

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie (Chirurgische Klinik II)

des Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

**Einfluss der perizellulären Matrix auf die Produktion extrazellulärer Matrix von
nativen porcinen Chondrozyten im 3D-Bioprinting in Agarose-Hydrogelen**
in vitro

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Gastberger

aus München

Augsburg, 05.07.2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk
Korreferent: Dr. habil. Jörg Teßmar
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2023

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Knorpelgewebe	1
1.1.1	Arten von Knorpelgewebe	1
1.1.2	Gelenkknorpel.....	1
1.1.3	Chondrozyten und Perizelluläre Matrix.....	2
1.1.4	Einfluss mechanischer Belastung auf Chondrozyten	3
1.2	Knorpeldefekte und Reparaturmechanismen	6
1.2.1	Arthrose	7
1.2.2	Klinische Möglichkeiten und Regenerative Medizin	8
1.2.3	Tissue Engineering	10
1.3	Cartilage Tissue Engineering	11
1.3.1	Zelltypen für Cartilage Tissue Engineering.....	11
1.3.2	Scaffolds	13
1.4	Bioprinting	15
1.4.1	Durchführung und Ablauf des Bioprintings	16
1.4.2	Vorteile und Chancen	16
1.4.3	Einwirkende Kräfte und Nachteile des Bioprintings	17
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	18
1.5.1	PZM als Schutz der Chondrozyten vor mechanisch bedingten Zellschäden	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Instrumente und Geräte.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	23

2.1.3	Chemikalien.....	25
2.1.4	Antikörper.....	28
2.1.5	Zellen und Zellkulturmedium.....	28
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7	Software.....	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Extraktion des Gelenkknorpels.....	32
2.2.2	Isolation der Chondrozyten.....	32
2.2.3	Gießen von Agarosehydrogelen.....	35
2.2.4	3D-Bioprinting mit Agarose-Biotinte.....	35
2.2.5	3D-Kultur.....	36
2.2.6	Ermittlung der Temperaturniveaus.....	37
2.2.7	Live/Dead-Assay.....	37
2.2.8	Qualitative Auswertung mittels Histologie und Immunhistochemie.....	37
2.2.9	Biochemische Assays.....	40
2.2.10	Statistische Auswertung.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Etablierung der Isolationsprotokolle.....	43
3.1.1	Isolationsprotokolle für Chondrozyten mit PZM.....	43
3.1.2	Isolationsprotokolle für Chondrozyten ohne PZM.....	48
3.2	Chondrozyten mit und ohne PZM, Bioprinting vs. cast.....	50
3.2.1	Zellzahl und Zellüberleben.....	50
3.2.2	Synthese von Knorpelmatrixbestandteilen.....	52
3.3	Chondrozyten mit und ohne PZM nach cast und Bioprinting unter temperaturkontrollierten Bedingungen.....	58

3.3.1	Auswahl geeigneter Temperaturbedingungen	58
3.3.2	Zellzahl und Zellüberleben	59
3.3.3	Synthese von Knorpelmatrixbestandteilen	63
4	Diskussion	74
4.1	Ergebnisse der Arbeit im wissenschaftlichen Kontext.....	74
4.1.1	Isolation von Chondrozyten mit und ohne PZM	74
4.1.2	3D-Bioprinting ohne Beeinträchtigung des Zellüberlebens	75
4.1.3	Verringerte Kollagenproduktion durch Chondrozyten ohne PZM.....	76
4.1.4	Beeinträchtigung der GAG-Synthese von Chondrozyten ohne PZM durch 3D-Bioprinting.....	79
4.2	Limitationen und Stärken dieser Arbeit	81
4.3	Ausblick	83
5	Zusammenfassung.....	85
6	Literaturverzeichnis.....	87
	Appendix	1
I.	Abbildungsverzeichnis	1
II.	Tabellenverzeichnis.....	3
III.	Abkürzungsverzeichnis	4
IV.	Danksagung.....	1

1 EINLEITUNG

1.1 KNORPELGEWEBE

Knorpelgewebe ist ein zellarmes, avaskuläres, alymphatisches und nicht innerviertes Stützgewebe, das zum Großteil aus extrazellulärer Matrix besteht. Diese wird aus den Hauptkomponenten Kollagen und Proteoglykanen gebildet. Sie sind Syntheseprodukte der Chondrozyten, die die vorherrschende Zellart im Knorpelgewebe darstellen. Eine wichtige Eigenschaft von Knorpelgewebe ist die Druckelastizität, die durch die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) bestimmt wird.¹

1.1.1 Arten von Knorpelgewebe

Im menschlichen Körper werden drei Arten von Knorpelgeweben unterschieden: Hyaliner Knorpel, der unter anderem die artikulierende Oberflächen diarthrotischer Gelenke überzieht, Elastischer Knorpel und Faserknorpel. Elastischer Knorpel enthält neben Kollagen auch elastische Fasern und findet sich in nicht-lasttragenden Geweben wie zum Beispiel der Ohrmuschel. Faserknorpel hingegen zeichnet sich durch eine hohe Festigkeit des Gewebes aus und ist daher an mechanisch stark beanspruchten Stellen wie an chondralen Sehnenansätzen, der Symphysis pubica sowie als Hauptbestandteil der Disci articulares und Disci intervertebrales zu finden. Hyaliner Knorpel ist die im menschlichen Körper überwiegend vorkommende Knorpelart.¹

1.1.2 Gelenkknorpel

Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels wird vor allem durch Kollagene, Grundsubstanz und Wasser gebildet. 90-95 % des Kollagens in hyalinem Knorpel stellt Kollagen-Typ-II dar. Daneben finden sich Kollagen-Typ-IX und -Typ-XI Die sogenannte Grundsubstanz wird überwiegend durch Proteoglykane gebildet. Sie sind negativ geladene Moleküle und setzen sich aus vernetzten Glykosaminoglykanen (GAG) zusammen.² Durch die negative Ladung ihrer Peptidketten vermag die EZM große Mengen an Wasser zu binden, sodass dieses mit rund 60-80 % den Hauptbestandteil des Feuchtgewichts von hyalinem Knorpel darstellt und maßgeblich zu seiner stoßdämpfenden Funktion innerhalb des Gelenkes beiträgt. Da sich das Wasser zu ca.

80 % an der Oberfläche der EZM befindet, ermöglicht es außerdem ein möglichst reibungsarmes Gleitverhalten der mit Knorpel überzogenen Gelenkkörper.¹

Den ersten feingeweblichen Untersuchungen von Knorpelgewebe durch Benninghoff folgend zeigt sich schon mit bloßem Auge ein geschichteter Aufbau von Gelenkknorpel.³ Mikroskopisch lässt sich der Gelenkknorpel orthogonal zur Gelenkoberfläche in vier Zonen einteilen: Die oberflächliche Zone oder auch tangentielle Zone genannt, die mittlere oder Übergangszone sowie die tiefe bzw. Radiärzone. Ihr folgt eine Zone von mineralisiertem Knorpel, die einen Übergang zum subchondralen Knochen darstellt.^{1,3} In der oberflächlichen Zone verlaufen die Kollagenfibrillen tangential zur Oberfläche. Von dort aus nehmen die Kollagenfibrillen über die Übergangszone bis hin zur mineralisierten Zone einen zur Oberfläche zunehmend senkrechten Verlauf an und verankern schließlich den Knorpel im subchondralen Knochen.⁴ Die Morphologie der Chondrozyten verändert sich mit zunehmender Tiefe des Knorpelgewebes: Während die Zellen in der oberflächlichen Zone längliche Zellkörper in Ausrichtung der Kollagenfibrillen aufweisen, präsentieren sie sich in der Übergangszone als ovale bis runde Zellen.³ Mit zunehmender Tiefe nimmt die Anzahl der Zellen ab.⁴

1.1.3 Chondrozyten und Perizelluläre Matrix

Chondrozyten stellen die überwiegende zelluläre Komponente im Knorpelgewebe dar und entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Innerhalb der Knorpelmatrix liegen Chondrozyten einer isogenen Gruppe, die aus einem gemeinsamen Chondroblasten hervorgegangen sind, eingebettet in einem sogenannten Territorium vor. Die einzelnen Territorien sind durch EZM bzw. interterritoriale Matrix voneinander getrennt.^{1,3}

Der einzelne Chondrozyt ist von einer perizellulären Matrix (PZM) umgeben. Sie liegt als dünne, 2-4 µm dicke Schicht der Zelle direkt an und wird unter anderem aus den Kollagen-Typen II, VI und IX sowie Aggrecan gebildet. Kollagen-Typ-VI lässt sich dabei ausschließlich in der perizellulären Matrix nachweisen und wird daher als spezifischer PZM-Marker verwendet.⁵ Ein Chondrozyt, seine PZM und eine umgebende Kapsel werden zusammen als Chondron bezeichnet und stellen die primäre funktionelle Einheit von hyalinem Knorpel dar.^{1,6-8} Über die PZM werden die Chondrozyten mit der territorialen Matrix sowie der interterritorialen Matrix verankert.⁹ Daneben nimmt die

PZM eine wichtige Rolle in der Transduktion von biomechanischen und biochemischen Signalen ein, die Einfluss auf den Stoffwechsel und damit den physiologischen EZM-Turnover, die Homöostase aus Auf- und Abbau des Knorpelgewebes, haben. Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor* (TGF)- β und *fibroblast growth factor* (FGF-2) können während ihrer Passage durch die PZM an deren Strukturelemente gebunden werden. Die PZM wirkt somit als Filter und modulierende Komponente in den Signalwegen der Chondrozyten mit ihrer Umgebung.^{5,7,9} Ihre Integrität ist für einen ausgeglichenen Zellmetabolismus und die Funktionalität der Chondrozyten in situ unerlässlich.⁹

Die spezifische Zusammensetzung von PZM und EZM zeigt deutliche strukturelle Unterschiede, die mit veränderten biomechanischen und physiologischen Eigenschaften einhergehen. Durch ihr Zusammenspiel wird eine optimale Umgebung für die Chondrozyten geschaffen, die zum einen Schutz vor mechanischer Belastung, zum anderen aber auch eine gerichtete Weiterleitung von mechanischen Signalen sowie molekularen Boten- und Nährstoffen ermöglicht.^{10,11}

1.1.4 Einfluss mechanischer Belastung auf Chondrozyten

1.1.4.1 Aufbau von diarthrotischen Gelenken

Gelenke stellen eine Verbindung zwischen Knochen dar und können in Synarthrosen und Diarthrosen unterteilt werden. Diarthrosen, oder auch echte Gelenke, beschreiben diskontinuierliche Gelenke, in denen die Gelenkkörper im Gegensatz zu Synarthrosen durch einen Gelenkspalt voneinander getrennt sind. Der Gelenkspalt ist mit synovialer Gelenkflüssigkeit gefüllt, die ein nahezu reibungsloses Gleiten der Gelenkkörper ermöglicht und gleichzeitig die Nährstoffversorgung des avaskulären Gelenkknorpels, der die Gelenkflächen überzieht, gewährleistet. Das Gelenk wird von einer Gelenkkapsel, bestehend aus der äußeren, bindegewebigen Membrana fibrosa sowie einer inneren Membrana synovialis, luftdicht umschlossen. Einige Gelenke, wie zum Beispiel das Kniegelenk, verfügen darüber hinaus über weitere intraartikuläre Hilfsstrukturen wie die Menisken. Sie ermöglichen eine gleichmäßig geformte Gelenkfläche und reduzieren durch Vergrößerung der Kontaktflächen zusätzlich die durch körperliche Bewegung entstehende Belastung des Kniegelenks.¹²⁻¹⁴

1.1.4.2 Biomechanik von Gelenken

Die während der Bewegung einwirkenden Kräfte sind abhängig von den Freiheitsgraden eines Gelenkes und damit wiederum Konsequenz von Form und Beschaffenheit der Gelenkkörper sowie der intra- und extraartikulären Hilfsstrukturen.^{12,14}

Unter alltäglichen Bedingungen wirken in den großen menschlichen Gelenken je nach Geschlecht und interindividuellen Unterschieden im Bewegungsablauf beim normalen Gehen Drücke von 3-7 MPa und unterer stärkerer Belastung wie etwa beim Treppensteigen Spitzendrücke bis 18 MPa.^{15,16} Im Wesentlichen lässt sich die biomechanische Belastung der Gelenkstrukturen während physiologischer körperlicher Aktivität als dynamische Kompression beschreiben, die innerhalb des Knorpelgewebes zu Spannung, Dehnung und hydrostatischem Druck führt.¹⁷ Die Chondrozyten werden unter physiologischen Belastungen Kompressions-, Zug- und Scherkräften ausgesetzt.¹⁸

In Abhängigkeit von körperlichem Trainings- und Ernährungszustand kann die Reaktion des Gelenkknorpels auf mechanische Belastung unterschiedlich ausgeprägt sein: Während eine nicht-physiologische Belastung mit hohen Spitzendrücken weithin als schädlich für das Knorpelgewebe anerkannt wird, stellt eine physiologische dynamische Kompression einen elementaren Stimulus für die Synthese von Matrixkomponenten durch die Chondrozyten dar.^{17,19} Regelmäßiges körperliches Training kann in gesundem Gewebe bei normalgewichtigen Erwachsenen außerdem zu einer Konditionierung des Gelenkknorpels führen. Dies geht mit einer verbesserten Resilienz des Knorpelgewebes nach mechanischer Belastung einher.¹⁹

1.1.4.3 Einfluss mechanischer Belastung auf Chondrozyten

Die Weiterleitung mechanischer Belastungen und ihre Umwandlung in biochemische Signale erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen und in einem engen Zusammenspiel der Eigenschaften der Knorpelmatrix. Dabei wirken die Steifigkeit von EZM und PZM, ihre Komposition aus unterschiedlichen Strukturelementen, die Regulation über Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie Eigenschaften der Chondrozyten selbst in einem vielschichten System zusammen.

Zahlreiche Studien zur Erforschung der biomechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe haben die Komponenten des Knorpelgewebes - EZM, PZM und Chondrozyten - anhand ihres Elastizitätsmoduls charakterisiert, der die Veränderung von Spannung und Dehnung durch Verformung eines Festkörpers beschreibt und somit Auskunft über die Festigkeit und Elastizität eines Werkstoffes gibt.²⁰ Die EZM zeichnet sich hierbei durch den höchsten Elastizitätsmodul aus und ist somit allgemein fester als PZM und Chondrozyten. Allerdings variieren die gemessenen Werte je nach Knorpelschicht stark: In der oberflächlichen Tangentialzone ist der Elastizitätsmodul deutlich niedriger als in der tiefen Zone. Der Elastizitätsmodul der PZM ist um ein Vielfaches geringer als der der EZM. In gesundem Knorpelgewebe zeigt es dabei durch alle Zonen hinweg in einen konstanten Wert von 40-70 kPa. Dieser ist 2-3fach so hoch wie der eines einzelnen Chondrozyten.^{11,21,22} Die einwirkende mechanische Belastung auf den Gelenkknorpel nimmt von oberflächlicher zu tiefer Schicht stark ab, während die Steifigkeit der EZM von oben nach unten hin zunimmt, sodass die Belastung auf die Zellen in der oberflächlichen Zone am größten wäre.¹¹ Durch die gleichförmige biomechanische Steifigkeit der PZM wird im Zusammenspiel eine uniforme mechanische Belastung der Chondrozyten erzielt. In der oberflächlichen Zone nimmt die PZM eine abschirmende Funktion ein, während sie in tieferen Schichten das mechanische Signal auf die Chondrozyten verstärkt.²²

In Umwandlung der physikalischen Belastung der PZM in physikochemische und biochemische Veränderungen der perizellulären Umgebung spielt die Zusammensetzung der PZM eine große Rolle: Perlecan ist ein PZM-typisches Proteoglykan, das interstitielles Wasser binden kann. Durch Kompression wird dieses aus dem netzartigen Gewebe der PZM herausgepresst. Dadurch nimmt die scheinbare Konzentration an Perlecan und die negative Ladung zu, was zu Veränderungen in der Osmolalität der Zellumgebung führt. So können Signalwege wie aber auch die Morphologie der Zelle beeinflusst werden.^{10,11,22} Des Weiteren stellt Perlecan ein Reservoir für Wachstumsfaktoren wie FGF-2 dar, sodass auch ein Zusammenhang von mechanischer Belastung der PZM und der Freisetzung dieser Wachstumsfaktoren angenommen wird.²²

Zudem sind zelluläre Strukturen der Chondrozyten in die Transduktion von mechanischen Reizen in intrazelluläre Signalwege mit Veränderungen der Genexpression involviert. Dabei sind sowohl Strukturen wie Integrin-Rezeptoren, mechanisch-aktivierte Ionenkanäle und primäre Zilien als Strukturen an der Zelloberfläche, über die die Zellen mit PZM und EZM verankert sind, wie auch das Zytoskelett an der Aktivierung von anabolen oder katabolen Stoffwechselaktivitäten der Chondrozyten beteiligt.^{8,9,11,23}

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die mechanische Belastung von Knorpelgewebe und Chondrozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* positiv auf die Komposition und Architektur von Knorpelgewebe sowie die Induktion der chondrogenen Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen auswirkt. Dabei spielt die Art der zugeführten mechanischen Belastung sowie deren Ausmaß eine entscheidende Rolle.^{16,23}

Der Einfluss der mechanischen Belastungen von Knorpelgewebe auf die Chondrozyten wird maßgeblich durch die perizelluläre Matrix beeinflusst. Dabei stellt sie gleichzeitig eine protektive wie auch signalübermittelnde Funktion dar und nimmt über die zelluläre Antwort Einfluss auf die Zusammensetzung des Knorpelgewebes.^{9,11,21-23}

1.2 KNORPELDEFEKTE UND REPARATURMECHANISMEN

Strukturelle Defekte der Knorpelmatrix stellen eine besondere Herausforderung für die klinische Medizin dar, da die endogenen Reparaturmöglichkeiten von Knorpel durch den avaskulären und zellarmen Charakter des Gewebes limitiert werden.² Der Nährstofftransport innerhalb des Gewebes erfolgt über Diffusion entlang von Konzentrationsgefällen zwischen der synovialen Gelenkflüssigkeit und dem Knorpelgewebe. Die intakte Extrazellulärmatrix ist neben der Nährstoffversorgung des Gewebes auch maßgebend für die druckelastischen Eigenschaften und seine stoßdämpfende Funktion innerhalb des Gelenkes.^{1,9,22} Belastungen, die das physiologische Maß überschreiten, werden als super-physiologisch sowie schädlich beschrieben. Sie gehen mit einer verminderten Produktion von Knorpelmatrix, einer inflammatorischen Reaktion und dem Abbau von Knorpelsubstanz einher. In ihrer Maximalform können sie für Zelltod durch Apoptose und Nekrose verantwortlich sein.¹⁷

Defekte des Knorpelgewebes können ihren Ursprung sowohl in traumatisch-degenerativen, inflammatorischen, neoplastischen sowie genetischen Krankheitsbildern haben. Die Arthrose gilt dabei als ein prominentes Beispiel für degenerative, nicht rheumatisch bedingte Erkrankungen des Knorpelgewebes.²⁴

1.2.1 Arthrose

Arthrose ist eine progressive, degenerative Erkrankung aller Gelenkstrukturen. Sie ist gekennzeichnet durch eine Störung im Gleichgewicht aus anaboler und kataboler Stoffwechselaktivität der Chondrozyten, in dem der Abbau der Knorpelmatrix überwiegt.⁹ Im angloamerikanischen Sprachraum wird die Arthrose als *Osteoarthritis* bezeichnet, was die Beteiligung der inflammatorischen Reaktion innerhalb des Pathomechanismus der Erkrankung klar hervorhebt.²⁵ Die Posttraumatische Osteoarthritis trifft ca. 50 % aller Patienten mit traumatischen Gelenkverletzungen.²⁴ Durch ein initiales Gelenktrauma kommt es zu Schäden der Knorpelmatrix, sodass die Druckelastizität wie auch die Kompetenz der Matrix zur gerichteten Weiterleitung der mechanischen Belastung auf die Chondrozyten beeinträchtigt wird. Als Antwort der Chondrozyten auf die veränderte biomechanische und biochemische Umgebung kommt es zu Veränderungen in der Ausschüttung von Wachstumshormonen und inflammatorischen Zytokinen, die über katabole Stoffwechselwege den Abbau der Knorpelmatrix weiter antreiben. Es kommt zu einer positiven Verstärkung der degenerativen Prozesse innerhalb der Gelenkstrukturen, die sich gegenseitig immer weiter beeinflussen und anstoßen.^{9,24-26}

Aufgrund der fehlenden Innervation des Knorpelgewebes kommt es erst nach deutlicher Progredienz der pathologischen Veränderungen der Gelenkstrukturen zu Symptomen, die sich in Gelenkschmerzen, Mobilitätseinschränkungen und Verlust von Lebensqualität äußern.^{24,25,27}

Nach aktuell gültiger Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) (2018, gültig bis 29.11.2022) basiert die Behandlung der Gonarthrose in Deutschland auf medikamentösen, konservativen und operativen Therapieschwerpunkten. Sie zielen auf die Linderung der Symptome, die Wiederherstellung der Funktionalität des Gelenkes und auf die Steigerung der Lebensqualität der betroffenen Menschen. Die operative Behandlung kann in gelenkerhaltende und gelenkersetzende Therapieverfahren unterteilt werden.²⁷

1.2.2 Klinische Möglichkeiten und Regenerative Medizin

Das U.S. Department of Health and Human Services definiert den Begriff „Regenerative Medizin“ als:

„the application of tissue science, tissue engineering, and related biological and engineering principles that restore the structure and function of damaged tissues and organs“.²⁸

„die Anwendung von Tissue Science, Tissue Engineering und damit verbundenen biologischen und technischen Prinzipien, die die Struktur und Funktion von schadhafte Geweben und Organen wiederherstellen.“ (Übersetzung K. Gastberger)

Damit unterscheiden sich die Ansätze der Regenerativen Medizin von den oben genannten Therapiezielen der leitliniengerechten Behandlung der Arthrose dahingehend, dass die Wiederherstellung der ursprünglichen, gesunden Gewebestrukturen in den Fokus gerückt wird. In klinischen Studien werden unterschiedliche Verfahren getestet, um die Fähigkeiten der endogenen Gewebereparatur zu verbessern sowie schadhafte Knorpelsubstanz durch Transplantate oder biotechnologisch hergestellten Neoknorpel zu ersetzen. Ziel ist es also, im Rahmen der Regenerativen Medizin das Gelenk zu erhalten sowie das beschädigte Gewebe zu seiner ursprünglichen Anatomie und Physiologie zurückzuführen.²⁹

Einen ersten regenerativen Therapieansatz für kleinere Knorpeldefekte mit einer Größe von 2-3 cm² stellt die Mikrofrakturierung dar. Sie beschreibt einen invasiven Vorgang, bei dem kleine Löcher durch den Gelenkknorpel bis in das Knochenmark des unterliegenden Knochens gebohrt werden. Durch die so entstehende Einblutung werden Stammzellen des Knochenmarks in den Knorpeldefekt eingeschwemmt, die zu Chondrozyten differenzieren und neue Knorpelsubstanz ausbilden. Diese besteht jedoch meist aus Faserknorpel, der verglichen mit hyalinem Knorpel die notwendigen Eigenschaften eines Gelenkknorpels weniger gut erfüllt und daher für die Regenerative Medizin nicht als gleichwertiger Gewebeersatz betrachtet wird.^{30,31}

Mosaikplastiken beschreiben einen weiteren operativen, gelenkerhaltenden Therapieansatz, bei dem kleinste Konstrukte bestehend aus Knorpel und subchondralem Knochen aus nicht-lasttragenden Zonen des Gelenkknorpels entfernt und in Bereiche des Knorpeldefekts transplantiert werden. Bisher konnte für dieses Verfahren keine klare Empfehlung der Fachgesellschaften für Orthopädie und Unfallchirurgie ausgesprochen werden.^{27,30,32,33}

Autologe Chondrozyten Implantationen (ACI) stellen eine weitere Möglichkeit zur regenerativen Therapie von größeren Knorpeldefekten von 3-10 cm² dar. Dabei werden operativ Chondrozyten aus dem betroffenen Gelenkknorpel entnommen, in Zellkultur expandiert und im Verlauf als Patch wieder in den Knorpeldefekt eingesetzt. Verschiedene ACI-Generationen wurden entwickelt, um diesen flüssigen Patch zu deckeln: ACI der ersten Generation verwenden zur Deckelung des Chondrozytenpatches einen Lappen aus Periost der medialen Tibia und werden deshalb als ACI-P bezeichnet.³⁴ Dieses Verfahren stellt für die behandelte Person zusätzliche Belastungen im Sinne von stärkeren Schmerzen und der Notwendigkeit von Folgeprozeduren durch auftretende Komplikationen dar. ACI-C sind ACI der zweiten Generation und bedienen sich statt des Periosts einer Kollagenkappe, die auf den flüssigen Patch aufgebracht wird. Somit kann die Dauer der Operation verkürzt und die intraoperative Handhabung erleichtert werden. Als dritte Generation werden die Chondrozyten direkt in eine Matrix aus Kollagen eingebettet und dann in den Knorpeldefekt eingebracht. Dieses Verfahren wird als Matrix-assoziierte Chondrozyten Implantation (MACI) bezeichnet.^{30,31,35}

Neuere Entwicklungen zielen nicht mehr auf die Implantation von losen Chondrozytenpatches ab, sondern setzen auf die Verwendung von durch autologe Chondrozyten neu hergestelltem, künstlichen Knorpel.³⁰

1.2.3 Tissue Engineering

Der Begriff *Tissue Engineering* wurde 1993 von Langer und Vacanti beschrieben als

„an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life science towards the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve biological tissue function or a whole organ“.³⁶

„ein interdisziplinäres Feld, das die Gesetzmäßigkeiten der Ingenieurs- und der Biowissenschaften zur Entwicklung von biologischen Substituten heranzieht, die die biologische Gewebefunktion oder ein ganzes Organ wiederherstellen, erhalten oder verbessern.“ (Übersetzung K. Gastberger)

Tissue Engineering liefert damit wichtige Handlungsansätze für die Umsetzung der Ziele der Regenerativen Medizin. Im herkömmlichen Sinne steht dabei die Entwicklung von 3D-Trägerkonstrukten im Fokus, die zu Gerüsten, sogenannten *Scaffolds*, verarbeitet werden, in die Zellen und weitere, molekulare Faktoren eingebracht werden können. Nach einem Reifungsprozess können diese Gewebeäquivalente in den Körper eingebracht oder auch als Modell für *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Implantation von Konstrukten, die durch die Rekrutierung von Zellen und Modulation der Chemotaxis die Ausbildung von Gewebe *in situ* induzieren. Dieses Verfahren wird entsprechend als „*in situ Tissue Engineering*“ bezeichnet.^{28,36}

Bioprinting und *Bioassembly* stellen elementare Biofabrikationsmethoden des *Tissue Engineerings* dar. Beide beschreiben Verfahren, in denen hybride Konstrukte aus zellulären und nicht-zellulären Komponenten mit räumlich klar definiertem Aufbau gebildet werden.²⁸ Das *Bioprinting* setzt dabei Computer-gestützte Verfahren zur gezielten An- und Ablagerung der einzelnen Komponenten^{37,38} ein, während die Organisation der Struktur beim *Bioassembly* durch die Zellen²⁸ selbst gesteuert wird.

1.3 CARTILAGE TISSUE ENGINEERING

Die Verfahren der Regenerativen Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden zeigen in klinischen Studien sehr große Unterschiede bezüglich ihres Outcomes: Häufig konnte bei zugrundeliegender Arthrose nur eine Symptomlinderung erzielt werden, während das Risiko für Arthrose nicht weiter reduziert werden konnte.³¹ Allgemein ist es bisher durch oben beschriebene Therapiemöglichkeiten im Sinne der Regenerativen Medizin nicht gelungen, künstlich hergestellte Konstrukte zu entwickeln, die Knorpeldefekte adäquat ersetzen können.³⁹ Die Nachbildung von Strukturen des nativen Knorpelgewebes stellt daher die zentrale Herausforderung des *Cartilage Tissue Engineering* dar, um eine angemessene Funktionalität der Konstrukte zu erreichen, die den biomechanischen Maßstäben des nativen Gelenkknorpels genügt.⁴⁰ *Bioprinting* liefert dabei einen Ansatz, den strukturellen Aufbau von Knorpelgewebe so gut wie möglich nachzubilden.⁴¹

Die Auswahl der richtigen Zellquelle, geeigneter *Scaffolds* und möglicher additiver modulatorischer Faktoren stellen dabei die drei Schwerpunkte des *Cartilage Tissue Engineering* dar.²

1.3.1 Zelltypen für Cartilage Tissue Engineering

Zellen verschiedener Differenzierungsstufen werden für *Cartilage Tissue Engineering* herangezogen: vollständig differenzierte Chondrozyten, die aus autologen oder allogenen Knorpelgewebe isoliert werden, Vorläuferzellen (PCs) und Multipotente Stammzellen mit mesenchymalem Ursprung (MSCs). Sie werden nach ihrem Herkunftsgewebe in *Bone marrow-derived MSCs* (BM- MSCs), *Adipose tissue-derived MSCs* (AD- MSCs), *Umbilical cord blood-derived MSCs* (UC-MSCs) und *Peripheral blood-derived MSCs* (PB-MSCs) benannt. Eine weitere Zelldifferenzierungsstufe für die Verwendung im Rahmen von *Cartilage Tissue Engineering* stellen Pluripotente Stammzellen wie Embryonale Stammzellen (ESCs) oder induzierte Pluripotente Stammzellen (iPSCs) dar.⁴²

1.3.1.1 Chondrozyten

Autologe Chondrozyten werden beispielsweise aus nicht-lasttragenden Zonen des Gelenkknorpels gewonnen. Für das Verfahren der ACI werden sie in einer zwei-zeitigen Operation dem betroffenen Gelenkknorpel entnommen, in Zellkultur expandiert und später in den Defektbereich implantiert.³⁴ Chondrozyten, die aus der Nasenscheidewand gewonnen werden, stellen eine weitere geeignete Zellquelle dar.⁴² Die Verwendung von allogenen Chondrozyten birgt das Risiko einer Übertragung von Infektionen sowie dem Hervorrufen einer immunvermittelten Abstoßungsreaktion.²

Die Expansion von Chondrozyten kann zu Dedifferenzierung führen. Dies zeigt sich in der überwiegenden Synthese von Kollagen-Typ-I⁴³ und damit der Ausbildung von Faserknorpel, der hinsichtlich seiner biomechanischen Eigenschaften dem hyalinen Gelenkknorpel unterlegen ist.^{31,44,45}

1.3.1.2 Stamm- und Vorläuferzellen

Stamm- und Vorläuferzellen können aus unterschiedlichen Geweben entnommen und in Richtung einer chondrogenen Differenzierung stimuliert werden. Sie können abhängig von ihrer Lokalisation unter weniger Komplikationen und Schmerzen gewonnen werden als Chondrozyten und problemlos in Zellkultur expandiert werden. MSCs zeigen eine gute Syntheseleistung für Knorpelmatrix. *In vitro* kann darüber hinaus die Produktion von Kollagen-Typ-X beobachtet werden, wie sie bei hypertrophem Knorpelgewebe vorkommt. Dieser wird physiologischer Weise bei der Kallusbildung im Rahmen der Frakturheilung gebildet.³¹ *In vivo* hingegen zeigen MSCs eine vermehrte Produktion von Kollagen-Typ-I, die als Hinweis auf eine nicht erfolgreiche chondrogene Differenzierung der MSCs gewertet werden kann.^{31,42}

1.3.2 Scaffolds

Die Auswahl des richtigen *Scaffolds* wird durch verschiedene Anforderungen an das verwendete Material und seine Architektur bedingt: Die Bereitstellung einer optimalen Umgebung für die eingebetteten Zellen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die Materialien der *Scaffolds* sollen Wachstum, Differenzierung und Migration wie auch Interaktion der Zellen untereinander und mit dem umliegenden Gewebe unterstützen und dadurch die Produktion von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix positiv beeinflussen.^{2,33,46}

1.3.2.1 Polymere

Als *Scaffolds* werden Polymere natürlichen oder synthetischen Ursprungs verwendet. Dabei stellen Hydrogele eine beliebte Option dar, da sie das wässrige Umfeld der Chondrozyten in Nativknorpel nachempfinden.^{33,47,48}

Polymere natürlichen Ursprungs können wie Alginat und Agarose auf Polysacchariden basieren oder wie Kollagen und Fibrin Polypeptide darstellen. Weitere natürliche Polymere sind Hyaluronan, ein natürliches Glykosaminoglykan der Knorpelmatrix, oder Chitosan, das strukturelle Ähnlichkeiten mit dem natürlichen GAG aufweist. Synthetische Polymere sind beispielsweise Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol oder Oligopolyethylenglykolfumarat.⁴⁹

Hydrogele sind dreidimensionale Polymernetzwerke, die sich durch ein starkes Quellverhalten sowie ihr poröses Molekularnetz auszeichnen. Sie ermöglichen somit die Diffusion von löslichen Stoffen und die Einbettung von verschiedenen Zelltypen. Durch Zugabe von additiven Faktoren können die Eigenschaften von Hydrogelen den biomechanischen und biochemischen Anforderungen angepasst werden.³⁹ Native Hydrogele stellen ein weiches Material mit geringer biomechanischer Stabilität dar.⁴⁶ Mechanische und biologische Eigenschaften nehmen direkt Einfluss auf das Zellverhalten. Durch gezielte Veränderungen dieser Eigenschaften kann eine gewünschte zelluläre Antwort hervorgerufen werden. Hydrogele müssen biokompatibel, biologisch abbaubar und weder toxisch, noch kanzerogen oder pro-inflammatorisch sein, um als *Scaffold* für zellbesiedelte Gewebekonstrukte zu dienen.⁴⁷ Zum Erreichen einer Gel-

Konsistenz sind häufig *Crosslinking*-Verfahren notwendig. Dabei kommen physikalische, thermische sowie chemische Methoden zum Einsatz.⁵⁰

Agarose

Agarose zählt zu den polysaccharidischen Polymeren natürlichen Ursprungs, kann aus Meeresalgen gewonnen werden und ist kommerziell verfügbar. Agarosegele sind beliebte Modelle für experimentelle Untersuchungen im Bereich *Cartilage Tissue Engineering*, da sich Zellen einfach einbetten lassen. Sie verfügen über eine ausgezeichnete Biokompatibilität, wirken chondropermissiv und tragen so dazu bei, den Phänotyp der Chondrozyten zu erhalten und die Ausbildung von mechanisch hochwertigem Knorpelgewebe unterstützen.^{51,52} Agarose geliert spontan, sodass keine weiteren *Crosslinking*-Verfahren notwendig sind.⁴⁹ Das thermosensible und thermoreversible Hydrogel ist bei Temperaturen von 17-40 °C in festem Aggregatzustand, während es ab ca. 65 °C flüssig wird. Bei Körpertemperatur liegen Agarosegele somit als stabile Hydrogele mit guten biomechanischen Eigenschaften vor.⁵² Verglichen mit Nativknorpel hingegen weist Agarose eine verminderte mechanische Stabilität auf.⁴⁹ Der Elastizitätsmodul von Agarosehydrogelen ist niedriger als der der perizellulären Matrix von Chondrozyten⁵, sodass der Einfluss verschiedener mechanischer Kräfte auf Chondrozyten und PZM gut in Agarosegelen untersucht werden kann.

1.3.2.2 Induktion durch mechanische und biochemische Stimuli

Die Produktion von Extrazellulärmatrix durch die in die *Scaffolds* eingebetteten Zellen kann durch zusätzliche stimulierende Faktoren unterstützt und vorangetrieben werden. Dabei können sowohl Wachstumsfaktoren, anti-inflammatorische Medikamente oder mechanische Stimuli eingesetzt werden. Biochemische und biomechanische Faktoren zeigen *in vitro* auch synergistische Wirkung auf die Knorpelproduktion in Hydrogelen.^{16,53}

1.4 BIOPRINTING

Bioprinting stellt eine gängige Methode des *Tissue Engineerings* für die Herstellung kleinerer Konstrukte innerhalb des Anwendungsbereichs der Regenerativen Medizin dar.²⁸ Guillemot und Kolleg:innen definierten 2010 den Begriff *Bioprinting* als „Computer-unterstütztes Verfahren, mit dem sich die präzise räumliche Anordnung von lebenden und nicht-lebenden Materialien sowohl in 2D- als auch in 3D-Gebilden ermöglichen lässt“.³⁷ (Übersetzt K. Gastberger)

Die Entwicklung von *Bioprintern* zu Beginn der 2000er Jahre erfolgte durch Weiterentwicklung von bereits bestehenden 3D-Druckern, deren Heizköpfe für die Kunststofffilamente dahin gehend verändert werden konnte, dass sich mit ihnen biologische Strukturen und auch enthaltene Zellen in einer vorbestimmten dreidimensionalen Raumstruktur auf einer Oberfläche ablegen ließen. Die Extrusion der Biomaterialien durch eine Nadel erfolgte dabei pneumatisch oder über einen Kolben. Im Allgemeinen können in dreidimensionalen Konstrukten die räumlichen Verhältnisse und Strukturen innerhalb eines nativen Gewebes besser dargestellt werden als in zweidimensionalen Modellen. Für Zwecke der Forschung, des *Tissue Engineerings* aber auch in der therapeutischen Anwendung sowie zur Durchführung von Medikamentenstudien sind sie somit von großem Interesse.³⁸

Anforderungen an ein Gewebe, das mittels *Bioprinting* hergestellt werden soll, sind eine einfache Druckbarkeit sowie eine gleichbleibende Zusammensetzung.³⁸ Daneben gibt es eine Vielzahl an Eigenschaften, die erfüllt werden müssen, damit ein Biomaterial als Biotinte eingesetzt werden kann: Allgemein gilt, je visköser ein Biomaterial und je höher sein Polymergehalt, desto besser lässt es sich für die Herstellung eines formstabilen dreidimensionalen Konstruktes als Biotinte verwenden. Mit zunehmender Dichte und Festigkeit hingegen werden die Bedingungen für die eingebetteten Zellen umso harscher und sie werden in ihrer Viabilität und Funktionalität stark beeinträchtigt. Der Bereich, in dem sich Druckbarkeit und Biokompatibilität einer Biotinte überschneiden, wird als *Biofabrication Window* bezeichnet.^{41,51}

1.4.1 Durchführung und Ablauf des Bioprintings

Um ein Gewebekonstrukt mittels *3D-Bioprinting* zu drucken, wird die Kartusche des Druckkopfes mit zellbeladener Biotinte befüllt. Als Biotinte wird ein Material definiert, das eine Formulierung von Zellen darstellt, die durch automatisierte Prozesse der Biofabrikation verarbeitet werden kann.⁵⁴ Druckköpfe für das *Bioprinting* können mehrere Kammern enthalten, mit denen unter annähernd sterilen Bedingungen verschiedene Materialien und Zelltypen simultan gedruckt werden können. Dies wird als *co-printing* bezeichnet.^{38,51} Die Extrusion der Biotinte kann je nach Druckermodell auf unterschiedliche Art erfolgen. Gängig sind pneumatische oder Kolben-gestützte Verfahren mit der Abgabe der Biotinte als vollständigen Strang sowie sogenanntes *Inkjet-Printing*, bei dem die Biotinte tropfenweise durch Veränderungen der Temperatur oder der elektrischen Polarisation gedruckt wird. Unabhängig vom Extrusionsmechanismus wird die Biotinte mit großer räumlicher Präzision über eine Nadel (*Nozzle*) mit schmaler Öffnung auf eine Oberfläche gesetzt. Die Ausbildung von dreidimensionalen Konstrukten mit den spezifischen, computergenerierten Formen und Strukturen erfolgt sukzessive durch die Ablagerung der Biotinte in mehreren Schichten.⁵⁰ Je nach verwendetem Hydrogel erfolgt das *Crosslinking* entweder begleitend zum Druckvorgang oder im Anschluss daran.⁴¹

1.4.2 Vorteile und Chancen

Herkömmliche Methoden zur Herstellung von 3D-Konstrukten stellen händische Pipettierschritte in mehreren Lagen dar, bei denen die Biotinte in Formen gegossen wird und anschließend darin aushärtet (im Folgenden mit dem wissenschaftlichen Terminus „*cast*“ bezeichnet). Dabei ist die Struktur innerhalb der Konstrukte ungerichtet und nicht bestimmt.³⁸ Durch *Bioprinting*-Verfahren wird eine klar vorgegebene interne Architektur der Konstrukte ermöglicht, in der Materialien und Zellen unterschiedlicher Art in lokal verschiedenen Zusammensetzungen miteinander kombiniert werden können. Diese lokalen Unterschiede stellen einen wichtigen Schritt in der Nachahmung von Strukturen des nativen Gewebes³⁸ dar und markieren durch Reproduzierbarkeit und Kostenersparnis den Übergang zu klinischer und kommerzieller Verwendung der Gewebekonstrukte³³.

1.4.2.1 Zonaler Aufbau

Ein Paradigma des *Cartilage Tissue Engineering* ist die Annahme der Überlegenheit von zonal unterschiedlichen Konstrukten, die den hierarchischen Aufbau nativen Gelenkknorpels nachempfinden. Der hohe Anteil an extrazellulärer Matrix sowie die zonalen Unterschiede in ihrer Konstitution gelten in der Nachbildung von Knorpelgewebe als Herausforderung, die sich durch herkömmliche Methoden des mehrschichtigen Pipettierens nur schwer erreichen lässt. Durch den Einsatz von *Bioprinting*-Verfahren können die Gewebekonstrukte mechanischen und individuellen anatomischen Anforderungen im betroffenen Gelenk angepasst werden. Über die Nachahmung des zonalen Aufbaus des Nativknorpels lassen sich auch dessen biomechanische Eigenschaften denen des nativen Gewebes besser angleichen.^{55,56} Die Integrität des Neoknorpels in die umliegenden Knorpelareale gilt als weitere große Herausforderung des *Cartilage Tissue Engineering*. Auch hier könnte die Verwendung von zonalen Konstrukten zu einer Verbesserung führen.⁴

1.4.3 Einwirkende Kräfte und Nachteile des Bioprintings

Im Zentrum der Untersuchungen des *Bioprinting* im Rahmen des *Cartilage Tissue Engineering* stehen die Druckbarkeit des Konstruktes und die Eigenschaften der eingesetzten Zellen. Sie werden durch ein komplexes Zusammenspiel aus physikalischen, biochemischen und biomechanischen Aspekten der eingesetzten Materialien, aber auch durch die Gestaltung der angewandten Methoden beeinflusst. Auf Seiten der methodisch bedingten Einflussfaktoren sind die Fabrikationszeit, die Schubspannung sowie Maße und Geometrie der Nadel zu nennen, während sich hinsichtlich der eingesetzten Biomaterialien die Charakteristika der Biotinte mit Gelierungsverhalten, Viskosität und den Eigenschaften des Polymernetzes auf Druckbarkeit und Zellverhalten auswirken.⁵⁰

Während des Druckvorgangs wirken Schub- und Dehnungsspannung auf die in Biotinte eingesetzten Zellen ein. Schubspannung (engl. *Shear stress*) wird durch die enge Nadelspitze erzeugt, während Dehnungsspannung (engl. *Extensional stress*) beim Übertritt der Biotinte von der Kartuschenkammer in den Nadelkonus entsteht. Die einwirkende Schubspannung kann durch Länge, Durchmesser und Geometrie der Nadel beeinflusst werden, wobei lange oder zylindrische Nadeln mit kleinem Durchmesser die größte mechanische Belastung für die Zellen darstellen.⁵⁷

1.4.3.1 Zellschaden durch Bioprinting

Durch Schub- und Dehnungsspannung kommt es zu kleinen Brüchen der Zellmembran, die Einfluss auf das Überleben und die Funktion der Zellen haben. Es kann somit zu Beeinträchtigungen der Syntheseleistung kommen. Die Zellschäden lassen sich überwiegend auf die Schubspannung zurückführen, weil ihr die Zellen während des Druckvorgangs über eine längere Zeit als der Dehnungsspannung ausgesetzt sind. Sowohl Ausmaß als auch Expositionsdauer sind für den Umfang der Zellschäden von Bedeutung. Akute Zellschäden werden hingegen vermehrt durch Dehnungsspannung hervorgerufen, können aber auch zum Teil reversibel sein. Insgesamt lassen sich Zellschäden während des Druckvorgangs aufgrund der längeren Expositionsdauer zum Großteil auf die Schubspannung zurückführen, wobei sich die Dehnungsspannung als aggravierender Faktor präsentieren könnte.⁵⁷ Die Auswirkung der mechanischen Beanspruchung ist abhängig vom eingesetzten Zelltyp. Chondrozyten sind dabei als eher robuste Zellen anzusehen.⁵⁸

1.5 ZIELE DIESER ARBEIT

Die Vergrößerung des *Biofabrication Window* ist wie bereits dargestellt eine zentrale Bestrebung wissenschaftlicher Untersuchungen. Zahlreiche Versuche werden unternommen, Biotinten mit verbesserten biomechanischen wie auch biokompatiblen Eigenschaften zu entwickeln oder neue, schonendere *Crosslinking*-Methoden zu entwickeln.⁴¹ Die Materialeigenschaften von Biotinten bzw. *Scaffolds* stellt jedoch nur eine von drei Säulen des Tissue Engineerings dar. Die Auswahl geeigneter Zelltypen und weiterer additiver Faktoren nehmen ebenso Einfluss auf die Produktion von Neoknorpel in dreidimensionalen, mittels *Bioprinting* hergestellten Konstrukten. Häufig wurden in der Literatur für den Bereich *Cartilage Tissue Engineering* Chondrozyten und Mesenchymale Stammzellen verwendet. Sie zeigen in Abhängigkeit von Biotinte und Additiva eine stabile Produktion von künstlich generiertem Knorpelgewebe unter herkömmlichen Biofabrikationsmethoden. Durch *Bioprinting* kann die zonale Architektur von Neoknorpel verbessert werden, während sich gleichzeitig deutliche zelluläre Beeinträchtigungen durch mechanische Belastungen zeigen, die während des Druckvorgangs auftreten. Unterschiedliche Zellen reagieren verschieden auf diesen

auftretenden Stress, sodass die Auswahl der eingesetzten Zellen einen vielversprechenden wissenschaftlichen Ansatz darstellt.

1.5.1 PZM als Schutz der Chondrozyten vor mechanisch bedingten Zellschäden

Im Knorpelgewebe sind die einzelnen Chondrozyten von ihrer PZM umgeben, die eine Schlüsselrolle innerhalb der Transduktion von mechanischen Signalen einnimmt und gleichzeitig die natürliche Mikroumgebung der Zellen darstellt. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die perizelluläre Matrix auch während des *Bioprintings* protektiv auf Chondrozyten wirken kann. Dabei sollen Lang- und Kurzzeitfolgen des Druckvorgangs auf Chondrozyten mit und ohne PZM in 3D-Kultur beschrieben und verglichen werden.

1.5.1.1 Isolation von Chondrozyten mit und ohne PZM

In einem ersten Schritt sollen Chondrozyten mit und ohne PZM aus porcinem Frischknorpel isoliert werden. Verschiedene Protokolle zur Isolation von Chondrozyten aus der Literatur sollen hierfür getestet werden. Zum Nachweis einer PZM soll nach enzymatischer Isolation der Zellen sowohl in 2D- als auch 3D-Kultur eine immunhistochemische Färbung von Kollagen-Typ-VI erfolgen, um Chondrozyten mit und ohne PZM klar voneinander unterscheiden zu können. Die Viabilität der Zellen soll unmittelbar nach Isolation anhand der Live/Dead-Färbung betrachtet werden. Dies soll gewährleisten, dass das Zellüberleben nicht durch den Isolationsprozess selbst beeinträchtigt wird. Als Biotinte soll aufgrund der hohen Biokompatibilität und des einfachen Gelierungsmechanismus ein Agarose-Hydrogel verwendet werden.

1.5.1.2 Print vs. cast von Chondrozyten mit und ohne PZM

In einem zweiten Schritt soll der Einfluss des *Bioprintings* auf Chondrozyten mit und ohne PZM untersucht werden. Dazu sollen beide Zellarten in 4 %ige Agarose eingebettet werden und über pneumatisch erzeugten Druck durch eine zylindrische Stahlnadel gedruckt werden. Die gedruckte, formlose Biotinte soll anschließend in Formen gegossen werden und zu Hydrogelen aushärten. Die Kontrollgruppen sollen aus Chondrozyten mit und ohne PZM gebildet werden, die direkt zu Gelen gegossen werden und nicht vorher dem Druckvorgang ausgesetzt werden. Die Ernte der Hydrogele soll einen Tag sowie 21 Tage nach der Herstellung erfolgen, um Kurz- und

Langzeitauswirkungen des Druckvorgangs zu untersuchen. Dabei soll die Viabilität der Zellen mittels Live/Dead-Färbung sowie die Syntheseleistung der Chondrozyten für knorpelspezifischen Kollagentypen und Proteoglykanen quantitativ und qualitativ dargestellt und bewertet werden.

Die protektive Eigenschaft der PZM während des Druckvorgangs soll in einem weiteren Versuch durch die Gestaltung noch härterer Bedingungen für die Chondrozyten untersucht und damit deutlicher hervorgehoben werden. Dafür soll auf die thermosensiblen Eigenschaften der Agarose zurückgegriffen werden. Mit sinkender Temperatur nimmt die Viskosität der Agarose-Hydrogele zu, was zu einer Steigerung der mechanischen Belastung der Chondrozyten während des Druckvorgangs⁵¹ führt. Hierfür sollen zunächst zwei Temperaturen ermittelt werden, bei denen sich die Viskosität der Agarosegele deutlich voneinander unterscheiden, die Druckbarkeit jedoch für beide Konditionen erhalten bleibt. Ein 3D-Bioprinter mit heizbarer Druckkartusche soll anschließend verwendet werden, um die Temperaturbedingungen während des Druckvorgangs kontrollieren zu können. Analog zum vorher beschriebenen Vorgehen werden das Kurz- und Langzeitüberleben der Chondrozyten mit und ohne PZM nach *Bioprinting* qualitativ und quantitativ untersucht und mit den Ergebnissen der Kontrollgruppen verglichen, die ebenfalls aus Agarose-Hydrogelen mit Chondrozyten mit und ohne PZM besteht, die ausschließlich über den *cast*-Vorgang in ihre dreidimensionale Form gebracht werden. Temperaturkontrollierte Bedingungen sollen während des *cast*-Vorgangs durch die Verwendung von Heizblöcken erreicht werden, in denen die Hydrogele bis zu ihrer Verarbeitung zu 3D-Konstrukten auf unterschiedlichen Temperaturniveaus gelagert werden können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Instrumente und Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Instrumente und Geräte

Artikel	Hersteller	Ort
Accu-jet®pro	Brand	Wertheim, Deutschland
Analytical scale CP224S (Messgenauigkeit 0,0001 g)	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Analytical scale Pioneer™ (Messgenauigkeit 0,001 g)	Ohaus	Parsippany, NJ, USA
CO₂-Inkubator	ibs technomara GmbH	Fernwald, Deutschland
CO₂-Inkubator	Heraeus	Hanau, Deutschland
CO₂-Inkubator Binder CB 150 (mit O₂- Regulation)	Binder	Neckarsulm, Deutschland
Cryostat CM 3050S	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
Dosiergerät DC 200	Vieweg	Kranzberg, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	Bulle, Schweiz
HandyStep®dispenser	Brand	Wertheim, Deutschland
Hemocytometer Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH	Lauda, Deutschland
Inkredibile+ 3D bioprinter	Cellink	Boston, MA, USA
Klingen mit Griffschutz	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr	Bulle, Schweiz
Laminar flow box Herasafe Typ-HS 18	Heraeus	Hanau, Deutschland
Magnetic stirrer	VWR	Darmstadt, Deutschland

Mastercycler®Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX51/DP71 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop IX51/XC30 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikrotome	pfm medical	Köln, Deutschland
Mikrowell Micromat 1000W	AEG	Frankfurt am Main, Deutschland
Multimode microplate reader Tecan GENios pro	Tecan	Männedorf, Schweiz
Orbital shaker Unimax 1010	Heidolph	Schwabach, Deutschland
pH-Meter H12210	Hanna Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Pipette displacement Microman™	Gilson	Middelton, USA
Pipette Multipette E3/E3x	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette multistep	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipetten Research® Plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Roll mixer RM5	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Shandon Model Cytospin 2 Centrifuge	Wazobia Enterprise	Houston, TX, USA
Silikonformen, zylindrisch, Durchmesser 6 mm, maßgefertigt	FMZ, Lehrstuhl: Prof. Jürgen Groll, Universität Würzburg	Würzburg, Deutschland
Thermomixer MHR 23	DITABIS	Pforzheim, Deutschland
TissueLyser	Qiagen	Hilden, Deutschland
Trocken- und Wärmeschrank	Binder	Neckarsulm, Deutschland

Ultra-deep freezer TTS 500 (-80 °C)	Thalheimer Kühlung	Ellwangen, Deutschland
Vortex 2	IKA	Staufen, Deutschland
Vortex- centrifuge CombiSpin	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro Laboratory products (nun Thermo Fisher Scientific)	Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge SIGMA 1-14	SIGMA Laborzentrifugen GmbH	Osterode, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Ort
96-Well-Platte mit schwarzem Boden 96- well, schwarz	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Cellstar Suspensionsplatte	Greiner Bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturplatte 12-, 48-Well	Greiner Bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Chamber-slides 8-well, removable	ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Combitips@advanced 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Coverslip Deckgläser 24x40 mm/ 24x50 mm	Paul Marienfeld GmbH	Lauda- Königshofen, Deutschland
Coverslip Deckgläser 24x60 mm	ibidi	Gräfelfing, Deutschland

Coverslip Deckgläser Durchmesser 13 mm/ 14 mm	ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Cryovials CyroPure 2,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Dispenser tips 12,5 ml/ 25 ml	Nerbe plus GmbH	Winsen, Deutschland
Edelstahlkugeln für TissueLyser, Durchmesser 5 mm	Qiagen	Hilden, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon Zellfilter (40 µm, 70 µm, 100 µm)	pluriSelect	Leipzig, Deutschland
Greiner Bio-One CELLSTART™ Teströhrchen, Polypropylen, 15 ml/50 ml	Greiner Bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Kartusche, Plastik	Nordson EFD	Westlake, OH, USA
Mikrotestplatte (analytisch) 96 Well	Nerbe plus GmbH	Winsen, Deutschland
Mikrotomklinge (n35)	Feather	Osaka, Japan
Nalgene™ Rapid-Flow™ sterile Einweg-Flaschenaufsatzfilter, Porengröße 0,2 µm	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
PAP pen liquid blocker	Science Services	München, Deutschland
Parafilm	Pechiney	Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen	Nerbe plus GmbH	Winsen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
pluriStrainer® 40 µm, 70 µm, 100 µm (Zellsieb)	pluriSelect	Leipzig, Deutschland
SafeSeal micro tubes 1,5 ml/ 2,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Feather	Osaka, Japan
Spritzen 10 ml, 20 ml	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA

Spritzenfilter Filter ReliaPrep™, Poren 0,2 µm	Ahlstrom -Munksjö	Helsinki, Finnland
SuperFrost®Plus Objektträger	R. Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zylindrische Dispense Tips, Edelstahl, Durchmesser 330 µm	Nordson EFD	Westlake, OH, USA

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Artikel	Hersteller	Ort
2-Propanol	VWR International, Avantor (VWR chemicals BDH)	Poole, Großbritannien
Aceton, 99,5 %	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Agarose low melt	Sigma Aldrich/Merk	Darmstadt, Deutschland
Antibody diluent, Dako REAL™	Dako	Hamburg, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun	Melsungen, Deutschland
bFGF (basic fibroblast growth factor)	Bio Legend	London, Großbritannien
BSA (Albumin aus Rinderserum)	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Chloramin T Trihydrat	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Chondroitinsulfat A Natriumsalz aus Rindertrachea (Pufferkonzentration: 1mg/ ml in PBE-cystein buffer)	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Citronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Collagenase II	Worthington	Lakewood, USA
DAB (Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, Merck	Steinheim, Deutschland

DAPI, IS mounting medium	Dako	Hamburg, Deutschland
Destilliertes Wasser (DNAse/RNAse frei)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
Dispase® II	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose 4.5 g/l)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
DMSO	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), (no CaCl₂, no MgCl₂)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolut, 99,8 %, für Molekularbiologie	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Fast green FCF	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
Formaldehyd, 37 %	Th. Geyer	Renningen, Deutschland
Gentamicin 25 mg/ml und Amphotericin B 125 µg/ml	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich/ Merck	Darmstadt, Deutschland
HEPES (1 M)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Hoechst 33258 dye	Polysciences	Warrington, PA, USA
L-Ascorbinsäure (A4544)	Sigma-Aldrich, Merck	Steinheim, Deutschland

L-Cystein	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
L-Hydroxyprolin Standard	MilliporeSigma	Burlington, MA, USA
Live/Dead cell staining kit II	PromoKine	Heidelberg, Deutschland
L-Prolin (P5607)	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat	SAFC, Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat Dihydrat	Sigma-Aldrich, Merck	Taufkirchen, Deutschland
NEAA (non-essential amino acids)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
Papain	Worthington	Lakewood, USA
PBS (Phosphate buffered saline)	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline) (Dulbecco A) Tabletten	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
Pronase (PRON-RO; Pronase from Streptomyces griseus)	Roche, Merck	Mannheim, Deutschland
Proteinase K (Digest-All 4)	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Safranin O	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Terralin Liquid® Desinfektionsspray	Schülke	Norderstedt, Deutschland
TGF-β1 (transforming growth factor β1)	BioLegend	London, Großbritannien
Tissue Tek® O.C.T. compound	Sakure Finetek	Zoeterwoude, Niederlande
TRIS PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a. (Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

Trypanblau	Sigma-Aldrich/ Merk	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25 %	Thermo Fisher Scientific (Gibco®)	Waltham, MA, USA
Xylen	VWR International, Avantor (VWR chemicals BDH)	Poole, Großbritannien

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Ort
Alexa Fluor 488 anti-rabbit, (Goat: 1:400)	Jackson Immuno Research	Cambridge, UK
Anti-type VI collagen (ab6588), Rabbit polyclonal: 1:200)	Abcam	Cambridge, UK
Anti-type I collagen (ab34710), Rabbit polyclonal: 1:200	Abcam	Cambridge, UK
Anti-type II collagen (ab347123), Rabbit polyclonal: 1:200	Abcam	Cambridge, UK
ChromPure Rabbit IgG, whole molecule, Rabbit isotype	Jackson Immuno Research Laboratories	West Grove, PA, USA

2.1.5 Zellen und Zellkulturmedium

Für die Versuche wurden native Chondrozyten (Passage 0) verwendet. Diese wurden aus porcinem Gelenkknorpel von Femurkondylen isoliert. Die Knie wurden einen Tag nach der Schlachtung der Tiere über die Metzgerei Hollerbach in Rimpar bezogen. Während der Isolation und über die Dauer der *in vitro*-Kulturen wurden in die Chondrozyten in basalem Zellkulturmedium aufgenommen. Soweit nicht anders angegeben wurden Medium und Zusätze von invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) - bezogen.

Tabelle 5: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedia

Medium	Zusammensetzung
Basales Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM/F12) 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin) 10 % FCS 0,1 % Gentamicin/ Amphotericin B (25 mg/ml Gentamicin, 125 µg/ml Amphotericin B)
Differenzierungsmedium	DMEM high glucose 10 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) 40 µg/ml L-Prolin 50 µg/ml Ascorbinsäure 1 % HEPES 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren 0,1 % Gentamicin/ Amphotericin B (25 mg/ml Gentamicin, 125 µg/ml Amphotericin B)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blocking-Lösung	1 % BSA PBS
Chloramin T Lösung	15,67 mg/ml Chloramin T 88,89 % Zitronensäurepuffer 11,11 % 2-Propanol
Chondroitinsulfat Stammlösung	100 µg/ml bovines Chondroitinsulfat 0,85 mg/ml L-Cystein PBE
DAB (p-Dimethylaminobenzaldehyd) Lösung	174,42 µg/ml DAB 69,77 % 2-Propanol

DMMB (Dimethylmethylen blue) Lösung (0,5 %)	3, 2 mg/ml DMMB in reinem Ethanol 3,04 g/l Glycin 2,37 g/l NaCl ddH2O pH 3,0
Fast green Färbelösung (0,02 %) (0,2 mg/ml fast green, ddH2O)	0,2 mg/ml fast green FCF ddH2O
Formalin gepuffert (3,7 % Formalin)	37 % Formalin-Stammlösung PBS
Hoechst 33258 Stammlösung	1 mg/ml Hoechst 33258 dye ddH2O
L-Hydroxyprolin Stammlösung	1 mg/ml L-Hydroxyprolin Standard 0,85 mg/ml L-Cystein PBE
L-Prolin-Stammlösung	40 mg/ml L-Prolin PBS Steril filtriert
Papainverdau-Puffer	0,85 mg/ml L-Cystein 3 U/ml Papain PBE Puffer
PBE Puffer (Phosphate Buffered Extraction)	8,9 g Na2HPO4 + 2 H2O 1,86 g EDTA 500 ml H2O pH 6,5
PBE/Cystein Puffer	0,85 mg/ml L-Cystein PBE Puffer
PBS (Phosphate Buffered Saline)	10 PBS (Dulbecco-A) Tabletten 1 l ddH2O
Safranin O Färbelösung (0,1 %)	1 mg/ml Safranin-O ddH2O
TEN Puffer (Tris-EDTA-NaCl Puffer)	0,1 M NaCl 1 mM EDTA 10 mM Tris ddH2O pH 7,4

TGF-β1 Stammlösung	10 µg/ml TGF-β1 1 % BSA PBS Steril filtriert
Zitronensäurepuffer (pH 6 Puffer)	33,33 mg/ml Zitronensäuremonohydrat 80 mg/ml Natriumacetat-Trihydrat 22,67 mg/ml NaOH 0,8 % Essigsäure 20 % 2-Propanol pH 6,0 gelagert bei 4 °C

2.1.7 Software

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Software

Software	Hersteller	Ort
CellSense™ 1.16	Olympus	Hamburg, Deutschland
CFX Manager™ soft-ware version 3.1.	Biorad	Hercules, CA, USA
GraphPad Prism Version 6.0	GraphPad Software	LaJolla, CA, USA
Microsoft-Office 365	Microsoft	Redmon, WA, USA

2.2 METHODEN

2.2.1 Extraktion des Gelenkknorpels

Die Präparation der Kniegelenke erfolgte unter keimreduzierten Bedingungen auf einer mit Terralin® und 70 %igem Ethanol desinfizierten Unterlagefläche sowie unter Verwendung von sterilen Instrumenten. Nach Eröffnung der Gelenkkapsel erfolgte eine Inspektion der intraartikulären Strukturen. Nur aus makroskopisch einwandfreiem Material wurde eine ca. 5 x 2 cm große Fläche Gelenkknorpel herausgelöst. Hinweise auf degenerative Prozesse oder sichtbare Kontamination mit Fremdmaterial führten zum Ausschluss des Materials von den Untersuchungen dieser Arbeit.

Nach mechanischer Entfernung kalzifizierter Anteile wurde der Knorpel mit PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 % Gentamicin/ Amphotericin B versetzt und auf eine Größe von 1 x 2 cm geschnitten. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Knorpelstücke für wenige Minuten in 10 ml Basismedium pro 1 g Knorpel im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration aufbewahrt. Im Folgenden wird die Isolation der Chondrozyten mit und ohne perizellulärer Matrix durch enzymatische Verdaureaktionen aus dem extrahierten Gelenkknorpel beschrieben.

2.2.2 Isolation der Chondrozyten

Zur Annäherung an die Fragestellung wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Protokolle zur enzymatischen Isolation von Chondrozyten aus Frischknorpel getestet. Durch die Kombination verschiedener Elemente bereits bestehender Protokolle wurden weitere Methoden zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM getestet und für die weiterführenden Versuche dieser Arbeit etabliert. Dabei wurden die Chondrozyten ausgehend von ihrem Gehalt an immunhistochemisch nachweisbarem, perizellulärem Kollagen-Typ-VI in Chondrozyten mit perizellulärer Matrix und Chondrozyten ohne perizelluläre Matrix unterschieden.

Die enzymatischen Verdaureaktionen liefen bei 37 °C Umgebungstemperatur und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Inkubator ab. Nach Ablauf der Isolationszeit wurde die Zellsuspension steril filtriert, für 10 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet anschließend in drei Waschgängen mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in Basismedium aufgenommen und gezählt. Hierfür wurde 1 µl der Zellsuspension mit 1 µl Trypanblau vermischt und anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. In die Zählkammer wurde 1 µl der 1:1-Lösung aus Trypanblau und Zellen eingebracht.

2.2.2.1 Isolation von Chondrozyten ohne PZM

Für die Isolation von Chondrozyten ohne perizelluläre Matrix wurden die Protokolle nach Oseni⁵⁹, nach Kuettner⁶⁰ sowie eine Kombination aus dem bei Kuettner beschriebenen Vorverdau mit 0,15 % Pronase und dem Chondrozyten-Isolationsprotokoll nach Schuurman⁶¹ getestet. Dieses Kombinationsprotokoll wurde für die weiterführenden Untersuchungen zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM verwendet.

Tabelle 8: Übersicht über getestete Protokolle zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM

	Enzym/e	Dauer	Größe des Zellfilters	Referenz
1	0,2 % Collagenase II	10 h	40 µm	Oseni et al. ⁵⁹
2	1,0 % Pronase	90 min	40 µm	Kuettner et al. ⁶²
	0,4 % Collagease II	180 min		
3	1,0 % Pronase	90 min	40 µm	Kuettner et al. ⁶² und Schuurman et al. ^{61*}
	0,15 % Collagenase II	16 h		

* vgl. Tabelle 9: Übersicht über getestete Protokolle zur Isolation von Chondrozyten mit PZM

2.2.2.2 Isolation von Chondrozyten mit PZM

Zur enzymatischen Isolation von Chondrozyten mit PZM wurden die Protokolle nach Schuurman⁶¹, Bekkers⁶ und Lee⁷ getestet. Um die Menge an perizellulärem Kollagen-Typ-VI, das als wichtigster Indikator zur Identifikation von perizellulärer Matrix herangezogen wurde, noch zu steigern, wurden diese Protokolle unter Verwendung von Zellfiltern verschiedener Größen (40 µm, 70 µm, 100 µm) durchgeführt.

Als Grundlage für die weiteren Untersuchungen von Chondrozyten mit residueller PZM in 3D-Hydrogel-Kulturen wurde das 2009 von Schuurman beschriebene Protokoll mit 0,15 % Collagenase II über eine Isolationsdauer von 16 Stunden⁶¹ verwendet.

Tabelle 9: Übersicht über getestete Protokolle zur Isolation von Chondrozyten mit PZM

	<i>Enzyme</i>	<i>Trägerlösung</i>	<i>Dauer</i>	<i>Größe der Zellfilter</i>	<i>Referenz</i>
4	0,15 % Collagenase II	Basismedium	Über Nacht	40 µm	Schuurman et al. ⁶¹
5a	2 % Collagenase II	Basismedium	45 min	70 µm	Bekkers et al. ⁶
5b	2 % Collagenase II	Basismedium	45 min	100 µm	Bekkers et al. ⁶
6a	0,3 % Dispase, 0,2 % Collagenase II	PBS	5 h	70 µm	Lee et al. ⁷
6b	0,3 % Dispase, 0,2 % Collagenase II	PBS	5 h	100 µm	Lee et al. ⁷
6c	0,3 % Dispase, 0,2 % Collagenase II	PBS	3 h	100 µm	Modifiziert nach Lee et al. ⁷

Es sind enzymatische Verdauprotokolle zur Isolation von Chondrozyten mit nachweisbarem, residuellen perizellulärem Kollagen-Typ-VI sowie zur Isolation von Chondronen dargestellt. Die Nummerierung ist fortlaufend für alle in dieser Arbeit getesteten Isolationsprotokolle, beginnend mit Protokollen zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM (vgl. Tabelle 8).

2.2.3 Gießen von Agarosehydrogelen

Für den *cast*- sowie für den Druckvorgang wurden Hydrogele aus 4 % *low melt* Agarose verwendet.

Aus *low melt* Agarose und PBS wurde eine 4 %ige Suspension hergestellt, die durch Erhitzen auf 80 °C in eine homogene Lösung umgewandelt wurde. Nach Abkühlen auf 40 °C konnten in PBS suspendierte Chondrozyten im Verhältnis 1:1 zugegeben werden, sodass eine 2 %ige Agarose-Chondrozyten-Suspension entstand (20 x 10⁶ Zellen/ml). Daraus wurden Hydrogele zu einem Volumen von je 40 µl und einem Zellgehalt von 800.000 Chondrozyten pro Hydrogel in Silikonformen gegossen. Die Aushärtung der Hydrogele erfolgte durch weiteres Abkühlen im Kühlschrank.

2.2.4 3D-Bioprinting mit Agarose-Biotinte

Als Biotinte für die Druckversuche sowohl am Simulator als auch am 3D-*Bioprinter* wurde die in 2.2.3 beschriebene 2 %ige Agarose versetzt mit Chondrozyten verwendet. Die beim Druckvorgang entstandenen Gele umfassten ebenfalls ein Volumen von 40 µl und beinhalteten 800.000 Zellen.

2.2.4.1 3D-Druck-Simulator

Der Drucksimulator enthält mit Kartusche, Kolben, Düse und pneumatischem Steuerungsdruck die wesentlichen Elemente eines *Bioprinters* und ist geeignet, Biotinte durch eine Druckkartusche zu pressen und damit den Druckvorgang *per se* zu simulieren. Die Druckbarkeit einer Biotinte sowie mögliche schädliche Einflüsse des Druckvorgangs auf die zelluläre Komponente der Biotinte können auf diese Weise untersucht werden.

Für den Druckvorgang wird zunächst die Druckkartusche mit Biotinte gefüllt und mit einem Kolben verschlossen. Anschließend werden Druckkartusche und Druckaggregat (Dosiergerät DC 200) über eine Luftzufuhrleitung konnektiert. Am anderen Ende wird eine Düse angebracht, über die die Biotinte die Druckkartusche verlässt. Der Steuerungsdruck wird am Aggregat eingestellt und über ein Fußpedal abgegeben. Durch die Abgabe des pneumatischen Drucks wird der Kolben innerhalb der Kartusche nach vorne gedrückt und so die Biotinte durch die Düse gepresst. Durch die

manuelle Bewegung des simulierten Druckkopfes aus Kartusche und Düse kann die Abgabe der Biotinte räumlich gesteuert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Agarose-Chondrozyten-Suspension in Eppendorf Tube bei 40°C in einem Heizblock temperiert und mit einer Verdrängerpipette in die Druckkartusche überführt. Es wurde ein Steuerungsdruck von 1 bar sowie eine zylindrische Stahldüse (*Nozzle*) mit einem Lumen von 330 µm (23 G) gewählt. Die gedruckte Biotinte wurde in einem vorgewärmten Eppendorf Tube aufgefangen und anschließend, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, in Gelform gebracht, was einem nachgeschalteten *cast*-Vorgang entspricht.

2.2.4.2 Cellink Bioprinter

Analog zum Vorgehen am 3D-Druck-Simulator wurden die Untersuchungen am *Cellink Bioprinter* mit einem pneumatischen Druck von 1 bar unter Verwendung einer zylindrischen Stahldüse mit einem Durchmesser von 330 µm durchgeführt. Durch Vorheizen der Druckkartusche wurde die Temperatur während des Druckvorgangs kontrolliert auf 40 °C sowie auf 33 °C gehalten. Die Kartuschen wurden mit zellbesetzter Biotinte befüllt und anschließend auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Die gedruckte Biotinte wurde in Eppendorf Tubes aufgefangen, anschließend zu Hydrogelen mit einem Volumen von 40 µl und einem Zellgehalt von 800.000 Zellen pro Hydrogel gegossen und im Kühlschrank bei 8 °C ausgehärtet.

2.2.5 3D-Kultur

Die durch *Bioprinting*- bzw. *cast*-Vorgang entstandenen Gele wurden für 21 Tage in einer 24-Well-Suspensionsplatte im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Konzentration in Kultur genommen. Als Nährmedium wurde ein Knorpeldifferenzierungsmedium (DMEM high glucose + 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren + 1 % HEPES + 0,1 % Prolin + 0,1 % Ascorbinsäure + 0,1 % Gentamicin/ Amphotericin B) verwendet, das jeden zweiten Tag gewechselt wurde.

2.2.6 Ermittlung der Temperaturniveaus

Geeignete Temperaturen für den 3D-Druckvorgang wurden empirisch ermittelt. Hierzu wurden Eppendorf Tubes im Leerzustand gewogen, mit einem definierten Volumen von 320 µl 2 %iger Agarose befüllt und in neun Stufen auf Temperaturen zwischen Raumtemperatur (22 °C) und auf 40 °C erwärmt. Pro Temperaturstufe wurden aus dem Grundvolumen von 320 µl möglichst viele Hydrogele mit einem definierten Volumen von 40 µl gegossen. Die Masse des verbleibenden, nicht mehr pipettierbaren Überstandes wurde quantifiziert und als Indikator für die Viskosität des Hydrogels bei entsprechender Temperatur herangezogen. Für die weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit wurden „33 °C“ und „40 °C“ auf dieser Grundlage als geeignete, definierte Temperaturniveaus gewählt.

2.2.7 Live/Dead-Assay

Der Live/Dead-Assay wurde an Tag 1 und Tag 21 mit dem Live/Dead cell staining kit II der Firma PromoKine (vgl. Tabelle 3) durchgeführt. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Gele in zwei Durchgängen mit PBS gewaschen, bevor sie für 45 Minuten mit jeweils 1 ml PBS und 2 µl Calcein und 1 µl Ethidium-Dimer in Dunkelheit inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS unter abgedunkelten Bedingungen. Unmittelbar danach konnten lichtmikroskopisch durch Verwendung von Fluoreszenzfiltern vitale Zellen grün und avitale Zellen rot dargestellt werden. Über die integrierte Kamera ließen sich die optischen Eindrücke digital aufnehmen.

2.2.8 Qualitative Auswertung mittels Histologie und Immunhistochemie

Die qualitative Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mittels einer Safranin-O-Färbung und immunhistochemisch mit Fluoreszenzfarbstoffen. Untersucht wurden Zytospins sowie Kryotom-Schnitte der Hydrogele. Zur qualitativen Auswertung der produzierten Knorpelmatrixbestandteile wurden an Zytospinpräparaten sowie an Kryotomschnitten der 3D-Hydrogelkulturen immunhistochemische und Safranin-O-Färbungen durchgeführt.

2.2.8.1 Zytospin

Zytospinpräparate wurden im direkten Anschluss an den Verdauvorgang durchgeführt. Die an Zytospinpräparaten dargestellten Zellen und deren umgebendes Kollagen-Typ-VI repräsentieren somit den Zustand direkt nach Ablauf der enzymatischen Isolation und spiegeln damit wider, wie viel residuelle PZM nach enzymatischer Isolation nachgewiesen werden kann. Pro Zytospin wurden 50 µl der Zellsuspension verwendet, worin 20.000 Zellen enthalten waren. Bei 550 rpm wurde die Suspension zentrifugiert und somit die darin enthaltenen Zellen auf den Objektträger aufgebracht. Zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurden diese im Anschluss an die Zentrifugation bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren und dort bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2.8.2 Kryotomschnitte

Proben der 3D-Hydrogelkulturen wurden an Tag 1 sowie Tag 21 gewonnen. Für die Schnitte am Kryotom wurden jeweils halbe Gele verwendet. Diese wurden über Nacht in 2 ml 3,7 %igem Formalin im Kühlschrank bei 8 °C fixiert. Danach wurde das Formalin abgenommen und bis zur Einbettung in Tissue Tek® durch PBS ersetzt. Nach dem Einbetten wurden die Proben am nächsten Tag zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -20 °C im Gefrierfach eingefroren. Die Proben wurden am Kryotom bei -19 °C auf eine Schnittdicke von 8 µm geschnitten und auf Superfrost® Objektträger gebettet und an der Raumluft vollständig getrocknet, bevor sie vor folgenden Färbungen in eiskaltem Aceton für 10 Minuten fixiert wurden.

2.2.8.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Fixierung der Proben auf dem Objektträger erfolgte für Zytospinpräparate für 10 Minuten mit 3,7 %igem Formalin, für die Kryotomschnitte hingegen mit eiskaltem Aceton. Die Kryotomschnitte wurden anschließend bei Raumluft vollständig getrocknet, bevor sie wie die übrigen Proben für 3 Minuten in PBS rehybridisiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min bei 37 °C mit Proteinase K inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 20 min mit 50 µl Blocking-Puffer, bestehend aus 1 % BSA in PBS, inkubiert und danach in drei Durchgängen zu je 3 Minuten mit PBS auf dem Schüttler gewaschen.

Die Primärantikörper gegen Kollagen-Typ-I, -Typ-II und -Typ-VI wurden in entsprechender Konzentration (anti-Kollagen-Typ-I 1:200, anti-Kollagen-Typ-II 1:200, anti-Kollagen-Typ-VI 1:100) aufgetragen und über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert, sodass sie an die Zielstrukturen binden konnten.

Vor dem Auftragen des Sekundärantikörpers wurden die Proben wieder in drei Schritten mit PBS für jeweils 3 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit) im Verhältnis 1:400 inkubiert. Nach drei Waschvorgängen mit PBS für 3 Minuten auf dem Schüttler wurden die Proben auf Objektträger und Deckglas mit einem Tropfen DAPI Mounting Medium gedeckelt.

Als Trägerlösung für Primär- und Sekundärantikörper sowie für die Isotypkontrolle wurde Antibody-Diluent verwendet. Die Isotypkontrolle erfolgte mit rabbit-IgG im Verhältnis des entsprechenden Primärantikörpers.

2.2.8.4 Safranin-O-Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung von Kryotomschnitten die Safranin-O-Färbung auf Glykosaminoglykanen durchgeführt.^{63,64} Die Schnitte wurden zunächst für eine Minute in ddH₂O und anschließend für 6 Minuten in Weigert's Hämatoxylin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in ddH₂O und 0,5 %ige Salzsäure in Ethanol getaucht, bevor sie für 5 Minuten und fließendem Leitungswasser rehybridisiert und für 4 Minuten mit 0,02 % *Fast Green* Lösung inkubiert wurden. Überstehende Färbelösung wurde durch kurzes Eintauchen in 1 %ige Essigsäure entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für 6 Minuten in 0,1 % Safranin-O-Lösung gefärbt. Vor dem Deckeln der Schnitte mit Entellan wurden diese für eine Minute mit 100 %igem Ethanol und anschließend für 2 Minuten mit Xylen inkubiert. Unter dem Abzug wurden die Schnitte für zwei Tage getrocknet, bevor lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden konnten.

2.2.9 Biochemische Assays

Proben der 3D-Hydrogelkulturen für die quantitative Auswertung wurden an Tag 1 sowie an Tag 21 gewonnen. Pro Versuchsreihe und Zeitpunkt wurden 3 halbe Gele ausgewertet. Die jeweils anderen Hälften wurden für die histologischen Untersuchungen als Kryotomschnitte aufbereitet.

Allen Assay-Untersuchungen ging ein Papainverdau der Proben voraus. Hierfür wurde jedes halbe Gel in 200 µl PBE-Cystein-Puffer für 5 Minuten im Tissue Lyser bei 25 Hz zerkleinert. Anschließend wurden nochmals 200 µl PBE-Cystein-Puffer zugegeben sowie pro halbem Gel 3 U Papain. Die Proben wurden über Nacht im Heizblock bei 60 °C und 300 rpm ca. 16 Stunden lang verdaut.

Für die späteren Untersuchungen in DNA-, GAG- und Kollagen-Assays wurden die Proben in drei technischen Replikaten und die Kalibriergerade in acht Schritten zu zwei technischen Replikaten in einer 96-Well-Assay-Platte aufgetragen.

2.2.9.1 Quantitative Analyse des DNA-Gehalts

Für die quantitative Analyse des DNA-Gehaltes⁶⁵ wurden 10 µl der Papain-Lösung bzw. des Standards in eine schwarze 96-Well-Assay-Platte vorgelegt, denen dann 200 µl *Work solution* zugegeben wurde, die sich aus 1 µl Hoechst 33258 in 10 ml 1xTEN Puffer zusammensetzt. Die Messung am Tecan-Plattenreader erfolgte direkt im Anschluss an die Zugabe der *Work solution* mit den Einstellungen Ex 365 nm/ Em 458 nm. Als Standard wurde DNA aus Lachssperma in PBE-Cystein-Puffer (18.2 µg DNA/ml) verwendet. Zur Messung am Tecan-Reader wurde auch der verwendete DNA-Standard mit PBE-Cystein-Puffer zu 100 µl ergänzt.

2.2.9.2 Quantitative Analyse des Kollagen-Gehalts

Zum quantitativen Nachweis von Kollagen⁶⁶ wurde die in den Proben gelöste Menge Hydroxyprolin gemessen, die dann zur Berechnung der Kollagenmenge herangezogen wurde. Für die Durchführung des Assays wurden 10 µl der mit Papain verdauten Proben verwendet. Diese wurden unter Zugabe von jeweils 100 µl 37 %iger Salzsäure für 16 Stunden bei 99 °C auf dem Heizblock hydrolysiert. Nachdem die restliche Salzsäure für zwei Stunden bei 100 °C abgeraucht war, wurden die trockenen

Proben in 500 µl ddH₂O verdünnt. In einer 96-Well-Assay-Platte wurden pro Probe bzw. Standard 100 µl vorgelegt, welche zunächst für 20 Minuten mit 50 µl Chloramin-T-Lösung bei Raumtemperatur und anschließend mit 50 µl DAB-Lösung für 30 Minuten bei 65 °C im Trockenschrank inkubiert wurden. Das Messen der Proben erfolgte bei 570 nm Wellenlänge am Tecan-Plattenscanner und die Auswertung der gemessenen Daten mit der Software Magellan.

Als vergleichender Standard wurde ein Hydroxyprolin-Stock mit 1 mg Hydroxyprolin in 1 ml PBE-Cystein-Puffer verwendet. Der Stock wurde im Verhältnis von 1:10 mit PBE-Cystein verdünnt. Für die Kalibriergerade wurde der 1:10 verdünnte Stock mit PBE-Cystein jeweils auf 100 µl ergänzt, Anschließend wurden allen Standardproben 400 µl ddH₂O zugegeben, sodass sie ebenso wie die Proben ein Gesamtvolumen von 500 µl aufweisen konnte. Aus diesem Gesamtvolumen wurden dann 100 µl in der Assay-Platte vorgelegt und genauso wie die restlichen Proben mit Chloramin T- und DAB-Lösung inkubiert.

2.2.9.3 Quantitative Analyse des GAG-Gehalts

Für die quantitative Bestimmung des GAG-Gehaltes⁶⁷ wurden 10 µl Papain-Lösung für die Proben von Tag 1 und 1 µl der Papin-Lösung für die Proben von Tag 21 in eine 96-Well-Assay-Platte vorgelegt. Anschließend wurden alle Proben mit PBE-Cystein-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 µl ergänzt. Die Proben für die Kalibriergerade wurde mit 10 µl Standard und 40 µl PBE-Cystein in die Wells vorgelegt. Anschließend wurden pro Well 200 µl DMMB als *Work solution* aufgetragen und innerhalb von 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 590 nm am Tecan-Plattenscanner gemessen. Der Chondroitinstandard wurde aus 50 mg bovinem Chondroitinsulfat in 60 ml PBE-Cystein-Puffer gebildet. Der Standard wurde in den Verhältnissen 1:10 sowie 1:100 mit PBE-Cystein-Puffer verdünnt. Die vorgelegten Standards wurden mit PBE-Cystein-Puffer auf ein Volumen von 100 µl ergänzt. Aus diesem Gesamtvolumen wurden dann in der 96-Well-Assay-Platte 10 µl in zwei technischen Replikaten vorgelegt und mit PBE-Cystein-Puffer auf 50 µl ergänzt und mit 200 µl *Work solution* innerhalb von 10 Minuten am Tecan-Plattenreader gemessen.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die Messwerte für DNA-, Kollagen- und GAG-Gehalt aus der quantitativen Auswertung werden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zur Untersuchung auf statistische Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) mit anschließendem post-hoc-Test nach Bonferroni durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ gewählt. Die Durchführung der statistischen Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 6. Für die graphische Darstellung wurde ebenfalls GraphPad Prism 6 sowie Microsoft Office Excel Version 2206 verwendet. Die statistischen Untersuchungen wurden selbständig und ohne fremde Hilfe durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 ETABLIERUNG DER ISOLATIONSPROTOKOLLE

3.1.1 Isolationsprotokolle für Chondrozyten mit PZM

Zur Isolation von Chondrozyten mit perizellulärer Matrix wurden verschiedene, in der Literatur dargestellte Protokolle durchgeführt. Überwiegend wurden dabei Verfahren getestet, die eine enzymatische Isolation von Chondronen aus Frischknorpel beschrieben. Daneben wurden auch Protokolle getestet, deren Isolationsprodukt in der Literatur als Chondrozyten benannt wurde, sich aber dennoch konstant reproduzierbar mit einer deutlichen perizellulären Anreicherung von Kollagen-Typ-VI darstellen ließ. Die untersuchten Isolationsverfahren zeigten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl, die sich aus einem Gramm Frischknorpel gewinnen ließ (vgl. Abbildung 1), sowie im Gehalt von Kollagen-Typ-VI und in dessen räumlichem Bezug zur einzelnen Zelle (vgl. Abbildung 2).

Das Isolationsprotokoll nach Schuurman⁶¹ ist als Chondrozyten-Isolationsprotokoll benannt. Die hier gewonnenen Zellen wiesen einen regelmäßigen perizellulären Kollagen-Typ-VI-Saum auf. Die Regelmäßigkeit der perizellulären Assoziation konnte insb. in der immunhistochemischen Darstellung in der 3D-Kultur beobachtet werden (vgl. Abbildung 2, Teil B, 2), während an der Färbung von Zytospinpräparaten auch weiter von den Zellkernen entfernt Kollagen-Typ-VI nachweisbar war (vgl. Abbildung 2, Teil A, 4). Pro Gramm Frischknorpel ließen sich nach diesem Protokoll bei Verwendung eines Zellfilters der Größe 40 µm durchschnittlich $5,88 \times 10^6$ Zellen gewinnen (vgl. Abbildung 1).

Typische Isolationsprotokolle für Chondrone sind das Verfahren nach Bekkers⁶ und Lee⁷. Das so genannte *rapid digest*-Protokoll nach Bekkers⁶ wurde hier unter Verwendung von Zellfiltern der Größe 70 und 100 µm getestet. Die Isolationszeit betrug 45 Minuten. Kollagen-Typ-VI war in beiden Versionen regelmäßig perizellulär lokalisiert, konnte aber insgesamt nur sehr schwach nachgewiesen werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung fiel eine im Vergleich zu den anderen Isolationsprotokollen geringe Zelldichte auf (vgl. Abbildung 2, Teil A, 5a und 5b). Die

quantitative Messung der isolierten Zellzahl bestätigte diesen Eindruck und zeigte, dass unter Verwendung eines Zellfilters der Größe 70 μm 0,08 x 10⁶ Zellen pro Gramm Frischknorpel isoliert werden konnten. Bei einer Filtergröße von 100 μm betrug die isolierte Zellzahl 0,13 x 10⁶ pro Gramm Knorpel (vgl. Abbildung 1).

Das Verfahren nach Lee⁷ stellt eines der bekanntesten und verbreitetsten Protokolle zur Isolation von Chondronen dar. Nach einer Isolationszeit von 5 Stunden und unter Verwendung eines Zellfilters der Größe 100 μm konnte eine deutliche Anreicherung von perizellulärem Kollagen-Typ-VI immunhistochemisch mittels Fluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6b und Teil B, 3). Diese erscheint sowohl am Zytospinpräparat als auch im 3D-Hydrogel insgesamt unregelmäßig ausgeprägt. Pro Gramm Frischknorpel konnten durchschnittlich 3,84 x 10⁶ Zellen gewonnen werden. Die Verwendung eines Zellfilters der Größe 70 μm erbrachte bei gleicher Isolationsdauer durchschnittlich 4,32 x 10⁶ Zellen pro Gramm Knorpel. Am Zytospinpräparat konnte hier kein Kollagen-Typ-VI nachgewiesen werden. Die Zellzahl erschien niedriger als in den beiden anderen Variationen des Protokolls nach Lee, obwohl quantitativ mehr Zellen pro Gramm Frischknorpel nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6a und Abbildung 1). Die reduzierte Isolationsdauer von 5 auf 3 Stunden führte zu einer deutlichen Steigerung der immunhistochemisch am Zytospinpräparat dargestellten Kollagen-Typ-VI-Menge. Diese war zwar überwiegend perizellulär lokalisiert, aber inhomogen innerhalb der Präparate verteilt und neigte stärker als in den übrigen Protokollen zur Ausbildung von Konglomeraten (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6c). Pro Gramm Frischknorpel konnten durchschnittlich 1,78 x 10⁶ Zellen isoliert werden

Unter den hier getesteten Protokollen ließ sich die größte Zellzahl pro Gramm Knorpel durch das Isolationsprotokoll nach Schuurman mit einem Filter von 40 μm erreichen. Kollagen-Typ-VI war für dieses Protokoll sowohl in Zytospinpräparaten als auch in der Darstellung in 3D-Konstrukten stets in räumlicher Assoziation zu den Zellen nachweisbar und regelmäßiger ausgeprägt als in den übrigen zur Isolation von Chondrozyten mit PZM untersuchten Verfahren.

Die nachfolgende Abbildung 1 zeigt die Zahl an Chondrozyten mit PZM, die anhand der getesteten Protokolle gewonnen werden konnte.

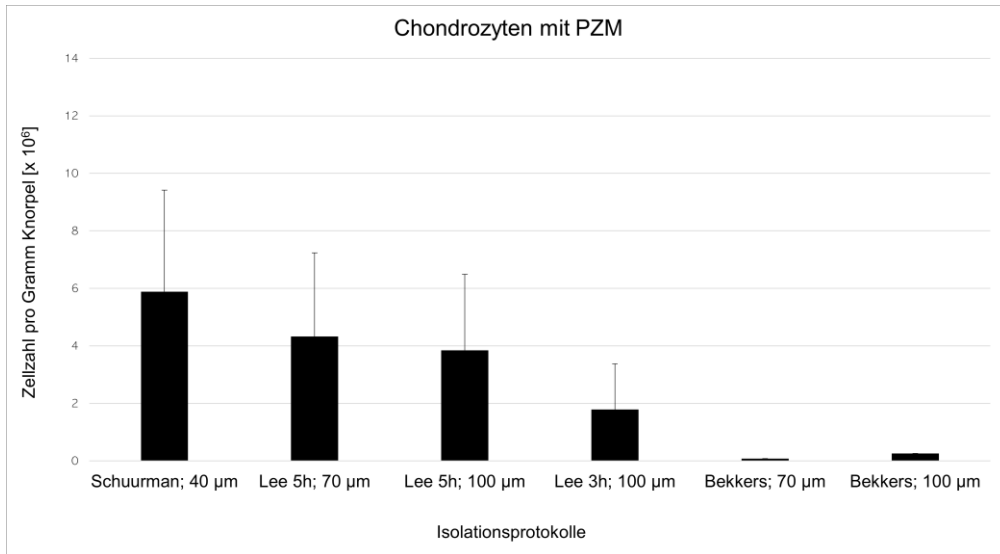


Abbildung 1: Vergleich verschiedener Protokolle zur Isolation von Chondrozyten mit PZM aus Frischknorpel

Anzahl der pro Gramm Frischknorpel isolierten Zellen; n=5 für Schuurman⁶¹, 40 µm, n=6 für Lee⁷ 5h, 70 µm und Lee⁷ 5h, 100 µm, n=2 für Lee⁷ 3h, 100 µm, n=1 für Bekkers⁶, 70 µm und Bekkers⁶, 100 µm. Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung.

3.1.1.1 Histologischer Nachweis typischer Komponenten der perizellulären Matrix an Tag 1

Kollagen-Typ-VI als wichtige Komponente der PZM wurde in Zytospinpräparaten, die unmittelbar nach Isolation der Zellen hergestellt wurden, durch immunhistochemische Verfahren nachgewiesen und mit Fluoreszenzfarbstoff mikroskopisch sichtbar gemacht (vgl. Abbildung 2, Teil A). Durch Verwendung von Zellfiltern unterschiedlicher Größe konnte die Menge an perizellulärem Kollagen-Typ-VI moduliert werden. Die größte Menge an Kollagen-Typ-VI zeigte sich für das verkürzte Isolationsprotokoll nach Lee unter Verwendung eines Filters der Größe 100 µm (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6c). Unter Verwendung eines Filters der Größe 70 µm hingegen konnte für das Protokoll nach Lee mit einer regulären Isolationsdauer von 5 Stunden kein Kollagen-Typ-VI in den Zytospinpräparaten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6a). Chondrozyten, die nach dem Verfahren nach Lee (5 Stunden) mit einem Zellfilter der Größe 100 µm isoliert wurden, zeigten nur unregelmäßig perizelluläres Kollagen-Typ-VI, das jedoch kräftig und in ähnlich großen Flächen wie nach dem verkürzten Isolationsprotokoll nach Lee ausgeprägt war (vgl. Abbildung 2, Teil A, 6b). Das Isolationsverfahren nach

Schuurman zeigte eine deutliche perizelluläre Anreicherung von Kollagen-Typ-VI (vgl. Abbildung 2, Teil A, 4), während die nach Bekkers isolierten Zellen in der immunhistochemischen Färbung der Zytospinpräparate Kollagen-Typ-VI nur in geringen Mengen und von den einzelnen Zellen dissoziiert vorliegend präsentierten (vgl. Abbildung 2, Teil A, 5a und 5b).

Für die Protokolle nach Lee und Schuurman wurden weiterführend auch histologische Präparate von Kryotomschnitten aus 3D-Kulturen in Agarosehydrogelen nach *Bioprinting*- sowie nach *cast*-Vorgang gewonnen. Für beide Isolationsprotokolle konnten Chondrozyten mit perizellulärem Kollagen-Typ-VI nachgewiesen werden, wobei dies nach Schuurman eine regelmäßigere perizelluläre Assoziation aufwies als nach Lee (vgl. Abbildung 2, Teil B).

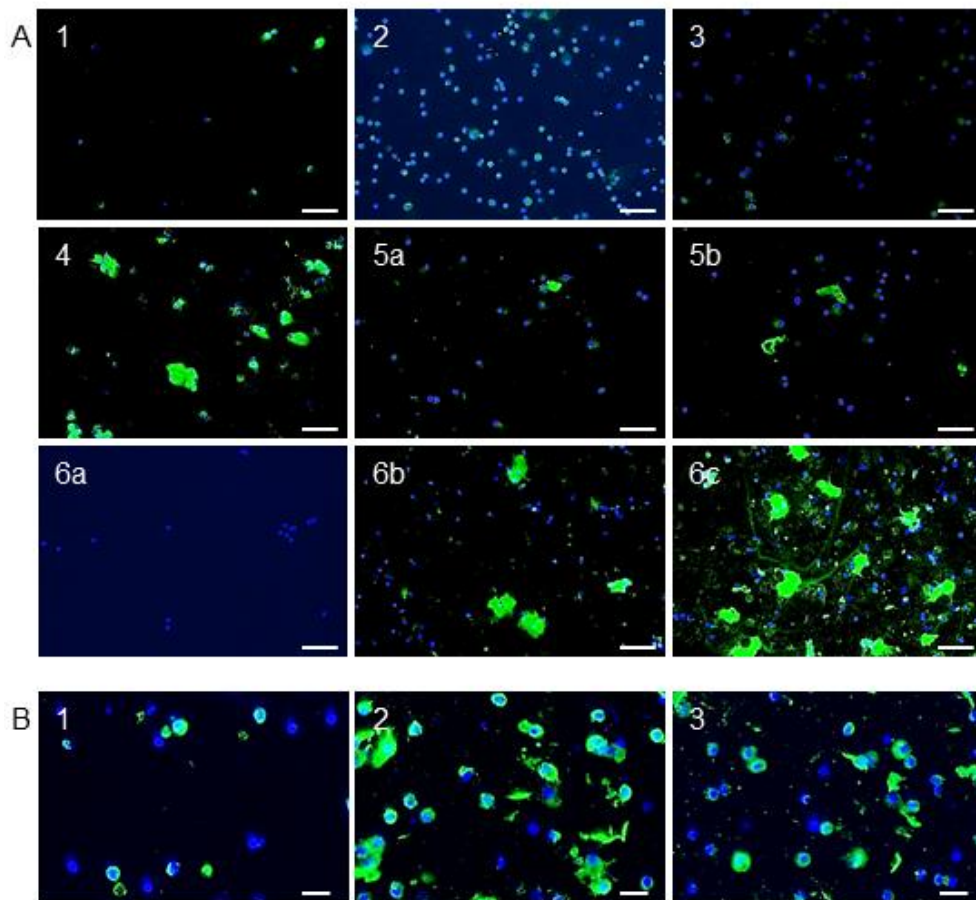


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-Typ-VI in Protokollen zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Zytospinpräparaten und in 3D-Kultur

A: *Zytospinpräparate* an d0 von verschiedenen Isolationsprotokollen für Chondrozyten *ohne* PZM (A 1-3) mit 1 nach Oseni⁵⁹, 2 nach Kuettner⁶², 3 Kombination aus Kuettner⁶² und Schuurman⁶¹; für Chondrozyten *mit* PZM (A 4 – 6c) mit 4 nach Schuurman⁶¹, 5a nach Bekkers⁶ (70 µm Zellfilter), 5b nach Bekkers⁶ (100 µm Zellfilter), 6a nach Lee⁷ (5 Stunden, 70 µm Zellfilter), 6b nach Lee⁷ (5 Stunden, 100 µm Zellfilter), 6c nach Lee⁷ (3 Stunden, 100 µm Zellfilter). B: *Kryotompräparate aus 3D-Kultur* aus Agarose-Hydrogel von verschiedenen Isolationsprotokollen an d1, *cast.* 1 Chondrozyten ohne PZM nach Kuettner⁶² und Schuurman⁶¹ sowie Chondrozyten mit PZM mit 2 nach Schuurman⁶¹ und 3 nach Lee⁷ (5 Stunden, 100 µm Zellfilter). A und B: Immunhistochemische Färbung von Kollagen-Typ-VI, Messbalken zeigt 100 µm.

3.1.2 Isolationsprotokolle für Chondrozyten ohne PZM

Um blanke Chondrozyten ohne PZM zu isolieren, wurden Protokolle getestet, durch die neben den Hauptbestandteilen der Extrazellulärmatrix auch die Komponenten der perizellulären Matrix durch enzymatische Verdaureaktion abgebaut werden.

Das Vorgehen nach Oseni⁵⁹ erbrachte nur eine geringe perizelluläre Anreicherung von Kollagen-Typ-VI (vgl. Abbildung 2, Teil A,1). Pro Gramm Frischknorpel ließen sich durchschnittlich $7,24 \times 10^6$ Zellen isolieren. Immunhistochemisch konnte hier nur sehr wenig und unregelmäßig verteiltes Kollagen-Typ-VI nachgewiesen.

Durch das Protokoll nach Kuettner⁶² ließen sich $2,99 \times 10^6$ Zellen aus einem Gramm Frischknorpel isolieren (vgl. Abbildung 3). Kollagen-Typ-VI konnte hier nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden und war dabei regelmäßig perizellulär lokalisiert (vgl. Abbildung 2, Teil A, 2).

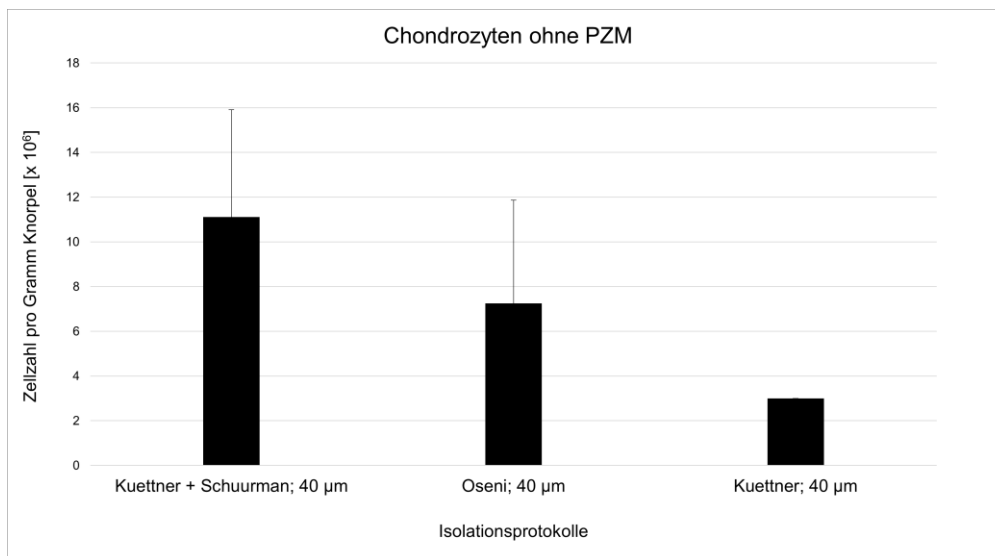


Abbildung 3: Vergleich verschiedener Protokolle zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM aus Frischknorpel

Anzahl der pro Gramm Frischknorpel isolierten Zellen; $n=7$ für Kuettner⁶² und Schuurman⁶¹, 40 μm , $n=4$ für Oseni⁵⁹ 40 μm und $n=1$ für Kuettner⁶² 40 μm . Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung.

Durch eine Kombination des Vorverdaus mit Pronase, wie es bei Kuettner beschrieben ist, und dem Protokoll nach Schuurman wurde ein weiteres Protokoll zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM erprobt. Nach Schuurman konnte in den vorliegenden Untersuchungen immunhistochemisch wiederholt Kollagen-Typ-VI nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.1.1), obwohl das Vorgehen als Protokoll zur Isolation von Chondrozyten beschrieben ist. Durch die Kombination mit dem Vorverdau mit Pronase nach Kuettner konnte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem Chondrozyten isoliert werden konnten, die nur geringste Mengen an Kollagen-Typ-VI aufwiesen (vgl. Abbildung 2, Teil A, 3 und B, 1). Pro Gramm Knorpel konnten mit diesem Verfahren durchschnittlich $11,1 \times 10^6$, die größte Anzahl der hier isolierten Zellen, gewonnen werden.

3.1.2.1 Histologischer Nachweis typischer Komponenten der perizellulären Matrix an Tag 1

Die Menge an perizellulärem Kollagen-Typ-VI ließ sich histologisch an Zytospinpräparaten unmittelbar nach der Isolation der Zellen sowie an Tag 1 nach Isolation und Einbettung in Hydrogele als Kryotomschnitte der 3D-Kultur nach *cast-* und *Bioprinting*-Vorgang nachweisen. Die nach den Isolationsprotokollen von Kuettner gewonnenen Chondrozyten präsentierten sich mit einem zarten perizellulärem Kollagen-Typ-VI-Saum. Auch die nach Oseni isolierten Chondrozyten wiesen in der Färbung der Zytospinpräparate teilweise noch Kollagen-Typ-VI-Rückstände auf. Nach Kombination der Protokolle nach Kuettner und Schuurman kam Kollagen-Typ-VI auf Zytospinpräparaten nur unregelmäßig und in minimalem Maße zur Darstellung, während der Großteil der Chondrozyten ohne perizelluläres Signal blieb (vgl. Abbildung 2, Teil A, 3). In der histologischen Darstellung aus 3D-Konstrukten hingegen ließ sich bei einem geringen Teil der Zellen ein kleiner Saum aus Kollagen-Typ-VI darstellen. Im Vergleich zu den Isolationsprotokollen nach Schuurman und Lee, ist der Gehalt an Kollagen-Typ-VI jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Ein großer Teil der nach dem Kombinationsprotokoll isolierten Zellen ist ohne perizelluläres Kollagen-Typ-VI darstellbar. Somit können anhand dieses kombinierten Protokolls Chondrozyten ohne PZM isoliert werden, die sich als Vergleichsgruppe für weiterführende Untersuchungen zum Einfluss der PZM im 3D-Druckmodell eignen.

3.2 CHONDROZYTEN MIT UND OHNE PZM, BIOPRINTING VS. CAST

Um den Einfluss des *Bioprinting*-Vorgangs auf das Überleben und die Syntheseleistung der Chondrozyten zu untersuchen, wurden Chondrozyten mit und ohne perizelluläre Matrix mittels eines Drucksimulators wie an vorheriger Stelle in dieser Arbeit (vgl. Kapitel 2.2.4.1) beschrieben dem Stress durch Scherkräfte innerhalb der Stahldüse ausgesetzt. Als Kontrollgruppen wurden vergleichend dazu ebenfalls Chondrozyten mit und ohne PZM ohne vorgeschalteten Druckprozess im *cast*-Vorgang händisch mittels Verdrängerpipette in Silikonformen gegossen.

3.2.1 Zellzahl und Zellüberleben

Zellzahl und Zellüberleben der Chondrozyten nach *Bioprinting* am Drucksimulator und nach *cast*-Vorgang wurden quantitativ mittels DNA-Assay und qualitativ mittels Live/Dead-Färbung an Tag 1 und Tag 21 in 3D-Kultur in Agarose-Hydrogelen untersucht. Tag 1 repräsentiert dabei den Zustand der Zellen kurz nach der Verarbeitung der Hydrogele mittels *print* oder *cast*. Da die Anzahl der in Agarosehydrogele eingebetteten Zellen für alle Gele gleich definiert war (vgl. Material und Methoden), lassen sich durch die Betrachtung der Live/Dead-Färbung Rückschlüsse auf Beeinträchtigung des Zellüberlebens durch den Verarbeitungsprozess ziehen. Nach 21 Tagen in 3D-Kultur können durch erneute Darstellung vitaler und avitaler Zellen Veränderungen in der quantitativ messbaren Zellzahl beurteilt werden.

Die Untersuchungen von Zellzahl und Zellüberleben nach 3D-Druck sind hier denen nach *cast*-Vorgang gegenübergestellt. An Tag 1 stellen sich alle untersuchten Gruppen in der Live/Dead-Färbung mit einer guten Vitalität der Zellen in den Hydrogelen dar (vgl. Abbildung 4). Es konnten in jedem Hydrogel nur vereinzelte avitale, rot gefärbte Zellen nachgewiesen werden. In der quantitativen Untersuchung mittels DNA-Assay konnte für Chondrozyten mit PZM an Tag 1 nach *Bioprinting* eine im Vergleich zu den entsprechenden *cast*-Bedingungen und zu Chondrozyten ohne PZM nach *Bioprinting* eine geringere DNA-Menge nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5). Die Betrachtung der Live/Dead-Färbung bestätigt zwar eine geringere Zelldichte, zeigt aber trotzdem ein gutes Zellüberleben mit einer deutlichen Dominanz an grün (vital) dargestellten Zellen (vgl. Abbildung 4).

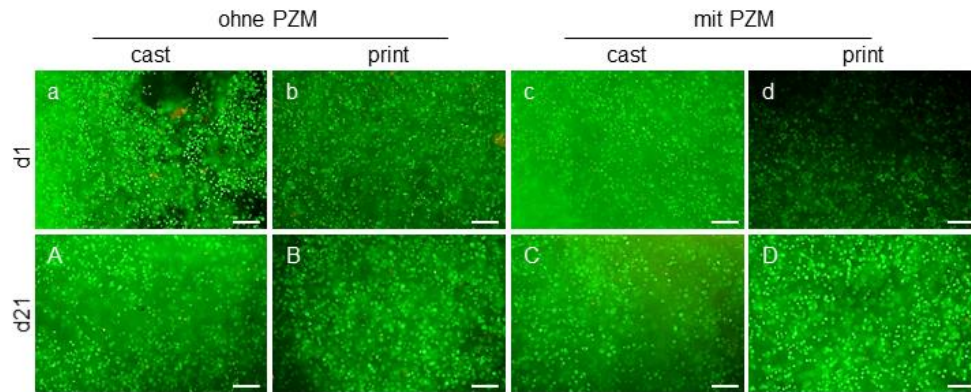


Abbildung 4: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print*

Live/Dead-Färbung, vitale Zellen grün, avitale Zellen rot dargestellt, Messbalken zeigt 100 µm.

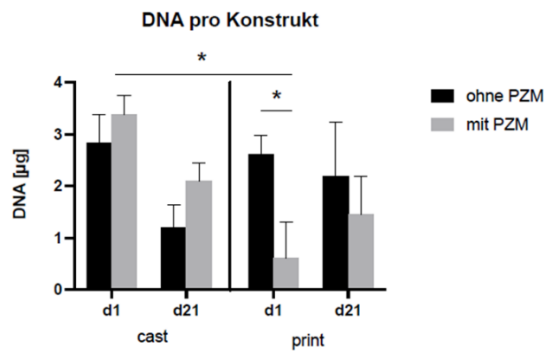


Abbildung 5: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print*

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. * zeigt statistische Signifikanz mit p-Wert < 0,05.

An Tag 21 präsentierten sich alle dargestellten Untersuchungsgruppen in der Live/Dead-Färbung mit einem ähnlichen Bild aus deutlich dominierend vital dargestellten Zellen. Übereinstimmend dazu konnten in der quantitativen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an DNA pro Hydrogel an Tag 21 festgestellt werden (vgl. Abbildungen 4 und 5). Weder in der Live/Dead-Färbung noch in der quantitativen Untersuchung der DNA-Menge pro Hydrogel konnten signifikante Unterschiede innerhalb einer Untersuchungsgruppe von Tag 1 hin zu Tag 21 nachgewiesen werden, sodass von einem stabilen Gehalt vitaler Zellen innerhalb der Zeit in Kultur ausgegangen werden kann (vgl. Abbildungen 4 und 5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach 21 Tagen alle Vergleichsgruppen hinsichtlich Zellzahl und Zellüberleben ähnliche Ergebnisse zeigten, während die Zellzahl an Tag 1 für Chondrozyten mit PZM unter Druckbedingungen geringer ausfiel als für die übrigen Gruppen. Das Zellüberleben an Tag 1 war jedoch für alle Vergleichsgruppen gleich gut.

3.2.2 Synthese von Knorpelmatrixbestandteilen

3.2.2.1 Synthese von knorpelspezifischen Kollagen-Typen

Die Extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpelgewebes besteht überwiegend aus Proteoglykanen und Kollagen. Eine ihrer Hauptkomponenten stellt Kollagen-Typ-II dar. Es wird von Chondrozyten synthetisiert und daher als Marker für die Bestimmung von chondrozytenhaltigem Gewebe verwendet.⁶⁸ Im Gegensatz dazu lässt sich Kollagen-Typ-VI typischerweise in der perizellulären Matrix der Chondrozyten in Nativknorpel nachweisen. Beide eignen sich somit zur Bestimmung von Knorpelgewebe, aber auch zur Beurteilung der Synthesefunktion der Chondrozyten in unterschiedlichen Biofabrikationsmodellen. Der Nachweis kann sowohl quantitativ mittels Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes pro Hydrogel als auch mittels antikörpervermittelter Immunfluoreszenzfärbung erfolgen. Die immunhistochemische Untersuchung am histologischen Präparat erlaubt eine Differenzierung in unterschiedliche Kollagentypen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die knorpelspezifischen Typ-II- und Typ-VI-Kollagene sowie Kollagen-Typ-I durch mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper sichtbar gemacht. Kollagen-Typ-I ist kein typischer Bestandteil der Matrix von hyalinem Knorpel, sondern wird überwiegend in Knochengewebe und Faserknorpel synthetisiert. Sein Nachweis dient damit als Hinweis für eine Dedifferenzierung der Chondrozyten mit Verlust der spezifischen Synthesefunktion.⁴³

Die histologische Differenzierung der unterschiedlichen Kollagentypen erfolgte hier nur an Tag 21, da sie die Funktionalität der Chondrozyten darstellen soll. An Tag 1 wurden die Chondrozyten hinsichtlich ihres Gehaltes an perizellulärem Kollagen-Typ-VI in *Chondrozyten mit PZM* und *Chondrozyten ohne PZM* unterteilt. Eine Extrazellulärmatrix besteht nach enzymatischer Isolation der Chondrozyten an Tag 1 nicht mehr. Diese muss erst im Verlauf durch die in das Hydrogel eingesetzten Chondrozyten synthetisiert werden. Abbildung 6 zeigt die immunhistochemische Darstellung der unterschiedlichen synthetisierten Kollagentypen in histologischen Schnittpräparaten aus 3D-Kultur in Agarosehydrogelen an Tag 21 sowie den Nachweis von Kollagen-Typ-VI an Tag 1. Die quantitative Untersuchung des Kollagengehaltes wurde an Tag 1 sowie an Tag 21 durchgeführt und kann damit eine Zunahme innerhalb dieses Zeitraums anzeigen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 als Mittelwert mit ihrer Standardabweichung dargestellt.

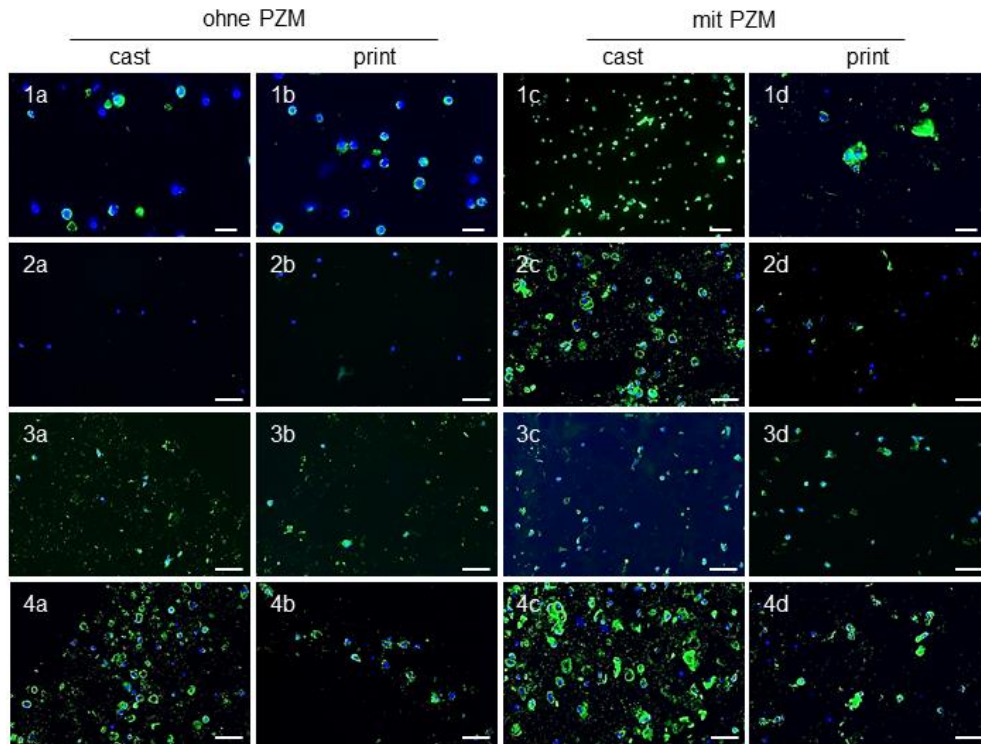


Abbildung 6: Knorpelspezifische Kollagentypen von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag1 und Tag 21, cast vs. print

1(a-d): Kollagen-Typ-VI an Tag 1. **2(a-d):** Kollagen-Typ-I an Tag 21. **3(a-d):** Kollagen-Typ-II an Tag 21. **4(a-d):** Kollagen-Typ-VI an Tag 21. Immunhistochemie, lichtmikroskopische Aufnahmen mit Fluoreszenzfilter, 1(a-d) Messbalken zeigt 20 μm , 2-4 Messbalken zeigt 50 μm .

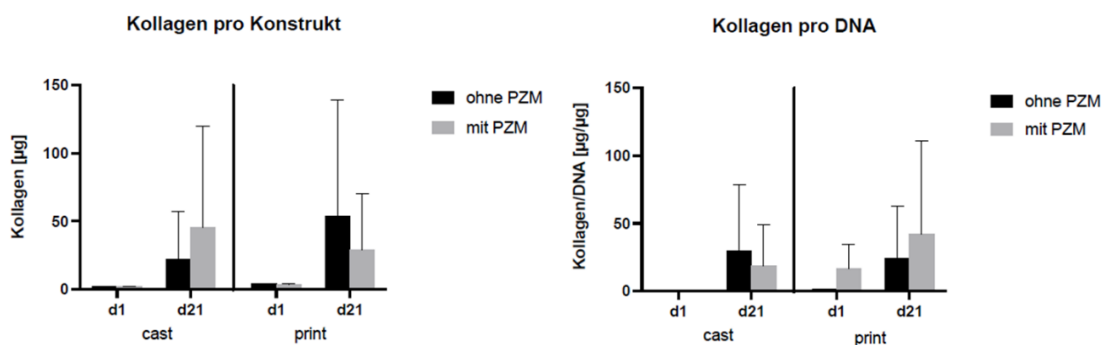


Abbildung 7: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, cast vs. print

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

An Tag 1 ließen sich quantitativ in der Kollagenmenge weder pro Hydrogel noch pro DNA-Menge Unterschiede nachweisen (vgl. Abbildung 7). In der histologischen Untersuchung zeigten sich jedoch Unterschiede im Gehalt an perizellulärem Kollagen-Typ-VI zwischen den beiden Isolationsprotokollen, sodass Chondrozyten ohne PZM von Chondrozyten mit PZM sicher abgegrenzt werden konnten (vgl. Abbildung 6).

Die histologische Untersuchung an Tag 21 zeigte eine insgesamt schwach ausgeprägte Kollagensynthese in allen drei untersuchten Kollagentypen (vgl. Abbildung 6). Dabei zeigte sich lediglich für Kollagen-Typ-VI eine erwartungsgemäße perizelluläre Anreicherung. Chondrozyten, die ohne PZM dem 3D-Druck- bzw. *cast*-Vorgang zugeführt wurden, wiesen an Tag 21 perizelluläres Kollagen-Typ-VI auf. Die darstellbare Menge an Kollagen-Typ-VI war dabei ähnlich groß wie bei Chondrozyten mit PZM an Tag 1.

An Tag 21 zeigten Chondrozyten mit PZM in der immunhistochemischen Darstellung einen etwas größeren Gehalt an Kollagen-Typ-VI als Chondrozyten ohne PZM. Für beide Zellarten waren unter Druckbedingungen an Tag 21 weniger Zellen im Hydrogel sichtbar. Der Kollagen-Typ-VI-Gehalt um die einzelnen Zellen war jedoch ähnlich groß wie unter *cast*-Bedingungen (vgl. Abbildung 6). Chondrozyten mit PZM zeigten von Tag 1 zu Tag 21 lediglich unter *cast*-Bedingungen eine leichte Zunahme im Gehalt an Kollagen-Typ-VI, während es unter *print*-Bedingungen nicht zu einer ausgeprägten Steigerung der perizellulär darstellbaren Menge an Kollagen-Typ-VI kam (vgl. Abbildung 6). Chondrozyten ohne PZM präsentierten sich 21 Tage nach *Bioprinting* mit einer schwächer darstellbaren Menge an Kollagen-Typ-VI als Chondrozyten ohne PZM nach *cast*-Vorgang.

Kollagen-Typ-I und -II ließen sich in den untersuchten Gruppen an Tag 21 nur in sehr geringem Maße nachweisen (vgl. Abbildung 6). Untersuchungen anderer Schnittebenen und weiterer Hydrogele zeigten ähnliche Befunde (Bilder nicht dargestellt). Die quantitative Untersuchung des Gesamtkollagens zeigte an Tag 21 im Vergleich zu Tag 1 tendenziell höhere Werte und damit einen Trend zur Zunahme des Kollagengehalts nach drei Wochen (vgl. Abbildung 7), auch wenn sich hierfür keine statistische Signifikanz beschreiben ließ. Die Messwerte innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen wichen stark voneinander ab, was durch die hohen Fehlerbalken

zum Ausdruck kommt. Die Verhältnisse zwischen den beiden Arten von Chondrozyten sowie zwischen den Verarbeitungsmethoden der Hydrogele sind daher nicht eindeutig zu bewerten.

3.2.2.2 Glykosaminoglykanproduktion

Glykosaminglykan (GAG) stellt eine weitere wesentliche Komponente der Extrazellulärmatrix von hyalinem Knorpel dar. Unter optimalen Bedingungen produzieren Chondrozyten in 3D-Kulturen in Hydrogelen knorpeltypische Komponenten der Extrazellulärmatrix. Der Nachweis von GAG nach einer Zeit von 21 Tagen in Kultur deutet auf eine erhaltene Differenzierung und chondrozytentypische Synthesefunktion hin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Chondrozyten mit PZM als auch ohne PZM hinsichtlich ihrer Vitalität nach 21 Tagen in Kultur durch den Druckvorgang nicht beeinträchtigt wurden. Von besonderem Interesse ist daher die Untersuchung der Funktionalität der unterschiedlichen Chondrozyten nach *Bioprinting* gemessen an der Produktion von Glykosaminoglykanen. Der Gehalt an GAG wurde an Tag 1 und Tag 21 bestimmt. Die quantitativ gemessene Menge an GAG wurde sowohl auf das einzelne Hydrogel als auch auf die im Hydrogel gemessene Menge an DNA bezogen. Die qualitative Untersuchung an histologischen Präparaten erfolgte mittels Safranin-O-Färbung, in der Glykosaminoglykan rot erscheint.

An Tag 1 konnte histologisch kein GAG nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 8). Hinsichtlich der Menge an GAG pro Hydrogel zeigten alle Gruppen in der quantitativen Messung eine signifikante Zunahme von Tag 1 zu Tag 21 (vgl. Abbildung 9). Auch histologisch ließ sich an Tag 21 für alle Gruppen ein deutlicher Gehalt an GAG darstellen. Chondrozyten ohne PZM nach Druckvorgang zeigten dabei die schwächste Färbung. Chondrozyten mit PZM imponierten hingegen sowohl unter *cast*- als auch unter *Bioprinting*-Bedingungen mit einer kräftigen Färbung von GAG. Nach *cast*-Vorgang zeigten auch Chondrozyten ohne PZM an Tag 21 kräftig färbbares GAG (vgl. Abbildung 8). In der quantitativen Untersuchung des GAG-Gehaltes bezogen auf die Menge an DNA an Tag 21 präsentierten sich Chondrozyten mit PZM nach *Bioprinting*-Bedingungen als stärkste Gruppe, während gedruckte Chondrozyten ohne PZM den geringsten Messwert zeigten (p-Wert 0,0333) (vgl. Abbildung 9).

Zusammenfassend ließ sich für alle Gruppen eine deutliche Produktion von GAG innerhalb von 21 Tagen in 3D-Kultur in Agarose-Hydrogelen nachweisen. 21 Tage nach 3D-Druck zeigten Chondrozyten ohne PZM sowohl histologisch-qualitativ als auch quantitativ signifikant weniger GAG pro DNA als Chondrozyten mit PZM.

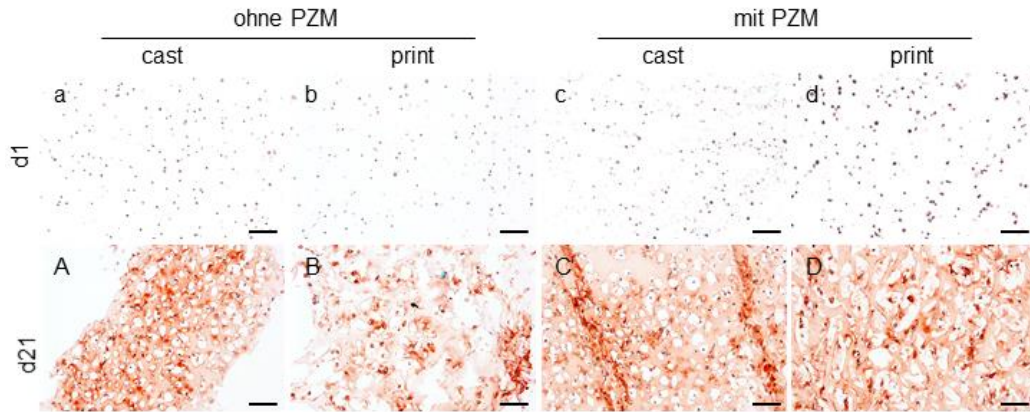


Abbildung 8: GAG-Synthese von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, cast vs. print

Safranin-O-Färbung, Messbalken zeigt 100 μm .

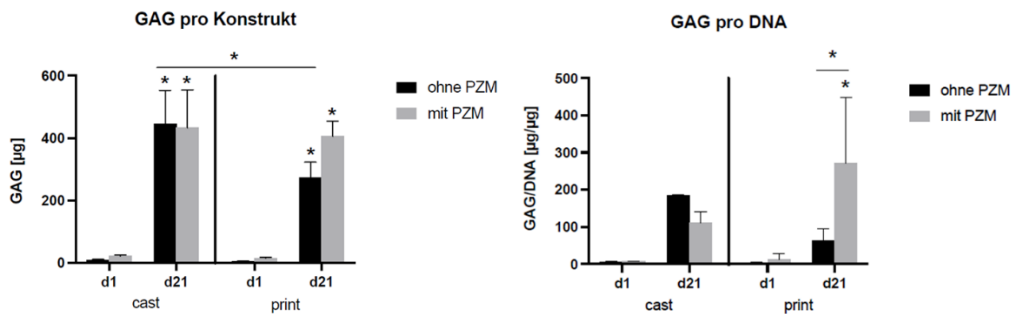


Abbildung 9: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, cast bzw. print

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. * zeigt, wenn nicht anders markiert, statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ zu Tag 1.

3.3 CHONDROZYTEN MIT UND OHNE PZM NACH CAST UND BIOPRINTING UNTER TEMPERATURKONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN

In Kapitel 3.2 sind die Untersuchungsergebnisse am Drucksimulator beschrieben. Wie bereits im Kapitel Material und Methoden (vgl. Kapitel 2.2.4.1) erwähnt, verfügt der Drucksimulator über zentrale Elemente eines 3D-Bioprinters, wie einer Druckerspitz mit konischer Stahlnadel, durch die die Biotinte mittels pneumatisch erzeugten Drucks gepresst wird.

Der Einsatz einer thermosensiblen Biotinte, deren Viskosität von der Umgebungstemperatur abhängig ist, erfordert die Integration weiterer, temperaturkontrollierender Elemente in den Versuchsaufbau, wie sie am Drucksimulator nicht gewährleistet werden konnten. Die bisher beschriebenen Experimente können also als Vorversuche betrachtet werden. Durch den Einsatz des *Cellink* 3D-Druckers sollten noch kontrolliertere Versuchsbedingungen geschaffen werden und der mögliche protektive Einfluss der PZM während des Druckvorgangs auch an einer Biotinte mit höherer Viskosität untersucht werden, die mit einer Verstärkung der auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte einhergeht.

3.3.1 Auswahl geeigneter Temperaturbedingungen

Der Einfluss unterschiedlicher Temperaturniveaus auf die Eigenschaften von Agarosegelen wurde anhand empirischer Versuche ermittelt. Ziel war es, bei erhaltener Pipettierbarkeit Agarosegele unterschiedlicher Viskosität herstellen zu können. In den Experimenten am Drucksimulator waren die 2%igen Agarosesole zwischen den einzelnen Arbeitsschritten in einem Heizblock bei 40°C temperiert worden, um die Viskosität möglichst gering zu halten und somit eine gute Pipettierbarkeit zu gewährleisten. Für die suspendierten Zellen liegt dieses Temperaturniveau innerhalb einer physiologischen Bandbreite, sodass diese Bedingung auch für die Versuche am *Bioprinter* gewählt wurde.

Mit abnehmender Temperatur wurde die Viskosität der 2 %igen Agarosehydrogele größer und die Verarbeitung mittels Verdrängerpipette nahm in ihrer Qualität ab, da die Gele nicht mehr rückstandslos aus dem Eppendorf Tube aufgenommen werden konnten. Bei einem Temperaturniveau von 33 °C war die Viskosität der Agarosehydrogele deutlich höher als bei 40 °C, die Materialverluste durch Schwierigkeiten beim Pipettiervorgang konnten jedoch unter diesen Bedingungen noch so gering wie möglich gehalten werden.

Somit konnten geeignete Temperaturniveaus für die nachfolgend beschriebene Durchführung der Druckversuche am *Bioprinter* und in den vergleichenden *cast*-Versuchen bei 40 °C und bei 33 °C definiert werden.

3.3.2 Zellzahl und Zellüberleben

Der Einfluss der mechanischen Belastung während des *Bioprinting*-Vorgangs auf Zellzahl und Zellüberleben der Chondrozyten wurde auch unter temperaturkontrollierten Bedingungen untersucht. Dabei erfolgte analog zu den Experimenten am Drucksimulator die Quantifizierung der DNA-Menge pro Hydrogel mittels DNA-Assay sowie die Darstellung vitaler und avitaler Zellen mittels Live/Dead-Färbung (vgl. Kapitel 2.2.7 und 2.2.10). Die Ergebnisse der Untersuchung der Chondrozyten nach *Bioprinting* wurden denen nach *cast*-Vorgang gegenübergestellt.

3.3.2.1 Zellzahl und Zellüberleben nach cast und Bioprinting bei 40 °C

Für eine Temperatur von 40 °C zeigte sich an Tag 1 in der Live/Dead-Färbung für Chondrozyten mit PZM ein kräftigeres Signal vitaler Zellen bei einer nur sehr geringen Anzahl avitaler Zellen. Chondrozyten ohne PZM zeigten in der Live/Dead-Färbung nach *Bioprinting* mehr avitale Zellen als Chondrozyten mit PZM, während für beide der Anteil an vitalen Zellen das Bild deutlich dominierte (vgl. Abbildung 10). In beiden Zellgruppen zeigten sich an Tag 1 keine Unterschiede in der Live/Dead-Färbung zwischen *cast* und *print*-Vorgang. In der quantitativen Untersuchung mittels DNA-Assay ließen sich an Tag 1 keine signifikanten Unterschiede darstellen (vgl. Abbildung 11). Chondrozyten mit PZM zeigten jedoch sowohl unter *cast*- als auch unter *print*-Bedingungen einen Trend zu höheren Werten an DNA pro Konstrukt.

An Tag 21 präsentierten sich alle Gruppen mit einem guten Zellüberleben, verdeutlicht durch einen hohen Gehalt an vitalen Zellen in der Live/Dead-Färbung bei kaum mehr nachweisbaren avitalen Zellen. Chondrozyten mit PZM präsentierten hier unter *cast*-Bedingungen an Tag 21 eine geringe Zelldichte im Hydrogel im Vergleich zu den anderen Zellgruppen. Dabei war der Anteil in grün dargestellter vitaler Zellen dominierend und es konnten nur vereinzelt avitale Zellen (rot) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 10). Für Chondrozyten ohne PZM konnten an Tag 21 keine Unterschiede zwischen *cast*- und *Bioprinting*-Vorgang in der Live/Dead-Färbung nachgewiesen werden. In der quantitativen Messung des DNA-Gehalts pro Hydrogel konnten zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen festgestellt werden. Allerdings war auch an Tag 21 der Trend zu höheren Werten für die Gruppen von Chondrozyten mit PZM zu verzeichnen (vgl. Abbildung 11).

Im Vergleich zu Tag 1 präsentierten sich an Tag 21 alle Gruppen mit einem noch stärkeren grünen Signal. Die Dichte der zellulären Besiedelung erschien an Tag 21 im Vergleich zu Tag 1 bis auf Chondrozyten mit PZM nach *cast*-Vorgang nicht verändert. Der Nachweis von avitalen Zellen gelang nur vereinzelt in den Hydrogelen mit Chondrozyten mit PZM nach *cast*- und ebenso nach *Bioprinting*-Vorgang (vgl. Abbildung 10). In der quantitativen Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der DNA-Menge an Tag 1 und an Tag 21, wobei für alle Gruppen, insbesondere jedoch für Chondrozyten ohne PZM, unter *print*-Bedingungen tendenziell niedrigere Werte im Vergleich zum *cast*-Vorgang gemessen werden konnten (vgl. Abbildung 11).

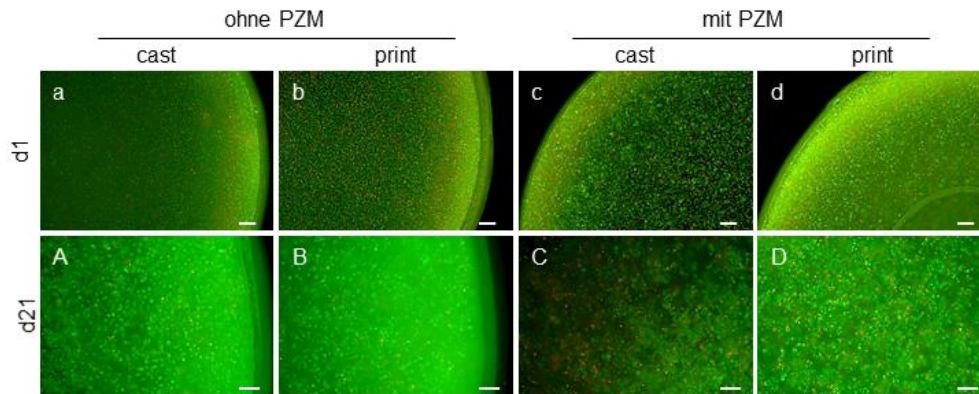


Abbildung 10: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 40 °C

Live/Dead-Färbung, vitale Zellen grün, avitale Zellen rot dargestellt, Messbalken zeigt 100 µm.

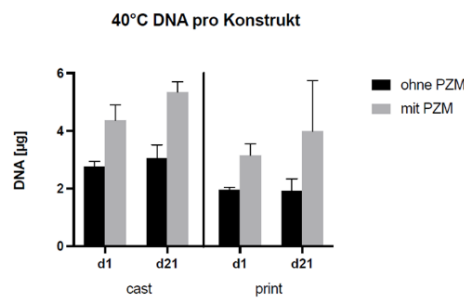


Abbildung 11: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 40 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

3.3.2.2 Zellzahl und Zellüberleben nach *cast* und *Bioprinting* bei 33 °C

Für eine Temperatur von 33 °C präsentierten sich an Tag 1 alle Gruppen mit überwiegend vitalen Zellen, wenngleich auch verglichen mit den Beobachtungen bei 40 °C etwas mehr avitale Zellen dargestellt werden konnten (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 10). In der quantitativen Untersuchung ließ sich für Chondrozyten mit PZM an Tag 1 sowohl unter *cast*- als auch unter *Bioprinting*-Bedingungen ein höherer DNA-Gehalt nachweisen als für Chondrozyten ohne PZM (vgl. Abbildung 13). Weder in der histologischen Darstellung mittels Live/Dead-Färbung noch in der quantitativen Messung des DNA-Gehaltes ließen sich für Chondrozyten mit und ohne PZM deutliche

Unterschiede zwischen den Methoden *cast* und *print* nachweisen (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13)

An Tag 21 konnte unter *cast*-Bedingungen für Chondrozyten mit PZM ein signifikant höherer Gehalt an DNA pro Hydrogel gemessen werden als für Chondrozyten ohne PZM (p-Wert 0,0111) (vgl. Abbildung 13). In der Live/Dead-Färbung ließ sich dieser Unterschied als Tendenz bezüglich der darstellbaren Zellzahl nachempfinden (vgl. Abbildung 12). Alle Gruppen zeigten jedoch visuell ein gutes Überleben mit einem kaum nachweisbaren Anteil an avitalen Zellen innerhalb der Hydrogele an Tag 21.

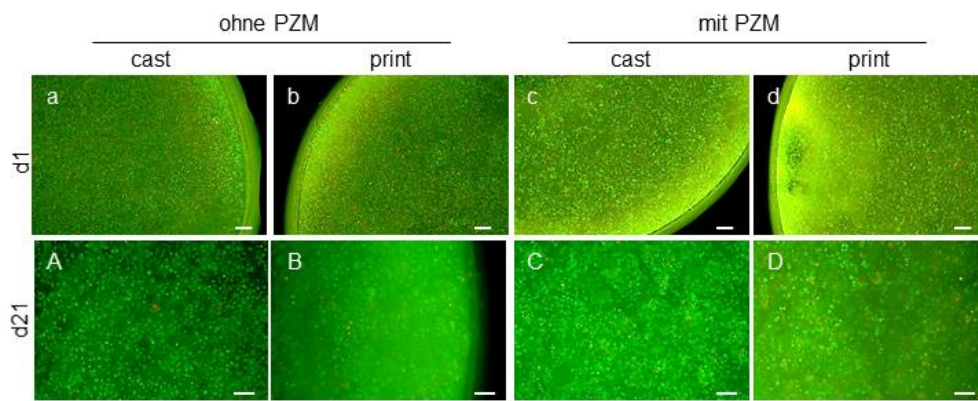


Abbildung 12: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 33 °C

Vitale Zellen grün, avitale Zellen rot dargestellt. Messbalken zeigt 100 µm.

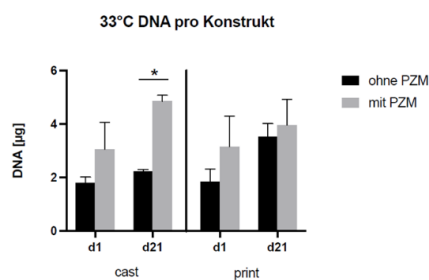


Abbildung 13: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 33 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3). (* zeigt statistische Signifikanz bei $p < 0,05$).

Zusammenfassend ließ sich nur bei 33 °C an Tag 21 ein signifikanter Unterschied in der DNA-Menge pro Hydrogel zwischen Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM nach *cast*-Vorgang zeigen. Die Verarbeitungsmethode der Hydrogele (*cast* vs. *Bioprinting*) zeigte weder bei 33 °C noch bei 40 °C einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Menge pro Hydrogel oder auf die Zellvitalität in der Live/Dead-Färbung. Insgesamt konnten für Chondrozyten mit PZM im Vergleich zu Chondrozyten ohne PZM höhere Werte an DNA pro Hydrogel bestimmt werden, wenn auch hierfür lediglich an Tag 21 nach *cast*-Vorgang bei 33 °C eine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte.

3.3.3 Synthese von Knorpelmatrixbestandteilen

3.3.3.1 Synthese von knorpelspezifischen Kollagentypen

Kollagengehalt nach cast- und Bioprinting-Verfahren bei 40 °C

Unter temperaturkontrollierten Bedingungen wurde der Kollagengehalt nur an Tag 21 histologisch untersucht. An Tag 1 wurde nach enzymatischem Verdau der Extrazellulärmatrix zur Isolation der Chondrozyten aus Nativknorpel bis auf das bereits dargestellte Kollagen-Typ-VI kein weiterer Kollagengehalt erwartet. Die entsprechenden histologischen Betrachtungen zum Zustand der Chondrozyten unmittelbar nach enzymatischer Isolation sind an vorheriger Stelle in dieser Arbeit bereits ausreichend dargestellt (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 6). Die quantitative Messung der Kollagenmenge erfolgte im Gegensatz dazu sowohl an Tag 1 als auch an Tag 21, um die Zunahme des Kollagengehaltes innerhalb der Zeit in Kultur und damit die Syntheseleistung der Chondrozyten bewerten zu können.

Für eine definierte Versuchstemperatur von 40 °C erbrachte die quantitative Messung des Gesamtkollagengehaltes an Tag 1 keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (vgl. Abbildung 14). Dies gilt sowohl für die Menge an Kollagen bezogen auf das gesamte Hydrogel sowie auf den Gehalt der DNA normiert.

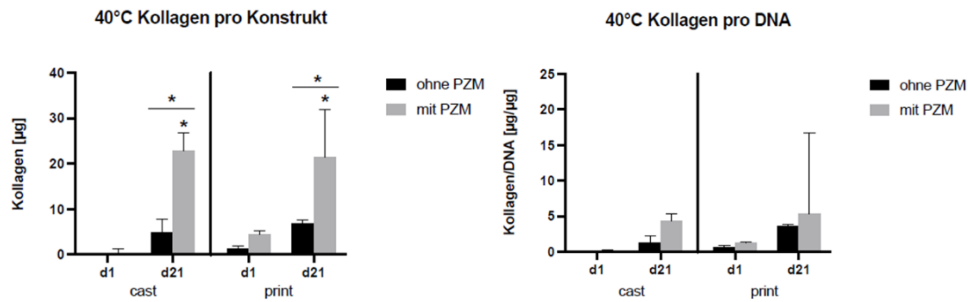


Abbildung 14: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, cast vs. print bei 40 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. (n=3; * zeigt, wenn nicht anders markiert, statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ zu Tag 1).

An Tag 21 konnte für Chondrozyten mit PZM ein deutlich höherer Gehalt an Gesamtkollagen pro Hydrogel nachgewiesen werden als für Chondrozyten ohne PZM. Sowohl unter *cast*- als auch unter *Bioprinting*-Bedingungen war dieser Unterschied signifikant (p-Wert unter *cast*-Bedingungen 0,0019; p-Wert unter *Bioprinting*-Bedingungen 0,0445). Der *Bioprinting*-Vorgang führte weder bei Chondrozyten mit PZM noch bei Chondrozyten ohne PZM zu einer Reduktion der Kollagenproduktion pro Hydrogel (vgl. Abbildung 14). Für Chondrozyten mit PZM konnte eine deutliche Zunahme im Kollagengehalt pro Hydrogel von Tag 1 zu Tag 21 hin beobachtet werden, der sich auch in der kräftigen immunhistochemischen Darstellung von Kollagen-Typ-II an Tag 21 widerspiegelt (vgl. Abbildung 15). Für Chondrozyten ohne PZM ließ sich quantitativ kein signifikanter Unterschied im Kollagenhalt von Tag 1 und Tag 21 feststellen.

Bezogen auf die Menge an DNA ließ sich quantitativ an Tag 21, unter Berücksichtigung des hohen Fehlerbalkens, der größte Gesamtkollagengehalt für Chondrozyten mit PZM unter *Bioprinting*-Bedingungen messen, während der kleinste Wert bei Chondrozyten ohne PZM unter *cast*-Bedingungen festgestellt wurde. Chondrozyten mit PZM zeigten im Allgemeinen bezogen auf den Kollagengehalt pro Mikrogramm DNA höhere Messwerte als Chondrozyten ohne PZM (vgl. Abbildung 14). Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Betrachtung der immunhistochemischen Färbung verschiedener Kollagentypen kann die Synthese des Gesamtkollagens weiter differenzieren und ermöglicht daher eine Beurteilung der Qualität der produzierten Kollagentypen und damit des Differenzierungszustandes und der Syntheseleistung der Chondrozyten. Abbildung 15 fasst die histologische Betrachtung der synthetisierten Komponenten der Extrazellulärmatrix – Kollagen und GAG – für *cast*- und *Bioprinting*-Bedingungen an Tag 21 bei 40 °C zusammen. Bei einer Versuchstemperatur von 40 °C ließ sich dabei für alle Gruppen die Produktion von knorpelspezifischen Kollagentypen zeigen. Der Nachweis von Kollagen-Typ-I als Hinweis für eine Dedifferenzierung der Chondrozyten war in keiner der untersuchten Gruppen als starkes Signal visuell darstellbar (vgl. Abbildung 15). Kollagen-Typ-II und -Typ-VI konnten an Tag 21 hingegen immunhistochemisch mittels Fluoreszenzfärbung deutlich dargestellt werden.

Für Chondrozyten mit PZM nach *cast* konnte die kräftigste Färbung und damit der visuell größte Gehalt an Kollagen-Typ-II und -Typ-VI bestimmt werden. (vgl. Abbildung 15). Chondrozyten ohne PZM zeigten an Tag 21 nach *cast* zwar ebenfalls einen deutlichen nachweisbaren Gehalt an Kollagen-Typ-II, verglichen mit den anderen Gruppen jedoch die schwächste Produktion.

Kollagen-Typ-VI wurde in allen Versuchsgruppen synthetisiert, wobei die immunhistochemische Darstellung für Chondrozyten mit PZM unter *cast*-Bedingungen am kräftigsten möglich war (vgl. Abbildung 15). Diese war sowohl gegenüber den Chondrozyten ohne PZM als auch gegenüber Chondrozyten mit PZM unter *Bioprinting*-Bedingungen stärker ausgeprägt. Chondrozyten ohne PZM zeigten keine deutlichen Unterschiede im Gehalt an Kollagen-Typ-VI zwischen *cast*- und *print*-Bedingungen (vgl. Abbildung 15).

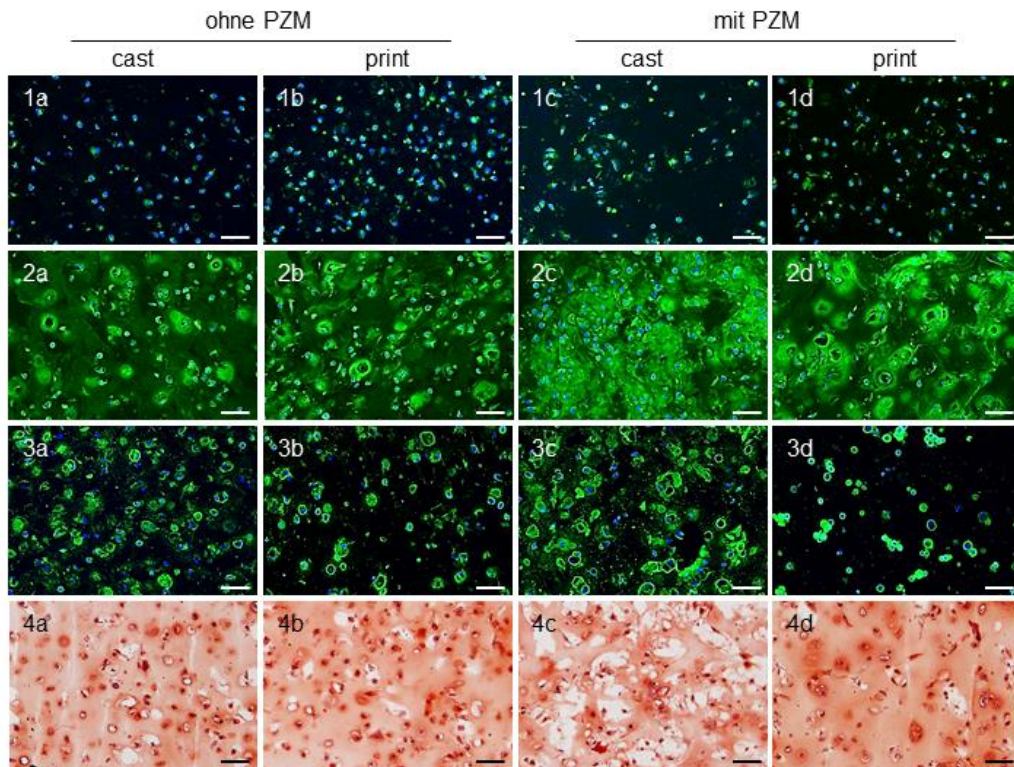


Abbildung 15: Knorpelspezifische Komponenten der Extrazellulärmatrix für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 21, *cast* vs. *print* bei 40 °C
1(a-d): Kollagen-Typ-I, 2(a-d): Kollagen-Typ-II, 3(a-d): Kollagen-Typ-VI, 4(a-d): Glykosaminoglykan. 1)-3) Immunfluoreszenzfärbung, 4) Safranin-O-Färbung, Messbalken zeigt 50 µm.

Kollagengehalt nach *cast*- und *Bioprinting*-Verfahren bei 33 °C

Die Durchführung der *cast*- und *Bioprinting*-Versuche bei 33 °C erbrachte in der quantitativen Messung des Gesamtkollagengehaltes an Tag 1 weder auf das gesamte Hydrogel noch auf den DNA-Gehalt bezogen deutliche Unterschiede zwischen Chondrozyten mit und Chondrozyten ohne PZM, da sich zu diesem Zeitpunkt quantitativ insgesamt kaum Kollagen nachweisen ließ (vgl. Abbildung 16). Die quantitative Untersuchung des Kollagengehaltes zeigte sowohl auf das Hydrogel wie auch auf die Menge an DNA bezogen ähnliche Ergebnisse (vgl. Abbildung 16). An Tag 21 präsentierten sich Chondrozyten mit PZM nach *cast* als stärkste Gruppe, während Chondrozyten ohne PZM nach *cast* den kleinsten Kollagengehalt pro Hydrogel aufwiesen (vgl. Abbildung 16) (p-Wert für Kollagen pro Hydrogel 0,0016; p-Wert für Kollagen pro DNA 0,0123). Nach *Bioprinting* konnten für Chondrozyten mit PZM an Tag 21 signifikant höhere Werte an Kollagen sowohl pro Konstrukt als auch pro DNA gemessen werden als für Chondrozyten ohne PZM (vgl. Abbildung 16) (p-Wert für Kollagen pro Hydrogel 0,0298, p-Wert für Kollagen pro DNA 0,0113).

Verglichen zu Tag 1 zeigten Chondrozyten mit PZM eine signifikante Zunahme des Kollagengehaltes (pro Hydrogel und pro DNA) hin zu Tag 21, während dies bei Chondrozyten ohne PZM nicht in gleichem Maße nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 16).

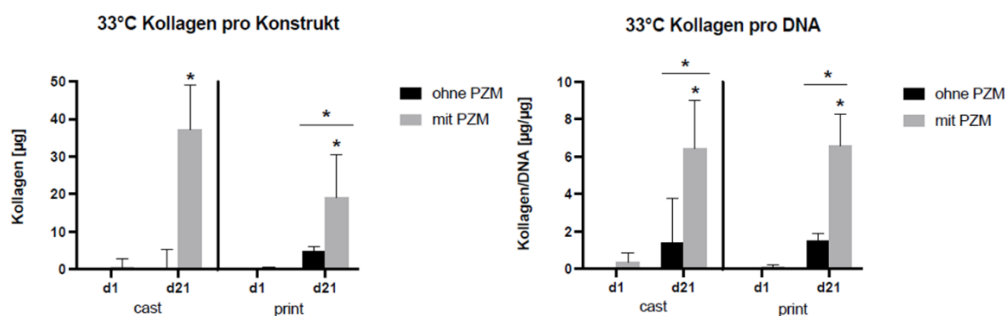


Abbildung 16: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 33 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. (n=3; * zeigt, wenn nicht anders markiert, statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ zu Tag 1).

Die histologische Differenzierung der synthetisierten Kollagentypen ist gemeinsam mit der histologischen Darstellung des Glykosaminoglykangehaltes in Abbildung 17 aufgeführt und liefert vergleichbare Ergebnisse wie der Versuch bei 40 °C (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 17).

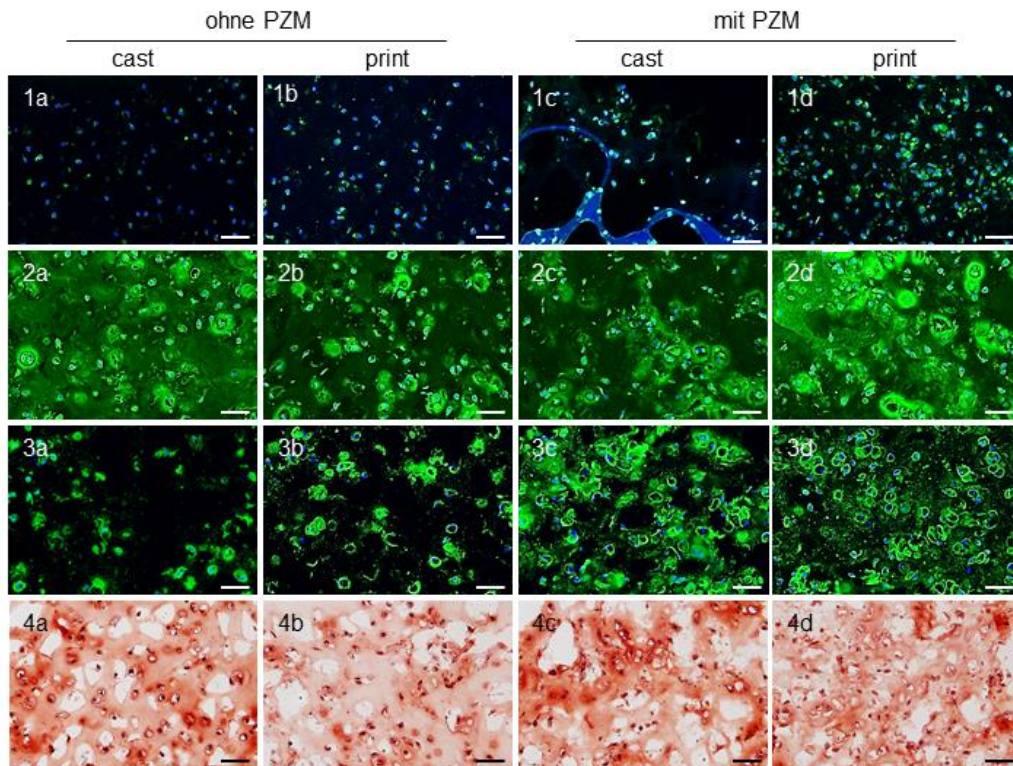


Abbildung 17: Knorpelspezifische Komponenten der Extrazellulärmatrix für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 21, *cast* vs. *print* bei 33 °C
1(a-d): Kollagen-Typ-I, 2(a-d): Kollagen-Typ-II, 3(a-d): Kollagen-Typ-VI, 4(a-d): Glykosaminoglykan. 1)-3) Immunfluoreszenzfärbung, 4) Safranin-O-Färbung, Messbalken zeigt 50 µm.

Kollagen-Typ-I ließ sich auch bei 33 °C für keine der untersuchten Gruppen immunhistochemisch nachweisen, was mit einer erhaltenen Differenzierung der eingesetzten Zellen vereinbar ist.

Alle untersuchten Gruppen präsentierten sich mit einer starken Syntheseleistung von Kollagen-Typ-II. Der größte Gehalt ließ sich hier für Chondrozyten mit PZM nach *Bioprinting* darstellen. Hier zeigte sich eine homogene Verteilung mit sowohl perizellulärer Lokalisation als auch einer Anreicherung im Extrazellulärraum (vgl. Abbildung 17). Chondrozyten ohne PZM zeigten nach *cast*-Vorgang im Vergleich zum *Bioprinting* einen stärker ausgeprägten Kollagen-Typ-II-Gehalt.

Kollagen-Typ-VI ließ sich an Tag 21 in allen Gruppen immunhistochemisch nachweisen. Dabei zeigten Chondrozyten mit PZM auch nach 21 Tagen in Kultur sowohl nach *cast* als auch nach *Bioprinting* deutlich größere Mengen an Kollagen-Typ-VI als Chondrozyten ohne PZM. Am meisten Kollagen-Typ-VI konnte für Chondrozyten mit PZM nach *cast*-Vorgang nachgewiesen werden, während Chondrozyten ohne PZM nach *cast* die kleinste Menge Kollagen-Typ-VI präsentierten (vgl. Abbildung 17). Unterschiede zwischen *cast*- und *print*-Bedingungen konnten in der immunhistochemischen Darstellung weder für Chondrozyten mit noch für Chondrozyten ohne PZM festgestellt werden.

Damit waren Chondrozyten mit PZM sowohl in den Versuchen bei 33 °C als auch bei 40 °C in ihrer Kollagensynthese Chondrozyten ohne PZM überlegen. Die gewählte Verarbeitungsmethode (*print* vs. *cast*) hatte weder bei 33 °C noch bei 40 °C signifikanten Einfluss auf den Kollagengehalt an Tag 21.

3.3.3.2 Glykosaminoglykan als Komponente der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe

Neben dem Nachweis des Kollagengehaltes zur Beurteilung der Syntheseleistung der Chondrozyten wurde auch im Versuch mit kontrollierten Temperaturbedingungen der Gehalt an Glykosaminoglykanen bestimmt, die eine weitere charakteristische Komponente der Extrazellulärmatrix in hyalinem Knorpel darstellen. Der Nachweis erfolgte anhand einer Safranin-O-Färbung am histologischen Präparat sowie quantitativ durch GAG-Assay. Die histologische Untersuchung des GAG-Gehaltes ist zusammen mit den unterschiedlichen Kollagentypen in Abbildung 15 und Abbildung 17 dargestellt. Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung sind in Abbildung 18 und Abbildung 19 aufgeführt.

GAG-Gehalt nach *cast*- und *Bioprinting*-Verfahren bei 40 °C

Bei einer Temperatur von 40 °C ließ sich an Tag 1 für keine der untersuchten Gruppen Glykosaminoglykan nachweisen. Nach 21 Tagen in Kultur konnte jedoch für alle Gruppen sowohl histologisch als auch quantitativ eine erfolgreiche GAG-Synthese der eingebetteten Chondrozyten bestätigt werden (vgl. Abbildungen 15 und 18).

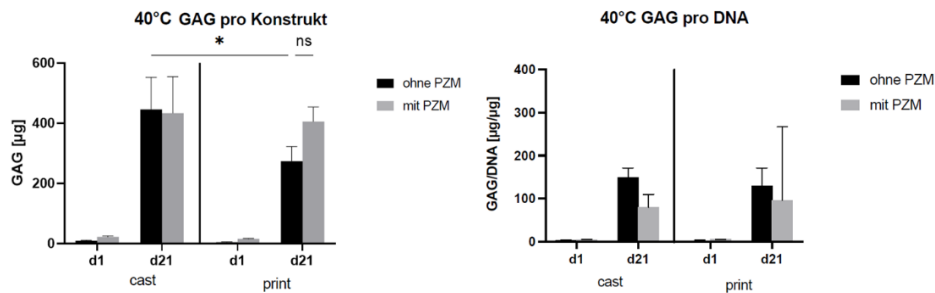


Abbildung 18: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 40 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3; * zeigt statistische Signifikanz mit $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Unter *cast*-Bedingungen zeigten sich an Tag 21 quantitativ keine Unterschiede im GAG-Gehalt zwischen Chondrozyten mit PZM und Chondrozyten ohne PZM. Unter *Bioprinting*-Bedingungen ließen sich zu diesem Zeitpunkt für Chondrozyten mit PZM und Chondrozyten ohne PZM ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Werte an GAG pro Hydrogel nachweisen (vgl. Abbildung 18). Chondrozyten ohne PZM konnten hingegen im Vergleich zum *cast*-Vorgang unter *Bioprinting*-Bedingungen signifikant weniger GAG pro Hydrogel ausbilden (p-Wert 0,0436). Für Chondrozyten mit PZM konnte jedoch kein Unterschied zwischen *cast*- und *Bioprinting*-Bedingungen festgestellt werden. Für alle Vergleichsgruppen konnten hinsichtlich der Menge an GAG pro DNA keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 18).

Die histologische Untersuchung des GAG-Gehaltes mittels Safranin-O-Färbung ist in Abbildung 15 dargestellt und zeigte im Gegensatz zur quantitativen Analyse keine deutlichen Unterschiede zwischen *cast*- und *Bioprinting*-Bedingungen für Chondrozyten ohne PZM auf. Chondrozyten mit PZM präsentierten nach *print*-Bedingungen die intensivste histologische Darstellung von GAG, während dies nach *cast*-Vorgang am schwächsten nachweisbar war. Diese Beobachtung scheint jedoch durch Artefakte im Schnittpräparat bedingt. Chondrozyten mit PZM zeigten unter *print*-Bedingungen allerdings auch eine etwas intensivere Darstellung von GAG als Chondrozyten ohne PZM. Unter *cast*-Bedingungen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Chondrozyten mit PZM und Chondrozyten ohne PZM. (vgl. Abbildung 15).

Zusammenfassend zeigte sich im Versuch bei 40 °C durch den *Bioprinting*-Vorgang quantitativ eine deutliche Beeinträchtigung der GAG-Synthese von Chondrozyten ohne PZM, während sich dies für Chondrozyten mit PZM nicht beobachten ließ.

GAG-Gehalt nach cast- und Bioprinting-Verfahren bei 33 °C

Die Unterschiede zwischen *Bioprinting*- und *cast*-Vorgang ließen sich auch bei einer Versuchstemperatur von 33 °C in ähnlicher Weise darstellen. An Tag 1 konnte weder für Chondrozyten mit PZM noch Chondrozyten ohne PZM GAG nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19). Nach 21 Tagen in 3D-Kultur ließ sich sowohl histologisch als auch quantitativ der größte GAG-Gehalt in den Hydrogelen von Chondrozyten mit PZM nach *cast*-Vorgang nachweisen (vgl. Abbildungen 17 und 19). Histologisch imponierte dabei besonders der Unterschied im GAG-Gehalt zu Chondrozyten ohne PZM unter *Bioprinting*-Bedingungen (vgl. Abbildung 17).

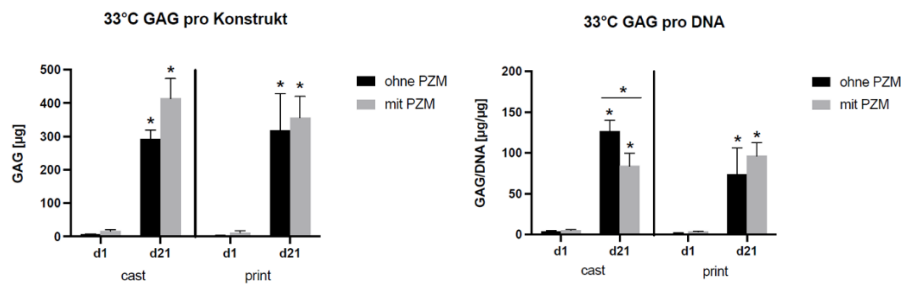


Abbildung 19: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, *cast* vs. *print* bei 33 °C

Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. (n=3, * zeigt, wenn nicht anders markiert, statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ zu Tag 1).

Bezogen auf den GAG-Gehalt pro DNA konnten unter *cast*-Bedingungen für Chondrozyten ohne PZM größere Werte gemessen werden als für Chondrozyten mit PZM (p-Wert 0,0546), während bezogen auf das gesamte Hydrogel keine signifikanten Unterschiede zwischen Chondrozyten mit PZM und Chondrozyten ohne PZM nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 19). Histologisch ließen sich unter *cast*-Bedingungen kaum Unterschiede im GAG-Gehalt zwischen Chondrozyten mit PZM und Chondrozyten ohne PZM feststellen (vgl. Abbildung 17). Sowohl bezogen auf das gesamte Hydrogel als auch auf die Menge DNA konnte für alle Versuchsgruppen eine deutliche Zunahme im GAG-Gehalt von Tag 1 zu Tag 21 festgestellt werden (vgl. Abbildung 19).

Stellt man die Ergebnisse der Versuche zu den unterschiedlichen Temperaturbedingungen als absolute Zahlen gegenüber, so lässt sich feststellen, dass sich die Menge an GAG pro Hydrogel an Tag 21 lediglich in der Gruppe der Chondrozyten ohne PZM unter *cast*-Bedingungen zwischen den beiden Versuchen unterscheidet. Während bei 40 °C noch ein Gehalt von 445,94 µg gemessen wurde, betrug der zugehörige Wert bei 33 C nur 293,28 µg.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Versuchsgruppen innerhalb von 21 Tagen in 3D-Kultur knorpelspezifische Extrazellulärmatrix bilden konnten. Gemessen am GAG-Gehalt zeigte sich sowohl bei 40 °C als auch bei 33 °C (im Trend) ein negativer Einfluss des *Bioprinting*-Vorgangs auf Chondrozyten ohne PZM, d.h. eine schwächere GAG-Produktion verglichen mit der Syntheseleistung von Chondrozyten mit PZM nach *Bioprinting* sowie von Chondrozyten ohne PZM nach *cast*. Histologisch wurden diese Unterschiede bei 33 °C noch deutlicher sichtbar. Mittels GAG-Assay konnten für beide Temperaturen bei Chondrozyten ohne PZM unter *cast*-Bedingungen eine große Menge an GAG festgestellt werden, die sich bei 40 °C signifikant von der Menge an GAG pro Hydrogel der Chondrozyten ohne PZM nach *Bioprinting* unterschied. Bei 33 °C konnte zwischen diesen beiden Gruppen normiert auf den DNA-Gehalt zwar kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich ein ähnlicher Trend sowie unter *print*-Bedingungen leicht höhere Messwerte für Chondrozyten mit PZM als für Chondrozyten ohne PZM.

4 DISKUSSION

4.1 ERGEBNISSE DER ARBEIT IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT

4.1.1 Isolation von Chondrozyten mit und ohne PZM

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der perizellulären Matrix von frisch isolierten, porcinen Chondrozyten im *3D-Bioprinting*-Modell zu untersuchen. Dafür wurden zunächst Isolationsprotokolle getestet, um die PZM von Chondrozyten bei der Isolation aus Frischknorpel zu erhalten bzw. ebenfalls enzymatisch abzubauen. Es konnte gezeigt werden, dass nach dem Protokoll von Schuurman⁶¹, bei dem Knorpel über Nacht mit 0,2 % konzentrierter Kollagenase II verdaut wird, Chondrozyten mit einer deutlichen PZM isoliert werden konnte. Durch die Kombination dieses Vorgehens mit einem Pronase-Vorverdau, wie ihn die Arbeitsgruppe um Kuettner⁶² verwendete, ließ sich darüber hinaus auch die PZM zu einem sehr großen Teil enzymatisch verdauen. Der Nachweis der PZM gelang über die immunhistochemische Darstellung von Kollagen-Typ-VI, einem ihrer Hauptbestandteile. Im Gegensatz zu den Kollagentypen der EZM lässt sich Kollagen-Typ-VI nicht durch Kollagenasen abbauen.^{7,22,69} Die Verwendung weiterer Enzyme ist also notwendig, um Chondrozyten ohne ihre PZM zu isolieren. Die Arbeitsgruppe um Kuettner zeigte, dass das Enzym Pronase dazu geeignet ist, in Kombination mit dem Enzym Kollagenase II, Chondrozyten ohne ihre PZM enzymatisch zu isolieren.^{60,62} Mit der Kombination des Pronase-Vorverdaus nach Kuettner⁶² und dem Chondrozytenisolationsprotokoll nach Schuurman⁶¹ konnte somit eine neue, funktionierende und geeignete Methode zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM etabliert werden.

In Gegenüberstellung zu den anderen hier untersuchten Isolationsprotokollen zeichneten sich das Vorgehen nach Schuurman⁶¹ sowie das Kombinationsprotokoll nach Kuettner⁶² und Schuurman⁶¹ als besonders ressourcenschonend und wirtschaftlich aus, da diese pro Gramm Knorpel die höchste Menge an Zellen isolieren konnten. Da sich beide Protokolle lediglich durch den vorgeschalteten Pronase-Vorverdau voneinander unterscheiden, ließen sich mögliche methodisch bedingte Verzerrungseffekte in der Auswertung der Ergebnisse so weit wie möglich reduzieren.

4.1.2 3D-Bioprinting ohne Beeinträchtigung des Zellüberlebens

In der Studie am Drucksimulator zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil an DNA pro Hydrogel für gedruckte Chondrozyten mit PZM verglichen mit dem von Chondrozyten mit PZM nach *cast.* Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der Live/Dead-Färbung als geringere Menge an grügefärbten Zellen wider. Da hier jedoch die Anzahl an insgesamt gefärbten Zellen im Vergleich mit den anderen Versuchsgruppen geringer war und im Verhältnis die grün, und somit vital, dargestellten Chondrozyten stark dominierten, kann nicht darauf geschlossen werden, dass die Menge an DNA aufgrund von durch *Bioprinting* bedingten Zelltod verringert ist, da sich in diesem Falle die Zellen in der Live/Dead-Färbung mit rotem Signal darstellen ließen.

Da die PZM im Kontext der Wissenschaft weithin mit protektiven Eigenschaften für das Zellüberleben^{70,71} assoziiert ist, wäre eine spezifische Beeinträchtigung der Chondrozyten mit PZM durch mechanische Einflüsse während des Druckvorgangs eine zum aktuellen Wissensstand stark konträre These. Wahrscheinlich ist es, dass diese Beobachtungen durch methodische Einflussfaktoren im Rahmen des 3D-*Bioprintings* am Drucksimulator bedingt sind.

Schwankungen in der Zellmenge können anders als deutliche Schwankungen des Gelvolumens makroskopisch nicht festgestellt werden und können erst nachträglich durch die Auswertung mittels DNA-Assay oder in der Live/Dead-Färbung festgestellt werden. Somit sind sie schlechter während des Verarbeitungsprozesses korrigierbar. Kleinere Abweichungen des Gelvolumens vom geplanten Soll sind jedoch ebenfalls nicht mit bloßem Auge feststellbar. Diese kleinen Gelrückstände in der Druckerkartusche oder der Pipettenspitze können selbst durch die Verwendung bspw. spezieller Verdrängerpipetten für viskosere Hydrogele nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Einer Methodik, die eine zügige und gründliche Verarbeitung unterstützt, kommt im Umgang mit thermosensiblen Biomaterialien eine große Bedeutung zu, da somit der durch Zunahme der Viskosität bedingte minimale Verlust von Biotinte innerhalb von Druckerkartusche und Pipettenspitze reduziert werden kann. Dies wird auch in dieser Arbeit daran ersichtlich, dass bei den Untersuchungen am methodisch robusteren *Cellink Bioprinter* kein Unterschied in der Zellzahl nachgewiesen werden konnte. Die kontrollierten Temperaturbedingungen und damit als einheitlich annehmbare

Viskositäten konnten sich damit in stabilen Zellzahlen pro Hydrogel niederschlagen. In Zusammenschau dieser Aspekte scheint es plausible, dass die verringerte Zellzahl der Chondrozyten mit PZM an Tag 1 nach Druckvorgang am Drucksimulator nicht auf einen Effekt des *Bioprintings* zurückzuführen ist, sondern auf Herausforderungen im Experimentablauf am Drucksimulator, die durch die Verwendung eines vollständigen *3D-Bioprinters* überwunden werden konnten.

Der Einfluss des *3D-Bioprintings* auf das Überleben der Chondrozyten in 3D-Kultur in Agarose-Hydrogelen wurde an Tag 1 sowie an Tag 21 untersucht. Nach 21 Tagen in 3D-Kultur konnte in keinem der durchgeführten Versuche Unterschiede im Überleben zwischen Chondrozyten mit PZM und ohne PZM nachgewiesen werden. Dass der Druckvorgang die Anzahl an lebenden Zellen nicht zu beeinträchtigen scheint, ist eine gute Voraussetzung für die Bewertung seines Einflusses auf die Funktionalität der Chondrozyten.

4.1.3 Verringerte Kollagenproduktion durch Chondrozyten ohne PZM

4.1.3.1 Schwache Kollagensynthese in der Versuchsreihe am Drucksimulator

Die Synthese von Matrixbestandteilen von hyalinem Knorpel durch Chondrozyten mit PZM war unabhängig von der verwendeten Biofabrikationsmethode stärker ausgeprägt als die der Chondrozyten ohne PZM. Dabei wurde allgemein eine schwache Synthese von Kollagen-Typ-II und Typ-VI bei den Versuchen nachgewiesen, die am Drucksimulator durchgeführt wurden. Sowohl Chondrozyten mit PZM als auch Chondrozyten ohne PZM waren von dieser schwachen Syntheseleistung betroffen, die sich in der histologischen Darstellung zeigte. In der quantitativen Messung mittels Kollagen-Assay deuteten die hohen Fehlerbalken auf eine große Varianz der Kollagensynthese zwischen den einzelnen Stichproben hin. Die absolut gemessenen Werte hingegen sind vergleichbar mit Ergebnissen ähnlicher Versuche aus unserer Arbeitsgruppe. Somit scheint es so, als ob nicht die Kollagensynthese allgemein in diesem Versuch schwach ausgefallen ist, sondern als ob innerhalb der Stichprobe größere Schwankungen in der Menge an nachweisbarem Kollagen vorliegen. Aus diesem Grund wurden auch weitere Proben aus demselben Experiment histologisch untersucht. Dabei zeigten sich keine wesentlich anderen Befunde als in den hier dargestellten Aufnahmen.

Zur weiteren Ursachenfindung wurden die immunhistochemischen Färbungen wiederholt, um auch ein Versagen der primären oder sekundären Antikörper oder ein methodisches Problem während der Arbeitsschritte auszuschließen. Auch dies zeigte keine zufriedenstellende Verbesserung der Ergebnisse.

Eine Dedifferenzierung der Chondrozyten verbunden mit einem Verlust der Funktion zur Synthese knorpelspezifischer Matrixkomponenten erscheint unwahrscheinlich, da einerseits Kollagen-Typ-I als Indikator einer Dedifferenzierung^{43,72,73} nicht vermehrt nachgewiesen werden konnte und andererseits eine deutliche Zunahme des GAG-Gehalts von Tag 1 zu Tag 21 hin beobachtet wurde. Erfreulicher Weise konnte in der Untersuchung am *3D-Bioprinter* eine durchweg erfolgreiche Kollagensynthese nachgewiesen werden. Die Ursache für die schlechte immunhistochemische Darstellung oder die hohe Varianz der Kollagenmenge zwischen den Stichproben im Versuch am Drucksimulator bleibt weiterhin unklar, kann jedoch im Anbetracht konsistenter und in sich stimmiger Ergebnisse im Folgeversuch auch als zufällige Beobachtung von nur geringer Relevanz eingestuft werden.

4.1.3.2 Gesteigerte Kollagensynthese in Chondrozyten mit PZM (im Vergleich zu Chondrozyten ohne PZM)

Die Versuche am *Cellink Bioprinter* zeigen sowohl in der quantitativen als auch in der histologischen Betrachtung besonders deutlich die Unterschiede zwischen Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM, wobei die PZM sowohl unter *cast*- als auch unter *print*-Bedingungen einen positiven Effekt auf die Kollagensynthese zu haben scheint. Die beiden unterschiedlichen Biofabrikationsmethoden hatten in der vorliegenden Arbeit keinen weiteren Einfluss auf diesen Vorteil der PZM. Diese Überlegenheit der Chondrozyten mit PZM im Hinblick auf die Synthese von Knorpelmatrixkomponenten fügt sich reibungslos in den Kontext der aktuellen Wissenschaft ein: Vielfach konnte gezeigt werden, dass der Erhalt der zelleigenen perizellulären Matrix *in vitro* zu einer verbesserten Produktion von knorpelähnlichem Gewebe führt: Die Arbeitsgruppe um Vonk konnte zeigen, dass aus Gelenkknorpel isolierte Chondrone über 25 Tage in Alginattropfen (*alginate beads*) eine signifikant höhere Col2a1-Genexpression aufweisen als Chondrozyten.⁷⁴ Die Unterscheidung zwischen Chondrozyten und Chondronen wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit,

immunhistochemisch anhand des perizellulär nachweisbaren Kollagen-Typ-VI definiert. Die Isolation der Chondrozyten erfolgte aus Frischknorpel unter Verwendung eines Protokolls, das ähnlich wie in dieser Arbeit einen enzymatischen Verdau mittels Kollagenase mit vorgeschaltetem Pronase-Vorverdau kombiniert. Im Gegensatz zu den Isolationsschritten in dieser Arbeit wurden höhere Konzentrationen der Pronase und Kollagenase eingesetzt (Vonk: Pronasevorverdau mit 2.5 % Pronase über 60 min und 0,125 Kollagenase über 16 h⁷⁴; Gastberger: Pronasevorverdau mit 1,0 % Pronase über 90 min und 0,15 % Kollagenase II über 16 h). Durch die Vergleichbarkeit der Isolation der Chondrozyten ohne PZM ergänzen sich die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Vonk mit denen dieser Arbeit dahingehend, dass die gesteigerte Kollagensynthese der Chondrone bzw. Chondrozyten mit PZM nicht nur über Genexpression (*real-time PCR*) und *Immunoblotting*, sondern auch histologisch im 3D-Konstrukt nachgewiesen werden konnte. Am Beispiel von Pelletkulturen konnte die Arbeitsgruppe um Lee und Larson über einen Zeitraum von 8 Wochen für Chondrone eine deutlich höhere Kollagen-Typ-II-Synthese immunhistochemisch und mittels ELISA nachweisen als für Chondrozyten.⁷⁵ Diese präsentierten jedoch im Verhältnis eine deutlich stärker ausgeprägte Synthese von Kollagen-Typ-VI als Chondrone, die aufgrund der PZM bereits initial mehr Kollagen-Typ-VI aufwiesen. Die enzymatische Isolation der Chondrozyten erfolgte nach dem Protokoll nach Lee⁷, während die Chondrozyten durch Pronase-Vorverdau über 60 min und anschließend 0,4 %ige Kollagenase über 3 h isoliert wurden.⁷⁵

Aktuellere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Owida beschreiben die Synthese von Knorpelmatrixbestandteilen, insb. Kollagen-Typ-II und GAG, für Chondrone sowohl in 3D-Hyaluronsäure- als auch Agarosehydrogel-Kultur über einen Zeitraum von 21 Tagen.⁷⁶ Chondrozyten ohne PZM, die mittels 0,1 % Proteinase K und 0,3 % Kollagenase 1A über insg. 4 h isoliert wurden, zeigten in beiden Hydrogelen ähnlich wie in der Studie der Arbeitsgruppe um Larson und Lee⁷⁵ eine Produktion von Kollagen-Typ-VI während der ersten Tage in 3D-Kultur⁷⁶. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass Chondrone bzw. Chondrozyten mit PZM in ihrer Kollagensynthese in unterschiedlichen Varianten der 3D-Kultur *in vitro*, insb. im Hinblick auf Kollagen-Typ-II, Chondrozyten ohne PZM überlegen sind. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser positive Einfluss der PZM auch nach *3D-Bioprinting* reproduzierbar ist.

4.1.4 Beeinträchtigung der GAG-Synthese von Chondrozyten ohne PZM durch 3D-Bioprinting

In den drei durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die Glykosaminykansynthese von Chondrozyten ohne PZM nach 3D-*Bioprinting*-Vorgang verglichen zum *cast*-Vorgang deutlich beeinträchtigt wurde. Die Untersuchungen am Drucksimulator zeigten eine signifikante Reduktion des GAG-Gehaltes pro Konstrukt durch den *Bioprinting*-Prozess, die sich auch histologisch mittels Safranin-O-Färbung als deutlicher Kontrast im Vergleich zu den *cast*-Bedingungen darstellen ließ. Im Versuch am *Cellink Bioprinter* war dieser Unterschied bei einer Versuchstemperatur von 40 °C ebenfalls für den Gehalt an GAG pro Konstrukt signifikant. Die Verminderung der GAG-Synthese durch den Druckvorgang zeigte sich bei 33 °C insbesondere in der histologischen Darstellung. Quantitativ ließ sich dieser Effekt ebenfalls als Trend nachvollziehen.

Für Chondrozyten mit PZM konnte keine Beeinträchtigung der GAG-Synthese durch den Druckvorgang gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die PZM während des Druckvorgangs eine protektive Funktion einnimmt und eine Einschränkung der Funktionalität der Chondrozyten verhindert. Unter physiologischen Bedingungen übernimmt die PZM eine wesentliche modulatorische Funktion in der Weiterleitung mechanischer Belastungen innerhalb des Knorpelgewebes, wie bereits eingangs dargestellt. Dabei sind Unterschiede des Elastizitätsmoduls von Chondrozyten, PZM und umgebender Matrix von entscheidender Bedeutung, um ein optimales Umfeld für die mechanische Stimulation der Chondrozyten und gleichzeitig die Verhinderung von Überbelastung zu erreichen: In nativem Knorpelgewebe zeigt sich ein zonaler Gradient des Elastizitätsmoduls für die EZM, während die PZM stets konstante Werte aufweist. Dies bewirkt eine Verstärkung der mechanischen Signale für die Chondrozyten in tieferen Knorpelschichten, in denen die EZM ihre größte Steifigkeit erreicht.^{11,21,22} *In situ* ist dies notwendig, da die mechanische Belastung mit zunehmender Entfernung von der Gelenkoberfläche hin zum subchondralen Knochen abnimmt. Die stärksten mechanischen Kräfte wirken in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels.^{10,11} Hier weist der Elastizitätsmodul der EZM die geringsten Werte auf und ist verglichen mit dem der PZM deutlich niedriger. In dieser Schicht werden also die Chondrozyten durch ihre PZM vor übermäßiger mechanischer Belastung abgeschirmt.²² Vor diesem Hintergrund

wurde die Hypothese aufgestellt werden, dass die residuelle PZM der Chondrozyten auch während einer super-physiologischen und damit potenziell schädlichen mechanischen Belastung während des 3D-Bioprintings eine protektive Funktion einnehmen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein protektiver Einfluss der PZM im Hinblick auf die GAG-Synthese bestätigt werden, da hier Chondrozyten ohne PZM nach 3D-Druckvorgang weniger GAG produzierten als nach *cast*-Vorgang, während diese Beeinträchtigung für Chondrozyten mit PZM nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Exposition von Scherkräften wirkt sich in unterschiedlichem Ausmaß auf die Synthese von Knorpelmatrix aus. Mit der Zunahme der Expositionsintensität und -dauer kann die Produktion von Kollagen-Typ-II gesteigert werden, während der Gehalt an GAG im Gewebe abnimmt.⁷⁷ Diesen Beobachtungen wird ein allgemein positiver stimulierender Einfluss auf die Matrixsynthese von Knorpelgewebe gegenübergestellt, wie er bei flüssigkeitsinduzierten Scherspannungen (*fluid-induced shear stress*) festgestellt wird.^{78,79} Die Arbeitsgruppe um Gharravi verwendete hierbei bovine Chondrozyten, die enzymatisch nach dem Vorgehen nach Schuurman isoliert wurden. Die Auswirkungen der Scherspannung wurden dabei umfangreich anhand von Knorpelimplantaten oder von Zusammenschlüssen von Chondrozyten in Pelletkulturen getestet.⁷⁹ Die Effekte der Scherspannungen während des *Bioprinting*-Vorgangs auf Chondrozyten ohne eine PZM sind nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht ausreichend untersucht, um die Ergebnisse dieser Arbeit mit ähnlichen Methoden gut vergleichen zu können. Da jedoch die PZM weithin als protektive und schützende Einheit für die Chondrozyten verstanden wird, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit mehrfach dargelegt wurde, erscheint der Rückschluss auf eine stärkere Beeinträchtigung der Chondrozyten durch mechanische Einflüsse in Abwesenheit eines solchen schützenden Faktors als plausibel. Dieser Logik folgend, scheinen die Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung, dass eine solche mechanische Beanspruchung der Chondrozyten mit einer verminderten GAG-Syntheseleistung verbunden ist, ebenfalls schlüssig. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um mit ausreichend großem Stichprobenumfang eine Regelmäßigkeit für die schädlichen Einflüsse des *Bioprinting*-Vorgangs auf Chondrozyten ohne PZM nachzuweisen.

4.2 LIMITATIONEN UND STÄRKEN DIESER ARBEIT

Die Nomenklatur der *Chondrozyten mit PZM* mag sperrig erscheinen und die Frage aufwerfen, ob nicht der Begriff *Chondron* eine einfachere Formulierung darstellen könnte. Die ursprüngliche Definition eines Chondrons umfasst nach Benninghoff und Lee die funktionelle Einheit des Gelenkknorpels, bestehend aus Chondrozyt, perizellulärer Matrix und umschließender Kapsel.^{3,7} In der Literatur sind Protokolle beschrieben, die explizit auf die Isolation von Chondronen^{6,7} zielen, während das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll nach Schuurman als Isolationsprotokoll für Chondrozyten⁶¹ beschrieben wird. Die Bezeichnung der so isolierten Zellen als Chondrone erscheint daher im Zusammenhang der Arbeit nicht korrekt, während die Formulierung als *Chondrozyten mit PZM* präziser widerspiegelt, dass für die nach Schuurman isolierten Zellen stets Kollagen-Typ-VI als Marker einer PZM nachgewiesen werden konnte. Da nur eine immunhistochemische Darstellung des Kollagens-Typ-VI zur Identifizierung einer PZM herangezogen wurde, kann hier nicht unterschieden werden, ob es sich bei den Zellen um definitionsgemäße Chondrone handelt. Diese weitere Differenzierung ist für die Untersuchungen der Arbeit jedoch nicht weiter notwendig, da auch in der Literatur die PZM mit ihrer bidirektionalen Funktion innerhalb der Mechanotransduktion als eigenständige Instanz unabhängig vom Begriff *Chondron* verwendet wird.^{5,9-11,22}

Die Effekte, die sich durch die Arbeit zeigen ließen, werden in ihrer Aussagekraft durch den geringen Stichprobenumfang geschwächt. Die Ergebnisse der Untersuchungen am Drucksimulator lieferten wichtige erste Hinweise darauf, dass die PZM ideale Bedingungen schafft, die Matrixsyntheseleistung der Chondrozyten zu erhalten und zu unterstützen. Chondrozyten mit PZM waren in ihrer Kollagensynthese den Chondrozyten ohne PZM überlegen. Der protektive Einfluss der PZM im *3D-Bioprinting* konnte im Hinblick auf die GAG-Synthese gezeigt werden.

Ein wesentlicher Erfolg konnte durch die Etablierung eines Isolationsprotokolls für Chondrozyten ohne PZM erreicht werden, der die Grundlage für alle aufbauenden Untersuchungen in dieser Arbeit war. Herausforderung war es, trotz einer vollständigen Isolation von extra- und perizellulärer Matrix die Zellen selbst durch den Isolationsvorgang nicht in ihrem Überleben zu beeinträchtigen, um somit eine Verzerrung der Ergebnisse des untersuchten Einflusses der PZM während des Druckvorgangs zu minimieren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination eines Vorverdaus mit 1 % Pronase für 90 Minuten und anschließender Isolation mittels 0,15 % Kollagenase II über Nacht Chondrozyten in angemessener Anzahl und Vitalität gewonnen werden konnten. Darüber hinaus konnte für die auf diese Art isolierten Chondrozyten deutlich weniger perizelluläres Kollagen-Typ-VI nachgewiesen werden als für Chondrozyten nach enzymatischer Isolation ohne Vorverdau mit Pronase. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte zudem ein protektiver Einfluss der PZM für Chondrozyten in Agarosehydrogelen gezeigt werden. Die vergleichende Untersuchung des Einflusses der PZM unter *Bioprinting*-Bedingungen gegenüber *cast*-Bedingungen schließt zum aktuellen Zeitpunkt eine argumentative Lücke, um den protektiven Einfluss der PZM zu beschreiben. Durch den Einsatz des *Cellink Bioprinters* konnte zum einen ein wichtiger methodischer Schritt in die Richtung der klinischen Anwendbarkeit unternommen werden. Zum anderen konnte durch temperaturkontrollierte Bedingungen auch der Einfluss der Varianz der Verarbeitungstemperatur und damit der unterschiedlichen Viskosität von Agarosehydrogelen im *3D-Bioprinting* untersucht werden.

4.3 AUSBLICK

Die Untersuchung einer möglichen protektiven Funktion der PZM für Chondrozyten unter mechanisch belastenden Umständen des *3D-Bioprintings* war Ziel dieser Arbeit und soll dazu dienen, das *Biofabrication Window* weiter zu öffnen und Zellen resistenter gegenüber harschen Bedingungen, die durch die Vorgaben der Druckbarkeit entstehen, werden zu lassen. Die Bedeutung der PZM wurde deutlich, indem Zellen nach vollständiger enzymatischer Isolation ihrer umgebenden Matrix merklich durch den Druckvorgang in ihrer Matrixsynthese eingeschränkt wurden. Dies eröffnet zwar keine neuartige Methode des *Cartilage Tissue Engineerings*, lenkt aber den Blick wieder zurück zu einem grundsätzlichen und altbekannten Verständnis der Knorpelstrukturen. Neben immer neuen Ansätzen zur Entwicklung von komplexen Biotinten mit individuell anpassbaren mechanischen und anatomischen Eigenschaften, bietet der Einsatz von Chondronen bzw. Chondrozyten mit PZM eine natürliche und leicht verfügbare Quelle an robusten Zellen, die gegenüber den herausfordernden Bedingungen des *Bioprintings* widerstandsfähig sind.

Der Einsatz von 3D-rekonstruierten Gewebemodellen kann wesentlich dazu beitragen, mehr über die Eigenschaften eines bestimmten Gewebes herauszufinden. Die Aufklärung molekularer Signalwege kann dabei zur Entschlüsselung weiterer Pathomechanismen von degenerativen Prozessen beitragen. Auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze können medikamentöse Ansatzpunkte anhand eines Gewebemodells untersucht und getestet werden. An Knorpelgewebemodellen könnten die Mechanismen des Stofftransportes innerhalb des intakten sowie des beschädigten Gewebes weiter aufgeklärt werden, sodass auch Verteilung und Wirkung von antiinflammatorischen Arzneimitteln untersucht werden könnten. Hieraus könnten sich weitere frühtherapeutische, gelenkerhaltende medikamentöse Therapieansätze entwickeln lassen, die über eine intraartikuläre Injektion von antiinflammatorischen Medikamenten Entstehung und Progress degenerativer Erkrankungen verzögern oder verhindern können.

Der Einsatz von *3D-Bioprinting* als Methode des *Tissue Engineering* ist auch eine vielversprechende therapeutische Perspektive der Regenerativen Medizin. Gerade für degenerative Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems ist individuell angepasstes

Neogewebe, das eine Imitation des archetypischen mikro- und makroanatomischen Aufbau eines schadhaften Gewebes ermöglicht, eine attraktive Alternative zu herkömmlichen Therapieoptionen, die lediglich auf den Erhalt der physikalischen und bewegungsphysiologischen Funktionen abzielen. Der exakte Nachbau des ursprünglichen Gewebes soll eine bessere Integrität des Implantats in den Organismus ermöglichen und so das Risiko für ein Langzeitversagen des Implantats reduzieren. Durch den Einsatz von autologen Zellen kann zudem das Risiko für immunologische und infektiologische Komplikationen reduziert werden. Um den Transfer von mittels *Tissue Engineering* hergestellten Knorpel in die klinische Anwendung zu gestalten, müssen neben einer Kosteneffizienz im Vergleich zu herkömmlichen Methoden auch ein exzellentes Sicherheitsprofil sowie reproduzierbare Ergebnisse zur verlässlichen Qualitätskontrolle erfüllt sein.³³ Es ist zu erwarten, dass der Einsatz von Chondronen bzw. Chondrozyten mit PZM für die klinische Anwendung mit einer hohen Sicherheit für die behandelten Menschen einhergehen wird. Da sich Chondrone jedoch nicht in Kultur expandieren lassen, ohne ihre PZM zu verlieren, müssen Isolationsverfahren gefunden werden, die aus einer kleinen Menge an gesundem Knorpelgewebe eine hohe Zahl an qualitativ hochwertigen Chondronen bzw. Chondrozyten mit PZM isolieren lassen. Mit einer Isolationsdauer von 16 Stunden ist das Isolationsprotokoll nach Schuurman⁶¹ nicht für ein einzeitiges Operationsgeschehen geeignet und es bedarf mehrerer operativer Eingriffe bis zum Abschluss des Therapieverfahrens. Es wird also in Zukunft notwendig sein, Protokolle zu entwickeln, mit denen sich innerhalb kürzester Zeit Chondrone bzw. Chondrozyten mit PZM aus einer kleinsten Menge an intaktem Knorpelgewebe isolieren lassen, und dieses Verfahren auf eine sichere Reproduzierbarkeit hin zu überprüfen.

Die vorliegende Arbeit konnte zwar keine neuartige Methode entwickeln, um das *Biofabrication Window* zu vergrößern, dennoch unterstreicht sie auf eine bisher noch wenig erforschte Weise die protektive Funktion der PZM und liefert so einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Möglichkeiten des *Cartilage Tissue Engineering*.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Chondrozyten stellen die zelluläre Komponente von hyalinem Knorpel dar, der die Gelenkflächen diarthrotischer Gelenke bedeckt. Über die perizelluläre Matrix (PZM) sind sie mit der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes, die im Wesentlichen aus Wasser, Kollagen-Typ-II und Glykosaminoglykan gebildet wird, verbunden. Die PZM gilt als wichtiges modulatorisches und protektives Element in der Signal- und Mechanotransduktion sowie im Erhalt der Homöostase innerhalb des Knorpelgewebes. Degenerative und inflammatorische Prozesse im Knorpelgewebe führen zu irreparablen Schäden der Gewebearchitektur und -funktionalität, sodass der Ersatz degenerativ veränderter Gelenkflächen durch mittels *Tissue Engineering* hergestellten Neoknorpel eine Bestrebung der Regenerativen Medizin darstellt. *3D-Bioprinting* gilt hierfür als attraktive Methode, nimmt jedoch über Scherkräfte während des Druckvorgangs auch schädigenden Einfluss auf das Überleben oder die Funktionalität der Zellen, die in die Biotinte eingebettet sind.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen möglichen protektiven Einfluss der PZM während des Druckvorgangs zu untersuchen. Aus porcinem Frischknorpel isolierte Chondrozyten wurden nach *3D-Bioprinting* in Agarose-Biotinte hinsichtlich ihres Überlebens und ihrer Syntheseleistung von knorpelspezifischem Kollagen-Typ-II und Glykosaminoglykan untersucht. Die Beobachtungen wurden mit dem Verhalten von Chondrozyten verglichen, die in einem lediglich durch *cast*-Vorgang und ohne 3D-Druck hergestellten 3D-Hydrogel kultiviert wurden. Chondrozyten, deren PZM enzymatisch verdaut wurde, wurden mit Chondrozyten verglichen, die nach enzymatischer Isolation noch eine residuelle PZM, definiert durch den Nachweis von perizellulärem Kollagen-Typ-VI, aufwiesen. Chondrozyten mit PZM zeigten allgemein eine stärkere Produktion von Kollagen-Typ-II als Chondrozyten ohne PZM. Nach *3D-Bioprinting* konnte für Chondrozyten ohne PZM eine signifikant geringere Produktion von Glykosaminoglykanen nachgewiesen werden als in der *cast*-Vergleichsgruppe, während dies für Chondrozyten mit PZM nicht gezeigt werden konnte.

Die stärker ausgeprägte Widerstandsfähigkeit der Chondrozyten mit PZM gegenüber Scherkräften während des Druckvorgangs eröffnet neue Methoden für das *Cartilage Tissue Engineering*. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um den

protektiven Effekt der PZM zu bestätigen und Protokolle zu entwickeln, die die Translation in die klinische Forschung ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6th ed. Stuttgart: Thieme, 2019.
2. Campos Y, Almirall A, Fuentes G, Bloem HL, Kaijzel EL, Cruz LJ. Tissue Engineering: An Alternative to Repair Cartilage. *Tissue Eng Part B Rev* 2019;25(4):357-73.
3. Benninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 1925;2(5):783-862.
4. Schuurman W, Klein TJ, Dhert WJ, van Weeren PR, Hutmacher DW, Malda J. Cartilage regeneration using zonal chondrocyte subpopulations: a promising approach or an overcomplicated strategy? *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(6):669-78.
5. Zhang Z. Chondrons and the pericellular matrix of chondrocytes. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21(3):267-77.
6. Bekkers JE, Tsuchida AI, van Rijen MH, Vonk LA, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture. *Am J Sports Med* 2013;41(9):2158-66.
7. Lee GM, Poole CA, Kelley SS, Chang J, Caterson B. Isolated chondrons: a viable alternative for studies of chondrocyte metabolism in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5(4):261-74.
8. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 1987;5(4):509-22.
9. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol* 2018;71-72:40-50.
10. Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater* 2005;1(3):317-25.
11. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:498-512.
12. Benninghoff A, Drenckhahn D, Waschke J. Taschenbuch Anatomie. München: Elsevier, 2020.19-22
13. Schmidt W. Bewegungssystem – Grundlagen. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, et al., eds. *Duale Reihe Anatomie. 5.*, korrigierte Auflage ed: Georg Thieme Verlag 2020.228-33
14. Richard HA, Kullmer G, Noecker D. Biomechanik. Anwendungen mechanischer Prinzipien auf den menschlichen Bewegungsapparat. Wiesbaden: Springer, 2020.158-90
15. Morrell KC, Hodge WA, Krebs DE, Mann RW. Corroboration of in vivo cartilage pressures with implications for synovial joint tribology and osteoarthritis causation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(41):14819-24.

16. Grad S, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469(10):2764-72.
17. Sanchez-Adams J, Leddy HA, McNulty AL, O'Connor CJ, Guilak F. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16(10):451.
18. Welhaven HD, McCutchen CN, June RK. Effects of mechanical stimulation on metabolomic profiles of SW1353 chondrocytes: shear and compression. *Biol Open* 2022;11(1).
19. Brenneeman Wilson EC, Gatti AA, Keir PJ, Maly MR. Daily cumulative load and body mass index alter knee cartilage response to running in women. *Gait Posture* 2021;88:192-97.
20. Bargel H-J, Schulze G. *Werkstoffkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018.119-21
21. Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(1):59-70.
22. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol* 2014;39:25-32.
23. Gilbert SJ, Bonnet CS, Blain EJ. Mechanical Cues: Bidirectional Reciprocity in the Extracellular Matrix Drives Mechano-Signalling in Articular Cartilage. *International journal of molecular sciences* 2021;22(24).
24. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol* 2018;71-72:51-69.
25. Hunter DJ. *Osteoarthritis*. Oxford; New York, New York: Oxford University Press, 2014.
26. van den Bosch MHJ. Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2021;29(2):143-50.
27. Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e.V. S2k- Leitlinie Gonarthrose. 30.11.2017 ed. online: AWMF online 2018. AWMF-Registernummer 033-004. <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/187-050> (zuletzt aufgerufen 26.06.2023)
28. Groll J, Boland T, Blunk T, Burdick JA, Cho DW, Dalton PD, Derby B, Forgacs G, Li Q, Mironov VA, Moroni L, Nakamura M, Shu W, Takeuchi S, Vozzi G, Woodfield TB, Xu T, Yoo JJ, Malda J. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* 2016;8(1):013001.
29. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008;3(1):1-5.
30. Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, Court R, Biant LC, Metcalfe A, Waugh N. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2017;21(6):1-294.
31. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev* 2019;146:289-305.

32. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmigel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2020;72(2):149-62.
33. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011;2:403-30.
34. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.
35. Richter DL, Schenck RC, Jr., Wascher DC, Treme G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sports Health* 2016;8(2):153-60.
36. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993 May;260(5110):920-6.
37. Guillemot F, Mironov V, Nakamura M. Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication* 2010;2(1):010201.
38. Thayer P, Martinez H, Gatenholm E. History and Trends of 3D Bioprinting. *Methods Mol Biol* 2020;2140:3-18.
39. Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2017;33:59-75.
40. Rahmani Del Bakhshayesh A, Babaie S, Tayefi Nasrabadi H, Asadi N, Akbarzadeh A, Abedelahi A. An overview of various treatment strategies, especially tissue engineering for damaged articular cartilage. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2020;48(1):1089-104.
41. Levato R, Jungst T, Scheuring RG, Blunk T, Groll J, Malda J. From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting. *Adv Mater* 2020;32(12):e1906423.
42. Urlić I, Ivković A. Cell Sources for Cartilage Repair-Biological and Clinical Perspective. *Cells* 2021;10(9):2496
43. von der Mark K, Conrad G. Cartilage cell differentiation: review. *Clin Orthop Relat Res* 1979;(139):185-205.
44. Alizadeh Sardroud H, Wanlin T, Chen X, Eames BF. Cartilage Tissue Engineering Approaches Need to Assess Fibrocartilage When Hydrogel Constructs Are Mechanically Loaded. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9:787538.
45. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977;267(5611):531-2.

46. Schuurman W, Harimulyo EB, Gawlitta D, Woodfield TB, Dhert WJ, van Weeren PR, Malda J. Three-dimensional assembly of tissue-engineered cartilage constructs results in cartilaginous tissue formation without retainment of zonal characteristics. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;10(4):315-24.
47. Chaudhary S, Chakraborty E. Hydrogel based tissue engineering and its future applications in personalized disease modeling and regenerative therapy. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci* 2022;11(1):3.
48. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;103(4):655-63.
49. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17(4):281-99.
50. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJ, Groll J, Hutmacher DW. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater* 2013;25(36):5011-28.
51. Daly AC, Freeman FE, Gonzalez-Fernandez T, Critchley SE, Nulty J, Kelly DJ. 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 2017;6(22).
52. Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2017;57:1-25.
53. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* 2000;122(3):252-60.
54. Groll J, Burdick JA, Cho DW, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn SC, Jüngst T, Malda J, Mironov VA, Nakayama K, Ovsianikov A, Sun W, Takeuchi S, Yoo JJ, Woodfield TBF. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* 2018;11(1):013001.
55. Mouser VHM, Levato R, Bonassar LJ, D'Lima DD, Grande DA, Klein TJ, Saris DBF, Zenobi-Wong M, Gawlitta D, Malda J. Three-Dimensional Bioprinting and Its Potential in the Field of Articular Cartilage Regeneration. *Cartilage* 2017;8(4):327-40.
56. Idaszek J, Costantini M, Karlsen TA, Jaroszewicz J, Colosi C, Testa S, Fornetti E, Bernardini S, Seta M, Kasarełło K, Wrzesień R, Cannata S, Barbetta A, Gargioli C, Brinchman JE, Świążzkowski W. 3D bioprinting of hydrogel constructs with cell and material gradients for the regeneration of full-thickness chondral defect using a microfluidic printing head. *Biofabrication* 2019;11(4):044101.
57. Ning L, Betancourt N, Schreyer DJ, Chen X. Characterization of Cell Damage and Proliferative Ability during and after Bioprinting. *ACS Biomater Sci Eng* 2018;4(11):3906-18.
58. Li M, Tian X, Zhu N, Schreyer DJ, Chen X. Modeling process-induced cell damage in the bioprinting process. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(3):533-42.
59. Oseni AO, Butler PE, Seifalian AM. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res* 2013;181(1):41-8.

60. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* 1982;93(3):743-50.
61. Schuurman W, Gawlitta D, Klein TJ, ten Hoope W, van Rijen MH, Dhert WJ, van Weeren PR, Malda J. Zonal chondrocyte subpopulations reacquire zone-specific characteristics during in vitro redifferentiation. *Am J Sports Med* 2009;37 Suppl 1:97S-104S.
62. Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 1982;93(3):751-7.
63. Martin I, Obradovic B, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage. *Ann Biomed Eng* 1999;27(5):656-62.
64. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 3:S113-6.
65. Kim YJ, Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem* 1988;174(1):168-76.
66. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-7.
67. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986;883(2):173-7.
68. Layman DL, Sokoloff L, Miller EJ. Collagen synthesis by articular chondrocytes in monolayer culture. *Experimental Cell Research* 1972;73(1):107-12.
69. Kielty CM, Lees M, Shuttleworth CA, Woolley D. Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191(3):1230-6.
70. Shah SS, Mithoefer K. Scientific Developments and Clinical Applications Utilizing Chondrons and Chondrocytes with Matrix for Cartilage Repair. *Cartilage* 2021;13(1_suppl):1195s-205s.
71. Cheng IH, Lin YC, Hwang E, Huang HT, Chang WH, Liu YL, Chao CY. Collagen VI protects against neuronal apoptosis elicited by ultraviolet irradiation via an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Neuroscience* 2011;183:178-88.
72. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30(1):215-24.
73. Mayne R, Vail MS, Miller EJ. The effect of embryo extract on the types of collagen synthesized by cultured chick chondrocytes. *Dev Biol* 1976;54(2):230-40.
74. Vonk LA, Doulabi BZ, Huang C, Helder MN, Everts V, Bank RA. Preservation of the chondrocyte's pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010;110(1):260-71.

75. Larson CM, Kelley SS, Blackwood AD, Banes AJ, Lee GM. Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol* 2002;21(4):349-59.
76. Owida HA, Kuiper NL, Yang Y. Maintenance and Acceleration of Pericellular Matrix Formation within 3D Cartilage Cell Culture Models. *Cartilage* 2021;13(2_suppl):847s-61s.
77. Gemmiti CV, Guldberg RE. Shear stress magnitude and duration modulates matrix composition and tensile mechanical properties in engineered cartilaginous tissue. *Biotechnol Bioeng* 2009;104(4):809-20.
78. Salinas EY, Aryaei A, Paschos N, Berson E, Kwon H, Hu JC, Athanasiou KA. Shear stress induced by fluid flow produces improvements in tissue-engineered cartilage. *Biofabrication* 2020;12(4):045010.
79. Gharravi AM, Orazizadeh M, Hashemitabar M. Fluid-induced low shear stress improves cartilage like tissue fabrication by encapsulating chondrocytes. *Cell Tissue Bank* 2016;17(1):117-22.

APPENDIX

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vergleich verschiedener Protokolle zur Isolation von Chondrozyten mit PZM aus Frischknorpel	45
Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-Typ-VI in Protokollen zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Zytospinpräparaten und in 3D-Kultur.....	47
Abbildung 3: Vergleich verschiedener Protokolle zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM aus Frischknorpel.....	48
Abbildung 4: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i>	51
Abbildung 5: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i>	51
Abbildung 6: Knorpelspezifische Kollagentypen von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i>	54
Abbildung 7: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i>	54
Abbildung 8: GAG-Synthese von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i>	57
Abbildung 9: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> bzw. <i>print</i>	57
Abbildung 10: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i> bei 40 °C.....	61
Abbildung 11: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i> bei 40 °C.....	61
Abbildung 12: Live/Dead-Färbung von Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast</i> vs. <i>print</i> bei 33 °C.....	62

Abbildung 13: DNA-Gehalt pro Hydrogel für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 33 °C.....	62
Abbildung 14: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 40 °C.....	64
Abbildung 15: Knorpelspezifische Komponenten der Extrazellulärmatrix für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 40 °C.....	66
Abbildung 16: Kollagengehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 33 °C.....	67
Abbildung 17: Knorpelspezifische Komponenten der Extrazellulärmatrix für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 33 °C.....	68
Abbildung 18: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 40 °C.....	70
Abbildung 19: GAG-Gehalt pro Hydrogel und pro DNA für Chondrozyten ohne PZM und Chondrozyten mit PZM an Tag 1 und Tag 21, <i>cast vs. print</i> bei 33 °C.....	72

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Instrumente und Geräte.....	21
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien	25
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper	28
Tabelle 5: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedia.....	29
Tabelle 6: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer	29
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Software	31
Tabelle 8: Übersicht über getestete Protokolle zur Isolation von Chondrozyten ohne PZM.....	33
Tabelle 9: Übersicht über getestete Protokolle zur Isolation von Chondrozyten mit PZM.....	34

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	2-dimensionale/r/s
3D	3-dimensionale/r/s
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
ACI-C	Autologe Chondrozyten Implantation mit Kollagenkappe
ACI-P	Autologe Chondrozyten Implantation mit Periostkappe
AD-MSCs	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
BM-MSCs	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	Circa
d	Day
DAB	p-Dimethylaminobezaldehyd
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	destilliertes H ₂ O
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium/Ham's
DMMB	Dimethylmethylene blue
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
engl.	englisch
ESCs	Embryonic stem cells
et al.	et alii/aliae
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal calf serum
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
GAG	Glykosaminoglykan
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperzin-1-yl]ethane-1- sulfonic acid
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
MACI	Matrix-assoziierte Chondrozyten Implantation
MF	Mikrofrakturierung
MSCs	Mesenchymal stem cells

NEAA	Non-essential amino acids
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBE	Phosphate buffered Extraction
PB-MSCs	Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells
PBS	Phosphate bufferd saline
PCs	Progenitor Cells
PZM	Perizelluläre Matrix
Rpm	Revolutions per minute
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
UC-MSCs	umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells
vgl	vergleiche

IV. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Torsten Blunk, Dr. Stefanie Schmidt, Dr. Julia Hauptsein, Hannes Horder, Oliver Berberich, Dr. Julia Bachmann und Paula Büttner, die mich stets mit ihrem Rat unterstützt haben, in mir die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt und mir wertvolle Einblicke in die experimentelle Forschung ermöglicht haben. Vielen Dank für die konstruktiven Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen in jeder Phase meiner Arbeit und die freundschaftliche Atmosphäre, durch die ich mich in der AG Blunk sehr wohl gefühlt habe. Prof. Dr. Stefanie Hölscher-Doht und Dr. habil. Jörg Teßmar danke ich für die Mitbetreuung meines Promotionsvorhabens und die Gewissheit, mich jederzeit an sie wenden zu können.

Meiner Familie und Philipp möchte ich für ihre grenzenlose Unterstützung bei all meinen Vorhaben danken. Ich bin dankbar und sehr gerührt von eurem Zuspruch und eurer liebevollen Fürsorge, die ich in anstrengenden Phasen meines Studiums, meiner neuen Arbeitsstelle und beim Verfassen der Dissertation erleben durfte. Euren Rückhalt und eure Liebe zu spüren, ist ein großes Geschenk.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, dir, Opa, für dein Interesse und Engagement für meine Arbeit zu danken! Es ist etwas Außergewöhnliches und Einzigartiges, mit einem Großvater die Ergebnisse der Doktorarbeit und deren wissenschaftliche Relevanz zu diskutieren. Mit deinem logischen Verstand und deiner Begeisterung für den wissenschaftlichen Fortschritt hast du mein Promotionsvorhaben ungemein bereichert und mich motiviert, weiter zu machen und weiter zu denken. Ich freue mich, dir am heutigen Tag diese Arbeit widmen zu dürfen.