen expandiert und damit zu einem gewissen Grad dedifferenziert. Die primären SZC und DZC wurden dazu jeweils in Zellkulturflaschen aus Kunststoff mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² mit 25 ml Proliferationsmedium ausgesät. Avitale und andere ungeeignete Zellen wie beispielsweise restliche Blutkörperchen adhärten nicht an den Flaschenboden und wurden im Zuge des regelmäßigen Mediumwechsels durch vorsichtiges Spülen mit PBS entfernt. In zwei- bis dreitägigen Abständen wurde die Dichte des Zellrasens mithilfe von Auflichtmikroskopie unter dem BX51 Mikroskop kontrolliert und mithilfe der DP71 Kamera dokumentiert. Sobald die gewünschte Konfluenz des Zellrasens erreicht wurde, wurden die Chondrozyten

passagiert und in Passage 1 weiterverwendet. Dazu wurden in jede Flasche nach Absaugen des Proliferationsmediums 5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA pipettiert, um die an den Flaschenboden adhären Chondrozyten zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Proliferationsmedium abgestoppt und die Suspension aufgenommen. Durch dreimaliges Zentrifugieren (5 min bei 311 x g), Absaugen der Flüssigkeit und Wiederaufnahme des Zellpellets in PBS wurden die Chondrozyten gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zellzählung mit Trypanblau wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

2.2.3 Herstellung der Hydrogele

In einer zweiten Form der Zellkultur, nämlich im 3D-Modell in Hydrogelen, sollten die Chondrozyten wieder redifferenziert und zur Knorpelproduktion angeregt werden. In dieser Phase erhöhte sich die Anzahl der Versuchsgruppen auf vier. Zusätzlich zu Gelen mit ausschließlich SZC bzw. DZC wurden gemischte Gele (MIX) sowie zonale Gele (ZON) mit beiden Zelltypen hergestellt. Letztere bestanden aus einer unteren Lage mit DZC und einer oberen Lage mit SZC (Abb. 2.1).

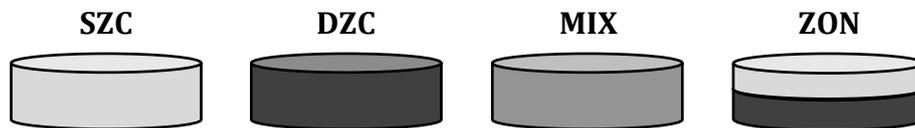


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Redifferenzierungsphase im 3D-Modell mit Kultivierung der Zellen in vier Gruppen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele

2.2.3.1 Agarose-Hydrogele

Als Biomaterial zur Herstellung der ersten Form von Hydrogelen wurde 4 % Low-Melt-Agarose in PBS verwendet, welche zuvor in einer Mikrowelle sterilisiert und dann in einem Thermoblock bei 40 °C flüssig gehalten wurde. Die gewaschenen Chondrozyten wurden mit der flüssigen Agarose zu einer Endkonzentration von 20×10^6 Zellen/ml und einer Agarose-Konzentration von 2 % vermennt.

Unter sterilen Bedingungen und mit auf 40 °C vorgewärmten Materialien wurden jeweils 40 µl der Suspensionen mit SZC bzw. DZC in autoklavierte Glasringe mit

einem Durchmesser von 5 mm pipettiert, sodass jedes Gel eine Zellzahl von 8×10^5 enthielt. Anschließend wurden die Gele für 3-4 min bei 4 °C ausgehärtet. Für gemischte Gele wurden jeweils 20 µl beider Zellsuspensionen im warmen, also flüssigen Zustand in einen Ring pipettiert und mit der Pipettenspitze miteinander vermischt. Für zonale Gele wurden zuerst 20 µl der Zellsuspension mit DZC in den Glasring pipettiert, für 2 min bei 4 °C ausgehärtet, nachfolgend 20 µl der Suspension mit SZC darüber pipettiert und das gesamte Hydrogel erneut für 2 min bei 4 °C ausgehärtet.

Durch Kapillarkräfte wurde der äußere Rand der Gele an den Glasringen nach oben gezogen, so entstand eine konkave Oberfläche, welche für die Beurteilung der histologischen Schnitte eine Rolle spielte, denn dadurch konnte auch nach dem Einbetten und Schneiden der Proben die Oberseite der Gele stets identifiziert werden.

2.2.3.2 HA/PG-Hydrogele

Als Grundlage für ein zweites Hydrogel diente eine Kombination aus einem natürlichen und einem synthetischen Polymer, die beide chemisch modifiziert wurden, um eine Vernetzung untereinander zu ermöglichen. Dabei handelte es sich um Thiol-funktionalisiertes Hyaluronan (HA-SH) und Allyl-funktionalisiertes Polyglycidol (P(AGE-co-G)) [99, 101]. Dementsprechend wird das Material im Folgenden als HA/PG bezeichnet. Beide Komponenten wurden von der Firma PolyVation BV (Groningen, NL) hergestellt und freundlicherweise vom AK Prof. Groll der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Das Biomaterial wurde mit einem totalen Massenanteil der Polymere von 10 % (Verhältnis HA-SH:P(AGE-co-G) von 1:1) verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden HA-SH und P(AGE-co-G) in PBS gelöst und mit dem Fotoinitiator Irgacure 2959 (Massenanteil 0,05 %) versetzt. Mithilfe von 5 M NaOH wurde die leicht saure Lösung auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert. Die Chondrozyten aus beiden Schichten wurden jeweils zu einer Endkonzentration von 20×10^6 Zellen/ml zugegeben. Für diese Versuchsreihe wurden kryokonservierte Zellen verwendet.

Anschließend wurden die Suspensionen in die Glasringe pipettiert, das Volumen der Gele sowie deren Aufteilung in vier Versuchsgruppen war analog zur Herstellung

der Agarose-Gele (siehe 2.2.3.1). Durch Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm für 5 min) wurde die Thiol-En-Reaktion katalysiert, wodurch die Polymere sich quervernetzten und das Hydrogel aushärtete (Abb. 2.2). Weil bei den zonalen Gelen die Schichtdicke der einzelnen Zonen nur die Hälfte betrug, wurde zuerst nur die tiefe Schicht und dann noch einmal das gesamte Gel mit der oberflächlichen Schicht jeweils für die Hälfte der Zeit, also 2,5 min mit UV-Licht bestrahlt.

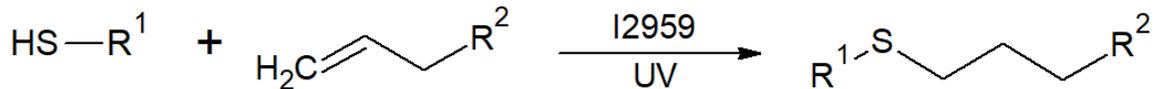


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Thiol-En-Reaktion.

2.2.3.3 Aufteilung auf Zellkulturplatten

Die Gele beider Biomaterialien wurden nach Aushärtung vorsichtig aus den Glasringen gedrückt, in jeder Versuchsreihe auf drei verschiedene 24-Well-Platten verteilt und in chondrogenes Nährmedium aufgenommen. Zwei der Zellkulturplatten wurden für 21 Tage (d21) unter normoxischen (21 % O₂, 5 % CO₂) bzw. hypoxischen (2 % O₂, 5 % CO₂) Bedingungen bei 37 °C kultiviert, dabei erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Eine der Platten wurde bereits nach einem Tag (d1) unter normoxischen Bedingungen geerntet und diente als Negativkontrolle sowohl für die Normoxie- als auch die Hypoxie-Gruppe.

Für jede der vier Versuchsgruppen aus SZC-, DZC-, gemischten und zonalen Konstrukten wurden in jeder Versuchsreihe mindestens zwölf Hydrogele hergestellt, so dass auf jeder der drei Zellkulturplatten mindestens vier biologische Replikate pro Gruppe vorhanden waren. Dadurch erhöhte sich zum einen die Anzahl möglicher Auswertungsmethoden, zum anderen konnten jeweils mehrere biologische Replikate einem biochemischen Assay bzw. einer histologischen Färbung zugeführt werden.

2.2.4 Zellviabilitäts-Assay

Mithilfe eines Live/Dead-Assays wurde die Viabilität der Zellen in den Hydrogelen nach einem Tag und nach 21 Tagen Kultivierung bestimmt. Im Gegensatz zur

Vitalität, bei der nur die Integrität der Zellmembran nicht kompromittiert ist, bedingt die Viabilität auch die Fähigkeit der Zellen zu komplexen Stoffwechselfvorgängen.

Die Hydrogele wurden zunächst aus dem Medium in PBS aufgenommen und dann für eine Stunde in einer Färbelösung mit 2 μM Calcein AM (AM = Acetoxymethylester) sowie 4 μM Ethidium Homodimer III (EthD-III) in PBS unter Lichtausschluss inkubiert.

Die Acetoxymethylgruppe des Calceins inhibiert die Bildung von Chelatkomplexen mit Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} und lässt gleichzeitig eine Diffusion sogar durch intakte Zellmembranen zu. Lediglich viable Zellen verfügen über eine Esterase zur Abspaltung der AM-Gruppe, was zum einen den passiven Abtransport aus der Zelle verhindert und zum anderen durch Bildung von Chelatkomplexen zu einer grünen Fluoreszenz führt [120]. EthD-III kann nur durch perforierte Zellmembranen in abgestorbene Zellen eindringen und dort in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) interkalieren, was in einer roten Fluoreszenz resultiert [121]. Somit fluoreszieren viable Zellen grün und avitale Zellen rot.

Nach Waschen der Gele in PBS wurden Aufsichtsbilder der Schnittfläche mit einem Fluoreszenz-Mikroskop IX51 (Anregungswellenlänge λ_{Ex} 460-490 nm, Emissionswellenlänge λ_{Em} 520 nm bzw. λ_{Ex} 510-550 nm, λ_{Em} 590 nm) aufgenommen und mit einer XC30 Kamera erfasst. Die Bilder beider Farbkanäle wurden im Anschluss mit der Software Olympus cellSens Dimension (Olympus, Hamburg) übereinandergelegt.

2.2.5 Kryostatschnitte

Die Proben für die Histologie und Immunhistochemie bestanden aus je der Hälfte von zwei bis drei Gelen pro Versuchsgruppe, welche zunächst aus dem chondrogenem Nährmedium entfernt, in PBS gewaschen und dann in 40 % Formalin fixiert wurden. Darin wurden sie bis zur Weiterverarbeitung wenige Tage später aufbewahrt. Zur Einbettung wurden sie in TissueTek O.C.T. für mindestens 24 h dehydriert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um Kristallbildung

zu vermeiden. Bis zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurden die eingebetteten Blöcke bei -20 °C aufbewahrt.

Die tiefgefrorenen Blöcke mit den Hydrogele wurden im Kryostaten bei optimaler Temperatur von -19 °C in der Kammer und -17 °C auf der Oberfläche des Kryostats geschnitten, die Schnittdicke betrug 6 µm. Die longitudinalen Schnitte, stichprobenartig durch die gesamte Breite der Probe entnommen, wurden auf SuperFrost plus Adhäsions-Objekträgern gesammelt und erneut bei -20 °C gelagert. Pro Versuchsreihe wurden aus jeder Gruppe mindestens zwei Konstrukte für die histologische Auswertung präpariert, gefärbt und mikroskopiert.

2.2.6 Färbungen

2.2.6.1 Histologische Färbungen

Für den Nachweis von GAG wurde der kationische Farbstoff Safranin O gewählt. Dieser bindet an die meist negativ geladenen Seitengruppen der GAG und zeigt eine orange-rote Färbung [122]. Die Objekträger mit den Kryostatschnitten wurden zunächst in destilliertem Wasser für 1 min rehydratisiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit Weigert's Hämatoxylin für 6 min, gefolgt von kurzen Spülungen mit destilliertem Wasser, 0,5 % Salzsäure in Ethanol und zuletzt für 5 min unter fließendem Leitungswasser. Zytoplasmatische Proteine wurden für 5 min mit 0,02 % Fast Green in dH₂O gefärbt, nach einer weiteren Spülung in 1 % Essigsäure in dH₂O wurden die Objekträger für 6 min in 0,1 % Safranin O in dH₂O getaucht [123].

Eine zweite in dieser Arbeit angewandte Färbung ist die Pikro-Siriusrot-Färbung für Kollagen. Durch eine Interaktion der basischen Gruppen des Proteins mit den Sulfonsäuregruppen des Farbstoffs lagert dieser sich parallel an Kollagenfasern an und stellt sie so dar [124]. Nach der Zellkernfärbung in Weigert's Hämatoxylin (8 min) und einer Spülung unter fließendem Leitungswasser (10 min) wurden die Proben für 60 min in der Färbelösung (0,1 % Siriusrot in gesättigter wässriger Lösung von Pikrinsäure) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zwei Mal für je 5 min in Wasser mit 0,5 % Essigsäure gewaschen [123].

Bei beiden Vorgängen durchliefen die gefärbten Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (absolutes Ethanol, Isopropanol, Xylol), als Eindeckmedium wurde Entellan verwendet.

Ausgewertet wurden die Proben mit drei unterschiedlichen Vergrößerungen unter einem BX51 Mikroskop mit einer DP71 Kamera. Es wurde darauf geachtet, dass der konkave Rand des Gewebeschnittes, also die ursprünglich obere Begrenzung des Gels, konstant nach oben zeigte. Somit lag bei den zonalen Gelen die tiefe Schicht im unteren und die oberflächliche Schicht im oberen Bildbereich. Mit der Software Olympus cellSens Dimension wurden die mikroskopischen Abbildungen formatiert und ein Maßstabsbalken eingefügt.

2.2.6.2 Immunhistochemie

Bei der indirekten Methode der Immunhistochemie bindet ein unkonjugierter, primärer Antikörper spezifisch an ein bestimmtes Epitop im Gewebe. In einem zweiten Schritt wird ein sekundärer Antikörper eingesetzt, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist und an den primären Antikörper bindet. Nach Zugabe des zunächst farblosen Chromogens Diaminobenzidin wird dieses durch HRP oxidiert und bildet ein braunes, unlösliches Präzipitat [125]. Bei der Negativkontrolle wird anstelle des primären Antikörpers ein Isotyp aufgetragen, den der sekundäre Antikörper ebenfalls erkennt. Allerdings hat der Isotyp keine Affinität zu dem zu analysierenden Antigen.

Es wurden vier verschiedene Antikörper-Färbungen zum Nachweis von Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X und Aggrekan durchgeführt, die Vorbereitung der Schnitte lief jeweils nach dem gleichen Protokoll ab. Zwischen allen folgenden Schritten erfolgte jeweils, falls nicht anders angegeben, ein dreimaliger Waschvorgang in PBST: Nachdem die Schnitte für 3 min in PBS rehydratisiert wurden, wurden sie mit Proteinase K für 10 min bei Raumtemperatur angedaut, um die Epitope zu demaskieren, also die Antigenerkennung zu erleichtern. Als Blockierer dienten zwei Substanzen: 1 % Bovines Serumalbumin in PBS verhinderte die unspezifische, hydrophobe Bindung der Antikörper; 2,5 % Wasserstoffperoxid (20 min bei Raumtemperatur) inaktivierte die endogene Peroxidase, um eine unspezifische Färbung des

Hintergrunds zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben mit den primären Antikörpern bzw. der Negativkontrolle in den in Tabelle 2.4 beschriebenen Verdünnungen über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert.

Die sekundären Antikörper (Tabelle 2.5), die im Anschluss auf die Schnitte aufgetragen wurden, hatten eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Färbung für 4-5 min mit Diaminobenzidin entwickelt und die Reaktion bei Erreichen der optimalen Intensität durch Spülung mit Wasser gestoppt. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde Mayer's Hämatoxylin verwendet, welches mit Leitungswasser gespült wurde. Zuletzt wurden die Schnitte mit Glycergel Mounting Medium eingedeckt und wie bereits in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben mikroskopiert.

2.2.7 Biochemische Analyse

2.2.7.1 Papainase-Verdau

Von jeder Versuchsgruppe wurde jeweils die Hälfte von drei Gelen für die biochemische Analyse verwendet. Durch Messung des Nassgewichts des gesamten Gels vor Halbierung sowie der halben Gele wurde ein Quotient berechnet, um am Ende die Daten der biochemischen Tests wieder auf das ursprünglich ganze Gel hochrechnen zu können. Die Proben wurden in PBE-Cystein-Puffer gegeben, nachdem sie zweimal für 10 min in PBS gewaschen wurden.

Die Agarose-Gele wurden zunächst im Thermomixer auf 70 °C erhitzt, um das Gel zu schmelzen und aufzulösen, die HA/PG-Proben wurden dagegen in einem Tissue-Lyser mit 25 Hz für 5 min zerkleinert. Die so entstandenen Lösungen wurden jeweils mit PBE-Cystein-Puffer und Papainase-Lösung zu 1 ml und einer Endkonzentration der Papainase von 3 U/ml ergänzt und für 20 h bei 60 °C inkubiert. Bei HA/PG-Gelen wurde das Volumen auf insgesamt 600 µl bei gleicher Papainase-Konzentration festgelegt, da weniger EZM in den Proben erwartet wurde. Die verdauten Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7.2 DNA-Assay

Ein biochemischer Test mit Hoechst Dye #33258 wurde zur Erfassung des DNA-Gehalts der Proben angewandt. Die Substanz interkaliert in die DNA und verschiebt dabei ihr Emissionsmaximum bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenz [126]. Hoechst Dye #33258 wurde in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in ddH_2O lichtgeschützt aufbewahrt und vor Gebrauch frisch mit einfach konzentriertem TEN-Puffer in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ angesetzt. Es wurden je zwei technische Replikate von 10 μl (bei HA/PG-Gelen 30 μl) der in Papainase verdauten Lösungen in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert, je mit 200 μl der Hoechst-Lösung gemischt und an einem Mikroplattenlesegerät vermessen (λ_{Ex} 365 nm, λ_{Em} 458 nm). Als Standard wurde DNA aus Lachshoden verwendet.

2.2.7.3 GAG-Assay

Zur Bestimmung des Gehalts an GAG diente eine Dimethylmethylenblau (DMMB)-Lösung, welche ihr Absorptionsspektrum bei Bindung an sulfatierte GAG ändert [127]. Je nach erwarteter Menge an GAG in den Proben wurden 5 – 50 μl in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit PBE-Cystein-Puffer zu 50 μl ergänzt, mit jeweils zwei technischen Replikaten. Nachdem zu den Proben je 200 μl der DMMB-Lösung gegeben wurde, maß ein Mikroplattenlesegerät die Platten bei einer Wellenlänge von 590 nm aus. Zur Normierung wurde eine Standardlösung aus Chondroitinsulfat verwendet.

2.2.7.4 Hydroxyprolin-Assay

Auch der Gehalt an der Aminosäure Hydroxyprolin (HP), der direkt proportional zum Gehalt an Kollagen im Knorpel ist, wurde mithilfe eines biochemischen Assays analysiert. HP wird durch Chloramin-T zu Pyrrol oxidiert, welches mit Dimethylamino-Benzaldehyd ein rot gefärbtes Kondensationsprodukt bildet [128]. 100 μl der in Papainase verdauten Proben, gemischt mit 100 μl 37%iger rauchender Salzsäure, wurden in einem geschlossenen Gefäß im Thermomixer für 16 h bei 103 °C hydrolysiert, wobei Polypeptide in Aminosäuren gespalten wurden. Nachdem die

Salzsäure bei 105 °C für 2 h abgeraucht war, wurden die nun trockenen Proben in 500 µl H₂O aufgenommen und je 100 µl dieser Lösung in zwei technischen Replikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach Inkubation mit 50 µl Chloramin-T-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur folgte eine Inkubation mit 50 µl einer Dimethylamino-Benzaldehyd-Lösung für 30 min bei 65 °C im Trockenschrank. Vermessen wurde die Platte bei 570 nm im Mikroplattenlesegerät. Zur Normierung wurde eine Standardlösung aus HP verwendet. Der Gesamtgehalt an Kollagen berechnet sich mit einem Verhältnis von HP zu Kollagen von 1:10 [58].

2.2.8 Überblick über den Versuchsaufbau

Für einen besseren Überblick über den allgemeinen Versuchsaufbau, im Folgenden als Basisprotokoll bezeichnet, und die vorgenommenen Modifikationen der Kulturbedingungen werden diese hier noch einmal zusammengefasst (Abb. 2.3).

Im Basisprotokoll wurden Chondrozyten der Femurkondylen von Ferkeln nach oberflächlicher und tiefer Schicht getrennt isoliert und zunächst für sieben Tage in Zellkulturflaschen expandiert. Im Anschluss erfolgte eine dreiwöchige Kultivierung in Agarose-Hydrogelen unter normoxischen Bedingungen. Die Stichprobengröße lag bei $n = 9$, da aus den drei Donorgruppen konsekutive Versuchsreihen mit je drei biologischen Replikaten durchgeführt wurden.

Aus jeder der drei Donorgruppen wurde ebenfalls eine Zellkulturplatte in der Redifferenzierungsphase unter hypoxischen Bedingungen kultiviert ($n = 9$). Nach der Expansionsphase der Zellen der ersten Donorgruppe fiel auf, dass die SZC langsamer proliferierten und zum Zeitpunkt der Trypsinierung einen weniger dichten Zellrasen gebildet hatten. Daraufhin wurde aus den nächsten beiden Donorgruppen jeweils ein Teil der SZC länger expandiert und dann erst der Redifferenzierungsphase zugeführt ($n = 6$). Ein Teil der Zellen der dritten Donorgruppe wurde zudem kryokonserviert und später für drei weitere Versuchsreihen genutzt, zwei in HA/PG-Gelen ($n = 6$) und einem wiederum in Agarose-Gelen ($n = 3$).

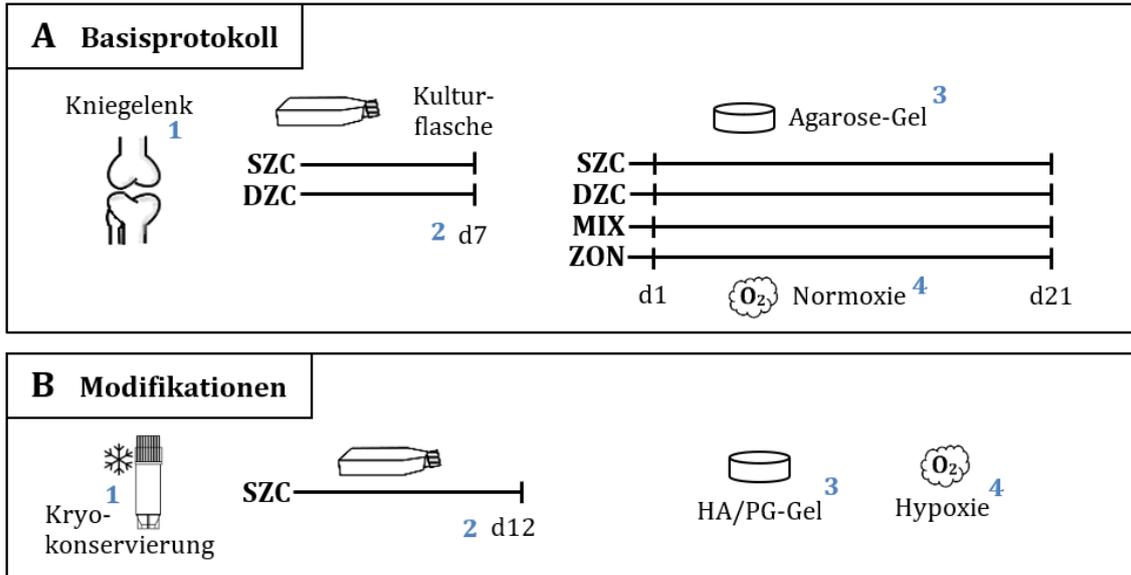


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Basisprotokolls (A) und der Modifikationen (B). (A) Nach Schichten getrennte Isolierung der Chondrozyten aus den Femurkondylen von Ferkeln, sieben-tägige Expansionsphase in Monoschichtkultur mit zwei Versuchsgruppen und anschließend dreiwöchige Redifferenzierungsphase in Agarose-Hydrogelen unter normoxischen Bedingungen mit vier Versuchsgruppen. Die Ziffern nehmen Bezug auf die einzelnen Modifikationen der Versuchsbedingungen, die in (B) gezeigt sind. (1) vorherige Kryokonservierung der Zellen. (2) Verlängerung der Expansionsphase von SZC auf zwölf Tage. (3) Redifferenzierungsphase in HA/PG-Hydrogelen. (4) Redifferenzierungsphase in Agarose-Gelen unter hypoxischen Bedingungen.

2.2.9 Statistik

Die Analyse der gesammelten Daten aus den biochemischen Assays wurde mit der Software Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) und deren Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software OriginPro 2020. Zur Signifikanzberechnung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen mit anschließendem Post-hoc-Test nach Bonferroni-Methode durchgeführt. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Balkendiagramme wurden mit OriginPro 2020 erstellt.

3 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden Chondrozyten aus den Hinterläufen von Ferkeln nach oberflächlicher und tiefer Schicht getrennt extrahiert, in Monoschichtkultur expandiert und dadurch dedifferenziert (als Expansionsphase bezeichnet) und anschließend in einer 3D-Zellkultur redifferenziert (als Redifferenzierungsphase bezeichnet). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Versuchsreihe in Hinblick auf Vitalität bzw. Viabilität, Proliferation, Morphologie sowie Matrixproduktion untersucht. In weiteren Versuchsreihen wurden unterschiedliche Bedingungen verändert, um deren Einfluss auf die oben genannten Endpunkte zu beurteilen. Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben.

3.1 Expansionsphase

3.1.1 Proliferationsrate

Die Dichte des Zellrasens der beiden Chondrozyten-Subpopulationen während der Kultivierung in Proliferationsmedium wurde mittels Auflichtmikroskopie beurteilt. Nach Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA konnte eine Proliferationsrate aus dem Quotienten von der Zellzahl vor und nach der Monoschichtkultur berechnet werden.

Die Proliferation unterlag einer hohen Donorvariabilität, schwankte aber auch stark zwischen den beiden Gruppen von SZC und DZC. Da beide Zelltypen zur gleichen Zeit in Gele gegossen werden mussten, erfolgte die Trypsinierung ebenfalls zum gleichen Zeitpunkt, nämlich sobald eine der beiden Kulturen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatte. Bei den DZC wurde diese Dichte nach sieben Tagen beobachtet, während die SZC dann erst eine Dichte von geschätzt 50 % erreicht hatten (Abb. 3.1).

Auch in der Zellzahl vor bzw. nach der Monoschichtkultur spiegelte sich diese unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit wider. Während sich die Zellzahl der SZC innerhalb einer Woche in der Regel verdoppelte bis verdreifachte ($MW = 2,4$;

$SD = 0,7$), stieg die Zahl bei den DZC auf das drei- bis achtfache ($MW = 5,3$; $SD = 2,5$). Dieser Unterschied war nicht signifikant (Abb. 3.2).

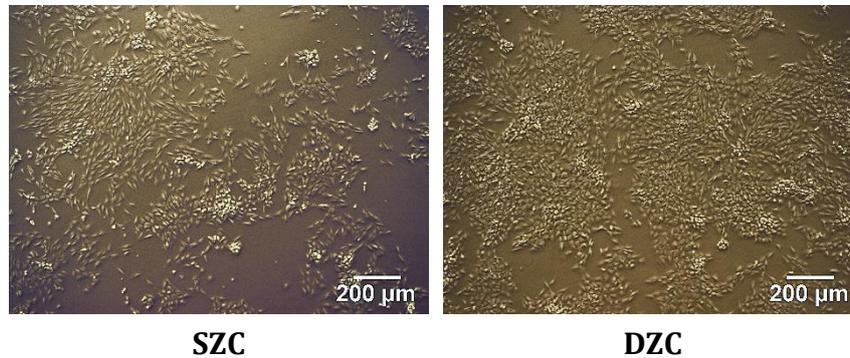


Abb. 3.1: Zelldichte in Kulturflaschen der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur, dargestellt durch Auflichtmikroskopie. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

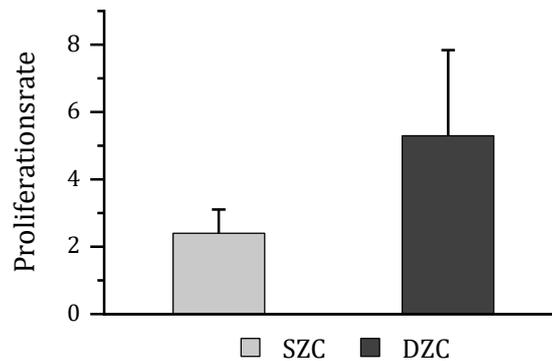


Abb. 3.2: Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

3.1.2 Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde nach Collagenase-Verdau der Knorpelstücke und nach Passagieren des Zellrasens mit Trypsin-EDTA durch Zellzählung mit Trypanblau bestimmt. Unmittelbar nach Collagenase-Verdau lag der Anteil an vitalen Zellen zwischen 92,6 % und 96,3 %. Bei den SZC war er leicht, aber signifikant niedriger als bei den DZC ($p = 0,039$). Der Anteil an vitalen Zellen nach der Trypsinierung bei beiden Gruppen war insgesamt höher, zwischen 92,6 % und 99,3 %. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 3.3).

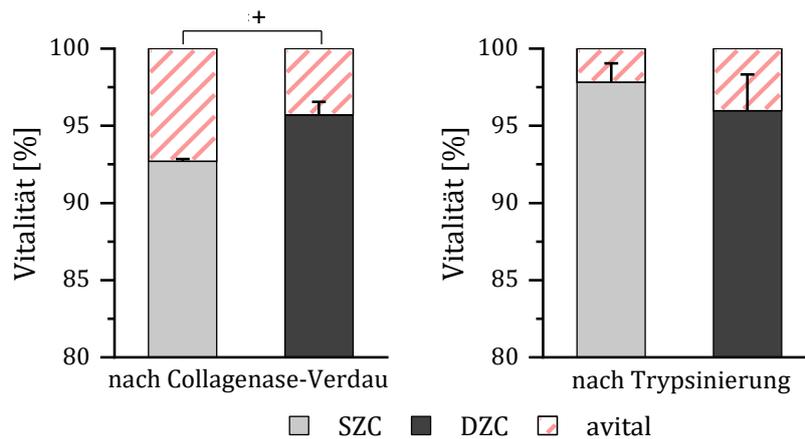


Abb. 3.3 Anteile an vitalen und avitalen Zellen der beiden Versuchsgruppen nach Collagenase-Verdau des Knorpels bzw. nach Trypsinierung der Monoschichtkultur in Prozent. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht. + markiert signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.2 Zonale Subpopulationen in der Redifferenzierungsphase

Eines der Hauptaugenmerke dieser Arbeit lag in den Unterschieden im Redifferenzierungspotenzial von Zellen aus oberflächlicher und tiefer Knorpelschicht. Daher werden zur besseren Übersicht im folgenden Abschnitt zunächst nur die Ergebnisse dieser beiden Zelltypen im Basisprotokoll beschrieben. Dies entspricht frisch isolierten Chondrozyten mit siebentägiger Expansionsphase und anschließender Redifferenzierung über 21 Tage in Agarose-Gelen unter normoxischen Bedingungen.

3.2.1 Zellviabilität und -vitalität

Zur Bestimmung der Viabilität bzw. Vitalität der Zellen in den Hydrogelen nach einem Tag und nach drei Wochen in Kultur diente ein Live/Dead-Assay. Insgesamt ließ sich beobachten, dass der Anteil an viablen Chondrozyten über alle Gruppen hinweg deutlich gegenüber dem Anteil an avitalen überwog (Abb. 3.4 oben). Die Unterschiede zwischen den Subpopulationen im Anteil an avitalen Zellen sind besser zu erkennen, wenn man nur den entsprechenden Farbkanal betrachtet. An d1 war das rote Signal, das von den avitalen Zellen ausgeht, in beiden Gruppen gleich stark. Die Gele mit SZC schienen an d21 einen niedrigeren Anteil an avitalen Zellen aufzuweisen als an d1. Dagegen stieg der Anteil an avitalen Zellen bei den Gelen mit DZC nach der 3D-Kultur eher etwas an (Abb. 3.4 unten).

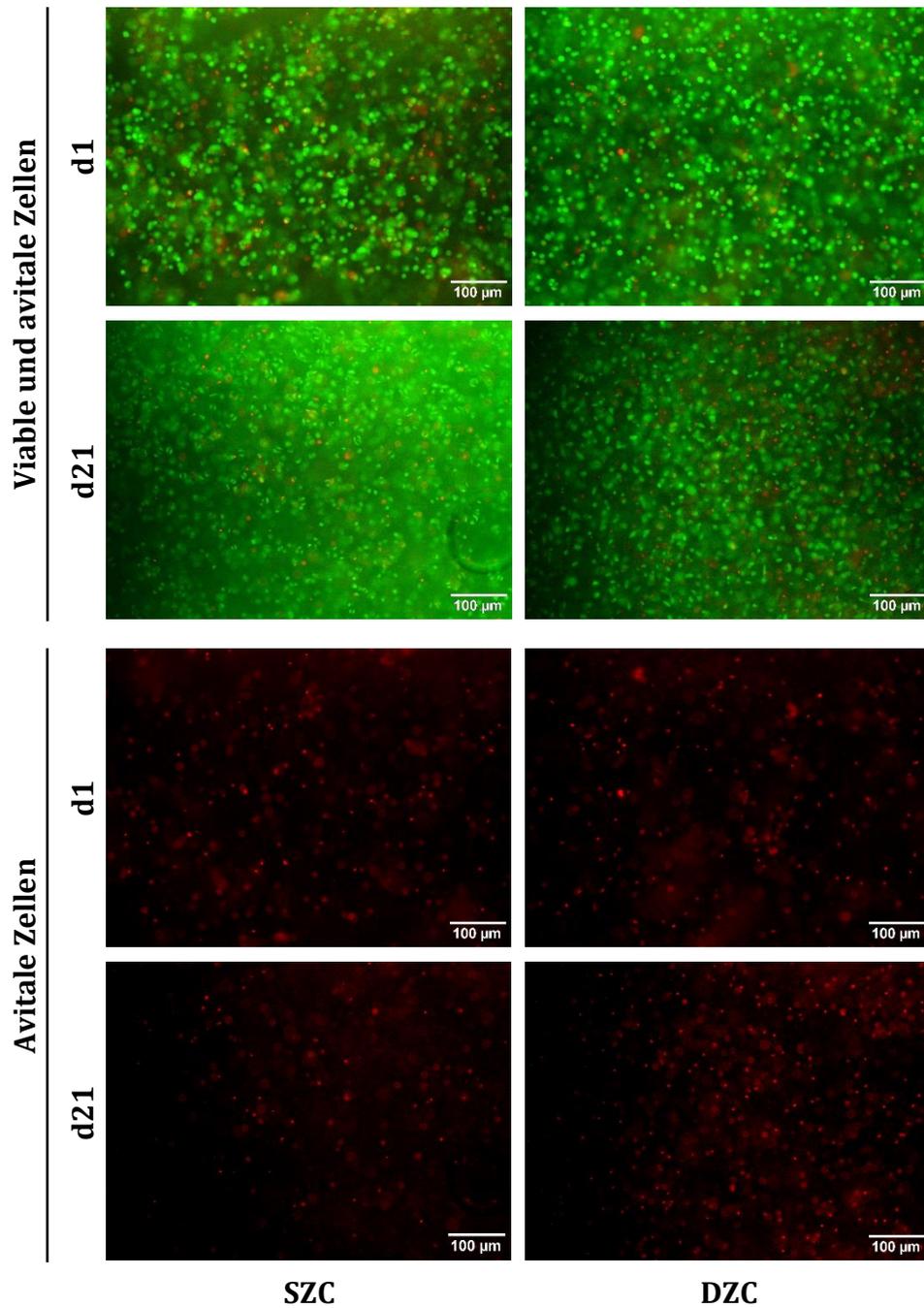


Abb. 3.4: Viabilität bzw. Vitalität der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Oben viable und avitale, unten nur avitale Zellen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

3.2.2 DNA-Gehalt

Als Methode zur Bestimmung des DNA-Gehalts in den Hydrogelen wurde ein biochemischer DNA-Assay gewählt.

An d1 der 3D-Zellkultur war der DNA-Gehalt in beiden Zellreihen in etwa gleich groß, im Mittel $4,53 \mu\text{g}$ ($SD = 1,15$) in den Gelen mit SZC und $5,11 \mu\text{g}$ ($SD = 1,63$) in solchen mit DZC. Nach 21 Tagen unterschieden sich die Werte deutlich, aber nicht signifikant voneinander. Die SZC proliferierten weiter und vermehrten den DNA-Gehalt pro Gel auf einen MW von $6,66 \mu\text{g}$ ($SD = 1,17$). Die DZC hingegen verringerten ihre Zellzahl und enthielten nach den drei Wochen nur noch $3,54 \mu\text{g}$ ($SD = 3,88$) DNA pro Gel (Abb. 3.5).

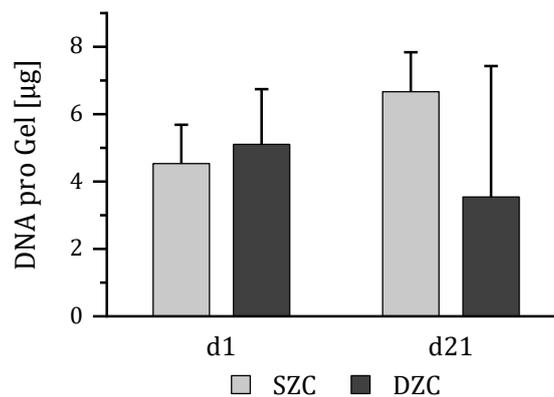


Abb. 3.5: DNA-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg . SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

3.2.3 Zellmorphologie

Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurden die histologischen Aufnahmen aller Färbungen in einer hohen Vergrößerung betrachtet. Die Ergebnisse waren in allen Versuchen und in jeder Färbung der Agarose-Gele deutlich zu identifizieren. Exemplarisch werden hier Bilder der Pikro-Siriusrot-Färbung gezeigt.

An d1 sahen die beiden Subpopulationen in der Histologie nahezu identisch aus. Die Zellen waren diffus verteilt und einzelnstehend, die Zellkerne waren klein und rundlich, ein Zytoplasma konnte nicht abgegrenzt werden. Die Zelldichte im Gel war ebenfalls in beiden Gruppen gleich groß. Nach 21 Tagen in der Kultur wiesen die beiden Zelltypen hingegen unverkennbare Unterschiede auf. In den Hydrogelen mit SZC waren die Zellen relativ klein und hatten wenig Zytoplasma. Zwei oder mehr Zellen ordneten sich oft dicht aneinander zu kleinen Gruppen an. Es ließ sich eine überwiegend horizontale Schichtung innerhalb des Gels erkennen. Die Zellkerne

erschieden meist halbmondförmig. In den Hydrogelen mit DZC dagegen fanden sich vor allem Zellen mit hohem Zytoplasma-Anteil, die demzufolge insgesamt größer waren. Die horizontale Schichtung wie bei den SZC war nicht zu erkennen, eher eine tendenziell vertikale Schichtung (Abb. 3.6).

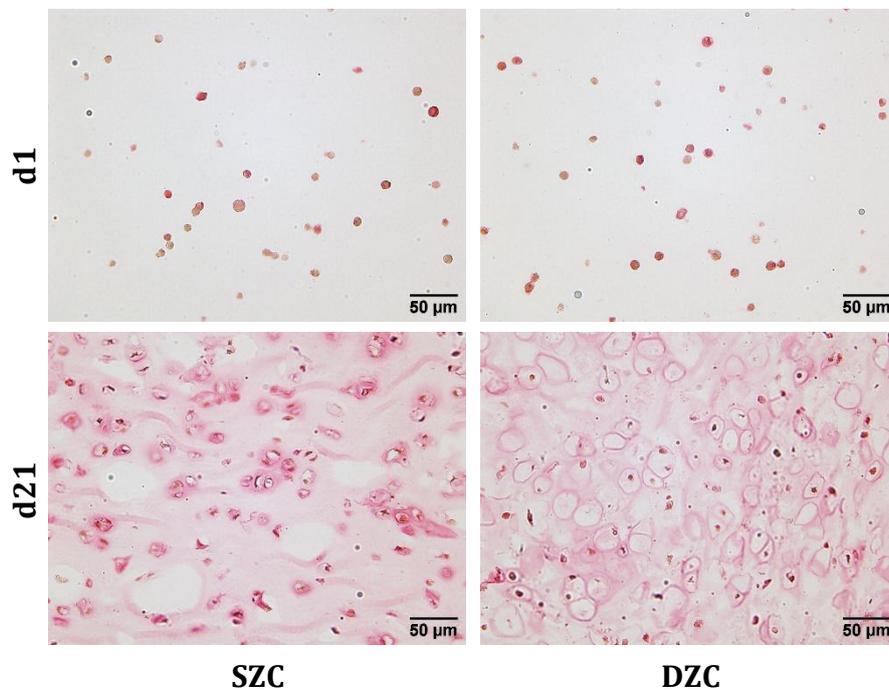


Abb. 3.6: Zellmorphologie der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, exemplarisch dargestellt durch Picro-Siriusrot-Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

3.2.4 Matrixproduktion

Die Produktion von EZM wurde zum einen durch histologische Färbungen, zum anderen durch biochemische Assays untersucht. Letztere bestimmten den quantitativen Gehalt an Hauptbestandteilen der EZM, welcher als absoluter Wert in μg , bezogen auf das Hydrogel, und als relativer Wert in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, bezogen auf den DNA-Gehalt der Gele, angegeben wurde.

3.2.4.1 Proteoglykane und Glykosaminoglykane

Zur Bestimmung des Gehalts an GAG und PRG in den Gelen dienten ein biochemischer GAG-Assay, die histologische Färbung mit Safranin O und die immunhistochemische Darstellung von Aggrekan, dem häufigsten PRG in Knorpel.

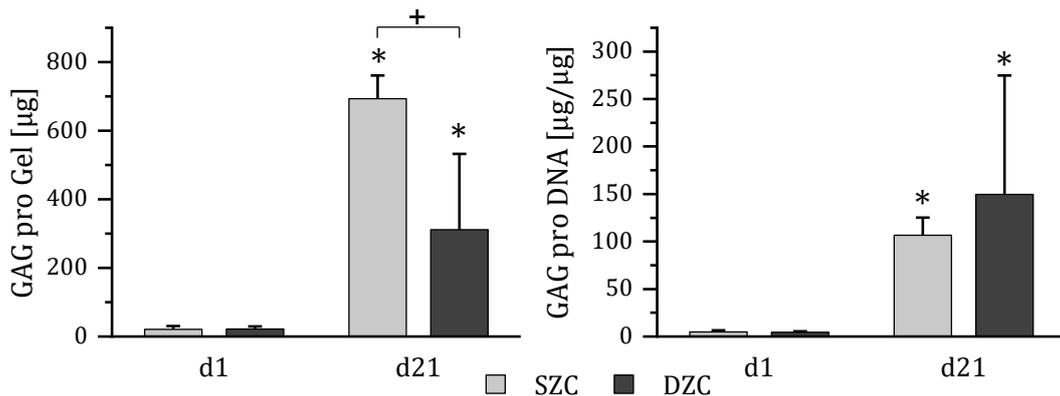


Abb. 3.7: GAG-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Gel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe an d1.

Laut GAG-Assay war an d1 noch kaum EZM in den Proben vorhanden, zwischen den Subpopulationen gab es keine signifikanten Unterschiede. Der MW lag bei $21,22 \mu\text{g}$ ($SD = 9,67$) für die SZC bzw. $22,11 \mu\text{g}$ ($SD = 7,86$) für die DZC. Bezogen auf den DNA-Gehalt errechnete sich somit ein MW von $4,78 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 1,85$) bzw. $4,41 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 0,93$). Die Steigerung sowohl des absoluten als auch des relativen GAG-Werts der jeweiligen Gruppen von d1 auf d21 war signifikant (jeweils $p < 0,001$ außer bei relativen GAG-Gehalt der SZC, hier $p = 0,024$). Die SZC produzierten innerhalb der drei Wochen in Kultur insgesamt signifikant mehr GAG im direkten Vergleich zu den DZC ($p < 0,001$) und enthielten an d21 einen MW von $692,94 \mu\text{g}$ ($SD = 68,01$), dies entsprach etwa dem 33-fachen des Ausgangswertes. Berechnete man den relativen GAG-Gehalt, ergab sich ein MW von $106,46 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 18,62$), eine Vervielfachung um den Faktor 22. Die Proben mit DZC hingegen steigerten den GAG-Gehalt insgesamt nur auf das gut 14-fache des MW an d1, nämlich auf $311,76 \mu\text{g}$ ($SD = 220,82$). Bezog man den Wert allerdings wiederum auf die GAG-Produktion pro DNA, ergab sich eine Steigerung um den Faktor 34 auf einen MW von $149,61 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 125,29$), also einen leicht höheren Wert als bei den SZC. Die Differenz im relativen GAG-Gehalt der Subpopulationen an d21 war nicht signifikant (Abb. 3.7).

In der Histologie wurden die Ergebnisse der biochemischen Analyse widerspiegelt. Sowohl in der Safranin O-Färbung als auch in der Aggrekan-Färbung erkannte man bei beiden Gruppen an d1 noch keine EZM um die Zellen herum (Abb. 3.8 und Abb. 3.9 jeweils obere Reihe). Vor allem in der Safranin O-Färbung wurde an d21

jedoch bereits ein großer Unterschied deutlich. Die Gele mit SZC waren insgesamt stärker gefärbt. Die EZM wurde parallel zu den Rändern des Gels ausgerichtet, außerdem ließ sich am oberen Rand eine etwas stärkere Färbung als in der Mitte bzw. am unteren Rand des Gels erahnen. Die EZM war über das gesamte Hydrogel auch in den Zellzwischenräumen verteilt. Die DZC wiesen eine deutlich schwächere Färbung mit Konzentration der EZM perizellulär auf. Hier schien die GAG-Konzentration am oberen Rand etwas geringer zu sein als in der Mitte des Gels. Parallel verlaufende Stränge wurden nicht beobachtet (Abb. 3.8 untere Reihe).

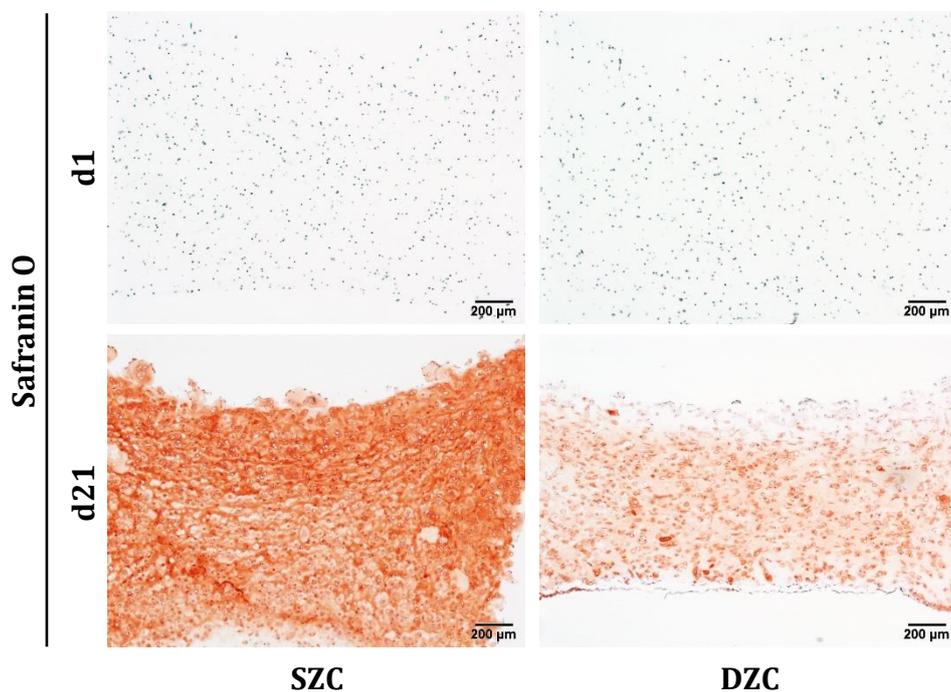


Abb. 3.8: GAG-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Safranin O-Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

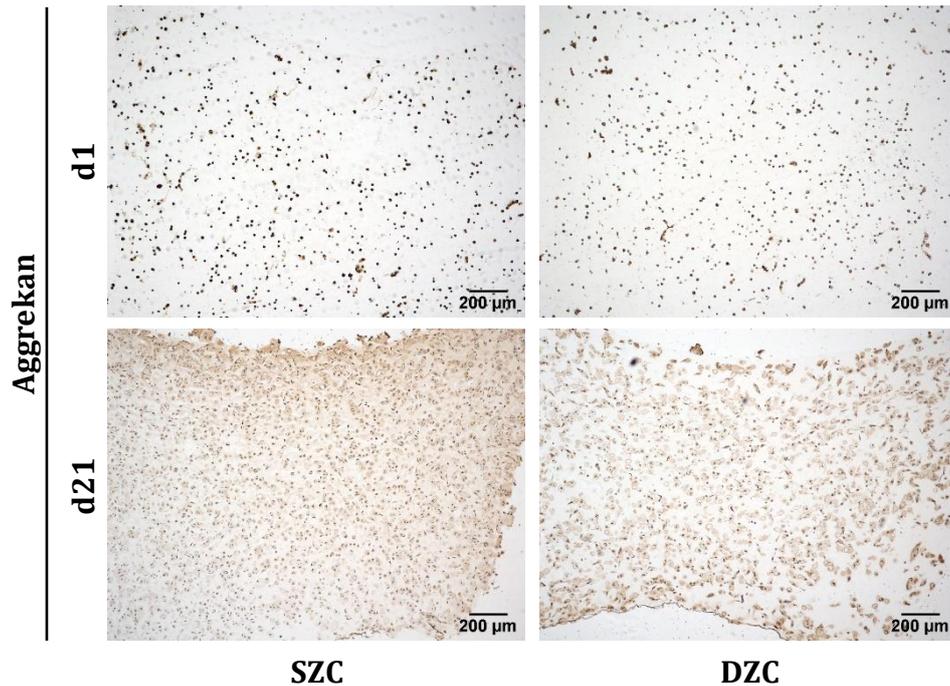


Abb. 3.9: Aggrecan-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

Die immunhistochemische Färbung auf Aggrecan lieferte ähnliche, aber weniger ausgeprägte Ergebnisse. Hier deutete die intensivere Färbung der Schnitte der Gele mit SZC eine höhere Konzentration an Aggrecan an, wiederum vor allem an der Oberfläche des Gels. Die DZC verteilten das PRG vor allem direkt perizellulär und kaum in die Zellzwischenräume (Abb. 3.9 untere Reihe).

3.2.4.2 Kollagene

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Methoden zur Bestimmung der Kollagenproduktion behandelt. Der biochemische HP-Assay und die Pikro-Siriusrot-Färbung geben nur einen Überblick über den Gesamtgehalt, da sie nicht zwischen den verschiedenen Kollagentypen unterscheiden. Zur genaueren Differenzierung diente die immunhistochemische Darstellung der Kollagene I, II und X.

An d1 der Kultur war laut HP-Assay kaum Kollagen in den Proben vorhanden, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht. Die Gele mit SZC enthielten durchschnittlich 19,28 µg ($SD = 4,68$) bzw. bezogen auf den DNA-Gehalt 5,22 µg/µg ($SD = 2,36$). Die Gele mit DZC enthielten im Mittel 22,65 µg ($SD = 3,55$)

bzw. $5,47 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 1,83$). Nach 21 Tagen steigerten beide Gruppen den absoluten Kollagengehalt signifikant im Vergleich zu d1 (SZC: $p < 0,001$; DZC: $p = 0,008$). Die SZC produzierten auf das gesamte Gel gerechnet signifikant mehr Kollagen als die DZC ($p < 0,001$) und enthielten an d21 durchschnittlich $136,32 \mu\text{g}$ ($SD = 21,53$), eine Zunahme um den Faktor 7. In den Gelen mit DZC stieg der Kollagengehalt insgesamt hingegen nur um das 2,4-fache auf $54,87 \mu\text{g}$ ($SD = 19,36$). Auch der relative Kollagengehalt stieg zwischen d1 und d21 in beiden Gruppen deutlich an, der Unterschied war allerdings nur bei den DZC signifikant ($p < 0,001$). Normiert auf den DNA-Gehalt ergab sich eine signifikant höhere Produktionsrate bei den DZC ($p = 0,015$). Während die Gele mit SZC im Mittel nur $21,57 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 3,93$) Kollagen pro DNA aufwiesen, lag dieser Wert bei Gelen mit DZC bei $55,80 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 30,15$). Die Vervielfachungsraten lagen im Vergleich zwischen den beiden Gruppen dementsprechend bei ca. 4,1 bzw. 10 (Abb. 3.10).

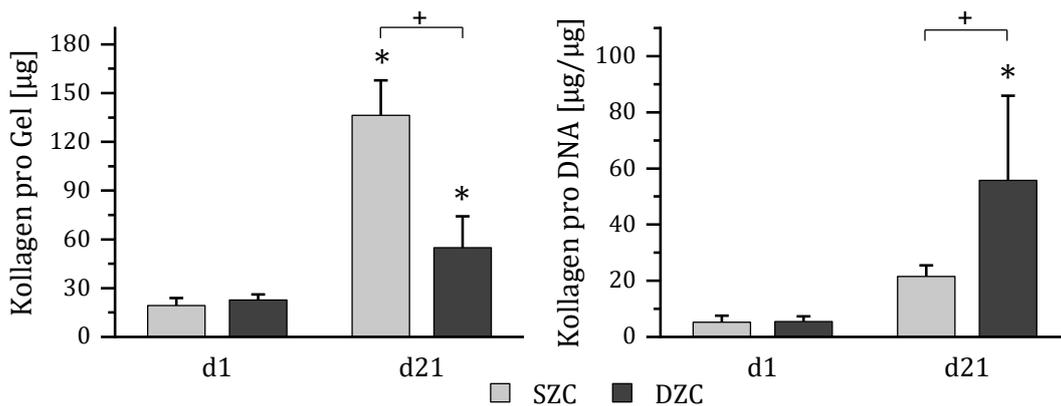


Abb. 3.10: Kollagengehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Gel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe an d1.

In der histologischen Färbung mit Picro-Siriusrot waren diese Tendenzen ebenso zu erkennen. An d1 war in beiden Gruppen kaum EZM vorhanden. Nach 21 Tagen war die Farbtintensität bei den SZC ausgeprägter. Vor allem die äußeren Bereiche der Gele schienen mehr Kollagen zu beinhalten, die EZM war relativ gleichmäßig über den Interzellularraum verteilt. In den Hydrogelen mit DZC lag dagegen insgesamt weniger Kollagen vor, es war vor allem perizellulär lokalisiert (Abb. 3.11).

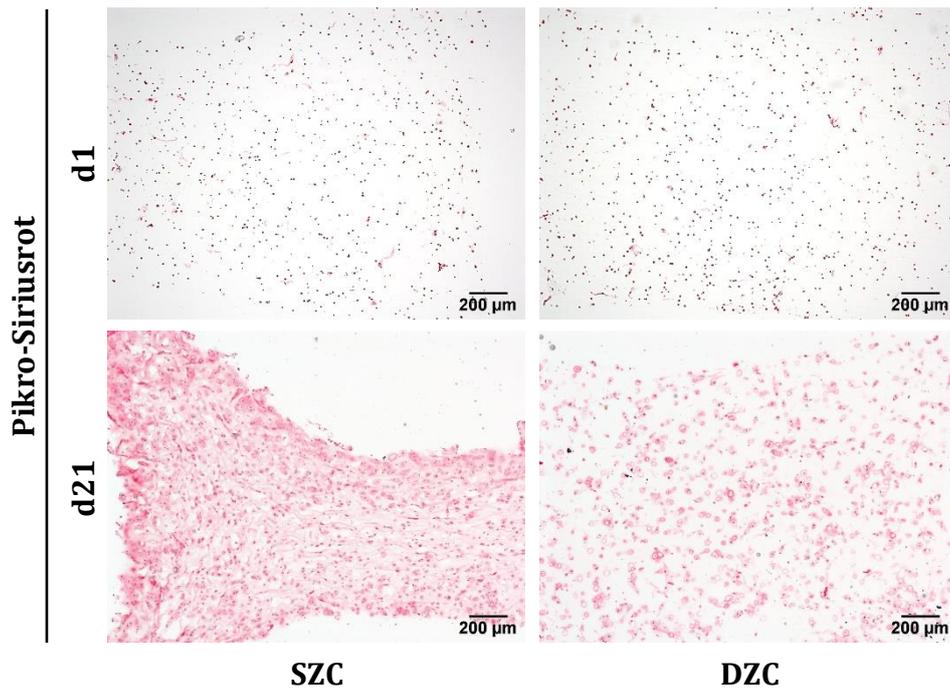


Abb. 3.11: Gehalt an Gesamtkollagen der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Picro-Siriusrot-Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

Die immunhistochemischen Färbungen der einzelnen Kollagen-Typen brachten alle in etwa die gleichen Ergebnisse. Während an d1 fast ausschließlich die Zellkerne gefärbt waren, haben die Chondrozyten in den drei Wochen in Kultur alle drei untersuchten Kollagene produziert. Die Gele mit SZC zeigten dabei stets eine intensivere Färbung, jedoch variierten bei den einzelnen Kollagen-Typen die Differenzen zwischen den beiden Gruppen. Die SZC waren reich an Kollagen II, wiederum schien die EZM das gesamte Gel, also auch die Zellzwischenräume zu durchziehen. Die DZC wiesen im Vergleich weniger Kollagen II auf. Bei den Färbungen auf Kollagen I und Kollagen X fielen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen weniger auf (Abb. 3.12, Abb. 3.13 und Abb. 3.14).

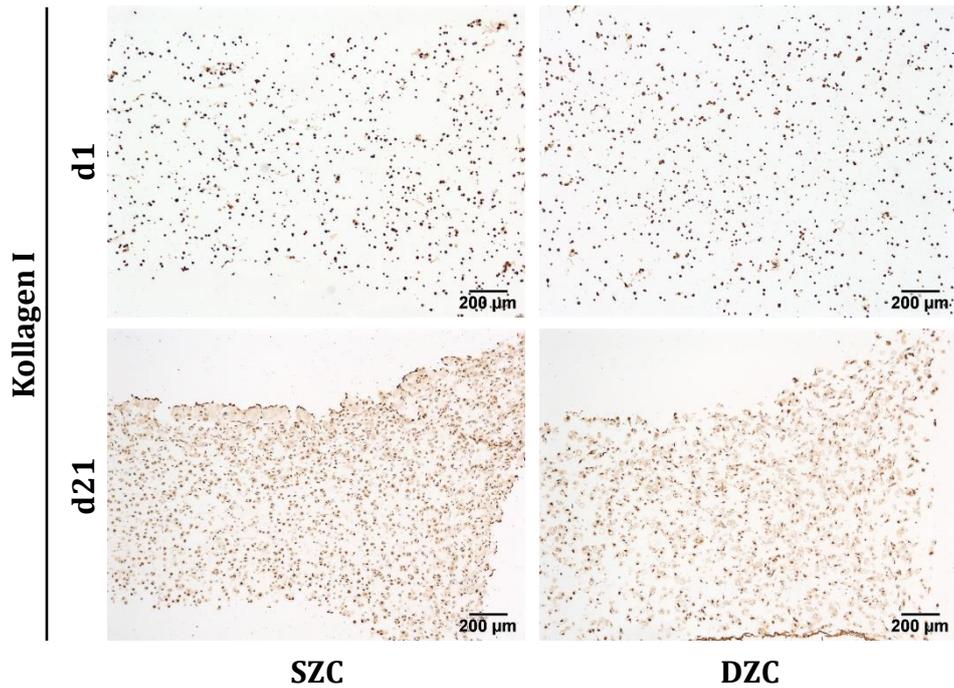


Abb. 3.12: Kollagen I-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

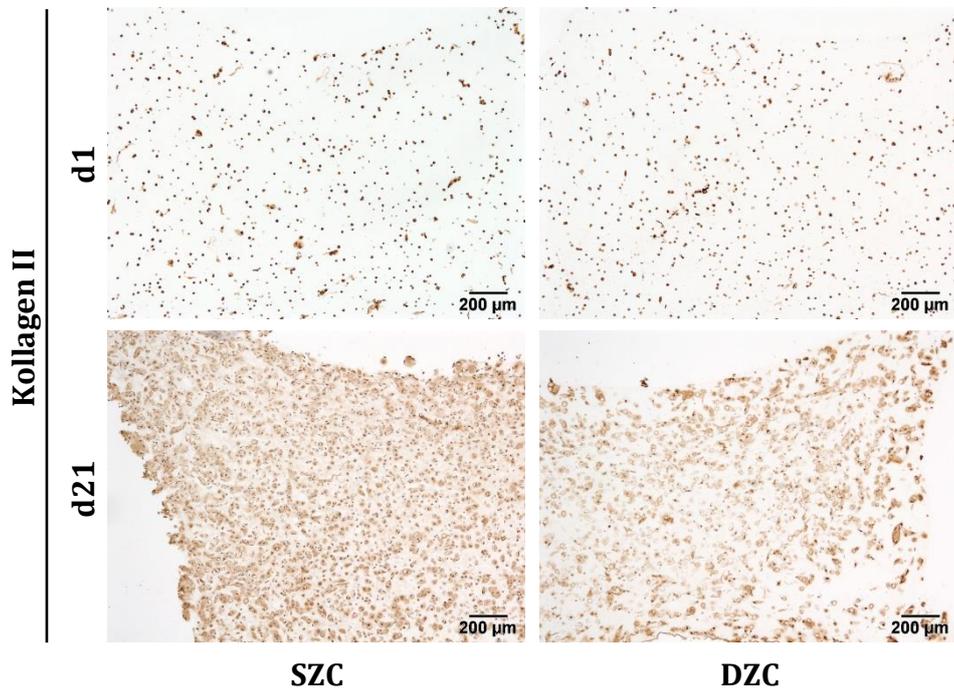


Abb. 3.13: Kollagen II-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

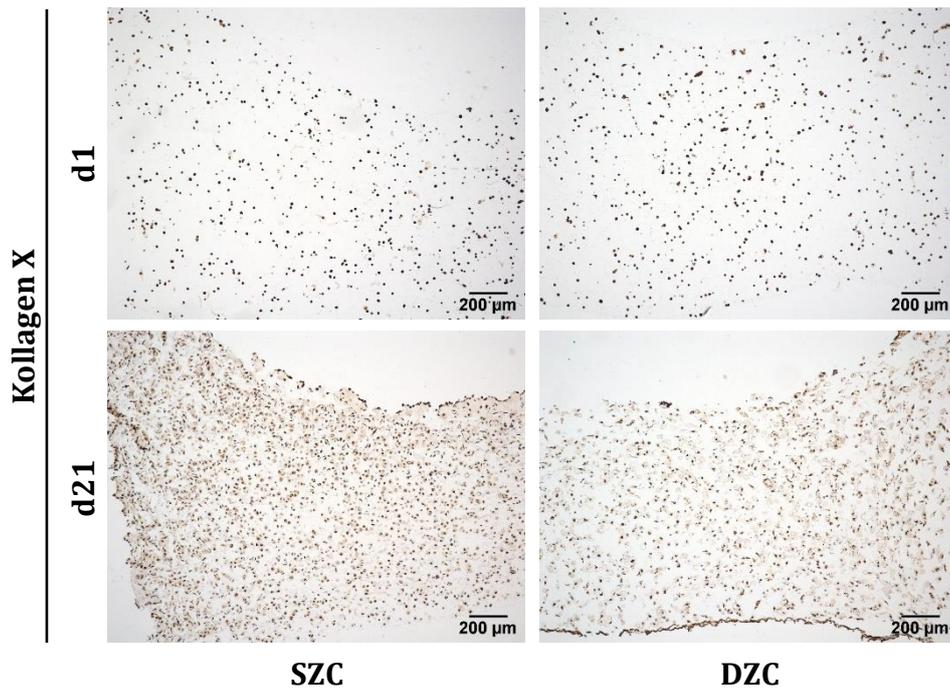


Abb. 3.14: Kollagen X-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

3.3 Gemischte und zonale Gele in der Redifferenzierungsphase

In jedem Versuch wurde außerdem eine Gruppe von zonalen Gelen getestet, die der hierarchischen Organisation des Gelenkknorpels näherkommen sollte. Als Kontrolle dienten dabei Gele, in denen SZC und DZC gemischt waren. An d1 waren die Resultate in allen untersuchten Endpunkten analog zu denen der reinen Gele mit SZC und mit DZC. Daher werden hier nur die Ergebnisse nach drei Wochen Inkubation miteinander verglichen. Zum besseren Vergleich und zur Signifikanzbestimmung sind in den Diagrammen die Ergebnisse der Gele mit nur SZC bzw. DZC noch einmal abgebildet.

3.3.1 Zellviabilität und -vitalität

Wieder überwog der Anteil an viablen Chondrozyten in beiden Gruppen deutlich gegenüber dem Anteil an avitalen Zellen, die Anzahl der avitalen Zellen war im Vergleich der beiden Gruppen zueinander ähnlich (Abb. 3.15; vgl. SZC/DZC: Abb. 3.4).

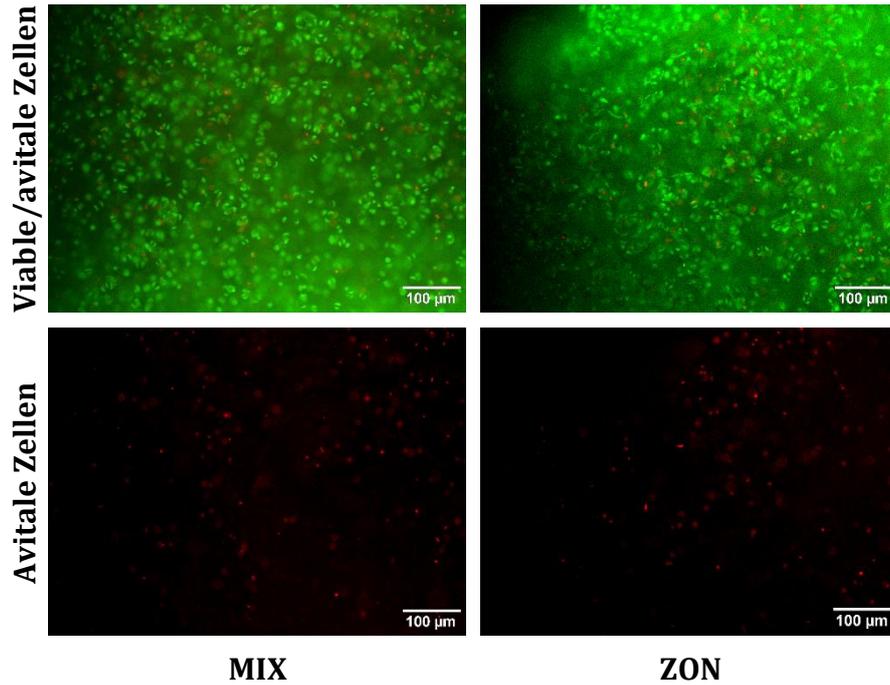


Abb. 3.15: Viabilität bzw. Vitalität der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Oben viable und avitale, unten nur avitale Zellen. MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele.

3.3.2 DNA-Gehalt

Der DNA-Gehalt der gemischten und zonalen Gele an d21 unterschied sich kaum voneinander. Im Mittel betrug er 6,78 µg ($SD = 3,72$) in den gemischten Gelen und 5,83 µg ($SD = 2,15$) in den zonalen. Damit lagen diese beiden Versuchsgruppen nah am Wert von den Gelen mit SZC, es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Abb. 3.16).

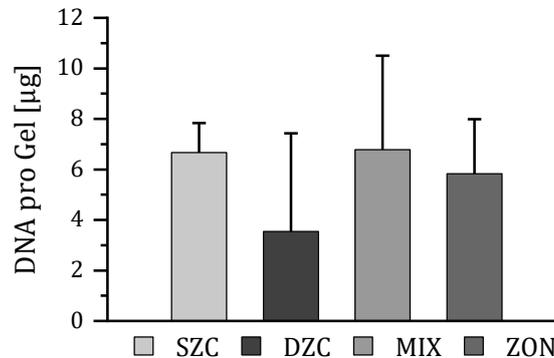


Abb. 3.16: DNA-Gehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele.

3.3.3 Zellmorphologie

Exemplarisch wird hier zur Darstellung der Zellmorphologie wiederum nur eine histologische Färbung, die Safranin O-Färbung, abgebildet. Zur besseren Orientierung werden zwei Vergrößerungen der Schnitte gezeigt, die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht ist mit Pfeilen markiert.

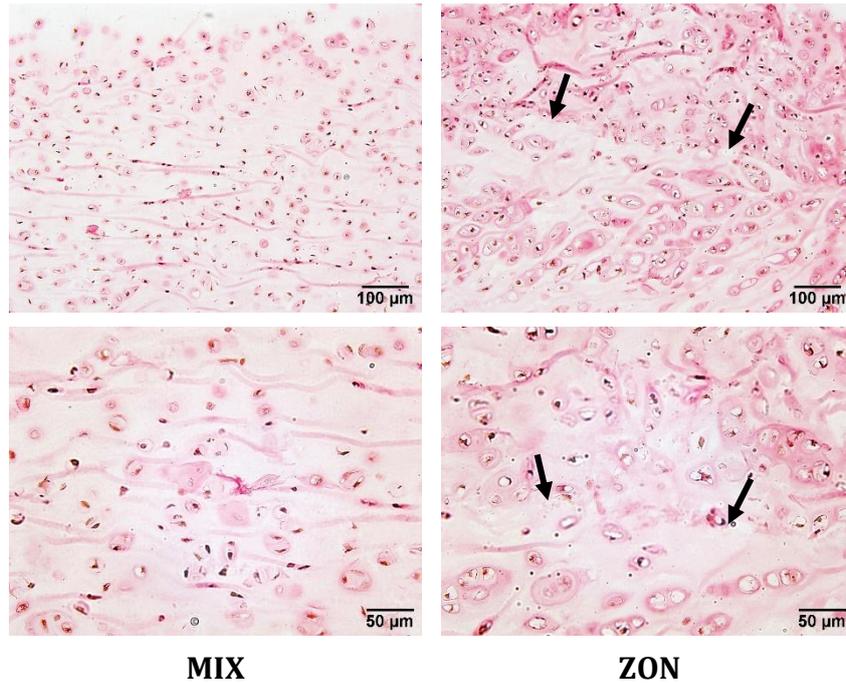


Abb. 3.17: Zellmorphologie der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in unterschiedlichen Vergrößerungen, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele.

Die gemischten Gele enthielten gleichmäßig verstreute kleinere und größere Zellen und eine homogen im Extrazellulärraum verteilte EZM. In den zonalen Hydrogelen dagegen war die unterschiedliche Morphologie der SZC und DZC in ihrer jeweiligen Gelschicht deutlich zu erkennen. In jedem Schnitt und bei jeder Färbung ließ sich die Grenze zwischen den beiden Versuchsgruppen zweifelsfrei festlegen. Der obere Teil der Gele mit den SZC war meist etwas schmaler bezogen auf die gesamte Höhe des Hydrogels. Er zeigte kleine Zellen mit wenig Zytoplasma, die dicht aneinander gereiht lagen und viel EZM um sich herum gebildet hatten. Im unteren Teil der Gele zeigte sich hingegen das Bild der DZC, mit weniger, dafür größeren Zellen, mehr Zytoplasma und weniger angefärbter EZM (Abb. 3.17; vgl. SZC/DZC: Abb. 3.6)

3.3.4 Matrixproduktion

3.3.4.1 Proteoglykane und Glykosaminoglykane

Auch bei den gemischten und zonalen Konstrukten wurde der Gehalt an EZM durch die bereits beschriebenen Methoden geprüft. In der quantitativen GAG-Messung konnte zwischen diesen beiden Versuchsgruppen weder ein signifikanter Unterschied beim GAG-Gehalt des gesamten Gels noch bei dem Wert bezogen auf den DNA-Gehalt beobachtet werden. Sowohl die gemischten als auch die zonalen Gele erzielten einen ähnlichen MW im gesamten Gel wie die reinen SZC-Zellkulturen, im Mittel 719,55 μg ($SD = 127,69$) bzw. 679,86 μg ($SD = 39,58$). Beide enthielten einen signifikant höheren GAG-Gehalt als die Gele mit DZC (jeweils $p < 0,001$). Bezogen auf den DNA-Gehalt der Gele lagen die Werte zwischen denen von SZC und DZC, nämlich bei 127,37 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 59,72$) bei den gemischten bzw. 134,51 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 58,06$) bei den zonalen Konstrukten, ohne signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 3.18).

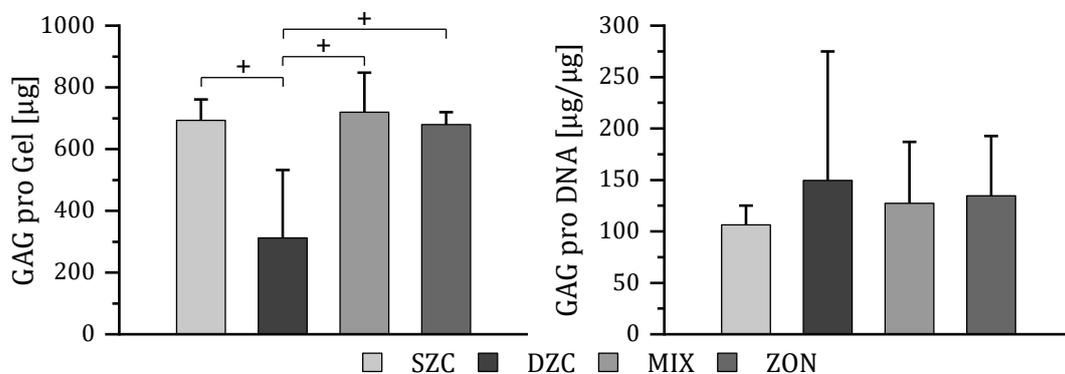


Abb. 3.18: GAG-Gehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen.

Auch hier korrelierte die Histologie mit den Ergebnissen der quantitativen Messung. In den histologischen Färbungen zeigte sich bei den beiden Versuchsgruppen jedoch eine unterschiedliche Verteilung der EZM innerhalb des Hydrogels. Während die Schnitte der gemischten Gele gleichmäßig angefärbt wurden, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der oberflächlichen und tiefen Schicht bei den zonalen Gelen. Die oberflächliche Schicht war im Gegensatz zur tiefen geschrumpft und

wesentlich schmaler. Allerdings enthielt sie deutlich mehr GAG und Aggrekan als die tiefe Schicht. Direkt am Übergang zwischen den beiden Zonen war der Extrazellulärraum zwischen den DZC stärker angefärbt als weiter peripher. In der Safranin O-Färbung war dieses Phänomen noch besser zu erkennen als in der immunhistochemischen Färbung auf Aggrekan (Abb. 3.19; vgl. SZC/DZC: Abb. 3.8; Abb. 3.9).

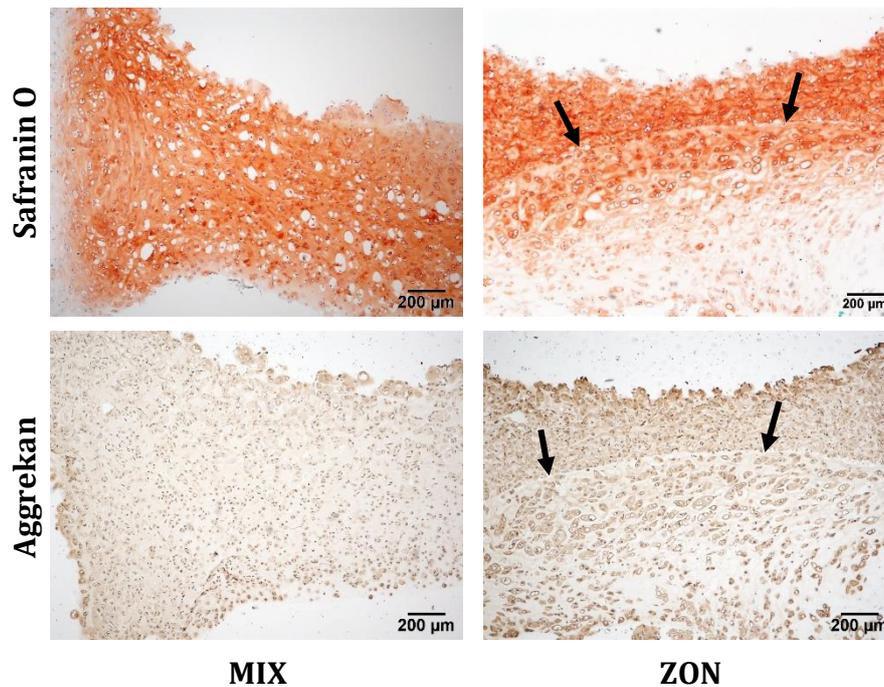


Abb. 3.19: GAG- bzw. Aggrekan-Gehalt der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Safranin O- bzw. immunhistochemische Färbung. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele.

3.3.4.2 Kollagene

Analog zu den Ergebnissen der GAG-Analyse gab es zwischen den beiden Versuchsgruppen auch in der quantitativen Kollagen-Messung keine signifikanten Differenzen insgesamt sowie bezogen auf den DNA-Gehalt. Im Vergleich zu den reinen SZC- bzw. DZC-Gelen waren die absoluten Werte im Kollagengehalt tendenziell höher, 178,96 µg ($SD = 52,55$) bei den gemischten bzw. 146,36 µg ($SD = 9,25$) bei den zonalen Gelen, der Unterschied zu den DZC war jeweils signifikant (jeweils $p < 0,001$). Bezogen auf den DNA-Gehalt der Gele lagen die Werte zwischen denen von SZC und DZC, ohne signifikante Unterschiede. Dies entsprach 39,64 µg/µg ($SD = 20,45$) bei

den gemischten bzw. 33,71 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 15,33$) bei den zonalen Konstrukten (Abb. 3.20).

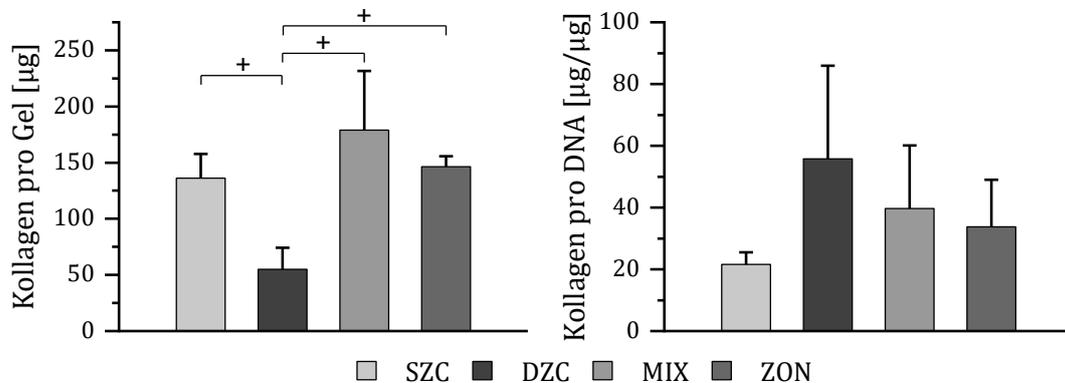


Abb. 3.20: Kollagengehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen.

Die Tendenzen im quantitativen Kollagengehalt deckten sich wiederum mit den Ergebnissen der Pikro-Siriusrot-Färbung. Es ließ sich eine unterschiedliche Verteilung der EZM innerhalb der Hydrogele feststellen. Während die gemischten Gele homogen angefärbt wurden, konnten bei den geschichteten Gelen zwei Zonen unterschiedlicher Farbintensität identifiziert werden. Auch hier ließ sich in der unteren Schicht in der Nähe des zonalen Übergangs eine tendenziell etwas stärkere Färbung als weiter peripher erahnen, wenn auch nicht so eindrücklich wie in der Safranin O-Färbung (Abb. 3.21 erste Reihe).

Die weiteren immunhistochemischen Färbungen sollten Aufschluss über die Zusammensetzung des Gesamtkollagens geben. In der oberen Schicht der zonalen Gele war die Färbung stets intensiver. Bei Kollagen I war der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen in den zonalen Gelen am geringsten, bei Kollagen II am stärksten. Besonders in der Kollagen II-Färbung nahm wiederum die Farbintensität der unteren Schicht in der Nähe des Übergangs zur oberen Schicht zu. Der Gehalt an Kollagen X war bei beiden Versuchsgruppen insgesamt gering (Abb. 3.21 zweite bis vierte Reihen; vgl. SZC/DZC: Abb. 3.11-Abb. 3.14).

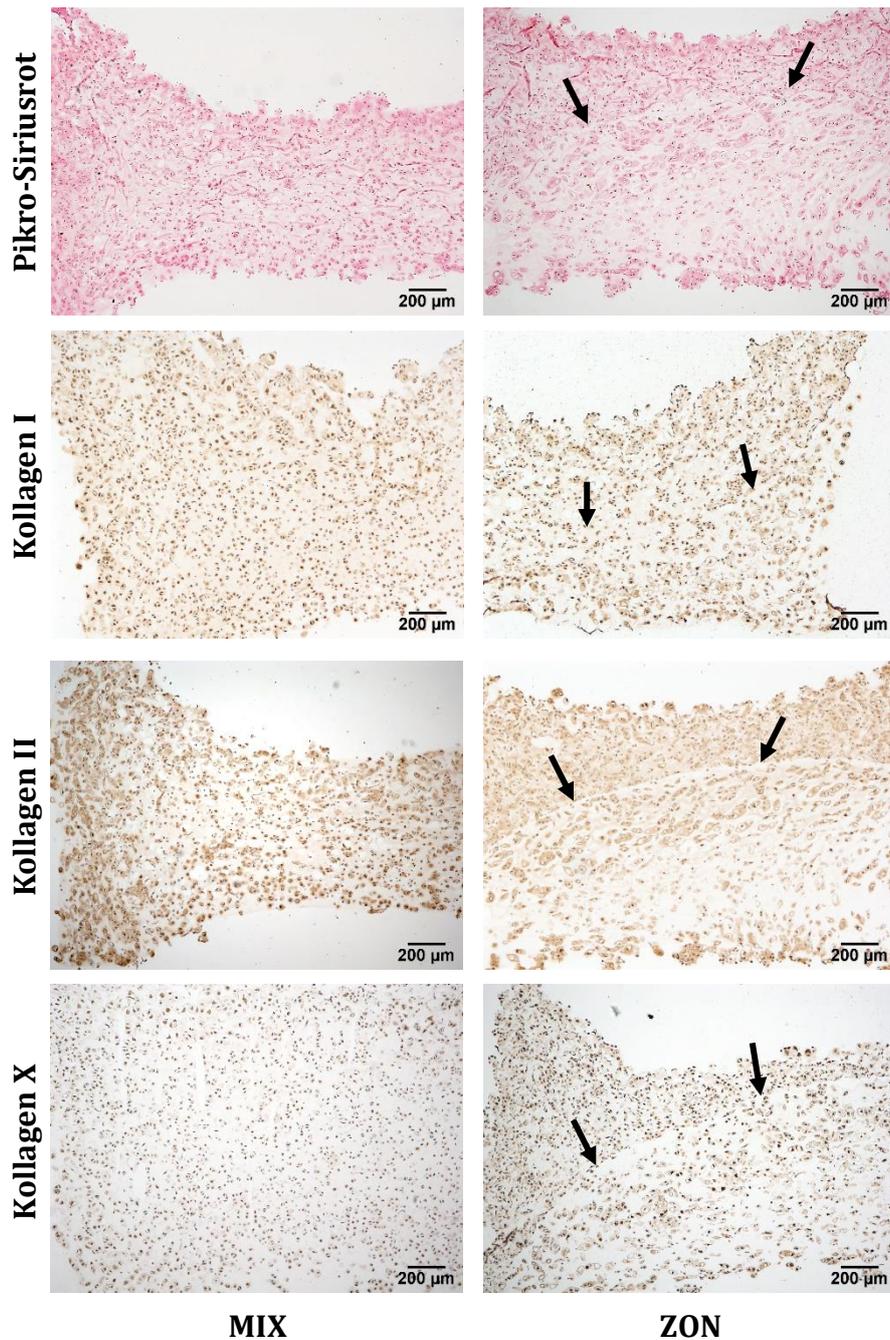


Abb. 3.21: Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I, II bzw. X der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Pikro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. MIX: gemischte Hydrogele, ZON: zonale Hydrogele.

3.4 Weitere Einflussfaktoren

In diesem Abschnitt werden nun die Ergebnisse aus der Expansions- und der Redifferenzierungsphase nach Modifikation des Basisprotokolls dargestellt. Es wurden

alle Methoden wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben zur Auswertung angewandt, mit Ausnahme der quantitativen Kollagen-Messung sowie der immunhistochemischen Färbungen auf Aggrekan und Kollagen X, auf die in einzelnen Versuchen verzichtet wurde. Dies ist in den jeweiligen folgenden Abschnitten gekennzeichnet. In den Diagrammen sind die Ergebnisse der jeweiligen Vergleichsgruppen im bisher beschriebenen Basisprotokoll zur Signifikanzberechnung noch einmal abgebildet. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf SZC, DZC und zonalen Konstrukten lag, wurde zur besseren Übersicht die Versuchsgruppe der gemischten Gele nicht mehr abgebildet.

3.4.1 Sauerstoffkonzentration in der Umgebung

In jedem Versuch wurde eine Kulturplatte bei 21 % und eine bei 2 % Sauerstoff in der Umgebungsluft inkubiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Als Negativkontrolle diente hier analog zum Basisprotokoll die Zellkulturplatte, die nach einem Tag unter normoxischen Bedingungen geerntet wurde. Da die Ergebnisse dieser Kontrollgruppe bereits in Abschnitt 3.2 aufgeführt wurden und hier besonders die Unterschiede zwischen Kultivierung in Normoxie und Hypoxie herausgearbeitet werden sollen, wird auf eine erneute Darstellung der Daten von d1 verzichtet.

In der Viabilität der Zellen war kaum ein Unterschied zu den Versuchsgruppen in Normoxie feststellbar. Die Gruppe der Gele mit DZC schien jedoch in Hypoxie einen geringeren Anteil avitaler Zellen aufzuweisen als in Normoxie (Abb. 3.22; vgl. Normoxie: Abb. 3.4; Abb. 3.15).

Auch im DNA-Gehalt der Gele an d21 gab es keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen den drei Versuchsgruppen in Hypoxie noch zu ihren jeweiligen Vergleichsgruppen in Normoxie. Die Mittelwerte lagen zwischen 5,98 μg ($SD = 3,54$) bei den SZC und 8,27 μg ($SD = 4,34$) bei den zonalen Gelen (Abb. 3.23).

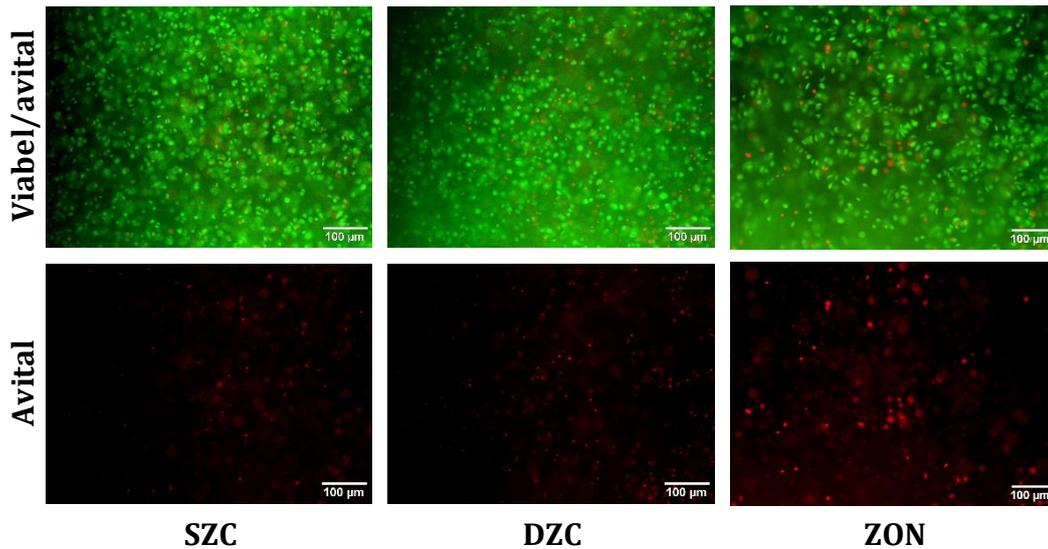


Abb. 3.22: Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Oben viable und avitale, unten nur avitale Zellen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

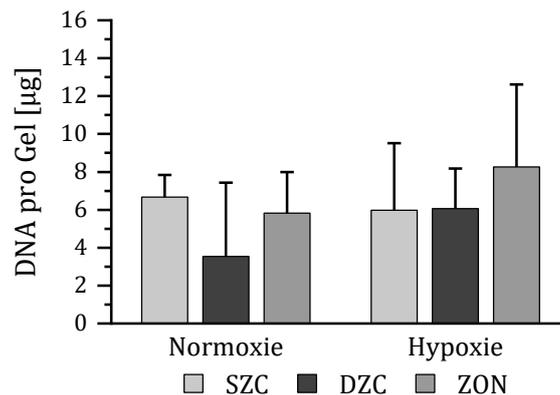


Abb. 3.23: DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Die morphologischen Eigenschaften der beiden Zelltypen von SZC und DZC waren auch in der Hypoxie-Gruppe gut erkennbar. Nach 21 Tagen in 3D-Kultur wiesen die SZC sowohl in den reinen als auch den zonalen Gelen wenig Zytoplasma auf, die Zellen lagen zu kleinen Gruppen aneinander und die EZM war auch in den Zellzwischenräumen homogen verteilt. In den Hydrogelen mit DZC sowie in der unteren Schicht der zonalen Gele dagegen fanden sich vor allem Zellen mit hohem Zytoplasma-Anteil, die demzufolge insgesamt größer waren und die EZM um sich herum konzentrierten (Abb. 3.24; vgl. Normoxie: Abb. 3.6; Abb. 3.17).

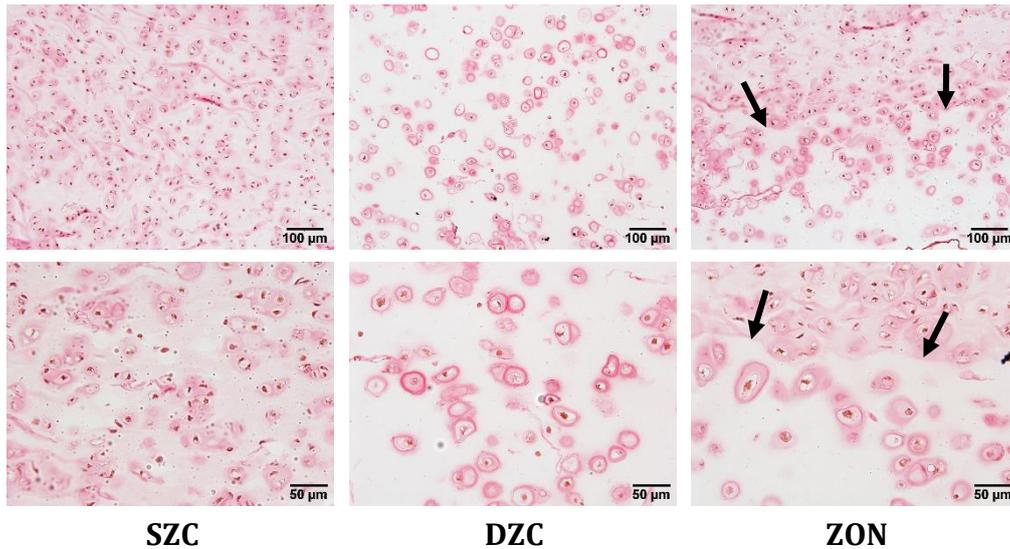


Abb. 3.24: Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Der absolute GAG-Gehalt der SZC- sowie der zonalen Gele lag in Hypoxie signifikant unter dem der jeweiligen Vergleichsgruppe in Normoxie (SZC: $p = 0,026$, ZON: $p < 0,001$). Außerdem war, analog zu den Ergebnissen aus der Normoxie, der GAG-Gehalt pro Gel in Hypoxie bei den DZC mit $164,27 \mu\text{g}$ ($SD = 54,93$) signifikant geringer als bei den SZC mit $513,77 \mu\text{g}$ ($SD = 70,84$) ($p < 0,001$) und den zonalen Gelen mit $365,13 \mu\text{g}$ ($SD = 71,61$) ($p = 0,004$). Im GAG-Gehalt pro DNA gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in Hypoxie. Die SZC- bzw. zonalen Gele enthielten ähnlich zu ihren Vergleichsgruppen in Normoxie im Mittel $117,67 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 74,93$) bzw. $55,40 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 26,70$) GAG pro DNA. Bei den DZC lag der Wert mit $31,05 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 14,53$) jedoch signifikant unter dem Vergleichswert in Normoxie ($p = 0,006$) (Abb. 3.25).

Die Ergebnisse der Histologie waren gut vereinbar mit den Ergebnissen der quantitativen Messung. Sowohl in der Safranin O- als auch in der immunhistochemischen Färbung auf Aggrekan wurden die Bereiche der Gele, die SZC enthielten, stärker angefärbt. Insbesondere in der Safranin O-Färbung war bei den zonalen Gelen auch hier eine intensivere Färbung der tiefen Schicht in der Nähe der Übergangszone zu beobachten (Abb. 3.26; vgl. Normoxie: Abb. 3.8; Abb. 3.9; Abb. 3.19).

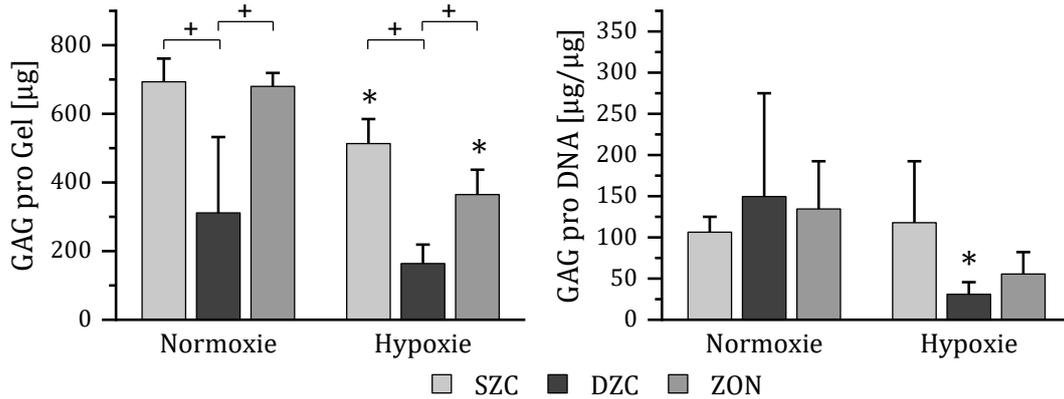


Abb. 3.25: GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in µg und pro DNA in µg/µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe in Normoxie.

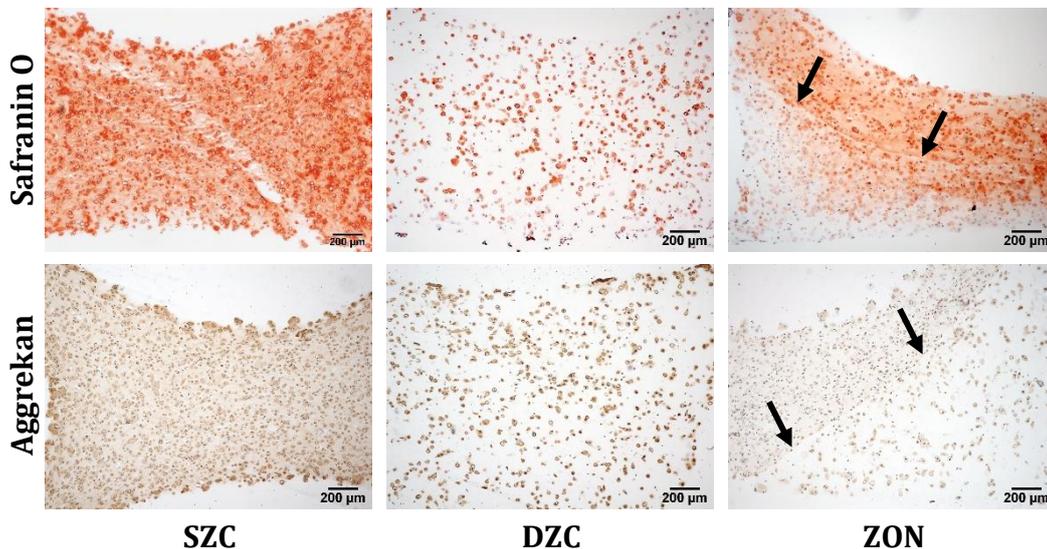


Abb. 3.26: GAG- bzw. Aggrekan-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Safranin O- bzw. immunhistochemische Färbung. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Ähnlich verhielt es sich mit dem Kollagengehalt der Zellkulturen. Die Gele mit SZC und die zonalen Gele, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, beinhalteten mit 119,10 µg ($SD = 15,52$) bzw. 95,77 µg ($SD = 12,89$) signifikant mehr Kollagen pro Gel als die DZC-Gele mit 60,01 µg ($SD = 20,98$) ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,017$). Nur bei den zonalen Gelen lag dieser Wert signifikant unter dem Vergleichswert in Normoxie ($p < 0,001$). Im Kollagengehalt pro DNA waren die Unterschiede der einzelnen Gruppen untereinander, ähnlich wie beim relativen GAG-Gehalt, nicht

signifikant. Die SZC enthielten $32,32 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 15,10$), die zonalen Gele $12,75 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 7,08$). Die DCZ wiesen in Hypoxie wiederum mit $12,06 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 8,31$) einen signifikant niedrigeren Wert als in Normoxie auf ($p < 0,001$) (Abb. 3.27).

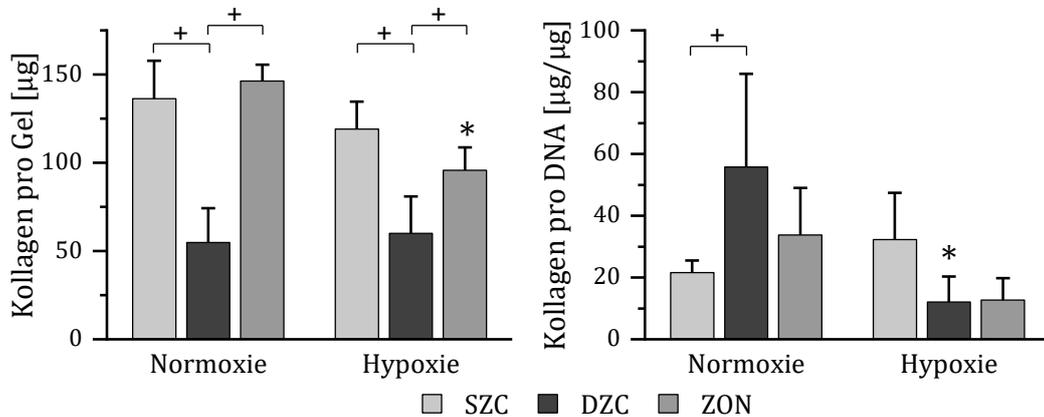


Abb. 3.27: Kollagengehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe in Normoxie.

In der Picro-Siriusrot-Färbung wurden die Unterschiede im Kollagengehalt der Gele ebenso dargestellt. Die immunhistochemischen Färbungen der verschiedenen Kollagen-Typen erbrachten ähnliche Ergebnisse wie in der Kultur unter normoxischen Bedingungen. Insgesamt schienen die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen etwas geringer zu sein, insbesondere in der Färbung auf Kollagen I. Die Kollagene I und X konzentrierten sich bei beiden Zelltypen perizellulär, genauso wie Kollagen II bei den DZC. Lediglich zwischen den SZC zeigte sich Kollagen II relativ homogen verteilt (Abb. 3.28; vgl. Normoxie: Abb. 3.11-Abb. 3.14; Abb. 3.21).

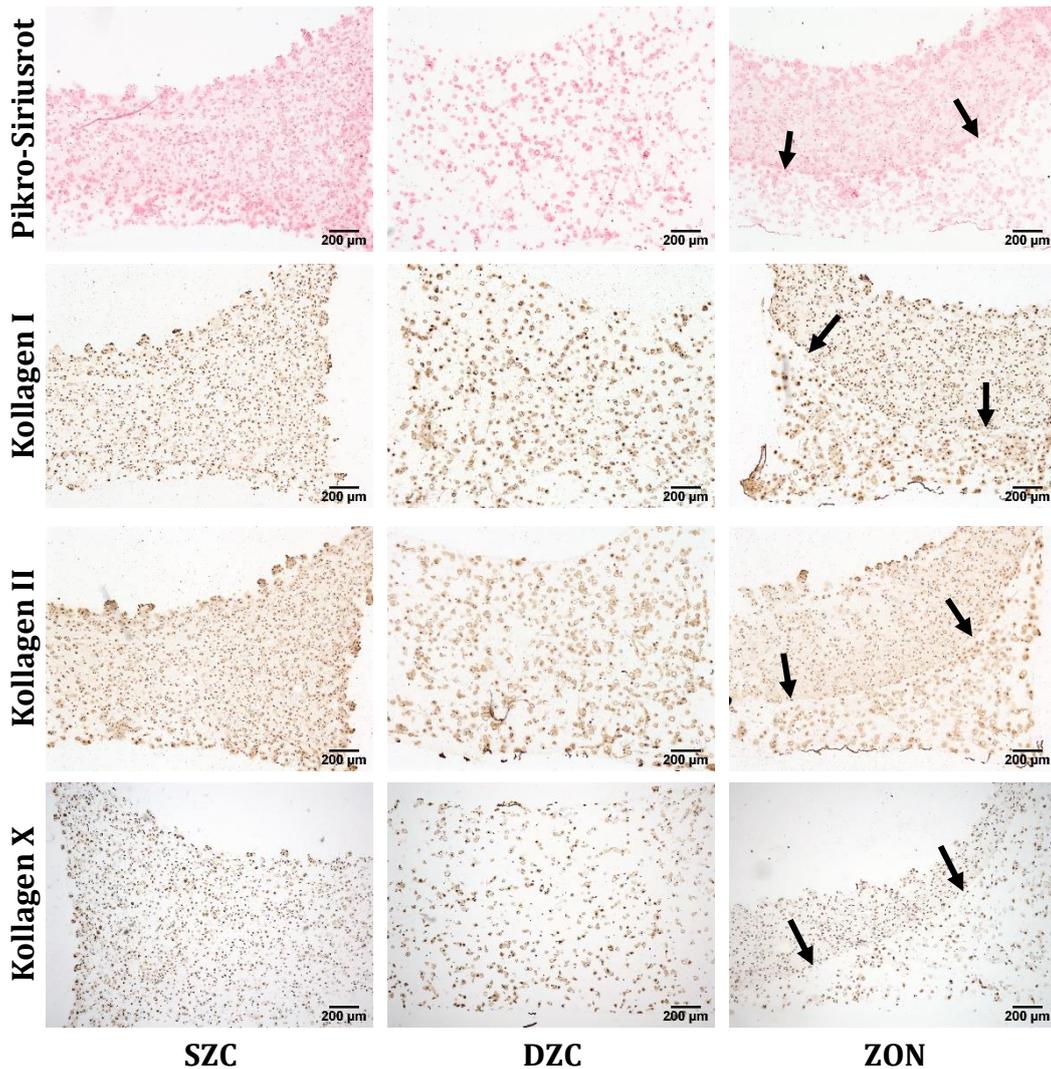


Abb. 3.28: Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I, II bzw. X der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Pikro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

3.4.2 Konfluenz in der Expansionsphase

Wie in Kapitel 3.1.2 bereits erwähnt, erreichten die DZC die 80%ige Konfluenz in der Expansionsphase schneller als die SZC. Um auszuschließen, dass die Konfluenz des Zellrasens bei Trypsinierung einen Einfluss auf das spätere Verhalten der Chondrozyten in der Redifferenzierungsphase habe und dass die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen damit zu erklären seien, wurden zusätzlich einige Zellkulturflaschen mit SZC zwölf Tage inkubiert und die Zellen erst dann in Hydrogele inkorporiert. Die Ergebnisse wurden mit den Gelen aus SZC verglichen, die nach

sieben Tagen mit einer 50%igen Konfluenz weiterverwendet wurden, sowie mit den DZC, die nach diesem Zeitraum bereits eine 80%ige Konfluenz aufwiesen.

Nach zwölf Tagen in den Zellkulturflaschen erreichten die SZC eine nahezu 90%ige Konfluenz (Abb. 3.29; vgl. 7 Tage Expansionsphase: Abb. 3.1). Die Zellzahl stieg dabei auf das vier- bzw. zehnfache ($MW = 7,2$; $SD = 4,0$). Aufgrund der geringen Stichprobengröße sowie der großen Abweichungen zwischen den einzelnen Donorgruppen waren die Unterschiede zu den SZC und DZC nach siebentägiger Monoschichtkultur nicht signifikant (Abb. 3.30).



Abb. 3.29: Zelldichte in Kulturflaschen der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 12 Tagen in Monoschichtkultur, dargestellt durch Auflichtmikroskopie.

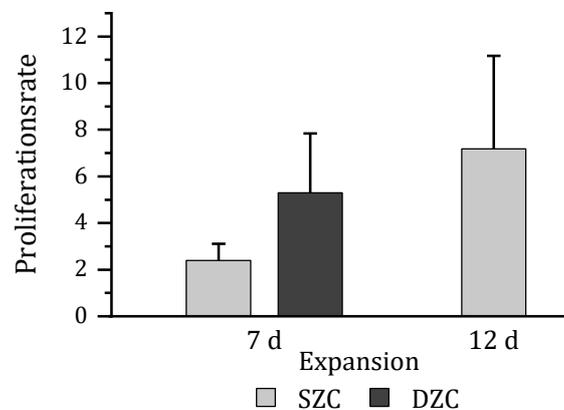


Abb. 3.30: Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der Versuchsgruppen jeweils nach 7 bzw. 12 Tagen in Monoschichtkultur. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

Im Live/Dead-Assay nach dreiwöchiger 3D-Zellkultur konnte kein Unterschied zu den Proben mit kürzerer Expansionsphase erkannt werden. Der Anteil avitaler Zellen im Vergleich zu viablen Zellen war sehr gering (Abb. 3.31; vgl. 7 Tage Expansionsphase: Abb. 3.4).

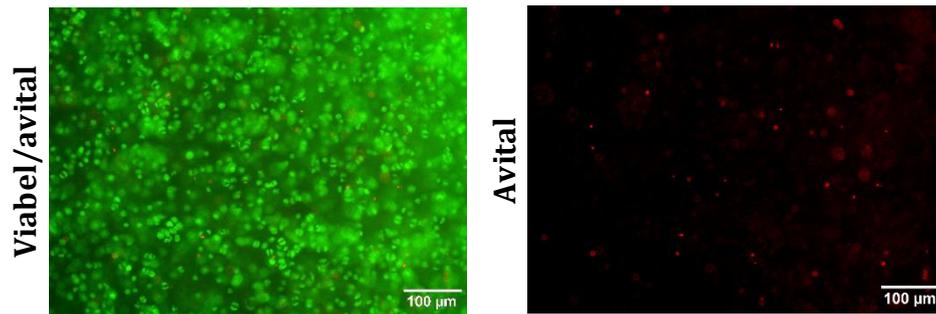


Abb. 3.31: Viabilität bzw. Vitalität der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Links viable und avitale, rechts nur avitale Zellen.

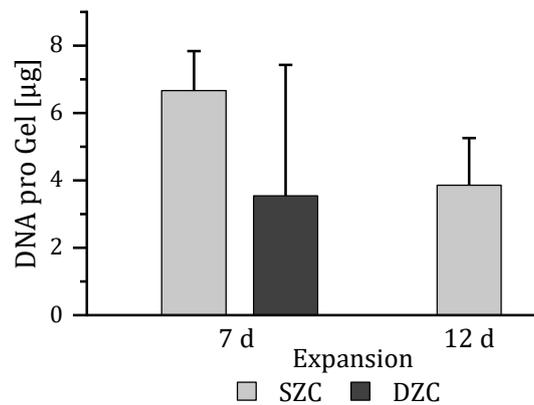


Abb. 3.32: DNA-Gehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.



Abb. 3.33: Zellmorphologie der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, exemplarisch dargestellt durch Picro-Siriusrot-Färbung.

Die Gele mit den SZC, die länger in Monoschicht expandiert wurden, enthielten etwas weniger DNA als die anderen SZC-Gele und lagen im Bereich der DZC-Gele, nämlich bei $3,85 \mu\text{g}$ ($SD = 1,40$). Die Differenzen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 3.32).

Morphologisch ähnelten die Zellen eindeutig den SZC, die nur sieben Tage in Monoschichtkultur proliferierten. Es überwogen kleine Zellen mit wenig Zytoplasma. Die Zellkerne waren oft halbmondförmig, die EZM auch in den Zellzwischenräumen gleichmäßig verteilt. Auch hier ließ sich eine horizontale Schichtung der EZM erahnen (Abb. 3.33; vgl. 7 Tage Expansionsphase: Abb. 3.6).

Ähnlich wie mit dem DNA-Gehalt verhielt es sich mit dem GAG-Gehalt der Gele. Die SZC nach zwölf-tägiger Expansionsphase produzierten insgesamt signifikant weniger ($p = 0,033$), bezogen auf den DNA-Gehalt dagegen genauso viel GAG wie die SZC nach sieben-tägiger Expansionsphase. Die MW lagen bei $437,46 \mu\text{g}$ ($SD = 59,40$) bzw. $123,04 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 33,57$). Die Unterschiede zu den DZC-Gelen waren nicht signifikant (Abb. 3.34).

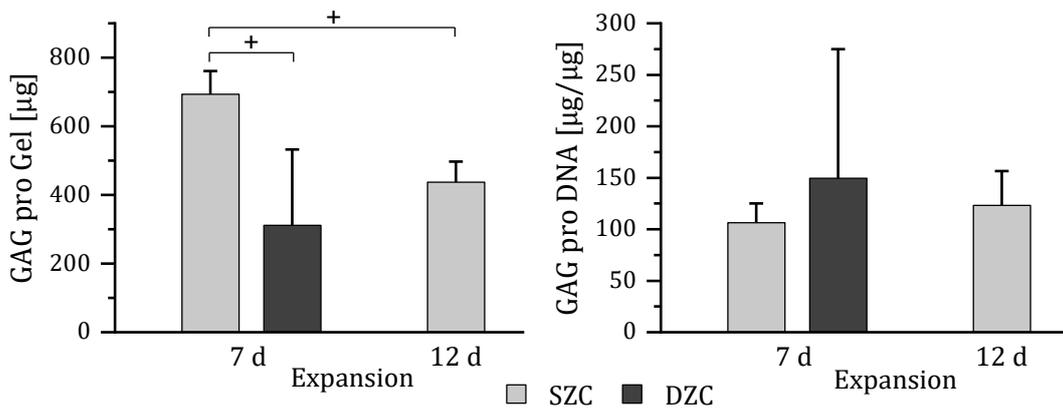


Abb. 3.34: GAG-Gehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen.

Der Kollagengehalt der hier beschriebenen Gruppe an länger expandierten SZC betrug $116,81 \mu\text{g}$ ($SD = 5,94$) insgesamt bzw. $26,11 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ($SD = 7,79$) bezogen auf den DNA-Gehalt. Damit gab es im Vergleich zu den SZC, die kürzer in der Expansionsphase inkubiert wurden, keinen Unterschied. Die Differenzen zu den DZC, die ähnlich dicht in der Monoschichtkultur gewachsen sind, waren dagegen deutlicher. Der Unterschied im absoluten Wert war signifikant ($p = 0,006$) (Abb. 3.35).

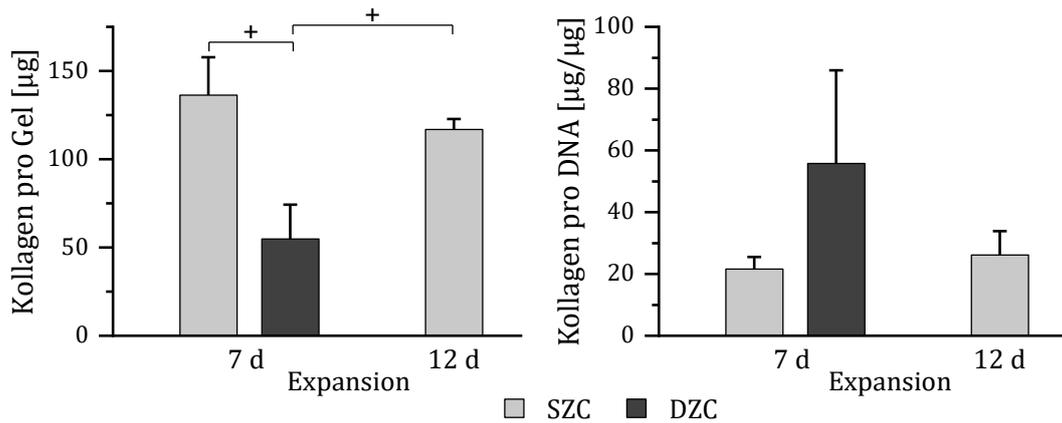


Abb. 3.35: Kollagengehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen.

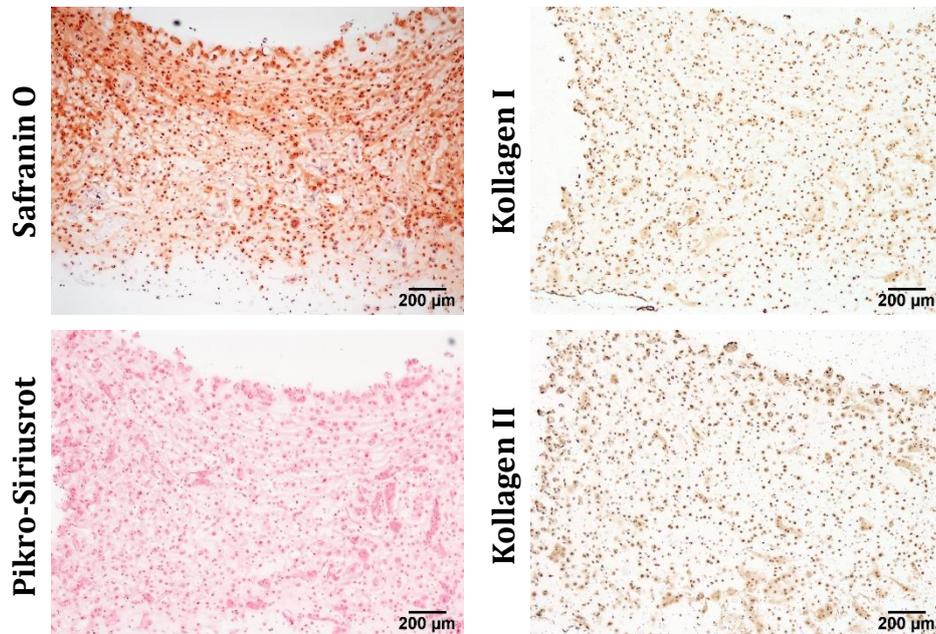


Abb. 3.36: Gehalt an GAG, Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der Gele mit Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, dargestellt durch Safranin O-, Picro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.

Die histologischen Färbungen glichen denen der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen SZC in Agarose-Gelen, mit gleichmäßig verteilter EZM im gesamten Gel. Allerdings fiel die Intensität vor allem der Safranin O-Färbung, übereinstimmend mit der quantitativen GAG-Messung, insgesamt etwas geringer aus, sie konzentrierte sich vor allem im oberen Bereich des Konstrukts. Die Kollagene, dargestellt in der Picro-Siriusrot-Färbung, waren dagegen etwas gleichmäßiger verteilt.

Die Kollagen I-Färbung zeigte sich mit ähnlich starker Intensität, der Gehalt an Kollagen II schien dagegen geringer als bei den Chondrozyten nach siebentägiger Expansionsphase zu sein (Abb. 3.36; vgl. 7 Tage Expansionsphase: Abb. 3.8; Abb. 3.11-Abb. 3.13).

3.4.3 Material des Hydrogels

Neben den Agarose-Gelen, die bisher beschrieben wurden, sollten in dieser Arbeit auch zwei Versuchsreihen mit einem anderen Biomaterial durchgeführt werden, welches in einem 3D-Drucker verwendbar ist. Dafür diente eine Kombination aus einem natürlichen und einem synthetischen Polymer, die beide chemisch modifiziert wurden, um eine Quervernetzung untereinander zu ermöglichen, nämlich Thiol-funktionalisiertes Hyaluronan (HA-SH) und Allyl-funktionalisiertes Polyglycidol (P(AGE-co-G)). Dieses Biomaterial, hier als HA/PG bezeichnet, war schwieriger in der Handhabung, die Gele waren sehr weich und fragil. Daher wurden während der dreiwöchigen Inkubationszeit im Rahmen des Mediumwechsels einige der Hydrogele beschädigt, weswegen für die Auswertung weniger Material zur Verfügung stand. Mit den verbliebenen, unbeschädigten Gelen ließ sich dennoch eine tendenzielle Aussage zu den untersuchten Endpunkten treffen. Die Ergebnisse von d1 der 3D-Zellkultur sind ebenfalls abgebildet, um den Verlauf während der dreiwöchigen Kultivierung besser beurteilen zu können.

Für diese Versuchsreihen wurden, wie bereits in Abschnitt 2.2.8 erwähnt, kryokonservierte Chondrozyten verwendet. Daher ist ein direkter Vergleich zu den Agarose-Gelen mit frisch isolierten Knorpelzellen nur eingeschränkt möglich. Die erneute Abbildung der Ergebnisse der biochemischen Assays aus den vorhergehenden Versuchsreihen dienen lediglich zur Orientierung.

Im Zellviabilitäts-Assay zeigte sich bei allen Versuchsgruppen eine intensivere Rotfärbung als in den Agarose-Gelen, entsprechend mehr avitale Zellen im Vergleich zu den grün fluoreszierenden viablen Zellen. Dieser Anteil an avitalen Zellen hat, im Gegensatz zu dem in Agarose-Gelen, im Laufe der dreiwöchigen Kultur eher zugenommen und war somit an d21 höher als an d1. Zwischen den drei Versuchsgruppen

konnte kein deutlicher Unterschied erkannt werden (Abb. 3.37; vgl. Agarose-Gele: Abb. 3.4; Abb. 3.15).

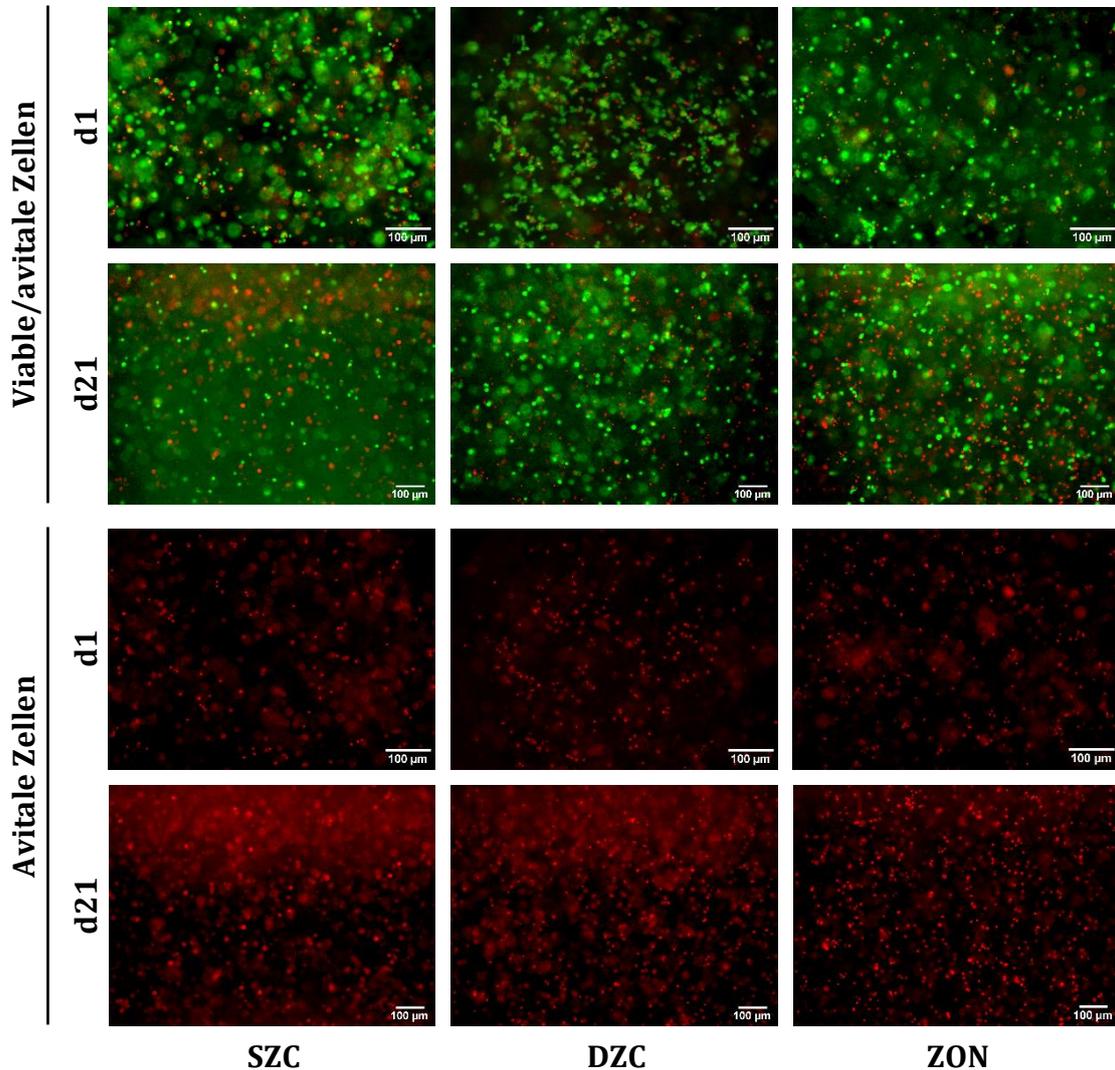


Abb. 3.37: Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Oben viable und avitale, unten nur avitale Zellen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Dementsprechend fiel auch der DNA-Assay aus. Alle Versuchsgruppen wiesen nach dreiwöchiger Inkubationszeit weniger DNA auf als an d1. An d1 enthielten die Gele zwischen 3,35 µg und 3,74 µg DNA. An d21 verringerte sich dieser MW auf 1,32 µg bis 1,95 µg, die Differenz war jedoch nicht signifikant. Auch bei Vergleich der einzelnen Gruppen zu einem Zeitpunkt der Zellkultur gab es keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zwischen HA/PG- und Agarose-Gelen an d21 war der

Unterschied bei den SZC und den zonalen Gelen signifikant ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,023$) (Abb. 3.38).

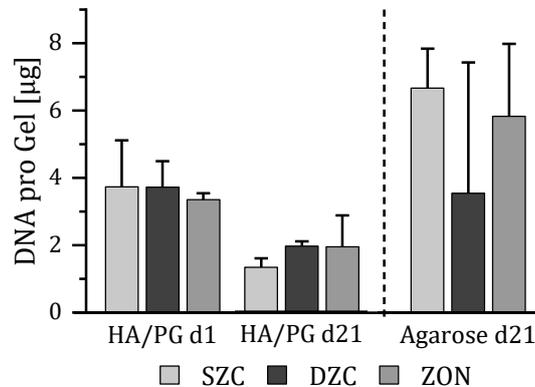


Abb. 3.38: DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach einem Tag in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen und nach 21 Tagen jeweils in HA/PG- bzw. in Agarose-Gelen pro Hydrogel in µg. In Agarose-Gelen wurden frische Chondrozyten verwendet, in HA/PG-Gelen hingegen kryokonservierte Chondrozyten, weswegen ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

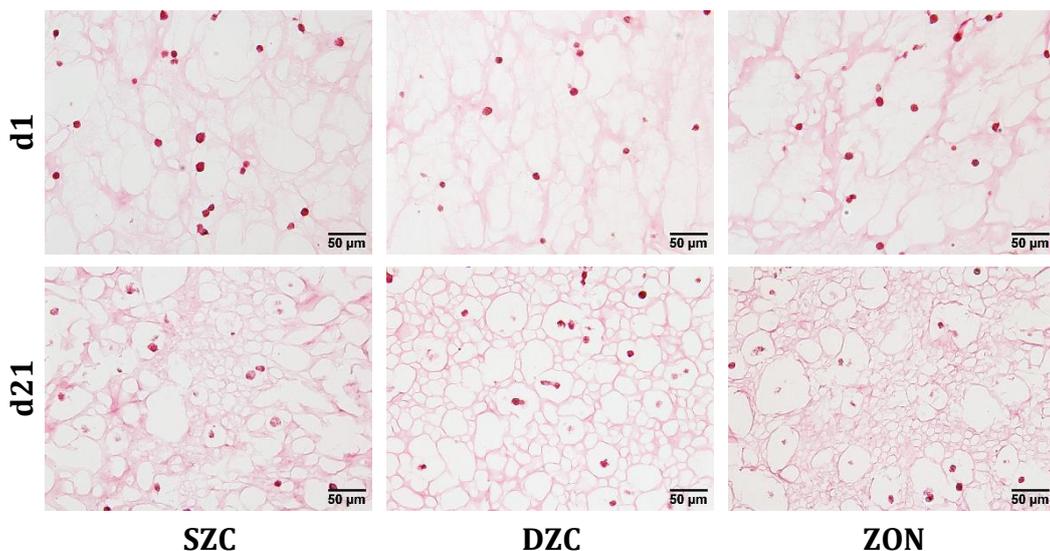


Abb. 3.39: Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, exemplarisch dargestellt durch Picro-Siriusrot-Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Da HA selbst eine ähnliche chemische Struktur wie GAG besitzt, wurde es in der Safranin O-Färbung angefärbt, was die Beurteilung der histologischen Schnitte beeinträchtigte. Auch in den anderen Färbungen zeigte sich eine leichte Anfärbung des Materials. Durch die Fixierung und Kryokonservierung der histologischen Proben

dehnte sich das Material zunächst aus und fiel dann in sich zusammen, was kleine Risse in der gesamten Struktur des Gels zur Folge hatte. Darum stellten sich die Gele mit einer Art Wabenmuster dar.

Bei großer Vergrößerung der histologischen Schnitte zur Beurteilung der Morphologie fiel an d21 eine insgesamt geringere Zelldichte im Vergleich zu d1 in Zellkultur sowie zu den Agarose Gelen an d21 auf. Die Zellkerne waren oft unrund und inhomogen gefärbt. Es gab keine ersichtlichen Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen, ebenso war die Grenze der zonalen Schichtung nicht erkennbar. Die Zellen wurden nicht von EZM umgeben, lediglich die Struktur des Hydrogels verdichtete sich im Laufe der 3D-Zellkultur (Abb. 3.39; vgl. Agarose-Gele: Abb. 3.6; Abb. 3.17).

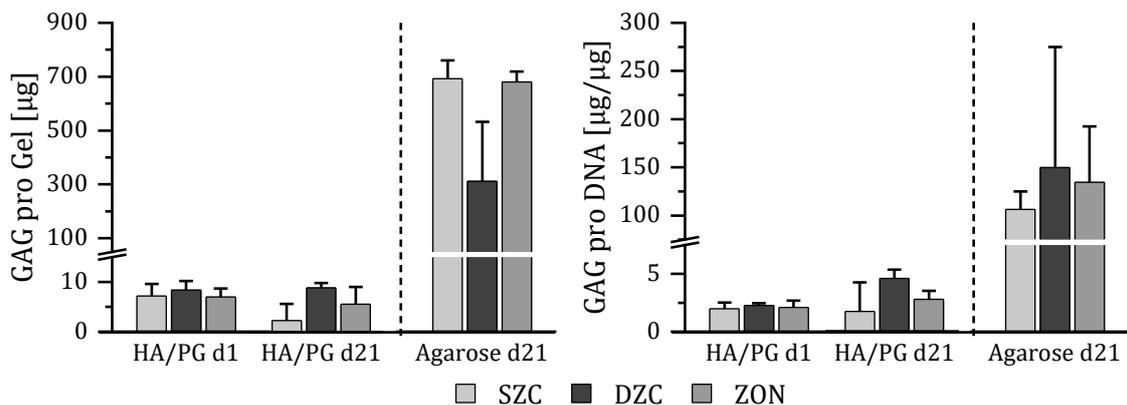


Abb. 3.40: GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach einem Tag in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen und nach 21 Tagen jeweils in HA/PG- bzw. Agarose-Gelen pro Hydrogel in µg und pro DNA in µg/µg. In Agarose-Gelen wurden frische Chondrozyten verwendet, in HA/PG-Gelen hingegen kryokonservierte Chondrozyten, weswegen ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Laut GAG-Assay enthielten die HA/PG-Gele an d1 durchschnittlich jeweils weniger als 10 µg an GAG insgesamt. Bezogen auf den DNA-Gehalt errechneten sich Werte um 2 µg/µg. An d21 gab es keine signifikante Veränderung dieser Werte, der absolute GAG-Gehalt lag in allen Gruppen weiter unter 10 µg, der relative unter 5 µg/µg. Auch hier gab es weder an d1 noch an d21 signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Werte entsprachen allerdings jeweils nur einem sehr kleinen Bruchteil der Werte, die die Agarose-Gele erzielten. Die Unterschiede

zwischen den beiden Materialien im absoluten und relativen GAG-Gehalt an d21 war in allen Gruppen signifikant (jeweils $p < 0,001$) (Abb. 3.40).

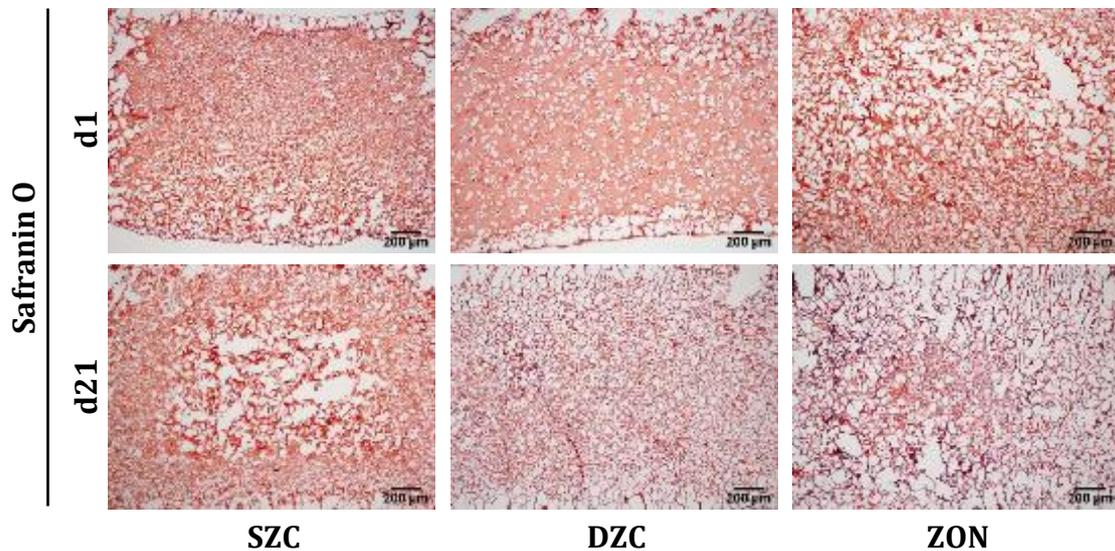


Abb. 3.41: GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Safranin O-Färbung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

In allen histologischen Schnitten, vor allem in der Safranin O-Färbung, wurde das Material des Hydrogels angefärbt, was eine Beurteilung der Matrixproduktion erheblich erschwerte. Vergleicht man allerdings die Aufnahmen von d21 mit denen von d1 der Zellkultur, lässt sich keine Zunahme der Farbintensität feststellen. Zudem kann man den perizellulären Raum genauer betrachten. Da hier keine Anfärbung im direkten Umfeld der Zellen zu erkennen ist, lässt sich daraus schließen, dass keiner der untersuchten EZM-Bestandteile in histologisch nachweisbarem Umfang produziert wurde. Ebenso wenig wurde ein Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen ersichtlich, die Grenze in den zonalen Gelen war nicht zu erkennen (Abb. 3.41; Abb. 3.42; vgl. Agarose-Gele: Abb. 3.8; Abb. 3.11-Abb. 3.13; Abb. 3.19; Abb. 3.21).

Aufgrund der Tatsache, dass weder im GAG-Assay noch in den histologischen Färbungen mit Safranin O und Pikro-Siriusrot oder den immunhistochemischen Färbungen auf Kollagen I und II eine Produktion von EZM nachgewiesen werden konnte, wurde auf den HP-Assay und die immunhistochemische Färbung auf Kollagen X und Aggrekan verzichtet.

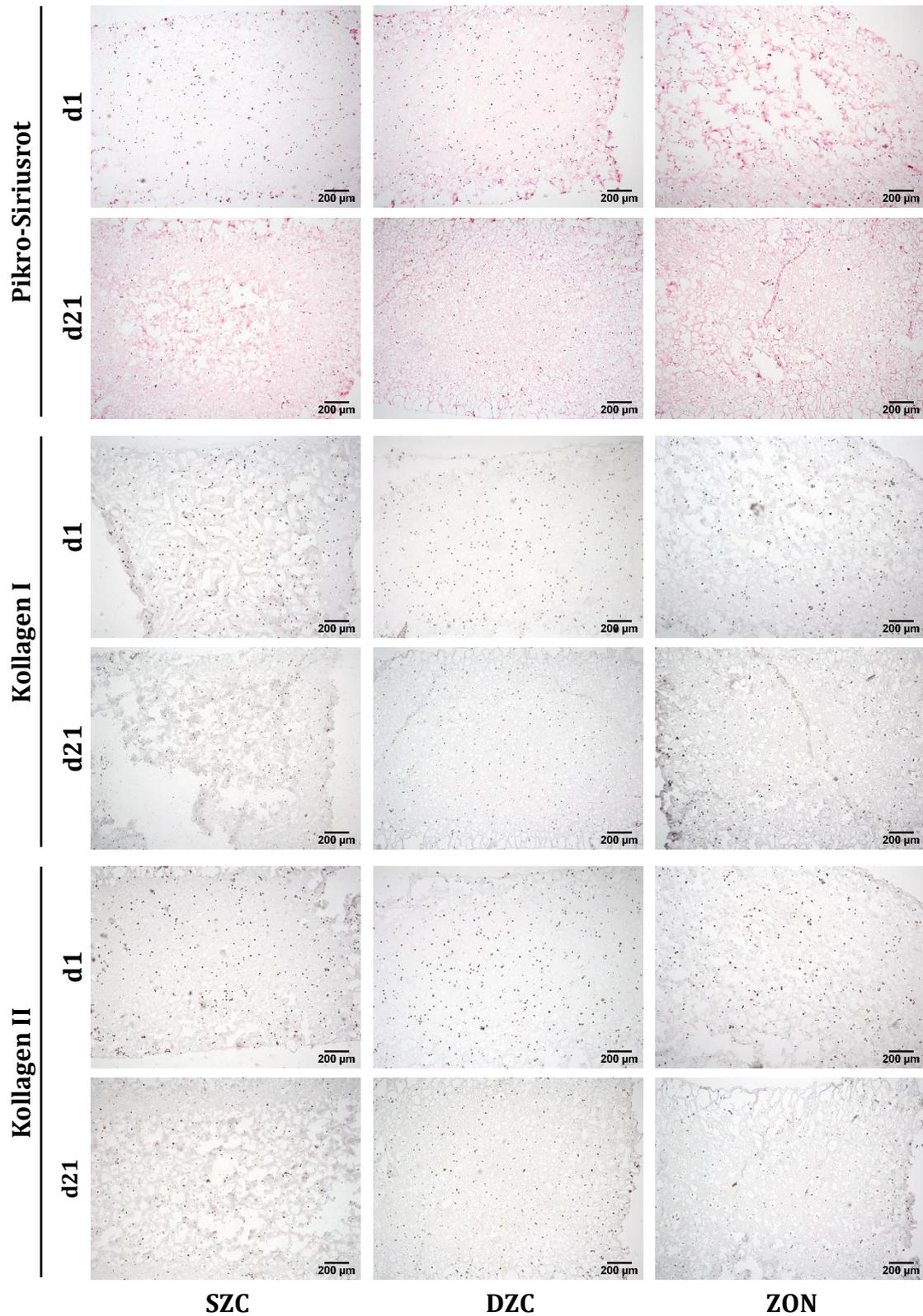


Abb. 3.42: Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Picro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

3.4.4 Kryokonservierung der Zellen nach Collagenase-Verdau

Bei den Versuchen mit den HA/PG-Gelen wurden Chondrozyten verwendet, die nach der Isolation zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und eine bzw. zwei Wochen später wieder aufgetaut und in Monoschichtkultur gegeben wurden. Dies diente dazu, einen weiteren Einflussfaktor durch andere Zelldonoren zu vermeiden. Um auszuschließen, dass die Kryokonservierung der Zellen an sich einen negativen Effekt habe und die schlechten Ergebnisse der HA/PG-Gele dadurch zu erklären seien, wurde ein erneuter Versuch mit den kryokonservierten Zellen in Agarose-Gelen gestartet. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Zellreihe mit den direkt nach Collagenase-Verdau verarbeiteten Chondrozyten verglichen.

Die Expansion in Monoschichtkultur lief langsamer ab als bei den frisch verwendeten Chondrozyten. SZC und DZC erreichten die 80%ige Konfluenz etwa gleichzeitig am elften Tag in den Zellkulturflaschen (Abb. 3.43; vgl. ohne Kryokonservierung: Abb. 3.1). Der große Unterschied in der Proliferationsrate, der bei den frischen Chondrozyten zwischen den beiden Zelltypen bestand, relativierte sich. Die Zellzahl stieg jeweils um das zwei- bis vierfache, der Unterschied war nicht signifikant (Abb. 3.44).

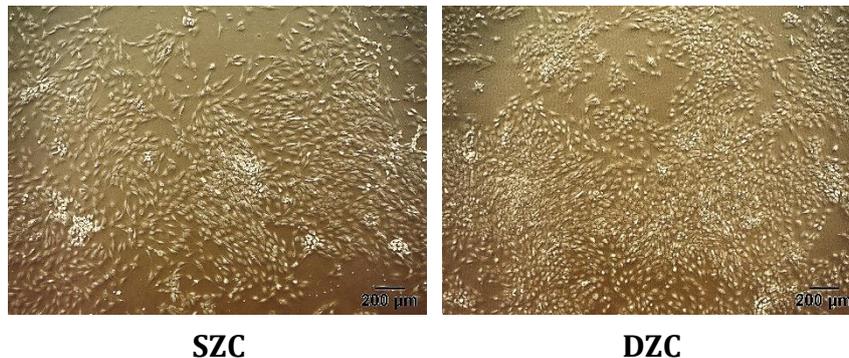


Abb. 3.43: Zelldichte in Kulturflaschen der beiden Versuchsgruppen nach 11 Tagen in Monoschichtkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Auflichtmikroskopie. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht.

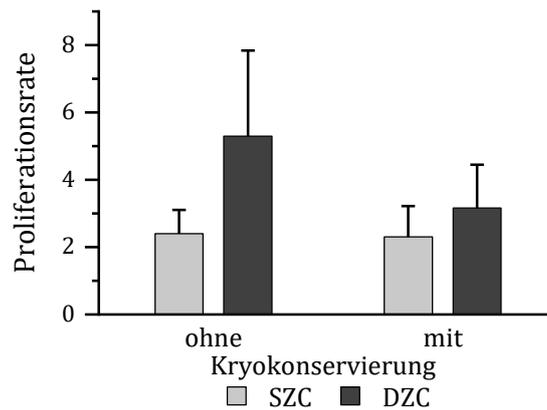


Abb. 3.44: Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur ohne bzw. nach 11 Tagen in Monoschichtkultur mit vorheriger Kryokonservierung. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht

In der Zellviabilität waren die Tendenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ähnlich zu den frisch verwendeten Zellen. Die Gele mit DZC hatten den höchsten Anteil an avitalen Zellen, die mit SZC den geringsten. Lediglich die zonalen Gele schie- nen eine etwas höhere Anzahl avitaler Zellen aufzuweisen als die zonalen Gele mit frischen Chondrozyten (Abb. 3.45 ; vgl. ohne Kryokonservierung: Abb. 3.4; Abb. 3.15).

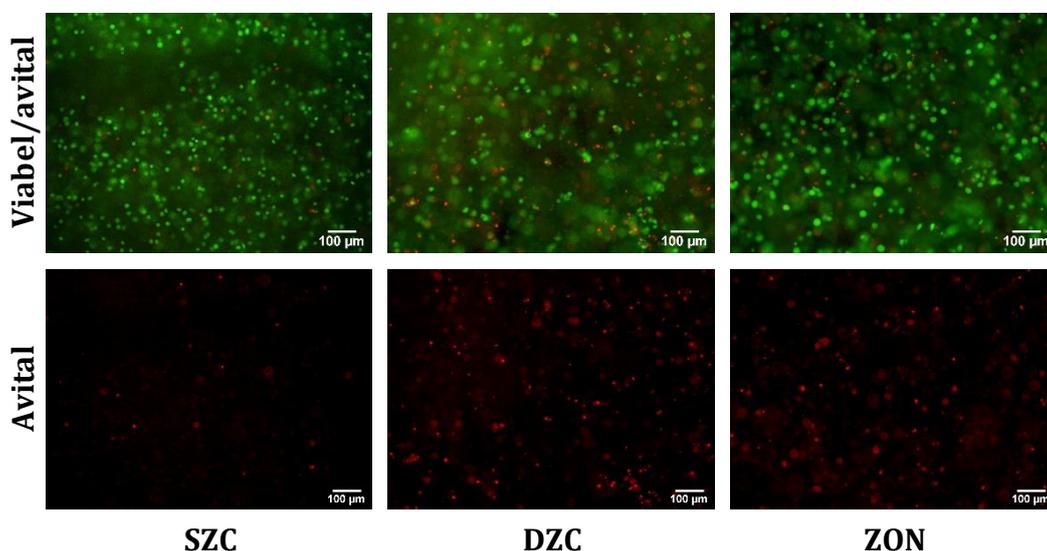


Abb. 3.45: Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung. Oben viable und avitale, unten nur avitale Zellen. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

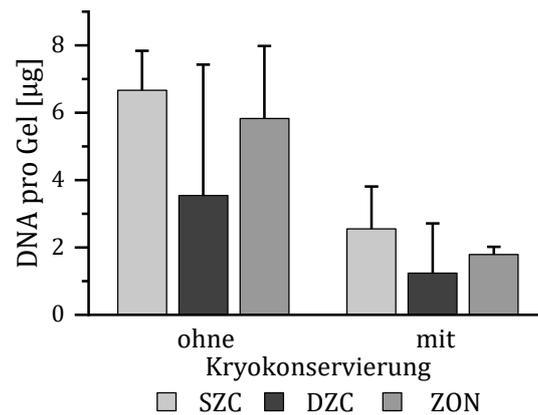


Abb. 3.46: DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Der DNA-Gehalt der Gele mit zunächst kryokonservierten Zellen war in allen Gruppen etwas, aber nicht signifikant niedriger als der der bisher beschriebenen Proben. Es zeigten sich jedoch die gleichen Tendenzen zwischen den drei Versuchsgruppen wie bei den nicht kryokonservierten Zellen, die SZC-Gele enthielten mit 2,55 µg den höchsten Wert an DNA, die DZC-Gele mit 1,24 µg den niedrigsten. Die Differenzen der Versuchsgruppen untereinander waren ebenfalls nicht signifikant (Abb. 3.46).

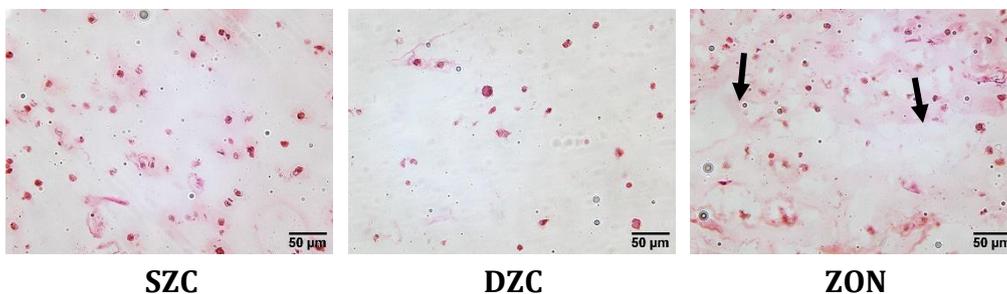


Abb. 3.47: Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

Die Zellen nach ihrer Morphologie zu beurteilen, war in dieser Versuchsreihe schwierig, da insbesondere die Gele mit DZC wenig EZM enthielten und darum nur die Zellkerne, nicht aber das Zytoplasma gut erkennbar waren. Die SZC in den reinen und zonalen Gelen waren eher klein (Abb. 3.47; vgl. ohne Kryokonservierung: Abb. 3.6; Abb. 3.17).

Was schon in der Betrachtung der Morphologie der Zellen auffiel, bestätigte sich in den Tests auf den Gehalt an EZM. Alle drei Versuchsgruppen produzierten insgesamt weniger GAG im Vergleich zu den Gruppen, deren Zellen direkt nach Collagenase-Verdau verwendet wurden. Die DZC erreichten mit 100 µg analog zu den frisch verwendeten Chondrozyten den geringsten GAG-Wert. Die SZC und zonalen Gelen enthielten ca. 300 µg GAG, der Unterschied zu den nicht kryokonservierten Zellen war bei diesen beiden Gruppen jeweils signifikant ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,002$). Im relativen GAG-Gehalt gab es dagegen keine Unterschiede zwischen den frisch bzw. nach Kryokonservierung weiterverwendeten Chondrozyten, die Werte lagen zwischen 135 µg/µg und 180 µg/µg. Weder beim absoluten noch beim relativen GAG-Gehalt gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen mit kryokonservierten Zellen (Abb. 3.48).

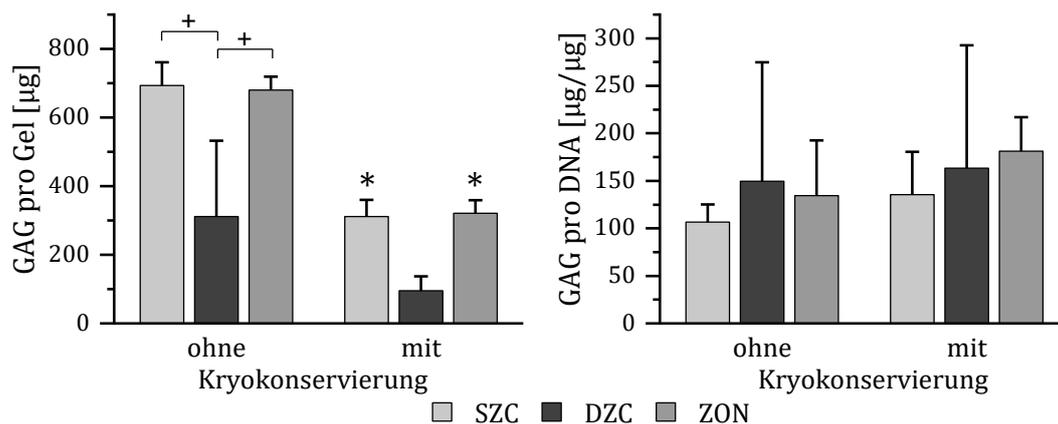


Abb. 3.48: GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in µg und pro DNA in µg/µg. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe ohne vorherige Kryokonservierung.

Im absoluten Kollagengehalt der Gele fiel der Unterschied zwischen frischen und kryokonservierten Zellen noch drastischer aus. Alle drei Versuchsgruppen enthielten insgesamt signifikant weniger Kollagen als ihre jeweilige Vergleichsgruppe mit frisch verwendeten Chondrozyten ($p < 0,001$ bei SZC und ZON; $p = 0,010$ bei DZC). Der absolute Kollagengehalt lag zwischen 13 µg bei den DZC und 25 µg bei den SZC, ohne signifikante Unterschiede untereinander. Es zeigten sich jedoch wiederum die gleichen Tendenzen zwischen den drei Versuchsgruppen wie bei den nicht

kryokonservierten Zellen. Bezogen auf den DNA-Gehalt produzierten die zunächst kryokonservierten Zellen zwar ebenfalls tendenziell weniger Kollagen, die Differenz zu den frisch verwendeten Zellen war allerdings nicht mehr signifikant. Der MW der SZC- bzw. zonalen Gele lag bei ca. 12 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, der MW der DZC-Gele bei 30 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, wiederum ohne signifikante Unterschiede untereinander (Abb. 3.49).

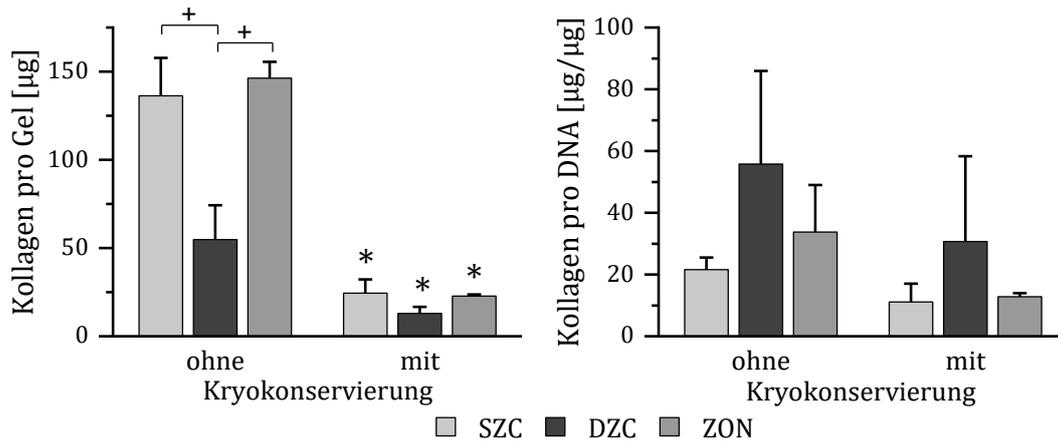


Abb. 3.49: Kollagengehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele. + markiert signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen, * markiert signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe ohne vorherige Kryokonservierung.

Die Ergebnisse der histologischen Färbungen deckten sich mit den Werten der quantitativen Messung und fielen insgesamt sehr schwach aus. Die Bereiche mit SZC erreichten in allen Färbungen noch eine etwas höhere Farbintensität, die vorhandene EZM verteilte sich gleichmäßig auch in den Zellzwischenräumen. In den Bereichen mit DZC war oft nur die Zellkernfärbung sichtbar, lediglich der Bereich mit DZC in den zonalen Gelen nahe der Übergangszone war etwas stärker gefärbt. (Abb. 3.50; vgl. ohne Kryokonservierung: Abb. 3.8; Abb. 3.11-Abb. 3.13; Abb. 3.19; Abb. 3.21).

Obwohl eine Kompromittierung der Zellen durch die Kryokonservierung bei Betrachtung dieser Ergebnisse als wahrscheinlich anzusehen ist, erreichen die Zellen in den Agarose-Gelen dennoch deutlich höhere Syntheseraten für GAG und Kollagene als die ebenfalls kryokonservierten Zellen in den HA/PG-Gelen.

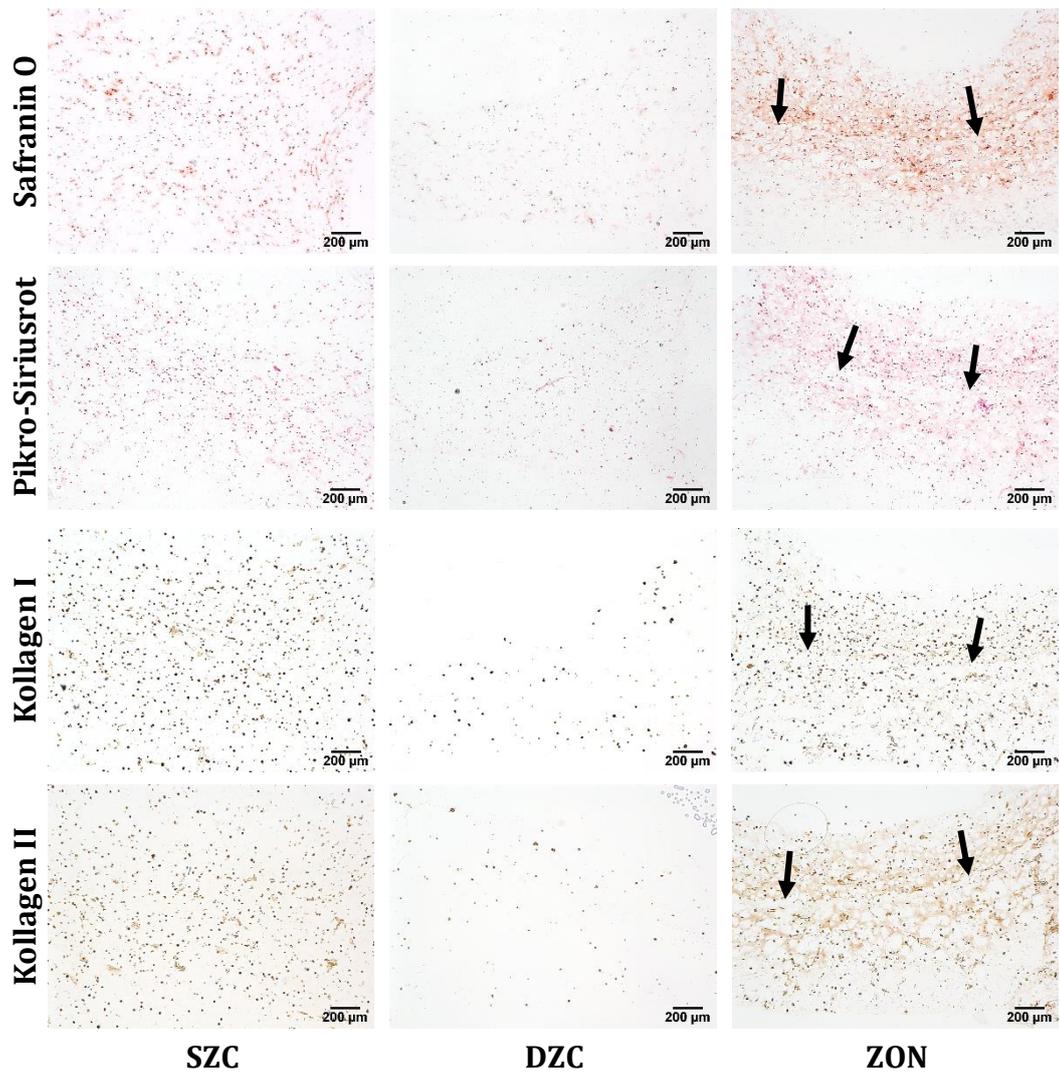


Abb. 3.50: Gehalt an GAG, Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Safranin O-, Picro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. SZC: Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht, DZC: Chondrozyten aus tiefer Schicht, ZON: zonale Hydrogele.

4 DISKUSSION

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es viele aussichtsreiche Ansätze im Hinblick auf die Versorgung von Knorpeldefekten gibt. Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte im Bereich des TE von Knorpel gemacht wurden, ist es bis heute nicht gelungen, das richtige Studienprotokoll unter Einbezug des Zelltyps, des Biomaterials und der Kulturbedingungen zu finden, das zu einem funktionell und mechanisch hochwertigem Knorpeltransplantat führt. Da die hohe Belastbarkeit des gesunden Gelenkknorpels zu einem erheblichen Teil auf seinen zonalen Aufbau zurückzuführen ist, ist eine Annäherung an die tiefenabhängig inhomogene Biomechanik im gezüchteten Gewebe erstrebenswert [90, 107]. Im Laufe der letzten Jahre wurden viele Methoden entwickelt, ein zonal organisiertes Konstrukt herzustellen [94, 107]. Neben dem Einbau von strukturellen, mechanischen oder chemischen Gradienten in das Biomaterial [98, 100] sowie der Kultivierung unter zonenabhängig unterschiedlichen Umgebungsbedingungen [88, 108] können alternativ bzw. zusätzlich unterschiedliche Zelltypen in einem Konstrukt geschichtet werden.

Einige Studien beschäftigen sich zudem damit, zonenspezifische Subpopulationen der Chondrozyten in einem mehrschichtigen Konstrukt zu kultivieren, womit möglicherweise die tiefenabhängigen mechanischen Eigenschaften von Gelenkknorpel im Neogewebe nachgeahmt und die Funktionalität des Transplantats verbessert werden kann [97, 109-112]. Dass zonale Subpopulationen von primären Chondrozyten ihren Phänotyp in 3D-Kultur weitestgehend aufrechterhalten können, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt [129-131]. In der klinischen Praxis ist jedoch eine Expansion der autologen Chondrozyten unvermeidlich, damit bei möglichst kleinem Defekt an der Entnahmestelle eine ausreichende Zellzahl für die Weiterverarbeitung zur Verfügung steht. Es ist allgemein bekannt, dass Chondrozyten bei Expansion in Monoschichtkultur zu einem gewissen Grad dedifferenzieren und in 3D-Kultur redifferenzieren können [90, 132]. So verringert sich in Monoschichtkultur auch der Unterschied im spezifischen Phänotyp von Chondrozyten, die aus den verschiedenen Knorpelschichten isoliert wurden. Dies kann sich in einer verminderten

Expression von zonalen Markern wie Clusterin und PRG4 für oberflächliche Chondrozyten sowie Cartilage Oligomeric Matrix Protein für die tiefe Zone äußern [115, 116]. Die Arbeiten mancher Autoren legen die Vermutung nahe, dass dieser Prozess zumindest teilweise reversibel ist und Subpopulationen unter bestimmten Kulturbedingungen ihren zonenspezifischen Phänotyp regenerieren [114, 116, 117]. Andere konnten diese Theorie wiederum nicht bestätigen [112]. In den genannten Studien wurden meist auch Wachstumsfaktoren eingesetzt, die allerdings unterschiedliche Reaktionen bezüglich Proliferation, Genexpression und Biosynthese in den zonalen Chondrozyten-Subpopulationen auslösen [119], was den Vergleich zwischen den Gruppen erschwert. Außerdem wurde bisher wenig Augenmerk auf den Einfluss einer zonalen Schichtung der Zellgruppen im Konstrukt auf das Redifferenzierungspotenzial gelegt. Daher beschäftigte sich diese Arbeit mit den Unterschieden im Redifferenzierungspotenzial von Chondrozyten aus oberflächlicher und tiefer Schicht sowie dem Effekt einer zonalen Schichtung in 3D-Kultur ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Um die Ergebnisse weitestgehend isoliert von weiteren äußeren Stimuli betrachten zu können, wurden verschiedene Kulturbedingungen gezielt verändert, um deren Einfluss auf das Zellverhalten zu untersuchen. Im Folgenden werden die Methoden und Ergebnisse diskutiert.

4.1 Zonale Subpopulationen

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, die Zellen der einzelnen Knorpelschichten voneinander zu separieren. So können gemischte isolierte Chondrozyten mittels Durchflusszytometrie nach Oberflächenmarkern und Zellvolumen getrennt werden, selten resultieren daraus jedoch reine Kulturen, da es Überschneidungen zwischen den Subpopulationen gibt [118]. Die Trennung der Knorpelschichten mit einem Skalpell vor Isolation der Zellen stellt eine weniger aufwendige und mit einfachen Mitteln durchführbare Alternative dar und wurde deshalb für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Bereits mehrere Studien konnten die Eignung dieser Methode zur Gewinnung zonaler Chondrozyten-Subpopulationen nachweisen [110, 116, 131]. In der klinischen Anwendung ist dieses Vorgehen jedoch nur eingeschränkt praktikabel, da an der Spenderstelle in der Regel keine Vollschichtprobe entnommen werden

kann [114]. In dieser Arbeit wurde nur zwischen einer oberflächlichen und einer tiefen Schicht unterschieden. Durch die geringe Gesamtknorpeldicke auf den Femurkondylen der Ferkel war zum einen eine Teilung in drei Schichten mit den gegebenen Mitteln nicht möglich, zum anderen stellt die histologische Einteilung von nichtkalzifiziertem Gelenkknorpel in drei Zonen ohnehin nur eine vereinfachte Beschreibung eines kontinuierlichen phänotypischen Übergangs von der Oberfläche zur Tidemark dar [118].

Trotz der Bemühungen, eine zeitnahe Weiterverarbeitung der Knorpelzellen nach Schlachtung der Tiere zu gewährleisten, konnte eine gewisse Verzögerung bei Zerlegung und Transport der Kadaver durch den Fleischereibetrieb nicht vermieden werden, während derer die Chondrozyten nicht mit Nährstoffen versorgt wurden. Weitere Stressfaktoren, denen die Zellen vor Kultivierung ausgesetzt waren, stellten die Scherkräfte an den Schnittflächen bei Zerkleinerung der Knorpelstücke, der Verdauung in Collagenase-Lösung und, zu einem späteren Zeitpunkt, die Trypsinierung der Monoschichtkultur dar. Die Prüfung der Zellvitalität durch Zellzählung mit Trypanblau nach diesen Arbeitsschritten sollte Hinweise darüber liefern, inwieweit die Funktionsfähigkeit der Zellkultur durch diesen erhöhten Stress beeinträchtigt wurde. In beiden Gruppen blieb jeweils ein Großteil der Zellen vital, wie die Untersuchungen nach den jeweiligen Einzelschritten zeigten.

In der Expansionsphase waren bereits Unterschiede zwischen den beiden Zellgruppen erkennbar. Die DZC wiesen eine tendenziell höhere, wenn auch nicht signifikant unterschiedliche Proliferationsrate auf. Diese Beobachtung stimmt mit anderen Studien, wie beispielsweise von Kim et al. [110] überein, die mit Knorpel aus jungen Tieren gearbeitet haben. Dafür könnten residuale, proliferationsfähige Vorläuferzellen in der tiefen Schicht von unreifem Knorpel verantwortlich sein [114]. Im Gegensatz dazu wurden bei reifem Knorpel keine Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den einzelnen Subpopulationen beobachtet [116]. Die Chondrozyten wurden nur einen Zyklus expandiert und in Passage 1 weiterverwendet, um eine Harmonisierung mit den Studienprotokollen des HydroZONES Projekts zu erreichen [107]. Zudem schreitet die Dedifferenzierung zu fibroblastenähnlichen Zellen gerade in Zellkulturflaschen aus Kunststoff rasch voran [117, 133].

Als Biomaterial für die 3D-Zellkultur in der Redifferenzierungsphase wurde Agarose gewählt, da sich dieses Material als geeignet erwiesen hat, den Phänotyp von Chondrozyten aufrechtzuerhalten bzw. nach Dedifferenzierung wiederherzustellen [97, 117]. Zusätzlich zu ihrer hohen Viskoelastizität, die der von Knorpelgewebe nahekommt, weisen Agarosehydrogele auch eine ausgezeichnete Biokompatibilität auf [91]. Dies zeigte sich in den hohen Raten viabler Zellen nach 21 Tagen in Kultur. Der tendenziell etwas höhere Anteil an avitalen Zellen in den Kontrollgruppen von d1 ist wahrscheinlich durch den Herstellungsprozess der Hydrogele begründet. Eine Erwärmung der Zellsuspension auf 40 °C und anschließende kurzzeitige Abkühlung auf 4 °C könnte manche Zellen kompromittiert und einen Zelltod induziert haben. Die Überreste dieser apoptotischen Zellen wurden wahrscheinlich im Hydrogel durch die restlichen viablen Zellen abgebaut und waren daher zu einem späteren Zeitpunkt in der Zellkultur nicht mehr nachweisbar.

In der Negativkontrolle von d1 gab es in keinem der untersuchten Endpunkte signifikante Unterschiede zwischen SCZ und DCZ. Auch in allen histologischen Untersuchungen sahen die Gruppen an d1 noch identisch aus. Nach dreiwöchiger Zellkultur bestanden dagegen bereits einige signifikante Unterschiede. Dies deutet klar darauf hin, dass die beiden Subpopulationen ungleiche Phänotypen aufwiesen und sich daher in der Redifferenzierungsphase unterschiedlich verhielten. Ob diese Unterschiede im Phänotyp auch während der Expansionsphase erhalten blieben oder erst in der Redifferenzierungsphase wiederhergestellt wurden, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht nachvollziehen. Der Grad der Dedifferenzierung nach der Expansionsphase ließe sich anhand der Genexpression in den beiden Zellgruppen bestimmen. In früheren Studien wurde allgemein eine Verlagerung der Genexpression von Kollagen II zugunsten von Kollagen I sowie ein Verlust der Expression zentraler Marker nach Monoschichtkultur von Chondrozyten beschrieben [89, 129, 134].

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Zellen in den hier gezüchteten Konstrukten phänotypisch ihren korrespondierenden Subpopulationen in nativem Knorpel ähneln. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Hidaka et al. [130] proliferierten die SCZ im Hydrogel stärker, der DNA Gehalt war in etwa doppelt so hoch wie in den

Gelen mit DCZ. Dass dieser Unterschied nicht signifikant war, könnte durch die höheren Varianzen zwischen den Donorgruppen zu erklären sein. So ist auch im nativen Knorpel die Zelldichte in der oberflächlichen Schicht am höchsten [15]. Die DZC verringerten ihre Zellzahl in der dreiwöchigen Kultur sogar, dies korreliert mit dem leicht höherem Anteil avitaler Zellen bei den DZC-Gelen im Zellviabilitäts-Assay. Gemeinsamkeiten zwischen den Chondrozyten in den Konstrukten und im nativen Knorpel ließen sich auch morphologisch erkennen. Wie bereits Ng et al. [97] und Kim et al. [110] berichteten, waren die SZC abgeflacht und kleiner im Durchmesser als die eher rundlichen DZC. Außerdem richteten die SZC die EZM eher in parallelen Strängen zur Oberfläche des Hydrogels aus, wie es auch physiologisch in der oberflächlichen Knorpelschicht der Fall ist [36].

Im nativen Knorpel sind Chondrozyten in der tiefen Zone bis zu zehnmal aktiver in Bezug auf die Matrixsynthese als in der oberflächlichen Zone [32]. In den meisten Studien findet sich dementsprechend in den Konstrukten mit DCZ die höchste Matrixproduktion [97, 110, 114, 116]. Demgegenüber überwog bei dieser Arbeit der absolute GAG- und Kollagengehalt in den Gelen mit SZC signifikant im Vergleich zu den Gelen mit DZC. Auch die histologischen Untersuchungen stützten diese Ergebnisse aus den biochemischen Analysen. Diese Differenz war allerdings vornehmlich auf die höhere Zelldichte in der Versuchsgruppe der SZC zurückzuführen. Normierte man den Matrixgehalt auf den DNA-Gehalt in den Konstrukten, errechnete sich eine größere Syntheserate bei den DZC, die zumindest für das Gesamtkollagen auch signifikant war. Weshalb der Unterschied in der Matrixproduktion nicht so deutlich zugunsten der DZC ausfiel, wie nach der aktuellen Literatur erwartet, könnte mit verschiedenen Überlegungen erklärt werden. Zum einen enthielt die Gruppe an SZC auch Chondrozyten aus der mittleren Schicht, die ebenfalls deutlich höhere Syntheseraten für GAG und Kollagen aufweisen als Zellen aus der oberflächlichen Schicht [110, 111, 114]. Zum anderen wurde durch direkten Vergleich gezeigt, dass die DZC während Expansion in Monoschichtkultur einen weniger stabilen Phänotyp aufweisen als die SZC [130] und vermutlich infolgedessen stärker dedifferenzieren.

Um den Grad der Redifferenzierung beurteilen zu können, ist vor allem der vorherrschende Kollagentyp ausschlaggebend. Während reife Chondrozyten fast

ausschließlich Kollagen II produzieren, kennzeichnet Kollagen I im Hydrogel einen hohen Anteil an fibroblastenähnlichen Zellen [134] und Kollagen X hypertrophe Zellen [135]. An d21 waren alle drei Kollagentypen sowohl in den Konstrukten mit SZC als auch in denen mit DZC in den immunhistochemischen Färbungen nachweisbar. Da weder die Proben von d1 noch die Isotypkontrollen (nicht abgebildet) angefärbt wurden, lag hier keine fehlerhafte oder unspezifische Hintergrundfärbung vor. Die Farbintensität der immunhistochemischen Schnitte ist außerdem gut vereinbar mit der Pikro-Siriusrot-Färbung. Beide Subpopulationen wiesen eine merkliche Produktion von Kollagen II auf, was für eine zumindest partielle chondrogene Ausprägung der Zellen spricht. Der Anteil an Kollagen I in beiden Subpopulationen schien zunächst relativ hoch, aber auch Schuurman et al. [116] sowie Schrobback et al. [133] beobachteten eine starke immunhistochemische Anfärbung für Kollagen I in ihren mit expandierten Chondrozyten beladenen Hydrogelen. Auch wenn in anderen Studien die Produktion von Kollagen I in redifferenzierten Chondrozyten geringer erschien, konnte bisher kein Konstrukt gezüchtet werden, das einen ähnlich niedrigen Kollagen I-Gehalt wie nativer Knorpel aufweist [112, 114, 117]. Kollagen X konnte in dieser Arbeit nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, diese Daten sind mit den Ergebnissen von Schrobback et al. vereinbar [133]. Da der Kollagen X-Gehalt in den wenigsten Studien analysiert wurde, mangelt es an weiteren Vergleichswerten. Zusammenfassend legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass sich die phänotypische Ausprägung der beiden Zelltypen und deren Verhalten in der Redifferenzierungsphase voneinander unterscheiden. Wie ihre entsprechenden Subpopulationen im nativen Knorpel kennzeichnete die Gruppe der SZC tendenziell eine höhere Zelldichte, die der DZC dagegen eine höhere Syntheserate. Die produzierte EZM in den Konstrukten hatte im Großen und Ganzen eine ähnliche Zusammensetzung wie die von Gelenkknorpel, erreichte jedoch weder die physiologischen Konzentrationen der einzelnen Bestandteile noch die zonale Organisation. Außerdem fanden sich auch Komponenten, die für fibröses Gewebe und entdifferenzierte Zellen charakteristisch sind und damit minderwertige Eigenschaften mit sich bringen. Die Ergebnisse werfen auch weitere Fragen auf, beispielsweise zur optimalen Kulturdauer. Studien, die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der 3D-Kultur

analysiert haben, zeigten eine bereits früh einsetzende Kollagen I Produktion, wohingegen die Kollagen X-Genexpression erst mit längerer Kulturdauer anstieg. Die Ergebnisse zu Kollagen II variierten je nach Studie [116, 133].

4.2 Zonale Schichtung

Ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag darin, den Effekt einer zonalen Schichtung der beiden Subpopulationen auf die Redifferenzierung zu analysieren. Zum Vergleich dienten hier gemischte Gele, in denen SZC und DZC gleichmäßig über das gesamte Hydrogel verteilt waren, sowie die Hydrogele mit nur einem der beiden Zelltypen. In nahezu allen histologischen Färbungen der zonalen Gele ließ sich zweifelsfrei eine Grenze zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht erkennen. Die oberflächliche Schicht war zudem an d21 stark geschrumpft und deutlich dünner als die tiefe Schicht. Ähnliche Unterschiede in der Schichtdicke beobachteten auch Klein et al. [111]. Die Morphologie der Zellen und der Gehalt an Matrixbestandteilen zu beiden Seiten dieses Übergangs glichen denen der entsprechenden Subpopulation in den oben genannten, mit nur einem Zelltyp beladenen Hydrogele. Die gemischten Gele dagegen enthielten zwar morphologisch unterschiedliche Zellen mit größerem und kleinerem Durchmesser, die EZM war aber homogen zwischen den Chondrozyten verteilt. Eine gerichtete Struktur war nicht erkennbar. Das beweist, dass die angewandte Methode zur Herstellung der zonalen und gemischten Gele erfolgreich war und unterschiedliche Konstrukte resultierten.

Der Anteil avitaler Zellen im Zellviabilitäts-Assay war sowohl bei gemischten als auch bei zonalen Gelen ähnlich gering wie bei den reinen SZC-Gelen. In allen quantitativen Messungen des DNA- sowie des Matrixgehalts lagen die erzielten Werte dieser beiden Vergleichsgruppen nah beieinander, signifikante Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Die Werte für die relative Matrixproduktion lagen zwischen den jeweiligen Werten von SZC und DZC, wie es auch Klein et al. [111] beobachteten, ohne signifikante Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen.

Dennoch gab es in den Ergebnissen Hinweise darauf, dass die Subpopulationen Einfluss aufeinander ausübten und eine kombinierte Zellkultur Vorteile in Hinblick auf

die chondrogene Redifferenzierung birgt, wie es auch die Meinung einiger weiterer Autoren ist [97, 109, 114]. So waren die absoluten Werte für den GAG- und Kollagengehalt der gemischten und zonalen Gele signifikant höher als die der reinen DZC-Gele und auf dem Niveau der reinen SZC-Gele bzw. sogar höher. Weiterhin ließ sich in den histologischen Abbildungen der zonalen Gele eine stärkere Farbtintensität der tiefen Zone in der Nähe des Übergangs zur oberflächlichen Zone feststellen. Dieses Phänomen war am eindrucklichsten in der Safranin O-Färbung zu erkennen, deutete sich jedoch auch in der Pikro-Siriusrot-Färbung und den immunhistochemischen Färbungen auf Aggrekan und Kollagen II an. Für eine lokale Produktion und gegen eine bloße Diffusion dieser vermehrten EZM von der oberflächlichen in die tiefe Schicht sprach die überwiegend perizelluläre Verteilung. Dass SZC in die tiefe Schicht diffundierten und so für den erhöhten Matrixgehalt im Übergangsbereich verantwortlich waren, war in Anbetracht der DZC-ähnlichen Morphologie der matrixproduzierenden Zellen ebenfalls unwahrscheinlich. Manche Studien markierten die Zellen der einzelnen Schichten vor 3D-Kultur mit fluoreszierenden Stoffen, um eine Zuordnung in der Histologie zu erleichtern. Eine Wanderung von zonenspezifischen Chondrozyten in andere Schichten des Konstrukts wurde dabei nicht beschrieben [110, 114]. Somit schien es einen Einfluss der SZC auf die DZC bei zonaler Schichtung dieser zu geben. Aufgrund der ohnehin schon intensiven Anfärbung in der oberflächlichen Schicht der zonalen Gele war ein umgekehrter Einfluss nicht zu erkennen. Um einen solchen zu quantifizieren, könnten die einzelnen Schichten der zonalen Konstrukte vor biochemischer Analyse separiert werden. So wiesen Ng et al. [97] eine Zunahme der Matrixproduktion innerhalb der Subpopulationen im zonalen Modell gegenüber einer reinen Zellkultur nach.

Ob dieser positive Einfluss auf die Redifferenzierung durch zonale Schichtung noch weiter bestärkt wurde oder genauso durch eine gemischte Zellkultur zustande kam, ist aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig ersichtlich. Für den Nutzen einer zonalen Schichtung spräche, dass die Matrixproduktion sowohl in gemischten als auch in zonalen Gelen ähnlich hoch war, obwohl die Kontaktfläche zwischen den Subpopulationen in den zonalen Gelen wesentlich geringer war. Auch in der Literatur ist man sich in dieser Fragestellung nicht einig. Während manche Studien ebenfalls

kaum Unterschiede zwischen gemischten und geschichteten 3D-Zellkulturen zonen-spezifischer Chondrozyten beschrieben [97, 112], legten andere einen eindeutigen Vorteil des zonalen Modells nahe [114]. Allerdings sind sich mehrere Autoren einig, dass durch Schichtung der Subpopulationen die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts verbessert werden können [97, 109, 114].

4.3 Weitere Einflussfaktoren

Neben der verwendeten Zellart haben das Biomaterial und externe Stimuli einen immensen Einfluss auf den Erfolg des TE von Knorpel. Trotz des Ziels dieser Arbeit, das Redifferenzierungspotenzial weitestgehend isoliert von weiteren äußeren Faktoren zu untersuchen, können diese oft nicht vermieden werden. Jedoch sollte versucht werden, durch gezielte Änderung einzelner Umgebungsbedingungen einen möglichen Einfluss dieser auf das Zellverhalten zu identifizieren. Im Basisprotokoll des Versuchs wurde mit frisch isolierten Chondrozyten in Agarose-Gelen mit normoxischer Umgebung und einer einheitlichen Expansionsphase von sieben Tagen gearbeitet. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Versuchen mit veränderten Kulturbedingungen diskutiert.

Zunächst wurde eine niedrigere Sauerstoffkonzentration von 2 % in der Umgebung während der Redifferenzierungsphase gewählt. Ein Grund dafür war, dass dies dem physiologischen Zustand im Gelenkknorpel näher kommt [95]. Zum anderen beschrieben einige Autoren eine bessere chondrogene Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen [89, 133, 136]. Unter normoxischen Bedingungen schienen die DZC im Zellviabilitäts-Assay einen höheren Anteil avitaler Zellen als in Hypoxie aufzuweisen. Passend dazu war die Zellzahl der SZC und der DZC an d21 der 3D-Zellkultur in Hypoxie gleich hoch. Insgesamt konnten im DNA-Assay keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. In den biochemischen Assays zum GAG- und Kollagengehalt schnitten jedoch die SZC- und zonalen Gele in Hypoxie den absoluten Wert betreffend deutlich schlechter ab. Die DZC enthielten in Hypoxie einen signifikant niedrigeren relativen Gehalt an beiden Matrixmolekülen. Somit schien in dieser Arbeit die Hypoxie einen negativen Einfluss auf

die Redifferenzierung der Chondrozyten zu haben. Betrachtet man die aktuelle Forschung zu diesem Thema genauer, so scheint der oben genannte positive Einfluss einer hypoxischen Umgebung besonders in humanen Chondrozyten zu wirken [89, 133]. Untersuchungen mit Zellen, die aus Rindern oder Mäusen isoliert wurden, ergaben weniger deutliche oder sogar umgekehrte Resultate [92, 93]. Ein mögliche Erklärung für diese Differenzen ist, dass die physiologische Sauerstoffkonzentration im Gelenkknorpel des Menschen einen niedrigeren Wert erreicht als in anderen untersuchten Lebewesen wie Rindern, Hunden oder Kaninchen [41]. Die Tendenzen der einzelnen Versuchsgruppen untereinander blieben unter hypoxischen Bedingungen weitestgehend unverändert.

In der ersten Versuchsreihe wurde beobachtet, dass die SZC in Monoschichtkultur langsamer proliferierten und einen weniger konfluenten Zellrasen als die DZC zum Zeitpunkt der Trypsinierung gebildet hatten. Um zu untersuchen, ob die Konfluenz in der Expansionsphase zu den beschriebenen Unterschieden der Subpopulationen in der Redifferenzierungsphase führte, wurde in weiteren Versuchen ein Teil der SZC länger in Monoschichtkultur belassen und erst nach zwölf statt nach sieben Tagen trypsiniert. Diese Gruppe der länger expandierten SZC glich morphologisch den SZC aus dem Basisprotokoll, die Zellzahl sowie der absolute und relative Matrixgehalt lagen jeweils zwischen den Werten von den SZC und DZC mit siebentägiger Expansionsphase. Signifikant war der Unterschied zu den SZC aus dem Basisprotokoll jedoch nur im GAG-Gehalt pro Gel. Der Kollagengehalt der länger expandierten SZC war dagegen fast genauso hoch wie bei den anderen SZC und signifikant höher als bei den DZC. Hingegen war bei den länger expandierten SZC der Kollagen II-Gehalt deutlich niedriger bei etwa gleich hohem Kollagen I-Gehalt im Vergleich zu den Zellen mit kürzerer vorheriger Expansionsphase. Ähnliche Verlagerungen der Produktion der verschiedenen Kollagentypen wurden auch durch häufigeres Passagieren von Chondrozyten herbeigeführt [117, 132]. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die längere Expansionsphase zu einer stärkeren Dedifferenzierung mit eingeschränktem Redifferenzierungspotenzial führte.

Bioprinting gilt als zukunftssträchtige Technologie, mit deren Hilfe Konstrukte mit optimiertem hierarchischem Aufbau hergestellt werden können [105]. Nicht jedes

Biomaterial kann dabei als Biotinte verwendet werden, die Suche nach geeigneten Materialien bleibt weiterhin eine Herausforderung. Neben guten biologischen Eigenschaften zur Unterstützung der chondrogenen Differenzierung sind auch bestimmte mechanische Eigenschaften für ein genaues Drucken erforderlich [96]. Das hier verwendete Material, eine Kombination aus HA-SH und P(AGE-co-G), wurde im Rahmen des EU-weiten Projekts HydroZONES entwickelt, um genau diese Anforderungen zu erfüllen, und bereits am Tiermodell getestet [94]. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Biomaterial trotz UV-aktivierter Quervernetzung der Komponenten eine gute Zellviabilität in Kultur ermöglicht und die chondrogene Differenzierung von MSC unterstützt [99]. In dieser Arbeit wurden dagegen hohe Raten avitaler Zellen und ein Rückgang der Zellzahl im Gel an d21 in allen Gruppen beobachtet. Keine der Versuchsgruppen wies eine messbare Matrixproduktion auf. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate ist, dass die reifen Chondrozyten ein anderes Verhalten in diesem Material aufwiesen als die von Stichler et al. [99] bzw. Mancini et al. [94] verwendeten Vorläufer- und Stammzellen. Zudem können bei einem experimentellen Material wie diesem herstellungsbedingte Variationen von Batch zu Batch nicht ausgeschlossen werden. Nicht zuletzt muss auch an die Möglichkeit gedacht werden, dass sich die vorhergehende Kryokonservierung nachteilig auf die hier verwendeten Chondrozyten auswirkte. Das Problem, dass Chondrozyten während Konservierung beeinträchtigt werden, ist klinisch bereits durch die schlechteren langfristigen Verlaufsbeobachtungen von Allograft-Transplantaten bekannt [30, 73]. Um diese Frage zu klären, wurde eine erneute Versuchsreihe mit kryokonservierten Zellen in Agarose-Gelen und ansonsten unverändertem Basisprotokoll umgesetzt.

Die Proliferation in Monoschichtkultur verlief nach Kryokonservierung deutlich langsamer als bei den frisch isolierten Chondrozyten. Die Expansionsphase musste auf elf Tage verlängert werden, um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten. Bezüglich der Agarose-Gele waren die Tendenzen in den untersuchten Endpunkten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit kryokonservierten Zellen ausnahmslos passend zu den Ergebnissen im Basisprotokoll. Jedoch waren vor allem die absoluten Werte der biochemischen Analysen meist signifikant geringer. Normiert auf den

DNA-Gehalt waren die Syntheseraten der kryokonservierten Zellen in Agarose-Gele dagegen genauso hoch wie die der frisch verwendeten Chondrozyten und lagen deutlich über den Werten der HA/PG-Gele. Es kann daher als gesichert angesehen werden, dass die vorherige Kryokonservierung als alleinige Ursache für die schlechten Ergebnisse der HA/PG-Gele ausgeschlossen werden kann.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen ziehen: Die in dieser Arbeit isolierten zonalen Subpopulationen besitzen eine unterschiedliche phänotypische Morphologie, die eindeutig in der Histologie zu erkennen ist. Quantitative Messungen sowie histologische und immunhistochemische Färbungen zentraler EZM-Komponenten konnten zudem Unterschiede in der Syntheserate zwischen den beiden Zelltypen belegen. Ebenso ist es wahrscheinlich, dass sich die Subpopulationen durch Kontakt zueinander in der Zellkultur gegenseitig beeinflussen. So scheint eine gemeinsame Kultivierung einen Vorteil gegenüber der isolierten Kultivierung im 3D-Modell zu bringen. Es besteht ferner ein ausgeprägter Zusammenhang zwischen einer zonalen Schichtung der Subpopulationen und der Verteilung der EZM im Konstrukt. Das Studienprotokoll übt einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Chondrozyten, insbesondere ein ungeeignetes Material sowie eine ungeeignete Sauerstoffkonzentration in der Umgebung und Kryokonservierung der Zellen kann die Redifferenzierung und somit die Chondrogenese beeinträchtigen.

Die hier erhobenen Daten werfen auf der anderen Seite allerdings auch weitergehende Fragen auf, die durch weitere Untersuchungen geklärt werden müssen. Ob der Gradient in der Matrixverteilung bei zonalen Modellen sich auch positiv auf die biomechanischen Eigenschaften des gezüchteten Konstrukts auswirkt, könnte beispielsweise durch mechanische Testungen näher untersucht werden. Die Bestimmung zonaler Marker könnte einen Informationsgewinn bezüglich der De- und Redifferenzierung der einzelnen Subpopulationen bringen. Nicht zuletzt könnte eine Markierung der Zelltypen vor Inkorporierung in Hydrogele aufklären, ob eine

Zelldiffusion ursächlich für den Gradienten im Matrixgehalt in der unteren Schicht der zonalen Gele ist.

Eine Expansion und resultierende Dedifferenzierung der Chondrozyten ist für den klinischen Einsatz bisher unvermeidlich. Die Bedingungen für eine optimale Redifferenzierung zur Züchtung von Knorpelgewebe mit hochwertigen biomechanischen Eigenschaften zu finden, stellt die Forschung weiter vor eine große Herausforderung. Da die physiologische Umgebung der einzelnen Subpopulationen variiert, unterscheiden sich vermutlich auch ihre Anforderungen an die Kulturbedingungen. Zur näheren Klärung dieses wichtigen Problems sind ergänzende Studien mit verschiedenen Biomaterialien sowie variierender Medienzusammensetzung und Sauerstoffkonzentration unabdingbar. Die Reliabilität der Ergebnisse wird durch höhere Stichprobenzahlen sowie eine größere Anzahl an Donoren verbessert. Zusätzliche Auswertungsmethoden unter Einbeziehung zonaler Marker und mechanischer Testungen können ebenfalls zu einem Informationsgewinn beitragen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung der Arthrose ist bis heute keine Heilung dieser Erkrankung möglich. Im Bereich des TE werden neue Therapiestrategien zur Züchtung von transplantationsfähigem, hochwertigem Knorpelgewebe entwickelt [85, 93]. Durch eine Nachahmung des zonalen Aufbaus von Knorpel mittels Schichtung autologer Chondrozyten-Subpopulationen könnten die biomechanischen Eigenschaften der Konstrukte verbessert werden [118]. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit ist eine Expansion dieser Zellen mit resultierender Dedifferenzierung und anschließende Redifferenzierung notwendig [115].

Ziel dieser Arbeit war, das Zellverhalten expandierter zonenspezifischer Chondrozyten sowie den Effekt einer zonalen Schichtung bezüglich Proliferation, Zellmorphologie und Produktion knorpelspezifischer EZM-Komponenten zu untersuchen. Die Subpopulationen (*superficial/deep zone chondrocytes*, SZC und DZC) wurden dazu in Agarose-Hydrogelen kultiviert, um eine chondrogene Redifferenzierung anzuregen. Zusätzlich wurden verschiedene Kulturbedingungen gezielt verändert, um einen möglichen Einfluss zu identifizieren.

Der jeweilige Phänotyp der zonalen Subpopulationen ähnelte dem im nativen Knorpel. Während die SZC insgesamt mehr GAG und Kollagen II pro Gel produzierten, war die Syntheserate pro DNA bei den DZC höher. Bei gemeinsamer Kultivierung konnte ein Einfluss der Zelltypen aufeinander beobachtet werden, zonale Schichtung führte zu einer tiefenabhängig unterschiedlichen Matrixverteilung. Sowohl hypoxische Umgebung als auch vorherige Kryokonservierung der Zellen führten zu einer verminderten Matrixproduktion. Im Gegensatz zu Agarose wies das experimentelle Material HA/PG eine ungünstige Biokompatibilität für Chondrozyten auf.

Die Nachahmung des physiologischen zonalen Aufbaus erscheint vielversprechend in Hinblick auf die Optimierung gezüchteter Knorpelkonstrukte. Bevor diese Erkenntnisse jedoch in die klinische Praxis übertragen werden können, bedarf es weiterer Erforschung der De- und Redifferenzierungsfähigkeit zonenspezifischer Chondrozyten sowie ihren Anforderungen an die Kulturbedingungen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bosman, F. T. und Stamenkovic, I. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol, 2003. **200**: S. 423-8.
2. Roughley, P. J. *The structure and function of cartilage proteoglycans*. Eur Cell Mater, 2006. **12**: S. 92-101.
3. Oldershaw, R. A., Baxter, M. A., Lowe, E. T., Bates, N., Grady, L. M., Soncin, F., Brison, D. R., Hardingham, T. E. und Kimber, S. J. *Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes*. Nat Biotechnol, 2010. **28**: S. 1187-94.
4. Augustyniak, E., Trzeciak, T., Richter, M., Kaczmarczyk, J. und Suchorska, W. *The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration*. Int Orthop, 2015. **39**: S. 995-1003.
5. Godman, G. C. und Porter, K. R. *Chondrogenesis, studied with the electron microscope*. J Biophys Biochem Cytol, 1960. **8**: S. 719-60.
6. Chijimatsu, R. und Saito, T. *Mechanisms of synovial joint and articular cartilage development*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**: S. 3939-52.
7. Buckwalter, J. A. *Articular cartilage*. Instr Course Lect, 1983. **32**: S. 349-70.
8. Yajima, T. *Ultrastructural and cytochemical studies on the remodelling of the tracheal cartilage*. Arch Histol Jpn, 1976. **39**: S. 79-97.
9. Goldring, M. B. *Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012. **4**: S. 269-85.
10. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. und Rodeo, S. A. *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**: S. 461-8.
11. Buckwalter, J. A. und Mankin, H. J. *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. Instr Course Lect, 1998. **47**: S. 477-86.
12. Mow, V. C., Ratcliffe, A. und Poole, A. R. *Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures*. Biomaterials, 1992. **13**: S. 67-97.
13. Mow, V. C. und Guo, X. E. *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. Annu Rev Biomed Eng, 2002. **4**: S. 175-209.
14. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. und Grodzinsky, A. J. *Articular cartilage and osteoarthritis*. Instr Course Lect, 2005. **54**: S. 465-80.
15. Hunziker, E. B., Quinn, T. M. und Hauselmann, H. J. *Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**: S. 564-72.
16. Chen, C., Tambe, D. T., Deng, L. und Yang, L. *Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**: C1202-8.
17. Poole, C. A. *Articular cartilage chondrons: form, function and failure*. J Anat, 1997. **191**: S. 1-13.

18. Cohen, N. P., Foster, R. J. und Mow, V. C. *Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state*. J Orthop Sports Phys Ther, 1998. **28**: S. 203-15.
19. Boettcher, K., Kienle, S., Nachtsheim, J., Burgkart, R., Hugel, T. und Lieleg, O. *The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration*. Acta Biomater, 2016. **29**: S. 180-7.
20. Eyre, D. R. *Collagens and cartilage matrix homeostasis*. Clin Orthop Relat Res, 2004. (427 Suppl): S. 118-22.
21. Eyre, D. R. *The collagens of articular cartilage*. Semin Arthritis Rheum, 1991. **21**: S. 2-11.
22. McAlinden, A., Traeger, G., Hansen, U., Weis, M. A., Ravindran, S., Wirthlin, L., Eyre, D. R. und Fernandes, R. J. *Molecular properties and fibril ultrastructure of types II and XI collagens in cartilage of mice expressing exclusively the alpha1(IIA) collagen isoform*. Matrix Biol, 2014. **34**: S. 105-13.
23. Klein, T. J., Malda, J., Sah, R. L. und Huttmacher, D. W. *Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**: S. 143-57.
24. Firner, S., Zaucke, F., Michael, J., Dargel, J., Schiwy-Bochat, K. H., Heilig, J., Rothschild, M. A., Eysel, P., Bruggemann, G. P. und Niehoff, A. *Extracellular distribution of collagen II and pericellular adapter proteins in healthy and osteoarthritic human knee joint cartilage*. J Histochem Cytochem, 2017. **65**: S. 593-606.
25. Vynios, D. H. *Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: 452315.
26. Kuiper, N. J. und Sharma, A. *A detailed quantitative outcome measure of glycosaminoglycans in human articular cartilage for cell therapy and tissue engineering strategies*. Osteoarthritis Cartilage, 2015. **23**: S. 2233-41.
27. Rizkalla, G., Reiner, A., Bogoch, E. und Poole, A. R. *Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease*. J Clin Invest, 1992. **90**: S. 2268-77.
28. Maroudas, A. und Bannan, C. *Measurement of swelling pressure in cartilage and comparison with the osmotic pressure of constituent proteoglycans*. Biorheology, 1981. **18**: S. 619-32.
29. Roughley, P. J. und Lee, E. R. *Cartilage proteoglycans: structure and potential functions*. Microsc Res Tech, 1994. **28**: S. 385-97.
30. Rudert, M. und Wirth, C. J. *[Cartilage regeneration and substitution]*. Orthopade, 1998. **27**: S. 309-21.
31. Pritzker, K. P. und Aigner, T. *Terminology of osteoarthritis cartilage and bone histopathology - a proposal for a consensus*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**: S. 7-9.
32. Wong, M., Wuethrich, P., Egli, P. und Hunziker, E. *Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography*. J Orthop Res, 1996. **14**: S. 424-32.

33. Yin, J., Xia, Y. und Lu, M. *Concentration profiles of collagen and proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2012. **88**: S. 90-6.
34. Hosseini, S. M., Wu, Y., Ito, K. und van Donkelaar, C. C. *The importance of superficial collagen fibrils for the function of articular cartilage*. Biomech Model Mechanobiol, 2014. **13**: S. 41-51.
35. Silverberg, J. L., Barrett, A. R., Das, M., Petersen, P. B., Bonassar, L. J. und Cohen, I. *Structure-function relations and rigidity percolation in the shear properties of articular cartilage*. Biophys J, 2014. **107**: S. 1721-30.
36. Klein, T. J., Chaudhry, M., Bae, W. C. und Sah, R. L. *Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage*. J Biomech, 2007. **40**: S. 182-90.
37. Chen, S. S., Falcovitz, Y. H., Schneiderman, R., Maroudas, A. und Sah, R. L. *Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: relationship to fixed charge density*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**: S. 561-9.
38. Ogata, K., Whiteside, L. A. und Lesker, P. A. *Subchondral route for nutrition to articular cartilage in the rabbit. Measurement of diffusion with hydrogen gas in vivo*. J Bone Joint Surg Am, 1978. **60**: S. 905-10.
39. Wang, Y., Wei, L., Zeng, L., He, D. und Wei, X. *Nutrition and degeneration of articular cartilage*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2013. **21**: S. 1751-62.
40. Malinin, T. und Ouellette, E. A. *Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**: S. 483-91.
41. Zhou, S., Cui, Z. und Urban, J. P. *Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study*. Arthritis Rheum, 2004. **50**: S. 3915-24.
42. Gibson, J. S., Milner, P. I., White, R., Fairfax, T. P. und Wilkins, R. J. *Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis*. Pflugers Arch, 2008. **455**: S. 563-73.
43. Pfander, D. und Gelse, K. *Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**: S. 457-62.
44. Hunter, W. *Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743*. Clin Orthop Relat Res, 1995. (317): S. 3-6.
45. Spitaels, D., Mamouris, P., Vaes, B., Smeets, M., Luyten, F., Hermens, R. und Vankrunkelsven, P. *Epidemiology of knee osteoarthritis in general practice: a registry-based study*. BMJ Open, 2020. **10**: e031734.
46. Fuchs, J., Kuhnert, R. und Scheidt-Nave, C. *12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland*. J Health Monit, 2017. **2**: S. 55-60.
47. Vina, E. R. und Kwok, C. K. *Epidemiology of osteoarthritis: literature update*. Curr Opin Rheumatol, 2018. **30**: S. 160-7.
48. O'Neill, T. W., McCabe, P. S. und McBeth, J. *Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018. **32**: S. 312-26.

49. Kloppenburg, M. und Berenbaum, F. *Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy*. Osteoarthritis Cartilage, 2020. **28**: S. 242-8.
50. Rabenberg, M. *Arthrose Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 54*, Hrsg. Robert Koch-Institut, 2013.
51. Weissenberger, M., Heinz, T., Boelch, S. P., Niemeyer, P., Rudert, M., Barthel, T. und Reppenhagen, S. *Is debridement beneficial for focal cartilage defects of the knee: data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU)*. Arch Orthop Trauma Surg, 2020. **140**: S. 373-82.
52. Aae, T. F., Randsborg, P. H., Luras, H., Aroen, A. und Lian, O. B. *Microfracture is more cost-effective than autologous chondrocyte implantation: a review of level 1 and level 2 studies with 5 year follow-up*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2018. **26**: S. 1044-52.
53. Felson, D. T. *Epidemiology of hip and knee osteoarthritis*. Epidemiol Rev, 1988. **10**: S. 1-28.
54. Hoberg, M., Aicher, W. K., Wulker, N. und Rudert, M. *[Expression analysis of different collagens and cytokines in cartilage cells derived from arthrotic hip and knee joints]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2006. **144**: S. 289-95.
55. Bolduc, J. A., Collins, J. A. und Loeser, R. F. *Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis*. Free Radic Biol Med, 2019. **132**: S. 73-82.
56. Aigner, T. und McKenna, L. *Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**: S. 5-18.
57. Bank, R. A., Soudry, M., Maroudas, A., Mizrahi, J. und TeKoppele, J. M. *The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation*. Arthritis Rheum, 2000. **43**: S. 2202-10.
58. Hollander, A. P., Heathfield, T. F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., Rorabeck, C. und Poole, A. R. *Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay*. J Clin Invest, 1994. **93**: S. 1722-32.
59. Aigner, T., Reichenberger, E., Bertling, W., Kirsch, T., Stoss, H. und von der Mark, K. *Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1993. **63**: S. 205-11.
60. von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Gluckert, K. und Stoss, H. *Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy*. Arthritis Rheum, 1992. **35**: S. 806-11.
61. Racine, J. und Aaron, R. K. *Pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis*. R I Med J (2013), 2013. **96**: S. 19-22.
62. Outerbridge, R. E. *Further studies on the etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1964. **46**: S. 179-90.
63. Wu, C. W., Morrell, M. R., Heinze, E., Concoff, A. L., Wollaston, S. J., Arnold, E. L., Singh, R., Charles, C., Skovrun, M. L., FitzGerald, J. D., Moreland, L. W. und Kalunian, K. C. *Validation of American College of Rheumatology classification criteria for knee osteoarthritis using arthroscopically defined cartilage damage scores*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **35**: S. 197-201.
64. Kleemann, R. U., Krockner, D., Cedraro, A., Tuischer, J. und Duda, G. N. *Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade)*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**: S. 958-63.

65. Schone, M., Mannicke, N., Somerson, J. S., Marquass, B., Henkelmann, R., Mochida, J., Aigner, T., Raum, K. und Schulz, R. M. *3D ultrasound biomicroscopy for assessment of cartilage repair tissue: volumetric characterisation and correlation to established classification systems*. Eur Cell Mater, 2016. **31**: S. 119-35.
66. Pritzker, K. P., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J. P., Revell, P. A., Salter, D. und van den Berg, W. B. *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**: S. 13-29.
67. Mannicke, N., Schone, M., Oelze, M. und Raum, K. *Articular cartilage degeneration classification by means of high-frequency ultrasound*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**: S. 1577-82.
68. Bruyere, O., Cooper, C., Arden, N., Branco, J., Brandi, M. L., Herrero-Beaumont, G., Berenbaum, F., Dennison, E., Devogelaer, J. P., Hochberg, M., Kanis, J., Laslop, A., McAlindon, T., Reiter, S., Richette, P., Rizzoli, R. und Reginster, J. Y. *Can we identify patients with high risk of osteoarthritis progression who will respond to treatment? A focus on epidemiology and phenotype of osteoarthritis*. Drugs Aging, 2015. **32**: S. 179-87.
69. Sakalauskiene, G. und Jauniskiene, D. *Osteoarthritis: etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management*. Medicina (Kaunas), 2010. **46**: S. 790-7.
70. Moskowitz, R. W. *Primary osteoarthritis: epidemiology, clinical aspects, and general management*. Am J Med, 1987. **83**: S. 5-10.
71. Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R. und O'Keefe, R. J. *Articular cartilage biology*. J Am Acad Orthop Surg, 2003. **11**: S. 421-30.
72. Manoto, S. L., Maepa, M. J. und Motaung, S. K. *Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis*. Saudi J Biol Sci, 2018. **25**: S. 672-9.
73. Burkart, A. C., Schoettle, P. B. und Imhoff, A. B. *[Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage]*. Unfallchirurg, 2001. **104**: S. 798-807.
74. Buckwalter, J. A. *Articular cartilage injuries*. Clin Orthop Relat Res, 2002. (402): S. 21-37.
75. Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C. und Athanasiou, K. A. *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**: S. 21-34.
76. Madsen, B. L., Noer, H. H., Carstensen, J. P. und Normark, F. *Long-term results of periosteal transplantation in osteochondritis dissecans of the knee*. Orthopedics, 2000. **23**: S. 223-6.
77. Behrens, P., Bosch, U., Bruns, J., Erggelet, C., Esenwein, S. A., Gaissmaier, C., Krackhardt, T., Lohnert, J., Marlovits, S., Meenen, N. M., Mollenhauer, J., Nehrer, S., Niethard, F. U., Noth, U., Perka, C., Richter, W., Schafer, D., Schneider, U., Steinwachs, M., Weise, K., German Society for Traumatology und German Society for Orthopedic Surgery *[Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2004. **142**: S. 529-39.
78. Buckwalter, J. A. und Mankin, H. J. *Articular cartilage repair and transplantation*. Arthritis Rheum, 1998. **41**: S. 1331-42.

79. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. und Peterson, L. *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**: S. 889-95.
80. Basad, E., Ishaque, B., Bachmann, G., Sturz, H. und Steinmeyer, J. *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**: S. 519-27.
81. Oussedik, S., Tsitskaris, K. und Parker, D. *Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review*. Arthroscopy, 2015. **31**: S. 732-44.
82. Kraeutler, M. J., Belk, J. W., Purcell, J. M. und McCarty, E. C. *Microfracture versus autologous chondrocyte implantation for articular cartilage lesions in the knee: a systematic review of 5-year outcomes*. Am J Sports Med, 2018. **46**: S. 995-9.
83. Gou, G. H., Tseng, F. J., Wang, S. H., Chen, P. J., Shyu, J. F., Weng, C. F. und Pan, R. Y. *Autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the knee: a meta-analysis and systematic review*. Arthroscopy, 2020. **36**: S. 289-303.
84. Kim, H. K., Moran, M. E. und Salter, R. B. *The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**: S. 1301-15.
85. Armiento, A. R., Stoddart, M. J., Alini, M. und Eglin, D. *Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology*. Acta Biomater, 2018. **65**: S. 1-20.
86. Vinatier, C. und Guicheux, J. *Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments*. Ann Phys Rehabil Med, 2016. **59**: S. 139-44.
87. Middendorf, J. M., Griffin, D. J., Shortkroff, S., Dugopolski, C., Kennedy, S., Siemiatkoski, J., Cohen, I. und Bonassar, L. J. *Mechanical properties and structure-function relationships of human chondrocyte-seeded cartilage constructs after in vitro culture*. J Orthop Res, 2017. **35**: S. 2298-306.
88. Chen, T., Hilton, M. J., Brown, E. B., Zuscik, M. J. und Awad, H. A. *Engineering superficial zone features in tissue engineered cartilage*. Biotechnol Bioeng, 2013. **110**: S. 1476-86.
89. Foldager, C. B., Nielsen, A. B., Munir, S., Ulrich-Vinther, M., Soballe, K., Bunger, C. und Lind, M. *Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes*. Acta Orthop, 2011. **82**: S. 234-40.
90. Steele, J. A., McCullen, S. D., Callanan, A., Autefage, H., Accardi, M. A., Dini, D. und Stevens, M. M. *Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering*. Acta Biomater, 2014. **10**: S. 2065-75.
91. Yang, J., Zhang, Y. S., Yue, K. und Khademhosseini, A. *Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering*. Acta Biomater, 2017. **57**: S. 1-25.
92. Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Wright, S., Kasper, F. K. und Mikos, A. G. *The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds*. Biomaterials, 2013. **34**: S. 4266-73.

93. Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J. M., Audigie, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F. und Galera, P. *Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**: S. 2414-40.
94. Mancini, I. A. D., Schmidt, S., Brommer, H., Pouran, B., Schafer, S., Tessmar, J., Mensinga, A., van Rijen, M. H. P., Groll, J., Blunk, T., Levato, R., Malda, J. und van Weeren, P. R. *A composite hydrogel-3D printed thermoplast osteochondral anchor as example for a zonal approach to cartilage repair: in vivo performance in a long-term equine model*. *Biofabrication*, 2020. **12**: 035028.
95. Anderson, D. E., Markway, B. D., Weekes, K. J., McCarthy, H. E. und Johnstone, B. *Physioxia promotes the articular chondrocyte-like phenotype in human chondroprogenitor-derived self-organized tissue*. *Tissue Eng Part A*, 2018. **24**: S. 264-74.
96. Mouser, V. H. M., Levato, R., Mensinga, A., Dhert, W. J. A., Gawlitta, D. und Malda, J. *Bio-ink development for three-dimensional bioprinting of hetero-cellular cartilage constructs*. *Connect Tissue Res*, 2020. **61**: S. 137-51.
97. Ng, K. W., Ateshian, G. A. und Hung, C. T. *Zonal chondrocytes seeded in a layered agarose hydrogel create engineered cartilage with depth-dependent cellular and mechanical inhomogeneity*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**: S. 2315-24.
98. Owida, H. A., Yang, R., Cen, L., Kuiper, N. J. und Yang, Y. *Induction of zonal-specific cellular morphology and matrix synthesis for biomimetic cartilage regeneration using hybrid scaffolds*. *J R Soc Interface*, 2018. **15**: 20180310.
99. Stichler, S., Bock, T., Paxton, N., Bertlein, S., Levato, R., Schill, V., Smolan, W., Malda, J., Tessmar, J., Blunk, T. und Groll, J. *Double printing of hyaluronic acid/poly(glycidol) hybrid hydrogels with poly(epsilon-caprolactone) for MSC chondrogenesis*. *Biofabrication*, 2017. **9**: 044108.
100. Nguyen, L. H., Kudva, A. K., Saxena, N. S. und Roy, K. *Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel*. *Biomaterials*, 2011. **32**: S. 6946-52.
101. Böck, T., Schill, V., Krähnke, M., Steinert, A. F., Tessmar, J., Blunk, T. und Groll, J. *TGF-beta1-modified hyaluronic acid/poly(glycidol) hydrogels for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells*. *Macromol Biosci*, 2018. **18**: 1700390.
102. Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J., Courter, D. L., Hollander, A. P., Nahir, A. M., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. und Freed, L. E. *Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage*. *Tissue Eng*, 2002. **8**: S. 73-84.
103. Castilho, M., Mouser, V., Chen, M., Malda, J. und Ito, K. *Bi-layered micro-fibre reinforced hydrogels for articular cartilage regeneration*. *Acta Biomater*, 2019. **95**: S. 297-306.
104. Weissenberger, M., Weissenberger, M. H., Gilbert, F., Groll, J., Evans, C. H. und Steinert, A. F. *Reduced hypertrophy in vitro after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020. **21**: 109.

105. Mouser, V. H. M., Levato, R., Bonassar, L. J., D'Lima, D. D., Grande, D. A., Klein, T. J., Saris, D. B. F., Zenobi-Wong, M., Gawlitta, D. und Malda, J. *Three-dimensional bioprinting and its potential in the field of articular cartilage regeneration*. Cartilage, 2017. **8**: S. 327-40.
106. CORDIS EU research results *Bioactivated hierarchical hydrogels as zonal implants for articular cartilage regeneration - Reporting*. 2018. URL: <https://cordis.europa.eu/project/id/309962/reporting/de> [Stand:25.08.2020].
107. Bothe, F., Deubel, A. K., Hesse, E., Lotz, B., Groll, J., Werner, C., Richter, W. und Hagmann, S. *Treatment of focal cartilage defects in minipigs with zonal chondrocyte/mesenchymal progenitor cell constructs*. Int J Mol Sci, 2019. **20**: 653.
108. Klein, T. J. und Sah, R. L. *Modulation of depth-dependent properties in tissue-engineered cartilage with a semi-permeable membrane and perfusion: a continuum model of matrix metabolism and transport*. Biomech Model Mechanobiol, 2007. **6**: S. 21-32.
109. Sharma, B., Williams, C. G., Kim, T. K., Sun, D., Malik, A., Khan, M., Leong, K. und Elisseeff, J. H. *Designing zonal organization into tissue-engineered cartilage*. Tissue Eng, 2007. **13**: S. 405-14.
110. Kim, T. K., Sharma, B., Williams, C. G., Ruffner, M. A., Malik, A., McFarland, E. G. und Elisseeff, J. H. *Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**: S. 653-64.
111. Klein, T. J., Schumacher, B. L., Schmidt, T. A., Li, K. W., Voegtline, M. S., Masuda, K., Thonar, E. J.-M. A. und Sah, R. L. *Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**: S. 595-602.
112. Schuurman, W., Harimulyo, E. B., Gawlitta, D., Woodfield, T. B., Dhert, W. J., van Weeren, P. R. und Malda, J. *Three-dimensional assembly of tissue-engineered cartilage constructs results in cartilaginous tissue formation without retainment of zonal characteristics*. J Tissue Eng Regen Med, 2016. **10**: S. 315-24.
113. Archer, C. W., McDowell, J., Bayliss, M. T., Stephens, M. D. und Bentley, G. *Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 2)**: S. 361-71.
114. Yin, L., Wu, Y., Yang, Z., Denslin, V., Ren, X., Tee, C. A., Lai, Z., Lim, C. T., Han, J. und Lee, E. H. *Characterization and application of size-sorted zonal chondrocytes for articular cartilage regeneration*. Biomaterials, 2018. **165**: S. 66-78.
115. Hong, E. und Reddi, A. H. *Dedifferentiation and redifferentiation of articular chondrocytes from surface and middle zones: changes in microRNAs-221/-222, -140, and -143/145 expression*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**: S. 1015-22.
116. Schuurman, W., Gawlitta, D., Klein, T. J., ten Hoope, W., van Rijen, M. H., Dhert, W. J., van Weeren, P. R. und Malda, J. *Zonal chondrocyte subpopulations reacquire zone-specific characteristics during in vitro redifferentiation*. Am J Sports Med, 2009. **37**: S. 97s-104s.

117. Darling, E. M. und Athanasiou, K. A. *Retaining zonal chondrocyte phenotype by means of novel growth environments*. Tissue Eng, 2005. **11**: S. 395-403.
118. Schuurman, W., Klein, T. J., Dhert, W. J., van Weeren, P. R., Hutmacher, D. W. und Malda, J. *Cartilage regeneration using zonal chondrocyte subpopulations: a promising approach or an overcomplicated strategy?* J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**: S. 669-78.
119. Darling, E. M. und Athanasiou, K. A. *Growth factor impact on articular cartilage subpopulations*. Cell Tissue Res, 2005. **322**: S. 463-73.
120. Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M. und Hannig, C. *Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm*. Clin Oral Investig, 2013. **17**: S. 841-50.
121. Olmsted, J., 3rd und Kearns, D. R. *Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids*. Biochemistry, 1977. **16**: S. 3647-54.
122. Martin, I., Obradovic, B., Freed, L. E. und Vunjak-Novakovic, G. *Method for Quantitative Analysis of Glycosaminoglycan Distribution in Cultured Natural and Engineered Cartilage*. Ann Biomed Eng, 1999. **27**: S. 656-62.
123. Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B. und Aigner, T. *Basic methods in histopathology of joint tissues*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**: S. S113-6.
124. Junqueira, L. C., Bignolas, G. und Brentani, R. R. *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. **11**: S. 447-55.
125. Zhang, S., Yang, J. und Lin, J. *3,3'-diaminobenzidine (DAB)-H2O2-HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay for the detection of carcionembryonic antigen*. Bioelectrochemistry, 2008. **72**: S. 47-52.
126. Kim, Y. J., Sah, R. L., Doong, J. Y. und Grodzinsky, A. J. *Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258*. Anal Biochem, 1988. **174**: S. 168-76.
127. Farndale, R. W., Buttle, D. J. und Barrett, A. J. *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. Biochim Biophys Acta, 1986. **883**: S. 173-7.
128. Reddy, G. K. und Enwemeka, C. S. *A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues*. Clin Biochem, 1996. **29**: S. 225-9.
129. Coates, E. E., Riggan, C. N. und Fisher, J. P. *Matrix molecule influence on chondrocyte phenotype and proteoglycan 4 expression by alginate-embedded zonal chondrocytes and mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2012. **30**: S. 1886-97.
130. Hidaka, C., Cheng, C., Alexandre, D., Bhargava, M. und Torzilli, P. A. *Maturational differences in superficial and deep zone articular chondrocytes*. Cell Tissue Res, 2006. **323**: S. 127-35.
131. Hwang, N. S., Varghese, S., Lee, H. J., Theprungsirikul, P., Canver, A., Sharma, B. und Elisseeff, J. *Response of zonal chondrocytes to extracellular matrix-hydrogels*. FEBS Lett, 2007. **581**: S. 4172-8.
132. Rackwitz, L., Djouad, F., Janjanin, S., Noth, U. und Tuan, R. S. *Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte- and mesenchymal stem cell-laden hydrogels in vitro*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**: S. 1148-57.

133. Schrobback, K., Klein, T. J., Crawford, R., Upton, Z., Malda, J. und Leavesley, D. I. *Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes*. Cell Tissue Res, 2012. **347**: S. 649-63.
134. Benya, P. D. und Shaffer, J. D. *Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype When Cultured in Agarose Gels*. Cell, 1982. **30**: S. 215-24.
135. Gegg, C. und Yang, F. *Spatially patterned microribbon-based hydrogels induce zonally-organized cartilage regeneration by stem cells in 3D*. Acta Biomater, 2020. **101**: S. 196-205.
136. Zhou, J., Yue, D., Bai, Y., Kong, F. und Pan, J. *Map and correlate intracellular calcium response and matrix deposition in cartilage under physiological oxygen tensions*. J Cell Physiol, 2018. **233**: S. 4949-60.

APPENDIX

I Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
DMMB	Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZC	Chondrozyten der tiefen Schicht
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronan
HA/PG	Hydrogel mit Kombination aus HA-SH und P(AGE-co-G)
HA-SH	Thiol-funktionalisiertes Hyaluronan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HP	Hydroxyprolin
HRP	Meerettichperoxidase
ICRS	International Cartilage Repair Society
IgG	Immunglobulin G
MIX	Gemischte Hydrogele
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
n	Größe der Stichprobe
p	Signifikanzwert
P(AGE-co-G)	Allyl-funktionalisiertes Polyglycidol

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Polyglycidol
PRG	Proteoglykan
PS	Penicillin/Streptomycin
SD	Standardabweichung
SOX9	Sex determining region Y - Box 9
SZC	Chondrozyten der oberflächlichen Schicht
TE	Tissue Engineering
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
U	Enzymeinheit
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
ZON	Zonale Hydrogele
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

II **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der interterritorialen Extrazellulärmatrix in hyalinem Knorpel im Ruhezustand, unter Kompression und nach Beendigung der Kompression.....	4
Abb. 1.2:	Zonaler Aufbau des Gelenkknorpels mit longitudinalen Schnitten durch den Knorpel der Femurkondyle eines Schweins und schematischer Darstellung des Kollagenfaserverlaufs in den einzelnen Zonen.	6
Abb. 1.3:	Trias des Tissue Engineering zur Reparatur von Gelenkknorpel.	16
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der Redifferenzierungsphase im 3D-Modell mit Kultivierung der Zellen in vier Gruppen.	32
Abb. 2.2:	Schematische Darstellung der Thiol-En-Reaktion.	34
Abb. 2.3:	Schematische Darstellung des Basisprotokolls (A) und der Modifikationen (B).....	41
Abb. 3.1:	Zelldichte in Kulturflaschen der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur, dargestellt durch Auflichtmikroskopie.	43
Abb. 3.2:	Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur.	43
Abb. 3.3	Anteile an vitalen und avitalen Zellen der beiden Versuchsgruppen nach Collagenase-Verdau des Knorpels bzw. nach Trypsinierung der Monoschichtkultur in Prozent.	44
Abb. 3.4:	Viabilität bzw. Vitalität der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.	45
Abb. 3.5:	DNA-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg	46
Abb. 3.6:	Zellmorphologie der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, exemplarisch dargestellt durch Piko-Siriusrot-Färbung.	47
Abb. 3.7:	GAG-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Gel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	48
Abb. 3.8:	GAG-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Safranin O-Färbung.....	49

Abb. 3.9:	Aggrekan-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung.	50
Abb. 3.10:	Kollagengehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Gel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	51
Abb. 3.11:	Gehalt an Gesamtkollagen der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Piko-Siriusrot-Färbung.	52
Abb. 3.12:	Kollagen I-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung.	53
Abb. 3.13:	Kollagen II-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung.	53
Abb. 3.14:	Kollagen X-Gehalt der beiden Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch immunhistochemische Färbung.	54
Abb. 3.15:	Viabilität bzw. Vitalität der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.....	55
Abb. 3.16:	DNA-Gehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg	55
Abb. 3.17:	Zellmorphologie der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in unterschiedlichen Vergrößerungen, exemplarisch dargestellt durch Piko-Siriusrot-Färbung.....	56
Abb. 3.18:	GAG-Gehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	57
Abb. 3.19:	GAG- bzw. Aggrekan-Gehalt der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Safranin O- bzw, immunhistochemische Färbung.	58
Abb. 3.20:	Kollagengehalt der vier Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	59
Abb. 3.21:	Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I, II bzw. X der beiden Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur, dargestellt durch Piko-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.	60

Abb. 3.22:	Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.	62
Abb. 3.23:	DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in μg	62
Abb. 3.24:	Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung.	63
Abb. 3.25:	GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	64
Abb. 3.26:	GAG- bzw. Aggrekan-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Safranin O- bzw. immunhistochemische Färbung.	64
Abb. 3.27:	Kollagengehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Kultur jeweils unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	65
Abb. 3.28:	Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I, II bzw. X der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen, dargestellt durch Pikro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.	66
Abb. 3.29:	Zelldichte in Kulturflaschen der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 12 Tagen in Monoschichtkultur, dargestellt durch Auflichtmikroskopie.	67
Abb. 3.30:	Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der Versuchsgruppen jeweils nach 7 bzw. 12 Tagen in Monoschichtkultur.	67
Abb. 3.31:	Viabilität bzw. Vitalität der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.	68
Abb. 3.32:	DNA-Gehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in μg	68
Abb. 3.33:	Zellmorphologie der Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung.	68

Abb. 3.34:	GAG-Gehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	69
Abb. 3.35:	Kollagengehalt der Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur jeweils nach vorheriger 7- bzw. 12-tägiger Expansionsphase pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	70
Abb. 3.36:	Gehalt an GAG, Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der Gele mit Chondrozyten aus oberflächlicher Schicht nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur und vorheriger 12-tägiger Expansionsphase, dargestellt durch Safranin O-, Pikro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.	70
Abb. 3.37:	Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.	72
Abb. 3.38:	DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach einem Tag in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen und nach 21 Tagen jeweils in HA/PG- bzw. in Agarose-Gelen pro Hydrogel in μg	73
Abb. 3.39:	Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, exemplarisch dargestellt durch Pikro-Siriusrot-Färbung.....	73
Abb. 3.40:	GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach einem Tag in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen und nach 21 Tagen jeweils in HA/PG- bzw. Agarose-Gelen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	74
Abb. 3.41:	GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Safranin O-Färbung.	75
Abb. 3.42:	Gehalt an Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der drei Versuchsgruppen jeweils nach einem bzw. nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur in HA/PG-Gelen, dargestellt durch Pikro-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.	76
Abb. 3.43:	Zelldichte in Kulturflaschen der beiden Versuchsgruppen nach 11 Tagen in Monoschichtkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Auflichtmikroskopie.	77
Abb. 3.44:	Proliferationsraten (definiert als Zellzahl nach Monoschichtkultur geteilt durch Zellzahl vorher) der beiden Versuchsgruppen nach 7 Tagen in Monoschichtkultur ohne bzw. nach 11 Tagen in Monoschichtkultur mit vorheriger Kryokonservierung.	78

Abb. 3.45:	Viabilität bzw. Vitalität der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Live/Dead-Färbung.	78
Abb. 3.46:	DNA-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in μg	79
Abb. 3.47:	Zellmorphologie der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, exemplarisch dargestellt durch Piko-Siriusrot-Färbung.....	79
Abb. 3.48:	GAG-Gehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	80
Abb. 3.49:	Kollagengehalt der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur ohne bzw. mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen pro Hydrogel in μg und pro DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	81
Abb. 3.50:	Gehalt an GAG, Gesamtkollagen sowie Kollagen I bzw. II der drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen in 3D-Zellkultur mit vorheriger Kryokonservierung der Zellen, dargestellt durch Safranin O-, Piko-Siriusrot- bzw. immunhistochemische Färbungen.	82

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Vereinfachte ICRS-Klassifikation von Gelenknorpeldefekten basierend auf der Outerbridge-Klassifikation. Modifiziert von ICRS und [64].	11
Tabelle 2.1: Auflistung der eingesetzten Geräte.....	24
Tabelle 2.2: Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 2.3: Auflistung der eingesetzten Chemikalien	25
Tabelle 2.4: Auflistung der eingesetzten primären Antikörper	27
Tabelle 2.5: Auflistung der eingesetzten sekundären Antikörper	28
Tabelle 2.6: Auflistung der eingesetzten Zellkulturmedien	28
Tabelle 2.7: Auflistung der eingesetzten Puffer und Lösungen	28

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk, für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in den Arbeitskreis und die jederzeit gute Betreuung und Zusammenarbeit danken. Die stets für Nachfragen offenstehende Bürotür war für das erfolgreiche Arbeiten eine große Hilfe

Besonderen Dank schulde ich zudem meiner Betreuerin, Frau Stefanie Schmidt, die mich bei der Planung und Umsetzung der experimentellen Arbeit im Labor sowie der wissenschaftlichen Arbeit bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit immer tatkräftig unterstützt hat. Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die stets sehr nette und kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Ein super Arbeitsklima und lockere Atmosphäre beim Pipettieren und auch beim Kaffee haben die Zeit wie im Flug vergehen lassen.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit gilt mein Dank der Studentischen Statistischen Beratung des Lehrstuhls für Mathematische Statistik der Universität Würzburg.

Natürlich wird an dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an meine Familie und meinen Freund nicht vergessen, die mir in dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich unermüdlich unterstützt haben

V Lebenslauf