



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

der Universität Würzburg

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

**„Untersuchung zweier Gewebekleber auf Basis von Fibrinogen und Gelatine zur
Knorpeladhäsion und -integration in einem In vitro Push-out-Modell“**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

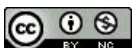
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johannes Maximilian Meister

aus Würzburg



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

Koreferent: Dr. habil. Jörg Teßmar

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2022

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion von Gelenkknorpel	1
1.2	Knorpelschäden und Arthrose	4
1.2.1	Einteilung von Knorpelschäden.....	4
1.2.2	Degeneration bei Arthrose.....	5
1.2.3	Faktoren, die die Entstehung und Entwicklung von Arthrose fördern	6
1.3	Aktuelle und zukünftige Therapieansätze zur Behandlung von Knorpelschäden.....	10
1.3.1	Knochenmarkstimulierende Techniken	10
1.3.2	Osteochondrale Transplantation	10
1.3.3	Regenerative Medizin und Zellbasierte Ansätze (Tissue Engineering)	11
1.4	Knorpelintegration	15
1.4.1	Probleme in der Knorpel-Knorpel-Integration	15
1.4.2	Gewebekleber	17
1.4.3	In vitro Push-Out-Modell	21
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	22
2	Material	25
2.1	Instrumente	25
2.2	Labormaterialien	26
2.3	Chemikalien.....	27
2.4	Nährmedien	29
	Proliferationsmedium	29
	Kulturmedium.....	30
2.5	Lösungen und Puffer	30
3	Methoden	31
3.1	Knorpelextraktion.....	31
3.2	Herstellung der Proben für die Push-Out-Messungen.....	32

3.3	Isolierung der Chondrozyten.....	34
3.4	Kryokonservierung der Chondrozyten.....	34
3.5	Kultivierung und Passagieren der Chondrozyten	34
3.6	Herstellung des Bioadhäsivums.....	35
3.6.1	Vorbereitung der Gelatine-Lösung	35
3.6.2	Vorbereitung der Fibrinogen-Lösung	35
3.6.3	Cross-Linking-Verfahren.....	35
3.7	Enzymatischer Andau	36
3.7.1	Trypsin.....	36
3.7.2	Pepsin.....	36
3.8	Versuchsaufbau Mechanik.....	36
3.8.1	Grundeinheit	36
3.8.2	Messeinheit	37
3.8.3	Prüfmaschine	37
3.8.4	Prüfsoftware.....	38
3.8.5	Messkurve.....	39
3.9	Histologie	40
3.9.1	Paraffinschnitte	40
3.9.2	Kryoschnitte.....	40
3.9.3	Safranin-O-Färbung	40
3.9.4	DAB-Färbung	40
3.9.5	Live/Dead-Färbung.....	41
3.9.6	MTT-Assay.....	41
3.10	Bildgebende Verfahren.....	41
3.10.1	Makroskopische Aufnahmen	41
3.10.2	Mikroskopische Aufnahmen.....	41
3.11	Statistische Auswertung	42
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Sofortadhäsion.....	46
4.1.1	Push-Out-Versuch: Sofortadhäsion durch Ruthenium-Fibrinogen (RuFib) und Ruthenium-Gelatine (RuGel) 150 mg/ml	46
4.1.2	Push-Out-Versuch: Einfluss auf Sofortadhäsion durch enzymatischen Andau mit Pepsin + Trypsin.....	47

4.2	Langzeitintegration über 21 Tage	49
4.2.1	Push-Out-Versuch und Histologie: RuFib und RuGel 150 mg/ml.....	49
4.2.2	Push-Out-Versuch und Histologie: RuGel und RuFib 100 mg/ml.....	52
4.2.3	Kinetik-Reihe Histologie: RuGel und RuFib 100 mg/ml.....	55
4.3	Zellbesiedelte Hydrogele	60
4.3.1	Histologie: RuFib und RuGel in verschiedenen Konzentrationen, mit Zellen besiedelt	60
4.4	Langzeitintegration mit zellbesiedelten Klebern	66
4.4.1	Push-Out-Versuch und Histologie: RuGel + RuFib 100 mg/ml, besiedelt (17×10^6 Zellen).....	66
5	Diskussion	70
5.1	Sofortadhäsion.....	71
5.2	Langzeitintegration.....	73
5.3	Besiedelte Gele.....	79
5.4	Langzeitintegration mit besiedelten Klebern.....	83
5.5	Ausblick	86
6	Zusammenfassung.....	90
7	Literaturverzeichnis.....	93
8	Appendix.....	
8.1	Abkürzungsverzeichnis	
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	
8.3	Tabellenverzeichnis	
8.4	Curriculum Vitae	

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion von Gelenkknorpel

Gelenkknorpel ist ein 2 bis 4 mm dickes, dichtes, elastisches Gewebe, das die Oberfläche aller menschlichen Gelenke überzieht und verbindet um einen reibungsarmen Bewegungsablauf zu gewährleisten^{1,2}. Knorpelgewebe ist avaskulär und nicht innerviert, was einen der Gründe für die schlechte Heilungstendenz darstellt. Es besteht aus einer dichten Extrazellulärmatrix (EZM), in die Chondrozyten, die den einzigen Zelltyp dieses Gewebes darstellen, eingebettet sind².

Chondrozyten: Chondrozyten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen und machen nur einen geringen Anteil von etwa 2% des gesamten Volumens des Knorpels aus³, sind jedoch unabdingbar für dessen Entstehung und Funktionalität. Sie variieren in Anzahl, Form und Größe je nach anatomischer Region. In erwachsenem Knorpel teilen sich Chondrozyten nicht mehr, was einen weiteren Grund für die limitierten Selbstheilungsmöglichkeiten von Gelenkknorpel darstellt². Da Knorpel nicht durchblutet wird, leben die Chondrozyten in einem hypoxischen Milieu und werden durch Diffusion über die Gelenkflüssigkeit und den subchondralen Knochen ernährt². Sie sind verantwortlich für die Synthese, den Erhalt und die Reparatur der EZM¹.

Extrazellulärmatrix (EZM): Die Extrazellulärmatrix setzt sich aus diversen Bestandteilen zusammen. Gewebeflüssigkeit macht 65% bis 80% des Gesamtgewichts aus, Kollagene und Proteoglykane bilden das restliche Trockengewicht^{1,4}. In kleinen Mengen kommen noch einige andere Moleküle wie Lipide, Phospholipide, Nicht-Kollagen-Proteine und Glykoproteine vor. Wasser stellt den Hauptbestandteil der EZM dar und trägt entscheidend zur hohen Kompressionsstabilität des Gewebes bei¹.

Kollagen ist das häufigste Makromolekül in der EZM und macht etwa 60% des Trockengewichtes von Knorpel aus. 80% des Kollagens ist Kollagen Typ II. Weitere Kollagene vom Typ I, IV, VI, IX und XI dienen hauptsächlich der Stabilisierung von Kollagen Typ II. Alle Kollagene haben eine Triple-Helix-Struktur, welche dem Gelenkknorpel seine Zug- und Reißfestigkeit verleihen^{1,2}.

Die zweitgrößte Gruppe unter den Makromolekülen stellen die Proteoglykane (PG) dar, bei denen es sich um Glykosaminoglykane und Proteine handelt, die O-glykosidisch miteinander verbunden sind. Das größte und vom Gewicht her am meisten vorkommende ist Aggrecan. Aggrecan besitzt über 100 Seitenketten und bildet zusammen mit Hyaluron über Link-Proteine⁵ große Proteoglykan-Aggregate¹. Durch Hydratisierung der Seitenketten besitzt es osmotische Eigenschaften, die dem Knorpelgewebe die Fähigkeit verleihen, großen Kompressionskräften standzuhalten^{1,6}. Weitere PG sind Decorin, Biglykan und Fibromodulin. Sie zeichnen sich durch ihre Interaktion mit Kollagen aus. Decorin und Fibromodulin interagieren mit Kollagen Typ II-Fibrillen in der Matrix und sind in der Fibrillogenese und an interfibrillären Interaktionen beteiligt. Biglycan interagiert mit Kollagen Typ VI in der direkten Umgebung der Chondrozyten¹. Chondrozyten und EZM sind hochkomplex organisiert, wobei sich die Zusammensetzung und Struktur des Knorpels in Abhängigkeit von der Gelenkflächenentfernung ändert.

Dabei lassen sich unterschiedliche vertikale Zonen unterscheiden – die oberflächliche Zone, die mittlere Zone, die tiefe Zone und die Zone des kalzifizierten Knorpels ⁷. Jede Zone unterteilt sich weiterhin in verschiedene Regionen – die perizelluläre, die territoriale und die interterritoriale Region ^{1,8}.

Zonen: Die oberflächliche Zone macht etwa 10% bis 20% der Dicke des Gelenkknorpels aus und schützt die tieferen Schichten vor Scherbelastungen. Sie wird von einer Schicht feiner Fibrillen, der „Lamina splendens“ bedeckt. Die hier spindelförmigen Chondrozyten und die dicht gepackten Kollagenfibrillen sind in dieser Zone tangential zur Gelenkoberfläche angeordnet. Die Wasserkonzentration ist in dieser Zone am höchsten und sie steht in Kontakt mit der Gelenkflüssigkeit ^{1,7}.

Die mittlere Zone macht 40%-60% der Knorpeldicke aus und fungiert als anatomische und funktionelle Brücke zwischen der oberflächlichen und der tiefen Zone. Die Chondrozyten sind rundlich geformt und in geringer Konzentration vorhanden. Sie enthält die höchste Konzentration an PG und die niedrigste Konzentration an Wasser. Die Kollagenfibrillen haben in dieser Zone den größten Durchmesser und verlaufen schräg. Dadurch werden Kompressionskräfte zunächst durch diese Zone abgefangen ^{1,7}.

Die tiefe Zone (30% der Knorpeldicke) zeichnet sich durch senkrecht verlaufende Kollagenfasern und runde, in Säulen angeordnete Knorpelzellen aus. Sie bildet den stärksten Widerstand gegenüber vertikal auftretenden Kompressionskräften. ^{1,7} Die Kollagenfasern strahlen senkrecht in die sogenannte „tidemark“ ein, die die Grenze zwischen nicht-kalzifizierter und kalzifizierter Matrix darstellt und lichtmikroskopisch als basophile Linie erkennbar ist ⁷.

Der Übergang in die dünne Zone des kalzifizierten Knorpels verläuft zapfenförmig, um die Integrität des Gewebes zu steigern und den Knorpel im Knochen zu verankern. Zellen sind in dieser Zone selten, kleiner und metabolisch kaum aktiv ^{1,7}.

Regionen: Neben der zonalen Organisation unterteilt sich die EZM in unterschiedliche Regionen in Abhängigkeit von der Entfernung zu den Chondrozyten sowie in der Zusammensetzung und Anordnung ihrer Bestandteile. Es werden dadurch drei Regionen unterschieden: die perizelluläre, die territoriale sowie die interterritoriale Region.

Die perizelluläre Matrix befindet sich in unmittelbarer Umgebung der Chondrozyten und steht in direktem Kontakt mit der Zellmembran ¹. Vermutlich spielt sie eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei Deformierung von Chondrozyten durch Lasteinwirkung ⁹ und in der Pathogenese der Osteoarthritis ^{1,10,11}. Zusammen mit den sie umgebenden Chondrozyten wird diese Funktionseinheit als Chondron bezeichnet ^{12,13}. Sie enthält hauptsächlich PG sowie einige Glykoproteine und andere nicht-kollagene Proteine.

Die territoriale Matrix umgibt die perizelluläre Matrix und besteht vorwiegend aus dünnen Kollagenfibrillen sowie Proteoglykanen, ^{14,15} die ein Gerüst um die Zellen bilden, das vermutlich eine Schutzfunktion vor mechanischem Stress hat ¹.

Die interterritoriale Region umgibt die zwei anderen als größte Region und ist durch große, entsprechend der Zonen angeordnete Kollagenfibrillen gekennzeichnet ¹. Diese Region übernimmt die größte biomechanische Last, die auf den Knorpel einwirkt ¹⁶.

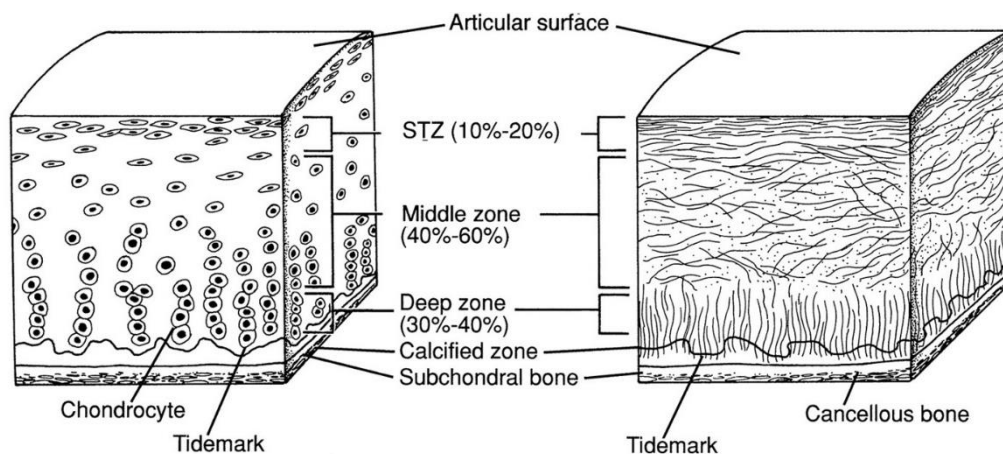


Abbildung 1: Schematische Abbildung der makromolekularen Organisation von adultem Gelenkknorpel. Das Gewebe unterteilt sich in vier verschiedene Zonen: die superfizielle (STZ), die mittlere (Middle zone), die tiefe (Deep zone) und die Zone des kalzifizierenden Knorpels (Calcified zone), unter der sich der subchondrale Knochen befindet. Jede Zone ist einzigartig hinsichtlich ihrer Zellmorphologie (mitte-linker Ausschnitt) und der Kollagenfibrillenorganisation (rechter Ausschnitt). Bild entstammt Buckwalter et. al ¹⁷, mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc.

Gelenkknorpel zeichnet sich durch seine optimalen Reibungseigenschaften sowie einzigartige viskoelastische Eigenschaften aus, die es dem Gewebe ermöglichen, sehr hohen wiederkehrenden Belastungen standzuhalten und diese auf den Knochen zu übertragen, ohne dabei Schaden zu nehmen ^{18,19}. Diese Fähigkeit erlangt der Knorpel durch sein Zusammenspiel aus flüssigen und festen Bestandteilen. Der feste Bestandteil besteht aus Chondrozyten und der permeablen EZM, die wie bereits beschrieben wiederum unterteilt werden kann in Kollagene und Proteoglykane. Die Glykosaminoglykane (GAG) der PG sind stark negativ geladen, weshalb sie Kationen wie Na^+ und Ca^{2+} aus der flüssigen Phase an sich ziehen, wodurch ein osmotischer Druck resultiert, der Wasser im Gewebe hält ²⁰⁻²². Wenn die Gelenkflächen bei Bewegung belastet werden, resultiert eine rapide Steigerung des interstitiellen Drucks, woraufhin Flüssigkeit aus der durchlässigen EZM fließt ^{20,21,23}. Diese Flüssigkeit trägt den Großteil der applizierten Last ohne den Knorpel direkt zu belasten ²⁴. Wenn der Druck nachlässt, strömt die Flüssigkeit wieder zurück ins Gewebe. Mit jeder Bewegung in einem Gelenk wird interstitielle Flüssigkeit aus dem Gewebe herausgepresst und dann wieder zurückgesogen. Die geringe Permeabilität der EZM verhindert dabei, dass die Flüssigkeit zu schnell aus dem Gewebe gedrückt wird. Durch die gegenüberstehenden Knochen und den umgebenden Knorpel wird das Gewebe begrenzt und mechanische Deformierung verhindert ^{1,18,25}. Durch diese Mechanismen ermöglicht Knorpel trotz begrenzter Selbstheilungsmöglichkeiten die reibungsarme Übertragung und Verteilung großer mechanischer Lasten über einen langen Zeitraum und unter extremen Bedingungen. Dennoch kann es zu traumatischen oder degenerativen Knorpelverletzungen kommen, die sich nur schwer suffizient therapieren lassen.

1.2 Knorpelschäden und Arthrose

1.2.1 Einteilung von Knorpelschäden

Knorpelschäden können in Größe, Form und Tiefe stark variieren. In den schweren Fällen reicht der Defekt bis auf den subchondralen Knochen hinunter. Sie können Symptome wie Unbehaglichkeit, Empfindlichkeit oder auch Schmerzen im Gelenk, Schwellung und Funktionseinschränkungen verursachen ²⁶. Da viele Läsionen in den Anfangsstadien jedoch keine Symptome verursachen, werden sie häufig übersehen, weshalb die Diagnosestellung sich oft als schwierig erweist ²⁷. Allerdings entwickeln sich meist auch diese stummen Läsionen unbehandelt weiter zu größeren fokalen Defekten. Um die Knorpelschäden systematisch erfassen, unterteilen und Therapieeffekte beurteilen zu können, wurden diverse Klassifikationssysteme entwickelt. Die zwei am häufigsten angewandten sind die Klassifikation nach Outerbridge ²⁸ und die ICRS-Skala, die von der International Cartilage Repair Society entwickelt wurde und im Gegensatz zur Outerbridge-Klassifikation auch die Tiefe des Defekts beschreibt ²⁹.

Tabelle 1: Klassifikation osteochondraler Verletzungen nach der ICRS-Skala

ICRS-Grad

Grad 0	Normal Gesunde Erscheinung, keine Risse
Grad 1	Fast normal 1.a: Leichte Eindellung 1.b: Oberflächliche Risse/Fissuren
Grad 2	Abnormal Läsionen reichen bis 50% der Knorpeldicke
Grad 3	Schwere Läsionen 3.a: Knorpeldefekte > 50% der Dicke 3.b: Knorpeldefekte reichen bis zur kalzifizierten Zone 3.c: Knorpeldefekte reichen bis zur subchondralen Platte ohne sie zu durchbohren 3.d: Knorpel bildet Blasen um den Defekt
Grad 4	Sehr schwere Läsionen 4.a: Knorpelläsion reicht bis zum subchondralen Knochen aber nicht im gesamten Durchmesser 4.b: Knorpelläsion durchbricht den subchondralen Knochen komplett und im gesamten Durchmesser

Tabelle 2: Klassifikation osteochondraler Verletzungen nach der Outerbridge-Klassifikation

Outerbridge-Grad

Grad I	Erweichung und Schwellung des Knorpels
Grad II	Fragmentierung und Rissbildung in einem Bereich $\leq 0,5$ Zoll (1,27 cm) im Durchmesser
Grad III	Fragmentierung und Rissbildung in einem Bereich $> 0,5$ Zoll (1,27 cm) im Durchmesser
Grad IV	Erosion des Knorpels bis auf den exponierten subchondralen Knochen

Knorpeldefekte können grob in degenerative Läsionen und traumatische Defekte unterteilt werden³⁰. Unabhängig von der Ätiologie erhöhen sie jedoch das Risiko, eine Arthrose zu entwickeln. Arthrose stellt mit einer Prävalenz von 25% der über 18-Jährigen in der Bevölkerung die häufigste Gelenkerkrankung dar³¹. Sie ist mit einer deutlichen Morbidität und körperlichen Einschränkungen assoziiert. Es wird angenommen, dass im Jahr 2030 Arthrose die häufigste Ursache für Behinderung darstellen wird³². Die Krankheit ist charakterisiert durch Schmerzen und degenerative Läsionen sowohl im Knorpel selber als auch in das Gelenk umgebenden Geweben. So kommt es bei fortschreitender Arthrose zum Remodeling des subchondralen Knochens, zu Osteophytenbildung und Veränderungen der Synovia, der Gelenkkapsel und der Ligamente^{26,33}. Jedes Gelenk im Körper kann befallen sein, am häufigsten betroffen sind jedoch das Knie- und das Hüftgelenk. Obwohl Arthrose im Endstadium meist zu einem typischen Symptomkomplex aus chronischen Schmerzen, Gelenkinstabilität, Versteifung und Funktionsverlust führt, sind die Ursachen vielfältig²⁶. Die häufigsten Risikofaktoren stellen traumatische Knorpelschädigungen und das Alter dar, weitere Risikofaktoren sind Übergewicht, metabolisches Syndrom, Entzündung, genetische Faktoren sowie das weibliche Geschlecht. Sie alle führen zu einer Störung in der Homöostase der Chondrozyten^{34,35}.

1.2.2 Degeneration bei Arthrose

Unter normalen Bedingungen ruhen die Chondrozyten in einem belastungsfreien Zustand mit niedrigem Umsatz der EZM. Als Reaktion auf Umgebungsveränderungen, wie dem Einfluss von biomechanischen Belastungen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, steigern die Chondrozyten ihre metabolische Aktivität und verändern damit die Zusammensetzung und Organisation der Matrix. Die genauen molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression der Arthrose sind dabei noch nicht vollständig verstanden, es lassen sich allerdings drei überlappende Stadien abgrenzen^{7,26}:

Stadium 1: Zerschneiden der Matrix

Bei frühen Veränderungen der Umgebung der Chondrozyten, etwa durch mechanischen Stress, setzen diese Sauerstoffradikale frei, die eine fortschreitende Gewebeerstörung in Gang setzen³⁶. Durch Abnahme der Molekülgröße, besonders der Aggrecane, tritt initial ein erhöhter Wassergehalt auf. Querverbindungen im Kollagenen-Netzwerk werden beschädigt⁷. Das Zerschneiden des Matrix-Netzwerkes auf molekularer Ebene ist die Folge³⁷.

Stadium 2: Chondrozyten-Aktivierung

Die Veränderungen der Osmolarität, der elektrischen Ladung und die Freisetzung verschiedener Mediatoren führen zu einer Aktivierung der Chondrozyten mit Proliferation und Steigerung der metabolischen Aktivität. Die Proliferation läuft dabei eher unkontrolliert ab und die Chondrozyten bilden Zell-Cluster, in denen die Zellen neue Matrix-Moleküle synthetisieren und in ihre Umgebung abgeben^{7,38}. Es kommt zu einer veränderten Genexpression, beispielsweise zu einer erhöhten Expression von TGF- β und Entzündungsmolekülen wie TNF- α , Interleukin (IL)-6 und IL-1, die eine Entzündung induzieren und diese als positive Selbstverstärker weiter befeuern^{39,40}. Diese Dysbalance führt zusätzlich dazu, dass die Chondrozyten Metalloproteinasen (MMP), Aggrecanasen und weitere katabolische Enzyme wie ADAMTS5 sowie Fibronectin sezernieren³³. In der Folge kommt es zur fortschreitenden Degradation der interstitiellen Matrix und zur Destabilisierung des gesamten kollagenen Netzwerkes. Der aktivierte Zustand der Chondrozyten kann über Jahre andauern⁷. Die Krankheit schreitet dabei langsam voran und kann lange asymptomatisch bleiben²⁶.

Stadium 3: Gewebe-Untergang

In der letzten Phase des degenerativen arthrotischen Prozesses kommt es zum fortschreitenden Tod der Chondrozyten durch Apoptose und zu einem kompletten Verlust der Knorpelschicht^{7,26,41}. Durch den Knorpelverlust kommt es zu Begleitreaktionen im Bereich des subchondralen Knochens, beginnend mit Sklerosierung und später mit Zystenbildung. Die Krankheit tritt in eine symptomatische Phase mit Gelenkschmerzen und Bewegungseinschränkungen über^{7,26}.

1.2.3 Faktoren, die die Entstehung und Entwicklung von Arthrose fördern

Traumatische Gelenkschädigungen

Meistens tritt Arthrose idiopathisch auf und betrifft hauptsächlich Menschen über 60 Jahre; das Arthroserisiko infolge traumatischer Gelenkschädigungen ist jedoch vor allem bei jüngeren und aktiven Patienten gegeben^{26,42,43}. Traumatische Gelenkverletzungen führen häufig zu Gelenkinstabilität oder intraartikulären Frakturen, was langfristig zu Arthrose führen kann. Eine solche Arthrose, die nach Gelenkverletzungen auftritt, wird Posttraumatische Osteoarthrose (PTOA) genannt^{26,43}. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 12% aller Arthrose-Fälle Folge einer Gelenkverletzung, wie etwa Gelenkfrakturen, Knorpelverletzungen oder ligamentären und meniscaleen Verletzungen, sind⁴⁴. So konnte gezeigt werden, dass Gelenkfrakturen mit einem erhöhten Level systemischer Biomarker und einem Viabilitäts-Verlust der Chondrozyten einhergehen, was wiederum den Weg ebnet für die Entwicklung einer PTOA^{45,46}.

Zusätzlich wird die Schwere eines Gelenktraumas mit der Schwere der Verletzung anderer

Gewebe des Gelenks wie Synovia und Knochen assoziiert⁴³. Nach einem Gelenktrauma kommt es durch Ruptur der gelenkversorgenden Gefäße zunächst zu akuten Symptomen wie Schwellung und einem Hämatom. Wenn die Verletzung den subchondralen Knochen betrifft, kommt es meist zusätzlich zu einer Beteiligung des Knochenmarks. Es kommt zum Tod von Chondrozyten, außerdem werden Enzyme freigesetzt, die eine inflammatorische Reaktion und eine lokale Flüssigkeitsansammlung hervorrufen, wodurch es zur Bildung eines Ödems kommt⁴⁷. Folglich werden biologische Kaskaden initiiert, die die Aktivität der Chondrozyten in Richtung einer katabolen Stoffwechsellage kippen, mit Aktivierung verschiedener Faktoren, die den Degenerationsprozess aktiv unterstützen und so zu progressiver Gelenkdegeneration und der Entwicklung einer Arthrose führen können^{43,48}.

Chondrale und osteochondrale Läsionen:

Chondrale Verletzungen beinhalten die Abrasion, die Lazeration und die Fraktur. Weil Knorpel ein avaskuläres und nicht innerviertes Gewebe ist, ist die intrinsische Selbstheilungskapazität gering. Nach der Knorpelverletzung wird kein Schmerz generiert und es kommt zu keiner Blutung. In Abhängigkeit von der Größe und Lokalisation kann es daher zu weiterer Degeneration und einem großen Knorpelverlust kommen⁴⁹.

Bei subchondralen Verletzungen des Knochens hingegen wird das Gelenk mit Blut aus dem Knochenmark gefüllt, was zu einer Entzündungsreaktion führt. Reparationsmechanismen werden durch den Kontakt des Knorpels mit dem Blut und Knochenmarkbestandteilen in Gang gesetzt, und die Matrix wird repariert. Es resultiert ein fibroartilaginäres Gewebe, das dem originalen Knorpel in seinen mechanischen Eigenschaften allerdings unterlegen ist⁴⁹.

Gelenkfrakturen:

Gelenkfrakturen stellen sehr häufige Verletzungen dar. Abhängig von der Intensität des Anpralls kommt es zur Unterbrechung der Knorpeloberfläche und dem darunterliegenden subchondralen Knochen mit unterschiedlichen Schweregraden. Klinisch konnte beobachtet werden, dass komplexe intraartikuläre Frakturen mit schwereren Traumata und anschließender Degeneration von Gelenkknorpel, sowie einem schlechteren Outcome, assoziiert sind^{26,44}.

Ligamentäre Verletzungen:

Die häufigsten Bandverletzungen betreffen das vorderer Kreuzband und das mediale Kollateralband, meistens ausgelöst durch Sportverletzungen^{50,51}. Besonders bei nicht-detektierten und unbehandelten Bandverletzungen ist das Risiko für eine PTOA hoch^{26,51}.

Verletzungen der Menisken:

Die Menisken sind aus Faserknorpel aufgebaut. Im Gegensatz zum hyalinen Knorpel ist Faserknorpel variabel angeordnet und enthält weniger Proteoglykane und Wasser. Deshalb ist Faserknorpel weniger belastbar und besitzt noch geringere Heilungskapazitäten²⁶. Verletzungen der Menisken sind häufig, insbesondere die des Knies und treten vor allem bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf⁵². Typische Risikofaktoren sind Übergewicht, intensives Training, Fehlstellungen der Beine wie Varus und Valgus, oder reduzierte Muskelkraft⁵³. Verletzungen der Menisken gelten ebenfalls als Risikofaktor für die Entstehung einer Arthrose²⁶.

Alter

Das Alter ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer Arthrose. So konnte in einer Studie aus dem Jahr 1995 gezeigt werden, dass die Entwicklung einer PTOA nach vorderer Kreuzbandruptur umso häufiger auftrat, je höher das Alter war⁵⁴. Die Inzidenz und Prävalenz der Arthrose steigt mit zunehmendem Alter aufgrund der Kombination verschiedener Risikofaktoren und biologischen Veränderungen, die zu einer gestörten Homöostase des Gelenks führen können, welche in einer höheren Anfälligkeit sowie geringeren Heilungskapazität des Knorpels mündet^{35,55}. Die Hauptfaktoren für altersbedingte Veränderungen sind zelluläres Altern, daraus folgend eine reduzierte Zelldichte, sowie veränderte sekretorische Profile^{56,57}.

Beim Altern der Zellen sind zahlreiche Prozesse beteiligt wie Telomerverkürzung⁵⁸, mitochondriale und nukleäre DNA-Schäden⁵⁹, reaktive Sauerstoffspezies⁶⁰ und inflammatorische Prozesse⁶¹. Außerdem sinkt die Heilungskapazität des Knorpels weiter durch die verminderte Fähigkeit der Chondrozyten, auf Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor beta* (TGFβ)⁶² oder *insulin-like growth factor 1* (IGF-1)⁶³ adäquat zu reagieren, was in oxidativem Stress und dem Überwiegen katabolischer über anabole Prozesse mündet⁵⁶.

Neben zellulären Alterationen spielen bei der Entwicklung der Arthrose auch altersbedingte Veränderungen der EZM eine wichtige Rolle. Die EZM von alterndem Knorpel zeigt eine höhere Anzahl von kleinen PG, die reich an Keratinsulfat-Seitenketten sind als große PG mit vielen Chondroitinsulfat-Seitenketten⁶⁴, außerdem sind Mikrofibrillationen auf der Oberfläche des Knorpels, ein verminderter Aggrecan-Gehalt und progressive Kalzifizierungen zu beobachten^{38,65}.

Eine weitere Rolle spielt die Formierung fortgeschrittener Glykations-Endprodukte (FGE). Diese entstehen durch spontane nichtenzymatische Glykierung von Proteinen. FGE treten in die Zellen ein, wo sie nicht abgebaut werden können und DNA-Mutationen verursachen². Zusätzlich werden Glykations-Endprodukt-Rezeptoren aktiviert, die Inflammation⁶⁶ und katabolische Kaskaden⁶⁷ auslösen, und sie erhöhen die Vernetzung von Kollagenmolekülen, weshalb der Knorpel spröder und anfälliger für mechanisch induzierte Schäden wird^{68,69}.

Weitere Faktoren

Übergewicht:

Übergewicht ist ein starker Risikofaktor für die Entwicklung einer Arthrose, besonders des Knies⁷⁰. Zudem fördert Übergewicht die arthrotische Entwicklung nach traumatischen Knieverletzungen⁷¹. Vermutlich sind für den negativen Einfluss zwei wesentliche Faktoren entscheidend: zum einen kommt es zu mechanischer Überlastung der Gelenke, da diese im Tagesverlauf das Vielfache des Körpergewichts tragen müssen, was zu Abnutzung, Verletzungen und Mikrotraumata führt⁷². Zum anderen trägt Übergewicht zur Entstehung und Progression der Arthrose durch die Sekretion von aus dem Fettgewebe stammenden Zytokinen, den sogenannten Adipokinen, wie Leptin, Adiponektin, TNF-α und zahlreichen Interleukinen, bei⁷³. Diese inflammatorischen Faktoren führen zu Knochenresorption und durch Herunterregulation der Synthese von wichtigen Matrix-Komponenten wie PG und Kollagen Typ II einerseits und Heraufregulation von katabolischen Prozessen andererseits zu

Veränderungen der EZM ⁷³. Der förderliche Einfluss einer Gewichtsabnahme auf den Krankheitsverlauf gilt als erwiesen ^{74,75}.

Genetische Faktoren:

Familien-basierte Studien unterstützen einen Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und der Erkrankung. Mithilfe von Zwillingsstudien wird der genetische Einfluss auf eine Größe von 30% bis 65% geschätzt ^{76,77}. Es wurden außerdem bereits diverse Gene auf unterschiedlichen Chromosomen identifiziert, die mit dem Ausbruch und der Progression der Erkrankung in Zusammenhang stehen. Für detaillierte Informationen wird auf die relevanten Reviews verwiesen ²⁶. Das Wissen um diese Gene kann möglicherweise für zukünftige neuartige Therapieansätze von großer Bedeutung sein.

Entzündung:

Auch Inflammation ist zunehmend als ein wichtiger Risikofaktor für Arthrose insbesondere nach Gelenkverletzungen, aber auch bei degenerativen Prozessen, in den Mittelpunkt getreten ²⁶. Pathophysiologisch entscheidend sind dabei diverse Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, die von Knorpel, Knochen und Synovia freigesetzt werden und zu Veränderungen der Zellhomöostase durch Apoptose und katabolische Prozesse führen, welche wiederum in einem sich selbst verstärkenden Kreislauf zu Knorpeldegenerationen und subchondralem Knochenremodeling führen, und so die Gelenkdegeneration vorantreiben und beschleunigen können ^{78,79}. In klinischen Studien werden derzeit „disease modifying drugs“ getestet, die durch Eingreifen in diese inflammatorischen Prozesse den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen sollen ⁸⁰.

Metabolisches Syndrom:

Das metabolische Syndrom beinhaltet einen Symptomkomplex metabolischer Störungen wie arterielle Hypertonie, Insulinresistenz, vermehrter Bauchumfang und Dyslipidämie, die zusammen auftreten und das Risiko für chronische Erkrankungen erhöhen ⁸¹. So wurde auch eine Assoziation zwischen Arthrose und metabolischem Syndrom aufgezeigt. Patienten mit Arthrose haben häufiger ein metabolisches Syndrom als solche ohne, und bei Patienten mit metabolischem Syndrom bricht Arthrose früher aus und zeigt einen schwereren Verlauf verglichen mit Patienten ohne metabolisches Syndrom ^{82,83}. Die einzelnen Symptome können dabei über unterschiedliche Wege zur Entwicklung und Progression der Erkrankung beitragen. Allen gemeinsam ist, dass es letztendlich zu Zellschäden und Inflammation kommt, wodurch die Arthroseentwicklung, wie in vorherigen Kapiteln bereits erläutert, gefördert wird ^{81,84}.

Geschlecht:

Ein weiterer Faktor, der zu einer erhöhten Prädisposition für die Entwicklung einer Arthrose beiträgt, ist das weibliche Geschlecht. Frauen sind demnach häufiger von Arthrose betroffen, und sie zeigen einen schwereren Krankheitsverlauf ⁸⁵. Zudem zeigt sich ein Anstieg der Inzidenzen bei Frauen um den Zeitpunkt der Menopause herum, weshalb unter anderem Hormone, insbesondere Östrogene, mitverantwortlich für den Ausbruch der Erkrankung gemacht werden ⁸⁶. Dafür spricht auch, dass in einigen Studien höhere Raten an Arthrose bei Frauen nachgewiesen wurden, die eine Hysterektomie hinter sich hatten. Welche genauen

pathophysiologischen Mechanismen diesen Beobachtungen zugrundeliegen, ist aktuell allerdings noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion^{79,87,88}.

1.3 Aktuelle und zukünftige Therapieansätze zur Behandlung von Knorpelschäden

1.3.1 Knochenmarkstimulierende Techniken

Drilling, Mikrofrakturierung

Die knochenmarkstimulierenden Techniken zielen auf eine absichtliche Penetration der subchondralen Platte ab. Durch die entstehende Blutung kommt es zur Bildung eines Fibrinpfropfens bis zur Oberfläche des Defekts. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark migrieren in den Pfropfen, proliferieren, und differenzieren sich zu Chondrozyten-ähnlichen Zellen⁸⁹.

Die Mikrofrakturierung ist eine der etabliertesten und am häufigsten angewandten Techniken in der Behandlung von Knorpeldefekten. Sie ist eine Weiterentwicklung des Drilling, das 1959 erstmal von Pridie⁹⁰ beschrieben wurde, wobei er den subchondralen Knochen anbohrte und die losen Knorpelstücke entfernte. Bei der Mikrofrakturierung, die erstmals von Steadman et al.⁹¹ beschrieben wurde, wird der komplette instabile Knochen und die kalzifizierte Zone entfernt, sodass die subchondrale Platte exponiert und komplett von gesundem, stabilen Knorpel umgeben ist. In einem Abstand von 3-4 mm werden mithilfe einer Ahle kontrolliert Löcher in den Knochen getrieben⁹². Wichtig für ein gutes Outcome bei dieser Technik ist die frühe postoperative Rehabilitation mit kontinuierlicher passiver Mobilisierung, die langsam gesteigert wird⁹³. Indikationen für die Mikrofrakturierung sind symptomatische, die gesamte Dicke betreffende Knorpeldefekte. Die Erfolgchancen sind höher bei eher kleinen (< 2-4 cm²) Defekten bei jungen Patienten (< 30 Jahre), die noch nicht lange symptomatisch waren (unter 12 – 24 Monate)⁹².

Limitierend für diese Techniken ist die Tatsache, dass das entstehende Ersatzgewebe eher wie Faserknorpel aufgebaut und damit dem hyalinen Knorpel in seinen mechanischen Eigenschaften unterlegen ist³⁷. Auf kurze Sicht bringt die Mikrofrakturierung einem Großteil der Patienten Linderung der Schmerzen und eine Verbesserung der Funktionalität; es ist allerdings davon auszugehen, dass die Ergebnisse über einen längeren Zeitraum wieder nachlassen⁹².

1.3.2 Osteochondrale Transplantation

Osteochondrale Autografts (Mosaikplastik)

Die Mosaikplastik wurde erstmals 1993 von Matusue et al.⁹⁴ beschrieben. Es handelt sich dabei um die Transplantation von körpereigenem Knorpelgewebe aus einer wenig belasteten Region in den Knorpeldefekt. Der Defekt wird dabei zunächst so vorbereitet, dass er von vertikal stehenden Knorpelkanten begrenzt wird. Dann werden einige Knorpelzylinder verschiedener Größen aus einer mechanisch wenig belasteten Region des Gelenks entnommen und mosaikartig in den Defekt gesetzt. Die Lücken zwischen den Zylindern werden mit

Faserknorpel aufgefüllt, der während des Debridements gewonnen wurde⁸⁹. So kann eine stabile Knorpelfläche geschaffen werden, die mechanische Lasten tragen kann. Diese Technik sollte allerdings nur bei Defektgrößen bis 4 cm² angewendet werden, um die Spenderseite zu schonen. Das Lebensalter spielt dabei eher eine untergeordnete Rolle, wichtiger ist, dass in dem Gelenk keine Arthrose in den übrigen Kompartimenten besteht⁹⁵.

Ein weiterer Nachteil ist das große erforderliche Geschick des Operateurs, die Unmöglichkeit, eine geschlossene Fläche zu bilden, möglicherweise auftretende Höhenunterschiede und insbesondere die schlechte laterale Integration der Zylinder zum umliegenden Knorpel⁸⁹.

Osteochondrale Allografts

Diese Technik kommt vor allem bei großen Knorpeldefekten (> 10 cm²) oder nach einer zuvor gescheiterten anderen Methode zum Einsatz⁹⁶. Es handelt sich um die Transplantation von fremdem Knorpel, der von Multiorgan- oder Postmortem-Spendern stammt. Der Vorteil liegt darin, dass große Teile gesunden, ausgereiften, mechanisch belastbaren Knorpelgewebes übertragen werden können, ohne dass eigener Knorpel an anderer Stelle verloren geht. So können sehr große und komplexe Gelenkrestorationen ermöglicht werden⁹⁷. Das transplantierte hyaline Gewebe sollte intakt sein, damit keine Immunreaktion im Empfänger ausgelöst wird⁹⁸.

Von Nachteil sind die hohen Kosten und der erforderliche Aufwand zur Transplantatgewinnung und -lagerung. Es werden nämlich etwa zwei bis drei Wochen benötigt, um Bakterien- und Vireninfektionen im Spendergewebe auszuschließen. Von großer Wichtigkeit für ein gutes Outcome der Prozedur ist daher unter anderem, die Viabilität der Chondrozyten während dieser Zeitspanne aufrechtzuerhalten^{96,97}.

1.3.3 Regenerative Medizin und Zellbasierte Ansätze (Tissue Engineering)

Tissue Engineering oder Gewebezüchtung bezeichnet die künstliche Herstellung biologischer Gewebe durch die gerichtete Kultivierung von Zellen. Das Tissue Engineering von Knorpelgewebe nahm mit der autologen Chondrozytenimplantation (ACI) seinen Anfang und wurde durch die matrix-assistierte autologe Chondrozytenimplantation (MACI) weiterentwickelt. Mittlerweile steht eine Vielzahl an Techniken zur Verfügung, von denen manche bereits klinisch gebräuchlich sind, andere noch mitten in der Entwicklung stecken. Ein Goldstandard konnte dabei noch nicht etabliert werden⁹⁹.

Autologe Chondrozytenimplantation (ACI)

1984-1987 entwickelten Peterson et al.¹⁰⁰ den ersten Ansatz zur Regeneration von Knorpelgewebe, die autologe Chondrozytenimplantation (ACI), am Kaninchen und 1994 am Menschen³⁰. Dabei werden kleine Stücke vom körpereigenen Knorpel des Patienten entnommen, die Chondrozyten enzymatisch isoliert und anschließend in vitro gezüchtet und um ein Vielfaches vermehrt. Nach zwei bis drei Wochen wird das Gelenk eröffnet und der Defekt mit einem wasserdichten Patch versehen. Ursprünglich wurde dazu ein periostealer Patch aus der Oberfläche der oberen Tibia verwendet. Um die Morbidität zu verringern wurde dieser später durch eine biologisch abbaubare Kollagenmembran abgelöst. Unter diesen Patch wird anschließend die Zellsuspension injiziert, welche sich dann zu einem Ersatzgewebe formiert^{89,101}.

Verglichen mit der Mikrofrakturierung oder Mosaikplastik können durch diese Technik größere Defekte repariert werden ^{102,103}. Bei kleinen bis mittleren Defekten zeigen ACI und Mikrofrakturierung dagegen ähnliche klinische Ergebnisse ¹⁰⁴. Limitierend für diesen Ansatz sind die hohen Kosten ¹⁰⁵ und die Invasivität der Knorpelgewinnung, vor allem jedoch die häufige Bildung von Faserknorpel, die unter anderem durch die stattfindende Dedifferenzierung der Chondrozyten während der Proliferation *ex vivo* bedingt ist ¹⁰⁶. Dedifferenzierung bezeichnet dabei nicht die Rückkehr der Chondrozyten in eine primitivere oder multipotente Form, sondern bezieht sich auf einen Fibroblasten-ähnlicheren Phänotyp der Chondrozyten mit einer verminderten Synthese von Proteoglykanen und Kollagen Typ II ^{101,107}. Diese Dedifferenzierung wurde bei Anzucht der Chondrozyten im Monolayer beschrieben ¹⁰⁷.

Matrix-induzierte autologe Chondrozytenimplantation (MACI)

Um dem Problem der Dedifferenzierung zu begegnen wurde die MACI als Weiterentwicklung der ACI eingeführt. Benya und Shaffer ¹⁰⁷ konnten zeigen, dass der Prozess der Dedifferenzierung reversibel ist, wenn die Zellen in einem dreidimensionalen Kultursystem gezüchtet werden. Außerdem umgeben sich Chondrozyten natürlicherweise mit der EZM, die hauptsächlich aus Wasser sowie festen Bestandteilen, vor allem Kollagen II und Proteoglykanen besteht, welche zusammen ein hochorganisiertes und festes Gerüst bilden. Bei der MACI werden die isolierten und *ex vivo* gezüchteten Chondrozyten nicht direkt in den Defekt gesetzt sondern erst in ein Trägergerüst, ein sogenanntes Scaffold, gesät und gezüchtet. Das Scaffold imitiert dabei die natürliche Umgebung der Chondrozyten, weshalb die Matrixsynthese und -organisation besser geleitet werden kann ^{99,108}. Durch das Zusammenspiel beider Faktoren soll das entstehende Ersatzgewebe der MACI mehr hyalinem Knorpel ähneln als bei alleiniger Chondrozytenimplantation ¹⁰⁹.

Es stehen unterschiedliche Scaffolds zur Verfügung, die sich anhand ihrer Bestandteile und Architektur in zwei Hauptkategorien unterteilen lassen, Hydrogele und Membranen.

Hydrogele:

Hydrogele bestehen aus quervernetzten hydrophilen Polymeren, die so ein Netzwerk bilden, das die natürlichen Eigenschaften des Knorpels imitieren soll. Ein großer Vorteil besteht darin, dass sie nichtinvasiv verabreicht und nach Injektion *in situ* quervernetzt (sog. „Crosslinking“) werden können. Crosslinking-Methoden beinhalten Belichtung, Temperaturmodulation und pH-Änderung. Die Trägermoleküle können natürlichen Ursprungs oder synthetisch hergestellt sein und sind teilweise bereits kommerziell erhältlich ¹¹⁰. Natürliche Träger sind beispielsweise Hyaluronsäure (Hyalograft® C), Kollagen I (NeoCart®), Agarose/Alginate (Cartipatch®) oder Fibrin ¹⁰⁸. Die zwei häufigsten synthetisch hergestellten Trägermoleküle sind Polyethylenglycol-Diacrylat und Polyvinyl-Alkohol ¹¹⁰.

Membranen:

Die ACI wurde, wie bereits erläutert, ursprünglich mit einem periostealen Patch versehen. Wegen postoperativer Komplikationen, insbesondere einer pathologischen Hypertrophie der Platte ¹¹¹, wurde diese durch eine zweischichtige Kollagen-I/III-Membran ersetzt ¹⁰⁶. Diese Technik entwickelte sich weiter in eine Form der MACI, bei der Chondrozyten vor Implantation auf der Membran kultiviert werden. Fortgeschrittene natürliche Membranen beinhalten eine

festen äußeren Schicht, einer Barrierschicht in der Mitte und einem inneren, porösen Teil zur Chondrozytendifferenzierung. Derartige Membranen gibt es als natürliche Kollagenmembranen (MACI®, Maix®, Chondro-Gide®). Auch synthetische Materialien finden als Membranen Verwendung, beispielsweise synthetische aliphatische Polyester, die ursprünglich als biologisch abbaubare Nahtfäden in Gebrauch gehalten hatten ¹¹⁰.

Die meisten klinischen Studien kommen zu dem Ergebnis, dass sich die MACI, abhängig von den verwendeten Materialien, als der ACI gleichwertig, wenn nicht überlegen erwiesen hat ^{105,112–115}. Die Möglichkeiten sind hier jedoch noch lange nicht ausgeschöpft und es werden laufend neue Produkte entwickelt. Durch die Kombination verschiedener Materialien kann die Knorpelbildung und die biomechanische Stabilität verbessert werden. Zum Beispiel verwendet das Cartilage Autograft Implantation System (CAIS®) eine Kopolymer-Membran, die mit einem Polydioxan-Netz verstärkt wird. Zerkleinerter Knorpel wird auf dem Scaffold verteilt, mit Fibrin bedeckt und durch biologisch abbaubare Nähte fixiert ¹¹⁰.

3D-Bioprinting:

Vielversprechend ist auch der relativ neuartige Einsatz von 3D-Druckern. Durch das Auftragen von Schicht um Schicht kann das Konstrukt an den jeweiligen individuellen Defekt angepasst werden ¹¹⁶. Dabei werden unterschiedlichste Druckverfahren angewendet. Hydrogel-basierte Tinte ermöglicht die homogene Inkorporation lebender Zellen und biologischer Faktoren in das Konstrukt, unter Beibehaltung der mechanischen Eigenschaften ¹¹⁷.

Es kommen natürliche Träger wie Kollagen und Hyaluronsäure sowie synthetische Polymere oder auch hybride Bio-Tinten zum Einsatz mit jeweils spezifischen Vor- und Nachteilen bezüglich mechanischer Stabilität, biologischer Degradation und Biokompatibilität ^{118,119}.

Durch das schichtweise Auftragen bieten sich diese Verfahren zudem an, zonale Aspekte des hyalinen Knorpelgewebes im hergestellten Regeneratknorpel zu imitieren, durch graduelle Veränderungen physikalischer Parameter etwa wie der Porengröße oder der Steifigkeit des Substrates, oder Graduierung biologischer Parameter wie der Präsenz an Wachstumsfaktoren, der Dichte/Anzahl an Zellen in den einzelnen Schichten sowie die Isolation von Chondrozyten aus verschiedenen Zonen des Knorpels und schichtweises Auftragen dieser in das Scaffold, wobei Zelldifferenzierung und phänotypische Instabilität der isolierten Chondrozyten noch einen von zahlreichen limitierenden Faktoren in der Entwicklung von dem nativen Knorpel ähnlichen Gewebe darstellen ^{120–122}.

Knorpelregeneration mit Stammzellen

Die Balance aus Proliferation und Differenzierung der Zellen ist ein entscheidender Faktor für das gelungene Generieren von widerstandsfähigem Knorpelgewebe. Wie bereits erläutert führt die Vermehrung von Chondrozyten *in vitro* zur Dedifferenzierung hin zu Fibroblasten-ähnlicheren Zellen, weshalb häufig ein faserknorpelartiges Gewebe entsteht. Ausdifferenzierte Chondrozyten aus hyalinem Knorpel proliferieren dagegen nicht und können daher nicht so einfach *in vitro* vermehrt werden. Die Beibehaltung der entsprechenden chondrogenen Eigenschaften und die gleichzeitige Proliferation der Zellen schließen sich also gegenseitig aus ¹⁰⁸.

Ein weiterer Ansatz, um unter anderem diesem Problem zu begegnen, ist die Verwendung

alternativer Zelltypen, die chondrogenes Potenzial besitzen, ihre immanenten proliferativen Eigenschaften jedoch beibehalten. Dafür kommen verschiedene Stammzellen in Betracht, wie adulte Stammzellen aus dem Knochenmark oder Fettgewebe, embryonale Stammzellen oder induzierte pluripotente Stammzellen. Ein weiterer Vorteil besteht in der Vermeidung der invasiven Knorpelentnahme aus dem Gelenk¹⁰⁸. Die Stammzellen sollen dabei in proliferierende Chondrozyten überführt werden, die schließlich hyalines Knorpelgewebe bilden sollen, das dann in den Defekt gesetzt werden kann. Je nach Stammzelltyp geschieht dies durch unterschiedliche, meist sehr komplexe Modulierung von Signalwegen, Wachstumsfaktoren, Kulturbedingungen etc. Für genauere Informationen wird auf die entsprechende Literatur verwiesen^{99,108}. Es handelt sich um vielversprechende, aber noch nicht gänzlich ausgereifte Ansätze mit spezifischen Vor- und Nachteilen.

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark oder Fettgewebe sind leicht verfügbar und haben großes Potenzial für Differenzierung und Proliferation. Sie sind im Wesentlichen für die Bildung des Ersatzgewebes durch Mikrofrakturierung verantwortlich, wobei jedoch häufig mechanisch minderwertiger Faserknorpel resultiert^{108,123}. Bevor mesenchymale Stammzellen erfolgreich zur Knorpelbildung genutzt werden können, sind daher weitere Verbesserungen von Kultur- und Differenzierungsprotokollen nötig¹⁰⁸.

Embryonale Stammzellen besitzen unlimitiertes Potenzial zur Differenzierung und Proliferation in praktisch jede Art von somatischen Zellen¹²⁴. Die Chondrogenese wird durch Co-Kultur mit adulten Chondrozyten befördert¹²⁵. Nachteile bestehen in ethischen Bedenken bezüglich ihrer Gewinnung, aber auch in möglichen immunologischen Abstoßungsreaktionen durch den Empfänger oder die Bildung von Teratomen¹²⁶.

Induzierte pluripotente Stammzellen stellen eine relativ neuartige Gewinnung pluripotenter Stammzellen dar, indem somatische Zellen in ein embryonales Stadium reprogrammiert werden, welche anschließend *in vitro* in Chondrozyten überführt werden sollen¹¹⁰. Reizvoll ist das praktisch ubiquitäre Vorkommen der somatischen Ursprungszellen sowie der Wegfall ethischer Bedenken in Hinblick auf ihre Gewinnung. Allerdings sind die technischen Details zur direkten Chondrozytendifferenzierung noch nicht ausgereift¹¹⁰.

1.4 Knorpelintegration

1.4.1 Probleme in der Knorpel-Knorpel-Integration

Ein essenzielles Problem in der Behandlung von Knorpelschäden, welches bis heute nicht gelöst werden konnte, besteht in der unzureichenden lateralen Integration von Knorpeltransplantat zum umliegenden Knorpelgewebe. Um eine langfristig stabile Defektheilung erzielen zu können, muss diese jedoch gewährleistet sein, da bei einer diskontinuierlichen Oberfläche durch Mikrobewegungen eine fortschreitende Knorpeldegeneration ausgelöst werden kann, es droht in dem Fall die erneute Ausbildung eines Knorpeltraumas und die Aggravation der Arthrose.

So konnten Shapiro et al.¹²⁷ an Kaninchen zeigen, dass es nach Drilling zunächst innerhalb von 12 Wochen zu einem vollständigen Auffüllen des Defektes mit von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark gebildetem Ersatzgewebe kam. Nach 12 bis 20 Wochen zeigten sich jedoch erste Anzeichen von Degeneration, die nach 24, 36 und 48 Wochen verstärkt auftraten. Die neu gebildete Matrix des Ersatzgewebes konnte nicht in den umliegenden Knorpel integriert werden mit teilweise stattfindender Spaltbildung. Auch diverse andere Autoren machten die Beobachtung, dass die laterale Knorpel-Knorpel-Integration bei Transplantation von Regeneratknorpel oder durch die Bildung von Ersatzgewebe nur unzureichend bis gar nicht stattfindet¹²⁸⁻¹³³.

Eine stabile Integration in das umliegende Gewebe ist somit zur langfristigen Heilung unerlässlich. Die Knorpel-Knorpel-Integration wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Einige Maßnahmen zielen darauf ab, diese in Richtung einer stärkeren lateralen Integration zu verschieben.

Chondrozyten-Phänotyp:

Die Dedifferenzierung von Chondrozyten bei zweidimensionaler Anzucht wurde bereits erläutert. Yan und Yu¹³⁴ konnten zeigen, dass in einem Kaninchen-Modell die laterale Integration mit der Defektfüllung durch Fibroblasten schlechter stattfindet als durch Chondrozyten und am besten durch mesenchymale Stammzellen.

Altersabhängige Effekte:

Altersabhängige Veränderungen von Chondrozyten wie reduziertes proliferatives Potenzial, die Bildung fortgeschrittener Glykationsendprodukte und veränderte sekretorische Profile sowie deren Beteiligung in der Pathogenese der Arthrose wurden bereits beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass die In-vitro-Expansion von Chondrozyten einer Alterung dieser um etwa 30 Jahre entspricht¹³⁵. Das beschleunigte zelluläre Altern könnte sich durch verminderte Syntheseleistung und das Annehmen einer katabolen, inflammatorischen Stoffwechsellage auch negativ auf die Integration auswirken^{136,137}. Dies wird unterstützt durch Beobachtungen, dass das Einbringen jüngerer Gewebezellen, beispielsweise aus embryonalen Epiphysen, in adultes Gewebe die Integration befördern kann¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Zelltod:

Zelltod von Chondrozyten kann durch die Präparation der Defektstelle vor Implantation des Transplantates, oder auch im Transplantat selber entstehen. Hunziker und Quinn¹⁴¹ beschrieben einen signifikanten und nachhaltigen Verlust von Chondrozyten an der Schnittstelle eines flachen Knorpeldefektes („*partial-thickness-defect*“), in einem porcinen Modell. Redman et al.¹⁴² konnten in einem In-vitro-Modell zeigen, dass Knorpelverletzung insbesondere durch stumpfes Trauma ein Nekroseband erzeugt, das sich innerhalb von 14 Tagen nach dem Trauma durch Zellapoptose noch weiter ausdehnt. Diese Zone hindert vermutlich die Integration zwischen neuem Knorpel und vorhandenem Gewebe, da eine reduzierte Zelldichte zur Produktion einer suboptimalen Matrix und damit zur Bildung von biomechanisch geschwächtem Gewebe führt¹⁴³. Eine Repopulation von devitalisiertem Knorpel kann die Knorpel-Knorpel-Integration wiederum stärken¹⁴⁴. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe des Apoptoseinhibitors ZVAD-fmk in das Kulturmedium die Knorpelintegration gestärkt werden kann¹⁴⁵. Mehrere Ansätze werden verfolgt, um das Problem der gehinderten Integration durch Zelltod zu begegnen, unter anderem enzymatische Andauung der Matrix an der Grenze des Defekts zum Transplantat, sowie der Einsatz chemotaktischer Agenzien, die viable Zellen in den Defektspalt locken sollen¹⁴⁶.

Kollagenetzwerk und Proteoglykane:

Kollagene und Proteoglykane spielen eine wichtige Rolle in der Knorpelintegration. Kollagene bilden das Gerüst der EZM und stützen die funktionellen Eigenschaften des Gewebes, weshalb die Integration von Kollagenfibrillen einen wichtigen Faktor für gelungene Knorpel-Knorpel-Reparatur darstellt¹⁴⁵. Proteoglykane sind ebenfalls wichtig für die Funktionalität von Knorpel, aber sie stellen eine intrinsische Barriere für Chondrozytenmigration dar^{145,146}. Das Proteoglykan PRG4 etwa, das auch Lubricin genannt wird und Bestandteil der Synovialflüssigkeit ist, behindert die integrative Knorpelreparatur. Der gewünschte Effekt ist die Verhinderung der Verwachsung gegenüberliegender Gelenkflächen, allerdings wird dadurch auch die Knorpelintegration behindert¹⁴⁷.

Ein Ansatz, die Integration von Knorpel zu verbessern, besteht in enzymatischem Andau der Grenzfläche des Defektes vor Transplantatimplantation durch Kollagenase, Hyaluronidase, Chondroitinase ABC oder Trypsin. Die Zerstörung des Kollagenetzwerkes und der Proteoglykane führt zur Zellproliferation¹⁴⁸ und erhöhten Chondrozytenmobilität mit Repopulation der hypozellulären Schnittstelle, welche wiederum eine verstärkte Deposition von Kollagen in den Defektspalt zur Folge hat. Dadurch kann die Integration verbessert werden^{128,149,150}.

Chemotaktische Agenzien:

Durch chemotaktische Agenzien wie den *platelet derived growth factor* (PDGF), den *insulin-like growth factor* (IGF-1), den *basic fibroblast growth factor* (bFGF), den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und eine Reihe von *bone morphogenic proteins* (BMPs) sollen viable Zellen zu den Wundrändern rekrutiert werden^{151,152}. McGregor et al¹⁵¹ konnten zeigen, dass PDGF, IGF-1 und bFGF die Migration boviner Chondrozyten stimulieren und die Todeszone durch Repopulation verschmälern können. Noch stärker ausgeprägt war dieser Effekt in Kombination mit enzymatischem Andau durch eine Kollagenase-Spülung (0,6%, 10 min).

1.4.2 Gewebekleber

Die optimale Integrationsmethode sollte die Gewebeteile stark verbinden, klinisch schnell und einfach angewendet werden können, biokompatibel sein und außerdem die Gewebereparatur unterstützen. Aktuelle Methoden zur Fixierung des Transplantates im Knorpeldefekt umfassen Nähte, die Implantierung als „Press-fit“ sowie die Implantierung durch Gewebekleber¹⁵³.

Nähte ermöglichen eine starke Fixierung und werden bei der ACI eingesetzt oder auch zur Implantation von Transplantaten bei Bioseed-C® und Novocart® 3D¹⁵³. Allerdings bedingt eine gute Fixierung nicht zwangsläufig eine langfristige Integration und die Nähte können am gegenüberliegenden Knorpel reiben, was zu Rissen und fortschreitendem Zellverlust führen kann, ähnlich dem Anfangsstadium der Arthrose¹⁵⁴. Durch Einsetzen eines Transplantats in einen minimal kleineren Defekt als „Press-fit“ wird ebenfalls eine Stabilisierung ermöglicht. Diese Technik wird beispielsweise bei Cartipatch® oder Hyalograft® angewendet. Für größere Defekte wird hierbei die Verwendung osteochondraler Konstrukte, die als Press-fits eingesetzt werden, erforscht, wobei der osteale Anteil als Anker für den chondralen Teil dienen soll¹⁵³. Allerdings stellt sich hier ebenfalls das Problem, dass dadurch nicht zwangsläufig eine laterale Knorpelintegration erreicht, oder sogar verhindert werden kann^{129,130}.

Eine weitere Möglichkeit, ein Transplantat zu fixieren stellt der Einsatz eines Gewebeklebers dar. In der Chirurgie werden Wunden klassischerweise durch Nähte oder Klammern verschlossen. Um damit verbundene Nachteile wie Wundinfektionen, Granulatbildung und die Notwendigkeit der späteren Entfernung zu umgehen, wurden Gewebekleber als alternative Methoden der Wundverschließung entwickelt¹⁵⁵. Der Einsatz eines Klebers als Bioadhäsivum zur Implantation eines Knorpeltransplantats stellt dabei besonders hohe Ansprüche, da er nicht nur gute adhäsive Eigenschaften besitzen muss, sondern auch besonders geringe zytotoxische Eigenschaften haben darf und die laterale Integration befördern sollte. Grundsätzlich sollte zwischen den Begriffen „immediate-bonding“ und „Integration“ unterschieden werden. „Immediate-bonding“ bezeichnet die unmittelbar entstehende Bindung zwischen zwei Knorpelstücken bzw. zwischen Transplantat und Knorpel durch das Adhäsivum. „Integration“ dagegen bezeichnet das eher längerfristig stattfindende Zusammenwachsen der Gewebeflächen.

In der Chirurgie stehen bereits eine Vielzahl unterschiedlicher sowohl synthetischer als auch natürlicher Kleber zur Verfügung, die jeweils Vor- und Nachteile haben. Der synthetische Kleber Cyanoacrylat beispielsweise, der erstmals 1949 von Ardis eingeführt wurde, besitzt neben exzellenten adhäsiven Fähigkeiten leider auch zytotoxische Eigenschaften durch die beim Abbau stattfindende Bildung von Formaldehyd und ist daher als Gewebekleber im Bereich Tissue Engineering ungeeignet¹⁵⁶. Diverse andere Gewebekleber werden erforscht^{157,158}. Ziel ist es dabei sowohl ein möglichst starkes „immediate bonding“, also eine sofortig eintretende Klebewirkung, als auch die Verbesserung der langfristigen Integration des Implantates in den Defekt zu ermöglichen. Nur Fibrin konnte sich dabei trotz Nachteilen im „immediate-bonding“ bisher als gängige Alternative zu den anderen Techniken etablieren¹⁵³. Es muss konstatiert werden, dass die optimale Integrationsmethode noch nicht ermittelt werden konnte.

Fibrin: Die Verwendung von Fibrin als Adhäsivum tauchte, wie die Cyanoacrylate, bereits während der 1950er Jahre auf¹⁵⁵. Fibrin stellt das Endprodukt der Gerinnungskaskade dar, die in Gegenwart von Calciumionen, Fibrinogen und Faktor VIII stattfindet¹⁵⁹. Fibrinogen wird dabei zu Fibrin konvertiert, die Fibrinmoleküle polymerisieren und bilden ein Gerinnsel, das von Faktor VIII stabilisiert wird¹⁶⁰.

Das Material hat eine starke Affinität zu Kollagen, weshalb es leicht an Gewebe, unter anderem auch an Knorpel bindet. Fibrinkleber findet Verwendung in vielen chirurgischen Eingriffen wie etwa in der Allgemein Chirurgie, Herz-Thorax-Chirurgie oder Neurochirurgie, und seit einigen Jahren wird er auch zur Implantation von einigen Regeneratknorpelkonstrukten verwendet, beispielsweise MACI und Revaflex™^{155,153}. Vorteilhaft ist dabei besonders, dass Fibrin die ungehinderte Proliferation und Migration der Chondrozyten¹⁶¹ ermöglicht und so zur lateralen Knorpelintegration beiträgt, bei gleichzeitig bestehenden unmittelbaren adhäsiven Eigenschaften, die allerdings nur im niedrigen Bereich liegen¹⁶². Ein weiterer Nachteil besteht dabei in der relativ langen Bindungszeit, die bei mehreren Minuten bis Stunden bis zum Erreichen der maximalen Bindung liegt¹⁶³.

Natives Fibrinogen, das Vorläufermolekül von Fibrin, kann dabei auch durch anderweitige Crosslinking zu einem Gewebekleber oder Hydrogel vernetzt werden, beispielsweise durch Lichtaktivierung mittels eines Photoinitiators^{164,165}.

Gelatine: Ein weiteres natürliches Substrat, das bereits Verwendung sowohl als Gewebekleber als auch als Hydrogel gefunden hat, ist Gelatine. Gelatine ist denaturiertes bzw. hydrolysiertes Kollagen und wird aus tierischem Bindegewebe gewonnen, wodurch sie verglichen mit anderen Materialien relativ preiswert ist¹⁶⁶. Gelatine ist wasserlöslich, nicht-toxisch und flüssig bei Temperaturen über 30°C, weshalb sie eine hohe Biokompatibilität besitzt und auch für Zelldruck-Techniken geeignet ist¹⁶⁷. Allerdings ist die geringe Härte von purer Gelatine von Nachteil für viele Anwendungen. Deshalb kann Gelatine funktionalisiert und mithilfe eines Crosslinkers chemisch modifiziert werden, um die Adhäsionskraft zu erhöhen und/oder die Abbaubarkeit zu verändern¹⁵⁵.

Die häufigste Anwendung als Adhäsivum ist eine Mischung aus Gelatine und Resorcin, die mit Formaldehyd quervernetzt werden, auch GFR-Kleber genannt. Das Adhäsivum wird bereits seit 1979 verwendet, und findet vor allem bei kardiovaskulären Eingriffen und Aortendissektionen Verwendung¹⁶⁸. Doch trotz hohen Adhäsionskräften ist die Anwendbarkeit auch hier durch die Toxizität des Formaldehyds limitiert, ebenso bei der Verwendung von Glutaraldehyd als ebenfalls häufig verwendetem Crosslinker^{169,170}.

Da Gelatine enzymatisch abbaubar ist und wichtige Aminosäuresequenzen zur Zelladhäsion und Proliferation besitzt, ist sie außerdem ein häufig verwendetes Material für Hydrogele¹⁷¹. Um die Verflüssigung bei Körpertemperatur zu umgehen wird sie dabei häufig mit chemischen Gruppen funktionalisiert. Der häufigste Ansatz ist die Funktionalisierung mit Methacryloyl-Einheiten (GelMA)¹⁷². Mithilfe verschiedener Photoinitiatoren kommt es dabei durch radikalische Polymerisation zur Vernetzung der Gelatin-Moleküle. Allerdings führt die Funktionalisierung der Gelatine häufig durch die Derivatisierung zu Einbußen in der Elastizität und zum Schrumpfen der Polymere^{173,174}. Deshalb wird der Fokus dieser Arbeit, ähnlich der Arbeit von Elvin et al.¹⁷³, auf der Verwendung unfunktionalisierter Gelatine liegen.

Ruthenium & SPS zur Quervernetzung: Bei der Photoquervernetzung werden in Anwesenheit eines aktivierten Photoinitiators Photonen absorbiert und die Bildung von Radikalen angeregt, welche wiederum durch radikalische Polymerisation die Molekülketten kovalent vernetzen¹⁷¹. Zur Aktivierung der Reaktion durch den Photoinitiator wird eine Lichtquelle benötigt, wofür meistens UV-Licht verwendet wird¹⁷¹. UV-Licht bietet allerdings Nachteile bezüglich der Zellviabilität und Penetrationstiefe. So kann UV-Licht bekanntermaßen zu chromosomalen und genetischen Instabilitäten in Zellen führen und Apoptose induzieren, die zum Zelltod führt¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Aus diesen Gründen werden andere Crosslinker-Systeme untersucht, die Licht aus dem sichtbaren Spektrum absorbieren, zum Beispiel Lithium-Phenyl-2,4,6-Trimethylbenzoylphosphinat (LAP)¹⁷⁶, Eosin¹⁷⁸ oder Riboflavin¹⁷⁹. Allerdings bieten diese Photoinitiatoren Nachteile bezüglich Handling, Reaktivität oder Toxizität^{176,179}.

Ein anderes Crosslinker-System besteht aus dem wasserlöslichen Photoinitiator Tris(2,2-Bipyridyl)Dichlororuthenium(II)Hexahydrat (Ru) und Natriumpersulfat (SPS) und wird durch Licht aus dem sichtbaren Spektrum aktiviert. Lim et al. konnten zeigen, dass mit diesem System, verglichen mit UV-Licht-aktivierten Systemen wie Irgacure 2959, höhere Zellviabilität und metabolische Aktivität auch bei hohen Ru/SPS-Konzentrationen erreicht werden können¹⁷¹.

Die Methode und der Mechanismus dahinter wurde erstmals von Fancy et Kodadek¹⁸⁰ beschrieben und beinhaltet zwei Schritte: Ein $[\text{RuII}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -Komplex absorbiert Photonen im sichtbaren Spektrum. Durch die Photolyse wird er in einen erregten Zustand versetzt, in dem er ein Elektron an das Persulfat abgeben kann, wodurch es zur Spaltung der O-O-Bindung kommt. Die Produkte sind das oxidierte Ru(III), das Sulfatradikal und ein Sulfatanion. In einem zweiten Schritt führt Ru(III) die Bildung eines Tyrosin-Radikals herbei; durch oxidative Bindung zweier Tyrosine zu einem Di-Tyrosin wird die Polymerisation initiiert¹⁸⁰. Die Tyrosine entstammen dabei den Proteinen, die verbunden werden sollen, beispielsweise Gelatine, Kollagen, oder auch Fibrinogen¹⁸¹. Dadurch kann die Polymerisation eines proteinhaltigen Gels oder Klebers an sich sowie die Adhäsion zum umliegenden Gewebe ermöglicht werden. Bei der Photoquervernetzung mit Ru/SPS handelt es sich um ein vielversprechendes System, das bereits Verwendung als Gewebekleber in Tierversuchen sowie zur Quervernetzung von Hydrogelen gefunden hat^{174,181,182}, bisher aber noch nicht für die Integration von Knorpel untersucht worden ist.

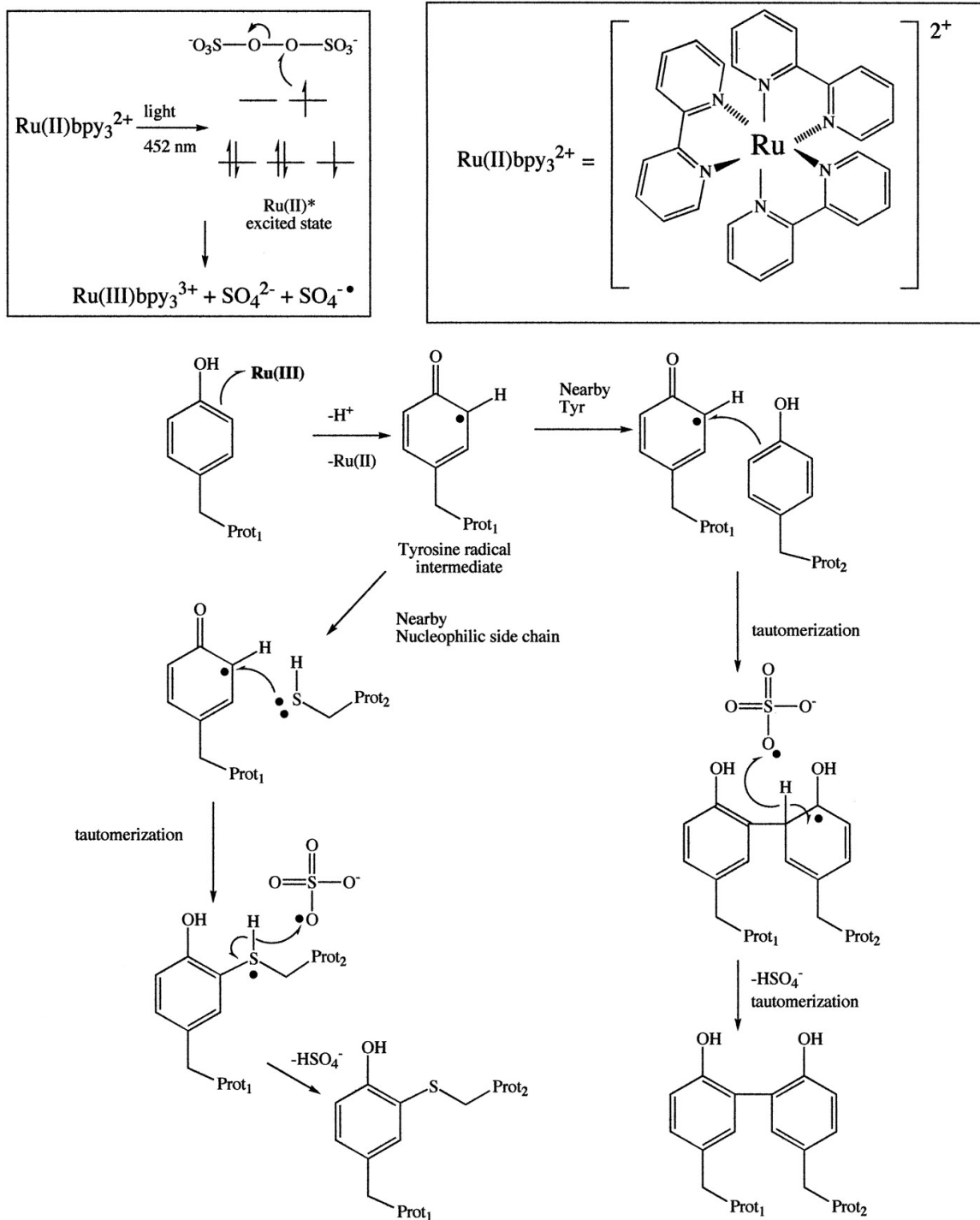


Abbildung 2: Systematische Illustration des lichtaktivierten Crosslink-Mechanismus durch Ruthenium und SPS. A: erster Schritt: Ru absorbiert Photonen aus dem sichtbaren Spektrum und gerät in einen erregten Zustand. B: Struktur des Metall-Komplexes Tris(2,2-Bipyridyl)Dichlororuthenium(II)Hexahydrat (Ru). C: Systematische Illustration der Kettenreaktion, unter oxidativer Bindung zweier Tyrosine. Bild entstammt Fancy et Kodak¹⁸⁰ mit freundlicher Genehmigung der National Academy of Sciences, Copyright © 2000.

1.4.3 In vitro Push-Out-Modell

Die biochemischen und biomechanischen Faktoren, die den Reparaturprozess von Gelenkknorpel *in vivo* beeinflussen, sind zu variabel und komplex, um sie systematisch bewerten und kontrollieren zu können. Die Notwendigkeit, diese Prozesse systematisch zu erforschen, hat die Etablierung verschiedener *In-vitro*-Modelle gefördert. Durch biomechanische Versuchsmodelle soll die Integration zwischen zwei Knorpelflächen oder zwischen nativem und Regeneratknorpel unter kontrollierten Bedingungen erfasst werden. Ein biomechanisches Modell kann dabei niemals alle Aspekte der physiologischen mechanischen Belastung wiedergeben. Umgekehrt lassen sich dadurch einzelne Aspekte besser beleuchten und verstehen.

Der Zugversuch ist eine Methode der mechanischen Bestimmung der Integration¹⁸³. Dabei wird die Kraft gemessen, die benötigt wird, um die Bindung zwischen zwei geklebten – oder auch genähten – Flächen zu lösen, indem sie senkrecht auseinander gezogen werden. Beim Scherbruchversuch werden die zwei Flächen ebenfalls auseinandergezogen, wurden jedoch überlappend aneinander geklebt¹⁸⁴. Da in der physiologischen Gelenkbewegung nicht ausschließlich Druckkräfte auftreten, sondern auch Zug- und Scherkräfte, beispielsweise in der Roll-Gleit-Bewegung des Kniegelenks, eignen sich diese Versuchsanordnungen, um solche Kräfte zu objektivieren.

Ein weiteres, gut etabliertes biomechanisches *In-vitro*-Modell ist das Push-Out-Modell. Dabei wird ein kreisförmiger Knorpelkern oder ein kreisförmiges Transplantat in ein ringförmiges Stück nativen Knorpel gesetzt bzw. geklebt und die Kraft gemessen, die benötigt wird, um den Kern senkrecht aus dem Ring zu drücken. Das Push-Out-Modell eignet sich besonders gut zur Quantifizierung der im Gelenk auf die Grenzfläche wirkenden kompressiven Kräfte und kommt den physiologischen Verhältnissen am nächsten, da die Defektstelle des Knorpels im Körper imitiert wird und prinzipiell auch zonale Aspekte der Knorpelschichtung zum Tragen kommen. Der Push-Out-Versuch wurde für Gelenkknorpel erstmals von Obradovic et al. beschrieben¹⁸⁵. Es wurde damit der Einfluss des Alters boviner Chondrozyten sowie der Einfluss einer Vorbehandlung der Integrationszone mit Trypsin auf die Knorpelintegration nach mehrwöchiger Kultivierung untersucht. Dieser Versuchsaufbau wurde mehrfach aufgegriffen und zur Untersuchung unterschiedlicher Parameter herangezogen, die auf die Knorpelintegration einwirken, beispielsweise Wachstumsfaktoren^{186–188} oder die Integrationsfähigkeit unterschiedlicher Konstrukte, beispielsweise Hydrogele^{189–191}. Auch die Beurteilung der Adhäsionskraft durch Gewebekleber erfolgte bereits mit diesem Versuchsaufbau^{192,193}.

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Knorpel überzieht die Oberfläche aller menschlichen Gelenke und ermöglicht eine reibungsarme Bewegung unter Aufnahme und Verteilung großer Lasten. Traumata und/oder chronische Belastung über das physiologische Maß hinaus sowie weitere Risikofaktoren wie Alter und genetische Prädisposition führen jedoch zu fortschreitender Knorpeldegeneration und enden in Arthrose, einer chronisch degenerativen Gelenkerkrankung, die mit einer deutlichen Morbidität und körperlichen Einschränkungen assoziiert ist. Weil Knorpel avaskulär ist und dessen Zellen, die Chondrozyten, sich in einem postmitotischen Zustand befinden, besitzt Knorpel nur sehr geringes Selbstheilungspotenzial. Momentan gibt es keine effektive Therapie der Arthrose. Chirurgische Techniken wie Mikrofrakturierung und die autologe Chondrozytenimplantation werden häufig eingesetzt und ermöglichen eine symptomatische Linderung der Beschwerden, das resultierende Ersatzgewebe ist dem nativen Knorpel jedoch strukturell und mechanisch unterlegen, weshalb langfristig mit einem Fortschreiten der Erkrankung zu rechnen ist. Ansätze der regenerativen Medizin kombinieren Zellen und Signalfaktoren mit künstlichen Gerüsten, sogenannten Scaffolds aus synthetischen oder natürlichen Materialien und stellen vielversprechende Alternativen der Arthrosetherapie dar. Mit dem Einbringen neuer Materialien in erkrankte Körperteile wird auch eine stabile Bindung sowie langfristige Verbindung dieser mit dem umliegenden Gewebe notwendig. Momentan erfolgt die chirurgische Implantation der Gewebetransplantate entweder durch Nähte, die Implantierung als „Press-fit“ oder durch Einsatz von Gewebeklebern. In ersteren Fällen kann zwar eine stabile Bindung, jedoch keine langfristige Integration der Gewebe im Defekt erzielt werden. An Gewebeklebern stehen unterschiedliche Präparate zur Verfügung, die zwar eine gewisse Effektivität besitzen, jedoch an geringer Biokompatibilität oder unzureichender Bindungskraft leiden. Die optimale Integrationsmethode sollte das Gewebe stark verbinden, klinisch schnell und einfach angewendet werden können, ein hohes Maß an Biokompatibilität besitzen und außerdem die Gewebereparatur fördern. Momentan sind die chirurgischen Methoden limitiert und kein Kleber konnte sich etablieren, der in der Lage ist, das Gewebe sowohl initial stark zu binden als auch langfristig zu integrieren.

Elvin und Kollegen haben eine neuartige und schnelle Photooxidationsmethode genutzt, um gelöstes natives Fibrinogen und unmodifizierte Gelatine als elastische Gele zu vernetzen, die adhäsive Eigenschaften besitzen und Zellproliferation ermöglichen. Gelatine und Fibrinogen sind natürliche Materialien mit diversen Vorteilen bezüglich Biokompatibilität, biologischen Eigenschaften und Abbaubarkeit. Zusätzlich zu ihrer Nützlichkeit als potentieller Knorpelkleber könnten diese Materialien daher auch Potenzial als besiedelte Hydrogele im Bereich Tissue Engineering besitzen. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, diese Gele bzw. Kleber vergleichend auf ihre Fähigkeit zur Knorpeladhäsion und -integration sowie auf ihre Zytokompatibilität hin zu untersuchen.

Zum Erreichen dieses Ziels werden folgende Teilbereiche untersucht:

- I: Die Sofortadhäsion unter Verwendung von quervernetzter Fibrinogen- und Gelatinelösung wird in einem porcinen Knorpel-Defekt-Modell mechanisch vergleichend untersucht.

- II: Die Langzeitintegration unter Verwendung von quervernetzter Fibrinogen- und Gelatinelösung wird in einem porcinen Knorpel-Defekt-Modell über einen Zeitraum von 21 Tagen histologisch und mechanisch vergleichend untersucht.
- III: Die Zytokompatibilität von quervernetzter Fibrinogen- und Gelatinelösung wird durch Inkorporation lebender Chondrozyten über einen Zeitraum von 14 Tagen histologisch untersucht.
- IV: Die Langzeitintegration unter Verwendung von besiedelter, quervernetzter Fibrinogen- und Gelatinelösung wird in einem porcinem Knorpel-Defekt-Modell über einen Zeitraum von 21 Tagen histologisch und mechanisch vergleichend untersucht.

2 Material

2.1 Instrumente

Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Instrumente

Instrument	Hersteller	Land
Accu-jet® pro	Brand	Wertheim, Deutschland
Analytische Waage	Ohaus	Zürich, Schweiz
CO ₂ -Inkubator	IBS Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Cryostat CM 3050S	Leica	Wetzlar, Deutschland
LED Wachstumslampe, 465 nm	HQRP®	Harrison, USA
Magnetrührer	VWR	Darmstadt, Deutschland
Materialprüfmaschine BZ020/TH2A	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
Mikroskop BX51/DP71 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop IX51/XC30 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Pipette multistep	Brand	Hamburg, Deutschland
Pipetten Research® Plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Prüfsoftware TestXpertII®	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
Thermomixer Comfort MTP	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermomixer MKR 23	DITABIS	Pforzheim, Deutschland
TissueLyser	Qiagen	Hilden, Deutschland

Vorrichtungen zur Herstellung der Knorpelkonstrukte	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Vorrichtungen des Versuchsaufbaus	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Vortex, IKA®MS3 basic	IKA®	Staufen, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge SIGMA 1-14	SIGMA Laborzentrifugen GmbH	Osterode, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr	Bieberach, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr	Bieberach, Deutschland
Orbitalschüttler Unimax 1010	Heidolph	Schwabach, Deutschland

2.2 Labormaterialien

Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Land
96-Well Platte	TPP	Trasadingen, Schweiz
96-Well Platte schwarz	Thermo Scientific	Waltham, USA
Biopsiestanze 3.0/6.0 mm	Smithkline Beecham Ltd.	UK
Bottle Top-Filter Nalgene®	Thermo Scientific	Waltham, USA
Deckgläser	R. Langenbrink	Emmendingen, Deutschland
Kryoröhrchen 2.0/5.0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Kulturplatte (Nunclon Delta Surface)	Thermo Scientific	Roskilde, Dänemark
Mikrotom-Klingen	Feather	Japan
PAP Pen Fettstift	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Parafilm M®	Pechiney	Chicago, USA
Pipettenspitzen	Starlab	Hamburg, Deutschland
Polypropylen Röhren 15/50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Rasierklingen	Personna/GEM	USA
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Skalpelle, verschiedene Größen	Feather	Osaka, Japan
Spitzröhren (Falcon® Centrifuge Tubes) 1.5/2.0 ml	Corning	New York, USA
Super Frost® Plus Deckgläser	R. Langenbrink	Emmendingen, Deutschland
Zellenfilter 100 µm	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Land
0,25% Trypsin-EDTA	Gibco®Life Technologies	Carlsbad, USA
2-Propanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Aqua ad iniectabilia	Bernd Braun Chemicals	Rottweil, Deutschland
Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure-2-Phosphat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Brilliant III Ultra-Fast SYBR	Agilent	Santa Clara, USA
Chloramin T	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DAPI Eindeckmedium ImmunoSelect®	Dianova	Hamburg, Deutschland
Destilliertes Wasser	Gibco® Technologies	Life Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisen(III)Chlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Entellan®	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fibrinogen	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Gelatine (porcine, Typ A)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kollagenase Typ II	Worthington	Lakewood, USA
Live/Dead Zell-Viabilität Kit II	PromoKine	Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumpersulfat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA Non-Essential Amino Acids)	Gibco® Technologies	Life Carlsbad, USA
Papain	Worthington	Lakewood, USA
PBS (Dulbecco A) Tabletten	Thermo Scientific	Waltham, USA

Penicillin/Streptomycin	Gibco® Technologies	Life	Carlsbad, USA
Pepsin	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)	Gibco® Technologies	Life	Carlsbad, USA
Prolin (L-Proline)	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Safranin O	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH		Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure Standard-Lösung	Sigma-Aldrich, Fluka® Analytical		Steinheim, Deutschland
Terralin®	Schülke & Mayr UK Ltd.		Norderstedt, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. compound	Sakura Finetek		Zoeterwonde, Niederlande
Tris(2,2'- Bipyridyl)dichlororuthenium(II)- Hexahydrat	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Xylene	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland
Zellkultur-Nährmedium (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium)	Sigma-Aldrich		Steinheim, Deutschland

2.4 Nährmedien

Proliferationsmedium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium/Ham`s F-12 (DMEM/F12) wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S; 100U/mL Penicillin, 0,1mg/mL Streptomycin) und 5 ng/mL fibroblastischem Wachstumsfaktor (bFGF) gemischt.

Kulturmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose 4.5 g/L (DMEM) wurde 10% FBS, 1% P/S, 1% 1 M HEPES, 0,1% L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 0,1% L-Prolin und 1% nicht-essenzielle Aminosäuren hinzugefügt.

2.5 Lösungen und Puffer

Chloramin T Lösung: 70,5 mg Chloramin T wurde in 4 mL Zitratpuffer mit einem pH 6 aufgelöst und 0,5 mL 2-Propanol wurde hinzugefügt.

Kollagenase Puffer: 0,1 M HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂, und 5 mM Glucose wurde zu 450 mL H₂O hinzugefügt. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt (mittels 2 M NaOH) und das Volumen wurde auf 500 mL mit H₂O erhöht. Dann wurde die Lösung steril filtriert. Direkt vor dem Verdauen wurden 10% FBS, 1% P/S und 0,15% Kollagenase Typ II hinzugefügt.

DAB-Lösung: 750 mg p-Dimethylamino-Benzaldehyd (DAB) wurde zu 3 mL 2-Propanol hinzugefügt, dann wurden 1,3 mL 60%-Perchlorsäure hinzugefügt.

MTT-Lösung: 5 mg/mL Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; Sigma, M2128) wurde in 1 x PBS (pH=7,4) aufgelöst und dann reichlich mittels des Vortexmischers geschüttelt. Danach erfolgte die sterile Filtration durch einen 0,2 µm Filter um Kristalle zu entfernen und zur Sterilisation. Die MTT Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

PBS: 10 PBS (Dulbecco A) Tabletten wurden in 1 L ddH₂O aufgelöst.

[RuII_(bpy)³]²⁺ (50 mM): 37.45 mg [RuII_(bpy)³]²⁺ wurde mit 1 mL H₂O gemischt und gerührt bis es vollständig aufgelöst war. Die Stammlösung wurde in Aluminium-Folie eingewickelt und in Dunkelheit bei -20°C aufbewahrt.

SPS (1 M) - Lösung: 238mg SPS wurden mit 1 mL H₂O gemischt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3 Methoden

3.1 Knorpelextraktion

Zur Herstellung der Knorpelscheiben für die mechanischen Push-Out-Messungen sowie zur Gewinnung porciner Chondrozyten wurde Knorpel aus den Hinterläufen von Spanferkeln aus einer lokalen Metzgerei (Metzgerei Hollerbach; Rimpar, Deutschland) verwendet. Die Ferkel waren bei Schlachtung zwischen 8 und 12 Wochen alt und standen unter tierärztlicher Kontrolle. Bei der Schlachtung wurde darauf geachtet, dass die Gelenkkapsel intakt blieb. Die Knie wurden innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet. Dabei wurde zunächst die Gelenkkapsel mit einem sterilen Skalpell schonend eröffnet. Anschließend wurde die Gelenkfläche der Tibia rechteckig umschnitten und mittels eines stumpfen Spatels herausgelöst (Abb.3). Die entstandenen Knorpelscheiben wurden gesammelt in einem mit PBS und 1% Streptomycin / 1% Penicillin gefüllten Falcon-Röhrchen bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

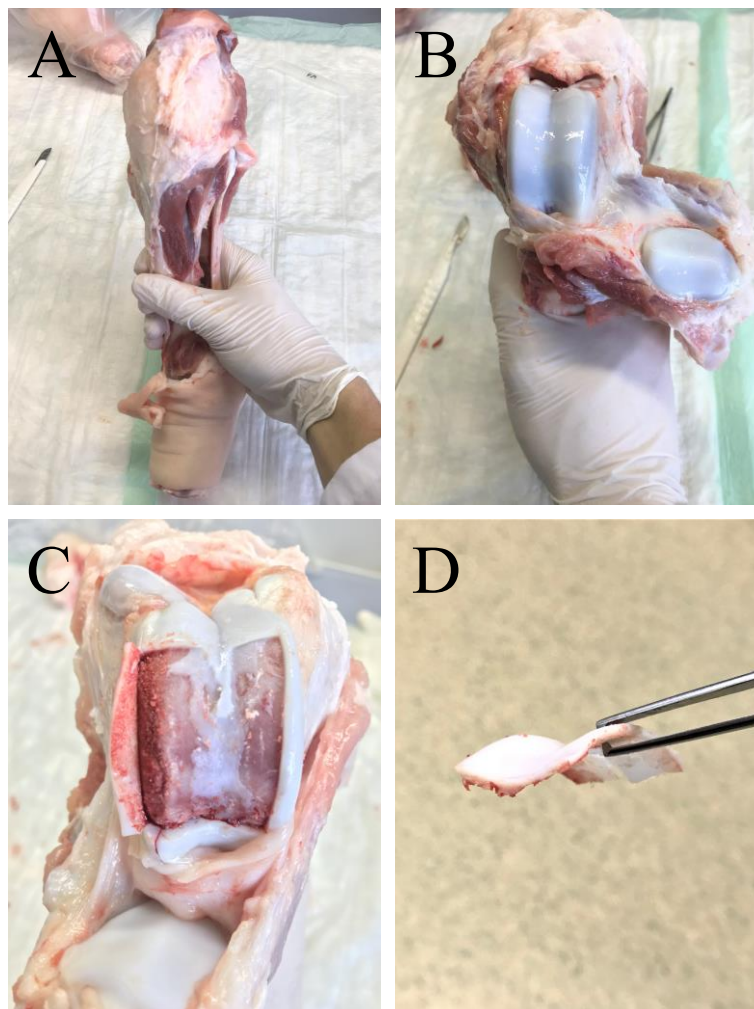


Abbildung 3: Knorpelextraktion; A: geschlossene Gelenkkapsel; B: freigelegter Gelenknorpel; C: Herauslösen der Knorpelplatte; D: Knorpelplatte

3.2 Herstellung der Proben für die Push-Out-Messungen

Mittels einer 6-mm-Biopsiestanze wurden mehrere Knorpelzylinder aus der Knorpelplatte herausgestanzt (Abb.4). Je nach Lokalisation war die Platte unterschiedlich dick, weshalb die Zylinder unterschiedliche Höhen hatten. Besonders in der Mitte ist die Dicke der Knorpelscheibe sehr gering, während sie in den lateralen Knorpelschenkeln, besonders im vorderen Bereich, dicker ist, weshalb die Stanzen bevorzugt hier entnommen wurden. Die Knorpelzylinder wurden wieder in PBS-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden die Zylinder mittels Rasierklingen in einem Schneidemodul auf eine Höhe von 1 mm zugeschnitten. Das Schneidemodul war zuvor von der Arbeitsgruppe etabliert worden. In Abhängigkeit der Ausgangshöhe der Zylinder konnten unterschiedliche Schnitfführungen gewählt werden; so konnten aus einem Zylinder mehrere Knorpelscheiben hergestellt werden. Wichtig war dabei, dass immer an beiden Seiten des Knorpels ein ganzflächiges Stück entfernt wurde, d.h. auf der ostealen Seite die komplette subchondrale Platte und von der gelenknahen Seite die superfizielle Zone weggeschnitten wurde. Schließlich wurde noch der Mittelteil der Knorpelscheiben in einer ebenfalls dafür angefertigten Vorrichtung mittels einer 3-mm-Biopsiestanze herausgestanzt. Die Haltevorrichtung gewährleistete, dass der Knorpelkern mittig und senkrecht herausgetrennt werden konnte. Schlussendlich resultierte auf diese Weise ein Knorpelring mit einer Höhe von 1 mm und einem Außendurchmesser von 6 mm, sowie ein Kern mit einem Durchmesser von 3 mm und ebenfalls einer Höhe von 1 mm (Abb. 4,5). Dieser Kern wurde im Verlauf mittels eines Bioadhäsivums wieder in den Ring geklebt und die Messungen bzw. Färbungen durchgeführt.

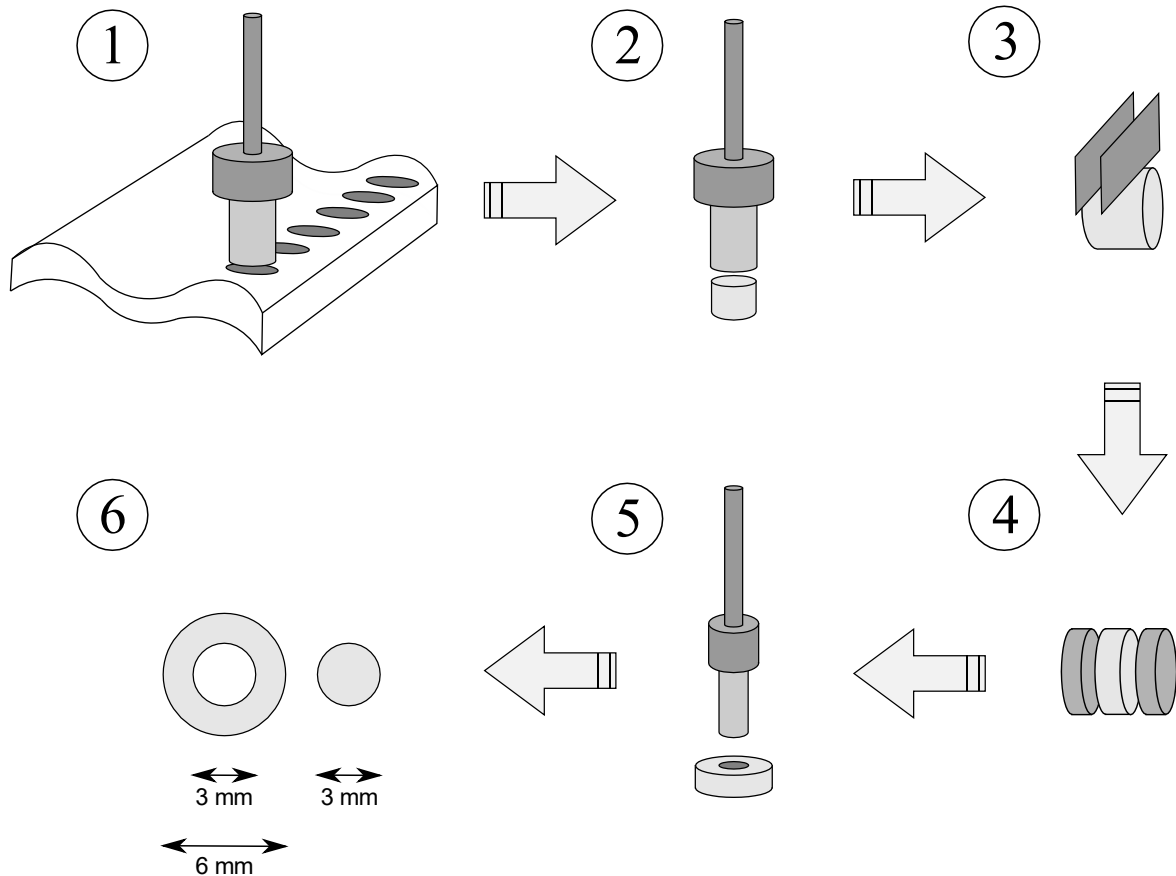


Abbildung 4: Herstellung der Proben für das Push-Out-Modell (nicht maßstabsgetreu); 1: Stanzen des Zylinders mit der 6-mm-Biopsiestanze aus dem Gelenkknorpel; 2: gestanzter 6-mm-Zylinder; 3: Beidseitiges Trimmen mit Rasierklingen auf Höhe von 1 mm in Schneidemodul (s. Abb. 5); 4: geschnittener 1 mm hoher Zylinder; 5: Stanzen des Knorpelkerns mit 3-mm-Biopsiestanze; 6: fertiger Knorpelring und -kern

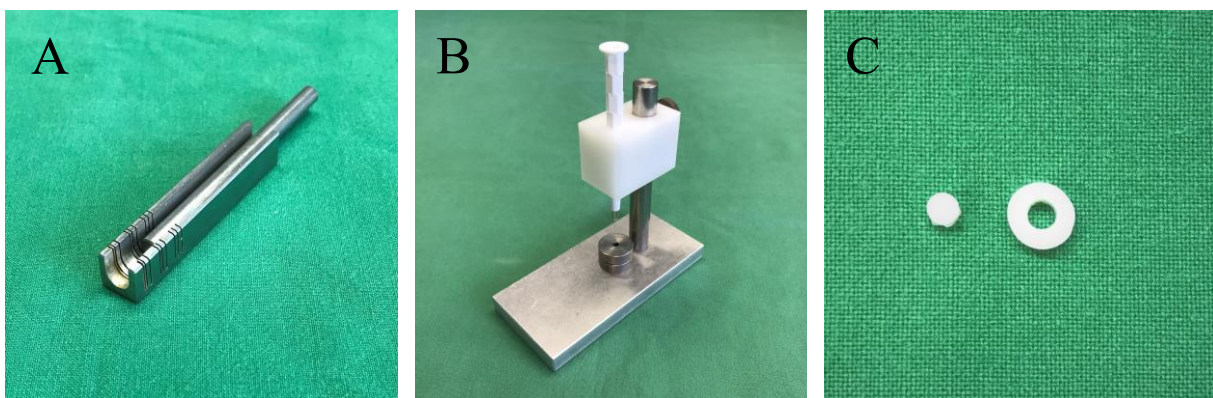


Abbildung 5: Trimmen der Konstrukte und Stanzen des Knorpelkerns mittels 3-mm-Stanze; A: Trimmen der Knorpelkonstrukte auf eine einheitliche Höhe mittels Schneidemodul und Rasierklingen (nicht mit abgebildet); B: Haltevorrichtung mit 3-mm-Stanze; C: 6-mm-Knorpelring und 3-mm-Knorpelkern; der Kern wird anschließend mittels des Adhäsivums in den Ring geklebt.

3.3 Isolierung der Chondrozyten

Für die Gewinnung lebender Chondrozyten wurde der Knorpel aus den Knien extrahiert (siehe oben). Mit einem Skalpell wurden kalzifizierte Anteile von der ostealen Seite entfernt. Der Knorpel wurde in 1-3 mm³ große Stückchen geschnitten und zentrifugiert (10 min, 300 g). Anschließend wurden die Knorpelstücke in Kollagenasepuffer enzymatisch verdaut (Kollagenase Typ II, 37°C, 5% CO₂, 16 h auf einem Orbitalschüttler bei 50 rpm). Die Suspension wurde durch einen 100 µm Zellfilter gefiltert, in PBS gewaschen und zentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Der Überstand wurde entfernt, PBS hinzugefügt und resuspendiert und anschließend nochmals zentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurde Proliferationsmedium hinzugefügt und das Zellpellet resuspendiert.

3.4 Kryokonservierung der Chondrozyten

Zur Aufbewahrung und anschließenden Verwendung wurden die Chondrozyten kryokonserviert. Hierzu wurden dem Proliferationsmedium 5% DMSO hinzugefügt, die Zellsuspension in Kryophiolen gegeben und diese in Isopropanol (-80°C) für 24 Stunden aufbewahrt um ein langsames Einfrieren der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Phiolen in flüssigem Stickstoff (-180°C) kryokonserviert bis zur weiteren Verwendung.

3.5 Kultivierung und Passagieren der Chondrozyten

Die Zellen wurden rasch aufgetaut, in Proliferationsmedium resuspendiert und in 50 mL Falcon- Röhren zentrifugiert (10 min, 300g). Der Überstand wurde abgesaugt um das DMSO zu entfernen. Nach Hinzufügen von Proliferationsmedium wurden die Zellen resuspendiert und in T175 cm² Flaschen mit 25 mL Proliferationsmedium gegeben. Das Proliferationsmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt, bis sich ein Zellrasen gebildet hatte, was regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft wurde. Zum Passagieren wurden das Proliferationsmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3,5 mL 0,25% Trypsin-EDTA hinzugefügt um die Zellen von der Flasche zu lösen. Nach 3-5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden 7 mL Proliferationsmedium hinzugegeben um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 300g), der Überstand entfernt und 18 mL Proliferationsmedium hinzugefügt um die Zellzahl unter Zuhilfenahme eines Hämozytometers zu bestimmen. Anschließend wurden die Zellen wieder in T175cm² Flaschen ausgesät oder für weitere Experimente verwendet.

3.6 Herstellung des Bioadhäsivums

3.6.1 Vorbereitung der Gelatine-Lösung

Gelatine-Pulver wurde in sterilem PBS bei 65°C unter gelegentlichem Umrühren aufgelöst mit verschiedenen Endkonzentrationen (75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL). Die Lösung wurde unter UV-Licht sterilisiert (10 min, 240 nm) und direkt verwendet oder bei -20°C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

3.6.2 Vorbereitung der Fibrinogen-Lösung

Fibrinogen-Pulver wurde in sterilem PBS bei Raumtemperatur aufgelöst da Fibrinogen bei höheren Temperaturen denaturieren würde, mit verschiedenen Endkonzentrationen (75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL). Die Lösung wurde unter UV-Licht sterilisiert (10 min, 240 nm) und direkt verwendet oder bei -20°C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

3.6.3 Cross-Linking-Verfahren

Die photoaktivierte Quervernetzung der Gelatine-/Fibrinogenkleber bzw. -gele erfolgte mittels des Photoinitiators Ruthenium ($[\text{RuII}(\text{bpy})_3]^{2+}$). Dabei wurde der Gelatine-/Fibrinogen-Lösung mit oder ohne Zellen bei Dunkelheit die Crosslinking-Lösung hinzugefügt im Verhältnis von 100 μL Gelatine/Fibrinogen Stammlösung mit 4 μL Ruthenium Stammlösung (1mM Rutheniumkomplex und 2 μL SPS Stammlösung).

Mechanische Versuche

Die vorbereiteten Knorpelkonstrukte wurden mit den Bioadhäsiva geklebt. Dabei wurde in folgender Reihenfolge vorgegangen: Knorpelring und Knorpelkern wurden mit Zellstoff abgetrocknet und nebeneinander auf einer Teflonplatte platziert. Der Gelatine- bzw Fibrinogenkleber wurde frisch angesetzt (s.o.) und eine definierte Menge von 10 μL in den Knorpelring pipettiert. Daraufhin wurden die Knorpelkerne mit einer Pinzette im Knorpelring platziert. Auf diese Weise ließen sich bis zu sechs Knorpelkonstrukte direkt hintereinander zusammenfügen. Der Prozess musste bei möglichst wenig Umgebungslicht stattfinden, um die lichtaktivierte Quervernetzung nicht vorzeitig zu starten. Deshalb, und weil die Gelatinelösung in so geringen Mengen schnell abzukühlen und auszuhärten drohte, musste dabei sehr rasch, aber trotzdem genau vorgegangen werden, weshalb der Klebeprozess Geschick und Übung erforderte. Anschließend wurden die Konstrukte mit einer blauen LED Lampe (5,6 mW/cm², 10 cm Entfernung) 30 sek. beleuchtet, gewendet und erneut für 30 s beleuchtet. Die so geklebten Konstrukte konnten direkt zur Messung der Integrationskraft des Klebers oder histologischen Begutachtung verwendet werden oder weiter kultiviert werden zur Beurteilung der Langzeitintegration. In diesem Fall wurden die Konstrukte in 48-Well-Platten gegeben und mit sterilem PBS mehrfach gewaschen. Anschließend wurden sie in Kulturmedium bis zu 21 Tage kultiviert und an unterschiedlichen Tagen Messungen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Gele

Um mit Zellen besiedelte Gele/Kleber herzustellen wurden die Zellen zentrifugiert und das Proliferationsmedium entfernt. Dann wurde Gelatinelösung (40°C) bzw Fibrinogenlösung (Raumtemperatur) hinzugefügt und die Zellen vorsichtig resuspendiert, mit einer angestrebten Konzentration von 20×10^6 Zellen/mL. Nach Hinzugabe von Ruthenium und SPS (s.o.) wurde eine definierte Menge von 40 μ L in Teflonringe, die auf einer Teflonplatte platziert waren, pipettiert und mit LED-Licht (s.o.) 30 sek. von beiden Seiten beleuchtet. Die so hergestellten Hydrogele wurden in 48-Well-Platten gegeben und mit sterilem PBS mehrfach gewaschen. Anschließend wurden sie in Kulturmedium bis zu 14 Tage kultiviert. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

3.7 Enzymatischer Andau

Teilweise wurden die Knorpelflächen einem enzymatischen Andau unterzogen um einen möglichen Einfluss auf die Integrationskraft zu untersuchen. Hierbei kamen Trypsin und Pepsin zum Einsatz.

3.7.1 Trypsin

Zu den Knorpelkonstrukten wurde Trypsin-EDTA in einer Konzentration 0,1% gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Konstrukte mehrfach in PBS gespült.

3.7.2 Pepsin

Zu den Knorpelkonstrukten wurde Pepsin in einer Konzentration 0,25% gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Konstrukte mehrfach in PBS gespült.

Die verwendeten Konzentrationen von Trypsin und Pepsin waren im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert worden.

3.8 Versuchsaufbau Mechanik

Der Versuchsaufbau für die mechanische Messung der Integrationskraft war von einem anderen Team aus der Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit etabliert und optimiert worden. Der Versuchsaufbau bestand aus der Grundeinheit und der Messeinheit, welche in einer Materialprüfmaschine (Zwick-Roell-BZ020/TH2A; Ulm, Deutschland) montiert wurden. Die dafür benötigten Einzelteile wurden von einem Feinmechaniker (Feinmechanik Sauer; Würzburg, Deutschland) angefertigt. Bei dem Versuchsaufbau handelte es sich um ein Push-Out-Modell. Gemessen wurde die benötigte Kraft, um den Knorpelkern mittels eines Stempels senkrecht durch den Knorpelring zu drücken. Mittels dieser und der berechneten Mantelfläche des Knorpelkerns bzw. des Knorpelringes ließ sich die Adhäsionskraft berechnen.

3.8.1 Grundeinheit

Die Grundeinheit (Abb. 6, 7) diente der Fixierung der Knorpelkonstrukte um eine fehlerfreie Messung gewährleisten zu können. Zu diesem Zweck wurde auf dem Boden der Prüfmaschine

eine bewegliche Grundplatte mit Feststellschrauben angebracht, in die wiederum die Probenhalterung gesetzt wurde. In diese konnten die Knorpelkonstrukte passgenau eingesetzt und mittels eines Deckel von allen Seiten fixiert werden. Im Deckel und dem Boden der Probenhalterung befand sich ein zentral gelegenes Loch, durch das der Stempel auf den im Inneren befindlichen Knorpelkern herabgesenkt werden konnte. Vor Beginn der Messung wurde die Grundeinheit auf die Messeinheit ausgerichtet, indem der Stempel und das Loch im Deckel der Ausrichtungseinheit aufeinander abgestimmt wurden, und dann mithilfe der Feststellschrauben fixiert.

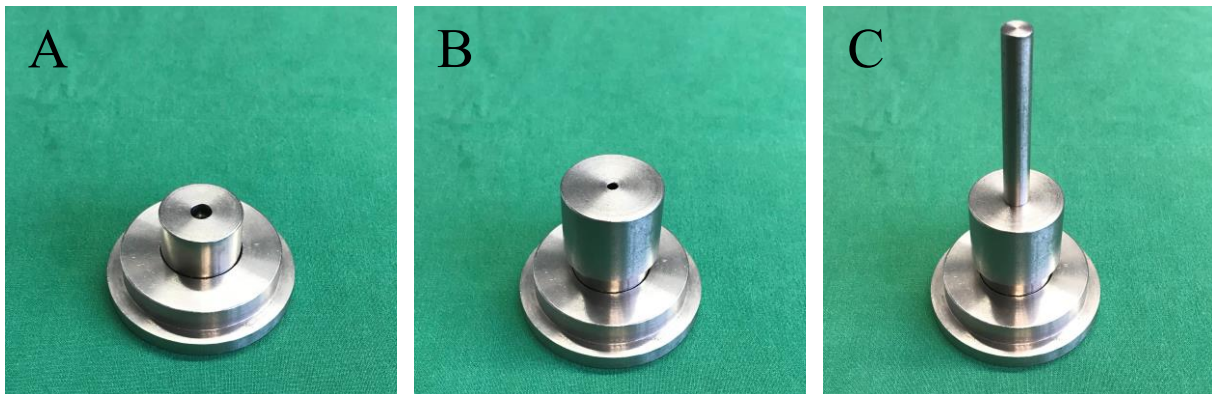


Abbildung 6: Grundeinheit; A: die Grundplatte mit Probenhalterung wurde auf dem Boden der Prüfmaschine fixiert; B: Probenhalterung mit Deckel = Ausrichtungseinheit; C: der Stempel fuhr senkrecht von oben durch den Deckel auf die Probe herab

3.8.2 Messeinheit

Die Messeinheit (Abb. 7) bestand aus dem Kraftaufnehmer, der Halterung für den Stempel, sowie dem Stempel. Diese wurde am beweglichen Mittelteil der Prüfmaschine, der Traverse, angebracht. Mittels des Stempels wurde der Knorpelkern durch den Ring gedrückt und die dafür benötigte Kraft vom Kraftaufnehmer ermittelt.

3.8.3 Prüfmaschine

Die Zwick-Roell-Materialprüfmaschine zeichnet sich durch zwei Prüfräume, ober- und unterhalb der Traverse aus, wodurch sowohl Druck- und Zugmessungen als auch Biegeversuche durchgeführt werden können. Die Traversengeschwindigkeit, mit welcher der Stempel auf die Probe trifft, kann zwischen 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ und 500 mm/min variiert werden. Der verwendete Kraftaufnehmer (Z6FD1) gehört zur Genauigkeitsklasse D1 der Firma HBM. Die maximale Last liegt bei 10 kg (Emax) bei einem Mindestteilungswert (Vmin) von 0,0360% wodurch Kräfte bis 98,1 N gemessen werden können. Über ein dazugehöriges Computerterminal konnten die ermittelten Daten über die Prüfsoftware (TestXpertII®) ausgewertet werden.

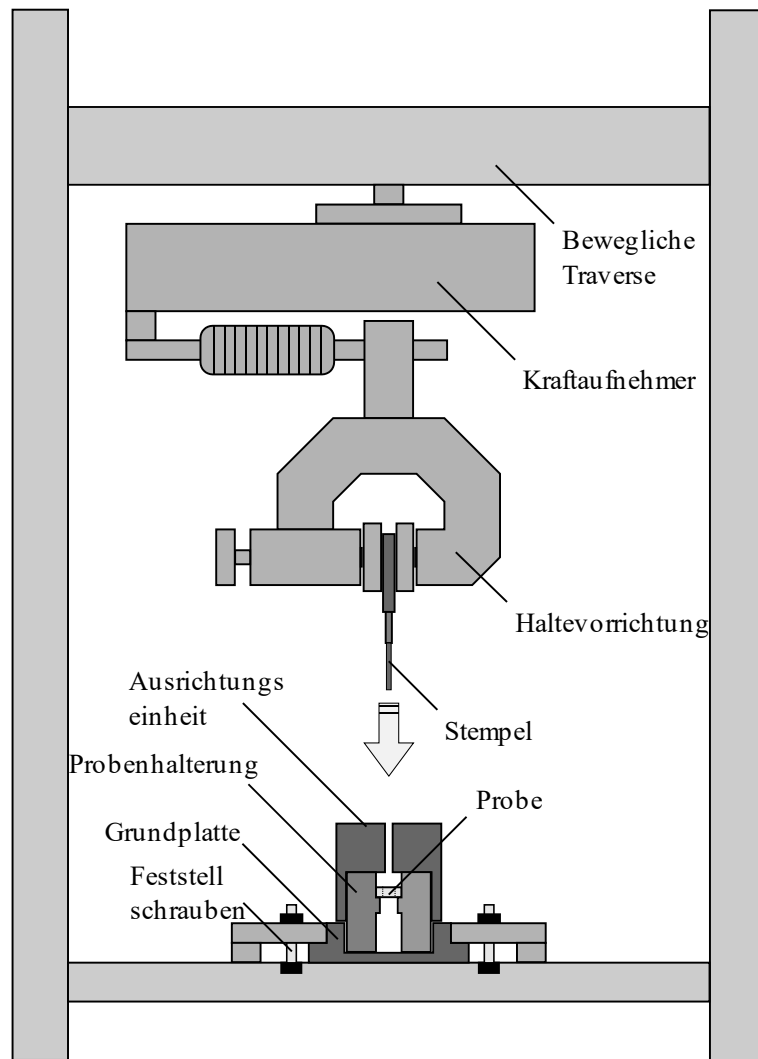


Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau (nicht maßstabgetreu); Grundeinheit: Grundplatte, Feststellschrauben, Probenhalterung, Ausrichtungseinheit; Messeinheit: Kraftaufnehmer, Haltevorrichtung, Stempel.

3.8.4 Prüfsoftware

Die Prüfsoftware TestXpertII® wurde von der Firma Zwick-Roell zur Verfügung gestellt. Das Programm liefert eine Kurvengrafik sowie den maximal benötigten Druck (F_{max} , in Newton) und die Verformung nominell bei F_{max} (in Millimetern). Die in der Prüfvorschrift festgelegte Anfahrtsgeschwindigkeit war von einer anderen Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit bei 10 mm/min festgelegt worden.

3.8.5 Messkurve

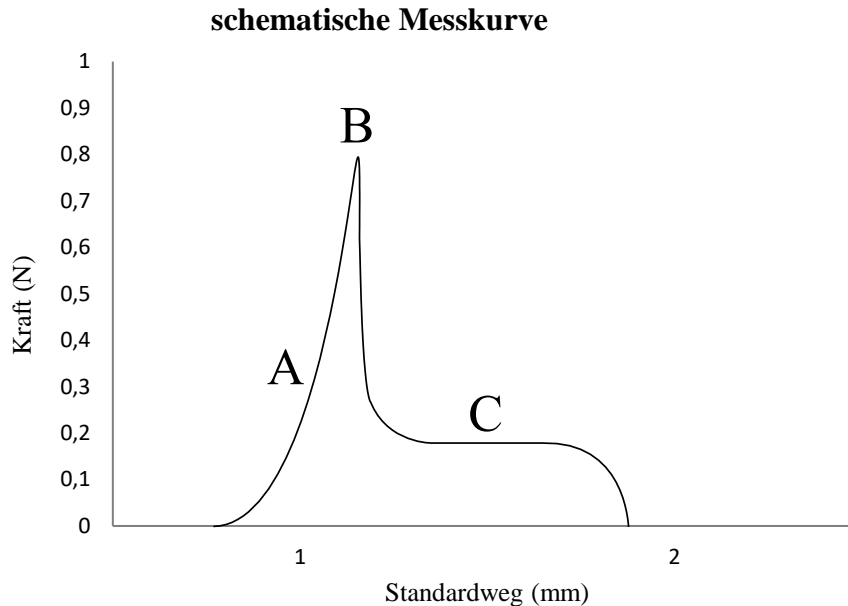


Abbildung 8: Schematischer Kurvenverlauf: A: Steigung der Kurve, abhängig vom Elastizitätsmodul; B: Peak, entspricht der gemessenen Maximalkraft; C: Plateau, entspricht der Kraft bzw. dem Weg, bis der Kern durch den Ring gedrückt worden ist

Nach Beendigung der Messung wurde der Messverlauf mithilfe der Prüfsoftware grafisch dargestellt. Auf der Y-Achse wurde die gemessene Kraft (in Newton) und auf der X-Achse der Standardweg (in Millimetern) angegeben. Aus den gemessenen Einzelmessungen ergab sich ein typischer Kurvenverlauf: zunächst stieg die Kurve steil an und zwar umso steiler, je steifer das Material, also je weniger elastisch der Kleber war. Danach folgte ein „Peak“, welcher der Kraft entsprach, die benötigt wurde, um die Adhäsion zu lösen, woraufhin die Kurve steil absank und in ein „Plateau“ überging, welches der konstanten Kraft entsprach, die benötigt wurde um den Knorpelkern vollständig durch den Knorpelring zu drücken.

Die benötigte Maximalkraft, also der Peak, war der Zielwert und wurde unter Einberechnung der Integrationsfläche in die normierte Adhäsionskraft (in kPa) umgerechnet. Die Integrationsfläche entsprach der Mantelfläche (M) des Knorpelkerns:

$$M = 2 \pi r h$$

Für die Adhäsionskraft in Kilopascal (kPa) ergab sich:

$$\text{Adhäsionskraft [kPa]} = \frac{F_{\max} [\text{N}]}{\text{Integrationsfläche} [\text{mm}^2]} \times 1000$$

3.9 Histologie

3.9.1 Paraffinschnitte

Die Knorpelkonstrukte wurden über 24 Stunden in 3,7% Formalin bei 4°C fixiert. Dann wurden die Proben mit einer Einbettungsmaschine in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms in 2 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in einem 45°C warmen Ofen bis zu 12 Stunden angebacken zur besseren Haftung auf dem Objektträger. Vor der Färbung wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert: 3 x 3 min Xylol, 3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 3 min 90% Ethanol, 2 x 3 min 80% Ethanol, 1 x 3 min 70% Ethanol, 1 x 3 min 50% Ethanol, 2 x 3 min vollentsalztes Wasser.

3.9.2 Kryoschnitte

Die Gele wurden über 24 Stunden in 3,7% Formalin bei 4°C fixiert. Danach wurden sie in Tissue-Tek® in Kryophiolen über Nacht bei 4°C eingebettet und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt bis zur weiteren Verwendung. Die gefrorenen, eingebetteten Proben wurden mittels eines Kryostates (Leica CM 1850) bei -20°C in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf SuperFrost® Plus Objektträgern bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert.

3.9.3 Safranin-O-Färbung

Zur histologischen Analytik der Proteoglykane erfolgten Färbungen mit Safranin-O. Für die Safranin-O-Färbung wurden die Objektträger nach folgendem Protokoll gefärbt: Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser für 1 min, Weigert's Hämatoxylin für 6 min, kurzes Eintauchen in destilliertem Wasser, kurzes Eintauchen in 0,5% Essigsäure, Bläuen der Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 5 min, 0,02% Fast Green für 4 min, 3 x Eintauchen in 1% Essigsäure, 0,1% Safranin-O für 6 min, Dehydratation in einer Alkoholreihe mit absolutem Ethanol für 1 min, dann 2 min 2-Propanol und 2 min Xylol. Am Ende wurden die Deckgläser auf den Objektträgern mit Entellan fixiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Bildaufnahmen wurden mit einem Olympus BX51 Mikroskop, ausgestattet mit einer DP71 Digitalkamera (Olympus; Hamburg, Deutschland), gemacht.

3.9.4 DAB-Färbung

Zur Darstellung von Kollagen I und II wurden immunhistochemische (IHC) Färbungen mit DAB-Substrat angefertigt. Die Schnitte wurden dazu mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in H₂O gelegt. Anschließend wurden die Histoschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift kreisförmig eingerahmt. Es erfolgte ein Andau mit Proteinase-K-Lösung für 10 min, gefolgt vom Block der Reaktion mit 1% BSA in PBS über 20 min. Für die Visualisierung wurden die Schnitte zunächst mit dem primären Antikörper versehen: Anti-Kollagen I (1:600 Ms-IgG ab6308, abcam) und Anti-Kollagen II (1:100, Rb-IgG, ab34712, abcam). Die Schnitte wurden mindestens 2 Stunden oder über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen für 3 x 3 min mit Tris-NaCl mit 0,1 % Tween 20 (TBS-T) folgte die immunhistochemische Färbung mithilfe des sekundären Antikörpers (1:100, goat-anti-rabbit-HRP für Kollagen I und 1:100, rabbit-anti-mouse-HRP für Kollagen II). Die Inkubation

erfolgte für 1 Stunde in einer feuchten Kammer, gefolgt von 3 x 3 min Waschen in TBS-T. Zur Entwicklung wurde das DAB-Reagenz mittels Kit frisch hergestellt, die Schnitte 5 min inkubiert und mit H₂O gewaschen. Danach folgte die Hämalaun-Färbung für 1-2 min, gefolgt von Spülen der Schnitte mit Leitungswasser. Schließlich wurden die Schnitte mit Glycergel Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt.

3.9.5 Live/Dead-Färbung

Die Überprüfung der Zellviabilität der Gele erfolgte mit dem Live/Dead Zell-Färbe Kit (PromoKine; Heidelberg, Deutschland). Hierzu wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt und den Zellen pro Well 333 µL Färbelösung, die 1 µL EthidiumbromidhomodimerIII (EthD) und 2 µL Calceinacetoxymethylester (CalceinAM) pro 1 mL PBS beinhaltet, hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C in Dunkelheit wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit der Olympus CellSensTM Software die Bildaufnahmen gemacht und bearbeitet.

3.9.6 MTT-Assay

Zur Überprüfung der Zellvitalität der Knorpelkonstrukte wurde der MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) Tetrazolium-Reduktions-Assay eingesetzt. Hierzu wurden 80 µL MTT-Lösung in 400 µL Kulturmedium pro Well gegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden makroskopische und mikroskopische Aufnahmen der Proben für eine qualitative Bestimmung der Zellvitalität angefertigt.

3.10 Bildgebende Verfahren

3.10.1 Makroskopische Aufnahmen

Makroskopische Bildgebung erfolgte entweder mit einem USB Mikroskop (dnt® DigiMicro Profi) unter Verwendung der Micro Capture Software auf einem LED Light Pad (HUION Leuchttisch L4S) oder mit einer Sony RGBW Sensor Kamera.

3.10.2 Mikroskopische Aufnahmen

Mikroskopische Bildgebung der Safranin-O- sowie der MTT-Schnitte erfolgte unter Verwendung einer DP71 Digitalkamera (Olympus; Hamburg, Deutschland), die an einem Olympus BX51 Mikroskop angeschlossen war. Zur mikroskopische Bildgebung der Live/Dead-Färbung kam ein Olympus IX51 invertiertes Mikroskop zum Einsatz, ausgestattet mit einer XC30-Kamera (Olympus; Hamburg, Deutschland). Die Bildbearbeitung erfolgte mit der CellSens Dimension Software.

3.11 Statistische Auswertung

Die Auswertung der durch die TestXpertIII®-Prüfsoftware erstellten Messdaten erfolgte mit MicrosoftExcel®. Mit dieser Software wurde die Integrationskraft entsprechend der Integrationsfläche sowie die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet und die dargestellten Diagramme erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS® (IBM SPSS Statistics). Die Normalverteilung der Proben wurde mittels Shapiro-Wilk-Test und visuell mittels Q-Q-Plots überprüft und bestätigt. Die Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test überprüft. Bei gegebener Varianzhomogenität erfolgte zur Signifikanzberechnung die Durchführung einer ANOVA mit Tukey-HSD als Post-Hoc-Test. Bei Varianzheterogenität erfolgte zur Signifikanzberechnung eine Welch-ANOVA mit Dunnett-T3 als Post-Hoc-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf einen Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Sofortadhäsion

Es sollte beurteilt werden, ob Fibrinogen – oder Gelatinelösung, die mit durch Licht aktiviertes Ruthenium vernetzt werden, sich als Bioadhäsivum für Knorpelgewebe eignen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Sofortadhäsion zwischen Knorpelring und Knorpelkern, also die Kraft, die benötigt wird, um geklebte Knorpelringe und Knorpelkerne voneinander zu lösen, durch mechanische Messungen untersucht. Anschließend wurde getestet, ob sich die Adhäsionskraft durch enzymatischen Andau der Knorpeloberfläche steigern lässt.

4.1.1 Push-Out-Versuch: Sofortadhäsion durch Ruthenium-Fibrinogen (RuFib) und Ruthenium-Gelatine (RuGel) 150 mg/ml

Für diesen Versuch wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Zur Messung der Sofortadhäsion zwischen zwei Knorpelflächen, die mit RuFib und RuGel geklebt worden waren, wurden Knorpelkerne mittels RuFib- und RuGel-Mischungen in den Knorpelkern geklebt.

Für beide Gruppen wurden Fibrinogen oder Gelatine in einer Konzentration von 150 mg/ml in PBS aufgelöst. Die Konzentration von 150 mg/ml wurde basierend auf den Arbeiten von Elvin et al. ^{165,173,181} ausgewählt. Die Lösungen wurden mit 1 mM Ruthenium und 20 mM SPS versetzt und für die ersten zwei Versuchsgruppen jeweils 10 µL in je einen Knorpelring pipettiert, der Knorpelkern mit einer Pinzette im Knorpelring platziert und die Konstrukte jeweils 30 sek von beiden Seiten beleuchtet. Mit der Zwick-Roell-Materialprüfmaschine wurde unter Verwendung der TestXpertII®-Prüfsoftware die Kraft ermittelt, die benötigt wurde, um den Knorpelkern mittels des Stempels aus dem Knorpelring zu drücken.

Im Vorfeld dieser Arbeit waren in demselben Versuchsaufbau mehrfach validierte Messungen von Kontrollgruppen an Tag 0 erfolgt, in denen der Knorpelkern lose in den Ring gesetzt worden war. Die entsprechenden Kontrollwerte wurden in diesem Versuch grafisch mit abgebildet und mit der Adhäsionskraft der Kleber verglichen. Es zeigte sich dabei, dass es an Tag 0 in beiden Versuchsgruppen zu einer messbaren Adhäsion zwischen Kleber und Knorpelgewebe kam, die unterschiedlich hoch ausfiel mit im Mittel 25,63 kPa in der Gruppe RuFib und 68,82 kPa in der Gruppe RuGel (Abbildung 9). Die Adhäsionskraft war dabei sowohl in der Gruppe RuFib als auch in der Gruppe RuGel signifikant höher als in der Kontrollgruppe, in der die Knorpelstücke lose ineinander gelegt worden waren. Die Adhäsionskraft fiel in den mit RuGel geklebten Knorpel-Knorpel-Konstrukten signifikant höher aus als in den RuFib-Konstrukten.

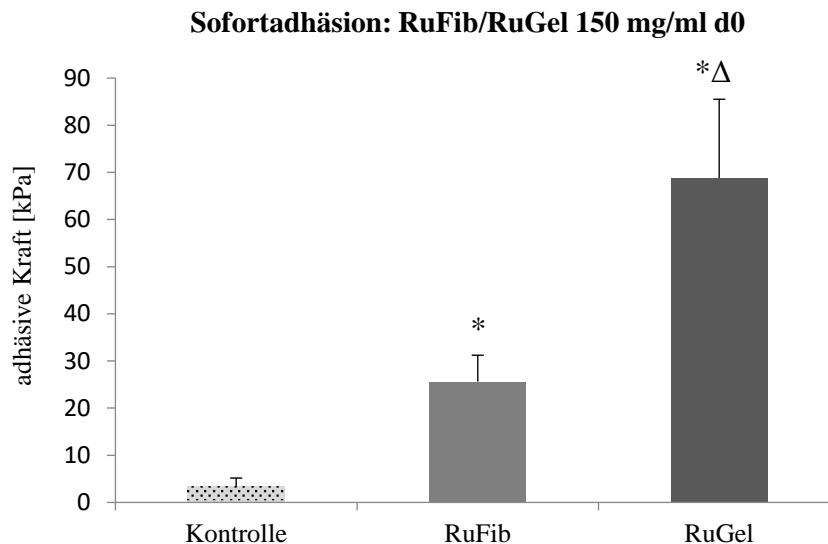


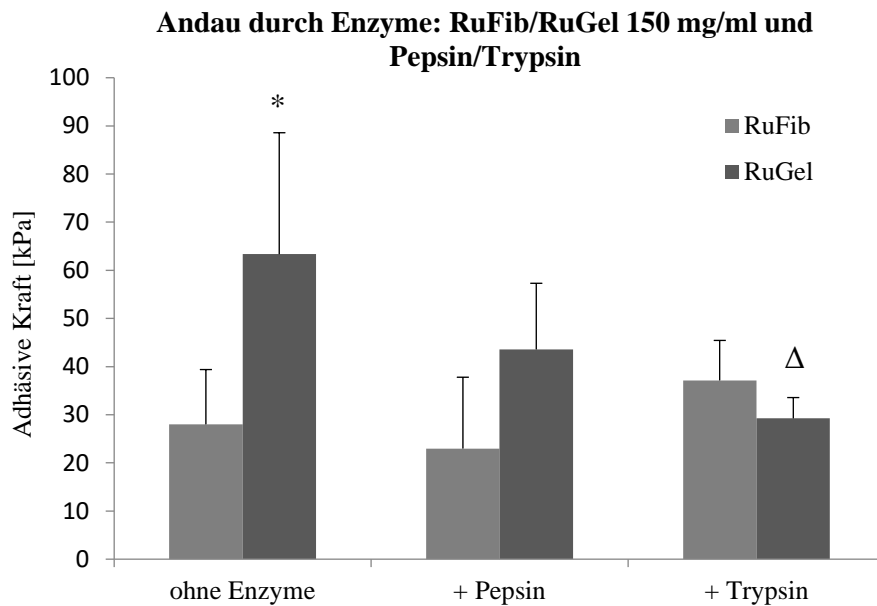
Abbildung 9: Push-Out-Messungen der Sofortadhäsion nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml; Bei Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden sind; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe Knorpel; Δ: signifikant gegenüber RuFib Knorpel.

4.1.2 Push-Out-Versuch: Einfluss auf Sofortadhäsion durch enzymatischen Andau mit Pepsin + Trypsin

In diesem Versuch wurde getestet ob der enzymatische Andau des Knorpels mit Pepsin und Trypsin zu einer Änderung der Adhäsionskraft führt. Hierzu wurden drei Versuchsgruppen gebildet, bestehend aus einer Gruppe mit durch Pepsin angedauten Knorpelkonstrukten und einer Gruppe mit durch Trypsin angedauten Konstrukten sowie einer Kontrollgruppe ohne Andau. In der Pepsin-Gruppe wurden die Konstrukte mit Pepsin in einer Konzentration 0,25% versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Konstrukte mehrfach in PBS gespült und nach Standard-Protokoll geklebt. In der Trypsin-Gruppe wurde zu den Knorpelkonstrukten Trypsin-EDTA in einer Konzentration 0,1% gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen für den enzymatischen Andau waren in der Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit etabliert worden. Anschließend wurden die Konstrukte mehrfach in PBS gespült und schließlich ebenfalls nach Standard-Protokoll geklebt. Die Kontrollgruppe wurde ohne vorherigen Andau nach Standard-Protokoll wie im vorherigen Versuch geklebt. Die Konzentrationen der Kleber wurden unverändert beibehalten.

Die Adhäsionskräfte der Gruppen ohne enzymatischen Andau lagen für RuFib und RuGel jeweils in einem ähnlichen Bereich wie im vorherigen Versuch. Auch in diesem Versuch zeigte sich dabei eine signifikant höhere Adhäsionskraft des Klebers RuGel gegenüber RuFib. Für die Gruppe RuFib zeigte sich nach vorherigem Andau durch Pepsin eine leicht niedrigere Adhäsionskraft und eine etwas höhere Integrationskraft nach vorherigem Andau durch Trypsin (Abbildung 10). Diese Unterschiede waren nicht signifikant. In der Gruppe RuGel zeigte sich eine erniedrigte Adhäsionskraft nach vorherigem Andau sowohl mit Pepsin als auch mit

Trypsin, wobei der Abfall der Adhäsionskraft nach enzymatischem Andau mit Trypsin noch geringer ausfiel und statistisch signifikant war.



*Abbildung 10: Push-Out-Messungen der Sofortadhäsion nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml, und vorher durchgeführtem enzymatischem Andau. Andau mit Pepsin oder Trypsin, bzw. ohne Andau als Kontrolle; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib ohne Enzyme; Δ : signifikant gegenüber der Gruppe RuGel ohne Enzyme.*

4.2 Langzeitintegration über 21 Tage

Als nächstes sollte das Verhalten der RuFib- und RuGel-Kleber über einen längeren Zeitraum mechanisch und histologisch untersucht werden. Auch veränderte Konzentrationen der Ruthenium-Kleber wurden getestet. In einem ersten Versuch wurden die Knorpelkonstrukte wie in den vorherigen Versuchen nach Standardprotokoll geklebt und über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Nach einer sowie nach drei Wochen wurden mechanische Messungen sowie MTT-Assays zur Überprüfung der Viabilität der Konstrukte durchgeführt. In einem zweiten Versuch wurde derselbe Versuchsaufbau beibehalten, jedoch mit Kleberkonzentrationen von RuFib und RuGel 100 mg/ml anstelle 150 mg/ml durchgeführt. Ergänzend zu den mechanischen Untersuchungen wurden erstmals histologische Untersuchungen der Konstrukte mit Safranin-O-Färbung durchgeführt. In einem dritten Versuch wurden diese Kleberkonzentrationen beibehalten und wieder 21 Tage lang kultiviert, jedoch ohne mechanische Messungen durchzuführen, sondern mit rein histologischen Untersuchungen in engeren Abständen.

4.2.1 Push-Out-Versuch und Histologie: RuFib und RuGel 150 mg/ml

In diesem Versuch wurden drei Versuchsgruppen gebildet, bestehend aus RuFib und RuGel in einer Konzentration von 150 mg/ml sowie einer Kontrollgruppe, in welcher die Knorpelkerne ohne Kleber in die Ringe gesetzt wurden. Alle Gruppen wurden 21 Tage kultiviert und an Tag 7 und Tag 21 mechanische Messungen sowie MTT-Assays zur Überprüfung der Viabilität durchgeführt. Die Tag-0-Werte der vorhergehenden Versuche sind grafisch gesondert mit abgebildet, wurden jedoch nicht statistisch miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass die Integrationskraft nach 7 und 21 Tagen in der Kontrollgruppe am höchsten ausfiel (Abbildung 11). In allen drei Gruppen lagen an Tag 21 höhere Integrationskräfte als an Tag 7 vor. Die Adhäsionskräfte waren in der Gruppe RuGel sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 höher als in der Gruppe RuFib. Diese Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen jeweils an Tag 7 und an Tag 21 waren statistisch nicht signifikant.

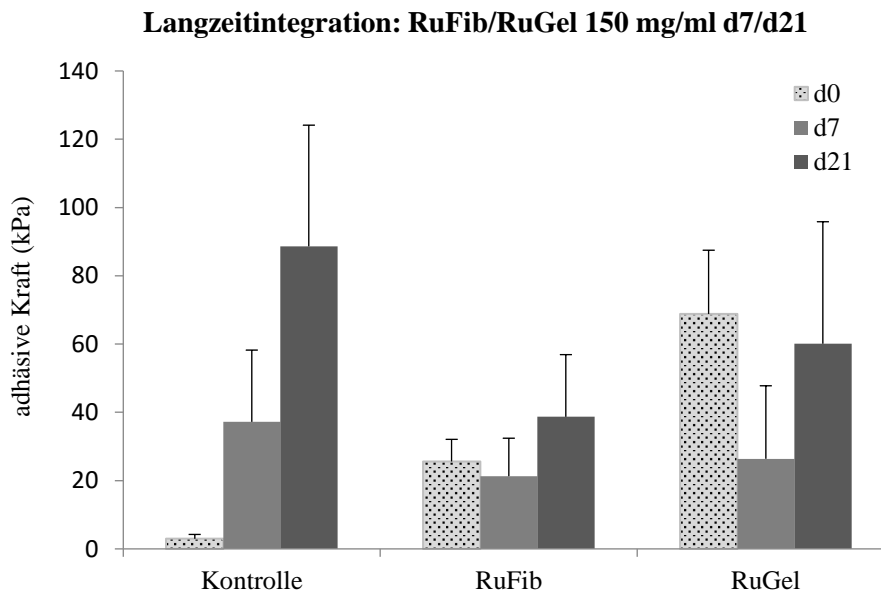


Abbildung 11: Push-Out-Messungen der Langzeitintegration nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml, nach bis zu drei Wochen Kultivierung. d0-Werte aus vorherigen Versuchsreihen sind ergänzend mit dargestellt, bei den d0-Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden waren.

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden in diesem Versuch außerdem MTT-Assays der Knorpelkonstrukte nach mechanischer Messung an Tag 7 und Tag 21 durchgeführt. Hierzu wurden 80 μL MTT-Lösung in 400 μL Kulturmedium pro Well gegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden makroskopische und mikroskopische Aufnahmen der Proben für eine qualitative Bestimmung der Zellvitalität angefertigt.

Bei makroskopischer Betrachtung der Proben an Tag 21 ließ sich kein wesentlicher Unterschied in der Schwarzfärbung der Knorpelkonstrukte zwischen den einzelnen Gruppen feststellen (Abbildung 13). Vereinzelt heller wirkende Bereichen waren auf die noch nasse und daher glänzende Oberfläche der Konstrukte zurückzuführen.

Bei mikroskopischer Beurteilung der Knorpelringe der Gruppen RuFib und RuGel an Tag 7 zeigten sich gut erkennbare, schwarz gefärbte Chondrozyten im gesamten Knorpelring verteilt (Abbildung 12). Auch in den Randzonen nach außen sowie nach innen zum Knorpelspalt hin ließen sich vitale Chondrozyten in beiden Gruppen erkennen.

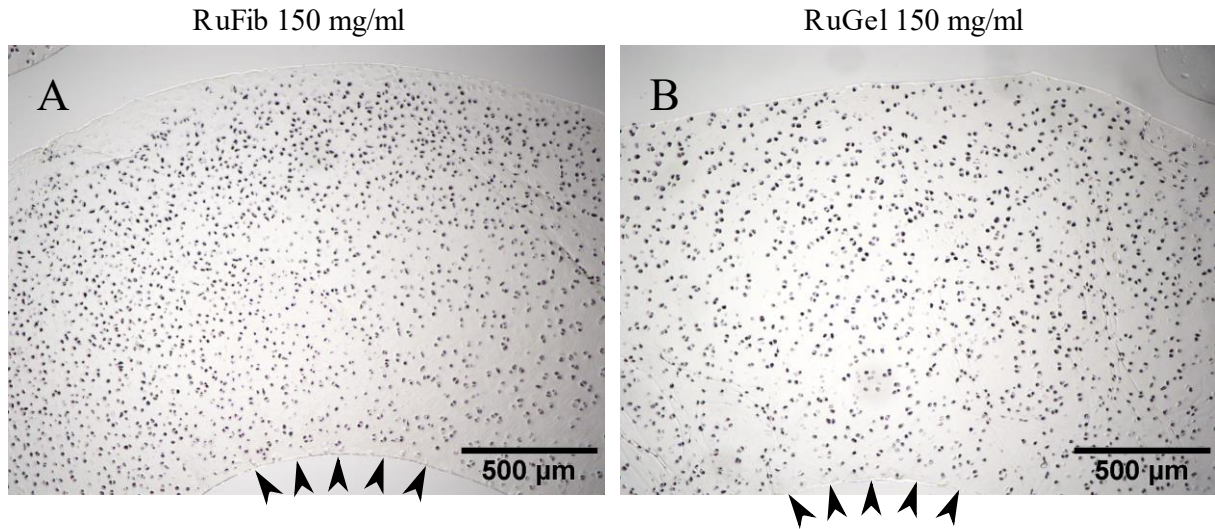


Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahmen der Gruppen RuFib 150/ml und RuGel 150 mg/ml nach mechanischer Messung an d7; Untersuchung der Zellvitalität und Viabilität mittels MTT; Pfeile markieren inneren Rand des Knorpelrings; Knorpelkerne fehlen, da die mechanische Messung bereits erfolgt ist.

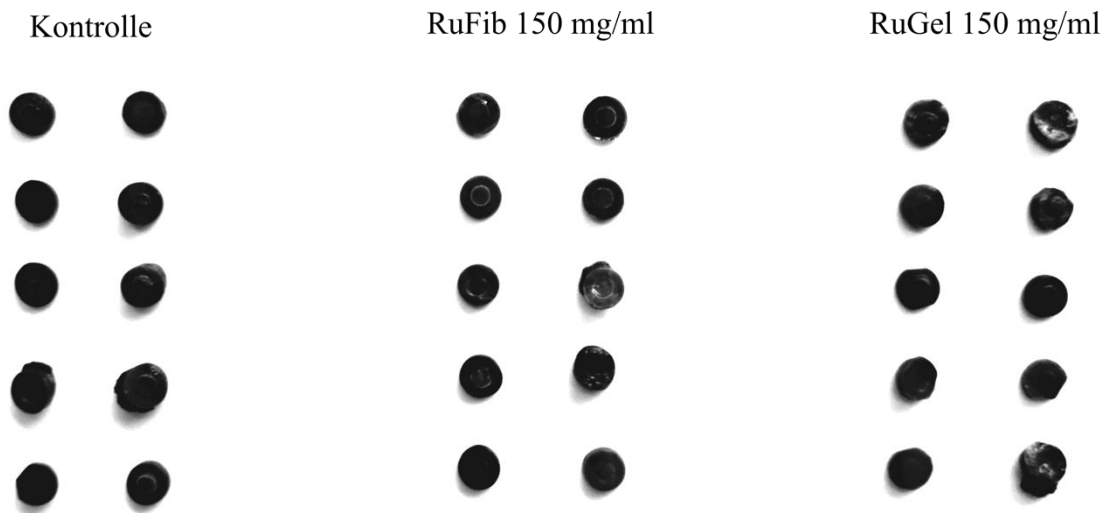


Abbildung 13: Makroskopische Aufnahme der Knorpelkonstrukte vor mechanischer Messung; Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT an d21; Aufhellungen entsprechen Lichtreflexionen.

4.2.2 Push-Out-Versuch und Histologie: RuGel und RuFib 100 mg/ml

Der Versuchsaufbau dieses Versuches war derselbe wie der Vorherige, jedoch wurde eine andere Konzentration für RuFib und RuGel gewählt mit 100 mg/ml Fibrinogen bzw. Gelatine. Dafür ausschlaggebend war die Überlegung, dass in einer geringeren Konzentration eine lockere Kleberstruktur resultieren könnte, die das Einwachsen von Chondrozyten und die Sekretion von Knorpelmatrix in den Kleber begünstigen könnte. Außerdem wurde wieder eine Kontrollgruppe zum Vergleich für d7 und d21 herangezogen.

Alle Gruppen wurden 21 Tage kultiviert und an d7 und d21 mechanische Messungen sowie zusätzlich histologische Untersuchungen durchgeführt. Bei den Gruppen RuFib und RuGel wurden auch mechanische Messungen an d0 zur Beurteilung der Sofortintegration durchgeführt. In der Kontrollgruppe wurden keine mechanischen Messungen an d0 durchgeführt, da hierzu mehrfach validierte Messdaten aus vorherigen Versuchsgruppen vorlagen, die grafisch mit abgebildet und mit den Tag-0-Werten der Versuchsgruppen verglichen wurden.

Bei den Push-Out-Messungen zeigten sich an Tag 0 für RuFib und RuGel in der geänderten Konzentration von 100 mg/ml ähnliche Werte für die Adhäsionskraft wie für RuFib und RuGel in der höheren Konzentration mit 150 mg/ml in den vorhergehenden Versuchen (Abbildung 14). Die Adhäsionskraft fiel dabei sowohl in der Gruppe RuFib als auch in der Gruppe RuGel an Tag 0 signifikant höher aus gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 0, und in der Gruppe RuGel wiederum signifikant höher gegenüber der Gruppe RuFib.

Von Tag 0 auf Tag 7 sank die Integrationskraft jedoch bei RuFib geringfügig ab und an Tag 21 stieg sie wieder auf fast dieselben Werte wie an Tag 0 an. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Bei RuGel sank die Integrationskraft signifikant von 69,14 kPa an Tag 0 um 63% auf 25,85 kPa ab und stieg dann wieder an auf 33,53 kPa an Tag 21, wobei der Anstieg statistisch nicht signifikant war.

Es zeigte sich, dass die Integrationskraft nach 7 und 21 Tagen in der Kontrollgruppe am höchsten war, wobei der Unterschied gegenüber der Gruppe RuFib, nicht jedoch gegenüber RuGel statistisch signifikant ausfiel. Die Adhäsionskräfte waren in der Gruppe RuGel an allen Tagen höher als in der Gruppe RuFib, wobei der Unterschied nur an Tag 0 signifikant war. Im Vergleich zum vorherigen Versuch mit der höheren Konzentration an Fibrinogen/Gelatine von 150 mg/ml zeigten sich an Tag 0 und Tag 7 ähnliche Werte für die Integrationskraft mit der veränderten Konzentration von 100 mg/ml, an Tag 21 waren sie jedoch bei RuFib und RuGel deutlich niedriger.

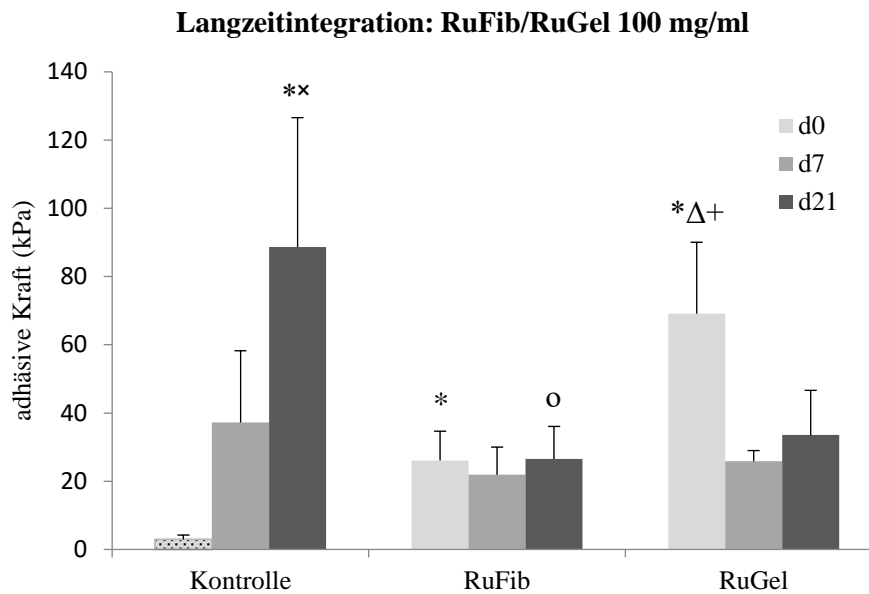


Abbildung 14: Push-Out-Messungen der Langzeitintegration nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 100 mg/ml, nach bis zu drei Wochen Kultivierung. Bei den d0-Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden waren. *: signifikant gegenüber der Kontrolle d0; **: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe d7; Δ: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib d0; ^o: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe d21; +: signifikant gegenüber der Gruppe RuGel d0.

Zur weiteren Untersuchung und Darstellung der Verhältnisse im Knorpelspalt nach 3 Wochen wurden histologische Präparate mit Safranin-O-Färbung und DAB-Färbung angefertigt. In Abbildung 15 ist der Spalt zwischen Knorpelring und -kern an Tag 21 in verschiedenen Vergrößerungen mit Safranin-O-Färbung dargestellt.

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine homogene Färbung des Knorpels und des Knorpelspalts, was auf stattfindende Matrixproduktion mit Proteoglykansynthese hinwies. Zellmigration war allerdings nicht sichtbar (Abbildung 15, Bild A, C). Vom Knorpelspalt ausgehend in Richtung Knorpelring war ein Saum mit verminderter Färbung des Gewebes sichtbar, was auf eine Zone verminderter Matrixdichte hindeutete. Dieser Saum war auch in den anderen Gruppen sichtbar. Auch bei RuFib zeigte sich eine rosa Färbung des Knorpelspalts, was für stattfindende Matrixproduktion sprach. Die Färbung war aber weniger homogen als in der Kontrollgruppe, der Knorpelspalt trat deutlicher hervor. Hier waren zusätzlich vereinzelte migrierende Chondrozyten sichtbar, was neben der Matrixsynthese auch für stattfindende Chondrozytenmigration sprach (Abbildung 15, Bild B, E).

Bei RuGel wirkte die Rotfärbung des Knorpelspalts an Tag 21 deutlicher und homogener als bei RuFib mit einer kräftigen Färbung des Knorpelspalts. Auch migrierende Chondrozyten waren häufiger und deutlicher sichtbar (Abbildung 15, Bild C, F), was insgesamt für eine bessere Anregung der Chondrozytenmigration und Stimulierung von Matrixsynthese im Vergleich zu RuFib sprach.

Von den Gruppen RuFib und RuGel wurden an Tag 21 außerdem immunhistochemische Färbung mit DAB-Substrat zur Darstellung von Kollagen I und II angefertigt. In der DAB-Färbung zeigte sich bei RuGel im Vergleich zu RuFib ebenfalls eine intensivere Färbung des Knorpelspalts, was ebenfalls für eine bessere Chondrozytenstimulierung und Matrixproduktion von RuGel im Vergleich zu RuFib sprach (Abbildung 16, Bild C, D). Dabei wurde vor allem Kollagen II, das hauptsächlich im Gelenkknorpel vorkommt, sichtbar. Kollagen I, das man eher bei Faserknorpel und anderen Geweben erwarten würde, war dagegen kaum sichtbar (Abbildung 16, Bild A, B).

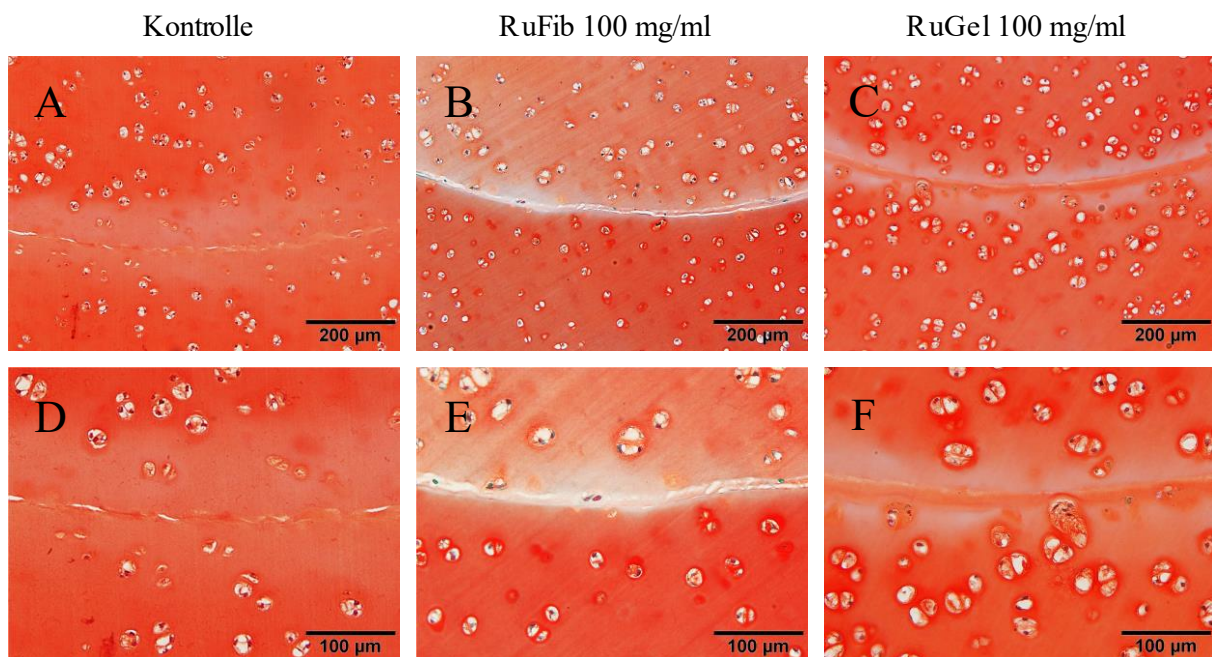


Abbildung 15: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d21.

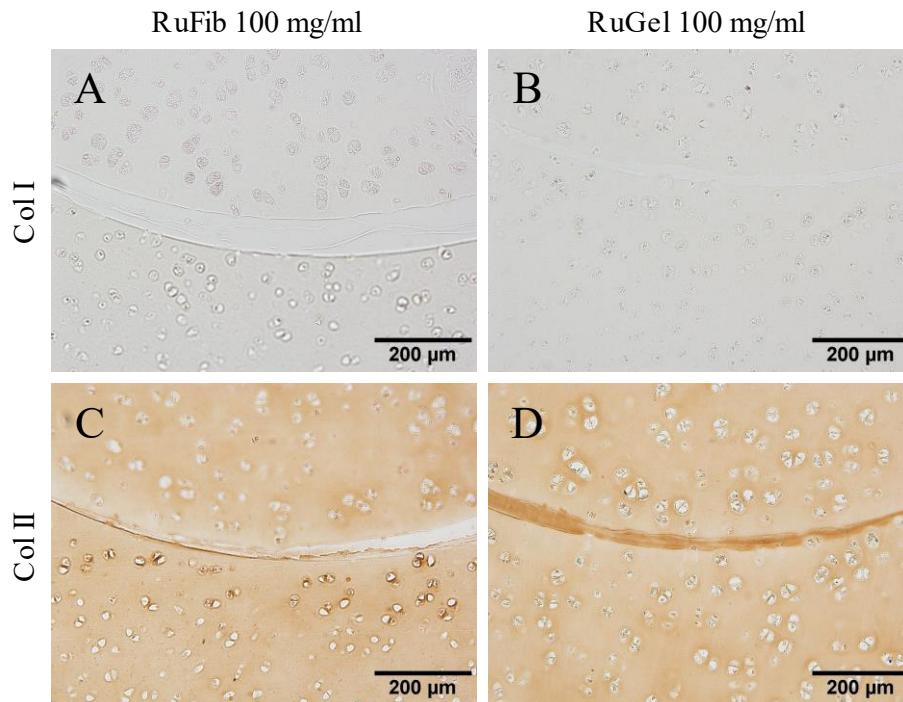


Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung der Integrationsfläche an d21 zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels DAB-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml.

4.2.3 Kinetik-Reihe Histologie: RuGel und RuFib 100 mg/ml

In einem weiteren Langzeitversuch über 21 Tage sollte die Entwicklung der Integrationsfläche im Knorpelspalt durch einen rein histologischen Versuch ohne mechanische Messungen genauer untersucht werden.

Der Versuch enthielt die zwei Versuchsgruppen RuFib und RuGel. Obwohl die Werte für die Langzeitintegration bei der niedrigeren Konzentration von 100 mg/ml hinter den Erwartungen zurückgeblieben waren, wurde aufgrund der vielversprechenden histologischen Aufnahmen und auch im Hinblick auf die Überlegung, in folgenden Versuchsreihen besiedelte Gele in dieser Konzentration anzufertigen, für diesen Versuch wieder die Konzentration von 100 mg/ml für RuFib und RuGel gewählt. Es wurden histologische Präparate an d0, d7, d10, d14 und d21 angefertigt.

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Gruppen RuFib und RuGel zu verschiedenen Zeitpunkten. An Tag 0 zeigte sich in beiden Gruppen der Knorpelspalt mit dem Ruthenium-Kleber gefüllt, der grün angefärbt war. Dass der Kleber in der Gruppe RuGel dem Knorpel nicht direkt anlag, war als präparationsbedingtes Artefakt zu werten.

Bei RuFib zeigte sich ab Tag 7 eine Rotfärbung des Knorpelspalts, was auf stattfindende Matrixsynthese in den Spalt hinein schließen ließ (Abbildung 17/18, Bilder E). Erste migrierende Chondrozyten, die die Randzonen des Knorpels in Richtung Knorpelspalt verließen, ließen sich im Anschluss ab Tag 10 erkennen (Abbildung 17/18, Bilder G). Ab dann kam es zu einer fortschreitenden Chondrozytenmigration sowie Matrixsynthese in den Knorpelspalt, die durch die Rotfärbung des Spalts deutlich wurde. Die Knorpel-Kleber-

Knorpel-Grenzen verschwammen zunehmend. An Tag 21 fanden sich einige Chondrozyten im Knorpelspalt liegend, die Rotfärbung des Knorpelspalts hatte beinahe dieselbe Intensität wie die des umliegenden Knorpelgewebes (Abbildung 17/18, Bilder K).

Bei RuGel fand dieser Prozess früher und schneller statt. Erste Matrixsynthese in den Kleber war bereits ab Tag 3 sichtbar (Abbildung 17/18, Bilder D). Neben reichlicher Matrixsynthese fanden sich erste migrierende Chondrozyten hier bereits an Tag 7 (Abbildung 17/18, Bilder F). Die Matrixsynthese und Chondrozytenmigration schritt auch hier mit der Zeit weiter voran. An Tag 21 war der gesamte Knorpelspalt homogen rot gefärbt und von ähnlicher Intensität wie das umliegende Knorpelgewebe (Abbildung 17/18, Bilder L). Dabei sollte beachtet werden, dass die Intensität der Färbung im Spalt im Verhältnis zum umliegenden Knorpel und weniger im Verhältnis zur Färbung in den anderen Schnitten betrachtet werden sollte, da hier die Rotfärbung des gesamten Gewebes durch leichte Unterschiede in der Schichtdicke der Schnitte nicht vollkommen einheitlich ausfiel. Im Knorpelspalt fanden sich zahlreiche Chondrozyten.

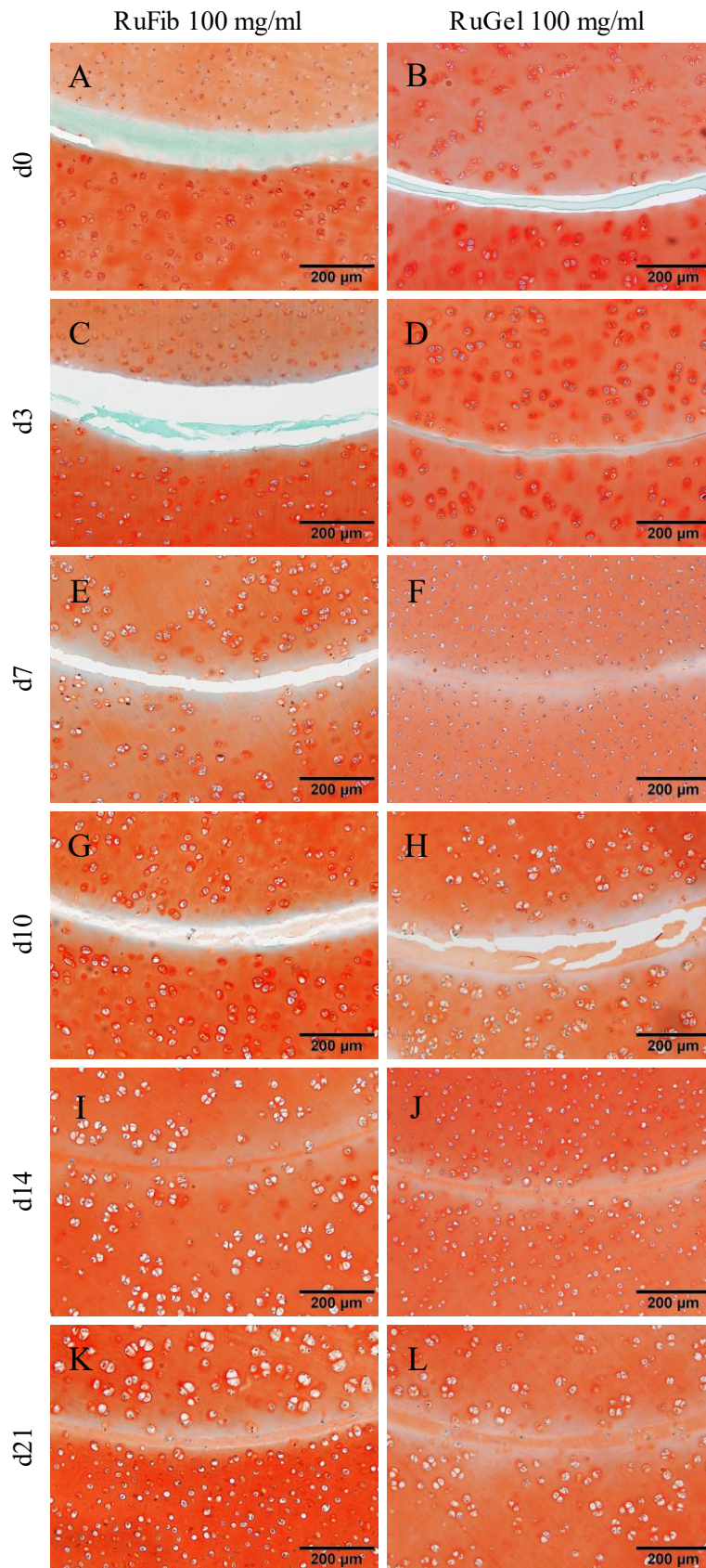


Abbildung 17: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d0, d3, d7, d10, d14, d21; Chondrozytenmigration war bei RuFib ab d10, bei RuGel ab d7 sichtbar, Matrixsynthese war bei RuFib ab d7, bei RuGel ab d3 sichtbar.

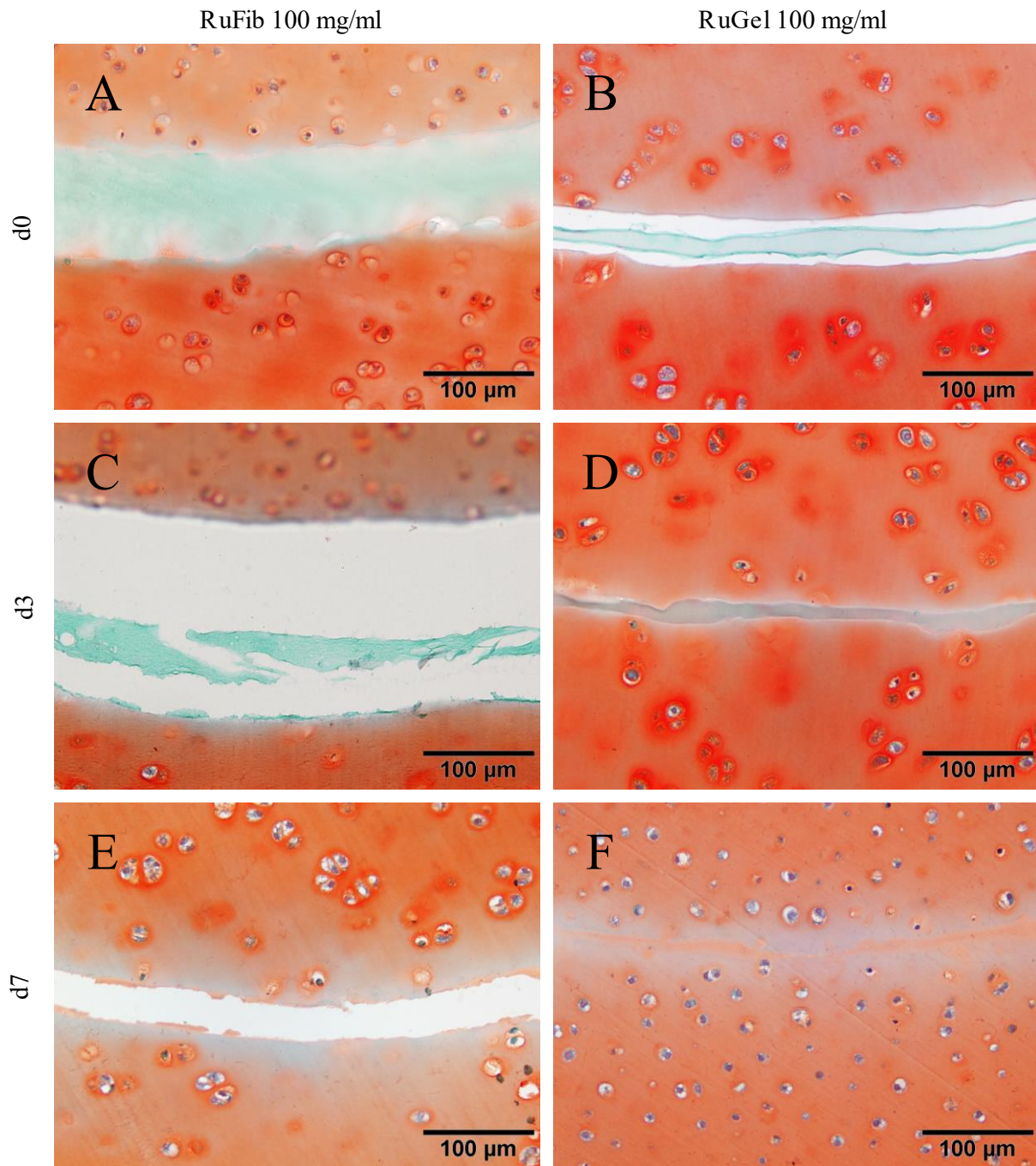


Abbildung 18: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d0,d3, d7; Matrixsynthese war bei RuFib ab d7, bei RuGel ab d3 sichtbar, Chondrozytenmigration war bei bei RuFib noch nicht, bei RuGel ab d7 sichtbar.

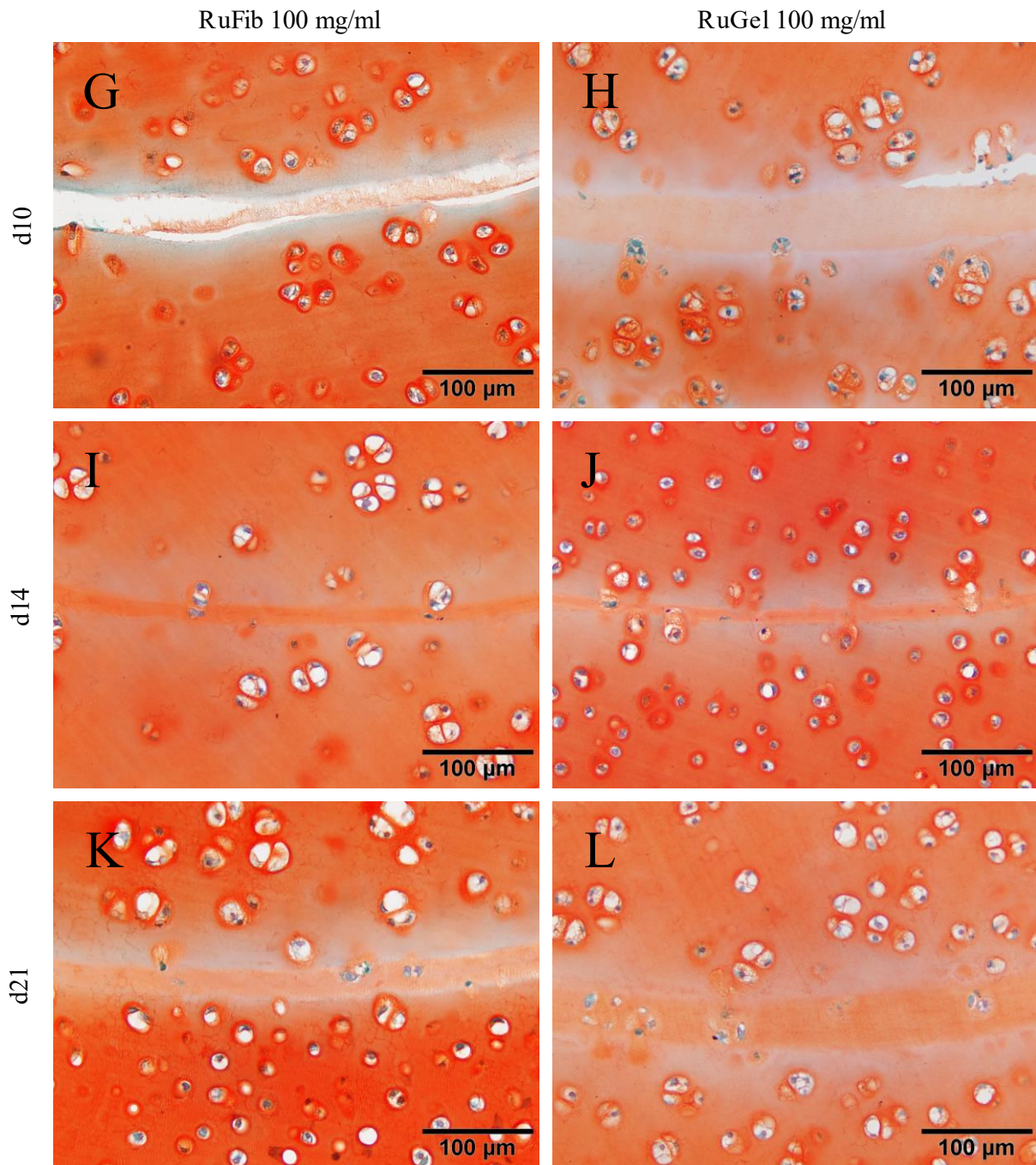


Abbildung 18, Fortsetzung: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d10, d14, d21; Chondrozytenmigration war bei RuFib ab d10 sichtbar.

4.3 Zellbesiedelte Hydrogele

Die vorherigen Experimente gaben Anlass zu der Annahme, dass sowohl RuFib als auch RuGel keinen wesentlichen zytotoxischen Einfluss auf das anliegende Knorpelgewebe ausüben. Zudem schienen die Chondrozyten im Knorpel zur Migration und Produktion von Extrazellulärmatrix angeregt zu werden. Diese Erkenntnisse gaben Anlass, die Ruthenium-Kleber mit lebenden Chondrozyten zu besiedeln und das Verhalten dieser sowie deren Einfluss über einen Zeitraum von 14 Tagen zu untersuchen und zu vergleichen.

4.3.1 Histologie: RuFib und RuGel in verschiedenen Konzentrationen, mit Zellen besiedelt

Es wurden 8 Gruppen angelegt, 4 RuFib-Gele und 4 RuGel-Gele in einer Konzentration von jeweils 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml und 150 mg/ml. Für die Besiedelung wurden kryokonservierte Passage-1-Chondrozyten aus oberen und unteren Knorpelschichten aufgetaut, 7 Tage lang kultiviert, geerntet und in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml in die Gele integriert, welche dann durch Beleuchtung quervernetzt wurden. Die Gel-Größe betrug 40 μ L. Die Gele sollten ursprünglich über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert und histologische Schnitte angefertigt werden. Einige Gele unterlagen jedoch einer so starken Verformung, dass die Gele sich auflösen drohten (Abbildung 19, B), weshalb bereits nach 14 Tagen histologische Schnitte angefertigt und Färbungen durchgeführt wurden.

Dabei zeigten sich bereits makroskopische Unterschiede zwischen den Gruppen. Während bei RuFib die Stabilität der Gele mit steigender Konzentration immer weiter abnahm, verhielten sich die Gele der Gruppe RuGel entgegengesetzt und wurden mit steigender Konzentration stabiler bzw. mit sinkender Konzentration zunehmend instabiler und kleiner (Abbildung 19, A, B, G, H). Die RuFib-Gele wiesen makroskopisch und vom Handling her insgesamt eine stabilere Struktur auf als die RuGel-Gele. Es wurden histologische Proben angefertigt mit Safranin-O- und DAB-Färbungen sowie ein Live/Dead-Assay.

Mikroskopisch zeigte sich in der Safranin-O-Färbung ebenfalls ein entgegengesetztes Verhalten der Proben. Die RuFib-Gele zeigten mit steigender Konzentration mehr Aktivität und Organisation der Chondrozyten, wie sich an der Anordnung der Chondrozyten und an der dezenten Rotfärbung der Gele erkennen ließ (Abbildung 20, G). Die RuGel-Gele hingegen zeigten in der höchsten Konzentration die niedrigste Aktivität. Rotfärbungen, die auf EZM-Bildung hinweisen, waren fleckig über die Proben verteilt (Abbildung 20, H). Die Organisation der Chondrozyten war eher gering. Mit abnehmender Konzentration stieg diese an, und erreichte in der niedrigsten Konzentration mit 75 mg/ml ihren Höhepunkt. Die Proben waren deutlich geschrumpft, die Chondrozyten zeigten hier eine hohe Organisation, die Proteoglykankonzentration war, der Intensität der Färbung nach zu urteilen, sehr hoch (Abbildung 20, Bild B). Insgesamt war die Rotfärbung in den RuGel-Gelen deutlicher als in den RuFib-Gelen.

In der DAB-Färbung zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen RuFib und RuGel. Während bei RuFib die Bildung von Kollagen II in niedrigen Konzentrationen vor allem auf einzelne Bereiche beschränkt war, zeigte sich in den höheren Konzentrationen eine gleichmäßigere Verteilung, jedoch sehr geringe Intensität von Kollagen II (Abbildung 21, A, C, E, G). Bei RuGel hingegen war die Bildung von Kollagen II in allen Konzentrationen deutlich prominenter, und stieg mit sinkender Konzentration (Abbildung 21, B, D, F, H).

Zur Untersuchung der Viabilität der Chondrozyten in den Gelen wurde außerdem ein Live/Dead Assay mit RuGel 150 mg/ml durchgeführt (Abbildung 22). Bei dem Gel leuchteten weite Teile des Gels grün auf, was für vitale Chondrozyten sprach. Außerdem fiel eine Organisation der Zellen mit Bildung von Zellclustern auf.

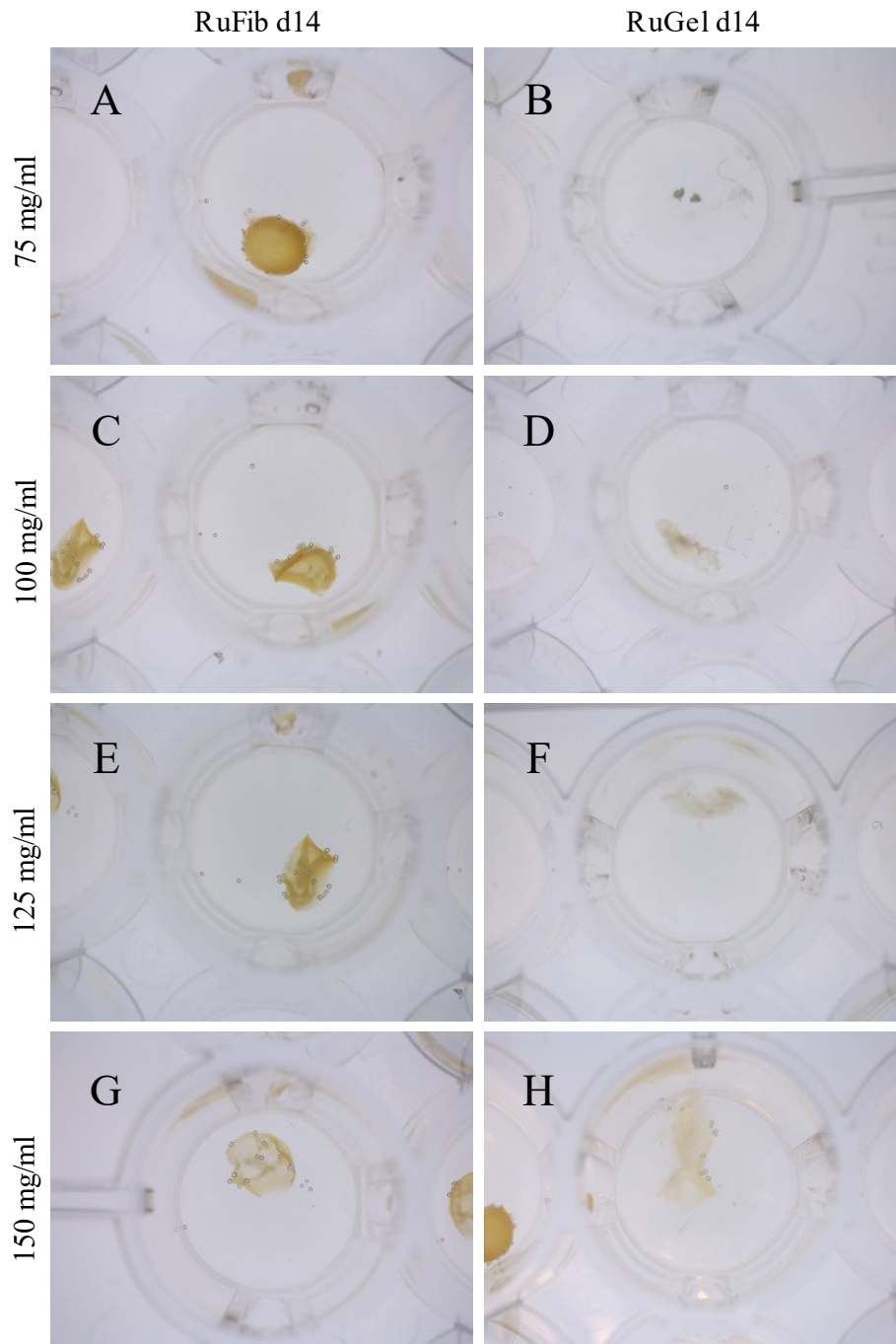


Abbildung 19: Makroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit 20×10^6 Zellen/mL der Gruppen RuFib und RuGel 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml an d14. RuFib und RuGel verhielten sich abhängig von ihrer Konzentration entgegengesetzt: RuFib zeigte sich mit steigender Konzentration instabiler, RuGel zeigte sich mit steigender Konzentration stabiler.

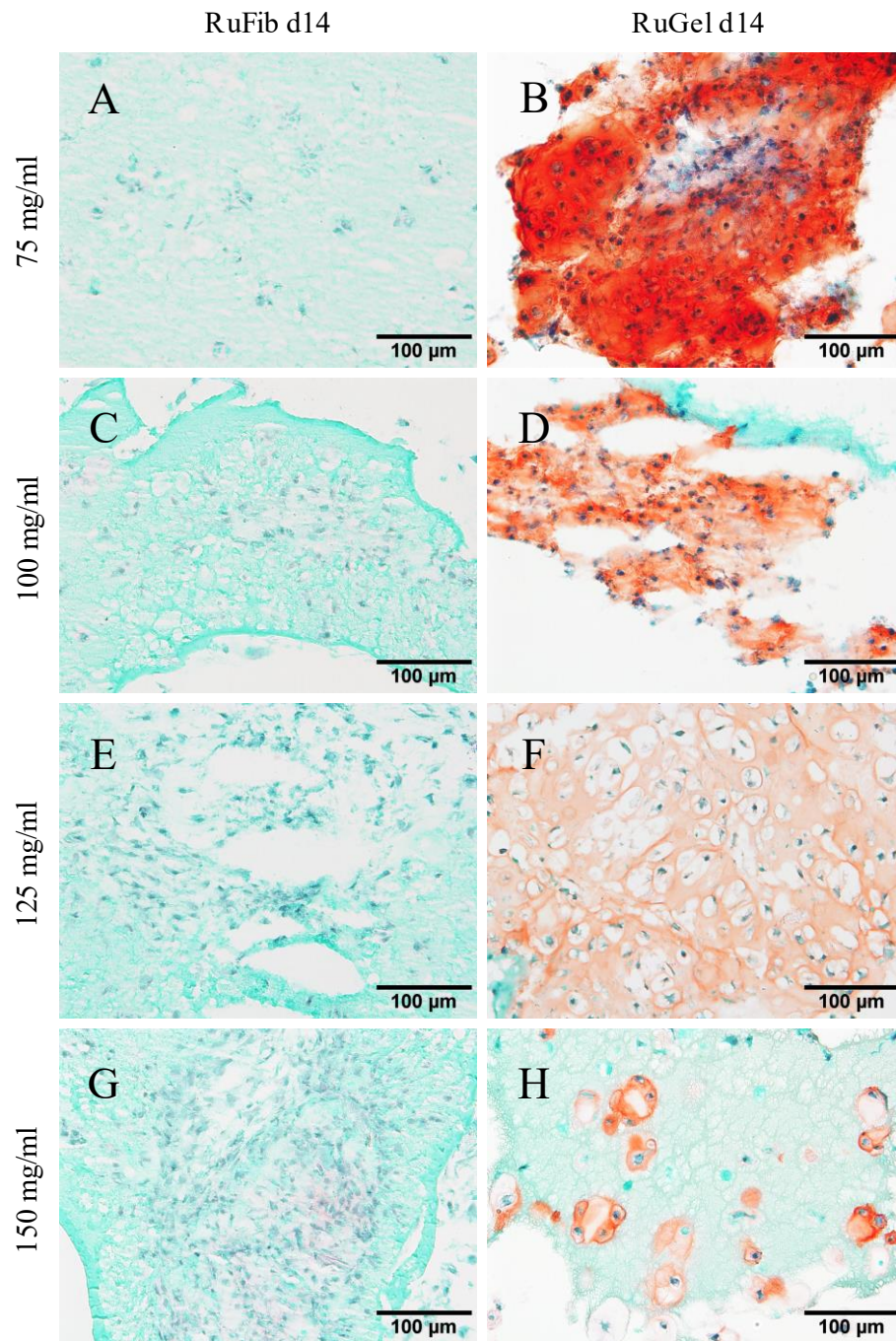


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit Safranin-O-Färbung an d14. Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/mL der Gruppen RuFib und RuGel jeweils 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml; RuFib und RuGel verhielten sich abhängig von ihrer Konzentration entgegengesetzt: RuFib zeigte mit steigender Konzentration stärkere Organisation und Matrixsynthese, RuGel zeigte mit sinkender Konzentration stärkere Organisation und Matrixsynthese.

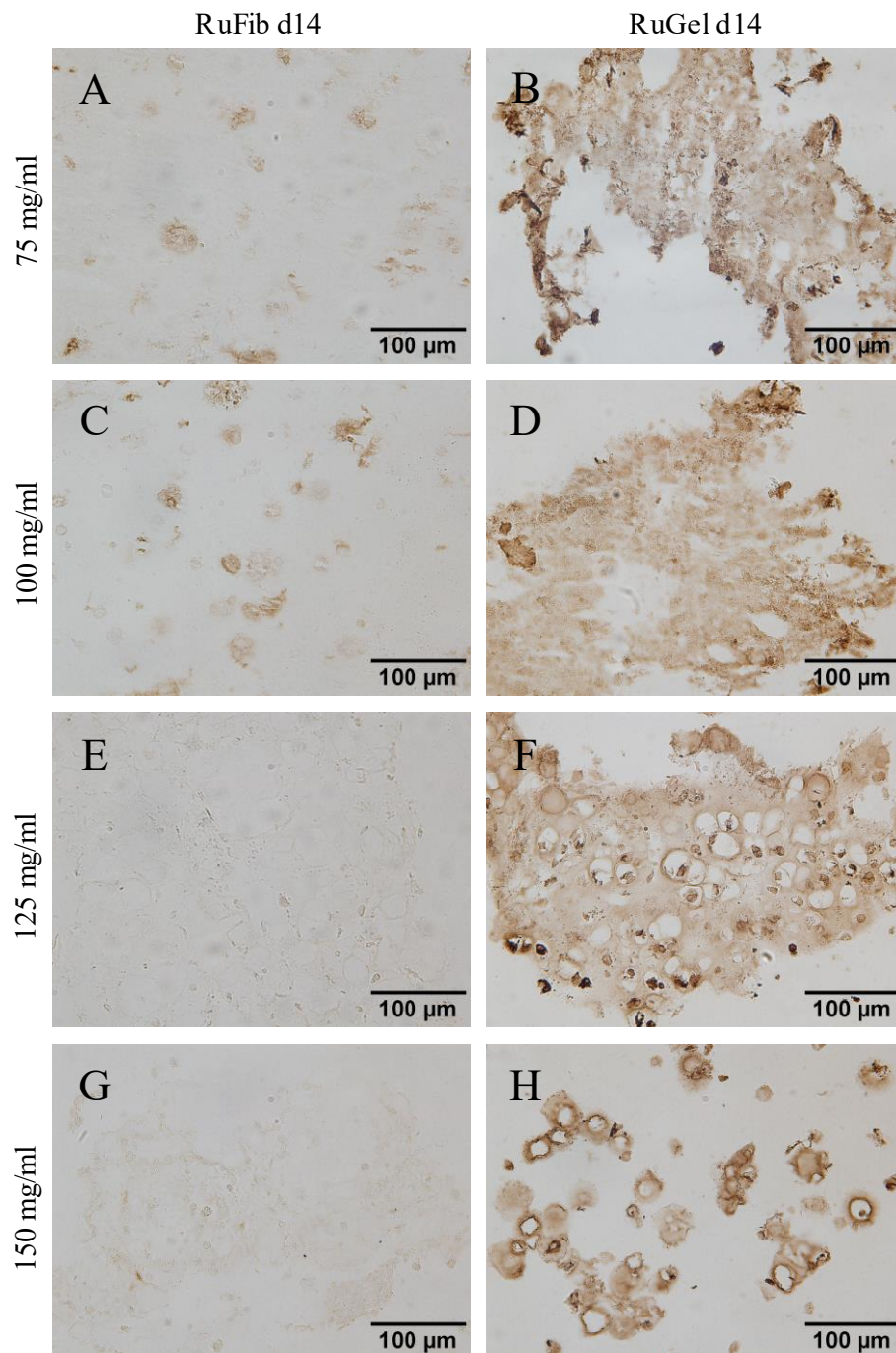


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit DAB-Färbung an d14; Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/ μL der Gruppen RuFib und RuGel jeweils 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml; RuGel zeigt in allen Konzentrationen deutlich größere Mengen an gebildetem Kollagen II als RuFib.

RuGel d14 150 mg/ml

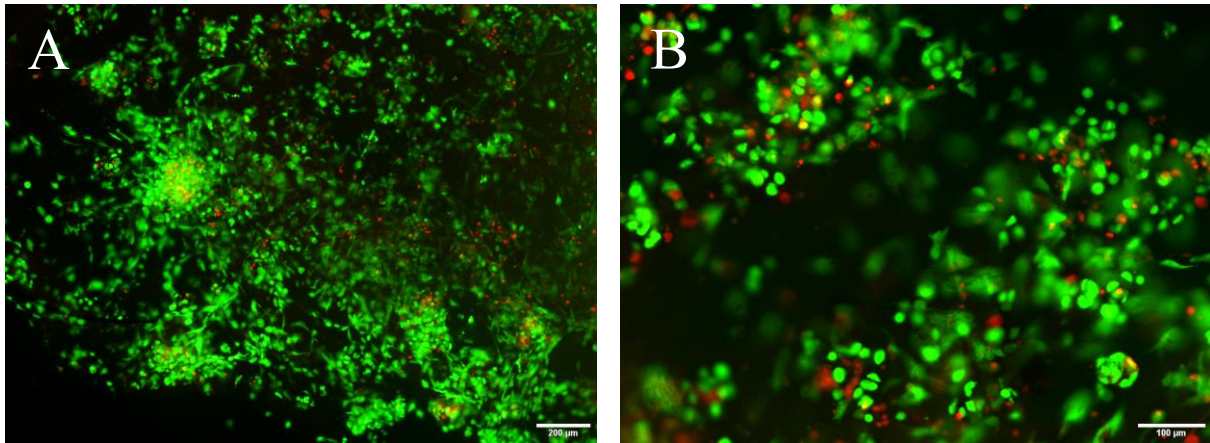


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit Live/Dead-Färbung an d14; Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/ μL der Gruppe RuGel 150 mg/ml mit überwiegend grün leuchtenden vitalen Chondrozyten; Balkengröße in A: 200 μm , in B: 100 μm .

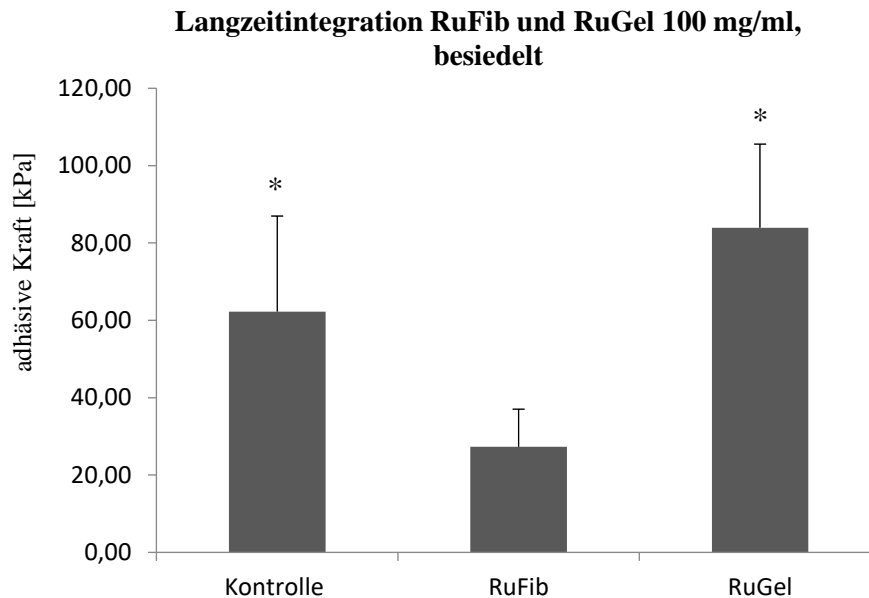
4.4 Langzeitintegration mit zellbesiedelten Klebern

Als nächster Schritt wurden die Erkenntnisse der Langzeitintegrationsversuche sowie der besiedelten Hydrogele zusammengeführt, indem die Langzeitintegration besiedelter Kleber im Push-Out-Modell untersucht werden sollte.

4.4.1 Push-Out-Versuch und Histologie: RuGel + RuFib 100 mg/ml, besiedelt (17×10^6 Zellen)

In diesem Versuch wurden Knorpelkonstrukte mit RuFib und RuGel geklebt, die mit Passage-2-Chondrozyten besiedelt waren. Die Zellkonzentration betrug 17×10^6 Zellen/ml. Ursprünglich waren 20×10^6 Zellen/ml angedacht gewesen, die isolierten Chondrozyten hatten jedoch für diese Konzentration nicht ausgereicht. Die Kleberkonzentration betrug 100 mg/ml. Ausschlaggebend für die Wahl der Kleberkonzentration waren einerseits die Ergebnisse der untersuchten besiedelten Gele. Hier ergab sich für die Konzentration 100 mg/ml ein gutes Verhältnis aus Stabilität und Zellaktivität. Außerdem ließ sich mit dieser gewählten Konzentration ein besserer Vergleich zu vorherigen Experimenten zur Langzeitintegration ohne besiedelte Zellen ziehen. Die Proben wurden 21 Tage lang kultiviert. Aufgrund des großen Aufwands und des schwierigen Handlings wurde auf Messungen an Tag 0 und Tag 7 verzichtet und alle Proben wurden 21 Tage lang kultiviert. Nach 21 Tagen wurden mechanische Messungen im Push-Out-Modell durchgeführt sowie histologische Schnitte und Safranin-O-Färbungen angefertigt.

In den mechanischen Messungen zeigten sich an Tag 21 die höchsten Integrationswerte für die Gruppe RuGel mit 83,95 kPa (Abbildung 23). Die Kontrollgruppe erzielte 62,26 kPa und die Gruppe RuFib 27,30 kPa. Der Unterschied in den Integrationswerten der Gruppe RuGel war dabei gegenüber der Versuchsgruppe RuFib, nicht jedoch gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant. Die gemessene Adhäsionskraft für RuGel war außerdem die höchste gemessene Adhäsionskraft dieser Gruppe zu irgendeinem Zeitpunkt, verglichen mit den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche.



*Abbildung 23: Push-Out-Messungen der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml, besiedelt mit 17×10^6 Zellen/ml; Kontrolle ohne Kleber und Zellen an d21; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib.*

In den Safranin-O-Färbungen zeigte sich in der Kontrolle ein geschlossener Knorpelspalt, der rosa gefärbt war (Abbildung 24, Bild A, D). Chondrozyten waren im Spalt nicht sichtbar. Dies sprach für stattfindende Matrixsynthese in den Knorpelspalt hinein von den randständigen Chondrozyten aus. Bei RuFib waren Zellen im Knorpelspalt sichtbar, die entweder dorthin migriert waren, wahrscheinlich jedoch aus dem besiedelten Gel dort verblieben waren (Abbildung 24, Bild B, E). Der Knorpelspalt war rötlich gefärbt, bei der Herstellung der Schnitte war es zu einer artifiziellen Rissbildung gekommen. Bei RuGel war der Knorpelspalt durchgehend rot gefärbt und hatte annähernd dieselbe Intensität wie das umliegende Knorpelgewebe. Chondrozyten waren im Knorpelspalt sichtbar, die vermutlich sowohl von den Randzonen dorthin migriert, als auch vom besiedelten Kleber dort verblieben waren und zur Matrixsynthese beigetragen hatten (Abbildung 24, Bild C, F).

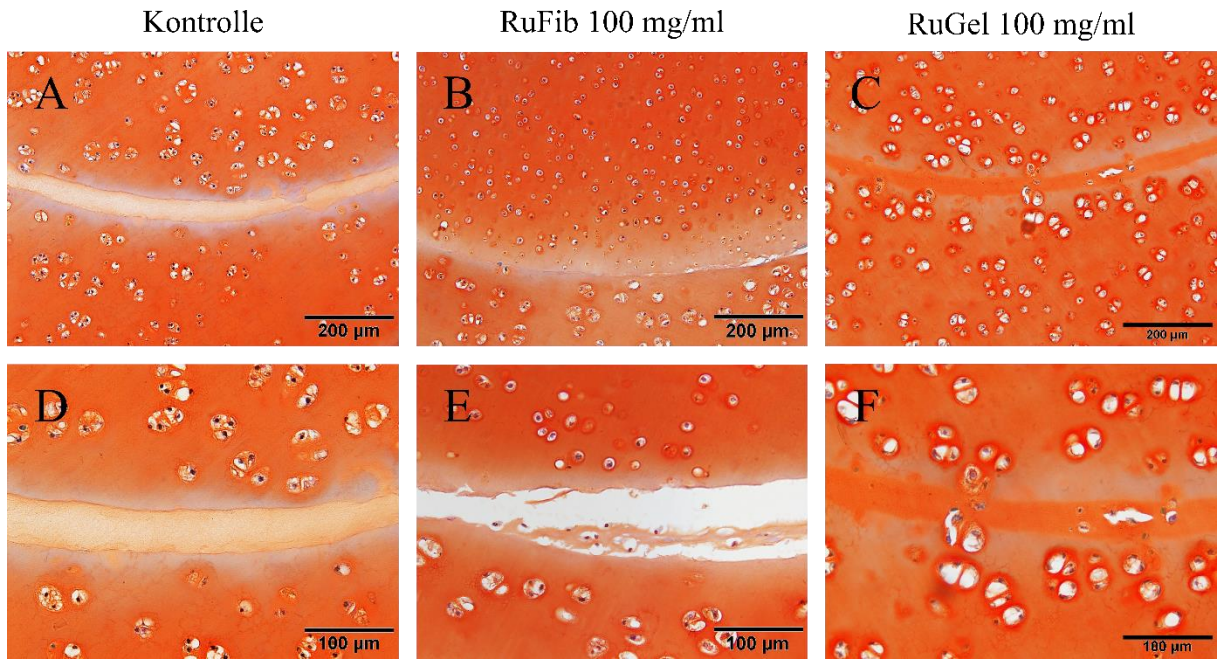


Abbildung 24: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml, besiedelt mit 17×10^6 Zellen/ml; Kontrolle ohne Kleber und Zellen an d21; Chondrozytenmigration war bei RuGel stärker als bei RuFib, in der Kontrolle gar nicht sichtbar.

5 Diskussion

Die Therapie von Knorpelschäden erweist sich als schwierig, da chirurgische Techniken wie die Mikrofrakturierung und ACI unter der Bildung von mechanisch minderwertigem Ersatzgewebe leiden, während immer ausgefeiltere zellbasierte Ansätze der regenerativen Medizin zwar große Fortschritte bezüglich der künstlichen Herstellung von gelenkknorpelähnlichem Gewebe erzielen konnten, jedoch die unzureichende laterale Integration der Konstrukte in den umliegenden Knorpel ein chronisches Problem darstellt, das es nach wie vor zu lösen gilt, da dies einen entscheidenden Faktor darstellt, der zu Transplantatkomplikationen und -versagen führt^{194,195}.

In dieser Arbeit erfolgte daher die Untersuchung zweier Gewebekleber auf Basis von Fibrinogen und Gelatine, die durch einen neuartigen lichtaktivierten Crosslink-Mechanismus vernetzt werden, hinsichtlich ihres Potenzials, diese Hindernisse in einem In-vitro-Pushout-Modell überwinden zu können. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde dafür zunächst die unmittelbare Knorpeladhäsion durch die Kleber evaluiert und der Einfluss einer enzymatischen Andauung des Gewebes auf die Adhäsionskraft untersucht. Im zweiten Abschnitt wurde der Fokus auf die mechanische und histologische Untersuchung der längerfristigen Integration über einen Zeitraum von 21 Tagen gelegt und mit verschiedenen Kleberkonzentrationen experimentiert. In einem weiteren Versuch im dritten Abschnitt erfolgte die histologische Untersuchung der Kleber als mit lebenden Zellen besiedelte Gele in unterschiedlichen Konzentrationen. Im vierten und letzten Abschnitt wurden die gewonnenen Erkenntnisse der vorhergehenden Experimente zusammengeführt und ein mit Zellen besiedelter Kleber im Push-out-Modell auf seine Fähigkeit hin, die langfristige Integration noch weiter zu steigern, mechanisch und histologisch untersucht.

5.1 Sofortadhäsion

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Gewebekleber auf ihr Potenzial hin untersucht, eine unmittelbare Knorpeladhäsion zwischen gegenüberliegenden beziehungsweise ineinanderliegenden Knorpelstücken im Push-out-in-vitro-Modell erzeugen zu können. Denn die Komplexität einer gelungenen Implantation von Regenerat- oder Transplantatknorpel besteht nicht nur in der natürlicherweise ungenügenden lateralen Integration mit dem umliegenden nativen Gewebe, sondern auch in der Schwierigkeit, eine passende Implantationsmethode zu finden, die das Gewebe sicher im Defekt verankert, aber die langfristige Integration nicht behindern und bestenfalls sogar fördern soll.

Dieses Problem wird beispielsweise bei der Implantation durch Nähte oder als „Press-fit“ deutlich. Anstatt die laterale Integration und Heilung des Gewebes zu befördern kann es bei der Verankerung des Knorpels durch chirurgische Nähte zu Arthrose-ähnlichen Veränderungen im Defekt kommen¹⁵⁴. Diverse *in vivo* und *in vitro* Studien konnten zeigen, dass die laterale Integration von Knorpel natürlicherweise nicht von alleine abläuft^{128–130,132,133}, weshalb eine Implantation als „Press-fit“ ebenfalls als unzureichend betrachtet werden muss. Fibrin hingegen, das bereits als Bioadhäsivum in verschiedenen chirurgischen Bereichen Verwendung findet und auch zur Implantation von Regeneratknorpel zum Einsatz kommt, besticht durch die Fähigkeit, die laterale Integration langfristig zu befördern, allerdings ist das unmittelbare adhäsive Potenzial eher gering und es dauert zusätzlich verhältnismäßig lange, bis dieses erreicht wird^{153,161–163}.

Die adhäsiven Kräfte der Kleber, die in dieser Arbeit untersucht wurden, lagen für RuFib in der Konzentration 150 mg/ml bei 25,63 +/- 5,60 kPa und für RuGel in derselben Konzentration bei 68,82 +/- 16,70 kPa. In unserer Arbeitsgruppe waren im Vorfeld in wiederholten Messungen auch Kontrollproben, bei denen der Knorpelkern lose in den Ring gelegt wurde, getestet worden. Die adhäsive Kraft lag dabei bei 3,45 +/- 1,73 kPa. Auch Fibrinkleber wurden im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe in demselben Pushout-Modell getestet. Dabei lag die adhäsive Kraft beim „immediate-bonding“ je nach verwendeter Fibrinkonzentration bei circa 5-10 kPa¹⁹⁶. Damit ist die unmittelbare adhäsive Bindung durch den in dieser Arbeit getesteten Kleber RuFib etwa drei bis fünfmal so stark, beim Kleber RuGel sogar mehr als sieben mal so stark wie beim gängig eingesetzten Fibrin.

Als vorteilhaft zu betrachten ist außerdem die kürzere Zeitspanne, die es zum Polymerisieren der Moleküle bei dieser lichtaktivierten Crosslink-Methode braucht. Während diese bei unseren Klebern nur bei 30 s pro Seite, also insgesamt 60 s liegt, benötigt das Polymerisieren der Fibrinmoleküle etwa 15 Minuten und erreicht erst nach etwa einer Stunde sein Maximum¹⁶³. Elvin et al.¹⁷³ konnten zeigen, dass für dasselbe RuGel-Gemisch, das in dieser Arbeit verwendet wurde, in Abhängigkeit von der Lichtquelle eine Belichtungszeit von nur 1 sek ausreichend sein kann um eine vergleichbare Bindungskraft wie nach 30 sek zu erreichen. In Bezug auf die klinische Praktikabilität wäre es natürlich wünschenswert, eine Methode zu finden, die schnell und einfach angewendet werden kann. Dabei könnte sich ein Kleber, der durch lichtaktiviertes Ruthenium vernetzt wird, als vorteilhaft erweisen.

Es zeigte sich, dass die adhäsive Kraft von RuGel signifikant höher war als die von RuFib. Die Vernetzung beider Kleber erfolgt durch die Bildung von Di-Tyrosinen. Dabei hatten Elvin et

al. gezeigt, dass die Menge an Tyrosin in nativem Fibrinogen höher ist als in unmodifizierter Gelatine. Im Fibrinogen bestehen die α -Ketten zu 0,65%, die β -Ketten zu 4,9% und die γ -Ketten zu 5,6% aus Tyrosin¹⁹⁷, während der Anteil der Tyrosine in Gelatine nur bei 0,9% liegt¹⁷³. Allerdings konnte in den Arbeiten von Elvin et al. auch gezeigt werden, dass im Fibrinogen nur 5% aller Tyrosine zu Di-Tyrosinen vernetzt werden¹⁹⁷, wohingegen der Anteil bei der Gelatine mit 11,5% deutlich höher liegt¹⁷³. Das liegt vermutlich an der unterschiedlichen molekularen Struktur der Materialien. Während Fibrinogenketten hochorganisiert sind und dadurch weniger molekulare Verbindungen eingehen können, sind die Peptidketten der Gelatine ziemlich ungeordnet und erlauben mehr flexible Interaktionen, weshalb der Anteil der Tyrosin-Vernetzungen höher ausfällt als beim Fibrinogen¹⁸¹. Dennoch lässt sich dadurch nicht ableiten, warum die Gelatine-Lösung höhere Bindungskräfte erzielte als die Fibrinogen-Lösung, da die Menge an Di-Tyrosinen im Fibrinogen trotzdem insgesamt höher liegen müsste. Möglicherweise ist der Grund zusätzlich in einer unterschiedlich ausgeprägten Bildung von Di-Tyrosinen zwischen den Klebern und den Kollagenen des Knorpels, zu dem die eigentliche Bindung hergestellt wird, zu suchen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss eines enzymatischen Andaus auf die Adhäsionskraft untersucht. Durch diverse Experimente konnte belegt werden, dass enzymatischer Andau die langfristige Knorpel-Knorpel-Integration durch vermehrte Zellmigration und -Aktivität befördert¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Allerdings ist dies nicht gleichzusetzen mit einer erhöhten sofortigen Adhäsionskraft, welche in dieser Arbeit untersucht wurde. Englert et al.²⁰¹ hatten ebenfalls den Einfluss eines enzymatischen Andaus mit Trypsin, Pepsin und Guanidin auf das „immediate bonding“ von bovinen Knorpelscheiben, die mit vier verschiedenen Crosslinkern (Glutaraldehyd, Genipin, Transglutaminase, 1-Ethyl-3-Diaminopropyl-Carbodiimid (EDC)/N-Hydroxysuccinimid (NHS)) zusammengeklebt wurden, in einem Zugversuch untersucht. Dabei resultierten im Mittel höhere Adhäsionswerte nach enzymatischem Andau der Knorpelflächen.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich die Werte für die Sofortadhäsion des vorhergehenden Versuchs reproduzieren mit einer erneut signifikant höheren adhäsiven Bindung in der Gruppe RuGel gegenüber RuFib. In den Versuchsgruppen, die einem enzymatischen Andau durch Trypsin und Pepsin unterzogen wurden, zeigte sich jedoch, dass dieser die Sofortadhäsion in den meisten Fällen nicht verstärkte, sondern abschwächte. Nur in der Gruppe RuFib kam es nach Andau durch Trypsin zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg in der Adhäsion verglichen mit der Kontrollgruppe. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass ein enzymatischer Andau der Kontaktfläche des Knorpels keine Erhöhung der adhäsiven Bindungskapazität zur Folge hatte.

Grund dafür könnte die Zerstörung des Kollagennetzwerkes mit konsekutiver Verringerung der Di-Tyrosinbindungen sein. Im Hinblick auf die benötigte Sofortadhäsion eines Knorpelklebers ist ein enzymatischer Andau für die Implantation von Knorpel durch diese Gebewekleber, insbesondere für die besser adhätierende Gelatine, also nicht von Vorteil. Andererseits könnte eventuell durch den Andau eine langfristige Integrationssteigerung erzielt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert werden konnte. Hier wäre gegebenenfalls abzuwägen, ob eine geringere Sofortadhäsion zugunsten einer besseren langfristigen Adhäsion zu rechtfertigen wäre, oder welches Maß an Sofortadhäsion für die sichere Implantation eines Knorpelstücks nötig wäre.

5.2 Langzeitintegration

Nachdem das adhäsive Potenzial der Gewebekleber bewiesen worden war, wurde im nächsten Schritt der Fokus auf die langfristige Integration gelegt, denn nur durch eine langfristig stattfindende Knorpel-Knorpelintegration kann die Heilung von Knorpeldefekten erzielt werden. Ein Gewebekleber, der das Gewebe dabei stabilisieren und den Heilungsprozess unterstützen soll, muss deshalb neben einer guten unmittelbaren Klebekraft weitere besondere Eigenschaften wie eine geringe Zytotoxizität und hohe Biokompatibilität mitbringen. Beispielsweise wurden in dieser Arbeitsgruppe auch andere Gewebekleber auf ihr Potenzial hin untersucht, Knorpel zu verbinden. BioGlue®, ein Zwei-Komponenten-Kleber bestehend aus Glutaraldehyd und BSA (bovines Serumalbumin) erzielte im Pushout-Test mittlere Maximalkräfte von 239,21 kPa (10% Glutaraldehyd, Verhältnis 1:1) für die Direktbindung²⁰². BioGlue® bietet damit zwar exzellente adhäsive Eigenschaften, jedoch wurde mittels MTT-Analyse auch festgestellt, dass es aufgrund zytotoxischer Eigenschaften des Klebers zu massivem Zelluntergang im angrenzenden Knorpelgewebe kam²⁰². Neben der toxischen Wirkung sind auch andere Nachteile von BioGlue® bekannt wie das Hervorrufen allergischer Reaktionen, die Übertragung von Krankheiten und das Auslösen inflammatorischer Prozesse bis hin zu Wundheilungsstörungen^{170,203}. Eine langfristige Integration wird somit unmöglich. Um die Integrationsfähigkeit eines Bioadhäsivums beurteilen zu können reichen alleinige mechanische Messungen daher nicht aus. Zusätzlich muss die Zytotoxizität mittels geeigneter Assays beurteilt werden und eine histologische Begutachtung der Defektzone über einen längeren Zeitraum ergänzend zu den mechanischen Ergebnissen erfolgen. Diese Punkte wurden in den Versuchen schrittweise abgearbeitet.

In einem ersten Versuch zur Beurteilung der Langzeitintegration wurde die Konzentration von Fibrinogen und Gelatine mit 150 mg/ml beibehalten. Die geklebten Knorpelkonstrukte wurden 21 Tage lang kultiviert. Jeweils an Tag 7 und an Tag 21 wurden mechanische Messungen im Pushout-Modell durchgeführt. Zusätzlich erfolgten MTT-Färbungen zur makroskopischen und mikroskopischen Beurteilung der Viabilität der Chondrozyten. Auf mechanische Messungen an Tag 0 wurde dabei verzichtet, da die Ergebnisse in den vorhergehenden Versuchen reproduzierbar waren und daher zur vergleichenden Analyse hier mit einfließen können.

Die mechanischen Messungen ergaben für die Versuchsgruppen einen U-förmigen Verlauf der adhäsiven beziehungsweise integrativen Kraft. Verglichen mit den Tag-0-Werten aus den vorherigen Versuchen sank die Adhäsion zunächst in beiden Gruppen ab, bei RuFib nur leicht von ca 25 kPa auf 21,31 +/- 10,39 kPa, bei RuGel deutlicher von 65-70 kPa auf 26,39 +/- 20,00 kPa. Die Werte lassen sich wohlgerne nicht in direkte Relation setzen, da die Messungen für Tag 0 wie gesagt den vorherigen Versuchen entstammen. Deshalb können hier auch keine statistisch harten Vergleiche gezogen werden. Dennoch ließ sich ein Trend ablesen, der zunächst vermuten ließ, dass die Adhäsion an Tag 21 weiter nachlassen würde. Interessanterweise war dies jedoch nicht der Fall, denn in denselben Versuchsgruppen stiegen die an Tag 21 gemessenen Integrationskräfte wieder an, auf 38,69 +/- 18,21 kPa in der Gruppe RuFib und auf 60,10 +/- 35,73 kPa in der Gruppe RuGel und erreichten damit nach drei Wochen in etwa das Ausgangsniveau, auf dem sie gestartet waren.

Problematisch an diesem Versuchsaufbau, wie auch an anderen Versuchen in dieser Arbeit ist die Tatsache, dass es sich mit etwa 10 Proben um relativ kleine Gruppengrößen handelte,

weshalb die Standardabweichungen dementsprechend groß ausfielen und beobachtete Unterschiede statistisch nicht signifikant ausfallen. Bei der beobachteten U-förmigen Verlaufskurve handelt es sich daher nur um einen beobachteten Trend, der statistisch nicht zu erhärten ist. Dafür wären weitere Versuche mit gegebenenfalls größeren Versuchsgruppen nötig.

Dennoch lässt sich über die Gründe für einen derartigen Verlauf der Bindungskräfte spekulieren. Der anfängliche Abfall der mechanischen Kräfte könnte in einem Nachlassen der adhäsiven Kraft des Klebers begründet sein, durch biologische Degradation etwa oder im Falle der Gelatine auch eine einsetzende Quellung¹⁷³, die den Kleber elastischer und lockerer, aber weniger mechanisch belastbar macht. Parallel dazu könnte die Knorpelintegration im Spalt mit Matrixsynthese und Zellmigration starten und mit zeitlicher Verzögerung zu einem Anstieg der Integration führen. Abfall der Adhäsion und Anstieg der Integration wären demnach zwei entgegengesetzt laufende Kurven, die bei Überlappung in einer U-förmigen Verlaufskurve, wie sie hier beobachtet wurde, resultieren könnten.

Die Tatsache, dass die Gruppe RuGel nicht nur höhere Werte in der Sofortadhäsion erzielte, sondern auch bessere Integrationswerte als die Gruppe RuFib lieferte, könnte ebenfalls durch dieses Modell erklärt werden. Die hohe Elastizität und gegebenenfalls höhere Degradation des Gelatineklebers könnte die Zellmigration und Matrixsynthese in den Knorpelspalt hinein erleichtern, was in einer konsekutiven stärkeren Integration resultieren würde. Die Integrationswerte nach 21 Tagen fielen in dieser Gruppe ähnlich hoch aus wie für Fibrinkleber, der von unserer Arbeitsgruppe im selben Pushout-Modell getestet worden war, jedoch mit dem klaren Unterschied, dass die Sofortadhäsion von RuGel mehr als sieben mal stärker ausfiel als die des Fibrinklebers.

Allerdings muss auch der Verlauf der Werte aus der Kontrollgruppe beachtet werden. Mehrfach validierte Messungen unserer Arbeitsgruppe hatten im Vorfeld dieser Arbeit ergeben, dass bei nativem Knorpel, der lose in den Defekt gesetzt wird, an Tag 0 keine wesentliche Kraft im Pushout-Modell gemessen werden kann, um den Knorpelkern aus dem Ring zu drücken. Interessanterweise zeigte sich in diesem Versuch nach 7 Tagen eine maßgebliche Integrationskraft von 37,21 +/- 19,47 kPa in der Kontrollgruppe, die nach 21 Tagen 88, +/- 35,48 kPa erreichte und damit sogar über der der Versuchsgruppe RuGel lag.

Die Knorpelkonstrukte wurden keinem enzymatischen Andau unterzogen und dem Kulturmedium wurden keine Wachstumsfaktoren hinzugefügt, die die Integration beschleunigen könnten. Wieso also fiel die integrative Kraft in der Kontrollgruppe so hoch aus? Eine Erklärung für die hohe integrative Kraft könnte das junge Alter der Ferkel, denen der Knorpel entstammte, sein. Wie einige Autoren feststellten, spielt das Alter der Knorpelspender eine maßgebliche Rolle bei der Knorpelintegration^{140,198}. DiMicco et al.¹⁴⁰ konnten zeigen, dass die integrative Kraft aneinander liegender boviner Knorpelstücke in einem Zugversuch bei ein bis zwei Wochen alten Kälbern höher ausfiel als bei erwachsenen Kühen und auch als bei Feten. Ursachen könnten dabei in einem unterschiedlichen Level an Kollagensynthese einerseits, aber auch in einer unterschiedlich guten Vernetzung der Kollagenfibrillen liegen. Die Spanferkel, denen der Knorpel für diese Arbeit entstammte, waren zum Zeitpunkt der Schlachtung zwischen 8 und 12 Wochen alt. Möglicherweise hängt die gute mechanische Integration der Kontrollgruppe damit zusammen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die in den Versuchsgruppen ermittelten

Integrationskräfte durch Stimulierung der Chondrozyten durch die Gewebekleber maßgeblich beeinflusst wurden, oder lediglich als das Resultat einer von alleine ablaufenden Integration wie in der Kontrollgruppe zu werten sind. Hier sei einerseits auf die ähnlichen in diesem Pushout-Modell ermittelten Werte für die Integrationskraft von Fibrinkleber im selben Zeitraum verwiesen, dessen förderlicher Einfluss auf die Chondrozytenmigration bereits beschrieben wurde¹⁶¹, und der klinisch schon Verwendung als Knorpelkleber findet¹⁵³. Zudem sollte bedacht werden, dass in den Versuchsgruppen, in denen die Knorpelkerne in den Ring geklebt wurden, der Kleber diese Knorpelflächen verbindet und damit einen direkten Kontakt der Knorpelflächen, wie es in der Kontrollgruppe der Fall ist, verhindert. Dass es dennoch zu einer guten Integration zwischen Knorpelkern und -ring gekommen ist, lässt vermuten, dass die Gewebekleber, insbesondere RuGel einen stimulierenden Einfluss auf das angrenzende Knorpelgewebe haben.

Um diese Überlegung einer Prüfung zu unterziehen wurden im nächsten Versuch histologische Schnitte der Versuchsproben angefertigt zur Untersuchung der Verhältnisse im Knorpelspalt.

Dass die Kleber zumindest keinen wesentlichen zytotoxischen Einfluss auf die Chondrozyten haben, zeigte sich mithilfe der MTT-Analyse der Knorpelkonstrukte vor mechanischer Messung an Tag 7 und 21.

An Tag 7 wurden die Knorpelkonstrukte gefärbt und nach mechanischer Messung histologische Schnitte angefertigt und mikroskopisch begutachtet. Die Knorpelringe zeigten schwarzgefärbte Chondrozyten über die gesamte Fläche verteilt, auch zum inneren Randbereich hin, wo das Gewebe direkten Kontakt mit dem Kleber hatte. In der makroskopischen Begutachtung der gefärbten Konstrukte an Tag 21 vor mechanischer Messung zeigten sich ebenfalls schwarz gefärbte Knorpelkonstrukte ohne farblichen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Im Gegensatz dazu konnte bei MTT-Färbungen von Knorpelkonstrukten unserer Arbeitsgruppe, die mit BioGlue® bestrichen worden waren, eine deutliche und konzentrationsabhängig abnehmende Färbung der Konstrukte beobachtet werden, was auf eine wesentliche Zytotoxizität dieses Klebergemischs hindeutet²⁰².

Im Hinblick auf die Möglichkeit, den Kleber später als Gele mit lebenden Zellen zu besiedeln, könnte eine niedrigere Konzentration förderlich für die Zellmobilität und -Aktivität in derartigen Gelen sein. Im Folgeversuch wurde daher der Versuchsaufbau grundlegend beibehalten, jedoch die Kleberkonzentration abgeändert mit Fibrinogen und Gelatine jeweils in der Konzentration 100 mg/ml anstatt 150 mg/ml. Es sollte nun zunächst überprüft werden, wie sich die verringerte Konzentration auf die unmittelbare Adhäsion und längerfristige Integration im Pushout-Modell auswirken.

Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass die Sofortadhäsion an Tag 0 in der Konzentration 100 mg/ml in beiden Gruppen in derselben Größenordnung lag wie bei den vorherigen Versuchen in der Konzentration 150 mg/ml. In der Gruppe RuGel war sie sogar etwas höher. Offensichtlich führt eine Konzentrationssteigerung der Kleberbestandteile nicht automatisch zu einer linearen Verstärkung der Sofortbindung. An Tag 21 fielen die Integrationskräfte der Gruppe RuFib sowie der Kontrolle ebenfalls wieder in ähnliche Bereiche wie in der Konzentration 150 mg/ml, mit einer linearen Steigerung der Bindungskraft in der Kontrolle und einem U-förmigen Verlauf in der Versuchsgruppe RuFib. In der Gruppe RuGel sank die Integrationskraft an Tag 7 ebenfalls wie gewohnt ab, stieg dann an Tag 21 zwar wieder an, aber

erreichte nicht das Ausgangsniveau von Tag 0, sondern mit $33,53 \pm 9,87$ kPa nur etwa die Hälfte der Kraft verglichen mit Tag 0 und mit Tag 21 in der Konzentration 150 mg/ml.

Über die Gründe dafür lässt sich spekulieren. Es ist möglich, dass die veränderte Konzentration der Gelatine im Kleber zu 100 mg/ml zu einer schlechteren Stimulation der Chondrozyten und Matrixsynthese durch diese geführt hat als in der Konzentration 150 mg/ml. Andererseits zeigten sich alle anderen Werte, d.h. die Sofortadhäsion an Tag 0 sowie die Werte in der anderen Versuchsgruppe RuFib als sehr ähnlich zu den Ergebnissen des vorhergehenden Versuches, was ein gänzlich anderes Verhalten des Gewebeklebers in dieser Konzentration eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Auch in diesem Versuch muss zudem auf die geringe Gruppengröße hingewiesen werden, die unweigerlich zu größeren Schwankungen in den gemessenen Mittelwerten zwischen den einzelnen Versuchen führt und sich in einer niedrigeren gemessenen Integrationskraft ausdrücken kann. Dementsprechend ist der Unterschied innerhalb der Gruppe RuGel zwischen Tag 0 und Tag 7 auch statistisch signifikant, der Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 21 jedoch nicht. Auch hier wäre eine zukünftige statistische Erhärtung der Beobachtungen erstrebenswert. Womöglich kam es zu einer Kombination beider Effekte, die dazu geführt haben, dass die an Tag 21 gemessenen Integrationskräfte geringer ausfielen. Der Trend, dass die Integrationskraft auf lange Sicht nach einem ersten Abfall wieder ansteigt, ist auch in der Konzentration 100 mg/ml dennoch sichtbar.

Die mechanisch gemessenen Adhäsions-/Integrationskräfte sollen ausdrücken, wie gut die unmittelbare Klebewirkung eines Bioadhäsivums ist, und wie gut diese zu einer langfristigen und stabilen Integration und Gewebereparatur führen. Dabei lässt sich allerdings nicht beobachten, welche Prozesse im Knorpel stattfinden und einen Einfluss haben. Zusätzlich zu einer mechanischen Objektivierung ist daher eine bildliche Darstellung der Integration über denselben Zeitraum nötig. Mithilfe der MTT-Färbung wurde bereits die Viabilität der Chondrozyten nach Exposition gegenüber den Klebern über einen langen Zeitraum validiert. In diesem Versuch wurden außerdem Knorpelkonstrukte aller Versuchsgruppen an Tag 21 histologisch in Safranin-O- und DAB-Färbungen untersucht.

Die Färbungen mit Safranin-O auf Glykosaminoglykane (GAG) zeigten dabei die besten histologischen Ergebnisse für die Gruppe RuGel. In der Kontrolle zeigte sich der Knorpelspalt zwar homogen rotgefärbt, was für stattfindende Matrixsynthese spricht und anscheinend für die guten mechanischen Integrationsergebnisse ausreichte, jedoch zeigten sich hier keine migrierenden Chondrozyten in den Knorpelspalt hinein. In der Gruppe RuFib erschien die Rotfärbung des Knorpelspalts eher dezenter, was vereinbar ist mit den eher moderaten Ergebnissen in der Mechanik. Allerdings zeigten sich hier im Gegensatz zur Kontrollgruppe Zellen im Knorpelspalt, die offensichtlich dorthin migrierten. Die Gruppe RuGel lieferte die besten histologischen Ergebnisse. Hier zeigte sich eine kräftige Färbung des Knorpelspalts von beinahe gleicher Intensität wie der umliegende Knorpel, was auf laufende Matrixsynthese in den Knorpelspalt hinein hinweist. Außerdem waren hier deutlich Chondrozyten zu beobachten, die in den Knorpelspalt hinein migrierten und offensichtlich zur Defektreparatur beitrugen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass die Defektüberbrückung in der Kontrollgruppe und in den Versuchsgruppen unterschiedlich abläuft und der Einsatz der Gewebekleber zu einer nachhaltigeren Knorpelintegration führen könnte.

Der hypointense Randsaum wurde am ehesten durch das mechanische Schneidetrauma beim

Stenzen der Konstrukte verursacht. Eine hypozelluläre Zone als Folge eines mechanischen Traumas wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben und untersucht^{151,204}. Die Tatsache, dass dieser Saum ebenfalls in der Kontrollgruppe sichtbar war, legt diesen Mechanismus nahe und macht eine zytotoxische Ursache der Kleberkomponenten unwahrscheinlich, zumal in den MTT-Analysen ein solcher ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte.

McGregor et al.¹⁵¹ konnten außerdem zeigen, dass diese Zone durch Kollagenase-Behandlung und den Einsatz chemotaktischer Agenzien mit Chondrozyten repopuliert werden konnte. In dieser Arbeit konnte anhand der histologischen Ergebnisse gezeigt werden, dass dies auch mithilfe des Einsatzes eines Gewebeklebers möglich ist, ohne den Knorpel einer Behandlung mit Enzymen oder chemotaktischen Agenzien auszusetzen. Im Hinblick auf die klinische Praktikabilität wäre der alleinige Einsatz eines unkompliziert anzuwendenden Gewebeklebers natürlich wünschenswert.

Zusätzliche immunhistochemische Färbungen der Versuchsgruppen RuFib und RuGel an Tag 21 auf Kollagen Typ I und II ergaben unterschiedlich stark ausgeprägte Kollagendeposition in den Knorpelspalt hinein. Dabei wurde praktisch keine Synthese von Kollagen Typ I nachgewiesen, das besonders in Faserknorpel und anderen Geweben vorkommt und für eine starke Dedifferenzierung der Chondrozyten hin zu einem fibroblastischen Typ gesprochen hätte¹⁰⁷. Dies scheint hier nicht der Fall gewesen zu sein. Die Synthese von Kollagen Typ II, das besonders in hyalinem Gelenkknorpel vorkommt, zeigte sich in der Gruppe RuGel besonders deutlich mit einer sogar stärkeren Anfärbung als im umliegenden Knorpelgewebe, war jedoch auch in der Gruppe RuFib in geringerer Intensität nachweisbar.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Safranin-O-Färbungen, in denen die Proteoglykane der Matrix nachgewiesen wurden. Beide Färbungen sprechen für eine bessere Matrixsynthese in der Gruppe RuGel als RuFib. Die Überlegenheit des Gelatineklebers, die sich in den mechanischen Messungen abzeichnete, konnte in den histologischen Untersuchungen weiter verdeutlicht werden.

Um die Verhältnisse im geklebten Knorpelspalt in einer höheren zeitlichen Auflösung vergleichend zu untersuchen wurde in einem weiteren Versuch der Fokus auf die rein histologische Objektivierung der schrittweise ablaufenden Knorpelintegration in den Konstrukten über einen Zeitraum von 21 Tagen gelegt. In dieser Kinetik-Reihe wurden histologische Aufnahmen in Safranin-O-Färbung von Tag 0, 3, 7, 10, 14 und 21 gemacht. Anhand dieser Aufnahmen konnte der schrittweise Ablauf der Integration in den beiden Versuchsgruppen RuFib und RuGel besser verdeutlicht werden.

Im Wesentlichen scheint der Integrationsprozess bei beiden Gruppen ähnlich, jedoch in der Gruppe RuGel deutlich schneller abzulaufen. Nachdem die Knorpelflächen durch die im Knorpelspalt jeweils grün angefärbten Kleber RuFib und RuGel unmittelbar gebunden wurden, kam es erst zur fortschreitenden Matrixsynthese in die Kleber, und dann zur Einwanderung von Chondrozyten in den Defekt hinein. Diese teils nacheinander, teils nebeneinander ablaufenden Prozessen schienen zum Umbau der Kleber in ein Ersatzgewebe zu führen, das die Knorpelflächen innerhalb weniger Wochen histologisch verband. Dabei erfolgte dieser Prozess in der Gruppe RuGel schneller und vollständiger als in der Gruppe RuFib. Matrixsynthese in den Defekt hinein war hier bereits ab Tag 3, Zellmigration bereits ab Tag 7 sichtbar. Diese Prozesse waren in der Gruppe RuFib jeweils erst einen Messzeitpunkt später sichtbar. Die

Integration an Tag 21 war bei RuGel weiter vorangeschritten mit einer deutlicheren Matrixanfärbung im Defekt und mehr eingewanderten Zellen.

Was in diesem Versuch außerdem gut sichtbar wurde, war die Entwicklung der durch das Schneidetrauma verursachten hypozellulären Randzone, ähnlich wie sie bereits von McGregor¹⁵¹ beschrieben wurde. An Tag 0 war diese kaum sichtbar, da das Trauma noch sehr frisch war. Daraufhin kam es durch Apoptose und Nekrose zur Bildung und Ausdehnung einer hypointensen und hypozellulären Randzone, die etwa an Tag 7 ihren Höhepunkt erreichte. Anschließend kam es bis zu Tag 21 zu einer zunehmenden Repopulation der Zone durch migrierende Chondrozyten.

In Zusammenschau der mechanischen und histologischen Ergebnisse zur Langzeitintegration lässt sich feststellen, dass die Gewebekleber RuFib und RuGel neben der Sofortadhäsion auch Potenzial zur Förderung der Langzeitintegration von Knorpel besitzen, welches durch mechanische und histologische Untersuchungen objektiviert werden konnte. Dabei zeigten sich sowohl Unterschiede zwischen den beiden Klebergruppen, in denen sich der Kleber RuGel als dem Kleber RuFib überlegen erwies, als auch gewisse konzentrationsabhängige Unterschiede. In den mechanischen Messungen zeigte sich dabei in der höheren Kleberkonzentration von 150 mg/ml ein U-förmiger Verlauf mit einer zunächst guten Sofortadhäsion, gefolgt von einem zwischenzeitlichen Abfall der Adhäsionsstärke, woraufhin durch erfolgreiche Integration der Knorpelflächen nach 21 Tagen wieder in etwa dieselben Bindungsstärken wie an Tag 0 erreicht werden konnten. In den histologischen Auswertungen konnte der Integrationsablauf weiter objektiviert werden. Das im Defektmodell durch Umbau der Gewebekleber gebildete Ersatzgewebe zeigte gelenkknorpeltypische Bestandteile wie eine hohe Konzentration von Glykoproteinen und Kollagen II sowie lebende Chondrozyten.

5.3 Besiedelte Gele

Fibrinogen und Gelatine sind natürliche Biomaterialien und besitzen deshalb ein hohes Maß an Biokompatibilität, Abbaubarkeit und weitere inhärente biologische Eigenschaften wie zahlreiche Liganden, die eine Zelladhäsion ermöglichen, beispielsweise die integrinbindende RGD-Sequenz, bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure^{205,206}. Die MTT-Analysen sowie die histologischen Ergebnisse der Integrationsversuche mit den geklebten Knorpelkonstrukten ließen vermuten, dass die getesteten Gewebekleber nicht nur keinen toxischen Einfluss auf das umliegende Knorpelgewebe ausübten, sondern die Chondrozytenmigration und Matrixsynthese sogar befördern könnten. Um diese Beobachtung zu erhärten wurden im folgenden Versuch die Kleber mit Chondrozyten besiedelt und zu Gelen ohne Knorpelkonstrukte vernetzt. Durch die Inkorporation lebender Zellen in die Kleber als Gele ohne umliegendes Gewebe sollte der direkte Einfluss der Kleber auf die Chondrozyten in zwei Konzentrationsreihen vergleichend über einen Zeitraum von 14 Tagen objektiviert werden. Ziel war es, einen zytotoxischen Einfluss weiter auszuschließen und eine etwaige Chondrozytenstimulierung durch die Kleber zu evaluieren.

Bereits makroskopisch zeigten sich dabei bereits Unterschiede sowohl zwischen den Klebern RuFib und RuGel als auch zwischen den einzelnen Konzentrationen innerhalb der Gelgruppe. Die RuFib-Gele zeigten mit höheren Konzentrationen eine zunehmende makroskopische Deformierung; in der niedrigsten Konzentration von 75 mg/ml hatten die Gele ihre Form nach zwei Wochen weitgehend beibehalten, während die Gele in der höchsten Konzentration von 150 mg/ml deutlich verformt waren.

In der Gruppe RuGel waren die Gele noch weniger formstabil, jedoch zeigte sich hier ein umgekehrter Zusammenhang mit einer zunehmenden Deformierung und Schrumpfen, je niedriger die Gelkonzentration war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Gele einer unterschiedlich starken Degradation durch die Zellen unterlagen, mit der höchsten Degradation in der Gruppe RuGel in der Konzentration 75 mg/ml. Das Schrumpfen des Gels war hier so stark, dass dieses drohte sich aufzulösen, weshalb die Gewinnung der histologischen Proben bereits nach 14 Tagen anstatt wie ursprünglich geplant nach 21 Tagen erfolgte.

Die histologischen Schnitte wurden mit Safranin-O-Färbung auf GAG und immunhistochemisch auf Kollagen II mit DAB-Substrat angefärbt. Dabei wurden die Unterschiede sowohl zwischen den Klebern als auch zwischen den Kleberkonzentrationen noch deutlicher. Die Gruppe RuFib erwies sich in der niedrigsten Konzentration von 75 mg/ml zwar als das formstabilste mit einer homogenen Verteilung der Zellen, jedoch zeigte sich die Zellaktivität ohne wesentliche Matrixproduktion als sehr gering. Zu höheren Gelkonzentrationen hin nahm die Zellmobilität zu, mit Anordnung der Chondrozyten in Zellclustern, die sich makroskopisch in einer Deformierung der Gele zeigte. Histologisch war durch Anfärbung mit Safranin-O und DAB-Substrat jedoch in allen RuFib-Gelen in etwa gleich wenig Matrixproduktion nachweisbar.

Verglichen mit den RuFib-Gelen zeigten die RuGel-Gele hingegen eine deutliche konzentrationsabhängige Zellorganisation und -aktivität. Die Produktion von Matrix wurde umso deutlicher, je geringer die Gelkonzentration war, mit extrem verdichteten und stark angefärbten Gelen in der niedrigsten Konzentration 75 mg/ml. Das beste Verhältnis aus

Gelstabilität und Zellaktivität wurde hier in der Konzentration 125 mg/ml erreicht.

Die DAB-Färbungen zeigten in den RuGel-Gelen äquivalent zu den Integrationsversuchen eine Anreicherung von Kollagen II, was auf die Bildung knorpeltypischer Bestandteile hinweist. In einer Live/Dead-Färbung, die exemplarisch in der Gruppe RuGel 150 mg/ml erfolgte, zeigten sich die im Gel inkorporierten Zellen vital mit Bildung von Zellclustern. Eine Zytotoxizität der Gelbestandteile auf die Zellen konnte hier weiter ausgeschlossen werden.

Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Gele in verschiedenen Konzentrationen sind vermutlich vielfältig und komplex und können daher hier nur angerissen werden. Eine Erklärung für die höhere Zellorganisation in den RuFib-Gelen in höherer Konzentration könnte sein, dass Zellproliferation und -aktivität von der Zelldichte und Nährstoffverfügbarkeit abhängen ²⁰⁷. Durch die höhere Konzentration an Fibrinogen stünde mehr Material zur Verfügung, das die Zellen verarbeiten könnten, deshalb stiege mit höherer Konzentration auch die Zellaktivität, was sich in einem verstärkten Ab- und Umbau des Geles äußerte. Bei den RuGel-Gelen hingegen zeigte sich dieser Zusammenhang nicht. Nichol ¹⁶⁶ machte die Beobachtung, dass in mit Chondrozyten besiedelten GelMA-Gelen (Gelatine mit Methacryloylsubstitution) höhere Gelkonzentrationen zu einer höheren Steifheit der Gele führte, aber die Zellviabilität und Zellelongation sowie -migration umgekehrt abhängig von der Zelldichte waren, also mit höherer Konzentration sanken. Andere Autoren machten die Beobachtung, dass die Porengröße in GelMA-Hydrogelen neben einigen anderen Faktoren chemischer und physikalischer Natur unter anderem vom Ausmaß der Methacryloyl-Substitution als auch von der Gelkonzentration selber abhängt ²⁰⁸⁻²¹⁰. Da es sich in dieser Arbeit um Versuche mit unfunktionalisierter Gelatine handelt, sind diese Beobachtungen nicht direkt übertragbar, dennoch könnte hierin die Erklärung für die umgekehrte Abhängigkeit der Zellorganisation und -aktivität von der Gelkonzentration liegen. Ein zu dichtes Gel mit einer geringen Porengröße könnte eine schlechtere Nährstoffversorgung und Behinderung der Chondrozyten in ihrer Ausdehnung und Organisation darstellen.

Welche Faktoren ausschlaggebend dafür sind, ob die Zellorganisation und -aktivität mit höherer Konzentration steigen oder absinken, sind, wie dieser Versuch gezeigt hat, demnach unter anderem stark von den verwendeten Hydrogelen abhängig.

Sowohl Fibrinogen als auch Gelatine sind vielseitig einsetzbare Materialien und finden unter anderem bereits Verwendung in Hydrogelen. Neben der Polymerisierung von Fibrinogen zu Fibrin, das sich als Gewebekleber und Hydrogel bereits etablieren konnte, kann Fibrinogen selber auch als Hydrogelbestandteil verwendet werden, beispielsweise wurden schon PEG-basierte Hydrogele mit Fibrinogen untersucht ¹⁶⁴.

Gelatine ist sogar eines der am häufigsten verwendeten Materialien in Hydrogelen, da sie biokompatibel und enzymatisch abbaubar ist, bioaktive Gruppen für Zelladhäsion und weitere interessante Eigenschaften besitzt, wie Wasserlöslichkeit und einen Gelpunkt um 30 °C, weshalb sie auch Verwendung als Bioink im 3D-Bioprinting findet. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden viele verschiedene Gelatine-Scaffolds entwickelt. Photovernetzung der Gelatine stellt dabei aufgrund der schnellen Aktivierung und relativ milder chemischer Umgebungsbedingungen eine attraktive Methode dar. Am häufigsten ist dabei die Verwendung von UV-lichtaktivierter Vernetzung mithilfe des Photoinitiators IrgacureI2959 ¹⁸⁹. Dieser bietet jedoch einige Nachteile: er ist sauerstoffsensitiv, wodurch die Verwendung luftdichter

Barrieren nötig ist ¹⁸⁹, was klinisch unpraktikabel ist, und die Verwendung von UV-Licht birgt das Risiko der Induzierung von DNA-Schäden in Zellen ¹⁷⁵.

Diese Schwierigkeiten werden mithilfe der Verwendung von lichtaktiviertem Ru/SPS zur Vernetzung der Gelatine umgangen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch diese Methode Gele hergestellt werden können, die eine zellfreundliche Umgebung darstellen und inkorporierte Chondrozyten durch Anpassung der Gelkonzentration zu mäßiger bis starker Organisation und Matrixsynthese angeregt werden können.

Allerdings muss konstatiert werden, dass es sich bei diesen Gelen um keine ausgereiften Hydrogele handelt, die in dieser Form noch nicht im Bereich Tissue Engineering angewendet werden können. Für die künstliche Herstellung von Regeneratgewebe mithilfe von Hydrogelen müssen diese ein hohes Maß an Formstabilität besitzen, welches diesen Gelen noch abhanden kommt. Maßgeblichen Einfluss könnte die Verwendung der unfunktionalisierten Gelatine gehabt haben. Diese zeichnet sich durch ihre hohe Elastizität und lockere Struktur aus. Dies könnte sich förderlich auf die Zellaktivität und Mobilität ausgewirkt haben, allerdings führen diese Eigenschaften auch zu einer stärkeren Quellung und womöglich einem höheren Maß an Abbaubarkeit als bei funktionalisierter Gelatine, weshalb die Gele besonders in niedrigeren Konzentrationen einer starken Veränderung der Form und Größe unterlagen.

Funktionalisierte Gelatine wird in Hydrogelen am häufigsten in Form des bereits erwähnten GelMA verwendet ^{189,211}. Dabei handelt es sich um Gelatine, die mit Methacryloylgruppen an Amin-Seitengruppen substituiert wurde. Dadurch wird eine lichtaktivierte Vernetzung durch zum Beispiel IrgacureI2959 erst möglich. Außerdem kann mithilfe verschiedener Substitutionsgrade die Steifheit und Festigkeit des Gels angepasst werden.

Eine andere Möglichkeit der Funktionalisierung wäre beispielsweise die Thiol-En-Click-Chemie, die auf der Dimerisierung von Thiolen mit reaktiven Carbon-Carbon-Doppelbindungen („Ene“) basiert ¹⁷⁴. Neben der Steigerung der Festigkeit des Gels soll durch eine hohe Konversion funktioneller Gruppen und ein geringeres Maß an polymerisationsbedingtem Schrumpfen und Stress die Vernetzung der Gelatine zu einem homogenen Netzwerk ermöglicht werden. Dieses Verfahren wurde von Bertlein et al. ¹⁷⁴ mit GelAGE (Allyl-Glycyl-Ether-substituierte Gelatine) schon unter Verwendung des Photoinitiatorsystem Ru/SPS getestet und mit den bereits etablierten GelMA-Gelen verglichen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch nicht in der Herstellung von Hydrogelen für den Bereich Tissue Engineering, sondern in der Etablierung eines fähigen Gewebeklebers. Entscheidend sind dabei neben adhäsiven Eigenschaften solche, die die langfristige Integration positiv beeinflussen. Dazu ist ein hohes Maß an Elastizität und Abbaubarkeit nicht hinderlich, sondern vermutlich eher förderlich. Dieser Versuch lieferte starke Anhalte dafür, dass Chondrozyten in der direkten Umgebung der Gewebekleber als Gele, besonders im RuGel-Gel in ihrer Organisation und Aktivität nicht gehindert oder sogar stimuliert werden, und hob damit das integrative Potenzial dieser hervor. Die Beobachtungen des Gelversuches fügen sich damit in die Ergebnisse der Integrationsversuche mit Knorpelkonstrukten ein und heben die Überlegenheit des RuGel-Gels beziehungsweise -Klebers gegenüber dem RuFib-Kleber in Bezug auf die Möglichkeit der Chondrozyten zur Mobilität und Bildung von Matrix weiter hervor.

Zusätzlich lieferte dieser Versuch außerdem interessante und vielversprechende Erkenntnisse zu den verwendeten Materialien und ihrem Verhalten als mit Zellen besiedelte Gele. Durch

Einbringen funktioneller Gruppen könnte insbesondere RuGel Potenzial zur Anwendung im Bereich Tissue Engineering, beispielsweise als BioInk besitzen.

5.4 Langzeitintegration mit besiedelten Klebern

Die vorhergehenden Versuche hatten gezeigt, dass die Gewebekleber, insbesondere RuGel, sowohl zu einer starken Sofortadhäsion als auch langfristigen Integration von Knorpel fähig sind. Ferner wurde beobachtet, dass eine Besiedelung der Kleber mit Chondrozyten möglich ist und diese einen positiven Einfluss auf die Zellmigration und -aktivität auszuüben scheinen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde in einem letzten Versuch erneut die Langzeitintegration geklebter Knorpelkonstrukte im Pushout-Modell nach 21 Tagen ermittelt, wobei die Knorpelkonstrukte mit mit Chondrozyten besiedelten Klebern geklebt und kultiviert wurden. Ziel war es, durch die Erhöhung der Zelldichte im Knorpelspalt eine höhere Ausbeute an Matrixsynthese und damit eine noch bessere Langzeitintegration zu erzielen.

Als Kleberkonzentration wurde die Konzentration 100 mg/ml gewählt. Für diese Konzentration hatte sich in den Vorversuchen ein gutes Verhältnis aus Sofortadhäsion, Stabilität und Zellaktivität ergeben. Zudem ließen sich so die Ergebnisse der Langzeitintegration mit und ohne Besiedelung der Kleber besser vergleichen.

In den mechanischen Messungen an Tag 21 übertrafen die mechanisch gemessenen Integrationskräfte in der Versuchsgruppe RuGel mit $83,95 \pm 21,62$ kPa tatsächlich erstmals die Integrationswerte aus der Kontrollgruppe, auch wenn dieser Unterschied statistisch nicht erhärtet werden konnte, und fielen auch deutlich höher aus als die in derselben Konzentration ohne Besiedelung gemessenen Integrationswerte. Die Integrationswerte für die Kontrolle und die Gruppe RuFib lagen mit $62,26 \pm 24,71$ kPa beziehungsweise $27,30 \pm 9,74$ kPa sehr nah bei den Ergebnissen, die auch zuvor in den Versuchen gemessen worden waren.

Durch diese Ergebnisse können sich einige Aussagen ableiten lassen. Zunächst lässt sich feststellen, dass sich die Integrationswerte der Kontrollgruppe mit diesem Versuch erneut reproduzieren ließen. Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen dieses und vorhergehender Versuche lassen sich dadurch besser legitimieren.

Die Versuchsgruppe RuFib erreichte beinahe identische Integrationswerte mit und ohne Zellbesiedelung. Dieses Ergebnis steht im Einklang zu den Beobachtungen des Gelversuches. Die Chondrozyten wurden durch RuFib zwar zur Zellorganisation angeregt, jedoch ließ sich keine bedeutende Matrixproduktion nachweisen. Diese ist jedoch der entscheidende Faktor in der Ausbildung einer mechanisch festen Bindung zwischen den Knorpelflächen. Deshalb ließ sich vermutlich auch kein Unterschied in der mechanischen Untersuchung der Integration feststellen.

In der Gruppe RuGel hingegen fiel die Langzeitintegration verglichen mit der Integration ohne Zellbesiedelung deutlich höher aus. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen des Gelversuchs. Hier zeigte sich in der Gruppe RuGel nicht nur eine deutliche Zellorganisation, sondern auch eine besonders in niedrigeren Konzentrationen starke Anreicherung von Proteoglykanen und Kollagen II. Die Inkorporation der Chondrozyten in den Kleber hat vermutlich durch Matrixsynthese zu einem stärkeren Umbau des Klebers und Vernetzung der Knorpelflächen geführt, was in einer höheren Langzeitintegration resultierte. Durch das Zusammenwirken der im Kleber inkorporierten Zellen und den Chondrozyten der angrenzenden Knorpelflächen konnte eine stärkere Verankerung des Klebers mit den angrenzenden Knorpelflächen erzielt werden als durch das alleinige Zusammenwachsen der Knorpelstücke in der Kontrollgruppe.

Die histologischen Färbungen der Konstrukte spiegeln dabei die mechanischen Ergebnisse, mit den besten Aufnahmen aus der Gruppe RuGel. Hier war die Anreicherung von Proteoglykanen in der Safranin-O-Färbung im Knorpelspalt am deutlichsten mit derselben Intensität wie im anliegenden Knorpelgewebe, was auf die beste Matrixsynthese hinweist und mit den guten mechanischen Werten korreliert. Zusätzlich waren im Knorpelspalt Chondrozyten sichtbar, wobei nicht sicher differenziert werden kann, ob diese aus dem besiedelten Kleber verblieben oder aus dem anliegenden Knorpel dorthin migriert waren. Um diese Zusammenhänge in Zukunft sicher differenzieren zu können, wäre bspw. eine Möglichkeit, die Chondrozyten, die in den Kleber inkorporiert werden, radioaktiv zu markieren und nach 21 Tagen histologische Aufnahmen in Fluoreszenzmikroskopie anzufertigen. Ausgehend von der Anzahl und der Verteilung der Zellen ist der wahrscheinlichste Fall, dass sowohl eingewanderte als auch verbliebene Chondrozyten im Spalt sichtbar waren und zur guten Matrixsynthese und Integration beigetragen haben, da bei einzelnen Chondrozyten Bewegungsrichtungen zum Spalt hin sichtbar waren, andere jedoch völlig isoliert in der Mitte des Spalts lagen.

In der Gruppe RuFib waren solche Chondrozyten ohne sichtbare Verbindung zum anliegenden Knorpel noch häufiger sichtbar und machen die Existenz von im Kleber überlebenden und zur Integration beitragenden Zellen wahrscheinlich. Gleichzeitig wird dadurch einmal mehr betont, dass die Verwendung von RuGel zu einer besseren Integration führt als die Verwendung von RuFib, was sich eben in einer höheren Chondrozytenmigration spiegelt.

Auffällig an den histologischen Proben ist zudem, dass erneut in der Kontrollgruppe zwar eine Verbundenheit der Knorpelflächen durch überbrückende Matrixsynthese zu bestehen schien, welche sich in der guten mechanischen Integrationskraft spiegelt, allerdings schien die Proteoglykankonzentration, der Intensität der Anfärbung nach zu urteilen, geringer zu sein als in den Versuchsgruppen, insbesondere als im Vergleich zu RuGel. Da die Safranin-O-Färbung nur eine semiquantitative Methode zur Bestimmung des Proteoglykangehaltes ist, könnte hier beispielsweise ein GAG-Assay zur absoluten Bestimmung von Glykosaminoglykanen wertvolle weitere Erkenntnisse liefern. Bemerkenswert ist zudem, dass im Knorpelspalt in der Kontrollgruppe keine Chondrozyten sichtbar waren, die von außen eingewandert waren. Offensichtlich wurden die umliegenden Chondrozyten zwar zur Matrixproduktion, jedoch nicht zur Migration angeregt. Ein möglicher Mechanismus für die verhältnismäßig guten mechanischen Integrationskräfte, verglichen mit dem histologisch minderwertigen Maß an sichtbarer Integration, wäre, dass die Kontrollgruppe durch den sehr engen Kontakt der Knorpelflächen ohne eine trennende „Kleberwand“ einen zeitlichen Vorsprung gewann, welcher jedoch in der Versuchsgruppe RuGel durch die Migration und Aktivität der Chondrozyten im Knorpelspalt mit der Zeit wieder wettgemacht wurde. Demnach wäre zu erwarten, dass die Langzeitintegration über einen noch längeren Zeitraum in den Versuchsgruppen, besonders RuGel, die Kontrollgruppe eindeutig überholen müsste. Um dies zu evaluieren wären weitere Versuche über einen längeren Zeitraum nötig. Eindeutige Klarheit würden Langzeit-in-vivo-Versuche schaffen.

Eine weitere Möglichkeit, um diese Hypothese zu stützen, könnte in einem leicht abgeänderten Defektmodell bestehen, in welchem der ausgestanzte Knorpeldisc nicht wieder passgenau in den Ring gesetzt würde, sondern dieser Ring durch das erneute Ausstanzen mittels einer etwas größeren Stanze innen leicht vergrößert würde. Auf diese Weise würde ein größerer Spalt zwischen Knorpeldisc und Knorpelring resultieren. Wie erläutert, besteht der Verdacht, dass

die mechanisch hohen gemessenen Werte in der Kontrollgruppe durch den engen Knorpelkontakt zustandekommen, wodurch es der Kontrollgruppe erleichtert wird, durch überbrückende Matrixsynthese eine Bindung herzustellen, während in den Versuchsgruppen zunächst die Barriere in Form des Klebers „überwunden“ werden muss. Demnach könnte bei einer Vergrößerung des Knorpelabstands zwischen Knorpelring und Knorpeldisc die überbrückende Matrixsynthese und -vernetzung in der Kontrollgruppe erschwert werden, während in den Versuchsgruppen die Sofortadhäsion bei Einsatze einer etwas größeren Klebermenge wenig oder gar nicht beeinträchtigt werden sollte, und bis zum Erreichen einer stabilen integrativen Bindung durch die etwas dickere Kleberschicht nur unwesentlich mehr Zeit vergehen könnte. Das integrative Potenzial der Versuchs- und Kontrollgruppen könnte durch zukünftige Versuche mit einem derartigen leicht abgeänderten Defektmodell demaskiert werden.

In diesem Versuch wurde die Langzeitintegration von Knorpelgewebe durch die besiedelten Kleber RuFib und RuGel untersucht. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Maher et Mauck¹⁵⁸ verfolgt, die in einem Pushout-Defekt-Modell ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten, ein kommerziell erhältliches synthetisches Hydrogel (Puramaxtrix®), das mit Chondrozyten besiedelt und mit dem Wachstumsfaktor TGFβ3 supplementiert wurde, in den 0,25 mm breiten Knorpelspalt zwischen Knorpelring und -kern injizierten. Über einen Zeitraum von 21 bzw. 42 Tagen konnten sie eine Integration zwischen den Knorpelflächen erzeugen, die histologisch und mechanisch durch Pushout-Tests objektiviert wurde. Der Versuch von Maher et Mauck zeigt, dass die langfristige Knorpelintegration durch Injektion eines mit Zellen besiedelten, biologisch abbaubaren Materials gesteigert werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Integrationssteigerung auch durch Besiedelung von lichtaktivierter Gelatine erzielt werden kann. Vorteilhaft an diesem Material ist dabei, dass es neben der langfristigen Integration auch zur Induktion einer stabilen Sofortbindung durch dieses Material kommt, wie die vorhergehenden Versuche gezeigt hatten. Dies stellt auch den wesentlichen Unterschied gegenüber dem bereits kommerziell eingesetzten Fibrin dar, das ebenfalls unter niedrigem adhäsivem Potenzial im „immediate bonding“ leidet. Zudem ist bei der hier verwendeten RuGel keine Supplementation mit Wachstumsfaktoren nötig, um eine Integration zu erwirken; ein Umstand, der in Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit des Materials von Vorteil sein kann.

5.5 Ausblick

Die Therapie von Knorpelschäden hat durch regenerative Ansätze der Medizin mit dem Tissue Engineering von Knorpelgewebe enormen Zuwachs in der potenziellen Chance auf Heilung dieser gewonnen. Dabei werden immer komplexere und vielschichtigere Scaffolds als Basis zur künstlichen Herstellung von Regeneratknorpel entwickelt. Der Einbezug zonaler Aspekte des Knorpelgewebes in die Entwicklung der Scaffolds²¹², hochkomplexe Gerüste auf Basis elektrogesponnener Nanofibrillen²¹³ oder dreidimensionales Bioprinting¹¹⁷ und der Einsatz pluripotenter Stammzellen aus verschiedenen möglichen Geweben¹⁰⁸ stellen nur einige dieser Aspekte dar.

Ein chronisches Problem besteht jedoch in der Implantation der Konstrukte in den Knorpeldefekt, da aufgrund der natürlicherweise unzureichenden lateralen Integration von Knorpelgewebe ein vollständiges Verheilen des Defektes erschwert oder verhindert wird. Um diese Hindernisse zu überwinden, ist, trotz bereits erreichter Fortschritte, weitere Forschung nötig.

Benötigt wird ein besseres Verständnis der Mechanismen, die erfolgreicher Integration durch Matrixsynthese und Zellmigration zugrundeliegen. Dabei sollte zudem in den *in vitro* Modellen mehr Wert auf die Nachahmung der im Knorpeldefekt vorherrschenden physiologischen Umgebungsbedingungen gelegt werden. Hier ist die Rede insbesondere vom inflammatorischen Milieu und dem Einwirken mechanischer Kräfte, die es einzubeziehen gilt. Letzteres wird bei der Herstellung von besiedelten Scaffolds bereits durch den Einsatz sogenannter Bioreaktoren imitiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Stimulierung die EZM-Produktion der Chondrozyten signifikant gesteigert werden kann¹⁶⁴. Auch bei der Erforschung von Integrationsmodellen könnten solche Techniken zum Einsatz kommen.

Neben dem Einsatz chemotaktischer Agenzien und einem enzymatischen Andau der Defektzone zur Repopulation und Verbesserung der Heilung der Defektflächen rücken zunehmend biomaterialbasierte Ansätze ins Blickfeld der Forschung. Langfristige Integration soll dabei durch den Einsatz geeigneter Scaffolds erreicht werden oder unter Zuhilfenahme von Gewebeklebern. Als Standard konnte sich dabei bisher nur Fibrinkleber etablieren. Doch dieser besitzt zahlreiche Nachteile, wie eine lange Polymerisationszeit und geringes adhäsives Potenzial im „immediate bonding“^{162,163}. Für die sichere Implantation eines Transplantates in den Defekt ist dieses jedoch nötig. Ein zukünftiges Bioadhäsivum zur Unterstützung der Knorpelreparatur muss deshalb in der Lage sein, sowohl die sichere Sofortadhäsion zu initiieren als auch die langfristige Integration zu unterstützen.

In dieser Arbeit wurden zwei Gewebekleber auf Basis von Fibrinogen und Gelatine, die mittels eines neuartigen lichtaktivierten Crosslink-Mechanismus vernetzt wurden, auf ihr Potenzial hin, diese Bedingungen zu erfüllen, untersucht. Dabei erwies sich der Kleber RuGel als dem Kleber RuFib sowohl hinsichtlich der Sofortadhäsion als auch der Langzeitintegration überlegen. Die adhäsiven Kräfte im „immediate bonding“ lagen dabei für RuGel über siebenmal höher als die von Fibrinkleber, während die Integrationswerte nach 21 Tagen in einem vergleichbaren Rahmen lagen. Zudem konnte kein zytotoxisches Potenzial des Klebers nachgewiesen werden. In Bezug auf den möglichen zukünftigen Einsatz als Gewebekleber für Knorpelgewebe lieferte diese Arbeit damit vielversprechende Ergebnisse.

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig. Wichtig wäre es, eine sichere Überlegenheit

des Klebers gegenüber der Kontrollgruppe nicht nur histologisch, sondern auch mechanisch zu objektivieren. Dafür wäre gegebenenfalls die Entwicklung eines leicht abgeänderten Defektmodells notwendig. Auch der Einsatz eines Zugversuches anstatt des Pushout-Modells wäre denkbar. Zudem sollten zukünftige Experimente größere Versuchsgruppen beinhalten, um einige in dieser Arbeit dargestellte und diskutierte Trends statistisch erhärten zu können. Da in den Ergebnissen dieser Arbeit beobachtet wurde, dass die Adhäsions- bzw. Integrationskurve einen U-förmigen Verlauf annahm, wäre es von Bedeutung den genaueren zeitlichen Ablauf und das Ausmaß des Einbrechens der adhäsiven Kraft zu evaluieren. Eine entscheidende Rolle könnte dabei das Quellverhalten der Gelatine spielen. Dieses gilt es genauer zu evaluieren. Gegebenenfalls könnte der Einsatz funktionalisierter Gelatine erwogen und untersucht werden, um die Festigkeit dieser zu erhöhen und so dieser Schwierigkeit zu begegnen¹⁷³. Hier wäre ein gutes Verhältnis aus gewonnener Festigkeit und erhaltener Elastizität erstrebenswert.

Da neben dem Einsatz eines Gewebeklebers auch weitere Strategien zur Integrationssteigerung beitragen können, wäre eine Untersuchung hinsichtlich des Zusammenwirkens dieser sinnvoll. So könnte die Kombination aus dem Einsatz des Klebers RuGel und einem enzymatischen Andau der Defektfläche und/oder der Einsatz chemotaktischer Agenzien die langfristige Integration eventuell weiter steigern^{128,149–151}.

Da letztendlich die Implantation von Regeneratknorpel in den Defekt das langfristige Ziel darstellt, wäre es zudem von großer Bedeutung, die adhäsiven und integrativen Eigenschaften des Klebers nicht nur in einem reinen Knorpeldefektmodell zu testen, sondern auch zu untersuchen, wie sich die Kombination mit verschiedenen Scaffolds auf diese auswirken würde, insbesondere da sich die Integration von Regeneratknorpel in nativen Knorpel als besonders diffizil erweisen kann.

In dieser Arbeit wurde der Kleber ausschließlich mit Chondrozyten besiedelt. Interessant wäre es, alternative Zellquellen, beispielsweise mesenchymale Stammzellen zu verwenden. Diese spielen in der Entwicklung cartilaginärer Konstrukte eine immer größere Rolle und wurden auch bereits in Gelatine-basierte Hydrogele erfolgreich inkorporiert und zur Matrixsynthese angeregt²¹⁴. Die vergleichende Untersuchung des Einflusses dieser Zellen auf die laterale Integration könnte wertvolle Erkenntnisse liefern.

Schlussendlich sind zum sicheren Nachweis des integrativen Potenzials des Klebers *in vivo* Studien in Tiermodellen nötig, da *in vitro* Modelle zwangsläufig mit Unzulänglichkeiten bezüglich der Imitierung des physiologischen Milieus und reparativer Mechanismen verbunden sind.

Neben der Untersuchung von RuGel als Gewebekleber im Defektmodell wurden zudem vielversprechende Ergebnisse in der Besiedelung von RuGel als Gel erzielt. Als vorteilhaft könnte sich dabei besonders die nicht-toxische aber schnelle Aktivierung mittels sichtbarem Licht erweisen. Es konnte gezeigt werden, dass RuGel-Gele eine zellfreundliche Umgebung darstellen, die die Chondrozyten konzentrationsabhängig zur Organisation und Produktion von EZM anregten. Diese könnten die Basis für die weitere Erforschung des Klebers im hydrogelbasierten Tissue Engineering darstellen. Als problematisch für diesen Einsatz würde sich jedoch vermutlich die Forminstabilität im Zuge der starken Degradation eines solchen Gels erweisen. Hier könnte sich ebenfalls die vorherige Funktionalisierung der Gelatine vor der lichtaktivierten Vernetzung positiv auswirken. Bertlein et al.¹⁷⁴ untersuchten den Einsatz von mit Thiol-En-Gruppen funktionalisierter GelAGE, die mittels desselben lichtaktivierten

Crosslink-Mechanismus vernetzt wurde als Bioink für 3D-Bioprinting im Tissue Engineering. Schlussendlich ist auch ein Einsatz von RuGel als Gewebekleber in anderen chirurgischen Bereichen möglich als Alternative zu gängigen Gewebeklebern wie dem auch hier etablierten Fibrin oder BioGlue®, das zytotoxisches Potenzial aufweist, welches mit dem zytokompatiblen RuGel nicht gegeben ist. Ein solcher Einsatz als chirurgischer Gewebekleber wurde bereits erfolgreich im Tiermodell getestet¹⁸².

Bei RuGel handelt es sich also um ein vielseitig einsetzbares Material, das in verschiedenen Richtungen in abgewandelter Form in klinischen Einsatzbereichen Verwendung finden kann.

6 Zusammenfassung

Die degenerative Gelenkerkrankung Osteoarthritis ist eine häufige Erkrankung des Menschen, die mit einer deutlichen Morbidität und körperlichen Einschränkungen assoziiert ist. Es wird angenommen, dass im Jahr 2030 Arthritis die häufigste Ursache für Behinderung darstellen wird³². Weil Knorpelgewebe avaskulär ist und die Chondrozyten sich in einem postmitotischen Zustand befinden, besitzt Knorpel nur sehr geringes Selbstheilungspotenzial. Es gibt momentan keine effektive Therapie der Arthritis. Obwohl regenerative Ansätze mit dem Tissue Engineering von Knorpelgewebe vielversprechende Therapiealternativen darstellen, stellt die mangelnde laterale Integration von Knorpelgewebe ein chronisches Problem dar, das die Implantation von Knorpelkonstrukten vor Schwierigkeiten stellt. Die optimale Integrationsmethode sollte das Gewebe stark verbinden, klinisch schnell und einfach angewendet werden können, ein hohes Maß an Biokompatibilität besitzen und außerdem die Gewebereparatur fördern. Eine vielversprechende Möglichkeit stellt der Einsatz von Gewebeklebern dar.

Gelatine und Fibrinogen sind natürliche Materialien mit diversen Vorteilen bezüglich Biokompatibilität, biologischen Eigenschaften und Abbaubarkeit. In dieser Arbeit wurden natives Fibrinogen und unmodifizierte Gelatine in gelöster Form mittels einer neuartigen und schnellen Photooxidationsmethode unter Verwendung von Rutheniumkomplexen und Licht aus dem sichtbaren Spektrum zu Klebern vernetzt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit den auf diese Weise hergestellten Klebern RuFib und RuGel Knorpel in Disc-Ring-Konstrukten zusammengeklebt. Mittels einer Materialprüfmaschine wurde in einem Push-Out-Versuch die Sofortadhäsion der geklebten Konstrukte mechanisch vergleichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide Kleber zur Herstellung einer suffizienten Gewebeadhäsion imstande sind, wobei die Adhäsionskräfte beim Kleber RuGel etwa doppelt so hoch ausfielen wie beim Kleber RuFib. Außerdem wurde der Einfluss eines enzymatischen Andaus der Knorpelflächen auf die Sofortadhäsion untersucht, wobei keine Adhäsionssteigerung beobachtet werden konnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fokus auf die Evaluierung der Langzeitintegration gelegt. Die entsprechenden Knorpelkonstrukte wurden erneut mithilfe der Kleber RuFib und RuGel geklebt und über 3 Wochen in Gewebekultur gehalten. Nach 7 und nach 21 Tagen erfolgten mechanische Messungen im Push-Out-Modell. Dabei zeigte sich ein U-förmiger Verlauf der Bindungskräfte im Knorpelspalt, mit einem ersten Abfall der Adhäsionskräfte an Tag 7 und einem darauffolgenden erneuten Anstieg der Integrationskräfte an Tag 21. Ursächlich sind möglicherweise sich überlappende Phänomene mit einem ersten Nachlassen der adhäsiven Bindungskraft der Kleber und einer versetzt stattfindenden Integration der Knorpelflächen. Eine Reduktion der Kleberkonzentration in einem weiteren Versuch resultierte interessanterweise in keinen signifikanten Veränderungen in der Sofortadhäsion, während jedoch die Langzeitintegrationswerte der Gruppe RuGel nach 21 Tagen geringer ausfielen. Histologische Aufnahmen wurden angefertigt, die keinen zytotoxischen Einfluss der Kleber auf das Knorpelgewebe erkennen ließen und das schrittweise ablaufende Integrationsgeschehen im Knorpelspalt in einer Kinetik-Reihe besonders in der Gruppe RuGel anschaulich unterstrichen.

Insgesamt zeigte sich der Kleber RuGel dem Kleber RuFib sowohl hinsichtlich der Sofortadhäsion als auch der Langzeitintegration überlegen.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Erforschung der vernetzten Kleber in Form besiedelter Gele. In einer konzentrationsabhängigen Reihe wurden beide Materialien mit Chondrozyten besiedelt und mithilfe des Crosslink-Mechanismus vernetzt und über einen Zeitraum von zwei Wochen in Gewebekultur gehalten. Anschließend erfolgte die makroskopische und histologische Auswertung der Chondrozytenvitalität, -Mobilität und -Aktivität. Dabei konnten Unterschiede sowohl zwischen den Gruppen als auch innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Gelkonzentrationen beobachtet werden. Insgesamt ließ sich feststellen, dass beide Materialien eine zellfreundliche Umgebung darstellen, in der die Chondrozyten zur Organisation und Matrixsynthese angeregt werden können. In den RuGel-Gelen zeigte sich die Zellaktivität stärker im Vergleich zu den RuFib-Gelen und umso stärker, je niedriger die Gelkonzentration war. Hier unterlagen die Gele jedoch einer starken Instabilität in Form und Größe. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Material neben der Verwendung als Gewebekleber auch ein aussichtsreicher Kandidat für die weitere Erforschung im Rahmen von hydrogelbasiertem Tissue Engineering sein könnte, hierfür jedoch eine weitere Modifikation der Gelatine nötig sein könnte.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden die Erkenntnisse aus den vorhergehenden Versuchen zusammengeführt und ein weiterer Langzeitintegrationsversuch entworfen, in welchem besiedelte Kleber zum Einsatz kamen. Die entsprechenden geklebten Konstrukte wurden wieder drei Wochen lang inkubiert. In der Auswertung der mechanischen Ergebnisse an Tag 21 zeigte sich, dass durch die Besiedelung der Kleber eine weitere Integrationssteigerung erzielt werden konnte. Beim Kleber RuGel erreichte die Langzeitintegration damit den Spitzenwert. Auch in den histologischen Untersuchungen zeigte sich die beste Integration in der Gruppe RuGel. Dieser Versuch machte deutlich, dass eine Besiedelung der Kleber möglich ist und durch Chondrozytenstimulation und Matrixsynthese zur weiteren Integration im Knorpelspalt beiträgt.

In dieser Arbeit erfolgte der erstmalige Einsatz von Fibrinogen und Gelatine, die mittels des Crosslinker-Komplexes Ruthenium/SPS vernetzt wurden, als Bioadhäsivum von Knorpelgewebe. In der Zusammenschau der erbrachten Ergebnisse ließ sich feststellen, dass von den hier vorgestellten Materialien insbesondere der Kleber RuGel Potenzial besitzt, Einsatz als Bioadhäsivum im Bereich Tissue Engineering von Knorpelgewebe zu finden. Ausschlaggebend dafür ist die Herstellung einer suffizienten Sofortadhäsion zwischen gegenüberliegenden Knorpelflächen einerseits, sowie die Förderung der Langzeitintegration andererseits, die für eine Stimulierung der Gewebereparatur im echten Knorpeldefekt vielversprechend ist. Weitere Forschung ist jedoch nötig, um die Abgrenzung der mechanischen Integration gegenüber der Kontrollgruppe besser zu unterstreichen und das Material weiteren Untersuchungen wie einer Analyse des Quellverhaltens zu unterziehen. Schließlich sollte das regenerative Potenzial des Gewebeklebers in *in vivo* Tiermodellen weiter systematisch untersucht werden. Zudem lieferte diese Arbeit vielversprechende Ergebnisse für den potenziellen Einsatz von RuGel im Bereich hydrogelbasiertes Tissue Engineering. Als

limitierender Faktor in dieser Form stellte sich dabei die Form- und Größeninstabilität der Gele heraus. Eine Funktionalisierung der Gelatine könnte hier erfolversprechend sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;Vol.1;Nr.6;p.461-468.
2. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, Lafont J, Denoix JM, Audigié F, Mallein-Gerin F, Legendre F, Galera P. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2014;Vol.1840;Nr.8;p.2414-2440.
3. Stockwell RA. Chondrocytes. *Journal of Clinical Pathology*. 1978;Vol.31;Nr.12;p.7-13.
4. Mow VC, Ratcliffe A, Robin Poole A. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*. 1992;Vol.13;Nr.2;p.67-97.
5. Tang LH, Buckwalter JA, Rosenberg LC. Effect of link protein concentration on articular cartilage proteoglycan aggregation. *Journal of Orthopaedic Research*. 1996;Vol.14;Nr.2;p.334-339.
6. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001;Vol.1;Nr.391;p.26-33.
7. Martinek V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2003;Vol.54;Nr.6;p.166-170.
8. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional Course Lectures*. 1998;Vol.47;p.477-486.
9. Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomaterialia*. 2005;Vol.1;Nr.3;p.317-325.
10. Khoshgoftar M, Torzilli PA, Maher SA. Influence of the pericellular and extracellular matrix structural properties on chondrocyte mechanics. *Journal of Orthopaedic Research*. 2018;Vol.36;Nr.2;p.721-729.
11. Liu C, Wang B, Xiao L, Li Y, Xu L, Zhao Z, Zhang L. Protective effects of the pericellular matrix of chondrocyte on articular cartilage against the development of osteoarthritis. *Histology and Histopathology*. 2018;Vol.33;Nr.8;p.757-764.
12. Benninghoff A. Form und Bau der Gelenknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion - Zweiter Teil: Der Aufbau des Gelenknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1925;Vol.2;Nr.5;p.783-862.
13. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*. 2014;Vol.39;p.25-32.
14. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and

- molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*. 1995;Vol.17;Nr.12;p.1039-1048.
15. Kim E, Guilak F, Haider MA. The dynamic mechanical environment of the chondrocyte: A biphasic finite element model of cell-matrix interactions under cyclic compressive loading. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2008;Vol.130;Nr.6;p.061009.
 16. Mow VC, Guo XE. Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2002;Vol.4;Nr.1;p.175-209.
 17. Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1994;Vol.2;Nr.4;p.192-201.
 18. Boettcher K, Kienle S, Nachtsheim J, Burgkart R, Hugel T, Lieleg O. The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration. *Acta Biomaterialia*. 2016;Vol.29;p.180-187.
 19. Buckwalter JA. Articular cartilage: Injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*. 1998;Vol.28;Nr.4;p.192-202.
 20. Mow VC, Holmes MH, Michael Lai W. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *Journal of Biomechanics*. 1984;Vol.17;Nr.5;p.377-394.
 21. Maroudas A. Physicochemical Properties of Cartilage in the Light of Ion Exchange Theory. *Biophysical Journal*. 1968;Vol.8;Nr.5;p.575-595.
 22. Maroudas A, Wachtel E, Grushko G, Katz EP, Weinberg P. The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. *BBA - General Subjects*. 1991;Vol.1073;Nr.2;p.285-294.
 23. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments. *Journal of Biomechanical Engineering*. 1980;Vol.102;Nr.1;p.73-84.
 24. Soltz MA, Ateshian GA. Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in confined compression. *Journal of Biomechanics*. 1998;Vol.31;Nr.10;p.927-934.
 25. Woo SL, Buckwalter JA. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. *Journal of Orthopaedic Research*. 1988;Vol.6;Nr.6;p.907-931.
 26. Oliveiraa JM, Rui S, Reiss L. Osteochondral Tissue Engineering Challenges, Current Strategies, and Technological Advances. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2018; Vol.1059;p.1-511.
 27. Ryd L, Brittberg M, Eriksson K, Jurvelin JS, Lindahl A, Marlovits S, Möller P, Richardson JB, Steinwachs M, Zenobi-Wong M. Pre-Osteoarthritis: Definition and Diagnosis of an Elusive Clinical Entity. *Cartilage*. 2015;Vol.6;Nr.3;p.156-165.
 28. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1961;Vol.43-B;p.752-757.

29. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2003;Vol.85;p.58-69.
30. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1994;Vol.331;Nr.14;p.889-895.
31. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism*. 2012;Vol.64;Nr.6;p.1697-1707.
32. Thomas E, Peat G, Croft P. Defining and mapping the person with osteoarthritis for population studies and public health. *Rheumatology*. 2014;Vol.53;Nr.2;p.338-345.
33. Zhao W, Wang T, Luo Q, Chen Y, Leung VYL, Wen C, Shah MF, Pan H, Chiu K, Cao X, Lu WW. Cartilage degeneration and excessive subchondral bone formation in spontaneous osteoarthritis involves altered TGF- β signaling. *Journal of Orthopaedic Research*. 2016;Vol.34;Nr.5;p.763-770.
34. Moskowitz RW. The burden of osteoarthritis: clinical and quality-of-life issues. *The American Journal of Managed Care*. 2009;Vol.15;Nr.8;p.223-229.
35. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011;Vol.23;Nr.5;p.492-496.
36. Sauter E, Buckwalter JA, McKinley TO, Martin JA. Cytoskeletal dissolution blocks oxidant release and cell death in injured cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;Vol.30;Nr.4;p.593-598.
37. Mankin HJ. The Reaction of Articular Cartilage to Injury and Osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*. 1974;Vol.291;Nr.24;p.1285-1292.
38. Martin JA, Buckwalter JA. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *The Iowa Orthopaedic Journal*. 2001;Vol.21;p.1-7.
39. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: Mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;Vol.54;Nr.5;p.1357-1360.
40. Xu L, Golshirazian I, Asbury BJ, Li Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF-beta1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histology and Histopathology*. 2014;Vol.29;Nr.5;p.609-618.
41. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2011;Vol.14;Nr.2;p.191-198.
42. Kuijt MTK, Inklaar H, Gouttebauge V, Frings-Dresen MHW. Knee and ankle osteoarthritis in former elite soccer players: A systematic review of the recent literature. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2012;Vol.15;Nr.6;p.480-487.
43. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. *Journal of Orthopaedic Research*. 2011;Vol.29;Nr.6;p.802-809.

44. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: A first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2006;Vol.20;Nr.10;p.739-744.
45. Lewis JS, Hembree WC, Furman BD, Tippets L, Cattel D, Huebner JL, Little D, DeFrate LE, Kraus VB, Guilak F, Olson SA. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011;Vol.19;Nr.7;p.864-873.
46. Olson SA, Furman BD, Kraus VB, Huebner JL, Guilak F. Therapeutic opportunities to prevent post-traumatic arthritis: Lessons from the natural history of arthritis after articular fracture. *Journal of Orthopaedic Research*. 2015;Vol.33;Nr.9;p.1266-1277.
47. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Ike R, Kapila P, Kaplan D, Koopman W, Marino C, McDonald E, McShane DJ, Medsger T, Michel B, Murphy WA, Osial T, Ramsey-Goldman R, Rothschild B, Wolfe F. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis and Rheumatism*. 1991;Vol.34;Nr.5;p.505-514.
48. Xia B, Di Chen, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. *Calcified Tissue International*. 2014;Vol.95;Nr.6;p.495-505.
49. Li H, Hua Y, Li H, Li S, Ma K, Chen S. Treatment of talus osteochondral defects in chronic lateral unstable ankles: small-sized lateral chondral lesions had good clinical outcomes. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2018;Vol.26;Nr.7;p.2116-2122.
50. Seon JK, Song EK, Park SJ. Osteoarthritis after anterior cruciate ligament reconstruction using a patellar tendon autograft. *International Orthopaedics*. 2006;Vol.30;Nr.2;p.94-98.
51. Lee HH, Chu CR. Clinical and Basic Science of Cartilage Injury and Arthritis in the Football (Soccer) Athlete. *Cartilage*. 2012;Vol.3;Nr.1;p.63-68.
52. Nuber GW, Kvitne RS. Meniscal repair. *Techniques in Orthopaedics*. 1987;Vol.2;Nr.2;p.63-67.
53. Sigurdsson U, Müller G, Siversson C, Lammentausta E, Svensson J, Tiderius C-J, Dahlberg LE. Delayed gadolinium-enhanced MRI of meniscus (dGEMRIM) and cartilage (dGEMRIC) in healthy knees and in knees with different stages of meniscus pathology. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;Vol.17;Nr.1;p.406.
54. Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1995;Vol.3;Nr.4;p.261-267.
55. Aigner T, Richter W. OA in 2011: Age-related OA-a concept emerging from infancy? *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;Vol.8;Nr.2;p.70-72.
56. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*. 2012;Vol.51;Nr.2;p.241-248.

57. Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JHP, Richardson JB, Roberts S, Spector M. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthopaedica*. 2016;Vol.87;Nr.363;p.6-14.
58. Harbo M, Bendix L, Bay-Jensen AC, Graakjaer J, Sørensen K, Andersen TL, Kjaersgaard-Andersen P, Koelvraa S, Delaisse JM. The distribution pattern of critically short telomeres in human osteoarthritic knees. *Arthritis Research and Therapy*. 2012;Vol.14;Nr.1;p.R12.
59. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall IV AW, Grishko V. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010;Vol.18;Nr.3;p.424-432.
60. Loeser RF, Gandhi U, Long DL, Yin W, Chubinskaya S. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;Vol.66;Nr.8;p.2201-2209.
61. Greene MA, Loeser RF. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015;Vol.23;Nr.11;p.1966-1971.
62. Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF β signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2010;Vol.12;Nr.1;p.201.
63. Loeser RF, Shanker G, Carlson CS, Gardin JF, Shelton BJ, Sonntag WE. Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: Studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis and Rheumatism*. 2000;Vol.43;Nr.9;p.2110-2120.
64. Mallinger R, Stockinger L. Histochemistry of the extracellular matrix of aging hyaline cartilage. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 1987;Vol.25;Nr.2;p.129-132.
65. Mitsuyama H, Healey RM, Terkeltaub RA, Coutts RD, Amiel D. Calcification of human articular knee cartilage is primarily an effect of aging rather than osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;Vol.15;Nr.5;p.559-565.
66. Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R. Inflammation-Induced Chondrocyte Hypertrophy Is Driven by Receptor for Advanced Glycation End Products. *The Journal of Immunology*. 2005;Vol.175;Nr.12;p.8296-8302.
67. Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;Vol.54;Nr.9;p.2901-2911.
68. Chen AC, Temple MM, Ng DM, Verzijl N, DeGroot J, TeKoppele JM, Sah RL. Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;Vol.46;Nr.12;p.3212-3217.
69. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-Van Wijk MJG, Jacobs KMG, Van El B, Van Roermund PM, Bank RA, Bijlsma JWJ, TeKoppele JM, Lafeber FPJG. Accumulation of Advanced Glycation End Products as a Molecular Mechanism for Aging as a Risk Factor in Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;Vol.50;Nr.4;p.1207-1215.

70. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, Fries JF. Osteoarthritis: New insights - Part 1: The disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*. 2000;Vol 133.Nr.8;p.635-646.
71. Whittaker JL, Woodhouse LJ, Nettel-Aguirre A, Emery CA. Outcomes associated with early post-traumatic osteoarthritis and other negative health consequences 3-10 years following knee joint injury in youth sport. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015;Vol.23;Nr.7;p.1122-1129.
72. Ding C, Stannus O, Cicuttini F, Antony B, Jones G. Body fat is associated with increased and lean mass with decreased knee cartilage loss in older adults: A prospective cohort study. *International Journal of Obesity*. 2013;Vol.37;Nr.6;p.822-827.
73. Conde J, Scotece M, Gómez R, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Adipokines and Osteoarthritis: Novel Molecules Involved in the Pathogenesis and Progression of Disease. *Arthritis*. 2011;Vol.2011;p.1-8.
74. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007;Vol.66;Nr.4;p.433-439.
75. Lee R, Kean WF. Obesity and knee osteoarthritis. *Inflammopharmacology*. 2012;Vol.20;Nr.2;p.53-58.
76. Kirk KM, Bellamy N, O’Gorman LE, Kuhnert PM, Klestov A, Muirden K, Tesar P, Walker D, Martin NG. The validity and heritability of self-report osteoarthritis in an Australian older twin sample. *Twin Research*. 2002;Vol.5;Nr.2;p.98-106.
77. MacGregor AJ, Antoniades L, Matson M, Andrew T, Spector TD. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: Results of a classic twin study. *Arthritis and Rheumatism*. 2000;Vol.43;Nr.11;p.2410-2416.
78. Wei Y, Bai L. Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*. 2016;Vol.57;Nr.4;p.245-261.
79. Richette P, Dumontier MF, Tahiri K, Widerak M, Torre A, Benallaloua M, Rannou F, Corvol MT, Savouret JF. Oestrogens inhibit interleukin 1 β -mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor- κ B impairment. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007;Vol.66;Nr.3;p.345-350.
80. Lotz MK. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: Pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Research and Therapy*. 2010;Vol.12;Nr.3;p.211.
81. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;Vol.8;Nr.12;p.729-737.
82. Sowers MF, Karvonen-Gutierrez CA, Palmieri-Smith R, Jacobson JA, Jiang Y, Ashton-Miller JA. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Care and Research*. 2009;Vol.61;Nr.10;p.1328-1336.

83. Velasquez MT, Katz JD. Osteoarthritis: Another component of metabolic syndrome? *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2010;Vol.8;Nr.4;p.295-305.
84. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;Vol.444;Nr.7121;p.860-867.
85. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;Vol.13;Nr.9;p.769-781.
86. Silman AJ, Newman J. Obstetric and gynaecological factors in susceptibility to peripheral joint osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1996;Vol.55;Nr.9;p.671-673.
87. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Kannel WB. Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. *Arthritis and Rheumatism*. 1990;Vol.33;Nr.4;p.525-532.
88. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR, Genant HK, Cauley JA. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Archives of Internal Medicine*. 1996;Vol.156;Nr.18;p.2073-2080.
89. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*. 2008;Vol.87;Nr.1;p.77-95.
90. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1959;Vol.41;p.618-619.
91. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 1997;Vol.7;Nr.4;p.300-304.
92. Sommerfeldt MF, Magnussen RA, Hewett TE, Kaeding CC, Flanigan DC. Microfracture of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2016;Vol.4;Nr.6;p.1-6.
93. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture chondroplasty: Indications, techniques, and outcomes. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. 2003;Vol.11;Nr.4;p.236-244.
94. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*. 1993;Vol.9;Nr.3;p.318-321.
95. Schewe B, Fritz J, Weise K. Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*. 2008;Vol.3;Nr.2;p.77-94.
96. De Caro F, Bisicchia S, Amendola A, Ding L. Large fresh osteochondral allografts of the knee: A systematic clinical and basic science review of the literature. *Arthroscopy*. 2015; Vol.31;Nr.4;p.757-765.
97. Krettek C, Neunaber C. Transplantation von großen osteochondralen Allografts – Alter Wein in neuen Schläuchen oder Paradigmenwechsel? *Unfallchirurg*. 2017;Vol.120;Nr.11;p.906-907.

98. Langer F, Gross AE. Immunogenicity of allograft articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1974;Vol.56;Nr.2;p.297-304.
99. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;Vol.11;Nr.1;p.21-34.
100. Menche DS, Pitman MI, Peterson L. Experimental model for chondrocyte transplantation in rabbits. *Surgery and Arthroscopy of the Knee*. 1986;p.54.
101. Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative Medicine: A Review of the Evolution of Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) Therapy. *Bioengineering*. 2019;Vol.6;Nr.1;p.1-16.
102. Devitt BM, Bell SW, Webster KE, Feller JA, Whitehead TS. Surgical treatments of cartilage defects of the knee: Systematic review of randomised controlled trials. *Knee*. 2017;Vol.24;Nr.3;p.508-517.
103. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris DBF. Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *American Journal of Sports Medicine*. 2018;Vol.46;Nr.6;p.1343-1351.
104. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Ludvigsen TC, Loken S, Solheim E, Strand T, Johansen O. A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2016;Vol.98;Nr.16;p.1332-1339.
105. Derrett S, Stokes EA, James M, Bartlett W, Bentley G. Cost and health status analysis after autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: A retrospective comparison. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*. 2005;Vol.21;Nr.3;p.359-367.
106. Goyal D, Goyal A, Keyhani S, Lee EH, Hui JHP. Evidence-based status of second- and third-generation autologous chondrocyte implantation over first generation: A systematic review of level I and II studies. *Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2013;Vol.29;Nr.11;p.1872-1878.
107. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;Vol.30;Nr.1;p.215-224.
108. Medvedeva E V., Grebenik EA, Gornostaeva SN, Telpuhov VI, Lychagin A V., Timashev PS, Chagin AS. Repair of damaged articular cartilage: Current approaches and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;Vol.19;Nr.8;p.2366.
109. Caron MMJ, Emans PJ, Coolen MME, Voss L, Surtel DAM, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJM. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: Comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;Vol.20;Nr.10;p.1170-1178.
110. Dewan AK, Gibson MA, Elisseff JH, Trice ME. Evolution of Autologous Chondrocyte Repair and Comparison to Other Cartilage Repair Techniques. *BioMed Research International*. 2014;Vol.2014;p.1-11.

111. Kreuz PC, Steinwachs M, Erggelet C, Krause SJ, Ossendorf C, Maier D, Ghanem N, Uhl M, Haag M. Classification of graft hypertrophy after autologous chondrocyte implantation of full-thickness chondral defects in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;Vol.15;Nr.12;p.1339-1347.
112. Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A randomized clinical trial. *American Journal of Sports Medicine*. 2010;Vol.38;Nr.5;p.924-933.
113. Basad E, Wissing FR, Fehrenbach P, Rickert M, Steinmeyer J, Ishaque B. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2015;Vol.23;Nr.12;p.3729-3735.
114. Filardo G, Kon E, Andriolo L, Di Matteo B, Balboni F, Marcacci M. Clinical profiling in cartilage regeneration: Prognostic factors for midterm results of matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation. *American Journal of Sports Medicine*. 2014;Vol.42;Nr.4;p.898-905.
115. Ogura T, Mosier BA, Bryant T, Minas T. A 20-Year Follow-up after First-Generation Autologous Chondrocyte Implantation. *American Journal of Sports Medicine*. 2017;Vol.45;Nr.12;p.2751-2761.
116. Visser J, Peters B, Burger TJ, Boomstra J, Dhert WJA, Melchels FPW, Malda J. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. *Biofabrication*. 2013;Vol.5;Nr.3;p.035007.
117. Kesti M, Eberhardt C, Pagliccia G, Kenkel D, Grande D, Boss A, Zenobi-Wong M. Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials. *Advanced Functional Materials*. 2015;Vol.25;Nr.48;p.7406-7417.
118. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*. 2011;Vol.23;Nr.12;p.41-56.
119. Li C, Chik T-K, Ngan AHW, Chan SCH, Shum DKY, Chan BP. Correlation between compositional and mechanical properties of human mesenchymal stem cell-collagen microspheres during chondrogenic differentiation. *Tissue Engineering*. 2011;Vol.17;Nr.5-6;p.777-788.
120. Daly AC, Freeman FE, Gonzalez-Fernandez T, Critchley SE, Nulty J, Kelly DJ. 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;Vol.6;Nr.22;p.1-20.
121. You F, Eames BF, Chen X. Application of extrusion-based hydrogel bioprinting for cartilage tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;Vol.18;Nr.1597;p.1-26.
122. Yin L, Wu Y, Yang Z, Denslin V, Ren X, Tee CA, Lai Z, Lim CT, Han J, Lee EH. Characterization and application of size-sorted zonal chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2018;Vol.165;p.66-78.
123. Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W. Mesenchymal Stem Cell Differentiation in an Experimental Cartilage Defect: Restriction of Hypertrophy to

- Bone-Close Neocartilage. *Stem Cells and Development*. 2009;Vol.18;Nr.7;p.969-978.
124. Gibson JD, O'Sullivan MB, Alaei F, Paglia DN, Yoshida R, Guzzo RM, Drissi H. Regeneration of Articular Cartilage by Human ESC-Derived Mesenchymal Progenitors Treated Sequentially with BMP-2 and Wnt5a. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017;Vol.6;Nr.1;p.40-50.
125. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, Lammi MJ. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013;Vol.45;Nr.8;p.1802-1812.
126. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*. 2009;Vol.30;Nr.3;p.204-213.
127. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1993;Vol.75;Nr.4;p.532-553.
128. van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L, Verhaar JAN, Weinans H, van Osch GJVM. Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. *Arthritis Research and Therapy*. 2004;Vol.6;Nr.5;p.469-476..
129. Akens MK, Von Rechenberg B, Bittmann P, Nadler D, Zlinszky K, Auer JA. Long term in-vivo studies of a photo-oxidized bovine osteochondral transplant in sheep. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2001;Vol.2;Nr.9;p.1-12.
130. Waselau AC, Nadler D, Müller JMV, Zlinszky K, Hilbe M, Auer JA, Von Rechenberg B. The effect of cartilage and bone density of mushroom-shaped, photooxidized, osteochondral transplants: An experimental study on graft performance in sheep using transplants originating from different species. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2005;Vol.6; Nr.60;p.1-12.
131. Xu X, Shi D, Shen Y, Xu Z, Dai J, Chen D, Teng H, Jiang Q. Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin. *Arthritis Research and Therapy*. 2015;Vol.17;Nr.1;p.20.
132. Lane JG, Massie JB, Ball ST, Amiel ME, Chen AC, Bae WC, Sah RL, Amiel D. Follow-Up of Osteochondral Plug Transfers in a Goat Model. *The American Journal of Sports Medicine*. 2004;Vol.32;Nr.6;p.1440-1450.
133. Gelse K, Riedel D, Pachowsky M, Hennig FF, Trattng S, Welsch GH. Limited integrative repair capacity of native cartilage autografts within cartilage defects in a sheep model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2015;Vol.33;Nr.3;p.390-397.
134. Yan H, Yu C. Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model. *Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2007;Vol.23;Nr.2;p.178-187.
135. Parsch D, Brümmendorf TH, Richter W, Fellenberg J. Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;Vol.46;Nr.11;p.2911-2916.

136. Barbero A, Grogan S, Schäfer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;Vol.12;Nr.6;p.476-484.
137. Martin JA, Mitchell CJ, Klingelhutz AJ, Buckwalter JA. Effects of telomerase and viral oncogene expression on the in vitro growth of human chondrocytes. *The Journals of Gerontology*. 2002;Vol.57;Nr.2;p.B48-53.
138. Cohen I, Melamed E, Robinson D, Nevo Z. Repair of articular cartilage lesions in aged chickens by allogeneic transplantation of fresh embryonic epiphyses. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2007;Vol.127;Nr.9;p.763-768.
139. Perka C, Schultz O, Lindenhayn K, Spitzer RS, Muschik M, Sittlinger M, Burmester GR. Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2000;Vol.18;Nr.1;p.13-22.
140. Dimicco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL. Integrative articular cartilage repair: Dependence on developmental stage and collagen metabolism. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;Vol.10;Nr.3;p.218-225.
141. Hunziker EB, Quinn TM. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2003;Vol.85;Nr.1;p.85-92.
142. Redman SN, Dowthwaite GP, Thomson BM, Archer CW. The cellular responses of articular cartilage to sharp and blunt trauma. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;Vol.12;Nr.2;p.106-116.
143. Archer CW, Redman S, Khan I, Bishop J, Richardson K. Enhancing tissue integration in cartilage repair procedures. *Journal of Anatomy*. 2006;Vol.209;Nr.4;p.481-493.
144. Peretti GM, Randolph MA, Caruso EM, Rossetti F, Zaleske DJ. Bonding of cartilage matrices with cultured chondrocytes: an experimental model. *Journal of Orthopaedic Research*. 1998;Vol.16;Nr.1;p.89-95.
145. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. Cartilage integration: Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *European Cells and Materials*. 2008;Vol.16;p.26-39.
146. Boushell MK, Hung CT, Hunziker EB, Strauss EJ, Lu HH. Current strategies for integrative cartilage repair. *Connective Tissue Research*. 2017;Vol.58;Nr.5;p.393-406.
147. Englert C, McGowan KB, Klein TJ, Giurea A, Schumacher BL, Sah RL. Inhibition of integrative cartilage repair by proteoglycan 4 in synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism*. 2005;Vol.52;Nr.4;p.1091-1099.
148. Lee DA, Bentley G, Archer CW. The control of cell division in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1993;Vol.1;Nr.2;p.137-146.
149. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Integration of engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;Vol.19;Nr.6;p.1089-1097.
150. Lee MC, Sung KLP, Kurtis MS, Akeson WH, Sah RL. Adhesive force of chondrocytes

- to cartilage: Effects of chondroitinase ABC. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000;Nr.370;p.286-294.
151. McGregor AJ, Amsden BG, Waldman SD. Chondrocyte repopulation of the zone of death induced by osteochondral harvest. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011;Vol.19;Nr.2;p.242-248.
 152. Mishima Y, Lotz M. Chemotaxis of Human Articular Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008;Vol.26;Nr.10;p.1407-1412.
 153. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*. 2016;Vol.98;p.1-22.
 154. Hunziker EB, Stähli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;Vol.16;Nr.9;p.1067-1073.
 155. Ferreira P, Gil MH, Alves P. An overview in surgical adhesives. *Recent Advances in Adhesions Research*. 2013;p.1-21.
 156. Kopeček J, Ulbrich K. Biodegradation of biomedical polymers. *Progress in Polymer Science*. 1983;Vol.9;Nr.1;p.1-58.
 157. Wang DA, Varghese S, Sharma B, Strehin I, Fermanian S, Gorham J, Fairbrother DH, Cascio B, Elisseeff JH. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nature Materials*. 2007;Vol.6;Nr.5;p.385-392.
 158. Maher SA, Mauck RL, Rackwitz L, Tuan RS. A nanofibrous cell-seeded hydrogel promotes integration in a cartilage gap model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2010;Vol.4;Nr.1;p.25-29.
 159. Petersen B, Barkun A, Carpenter S, Chotiprasidhi P, Chuttani R, Silverman W, Hussain N, Liu J, Taitelbaum G, Ginsberg GG. Tissue adhesives and fibrin glues. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*. 2004;Vol.60;Nr.3;p.327-333.
 160. Ryou M, Thompson CC. Tissue adhesives: A review. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*. 2006;Vol.8;Nr.1;p.33-37.
 161. Kirilak Y, Pavlos NJ, Willers CR, Han R, Feng H, Xu J, Asokanathan N, Stewart GA, Henry P, Wood D, Zheng MH. Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: Possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006;Vol.17;Nr.4;p.551-558.
 162. Kazusa H, Nakasa T, Shibuya H, Ohkawa S, Kamei G, Adachi N, Deie M, Nakajima N, Hyon SH, Ochi M. Strong adhesiveness of a new biodegradable hydrogel glue, LYDEX, for use on articular cartilage. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*. 2013;Vol.11;Nr.3;p.180-186.
 163. Sierra DH, Eberhardt AW, Lemons JE. Failure characteristics of multiple-component fibrin-based adhesives. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;Vol.59;Nr.1;p.1-11.
 164. Appelman TP, Mizrahi J, Elisseeff JH, Seliktar D. The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes. *Biomaterials*. 2011;Vol.32;Nr.6;p.1508-1516.

165. Elvin CM, Danon SJ, Brownlee AG, White JF, Hickey M, Liyou NE, Edwards GA, Ramshaw JAM, Werkmeister JA. Evaluation of photo-crosslinked fibrinogen as a rapid and strong tissue adhesive. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2010;Vol.93;Nr.2;p.687-695.
166. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;Vol.31;Nr.21;p.5536-5544.
167. Tayebi L, Rasoulianboroujeni M, Cui Z, Ye H. 3D-printed thick structured gelatin membrane for engineering of heterogeneous tissues. *Materials Letters*. 2018;Vol.217;p.39-43.
168. Bachet JE, Goudot B, Dreyfus GD, Banfi C, Ayle NA, Aota M, Brodaty D, Dubois C, Delentdecker P, Guilmet D. The proper use of glue: a 20-year experience with the GRF glue in acute aortic dissection. *The Journal of Cardiac Surgery*. 1997; Vol.12;Nr.2;p.243-253.
169. Fukunaga S, Karck M, Harringer W, Cremer J, Rhein C, Haverich A. The use of gelatin-resorcín-formalin glue in acute aortic dissection type A. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 1999;Vol.15;Nr.5;p.564-569.
170. Erasmi AW, Sievers HH, Wohlschläger C. Inflammatory response after biogluce application. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2002;Vol.73;Nr.3;p.1025.
171. Lim KS, Schon BS, Mekhileri N V., Brown GCJ, Chia CM, Prabakar S, Hooper GJ, Woodfield TBF. New Visible-Light Photoinitiating System for Improved Print Fidelity in Gelatin-Based Bioinks. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2016;Vol.2;Nr.10;p.1752-1762.
172. Benton JA, DeForest CA, Vivekanandan V, Anseth KS. Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function. *Tissue Engineering*. 2009;Vol.15;Nr.11;p.3221-3230.
173. Elvin CM, Vuocolo T, Brownlee AG, Sando L, Huson MG, Liyou NE, Stockwell PR, Lyons RE, Kim M, Edwards GA, Johnson G, McFarland GA, Ramshaw JAM, Werkmeister JA. A highly elastic tissue sealant based on photopolymerised gelatin. *Biomaterials*. 2010;Vol.31;Nr.32;p.8323-8331.
174. Bertlein S, Brown G, Lim KS, Jungst T, Boeck T, Blunk T, Tessmar J, Hooper GJ, Woodfield TBF, Groll J. Thiol–Ene Clickable Gelatin: A Platform Bioink for Multiple 3D Biofabrication Technologies. *Advanced Materials*. 2017;Vol.29;Nr.44;p.1703404.
175. Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2002;Vol.1;Nr.4;p.225-236.
176. Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2009;Vol.30;Nr.35;p.6702-6707.
177. Jones CA, Huberman E, Cunningham ML, Peak MJ. Mutagenesis and cytotoxicity in human epithelial cells by far- and near-ultraviolet radiations: action spectra. *Radiation Research*. 1987;Vol.110;Nr.2;p.244-254.

178. Shih H, Lin C-C. Visible-Light-Mediated Thiol-Ene Hydrogelation Using Eosin-Y as the Only Photoinitiator. *Macromolecular Rapid Communications*. 2013;Vol.34;Nr.3;p.269-273.
179. Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A, Lee M. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2012;Vol.8;Nr.5;p.1730-1738.
180. Fancy DA, Kodadek T. Chemistry for the analysis of protein–protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Chemistry Biochemistry*. 1999;Vol.96;Nr.11;p.6020-6024.
181. Sando L, Danon S, Brownlee AG, Mcculloch RJ, Ramshaw JAM, Elvin CM, Werkmeister JA. Photochemically crosslinked matrices of gelatin and fibrinogen promote rapid cell proliferation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011;Vol.5;Nr.5;p.337-346.
182. Vuocolo T, Haddad R, Edwards GA, Lyons RE, Liyou NE, Werkmeister JA, Ramshaw JAM, Elvin CM. A highly elastic and adhesive gelatin tissue sealant for gastrointestinal surgery and colon anastomosis. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2012;Vol.16;Nr.4;p.744-752.
183. K, Aeschlimann D, Cavin V, Genge M, Hunziker EB. A new biological glue for cartilage-cartilage interfaces. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1997;Vol.79;Nr.2;p.185-193.
184. Reindel ES, Ayroso AM, Chen AC, Chun DM, Schinagl RM, Sah RL. Integrative repair of articular cartilage in vitro: Adhesive strength of the interface region. *Journal of Orthopaedic Research*. 1995;Vol.13;Nr.5;p.751-760.
185. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Integration of engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;Vol.19;Nr.6;p.1089-1097.
186. Khan IM, Gonzalez LG, Francis L, Conlan RS, Gilbert SJ, Singhrao SK, Burdon D, Hollander AP, Duance VC, Archer CW. Interleukin-1 β enhances cartilage-to-cartilage integration. *European Cells and Materials*. 2011;Vol.22;p.190-201.
187. Djouad F, Rackwitz L, Song Y, Janjanin S, Tuan RS. ERK1/2 activation induced by inflammatory cytokines compromises effective host tissue integration of engineered cartilage. *Tissue Engineering*. 2009;Vol.15;Nr.10;p.2825-2835.
188. Schaefer DB, Wendt D, Moretti M, Jakob M, Jay GD, Heberer M, Martin I. Lubricin reduces cartilage-cartilage integration. *Biorheology*. 2004;Vol 41.;Nr.3-4;p.503-508.
189. Lin H, Cheng AWM, Alexander PG, Beck AM, Tuan RS. Cartilage tissue engineering application of injectable gelatin hydrogel with in situ visible-light-activated gelation capability in both air and aqueous solution. *Tissue Engineering*. 2014;Vol.20;Nr.17-18;p.2402-2411.
190. Maher SA, Mauck RL, Rackwitz L, Tuan RS. A nanofibrous cell-seeded hydrogel promotes integration in a cartilage gap model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2010;Vol.4;Nr.1;p.25-29.

191. Rackwitz L, Djouad F, Janjanin S, Nöth U, Tuan RS. Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte- and mesenchymal stem cell-laden hydrogels in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014;Vol.22;Nr.8;p.1148-1157.
192. Athens AA, Makris EA, Hu JC. Induced Collagen Cross-Links Enhance Cartilage Integration. *PLOS ONE*. 2013;Vol.8;Nr.4;p.e60719.
193. Sitterle VB, Nishimuta JF, Levenston ME. Photochemical approaches for bonding of cartilage tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;Vol.17;Nr.12;p.1649-1656.
194. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis and Cartilage*. 1999;Vol.7;Nr.1;p.15-28.
195. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;Vol.10;Nr.6;p.432-463.
196. GMS | Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2017) | Extracellular matrix development and cell invasion at the defect site in an in vitro model for cartilage integration.
197. Elvin CM, Brownlee AG, Huson MG, Tebb TA, Kim M, Lyons RE, Vuocolo T, Liyou NE, Hughes TC, Ramshaw JAM, Werkmeister JA. The development of photochemically crosslinked native fibrinogen as a rapidly formed and mechanically strong surgical tissue sealant. *Biomaterials*. 2009;Vol.30;Nr.11;p.2059-2065.
198. Tam HK, Srivastava A, Colwell CW, D’Lima DD. In vitro model of full-thickness cartilage defect healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007;Vol.25;Nr.9;p.1136-1144.
199. Bos PK, DeGroot J, Budde M, Verhaar JAN, Van Osch GJVM. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: Implications for integrative cartilage repair. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;Vol.46;Nr.4;p.976-985.
200. Powei L, Chunan C, Alex M, Chris C, Kurt S, Steve L. Partially enzymatic treatment to improve integrative repair of cartilage. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology - Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress*. 2016.
201. Englert C, Blunk T, Müller R, von Glasser SS, Baumer J, Fierlbeck J, Heid IM, Nerlich M, Hammer J. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Research and Therapy*. 2007;Vol.9;Nr.3;p.R47.
202. Kossmann A. Knorpelintegration - Etablierung eines Push-out-Modells und Untersuchung von BioGlue® als Knorpeladhäsivum. 2018.
203. Luthra S, Theodore S, Tatoulis J. Bioglue: A Word of Caution. *Annals of Thoracic Surgery*. 2008;Vol.86;Nr.3;p.1055-1056.
204. Archer CW, Redman S, Khan I, Bishop J, Richardson K. Enhancing tissue integration in cartilage repair procedures. *Journal of Anatomy*. Vol 209; 2006;p481-493.
205. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie G, Ginsberg MH. Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood*.

- 1987;Vol.70;Nr.1;p.110-115.
206. Yamamoto M, Yamato M, Aoyagi M, Yamamoto K. Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*. 1995;Vol.219;Nr.1;p.249-256.
207. Syedain ZH, Bjork J, Sando L, Tranquillo RT. Controlled compaction with ruthenium-catalyzed photochemical cross-linking of fibrin-based engineered connective tissue. *Biomaterials*. 2009;Vol.30;Nr.35;p.6695-6701.
208. Van Vlierberghe S, Cnudde V, Dubruel P, Masschaele B, Cosijns A, De Paepe I, Jacobs PJS, Van Hoorebeke L, Remon JP, Schacht E. Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules*. 2007;Vol.8;Nr.2;p.331-337.
209. Lee Y, Lee JM, Bae P-K, Chung IY, Chung BH, Chung BG. Photo-crosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. *Electrophoresis*. 2015;Vol.36;Nr.7-8;p.994-1001.
210. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015;Vol.73;p.254-271.
211. Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg AJWP, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology*. 2016;Vol.34;Nr.5;p.394-407.
212. Izadifar Z, Chen X, Kulyk W. Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair. *Journal of Functional Biomaterials*. 2012;Vol.3;Nr.4;p.799-838.
213. Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. *Accounts of Chemical Research*. 2017;Vol.50;Nr.8;p.1976-1987.
214. Conrad B, Han L-H, Yang F. Gelatin-Based Microribbon Hydrogels Accelerate Cartilage Formation by Mesenchymal Stem Cells in Three Dimensions. *Tissue Engineering*. 2018;Vol.24;Nr.21-22;p.1631-1640.

8 Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2d	zweidimensional
3d	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAIS®	<i>Cartilage Autograft Implantation System</i>
Col I	Kollagen I
Col II	Kollagen II
CalceinAM	<i>Calcein acetoxymethyl ester</i>
DAB	P-Dimethylamino-Benzaldehyd
DAKO	<i>Glycergel Mounting Medium</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-Diaminopropyl-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EthD	Ethidium Homodimer III
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	Fetales bovines Serum
FGE	Fortgeschrittene Glykationsendprodukte

GAG	Glykosaminoglykane
GelAGE	Allyl-Glycyl-Ether-substituierte Gelatine
GelMA	Methacryloyl-substituierte Gelatine
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i>
IHC	Immunhistochemisch
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
KCl	Kaliumchlorid
Kol I	Kollagen I
Kol II	Kollagen II
kPA	kilo Pascal
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-Trimethylbenzoylphosphinat
LED	<i>Light emitting diode</i>
M	Mol
MACI	Matrix-assistierte autologe Chondrozytenimplantation
MEM NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
Min	Minuten
mL	milli Liter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
Ms-IgG	Maus-Immunglobulin G
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid</i>
mW	milli Watt
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid

OA	Osteoarthrose
P/S	Penicillin/Streptomycin
P1	Passage-1-Zellen
P2	Passage-2-Zellen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PG	Proteoglykane
pH	Potenzial des Wasserstoffs
PTOA	Posttraumatische Osteoarthrose
Rb-IgG	Kaninchen-Immunglobulin-G
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
Ru(III)	Tris(2,2-Bipyridyl)Dichlororuthenium(II)Hexahydrat
RuFib	Fibrinogen, durch Rutheniumkomplex quervernetzt
RuGel	Gelatine, durch Rutheniumkomplex quervernetzt
Sek	Sekunden
SPS	Bis-(Natriumsulfopropyl)-Disulfid
STZ	Superfizielle Zone
TBS-T	Tris-NaCl mit 0,1 % Tween 20
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
USB	<i>Universal serial bus</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascoendothelial growth factor</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Abbildung der makromolekularen Organisation von adultem Gelenkknorpel. Das Gewebe unterteilt sich in vier verschiedene Zonen: die superfizielle (STZ), die mittlere (Middle zone), die tiefe (Deep zone) und die Zone des kalzifizierenden Knorpels (Calcified zone), unter der sich der subchondrale Knochen befindet. Jede Zone ist einzigartig hinsichtlich ihrer Zellmorphologie (mitte-linker Ausschnitt) und der Kollagenfibrillenorganisation (rechter Ausschnitt). Bild entstammt Buckwalter et. al ¹⁷, mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. 3
- Abbildung 2: Systematische Illustration des lichtaktivierten Crosslink-Mechanismus durch Ruthenium und SPS. A: erster Schritt: Ru absorbiert Photonen aus dem sichtbaren Spektrum und gerät in einen erregten Zustand. B: Struktur des Metall-Komplexes Tris(2,2-Bipyridyl)Dichlororuthenium(II)Hexahydrat (Ru). C: Systematische Illustration der Kettenreaktion, unter oxidativer Bindung zweier Tyrosine. Bild entstammt Fancy et Kodadek ¹⁸⁰ mit freundlicher Genehmigung der National Academy of Sciences, Copyright © 2000. 20
- Abbildung 3: Knorpelextraktion; A: geschlossene Gelenkkapsel; B: freigelegter Gelenkknorpel; C: Herauslösen der Knorpelplatte; D: Knorpelplatte 31
- Abbildung 4: Herstellung der Proben für das Push-Out-Modell (nicht maßstabsgetreu); 1: Stanzen des Zylinders mit der 6-mm-Biopsiestanze aus dem Gelenkknorpel; 2: gestanzter 6-mm-Zylinder; 3: Beidseitiges Trimmen mit Rasierklingen auf Höhe von 1 mm in Schneidemodul (s. Abb. 5); 4: geschnittener 1 mm hoher Zylinder; 5: Stanzen des Knorpelkerns mit 3-mm-Biopsiestanze; 6: fertiger Knorpelring und -kern 33
- Abbildung 5: Trimmen der Konstrukte und Stanzen des Knorpelkerns mittels 3-mm-Stanze; A: Trimmen der Knorpelkonstrukte auf eine einheitliche Höhe mittels Schneidemodul und Rasierklingen (nicht mit abgebildet); B: Haltevorrichtung mit 3-mm-Stanze; C: 6-mm-Knorpelring und 3-mm-Knorpelkern; der Kern wird anschließend mittels des Adhäsivums in den Ring geklebt. 33
- Abbildung 6: Grundeinheit; A: die Grundplatte mit Probenhalterung wurde auf dem Boden der Prüfmaschine fixiert; B: Probenhalterung mit Deckel = Ausrichtungseinheit; C: der Stempel fuhr senkrecht von oben durch den Deckel auf die Probe herab 37
- Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau (nicht maßstabsgetreu); Grundeinheit: Grundplatte, Feststellschrauben, Probenhalterung, Ausrichtungseinheit; Messeinheit: Kraftaufnehmer, Haltevorrichtung, Stempel. 38
- Abbildung 8: Schematischer Kurvenverlauf: A: Steigung der Kurve, abhängig vom Elastizitätsmodul; B: Peak, entspricht der gemessenen Maximalkraft; C: Plateau, entspricht der Kraft bzw. dem Weg, bis der Kern durch den Ring gedrückt worden ist 39

- Abbildung 9: Push-Out-Messungen der Sofortadhäsion nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml; Bei Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden sind; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe Knorpel; Δ: signifikant gegenüber RuFib Knorpel. 47
- Abbildung 10: Push-Out-Messungen der Sofortadhäsion nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml, und vorher durchgeführtem enzymatischem Andau. Andau mit Pepsin oder Trypsin, bzw. ohne Andau als Kontrolle; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib ohne Enzyme; Δ: signifikant gegenüber der Gruppe RuGel ohne Enzyme. 48
- Abbildung 11: Push-Out-Messungen der Langzeitintegration nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 150 mg/ml, nach bis zu drei Wochen Kultivierung. d0-Werte aus vorherigen Versuchsreihen sind ergänzend mit dargestellt, bei den d0-Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden waren. 50
- Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahmen der Gruppen RuFib 150/ml und RuGel 150 mg/ml nach mechanischer Messung an d7; Untersuchung der Zellvitalität und Viabilität mittels MTT; Pfeile markieren inneren Rand des Knorpelrings; Knorpelkerne fehlen, da die mechanische Messung bereits erfolgt ist..... 51
- Abbildung 13: Makroskopische Aufnahme der Knorpelkonstrukte vor mechanischer Messung; Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT an d21; Aufhellungen entsprechen Lichtreflexionen. 51
- Abbildung 14: Push-Out-Messungen der Langzeitintegration nach Applikation der Kleber RuFib und RuGel, jeweils 100 mg/ml, nach bis zu drei Wochen Kultivierung. Bei den d0-Werten für die Kontrollgruppe handelt es sich dabei um validierte Messwerte, die im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erhoben worden waren. *: signifikant gegenüber der Kontrolle d0; *: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe d7; Δ: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib d0; o: signifikant gegenüber der Kontrollgruppe d21; +: signifikant gegenüber der Gruppe RuGel d0. 53
- Abbildung 15: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d21. 54
- Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung der Integrationsfläche an d21 zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels DAB-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml..... 55
- Abbildung 17: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100

- mg/ml an d0,d3, d7, d10, d14, d21; Chondrozytenmigration war bei RuFib ab d10, bei RuGel ab d7 sichtbar, Matrixsynthese war bei RuFib ab d7, bei RuGel ab d3 sichtbar. 57
- Abbildung 18: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d0,d3, d7, d10, d14, d21; Matrixsynthese war bei RuFib ab d7, bei RuGel ab d3 sichtbar, Chondrozytenmigration war bei bei RuFib noch nicht, bei RuGel ab d7 sichtbar. 58
- Abbildung 18, Fortsetzung: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml an d10, d14, d21; Chondrozytenmigration war bei RuFib ab d10 sichtbar. 59
- Abbildung 19: Makroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit 20×10^6 Zellen/mL der Gruppen RuFib und RuGel 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml an d14. RuFib und RuGel verhielten sich abhängig von ihrer Konzentration entgegengesetzt: RuFib zeigte sich mit steigender Konzentration instabiler, RuGel zeigte sich mit steigender Konzentration stabiler. 62
- Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit Safranin-O-Färbung an d14. Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/mL der Gruppen RuFib und RuGel jeweils 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml; RuFib und RuGel verhielten sich abhängig von ihrer Konzentration entgegengesetzt: RuFib zeigte mit steigender Konzentration stärkere Organisation und Matrixsynthese, RuGel zeigte mit sinkender Konzentration stärkere Organisation und Matrixsynthese. 63
- Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit DAB-Färbung an d14; Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/ μ L der Gruppen RuFib und RuGel jeweils 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml; RuGel zeigt in allen Konzentrationen deutlich größere Mengen an gebildetem Kollagen II als RuFib. 64
- Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen besiedelter Gele mit Live/Dead-Färbung an d14; Mit Passage-2-Chondrozyten besiedelte Gele mit 20×10^6 Zellen/ μ L der Gruppe RuGel 150 mg/ml mit überwiegend grün leuchtenden vitalen Chondrozyten; Balkengröße in A: 200 μ m, in B: 100 μ m. 65
- Abbildung 23: Push-Out-Messungen der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml, besiedelt mit 17×10^6 Zellen/ml; Kontrolle ohne Kleber und Zellen an d21; Mittelwerte mit Standardabweichungen; *: signifikant gegenüber der Gruppe RuFib. 67
- Abbildung 24: Histologische Darstellung der Integrationsfläche zwischen Knorpelring und Knorpelkern mittels Safranin-O-Färbung der Gruppen RuFib und RuGel 100 mg/ml, besiedelt mit 17×10^6 Zellen/ml; Kontrolle ohne Kleber und Zellen an d21; Chondrozytenmigration war bei RuGel stärker als bei RuFib, in der Kontrolle gar nicht sichtbar. 68

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation osteochondraler Verletzungen nach der ICRS-Skala.....	4
Tabelle 2: Klassifikation osteochondraler Verletzungen nach der Outerbridge-Klassifikation	5
Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Instrumente	25
Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Materialien	26
Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Chemikalien	27

8.4 Curriculum Vitae

Maximilian Meister

Adresse: Bronnbachergasse 21
97070 Würzburg
Kontaktdaten: Tel: 0157-86386284
Email: joma-meister@web.de
Geboren: Am 01.02.1994 in Detmold

Klinische Erfahrung

- **Seit 07/2020** | Ausbildung zum Facharzt für Psychiatrie und Psychotherapie am Zentrum für psychische Gesundheit der Universitätsklinik Würzburg
07/2020-04/2021: Wahlleistungsstation 5West
Seit 04/2021: Fachstation für Bipolare Erkrankungen 3West

Studium

- **2012-2019** | **Studium der Humanmedizin**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1. Staatsexamen 10/2014, Note 2
2. Staatsexamen 10/2018, Note 2
3. Staatsexamen 12/2019, Note 1

Schule

- **2004-2012** | **Droste-Hüllshoff-Gymnasium Meersburg**
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Note 1,4)

Würzburg, 11/2021

Max Meister