

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

der Universität Würzburg

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

**Gelenkknorpelintegration im Tissue Engineering:
Untersuchung von Polyethylenglykol- und Hyaluronsäure-Komponenten für ein
Adhäsivum
und
Etablierung eines biomechanischen Versuchsmodells**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Franke

aus Leipzig

Würzburg, März 2023

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

Koreferent/Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat Jörg Teßmar

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2023

Der Promovend ist Arzt.

Widmung

Für meinen Sohn

Javik

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Humaner Gelenkknorpel	1
1.1.1 Zonen des Gelenkknorpels.....	1
1.1.2 Regionen des Gelenkknorpels.....	3
1.1.3 Chondrozyten.....	4
1.1.4 Kollagene und Proteoglykane.....	4
1.2 Pathologien des Gelenkknorpels	6
1.2.1 Einteilung von Knorpelläsionen	6
1.2.2 Chronisch-degenerative Veränderungen	7
1.2.3 Traumatische Läsionen	7
1.2.4 Osteoarthrotische Knorpeldegeneration	8
1.2.5. Klinik der Osteoarthrose	9
1.3 Therapiemöglichkeiten	11
1.3.1 Konservative Therapie	11
1.3.2 Lavage, Shaving und Débridement	11
1.3.3 Knochenmarkstimulierende Techniken.....	12
1.3.4 Auto- und Allografts.....	12
1.3.5 Tissue Engineering.....	13
1.4 Knorpelintegration	15
1.5 Adhäsiva	17
1.5.1 Mechanismen.....	17
1.5.2 Polyethylenglykol (PEG)-basierte Adhäsiva.....	18
1.5.3 Hyaluronsäure (HA) als Kleberkomponente.....	21
1.6 Biomechanische Modelle	23
1.6.1 Single-Lap-Modell	23
1.6.2 Disc-Ring-Modell.....	24
1.6.3 Sandwich-Modell	24
1.7 Ziele	26
1.7.1 Untersuchung von PEG-basierten Adhäsiva zur Knorpelintegration	26
1.7.2 Untersuchung der prointegrativen Wirkung von HA.....	26

Inhaltsverzeichnis

1.7.3 Etablierung des Sandwich-Modells.....	26
2 Material.....	29
2.1 Instrumente	29
2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	30
2.3 Chemikalien.....	31
2.4 Antikörper.....	32
2.5 Kleberkomponenten	32
2.6 Chondrozyten-Nährmedium	33
2.7 Puffer und Lösungen	33
2.8 Software.....	34
3 Methoden	35
3.1 Isolierung des Gelenkknorpels	35
3.2 Herstellung der Knorpelkonstrukte	36
3.3 Kleben der Konstrukte.....	39
3.3.1 Vorbereitung der Kleberkomponenten.....	39
3.3.2 Disc-Ring-Modell.....	39
3.3.3 Sandwich-Modell.....	39
3.4 In vitro Kultivierung der Konstrukte	40
3.5 Kraftmessung.....	40
3.5.1 Universalprüfmaschine	40
3.5.2 Push-Out-Test.....	41
3.5.3 Tensile-Test	43
3.6 Zellvitalität: MTT-Assay	45
3.7 Histologie	46
3.7.1 Paraffinschnitte	46
3.7.2 Immunhistochemische Färbungen.....	46
3.8 Herstellung von Klebergelen.....	47
3.9 Statistik.....	48

4 Ergebnisse	49
4.1 Biomechanische Messungen	50
4.1.1 Zeitliche Dynamik der Adhäsionskräfte.....	50
4.1.2 Degradationsverhalten und Anpassung der Kleberkomponenten	52
4.1.3 Vergleich der Initialadhäsion	56
4.1.4 Vergleich der Langzeitadhäsion nach 21 Tagen in vitro Kultivierung	57
4.1.5 Sofortadhäsion und Langzeitintegration im Vergleich	58
4.2 Histologie	60
4.2.1 4SG-PEG/HA-SH	60
4.2.2 4C-PEG/HA-SH.....	61
4.2.3 4C/4A-PEG	64
4.3 Zellvitalität und Zytotoxizität der Kleber	66
4.4 Entwicklung des Tensile-Tests für das Sandwich-Modell	68
4.4.1 Entwicklung der Versuchsvorrichtung.....	68
4.4.1 Einfluss Messgeschwindigkeit auf die Adhäsionskraft	70
4.4.3 Vergleich der Standardabweichungen beim Tensile- und Push-Out-Test...	72
4.4.2 Potenzielle Fehlerquellen beim Tensile-Test	72
5 Diskussion	75
5.1 Sofortadhäsion	76
5.1.1 Charakterisierung und Anpassung der Sofortadhäsion.....	77
5.2 Langzeitintegration	79
5.2.1 Die prointegrative Wirkung von Hyaluronsäure.....	80
5.2.3 Zytotoxizität.....	82
5.3 Das Sandwich-Modell und der Tensile-Test zur Messung der Zugkräfte	83
5.3.1 Vergleich des Sandwich-Modells mit dem Disc-Ring-Modell	83
5.4 Ausblick	85
6 Zusammenfassung	89
7 Literaturverzeichnis	91

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Humaner Gelenkknorpel

Humaner Gelenkknorpel ist ein hyaliner Knorpel und spielt eine fundamentale Rolle bei der Funktion des Bewegungsapparates und der Körperbewegung. Mit einer Dicke von 2 bis 4 mm bedeckt er die Oberfläche der Epiphysen zweier sich artikulierender Knochen^{1,2}. Die Hauptfunktion besteht darin, eine glatte und durch Gelenkflüssigkeit geschmierte Oberfläche für die Artikulation von Diarthrodialgelenken zu gewährleisten, um bei der Lastaufnahme einen niedrigen Reibungskoeffizienten zu ermöglichen². Er fungiert dabei als eine Art Stoßdämpfer. Es handelt sich dabei um ein stark hydratisiertes, hochspezialisiertes Bindegewebe, welches keine Blut- oder Lymphgefäße und keine nervale Innervation besitzt^{1,3}. Dies und die ständige mechanische Belastung tragen wesentlich zu seiner geringen Selbstheilungstendenz bei.

Der Aufbau von Gelenkknorpel lässt sich in einen soliden und einen flüssigen Anteil einteilen³⁻⁵. Der solide Anteil besteht aus einem für die Form des Gewebes zuständigen Netzwerk von Kollagenfibrillen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und einem geringen Anteil von Glykoproteinen³. Umgeben sind diese soliden Anteile von Wasser und darin gelösten Elektrolyten, wie Kalzium, Kalium, Natrium und Chlorid³. Die Gewebeflüssigkeit macht dabei 65 bis 80 % des Gesamtgewichts aus¹. Zusammen bilden sie die sogenannte Extrazellulärmatrix (EZM), in welcher sich spärlich verteilt hochspezialisierte Knorpelzellen, genannt Chondrozyten, befinden³.

1.1.1 Zonen des Gelenkknorpels

Aus der Anordnung der Kollagenfibrillen in der EZM und der Chondrozyten, sowie deren Form und Größe ergeben sich verschiedene Zonen des Gelenkknorpels, welche in Abbildung (Abb.) 1 schematisch dargestellt sind^{2,6}:

(I) Tangentialzone:

Diese superfizielle Zone macht 10 bis 20 % der Knorpeldicke aus und ist gekennzeichnet durch eine hohe Dichte an flachen Chondrozyten^{2,3}. Die Kollagenfibrillen aus hauptsächlich Kollagen II und Kollagen IX verlaufen hier dicht gepackt parallel zur Gelenkoberfläche^{2,3}. Des Weiteren ist ein niedrigerer Proteoglykangehalt⁷⁻⁹ als in den tieferen Zonen, sowie die Anwesenheit von Lubricin¹⁰, ein muzinartiges Glykoprotein, typisch. Die Zone steht in Kontakt mit der Synovia

Einleitung

und ist verantwortlich für den Großteil der mechanischen Resilienz des Knorpels gegen Zug- und Scherkräfte ².

(II) Übergangszone:

Die mittlere Zone nimmt 40 bis 60 % der Knorpeldicke ein und weist eine niedrige Dichte kugelförmiger Chondrozyten auf ^{2,3}. Die hier dickeren Kollagenfibrillen imponieren in Form eines desorganisierten Netzwerkes ohne bestimmte Anordnung ¹¹. Diese bieten zusammen mit dem höheren Gehalt an Proteoglykanen einen ersten Widerstand gegen Kompressionen ². Sie fungiert anatomisch als Verbindung zwischen superfizieller und tiefer Zone ².

(III) Radiärzone:

Die tiefe Zone macht etwa 30 % der Gelenkknorpeldicke aus und weist den niedrigsten Wassergehalt auf ². Die hier großen Chondrozyten sind von einer perizellulären Matrix umgeben, welche Kollagen VI enthält ³. Diese sogenannten Chondrone sind säulenförmig übereinandergestapelt und verlaufen parallel zu den hier vertikal orientierten Kollagenfibrillen ^{2,3}. Letztere ermöglichen zusammen mit dem in dieser Zone höchsten Proteoglykangehalt den stärksten Widerstand gegen Kompressionen ².

(IV) Zone des mineralisierten Knorpels:

Zwischen Gelenkknorpel und subchondralem Knochen befindet sich in Form der sogenannten Zone des mineralisierten Knorpels eine Mineralisierungszone ^{3,12}. Nach Hämatoxilin-Eosin (H.-E.)-Färbung ist diese Zone durch die sogenannte „tidemark“ von der Radiärzone abgrenzbar ¹³. Hier findet man die Verankerung der Kollagenfibrillen in den subchondralen Knochen, sowie eine mit Hydroxyapatit-Kristallen durchsetzte EZM ^{2,6}. In dieser Zone sind wenige hypertrophe Chondrozyten auffindbar ².

Einleitung

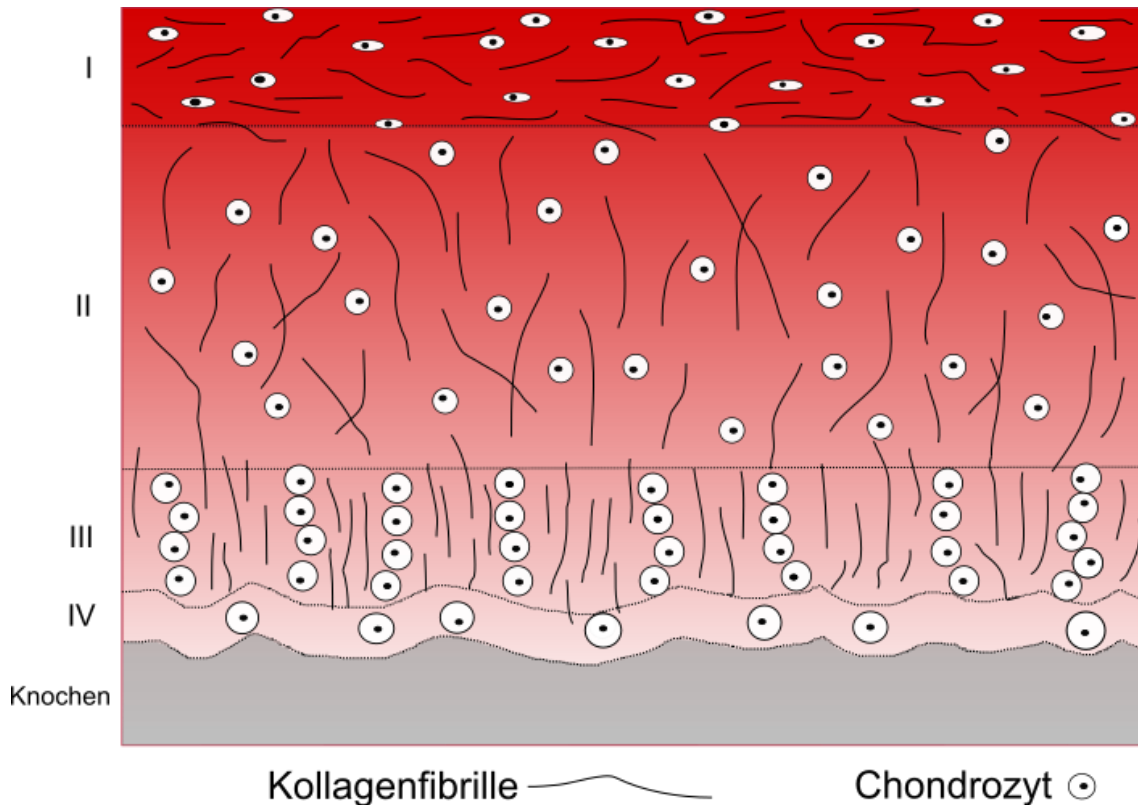


Abbildung 1: Darstellung der Zonen des Gelenkknorpels: (I) Tangentialzone, (II) Übergangszone, (III) Radiärzone, (IV) Zone des mineralisierten Knorpels. Es imponieren die typischen Konfigurationen der Kollagenfibrillen und Chondrozyten in den unterschiedlichen Zonen.

1.1.2 Regionen des Gelenkknorpels

Zusätzlich zu der zonalen Aufteilung lässt die Struktur und Organisation der EZM-Bestandteile in Bezug auf die darin befindlichen Chondrozyten eine weitere Aufteilung in Regionen zu ^{2,3}.

Die *perizelluläre Matrix* ist eine etwa 2 µm dünne Region, welche der Zellmembran des Chondrozyten direkt anliegt und sie schützend umgibt ^{2,3,14}. Kennzeichnend ist die Anwesenheit von Kollagen VI, sowie eine Zusammensetzung aus hauptsächlich Proteoglykanen ^{3,15-18}. Funktionell spielt diese Region eine wichtige Rolle in der Transduktion biochemischer und biomechanischer Signale ¹⁹.

Die *territoriale Matrix* umgibt die perizelluläre Matrix und besitzt einen noch höheren Gehalt an Proteoglykanen, sowie ein ausgeprägtes Netzwerk aus Kollagenfibrillen und ist reich an Chondroitinsulfat ^{19,20}. Vermutlich hat sie eine schützende Funktion für die Chondrozyten ².

Einleitung

Die *interterritoriale Matrix* lässt sich lichtmikroskopisch gut von den anderen beiden unterscheiden ⁶. Durch den in perizellulärer und territorialer Matrix hohen Gehalt an polyanionischen Proteoglykanen imponieren diese in der H.-E.-Färbung deutlich basophiler ⁶. Die interterritoriale Matrix ist im Gegensatz dazu reich an keratinsulfathaltigen Proteoglykanen ¹⁶. Durch die unterschiedliche Anordnung der dort dicken Kollagenfibrillen ist sie für den Großteil der mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels verantwortlich ^{21,22}.

1.1.3 Chondrozyten

Chondrozyten sind hochspezialisierte Zellen mesenchymaler Abstammung und weisen, wie bereits erwähnt, erhebliche Unterschiede in ihrer Morphologie und Verteilung innerhalb der EZM auf ^{2,23}. Sie nehmen dabei nur rund 2 % des Gesamtvolumens im Gelenkknorpel ein ²³. Jeder Chondrozyt kreiert seine eigene charakteristische Umgebung in Form der oben genannten Matrices, was dazu führt, dass sie recht immobil sind und daraus folgend kaum Zellmigration stattfindet ². Das erklärt, kombiniert mit ihrer geringen Quantität, warum kaum Zell-zu-Zell Kontakte stattfinden ^{23,24}. Dennoch reagieren Chondrozyten auf zahlreiche äußere Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, mechanische und piezoelektrische Kräfte sowie hydrostatische Drücke, ^{2,25}. Da Chondrozyten für die Bildung, Instandhaltung und Reparatur der EZM verantwortlich sind, ist ihr Überleben für einen gesunden Gelenkknorpel unabdingbar ². Ihre geringe Quantität und Zellteilungsrate ist ein entscheidender Faktor für die schlechte Selbstheilungstendenz und somit auch für die Pathogenese von Erkrankungen des Gelenkknorpels ².

1.1.4 Kollagene und Proteoglykane

Mit 60 % machen Kollagene den Großteil des Trockengewichts von Gelenkknorpel aus. Proteoglykanen haben einen Anteil von 10 bis 15 % am Trockengewicht des Gelenkknorpels. Bei beiden handelt es sich um wichtige strukturelle Makromoleküle in der EZM. Das am häufigsten vorkommende Kollagen II (90 bis 95 %) liegt als ein Netzwerk aus Fibrillen vor und ist mit Proteoglykanaggregaten verflochten ². Andere Kollagentypen helfen dabei, dieses Kollagenetzwerk zu stabilisieren ².

Eines der größten und zahlreichsten Proteoglykane ist Aggrecan, welches durch seine Fähigkeit mit Hyaluronsäure (HA) zu interagieren, gekennzeichnet ist ². Als riesige Aggregate befinden sie sich in den interfibrillären Räumen und sind durch ihre osmotischen Eigenschaften für die Druckelastizität des Knorpels verantwortlich ^{2,6}. Durch die zügelnde Wirkung der Kollagenfibrillen können Proteoglykane und HA ihrer

Einleitung

Expansionsneigung nicht voll nachkommen, sie können nur etwa 20 % ihres benötigten Lösungsraumes in der EZM einnehmen und fungieren vergleichbar wie Sprungfedern ⁶. Gleichzeitig haben sie eine stark wasseranziehende Wirkung und sind für den hohen Wassergehalt in der EZM verantwortlich ⁶.

1.2 Pathologien des Gelenkknorpels

Das Versagen von Gelenkknorpel lässt sich als Resultat aus einem Ungleichgewicht zwischen EZM-Produktion und den auf den Knorpel wirkenden destruktiven Kräften zusammenfassen ^{3,26}. Sowohl Traumata als auch chronisch-degenerative Veränderungen sind die wichtigsten Risikofaktoren in der Entstehung einer Osteoarthritis, der häufigsten nicht-entzündlichen, degenerativen Gelenkerkrankung in der westlichen Welt ^{27,28}. Zu beachten ist, dass die Osteoarthritis im englischen Sprachgebrauch als „osteoarthritis“ bezeichnet wird, während man in der deutschen Sprache bei einer Osteoarthritis in der Regel von einer entzündlich-rheumatoiden Erkrankung spricht ²⁹.

1.2.1 Einteilung von Knorpelläsionen

Lokalisation, Größe und Tiefe von Knorpelläsionen variieren und zur einheitlichen Einteilung existieren mehrere Klassifikationssysteme. Am häufigsten werden die International Cartilage Repair Society (ICRS) Klassifikation und die Outerbridge Klassifikation verwendet, wie in den Tabellen (Tab.) 1 und 2 aufgeführt ³⁰⁻³². Eine akkurate Einteilung ist essentiell, um eine passende Therapie festlegen zu können und eine Prognoseabschätzung zu ermöglichen ^{30,33}.

Tabelle 1: *International Cartilage Repair Society (ICRS) Klassifikation*

Grad	Beschreibung
0	Normaler intakter Knorpel
1	1A: oberflächliche Läsionen und Erweichung 1B: oberflächliche Fissuren und Lazerationen
2	Ausfransen, Läsionen und Fissuren, bis zu <50 % in die Tiefe des Knorpels
3	3A: Defekte tiefer als 50 %, aber nicht in der kalzifizierten Zone 3B: Defekte bis zur kalzifizierten Zone 3C: Defekte bis, aber nicht durch den subchondralen Knochen 3D: Defekt tiefer als 50 % mit Blasenbildung
4	4A: Defekt bis zum oberflächlichen subchondralen Knochen 4B: Defekt bis zum tiefen subchondralen Knochen

Einleitung

Tabelle 2: Outerbridge Klassifikation

Grad	Beschreibung
0	Normaler Knorpel
I	Erweichung und Schwellung des Knorpels
II	Fissuren mit einem Durchmesser <0,5 Inch nicht bis zum subchondralen Knochen
III	Fissuren mit einem Durchmesser >0,5 Inch bis auf den subchondralen Knochen
IV	Erosion bis auf den subchondralen Knochen

1.2.2 Chronisch-degenerative Veränderungen

Im Rahmen des Alterungsprozesses weist Gelenkknorpel eine Abnahme sowohl in Dicke als auch in Zelldichte auf ³⁴. Des Weiteren wird die Integrität der EZM durch eine veränderte Kollagenvernetzung gestört, was auf eine Akkumulation von glykierten Endprodukten zurückzuführen ist ³⁵. Dabei kann zwischen dem 50. und 90. Lebensjahr eine Abnahme der Chondrozytendichte von 50 % beobachtet werden, beginnend in der superfiziellen Zone ³⁶. Die verminderte Zelldichte ist vermutlich ein Grund für das im Alter zunehmende Risiko einer Osteoarthritis, da dem Knorpel jegliche, ohnehin schon kaum vorhandene Fähigkeit zur Selbstheilung verlorenght ^{34,36}. Auch die Ernährung des Knorpels über den einzig möglichen Weg, der Diffusion, nimmt im Alter ab ³⁷. Zurückzuführen ist dies auf eine Größenreduktion der Zone des kalzifizierten Knorpels und damit verbundener verminderter Durchlässigkeit ³⁸. Verstärkt wird der Nährstoffmangel durch eine bis in die 7. Lebensdekade sinkende Vaskularisation, welche an Femur- und Humerusköpfen beobachtet werden konnte ³⁶. Die Kombination dieser altersbedingten Faktoren führt zu einer erhöhten Fragilität des Gelenkknorpels und kann die Entstehung einer Osteoarthritis begünstigen.

1.2.3 Traumatische Läsionen

Verletzungen des Gelenkknorpels lassen sich grob in chondrale und osteochondrale Läsionen einteilen ^{39,40}. Dabei penetrieren die osteochondralen Verletzungen den subchondralen Knochen und haben je nach Größe und Lokalisation ein partielles Regenerationspotential. Dieses kommt durch lokale Einblutungen des verletzten Knochens zustande. Diese Einblutungen bilden zunächst ein fibrinhaltiges Blutgerinnsel, welches durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren Stammzelleinwanderung und

Einleitung

Kollagen I-Synthese verursacht wird ⁴¹. Es kommt am Ende dieser Kaskade zur Bildung eines faserknorpelartigen Reparaturgewebes, welches dem hyalinen Gelenknorpel in seinen biomechanischen Eigenschaften deutlich unterlegen ist, was am hohen Kollagen I-, statt Kollagen II-Gehalt, und niedrigen Proteoglykangehalt liegt ^{42,43}. Des Weiteren integriert dieses Reparaturgewebe wenig bis gar nicht mit dem nativen Gelenknorpel und es können häufig fokale Diskontinuitäten zwischen den beiden Knorpelarten nachgewiesen werden ⁴⁴. Aufgrund dieser Faktoren degeneriert dieses Reparaturgewebe nach einigen Wochen bis Monaten ⁴⁵.

Wegen der avaskulären Natur des Gelenknorpels kann sich bei rein chondralen Verletzungen kein Blutgerinnsel formieren und weder ein Reparaturgewebe entstehen noch eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden ²³. Stattdessen reagieren die Chondrozyten mit einer Proliferation und verstärkten EZM-Synthese am Läsionsort, welche aber die zerstörte Oberfläche nicht regenerieren kann ^{23,46}. Auch scheinbar triviale oberflächliche Verletzungen ohne sichtbare chondrale Fissur können Chondrozyten und EZM schädigen und einen Circulus vitiosus in Gang setzen ²³. Der Chondrozytenschaden führt durch die dadurch entstehende verminderte EZM-Produktionskapazität zu einer niedrigeren Konzentration von Proteoglykanen, höherem Wassergehalt und veränderten Kollagenstruktur in der EZM ^{23,46,47}. Die dadurch veränderten biomechanischen Eigenschaften können eine Knorpelläsion unabhängig von dessen Größe und Ausdehnung verschlimmern und schließlich in eine posttraumatische Osteoarthritis münden. Da Gelenkverletzungen häufig von Läsionen der Ligamente oder Menisken begleitet werden und diese zu Fehlhaltungen und -belastungen führen, können sie ebenfalls zur progredienten Knorpelschädigung und -degeneration beitragen ⁴⁰. Allein in den USA sind posttraumatische Osteoarthrosen für etwa 12 % aller Osteoarthrosen verantwortlich und verursachen Behandlungskosten von jährlich ungefähr 3 Milliarden US-Dollar ⁴⁸.

1.2.4 Osteoarthrotische Knorpeldegeneration

Posttraumatische und altersbedingte strukturelle Knorpelläsionen sind neben Übergewicht, genetischen Faktoren, Entzündung, metabolischem Syndrom und weiblichem Geschlecht die wichtigen Risikofaktoren bei der Entstehung einer Osteoarthritis ⁴⁰. Es kommt zur einer Störung der Homöostase im Gelenknorpel, wobei die katabolischen Prozesse den anabolischen Prozessen überwiegen und es zunächst zu einer Fibrillierung der Knorpeloberfläche und schließlich zu einer Veränderung der molekularen Komposition und Organisation der EZM kommt ⁴⁹⁻⁵¹. Dabei kann eine

Einleitung

Proteolyse von Aggrecan durch „a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs“ (ADAMTS) 4 und 5, sowie eine Verdauung von Kollagen II durch die Matrixmetalloproteasen 1, 2 und 13 beobachtet werden^{52,53}. Chondrozyten erhöhen daraufhin reaktiv ihre Stoffwechsel- und Teilungsrate, hypertrophieren und bilden Ansammlungen, um so den Versuch einer Regeneration zu initiieren⁵⁴. Diese transiente proliferative Reaktion führt zunächst zu einer erhöhten EZM-Produktion⁵⁴. Allerdings folgt dieser pathologischen Stimulation auch eine vermehrte Freisetzung von katabolischen Faktoren, was die EZM-Degradation wiederum beschleunigt und zu einem immer größeren Verlust an Kollagen und Proteoglykanen und dessen Netzwerk führt^{54,55}. Eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie scheint dabei das Zytokin „transforming growth factor“- β (TGF- β) zu spielen. Es werden sowohl protektive als auch katabolische Effekte des Signalstoffes im Rahmen der Osteoarthrose beschrieben^{56,57}. Letztlich kommt es zu einem kompletten Verlust des Gelenkknorpels mit Apoptose der Chondrozyten⁵⁴. Resultat ist eine knöcherne Gelenkfläche und Knochen-an-Knochen Reibung, was zu Schmerzen sowie Mobilitätseinschränkung bis hin zu einem kompletten Funktionsverlust des Gelenks führt⁵⁴.

1.2.5. Klinik der Osteoarthrose

Die Osteoarthrose kann sowohl mono- als auch polyartikulär auftreten und prinzipiell jedes Gelenk betreffen, wobei am häufigsten die kleinen Gelenke der Hände und Füße, die Hüftgelenke und die Kniegelenke betroffen sind^{58,59}. Dabei treten Symptome meist erst in einem späten Krankheitsstadium auf^{58,59}. Das prominenteste Symptom ist der Schmerz, welcher vor allem in Form eines konstanten Hintergrundschmerzes und eines intermittierenden intensiveren Schmerzes beschrieben wird. Der Schmerzcharakter und die -ausprägung kann sich mit dem Krankheitsprogress verändern und verstärken^{60,61}. Charakteristisch sind Schmerzexazerbationen nach mechanischer Belastung des Gelenks, welche im Tagesverlauf zunehmen^{58,61}. Weitere Symptome sind Steifheit des betroffenen Gelenks mit eingeschränkter Mobilität und Deformität, ein Gefühl der Instabilität und Krepitationen⁶¹. Typisch ist zudem eine asymmetrische Präsentation, bei der nicht alle betroffenen Gelenke symptomatisch sein müssen⁵⁸. Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis treten nur kurze, unter 30 min anhaltende Episoden von Morgensteifigkeit der Gelenke auf^{58,61}. In der weiteren Anamnese sind die zuvor genannten Risikofaktoren wegweisend für die Diagnosestellung.

Zur Verifizierung und zum Ausschluss anderer Diagnosen wird in der Regel eine Röntgenuntersuchung des betroffenen Gelenks durchgeführt. Typische

Einleitung

röntgenmorphologische Merkmale sind eine Verschmälerung des Gelenkspalts, subchondrale Sklerose, Osteophyten und subchondrale Geröllzysten⁶¹. Die am meisten verbreitete radiologische Klassifikation wird nach Kellgren und Lawrence in 4 Stadien vorgenommen (Tab. 3)^{62,63}. Da frühe Knorpelschäden röntgenmorphologisch nicht suffizient dargestellt werden können, kann die Magnetresonanztomografie als weiterführendes Diagnostikum herangezogen werden, um die Ausprägung des Schadens genauer zu beurteilen⁶⁴. Außerdem können so relevante, den Krankheitsverlauf beeinflussende Faktoren, wie Meniskus- oder Ligamentschäden, identifiziert werden^{61,65}. Zur Klärung einer Operationsindikation können die gewonnenen Erkenntnisse aus der nicht routinemäßig durchgeführten Magnetresonanztomografie hilfreich sein^{66,67}. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Diagnose der Osteoarthritis primär klinisch gestellt wird und die Symptomatik nicht mit der röntgenmorphologischen Ausprägung korrelieren muss⁶¹. Spezifische laborchemische Biomarker sind für die Osteoarthrosediagnostik nicht etabliert und dienen zum Ausschluss von Differentialdiagnosen^{58,61,68}.

Tabelle 3: Radiologische Klassifikation der Osteoarthritis nach Kellgren und Lawrence

Grad	Beschreibung
0	Normalbefund
1	Fragliche Verschmälerung der Gelenkspaltbreite, Osteophyten möglich
2	Mögliche Verschmälerung der Gelenkspaltbreite, definitiver Nachweis von Osteophyten
3	Definitive Verschmälerung der Gelenkspaltbreite, multiple Osteophyten, mögliche Deformität der gelenkbildenden Knochenanteile
4	Fortgeschrittene Verschmälerung der Gelenkspaltbreite, große Osteophyten, schwere subchondrale Sklerose, definitive Deformität der gelenkbildenden Knochenanteile

1.3 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie von Gelenkknorpelschäden beschäftigt Ärzte und Wissenschaftler schon seit Jahrzehnten. Dementsprechend existieren eine Reihe von operativen Therapiemethoden und deren Weiterentwicklungen, die im Folgenden zusammengefasst werden. Zwar konnten in der Vergangenheit teilweise schon gute klinische Ergebnisse erzielt werden, dennoch bleibt häufig als Ultima Ratio der Gelenkersatz durch eine Prothese, was der komplexen und fragilen Natur des Gelenkknorpels zuzuschreiben ist.

1.3.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie umfasst zunächst die individuelle Anpassung des Lebensstils und der modifizierbaren Risikofaktoren, wie Gewichtsverlust und aktive muskuläre Beübung. Da bei Gelenkknorpelschäden und der Osteoarthrose Schmerzen das Hauptsymptom darstellen, spielt die medikamentöse Schmerztherapie eine wichtige Rolle. Wenn die topische Applikation von nichtsteroidalen Antirheumatika und die orale Einnahme von Paracetamol nicht genügen, kann die analgetische Therapie stufenweise eskaliert werden. Zudem können supportive Therapien, wie Physiotherapie, orthopädische Hilfen und Orthesen oder transkutane Nervenstimulation herangezogen werden ^{58,61,69}. Sollten konservative Therapiemaßnahmen nicht genügen, müssen individuell die operativen Therapiemöglichkeiten diskutiert werden.

1.3.2 Lavage, Shaving und Débridement

Die *Lavage* umfasst die Spülung eines Gelenks mit einem Spülmittel, meist Natriumchlorid- oder Ringerlösung, mittels Arthroskopie. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten nur kurzzeitig eine Schmerzreduktion erfahren und nicht langfristig profitieren ⁷⁰.

Shaving umfasst das arthroskopische Entfernen von abgestorbenem Knorpelgewebe mit entsprechenden chirurgischen Instrumenten. Es wird nur noch selten bei Läsionen der Patella verwendet, da ein klinischer Nutzen sonst nicht nachgewiesen werden konnte ^{45,71}.

Das *Débridement* ist eine Kombination aus den ersten beiden Verfahren. Dabei werden beschädigter Knorpel und Osteophyten großzügig entfernt, Meniskusschäden behandelt, loses Gewebe beseitigt und schließlich das Gelenk gespült ^{45,72}. Auch wenn es einer kleinen Patientengruppe mit Schmerzsymptomatik nach leichtem Gelenktrauma zu helfen scheint, profitiert der Großteil der Patienten nicht von diesem Verfahren ^{73,74}.

1.3.3 Knochenmarkstimulierende Techniken

Die *Abrasionschondroplastik*, die *Pridie-Bohrung* und die *Mikrofrakturierung* sind Techniken, bei welchen ein Zugang zum Knochen und Knochenmark geschaffen wird. Ziel ist es, therapeutische Blutungen im subchondralen Knochen zu induzieren und Knorpelläsionen mit einem fibrinhaltigen Blutgerinnsel aufzufüllen, um so den intrinsischen Reparaturprozess, wie er bei osteochondralen Gelenkknorpelläsionen beobachtet wird, zu provozieren²³. Wie bereits erläutert, entsteht dabei allerdings ein minderwertiger Faserknorpel, was die Limitierungen dieser Therapieformen aufzeigt. Die Abrasionschondroplastik beinhaltet dabei das arthroskopische Entfernen von 1 bis 3 mm subchondralem Knochen, während die Pridie-Bohrung das Anbohren der betroffenen Areale mittels motorisierter Instrumente vorsieht²³. Im Gegensatz zu diesen beiden Methoden werden bei der Mikrofrakturierung mit Hilfe arthroskopischer Knorpelstößel kleinere und weniger tiefe Löcher in 3 bis 4 mm Abständen am Läsionsort verteilt⁴⁵. Durch die kleineren Perforationen besteht ein geringeres Risiko für biomechanische Beeinträchtigungen und für thermische Gewebenekrosen, welche bei den maschinellen Manipulationen der ersten beiden Methoden entstehen können⁴⁵. Es konnte nachgewiesen werden, dass vor allem Patienten unter 55 Jahren mit kleinen posttraumatischen osteochondralen Läsionen von der Mikrofrakturierung profitieren können⁷⁵. Generell ist jedoch festzustellen, dass die Verfahren im besten Fall einige Jahre symptomatische Besserung versprechen und die Ergebnisse sehr variabel sind^{45,76}.

1.3.4 Auto- und Allografts

Unter Auto- beziehungsweise Allografts versteht man die Transplantation von körpereigenem oder körperfremdem Gewebe. Bei Gelenkknorpelläsionen sind osteochondrale Auto- und Allografts, sowie perichondrale und periostale Transplantate mögliche Therapieformen. Sie werden vor allem bei größeren Läsionen oder nach Versagen anderer Therapien angewendet⁷⁷.

Der *osteochondrale Autograft Transfer (OATS)* beinhaltet den autologen Transfer von hyalinem Knorpel mit dazugehörigem subchondralen Knochen in Form von speziell ausgestanzten Zylindern. Diese werden im entsprechenden Gelenk von Orten kleiner Belastung entnommen und offen-chirurgisch oder arthroskopisch an den Läsionsort transplantiert. Vor allem für Läsionen im Kniegelenk werden gute langfristige Ergebnisse nach 10 Jahren beschrieben⁷⁸. Trotz der optimistischen Ergebnisse hat dieses Verfahren ein hohes Risiko für Kollateralschäden⁴⁵. Es muss ein gute laterale

Einleitung

Knorpelintegration zwischen transplantiertem und nativem Knorpel gewährleistet sein, um eine gute mechanische Verankerung des Transplantats sicherzustellen, da es ansonsten zu einem Knorpeluntergang und somit einer Progression der Läsion kommen kann ^{23,45}. Weitere relevante Probleme sind die Entnahmemorbidität und die eingeschränkte Größe des Transplantats aufgrund der limitierten Entnahmeorte sowie die technischen Anforderungen, da eine präzise Anpassung des Transplantates erforderlich ist ^{23,78}.

Im Gegensatz zum OATS wird beim *osteochondralen Allograft* körperfremdes Knorpelgewebe von Körperspendern verwendet. Vorteil dieser Methode im Vergleich zum Autograft ist das Wegfallen entnahmeassoziierter Komplikationen und die Möglichkeit größere Läsionen zu behandeln ²³. Logistisch stellt es allerdings eine Herausforderung dar, da nur eine begrenzte Anzahl an Spendern zur Verfügung steht und das entnommene Gewebe innerhalb weniger Tage, möglichst frisch und ungefroren, verarbeitet werden muss, um eine möglichst hohe Chondrozytenvitalität zu gewährleisten ^{45,79}. Außerdem sind allgemeine Komplikationen durch Fremdspende, wie immunologische Reaktionen, zu erwähnen ⁸⁰.

Periostale und perichondrale Autotransplantate können die Produktion von neuem Knorpelgewebe anregen ⁸¹. Aufgrund zwar weniger, aber eher ungünstiger Ergebnisse in Bezug auf die Stabilität dieses Reparaturgewebes finden diese Verfahren nur in wenigen Zentren Anwendung ^{23,82,83}.

1.3.5 Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE) hat das Ziel, biologisches Gewebe künstlich strukturell und funktionell zu rekonstituieren. Dies kann sowohl vollends *in vitro*, also auch teils *in vitro* und teils *in vivo* erfolgen. Mit der matrixgestützten autologen Chondrozyten-Transplantation (MACT) existiert bereits ein Verfahren, welches klinisch Anwendung findet. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT).

Die ACT umfasst eine Prozedur in zwei Schritten, bei welcher zunächst arthroskopisch eine Biopsie aus gesundem hyalinen Gelenknorpel gewonnen wird ⁷⁷. Die schließlich *in vitro* kultivierten und expandierten Chondrozyten werden im zweiten Schritt offen-chirurgisch in einen Knorpeldefekt implantiert ⁷⁷. Dabei wurden die in Suspension befindlichen Chondrozyten unter einen zuvor über den Defekt genähten Periostlappen injiziert ²³. Dieser wurde allerdings aufgrund von häufig vorkommenden ungewünschten

Einleitung

Hypertrophien (10 bis 40 %) und damit verbundenen Reoperationen durch eine Kollagenmembran ersetzt, was die Komplikationsraten senken konnte ^{3,84-88}. Ob die klinischen Ergebnisse der ACT denen der OATS und Mikrofrakturierung langfristig überlegen sind, lässt sich aufgrund der zur Zeit nur begrenzten Anzahl an Studien mit diesbezüglich variierenden Ergebnissen noch nicht sicher sagen ^{77,89-92}.

Wegen der komplexen und invasiven Natur des mehrschrittigen Eingriffs sowie anderer Probleme, wie die in vivo zu beobachtende Chondrozyten-Dedifferenzierung mit resultierender verminderter EZM-Produktionskapazität, wurde das Verfahren, in Form der MACT, weiterentwickelt ^{3,77,93}. Sie beinhaltet das Einbetten der durch Biopsie gewonnen Chondrozyten in eine Trägermatrix, mit welcher sie zusammen an den Läsionsort transplantiert werden ^{3,94}. Solche 3D-Matrices, auch Scaffolds genannt, dienen als strukturelles Gerüst und haben einige entscheidende Vorteile. Aufgrund der 3D-Konfiguration der Chondrozyten findet innerhalb des Scaffolds eine geringere Dedifferenzierung und somit eine höhere Produktion von hyalinem Reparaturknorpel statt ⁹⁵. Außerdem erlauben die Scaffolds eine bessere und technisch einfachere Anpassung an den Läsionsort mit dortiger besserer Stabilität und daraus resultierender schnellerer postoperativer Rehabilitation ⁹⁶. Bei der MACT wird eine gemischte Kollagenmatrix verwendet, in welche die zuvor in vitro expandierten Chondrozyten 3 Tage vor Implantation eingesät werden ⁹⁶. Zwar suggerieren verschiedene Studien bessere klinische Ergebnisse nach ≥ 2 Jahren, eine Überlegenheit der MACT gegenüber anderen Therapieformen konnte jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden ⁹⁶⁻⁹⁹.

Im Bereich des TE für Gelenkknorpel wird intensiv Forschung betrieben und es stehen zahlreiche neue Techniken in Erprobung. Die dafür verwendeten Komponenten umfassen unterschiedliche Scaffolds, Zellen und Wachstumsfaktoren. Untersucht werden unter anderem Scaffolds auf Proteinbasis (z.B. Kollagenmatrices, Gelatine, Fibrin), Kohlenhydratbasis (z.B. Hyaluronsäure, Chitosan) sowie synthetische und kombiniert-zusammengesetzte Scaffolds. Außerdem wird die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen unterschiedlicher Herkunft und von induzierten pluripotenten Stammzellen zur Gelenkknorpelzüchtung getestet. Um schon in vitro vor der Implantation Knorpelgewebe zu züchten, werden Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , als exogene Stimuli verwendet. Auch zellfreie Scaffolds und scaffoldfreie Ansätze sind Gegenstand der Forschung.

1.4 Knorpelintegration

Eine suffiziente laterale Integration zwischen nativem und implantiertem Gewebe ist für ein langfristiges Überleben des Implantats *in vivo* essenziell. Fehlt eine solche Verbindung, ist sie lückenhaft oder zu schwach ausgeprägt, kann es zu schädigenden Mikrobewegungen zwischen den Geweben kommen, was in einem progredienten Gewebeuntergang münden kann ¹⁰⁰. Es gibt eine Reihe von Faktoren, welche die laterale Knorpelintegration beeinflussen ¹⁰¹.

Geschädigter Gelenkknorpel innerhalb entsprechender Läsionen wird bei den verschiedenen therapeutischen Interventionen chirurgisch entfernt. So soll für ein Implantat Kontakt zu gesundem nativem Knorpel gewährleistet werden. Allerdings konnte an den Schnitträndern eine zunächst 100 bis 200 µm Breite nekrotische Zone beobachtet werden, die sich im weiteren Verlauf durch progrediente Apoptose von Chondrozyten bis auf 400 µm vergrößern kann ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Diese hypozelluläre Zone stellt ein relevantes Hindernis für die laterale Integration dar, da ohne vitale Chondrozyten keine EZM-Produktion stattfinden kann. Der Zelltod der Chondrozyten kann durch die Anwesenheit entsprechender Apoptose-Inhibitoren (z.B. ZVAD-fmk) verhindert werden und es konnte gezeigt werden, dass deren Anwesenheit in Kulturmedium die Knorpelintegration fördert ¹⁰¹. Auch vitale, in der Nähe der Nekrosezone befindliche Chondrozyten sind durch Zellteilung oder Migration nicht in der Lage, diese wieder zu besiedeln und zu revitalisieren ¹⁰⁴. Um deren dortige Quantität zu erhöhen und so eine suffiziente EZM-Synthese zur Revitalisierung zu erreichen, wurden verschiedene chemotaktische Faktoren erprobt. Dazu gehören beispielsweise „platelet derived growth factor“ (PDGF), „insulin-like growth factor I“ (IGF-1) und „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), die bei ausreichender Konzentration die Migration boviner Chondrozyten effektiv stimulieren ^{36,105,106}.

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der lateralen Knorpelintegration ist das Andauen der Defektränder. Dies bricht die hypozelluläre Matrix der Nekrosezone auf und bietet Chondrozyten eine einfachere Migration an den Knorpel-Transplantat-Spalt. Prominente Vertreter solcher zum Andau verwendeter Enzyme sind Hyaluronidase, Kollagenase und Chondroitinase ABC. Es wurden an bovinem Knorpel *in vitro* verschiedene Protokolle untersucht, bei denen die Enzyme einzeln und in Serie kombiniert zum Andau von bovinen Explantaten verwendet wurden ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Dabei konnte histologisch nachgewiesen werden, dass bei entsprechender Konzentration und Reaktionszeit der Enzyme eine

Einleitung

höhere Chondrozytendichte am Defektrand erreicht werden konnte, als in gesundem Gelenkknorpel und somit die laterale Knorpelintegration verbessert werden kann ¹⁰⁹.

Ein weiterer Ansatz, um dies zu erreichen, umfasst die Benutzung von Biomaterialien. Dabei sollen diese als Adhäsivum fungieren, welches nativen Knorpel und Implantat miteinander über chemische Verbindungen „verkleben“. Ein solches Adhäsivum muss bestimmte Voraussetzungen erfüllen, die im Folgenden charakterisiert werden.

1.5 Adhäsiva

Ein ideales Adhäsivum muss sicher in der Anwendung und sterilisierbar sein sowie eine geringe bis keine Toxizität aufweisen. Um sich in der klinischen Anwendung durchzusetzen, muss es außerdem intraoperativ einfach vor- und zuzubereiten sein, damit eine schnelle Applikation gewährleistet ist. Auch die Applikation selbst sollte möglichst unkompliziert praktikierbar sein. Dementsprechend sollte sie in möglichst wenigen Schritten erfolgen beziehungsweise die Konsistenz des Biomaterials eine einfache Applikation ermöglichen. Der Klebprozess, also der Reaktionsmechanismus des Adhäsivums, muss in einem schnellen zeitlichen Rahmen stattfinden, um unnötige intraoperative Wartezeiten zu vermeiden. Die initiale Klebekraft muss dabei ausreichend hoch sein, damit eine sichere Fixierung des Implantats gewährleistet ist. Diese chemische Adhäsionskraft muss auch über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben, bis die biologischen Prozesse des Gelenkknorpels eine ausreichende laterale Integration initiiert haben. Dementsprechend muss das Adhäsivum die Regeneration von Gelenkknorpel als Matrix fördern und dabei degradierbar und absorbierbar sein. Damit eine breite Anwendung des Adhäsivums bei der Therapie entsprechender Gelenkknorpelschäden möglich ist, müssen die dazu benötigten Biomaterialien möglichst kosteneffizient sein ¹¹¹.

1.5.1 Mechanismen

Es existieren verschiedene Mechanismen für Adhäsion und Bioadhäsion. Diese können in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die adhäsiven Eigenschaften eines Materials werden in der Praxis meist einem dieser Mechanismen zugeschrieben, dennoch handelt es sich in der Regel im gesamten um eine Kombination dieser ¹¹¹.

Das Konzept der *mechanischen Verzahnung* beschreibt die Eigenschaft eines adhäsiven Materials in die Poren und Unebenheiten auf der Oberfläche des zu klebenden Substrates einzudringen und so eine mechanische ineinandergreifende Verriegelung zu erzeugen ¹¹¹. Dies setzt eine entsprechende Oberflächenbeschaffenheit des Substrates voraus und es besteht gegebenenfalls die Notwendigkeit, dieses vorzubehandeln, um eine solche zu erzeugen. Insgesamt scheint dieser Mechanismus allerdings nur einen geringen Anteil zur Gesamtadhäsionskraft beizutragen ¹¹¹⁻¹¹³. Der enzymatische Andau von Gelenkknorpeldefekträndern kann zwar, wie bereits erwähnt, die laterale Integration verbessern, der hier erläuterte Mechanismus spielt dabei aber eher eine untergeordnete Rolle.

Einleitung

Intermolekulare Bindungen stellen den für die adhäsiven Kräfte verantwortlichen Hauptmechanismus dar. Die Atome und Moleküle der Adhäsiva und der Substratoberfläche interagieren dabei über intermolekulare/-atomare Kräfte und über Bindungen. Chemische Bindungen sind dabei die primär wirksamen Kräfte und umfassen die hochenergetischen kovalenten, ionischen und metallischen Bindungen. Damit solche Bindungen zustande kommen, müssen je nach Reaktionsmechanismus gegebenenfalls chemische Modifikationen innerhalb des adhäsiven Materials vorgenommen werden oder die Substratoberfläche vorbehandelt werden. Sekundäre Kräfte intermolekularer Bindungen umfassen unter anderem Wasserstoffbindungen, Dipol-Dipol-Interaktionen und Van-der-Waals-Kräfte. Zwar sind diese im Vergleich zu den chemischen Bindungen deutlich niedrigerenergetischer, dennoch können sie vor allem bei hoher Quantität einen wesentlichen Beitrag zur Gesamtadhäsionskraft leisten ¹¹¹.

Zwei weitere Mechanismen sind die *Polymerketten-Verschlaufung* und die *elektrostatische Anziehung*. Ersterer beschreibt die Adhäsion durch die Verschlaufung zweier ähnlicher Makromoleküle, während die elektrostatische Anziehung durch den Elektronentransfer zweier in Kontakt stehender Flächen zustande kommt ¹¹¹. Beide Mechanismen spielen bei Gelenkknorpeladhäsiva bis dato keine Rolle und werden als mögliche Mechanismen im Rahmen von Mukoadhäsion diskutiert ^{114,115}.

1.5.2 Polyethylenglykol (PEG)-basierte Adhäsiva

PEG ist ein mittlerweile gut untersuchtes, ungiftiges, biokompatibles und kostengünstiges synthetisches Material, welches in der Medizin bereits breit angewendet wird. Adhäsiva auf PEG-basis bestehen typischerweise aus chemisch funktionalisierten linearen oder verzweigten PEG-Molekülen. Diese modifizierten PEGs können je nach funktioneller Gruppe miteinander vernetzt werden. Diese Vernetzung kann zum einen chemisch mittels einfacher Vermischung zweier miteinander reagierender Komponenten oder aber auch fotoaktiviert bei Vorhandensein fotoreaktiver Gruppen stattfinden. Dabei entsteht ein Netzwerk aus PEG in Form eines adhäsiven Hydrogels ¹¹¹. Da die reaktiven Gruppen des PEGs auch mit der Oberfläche des Substrates kovalente Bindungen bilden können, kommt so eine Adhäsionskraft zustande. Elisseff et al. funktionalisierten zum Beispiel Chondroitinsulfat, ein im Gelenkknorpel prävalentes Polysaccharid, mit einer fotoreaktiven Methylacrylat-Gruppe und einer chemisch reaktiven Aldehyd-Gruppe ¹¹⁶. Dieses wurde auf einen Gelenkknorpeldefekt aufgetragen und die Aldehyd-Gruppen bildeten kovalente Bindungen mit dem Gelenkknorpel. Im nächsten Schritt wurde der Defekt mit einem

Einleitung

PEG-Diacrylat-Hydrogel aufgefüllt und mittels der fotoreaktiven Gruppen mit dem Chondroitinsulfat vernetzt. So entstand eine adhäsive Vernetzung zwischen PEG-Hydrogel und Gelenkknorpel, wobei das PEG in diesem Fall nicht primär als Adhäsivum diente. Es konnte eine signifikante Verbesserung der lateralen Knorpelintegration sowie der gesamten Regeneration des Gelenkknorpeldefekts *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden ¹¹⁶. Es ist also davon auszugehen, dass ein PEG-Hydrogel prinzipiell als Matrix für Gelenkknorpelregeneration geeignet ist.

Wallace et al. testeten ein in Europa unter dem Namen CoSeal™ (Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA) zugelassenes zweikomponentiges Adhäsivum ¹¹⁷. Primäres Anwendungsgebiet stellt dabei der dichte Verschluss von zuvor genähten Gefäßanastomosen in der Gefäßchirurgie dar. Bei den verwendeten Komponenten handelt es sich um zwei PEG-Polymere mit Penta-erythritol-Kern und jeweils vier PEG-Armen mit einem Molekulargewicht von insgesamt 10000 kDa. Das terminale Ende der vier PEG-Arme der einen Komponente besteht dabei aus einem Glutaryl-Succinimidyl-Ester (4SG-PEG) und der anderen Komponente aus einem Thiol (4T-PEG), wie in Abb. 2 dargestellt. Die als Pulver vorliegenden Komponenten wurden 2 bis 4 min vor Verwendung in dazugehörigen Puffern gelöst und mittels eines dualen Applikators auf den entsprechenden Versuchsaufbau durchmischt und appliziert. Die Thiol-Gruppen der einen Komponente reagieren dabei mit den Carbonyl-Gruppen des Succinimidyl-Esters der anderen Komponente. Es entsteht dabei eine kovalente Thioester-Bindung zwischen den PEG-Molekülen mit einem freien N-Hydroxy-Succinimid als Nebenprodukt. Aus einem Netzwerk multipler solcher kovalenten Bindungen entsteht in Summe das adhäsive PEG-Hydrogel (Abb. 2).

Einleitung

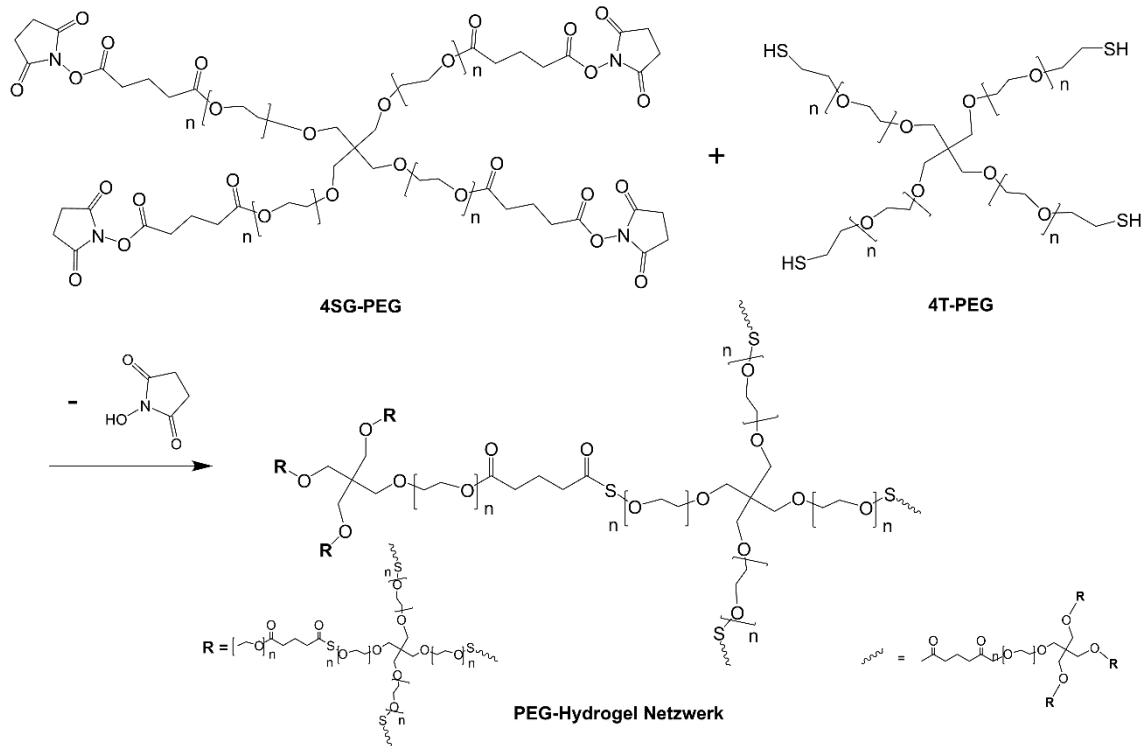


Abbildung 2: Darstellung der Struktur des vierarmigen Succinimidyl-Glutarat-Polyethylenglykols (4SG-PEG) und des vierarmigen Thiol-Polyethylenglykols (4T-PEG). Die Thiol-Gruppen des 4T-PEG reagieren mit den Carbonyl-Gruppen des 4SG-PEG. Es entsteht eine kovalente Thioester-Bindung zwischen den PEG-Molekülen mit einem freien N-Hydroxy-Succinimid als Nebenprodukt. Aus einem Netzwerk multipler solcher kovalenten Bindungen entsteht in Summe das adhäsive PEG-Hydrogel.

Interessant ist, dass Wallace et al. als Substratoberfläche zur Testung der Adhäsionskraft des Adhäsivums eine Kollagenmembran verwendeten und eine sehr gute Adhäsion beschrieben. Aufgrund des hohen Kollagenanteils im Gelenkknorpel ist es naheliegend, dass auch dort eine hohe Adhäsionskraft zu erwarten ist. Neben den bereits genannten Anwendungen gibt es mit DuraSeal® (Integra LifeSciences, Plainsboro Township, NJ, USA) und Adherus® (Stryker, Kalamazoo, MI, USA) weitere zweikomponentige PEG-Adhäsiva, die in der Neurochirurgie zum Verschluss der Dura mater Anwendung finden ¹¹⁸.

Zwar beschrieben Elisseff et al., dass ein PEG-Hydrogel als Matrix zur lateralen Knorpelintegration geeignet ist, die adhäsive Komponente war in dem Fall jedoch das funktionalisierte Chondroitinsulfat. Wallace et al. beschrieben die gute Adhäsionskraft der funktionalisierten PEG-Succinimidyl-Ester-Komponente zusammen mit der PEG-Thiol-Komponente. Bislang ist keine experimentelle Untersuchung bezüglich der

Einleitung

Tauglichkeit dieser Komponenten als Adhäsivum zur lateralen Knorpelintegration im Rahmen von TE erfolgt. Die oben aufgeführten Ergebnisse suggerieren eine gute initiale Klebekraft mit langfristig guter Integration. In Abb. 3 ist die hypothetische Funktionsweise der adhäsiven Wirkung von CoSeal™ in Anwesenheit von Gelenkknorpel aufgeführt.

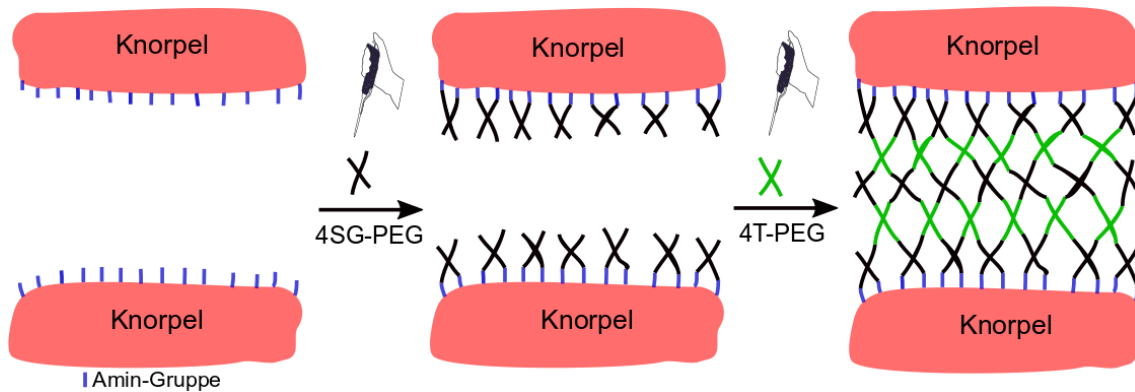


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der adhäsiven Wirkung von CoSeal™. Die 4SG-PEG-Komponente (schwarz) reagiert nach Applikation mit den Amin-Gruppen (blau) des Gelenkknorpels. Die 4T-PEG-Komponente (grün) führt zur Quervernetzung und Bildung des adhäsiven Hydrogels.

1.5.3 Hyaluronsäure (HA) als Kleberkomponente

HA bindet als einer der Hauptbestandteile der EZM von nativem Gelenkknorpel an andere Matrixmoleküle. Neben ihrer bereits erwähnten mechanischen Eigenschaften ist sie auch an der Regulation von Zellbindung und -motilität sowie Zelldifferenzierung und -proliferation beteiligt ^{119,120}. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HA-Hydrogele eine gute dreidimensionale Matrix für Chondrozyten-Zellkulturen bilden und EZM-Produktion fördern ¹¹⁹⁻¹²². In ihrer thiolierten Form (HA-SH) bietet HA eine reaktive Gruppe, wie in Abb. 4 strukturell dargestellt. Bian et al. untersuchten ein selbstvernetzendes Hydrogel aus reiner HA-SH und konnten die Biokompatibilität sowie Eignung im TE bestätigen ¹²².

Einleitung

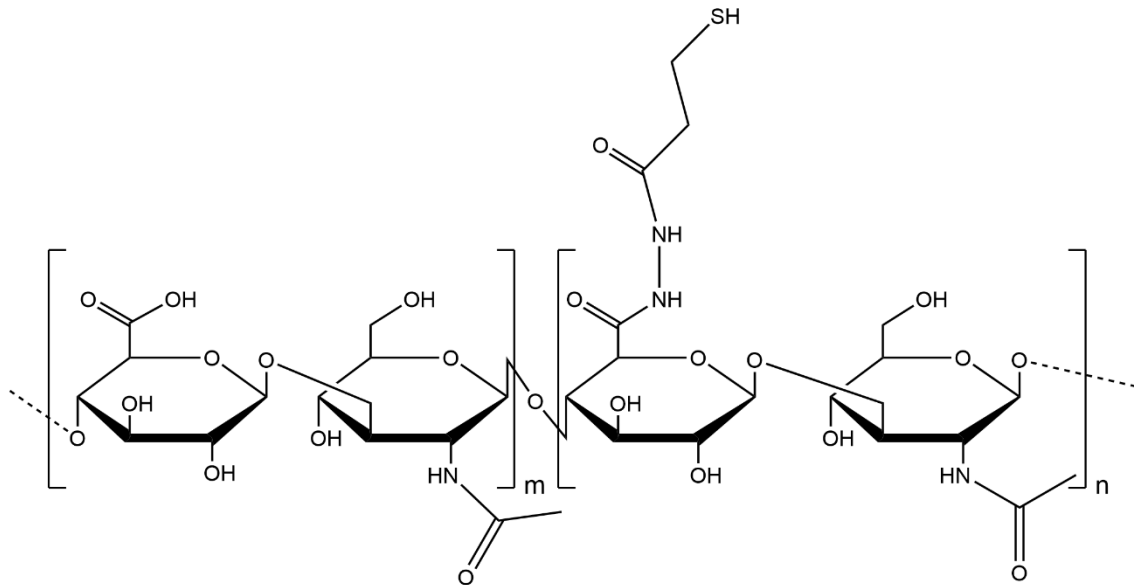


Abbildung 4: Darstellung der Struktur einer mit Thiol-Gruppe funktionalisierten Hyaluronsäure (HA-SH). Als Substitut zur 4T-PEG-Komponente kann zusammen mit der 4SG-PEG-Komponente eine kovalente Thioester-Bindung entstehen und resultierend ein PEG/HA-SH Netzwerk.

Nachteil eines reinen PEG-Adhäsivums ist eben das Fehlen dieser biologischen Eigenschaften, aufgrund seiner synthetischen Natur. Die Inkorporierung einer biologischen Komponente in das Adhäsivum könnte somit die Knorpelintegration fördern. Da HA-SH, genau wie die 4T-PEG-Komponente, mittels Thioester mit der 4SG-Komponente reagieren kann, ist eine solche Substitution denkbar. Die hypothetische Funktionsweise ist in Abb. 5 dargestellt.

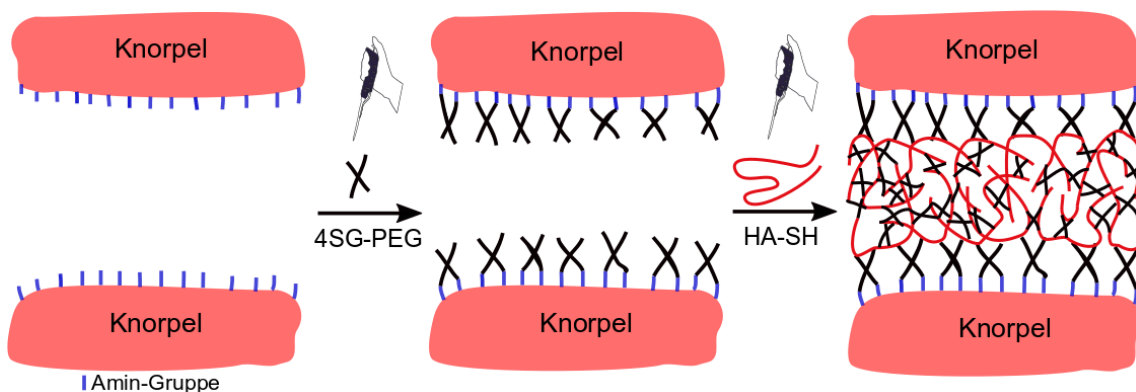


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der adhäsiven Wirkung des adhäsiven Hydrogels nach Substitution der 4T-PEG-Komponente mit thiofunktionalisierter Hyaluronsäure (HA-SH, rot).

1.6 Biomechanische Modelle

Zur Evaluation der adhäsiven Eigenschaften eines Materials und der Untersuchung der lateralen Knorpelintegration wird ein passender Versuchsaufbau benötigt. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Versuchsmodelle sowohl in vivo als auch in vitro mit Knorpelzellen und -gewebe unterschiedlicher Herkunft durchgeführt. Endpunkt einer solchen Untersuchung ist dabei zum einen die makroskopische Inspektion sowie die mikroskopische histologische Untersuchung und zum anderen die biomechanische Messung der Adhäsionskraft.

Die Kraftwirkung auf ein Gelenk ist komplex und umfasst vor allem Scher-, Druck-, und Zugkräfte. Zwar können diese Kraftwirkungen in vitro durch ein Modell nicht vollends die physiologischen Gegebenheiten imitieren, sie ermöglichen aber reproduzierbare objektivierbare Ergebnisse. In vivo wird die Gelenkknorpelregeneration unter anderem durch Entzündungsreaktionen, unterschiedliche artikulare Belastung und die heterogenen Zelltypen eines Gelenks beeinflusst und erschweren somit eine objektive vergleichende Untersuchung ohne systemische Einflussfaktoren. Auch die diffizile praktische Umsetzbarkeit von in vivo Versuchen ist ein Grund dafür, weshalb vor allem in vitro Modelle zum Einsatz kommen.

Biomechanische Modelle zur Messung der Adhäsionskraft kommen nicht nur im Rahmen von Gelenkknorpel zur Anwendung, sondern auch bei anderen zu klebenden Geweben, wie beispielsweise bei Nervengewebe, Gefäßen oder Herzmuskelgewebe^{123,124}. Jedes der unterschiedlichen zur Anwendung kommenden Modelle umfasst ein Konstrukt und einen dazugehörigen biomechanischen Versuchsaufbau. Das Konstrukt besteht aus dem zu klebenden Gewebe und dem Adhäsivum. Die Konfiguration variiert je nach Modell und ist auf den Versuchsaufbau angepasst. Dabei eignen sich einige Konstrukte zur in vitro Kultivierung in Nährmedium, um eine biomechanische Messung auch im Intervall zu ermöglichen und somit die langfristige Adhäsion, bei Gelenkknorpel die laterale Integration, beurteilen zu können. Allerdings finden auch Modelle Anwendung, welche vor allem zur Beurteilung der Sofortadhäsion geeignet sind. Im Folgenden sind die drei für Gelenkknorpel zur Anwendung kommenden Modelle aufgeführt.

1.6.1 Single-Lap-Modell

Zur Beurteilung der Scherkraft gibt es eine Reihe unterschiedlicher Modelle mit eigenem Versuchsaufbau, bei denen die Scherkräfte in variierender Form geprüft werden können¹²⁵⁻¹²⁷. Zur Prüfung speziell von Gelenkknorpeladhäsiva wurde das *Single-Lap-Modell*

Einleitung

mit dem *Single-Lap-Shear-Test* etabliert ¹²⁸. Das Konstrukt besteht in diesem Modell aus zwei Gelenkknorpelblöcken, welche an einem sich überlappendem Areal miteinander verklebt werden. Die Testung erfolgt, wie zuvor erwähnt, mittels Zugbewegung der Blöcke in entgegengesetzter Richtung und parallel zur geklebten Fläche. Anwendung findet das Single-Lap-Modell vor allem zur Testung der Initialadhäsion und den damit verbundenen Fragestellungen ^{129,130}. Der Single-Lap-Shear-Test stellt hohe Anforderungen an einen akribisch technisch korrekten Versuchsaufbau, da es sonst zu ungenauen Messergebnissen kommen kann. Zudem lässt der Fakt, dass die verklebten Knorpelareale nicht den in vivo aneinandergrenzenden Kollagen- und EZM-Strukturen entsprechen, einen weiteren Kritikpunkt in der Beurteilung der Langzeitintegration zu, da die verwendeten Knorpelblöcke nicht in lateraler, sondern in Ausrichtung parallel zur Gelenkoberfläche verklebt werden. Um die in vivo herrschenden Verhältnisse in Bezug auf die Problematik der lateralen Integration besser zu imitieren und qualitativ hochwertigere Messergebnisse zu erzielen, wurden andere Modelle entwickelt ¹³¹.

1.6.2 Disc-Ring-Modell

Beim *Disc-Ring-Modell* besteht das Konstrukt aus einer Gelenkknorpelscheibe mit definierter Höhe und Durchmesser, aus der mittig ein kleinerer Zylinder herausgestanzt wird, so dass ein größerer Ring mit passendem Mittelstück vorliegt. Mittels des zu testenden Adhäsivums kann nun das Mittelstück wieder in den Ring geklebt werden. Im Gegensatz zum Single-Lap-Modell wird somit eine vertikal zur Gelenkoberfläche ausgerichtete Läsion simuliert, so wie sie den in vivo herrschenden Verhältnissen am ehesten entspricht. Das entstandene Konstrukt eignet sich zur weiteren in vitro Kultivierung, zur histologischen Untersuchung und zur biomechanischen Adhäsionskraft-Messung. Letztere wird auch als *Push-Out-Test* bezeichnet. Dabei wird das geklebte Mittelstück mit einem passenden Messstempel aus dem Ring gedrückt und die dafür benötigte Kraft gemessen. Das Disc-Ring-Modell hat sich als eines der geeignetsten Modelle zur Untersuchung von Gelenkknorpel etabliert und wurde bereits für die verschiedensten Fragestellungen im Bereich der lateralen Knorpelintegration angewendet ¹³²⁻¹³⁴.

1.6.3 Sandwich-Modell

Für das *Sandwich-Modell* werden zwei gleiche zylindrische Knorpelscheiben mit definiertem Durchmesser zusammengeklebt. Zur biomechanischen Messung der Adhäsionskraft, mittels sogenanntem *Tensile-Test*, werden die Knorpelscheiben bei einer definierten Geschwindigkeit in entgegengesetzte Richtung gezogen ^{127,135,136}. Im

Einleitung

Gegensatz zum Push-Out-Test, welcher eine Mischung aus Druck- und Scherkräften misst, werden Zugkräfte ermittelt. Auch die Konstrukte des Sandwich-Modells eignen sich zur in vitro Kultivierung und zur histologischen Untersuchung. Mit Hilfe des Sandwich-Modells wurden bereits Untersuchungen über Chondrozytenmigration und Matrixproduktion in den Klebespalt durchgeführt. Es wurde dafür als besonders geeignet beschrieben ¹³⁷.

1.7 Ziele

Gelenkknorpel ist ein äußerst komplexes Gewebe, welches nach Schädigung nicht in der Lage ist, sich suffizient selbst zu heilen. Es gibt im Bereich des TE viele unterschiedliche Ansätze, um irreparabel geschädigte Knorpeldefekte zu ersetzen. Eine gute laterale Integration ist für jede Form von Implantat unabdingbar. Um diese gewährleisten zu können, wird ein entsprechender Klebstoff benötigt, welcher nicht nur ausreichende adhäsive Eigenschaften aufweist, sondern dem Gelenkknorpel langfristig auch einen Boden zur EZM-Produktion und gegebenenfalls Chondrozytenmigration für eine suffiziente Langzeitintegration bietet. Für die Entwicklung eines solchen Adhäsivums werden Versuchsmodelle benötigt, die reproduzierbare Aussagen zulassen. Diese Arbeit soll mit drei wesentlichen Untersuchungen einen Beitrag dazu leisten.

1.7.1 Untersuchung von PEG-basierten Adhäsiva zur Knorpelintegration

Diese Arbeit soll die Eignung PEG-basierter Adhäsiva für die laterale Gelenkknorpelintegration anhand des Disc-Ring-Modells ermitteln. Dazu soll zunächst die Zusammensetzung entsprechend der CoSeal™-Komponenten untersucht werden (siehe 1.5.2). Im nächsten Schritt sollen die Komponenten den speziellen Bedürfnissen des Gelenkknorpels angepasst werden und unterschiedliche Kompositionen, die aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen abgeleitet werden, untersucht werden. Neben der initialen soll auch die nach 21 d in vitro Kultur bestehende Adhäsionskraft der Kleber-Knorpel-Konstrukte beurteilt werden. 21 d kultivierte Konstrukte sollen des Weiteren mit Hilfe von Spezialfärbungen histologisch untersucht werden, um die laterale Langzeitintegration beurteilen zu können. Schließlich soll eine Zytotoxizität der unterschiedlichen Kleberkompositionen ausgeschlossen werden.

1.7.2 Untersuchung der prointegrativen Wirkung von HA

Bei der Anpassung der PEG-basierten Adhäsiva soll HA in thiolierter Form (HA-SH) als Komponente integriert werden (siehe 1.5.3). Die Eignung von HA-SH als zweite Kleberkomponente soll in dieser Arbeit ermittelt werden und dessen Auswirkung auf eine bessere laterale Integration. Hypothese ist, dass HA prointegrativ wirkt und somit die laterale Knorpelintegration als Kleberkomponente in Form von HA-SH verbessert.

1.7.3 Etablierung des Sandwich-Modells

Da das Sandwich-Modell potenziell eine sehr gute Alternative beziehungsweise Ergänzung zum Disc-Ring-Modell bietet, soll dieses im Rahmen dieser Arbeit etabliert

Einleitung

werden (siehe 1.6.3). Zunächst soll dafür im Sinne des Tensile-Tests ein passender Versuchsaufbau konstruiert und entwickelt werden. Anschließend soll ein geeignetes Prüfprotokoll festgelegt werden. Zuletzt soll der Tensile-Test in der Qualität seiner Reproduzierbarkeit mit dem Push-Out-Test verglichen und schließlich die Vor- und Nachteile des Sandwich-Modells im Vergleich zum Disc-Ring-Modell diskutiert werden

2 Material

2.1 Instrumente

Tabelle 4: Überblick der verwendeten Instrumente

Instrument	Hersteller	Land
Accu-jet® pro	Brand	Wertheim, Deutschland
Analysenwaage	Ohaus	Zürich, Schweiz
Kraftaufnehmer Z6FD1	Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH	Darmstadt, Deutschland
Laminarflow Box Typ-HS18	Heraeus	Hanau, Deutschland
Magnetrührer	VWR	Darmstadt, Deutschland
Mikroskop BX51/DP71 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop IX51/XC30 Kamera	Olympus	Hamburg, Deutschland
Paraffinstreckbad Typ 24900	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
pH-Meter HI2210	Hanna Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Pipette multistep	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipetten Research® Plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Schlittenmikrotom SM2000R	Leica	Nussloch, Deutschland
Universalprüfmaschine BZ020/TH2A	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
Vorrichtungen für biomechanische Messungen, maßgefertigt	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Vorrichtungen zur Herstellung der Knorpelkonstrukte, maßgefertigt	Feinmechanik Sauer	Würzburg, Deutschland
Vortex IKA® MS3 basic	IKA®	Staufen, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

Material

Zentrifuge SIGMA 1-14	SIGMA Laborzentrifugen GmbH	Osterode, Deutschland
-----------------------	-----------------------------------	-----------------------

2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Überblick der verwendeten allgemeinen Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Land
Adhäsions-Objektträger, Superfrost™ Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Deckgläser 24 mm x 60 mm	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Einkantige Rasierklingen	GEM/Personna	Verona, WI, USA
Einweg-Pinzetten	ratiomed megro GmbH	Wesel, Deutschland
Filterpapier	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Gewebemarkierungsfarben Shandon™	Thermo Scientific™	Waltham, MA, USA
Leukosilk® Fixierpflaster	BSN medical GmbH	Hamburg, Deutschland
Mikrotom-Klingen N35	Feather	Osaka, Japan
Multiwellplatten 24- & 48-Well	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
PAP Pen Liquid Blocker (Fettstift)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Parafilm® M	Pechiney	Chicago, IL, USA
pH-Indikator-Papier	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt	Hamburg, Deutschland
Polypropylen Röhrchen 15 ml/50 ml (Falcon Tube)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäß SafeSeal 1,5 ml/2,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Gelenkknorpel aus Schweineknieen	Metzgerei Hollerbach	Rimpar, Deutschland
Sekundenkleber 18041	Stanger	Espelkamp, Deutschland

Material

Serologische Pipetten	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Skalpelle diverser Größen	Feather	Osaka, Japan
Stiefel Biopsy Punch Hautstanze 3 mm/6 mm	GlaxoSmithKline	München, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 6: Überblick der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Land
2-Propanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
4-Dimethylamino-Benzaldehyd (DAB)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dako REAL™ Antikörperlösung	Dako	Hamburg, Deutschland
DAPI Eindeckmedium ImmunoSelect®	Dako	Hamburg, Deutschland
Destilliertes Wasser (DNase/RNase frei)	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
EnVision G 2 Doublestain System	Dako	Hamburg, Deutschland
Glutaraldehyd 50 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin nach Mayer	Bio Optica	Milan, Italien
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Thermo Scientific™	Waltham, MA, USA

Material

Penicillin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Dulbecco A Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) Tabletten	Thermo Scientific™	Waltham, MA, USA
Terralin Liquid® Desinfektionsmittel	Schülke	Norderstedt, Deutschland
Tris Puffer	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tween® 20 (Polysorbate)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Zellkultur-Nährmedium (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, DMEM)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

2.4 Antikörper

Tabelle 7: Überblick der verwendeten Antikörper

Antikörper	Typ/Herkunft	Applikation/Verdünnung	Hersteller
Anti-Aggrecan	Monoclonal IgG/mouse	IHC/1:300	Thermo Scientific (Clone 969D4D11)
Anti-Collagen II	Monoclonal IgG/mouse	IHC/1:100	Acris (Clone II-4C11)
HRP Anti-mouse	Polyclonal IgG/rabbit	IHC/1:100	Dako (P0161)

2.5 Kleberkomponenten

Aufgrund ihrer Oxidationsempfindlichkeit wurden alle Kleberkomponenten unter Argon bei -20 °C und entsprechend den Herstellerangaben gelagert.

Tabelle 8: Überblick der verwendeten Kleberkomponenten

Komponente	Spezifikationen
4SG-PEG	Kommerziell erhältliches 4-Arm Polyethylenglykol-Succinimidyl-Glutarat (4SG-PEG; MW=10.000 Da; JenKem Technology Co., Peking, China).

Material

4C-PEG	Kommerziell erhältliches 4-Arm Polyethylenglykol-Succinimidyl-Carbonat (4C-PEG; MW=10.000 Da; JenKem Technology Co., Peking, China).
4T-PEG	Kommerziell erhältliches 4-Arm Polyethylenglykol-Thiol (4T-PEG; MW=10.000 Da; JenKem Technology Co., Peking, China).
4A-PEG	Kommerziell erhältliches 4-Arm Polyethylenglykol-Amin (4A-PEG; MW=10.000 Da; JenKem Technology Co., Peking, China).
HA-SH	Thiolierte Hyaluronsäure wurde vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin mit einer MW=30.287 Da und DS=43% thioifunktionalisiert synthetisiert (HA-SH, AK Groll, Würzburg, Deutschland)

2.6 Chondrozyten-Nährmedium

Zusammensetzung: DMEM 4.5 g/l supplementiert mit 10 % fetalem bovines Serum, 10 mM HEPES, 0.1 mM NEAA, 0.4 µg/ml L-Prolin, 50 mg/l L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin.

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Überblick der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
IHC-Block-Lösung	1.5 % BSA gelöst in PBS.
DAB-Lösung	1.5 g DAB, 6 ml 2-Propanol, 2.6ml 60% Perchlorsäure.
MTT-Lösung	5 mg/ml wurden in PBS (pH=7,4) aufgelöst und durch einen 0,2 µm Filter filtriert.
PBS	10 PBS (Dulbecco A) Tabletten wurden in 1 l destilliertem Wasser aufgelöst.
TBS-T	0,1 % Tween® 20 in Tris-Puffer
S-Puffer	0,5 mM Natriumphosphat, pH 6,0.
T-Puffer	120 mM Natriumphosphat, 180 mM Natriumcarbonat, pH 9,6.

2.8 Software

Tabelle 10: Überblick der verwendeten Software

Software	Hersteller	Land
CellSense™ 1.16	Olympus	Hamburg, Deutschland
Microsoft Office 2018	Microsoft	Redmond, WA, USA
Prüfsoftware TestXpertII®	Zwick-Roell	Ulm, Deutschland
SPSS Statistics 25	IBM	Armonk, NY, USA
Inkscape	Inkscape Community	International
ChemDraw 20	PerkinElmer	Waltham, MA, USA

3 Methoden

3.1 Isolierung des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel für die Versuche wurde aus den Kniegelenken von Spanferkeln isoliert. Diese wurden von einem regionalen Schlachthof (Metzgerei Hollerbach, Rimpf, Deutschland) bezogen und stammten von 8 bis 12 Wochen alten Ferkeln, die unter der gesetzlich vorgeschriebenen Kontrolle standen. Ober- und Unterschenkelknochen wurden etwa 20 cm ober- beziehungsweise unterhalb des Kniegelenks durch die Metzgerei unter Schonung der Gelenkkapsel durchtrennt. Die Isolierung des Gelenkknorpels erfolgte am Tag der Schlachtung innerhalb weniger Stunden. Der Transport der Knie vom Schlachthof ins Labor fand unter Kühlung statt. Zunächst wurden alle Kniegelenke auf ihre Unversehrtheit überprüft und beschädigte Exemplare aussortiert (Abb. 6: links).

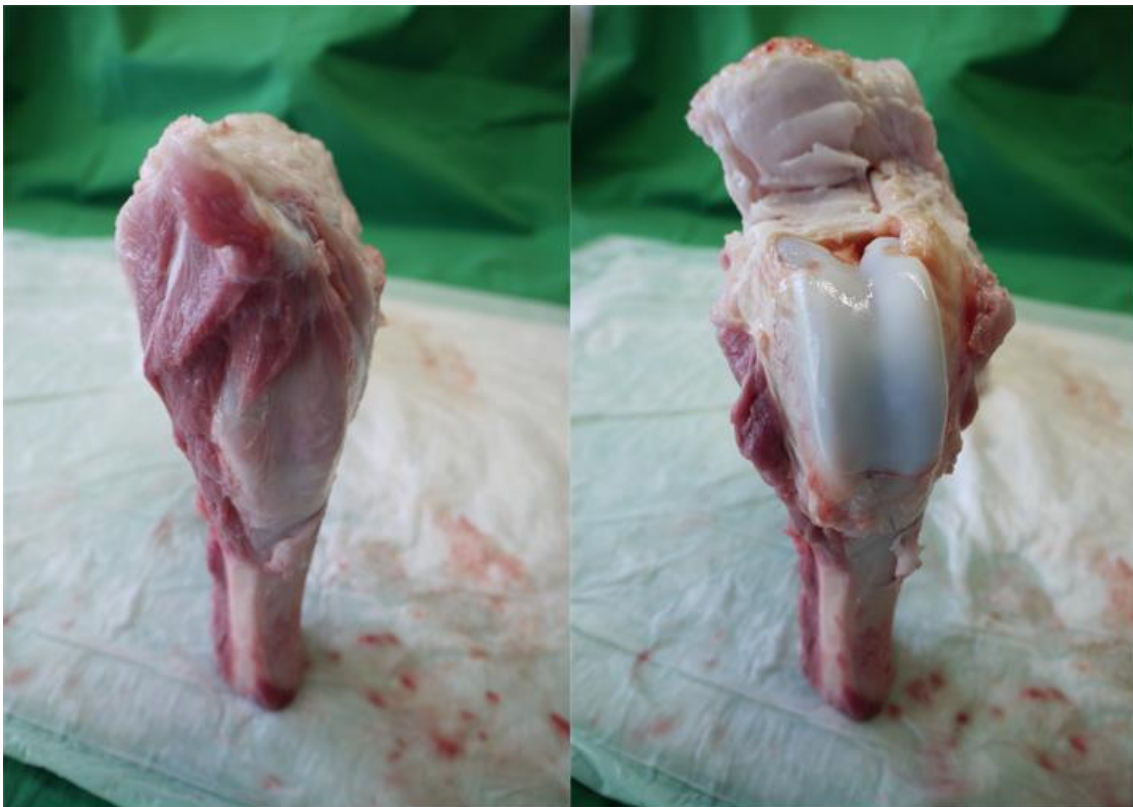


Abbildung 6: Fotografische Darstellung eines Schweinekniees. Links: Vor Eröffnung der Gelenkkapsel. Rechts: Nach Eröffnung der der Gelenkkapsel mittels Durchtrennung des Ligamentum patellae und U-förmiger Inzision. Die Patella ist nach oben geklappt mit Blick auf den Gelenkknorpel der tibialen Gelenkfläche.

Methoden

Schließlich wurde die Gelenkkapsel mit einem Skalpell durch einen vertikalen Schnitt lateral der Patella eröffnet und die Synovia abgelassen. Der Schnitt wurde schließlich U-förmig erweitert, dabei das Ligamentum patellae durchtrennt und somit die Gelenkfläche schonend freigelegt (Abb. 6: rechts). Letztlich wurde die tibiale Gelenkfläche mit Skalpell rechteckig inzidiert und mit einem stumpfen Spatel ein rechteckiges Knorpelpräparat durch Hebeln vorsichtig herausgetrennt (Abb. 7). Bis zur Weiterverarbeitung wurden die isolierten Gelenkknorpelstücke in PBS getränkt in einem Falcon Tube aufbewahrt.



Abbildung 7: Fotografische Darstellung eines frisch aus der tibialen Gelenkfläche isolierten porcinen Gelenkknorpelstückes. Bis zur Weiterverarbeitung wurde dieser in einem Falcon Tube in PBS getränkt aufbewahrt.

3.2 Herstellung der Knorpelkonstrukte

Aus den isolierten Knorpelstücken wurden schließlich die Konstrukte für das Disc-Ring-Modell und das Sandwich-Modell hergestellt. Dazu wurden aus den Knorpelrechtecken mit Hilfe einer Biopsiestanze Zylinder mit einem Durchmesser von 6 mm herausgestanzt (Abb. 8: links) Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Zylinder eine ausreichende Höhe aufweisen, um im nächsten Schritt die superfizielle, gelenknahe und tiefe, knochennahe Zone vollständig abschneiden zu können. Dazu wurde eine speziell angefertigte Vorrichtung verwendet (Feinmechanik Sauer, Würzburg). Diese ermöglicht es, die Höhe des abzutrennenden Teils, je nach Gesamthöhe des Knorpelzylinders zu variieren (Abb. 8: mittig). Damit wurde sichergestellt, dass beide Zonen vollständig abgeschnitten wurden. Der Mittelteil der Vorrichtung maß stets genau 1 mm. So erhielt man schließlich einen Zylinder beziehungsweise eine Disc mit exakt 1 mm Höhe und 6

Methoden

mm Durchmesser. Das Knorpelstück wurde dazu in die abgebildete Schiene gelegt und mit Hilfe eines passenden Stiftes gegen das Endstück gedrückt und so fixiert (Abb. 8: mittig, oben). Mittels zweier Klingen erfolgte dann die obere und untere Abtrennung (Abb 8: mittig, unten). Für das Sandwich-Modell konnten nun zwei dieser Discs verwendet werden, während für das Disc-Ring-Modell weitere Schritte nötig waren.



Abbildung 8: Darstellung der Gerätschaften zur Herstellung der Knorpelkonstrukte. Links: Isolierter Gelenkknorpel, zwei herausgestanzte Knorpelzylinder und die Biopsiestanze. Mitte: Vorrichtung zum Kürzen des Knorpelzylinders auf 1 mm Höhe. Rechts: Vorrichtung zum Herausstanzen des mittigen Knorpelkerns beim Disc-Ring-Modell. Daneben ein mit Gewebefarbstoff markiertes Konstrukt zur späteren richtigen Positionierung.

Zunächst musste dafür ein weiterer Zylinder mit einem Durchmesser von 3 mm genau mittig aus der bereits hergestellten Scheibe herausgestanzt werden. Dies wurde mit Hilfe einer weiteren Biopsiestanze durchgeführt, welche in eine Ziel- und Haltevorrichtung eingebracht wurde (Abb. 8: rechts). Die Knorpelscheibe wurde ebenfalls in der Vorrichtung fixiert, um eine genau mittige, reproduzierbare Stanzung zu ermöglichen. Zuvor erfolgte eine Markierung der Knorpelscheibe mit einem Gewebemarkierungsfarbstoff (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), damit beim späteren Einkleben der inneren Scheibe in den äußeren Ring die genaue Ursprungsposition nachvollzogen werden konnte. In Abb. 9 ist die Herstellung der Knorpelkonstrukte jeweils für das Disc-Ring- und Sandwich-Modell schematisch dargestellt.

Methoden

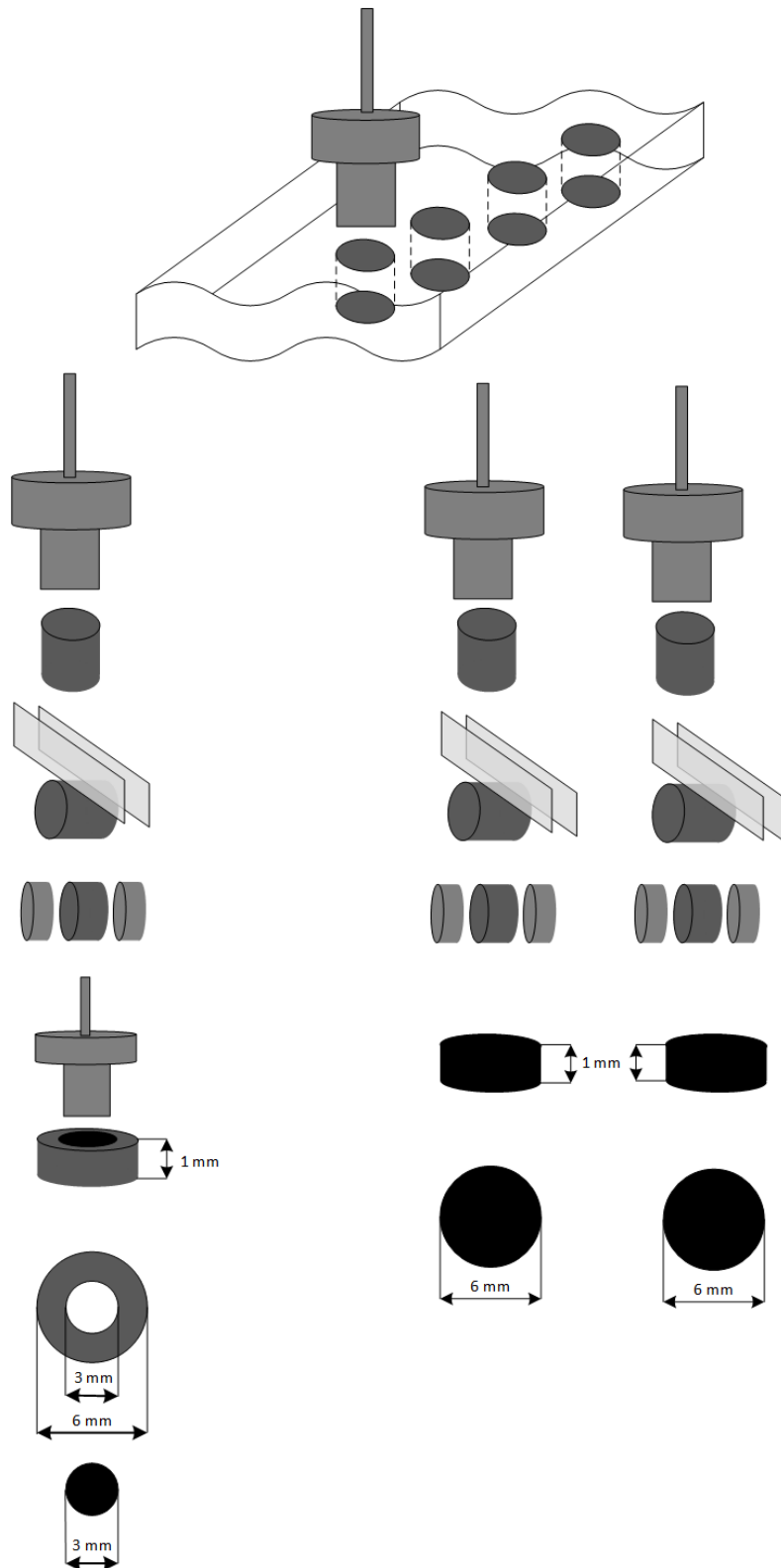


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung der Knorpelkonstrukte. Oben: Mit Hilfe einer Biopsiestanze wurden Zylinder mit 6 mm Durchmesser aus den zuvor isolierten Gelenkknorpelstücken gestanzt. Links: Die weiteren Schritte für das Disc-Ring-Modell. Rechts: Die weiteren Schritte für das Sandwich-Modell.

3.3 Kleben der Konstrukte

3.3.1 Vorbereitung der Kleberkomponenten

Alle Kleberkomponenten wurden erst kurz vor dem Kleben der Konstrukte vorbereitet. Dazu wurden die Komponenten wie in Tab. 11 aufgeführt in Lösung gegeben.

Tabelle 11: Überblick der Lösungen der Kleberkomponenten

Komponente	Lösung
4SG-PEG	20% w/v in S-Puffer
4C-PEG	20% w/v in S-Puffer
4A-PEG	20% w/v in T-Puffer
4T-PEG	20% w/v in T-Puffer
HA-SH	7,57% w/v in T-Puffer

Schließlich wurden beide Kleberkomponenten zum Kleben in entsprechender Dosierung 1:1 zusammengegeben, wodurch ein 1:1 Verhältnis der funktionellen Gruppen gegeben war.

3.3.2 Disc-Ring-Modell

Für das Disc-Ring-Modell wurden zunächst 3,5 µl der ersten Komponente (4SG-PEG oder 4C-PEG) auf die Innenseite des Ringes pipettiert. Nach circa 10 s Einwirkzeit wurden ebenfalls 3,5 µl der zweiten Komponente (4A-PEG, 4T-PEG oder HA-SH) dazu pipettiert und mit Hilfe einer Pinzette sofort die innere Disc in den mit Kleber ausgefüllten äußeren Ring gegeben. Beim Einsetzen wurde mit Hilfe der zuvor angebrachten Farbstoffmarkierung auf die korrekte Position der Scheibe im Ring geachtet. Schließlich wurde das geklebte Konstrukt bei Raumtemperatur auf in PBS getränkter Watte platziert und abgedeckt. Nach maximal 10 min bei Raumtemperatur wurden alle Konstrukte bei 37 °C für 30 min inkubiert.

3.3.3 Sandwich-Modell

Für das Sandwich-Modell wurden zwei der präparierten Scheiben aufeinander geklebt. Dazu wurden die beiden Komponenten nacheinander auf die obere Fläche einer Knorpelscheibe pipettiert und sofort die zweite Knorpelscheibe aufgesetzt. Anschließend wurden die geklebten Konstrukte analog zum Disc-Ring-Modell auf in PBS getränkter Watte platziert und abgedeckt. Nach maximal 10 min bei Raumtemperatur wurden alle Konstrukte bei 37 °C für 30 min inkubiert.

3.4 In vitro Kultivierung der Konstrukte

Um die Knorpelintegration beziehungsweise die Adhäsionskräfte der Konstrukte im Intervall beurteilen zu können, wurden sie in vitro kultiviert. Dazu wurden sie unter sterilen Bedingungen einzeln in 24-Well-Multiwellplatten platziert und zunächst zweimal mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen, um das Risiko einer Kontamination zu verringern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Konstrukte in erwärmtem Chondrozyten-Nährmedium getränkt. Dieses wurde alle 2 bis 3 d ebenfalls unter sterilen Bedingungen abgesaugt und gewechselt. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C.

3.5 Kraftmessung

Die Messung der Adhäsionskräfte wurde mit Hilfe einer Universalprüfmaschine (BZ020/TH2A, Zwick-Roell) und mit in der Arbeitsgruppe entwickelten Tests durchgeführt. Der Push-Out-Test des Disc-Ring-Modells wurde in der Arbeitsgruppe bereits entwickelt sowie etabliert und das entsprechende Protokoll wurde übernommen. Die Entwicklung des Tensile-Tests für das Sandwich-Modell ist Bestandteil dieser Arbeit und wird im Ergebnisteil detailliert beschrieben. Bei den dafür verwendeten Vorrichtungen handelt es sich um individuell von einem Feinmechaniker (Feinmechanik Sauer, Würzburg) angefertigte Unikate.

3.5.1 Universalprüfmaschine

Die zur Messung der Klebekraft verwendete Prüfmaschine BZ020/TH2A (Werksnummer: 176877) der Pro-Line des Herstellers Zwick-Roell besteht aus zwei Prüfräumen ober- und unterhalb einer mobilen Traverse, die durch einen Lastrahmen getragen wird. Beim Push-out und Tensile-Test kam die untere Prüfkammer zum Einsatz. Dazu wurde ein Kraftaufnehmer (Z6FD1, Firma HBM, Genauigkeitsklasse D1) an der Unterseite der Traverse befestigt und an diesen wiederum die sonderangefertigten Bestandteile der Versuchsmodelle montiert. Mit Hilfe der Software TestXpertII® und dem dazugehörigen Computerterminal konnten die Messwerte ermittelt, dargestellt sowie das entsprechende Messprotokoll programmiert werden.

3.5.2 Push-Out-Test

Der Push-Out-Test erfolgte nach einem festen, in der Arbeitsgruppe definierten Protokoll. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 10 oben schematisch und unten fotografisch dargestellt.

Zunächst wurde der Versuchsaufbau für die Messung vorbereitet. Dazu wurde der Kraftaufnehmer samt Haltevorrichtung an der mobile Traverse montiert. Der Stempel wurde schließlich mit der fixierten Probenhalterung ausgerichtet und dieser in ausgerichteter Position in der Haltevorrichtung befestigt. Somit war sichergestellt, dass der Stempel mittig auf das Konstrukt auftraf und akkurate Messergebnisse erzielt werden konnten.

Für die Messung wurde das Knorpelkonstrukt in die ausgerichtete Probenhalterung platziert und über die Prüfsoftware TestXpertII® die Messung gestartet. Der Prüfstempel bewegte sich dafür mit einer definierten Geschwindigkeit von 10 mm/min in Richtung des Konstrukts und löste die Disc aus dem Ring. Die dafür benötigte Maximalkraft F_{max} in Newton entsprach dem Scheitelwert der Messkurve und der benötigten Kraft zum Lösen der Adhäsion des Klebers. Zur Ermittlung der normierten Adhäsionskraft wurde die Integrationsfläche mit einberechnet und entsprechend folgender Formel berechnet:

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

Die Integrationsfläche entsprach dabei der Mantelfläche des Knorpelkerns. Um diskrete Abweichungen der Konstrukthöhe zu berücksichtigen, wurde diese bei jedem Konstrukt gemessen und die Integrationsfläche individuell folgendermaßen berechnet:

$$\text{Integrationsfläche [mm}^2] = 2 \times \pi \times r \times h$$

Die weitere statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel und SPSS Statistics durchgeführt.

Methoden

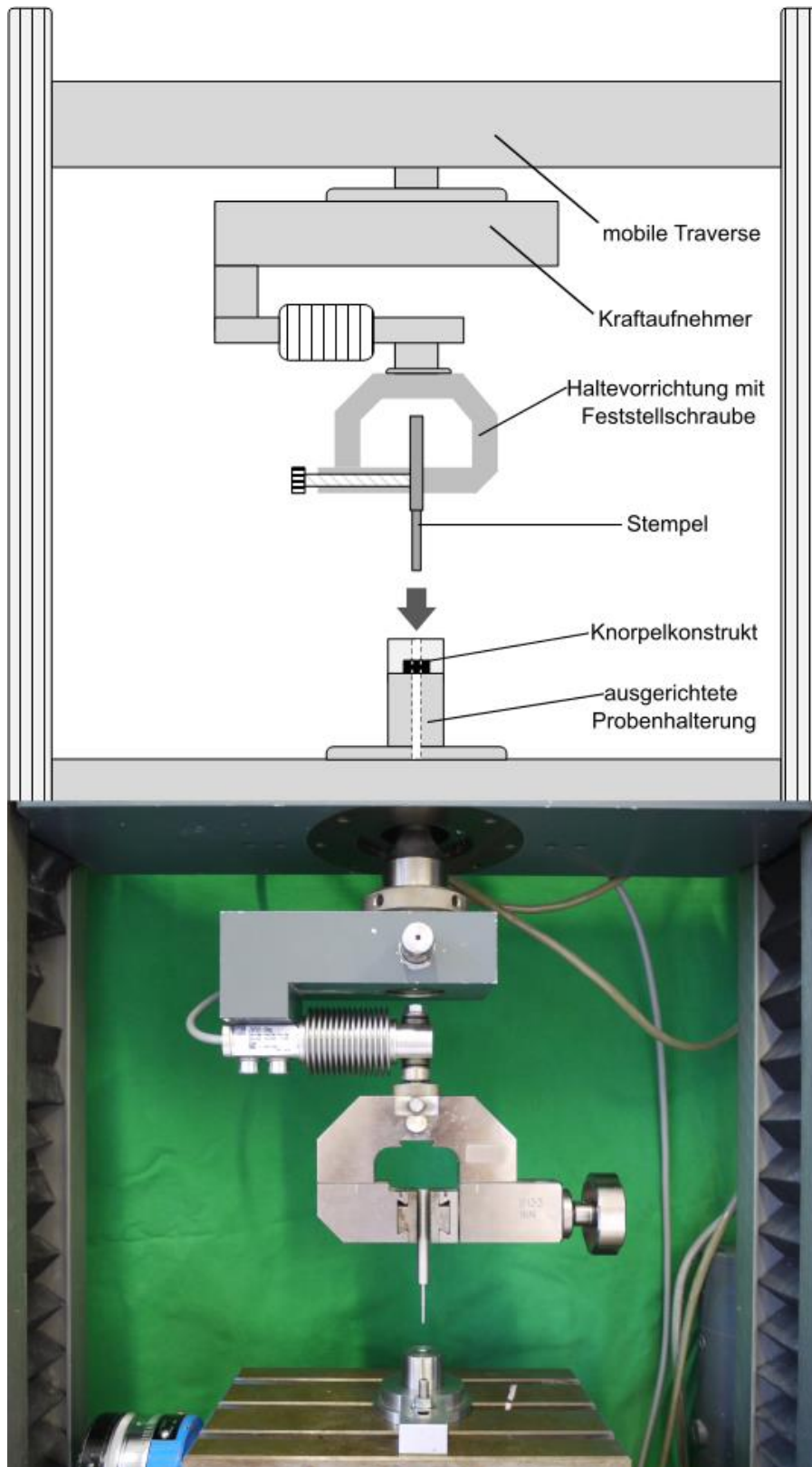


Abbildung 10: Darstellung des Versuchsaufbaus des Push-Out-Tests. Oben: Schematische, beschriftete Darstellung. Unten: Fotografische Darstellung.

3.5.3 Tensile-Test

Für den Tensile-Test wurde der Versuchsaufbau an einigen Punkten angepasst und ist in Abb. 11 dargestellt. Die Aufhängung des Kraftaufnehmers an der mobilen Traverse entsprach dabei dem Push-Out-Test. Das Knorpelkonstrukt wurde an zwei vertikal zueinander ausgerichteten Metallstäben fixiert. Die untere Knorpelscheibe wurde dabei an einem Metallstab, der in einem Schraubstock befestigt ist, an der unteren kleberfreien Knorpelfläche fixiert. Der obere Metallstab war an der oberen kleberfreien Fläche der oberen Knorpelscheibe fixiert und zunächst spannungsfrei direkt am Kraftaufnehmer aufgehängt.

Für die biomechanische Messung wurde die Traverse nach oben bewegt und über den Kraftaufnehmer die Maximalkraft F_{max} in Newton ermittelt. Die Berechnung der nominalen Adhäsionskraft erfolgte über die analoge Formel des Push-Out-Test:

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

Die Berechnung der Integrationsfläche wurde entsprechend angepasst und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Integrationsfläche [mm}^2] = \pi \times r^2$$

Die Entwicklung und Etablierung des Tensile-Tests ist Bestandteil dieser Arbeit und wird im Ergebnisteil detailliert beschrieben und anschließend diskutiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse des Tensile-Tests wurden mit Microsoft Excel und SPSS Statistics durchgeführt.

Methoden

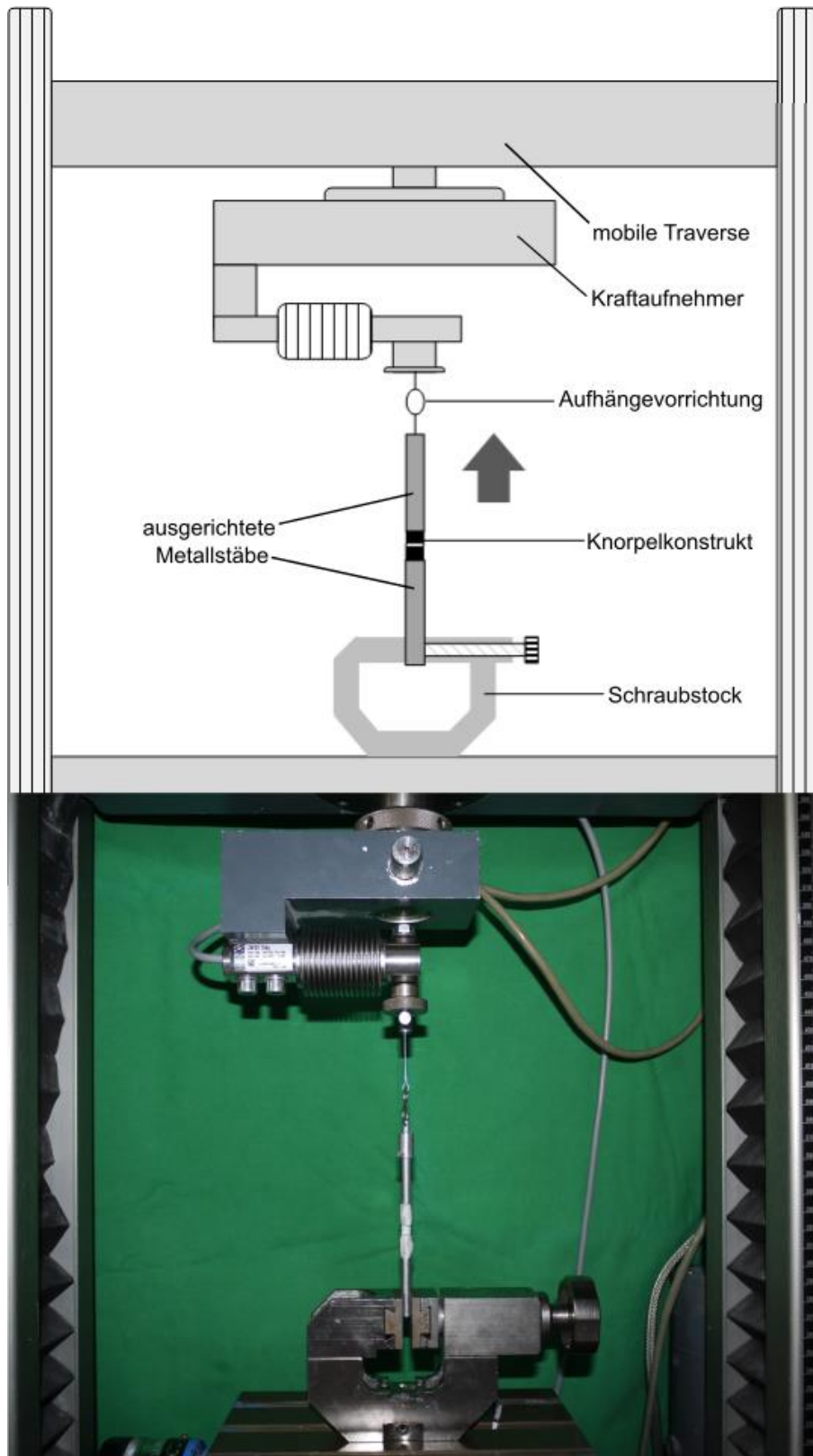


Abbildung 11: Darstellung des Versuchsaufbaus des Tensile-Tests. Oben: schematische, beschriftete Darstellung. Unten: fotografische Darstellung.

3.6 Zellvitalität: MTT-Assay

Um die metabolische Zellvitalität beziehungsweise die Toxizität der unterschiedlichen Kleberzusammensetzungen zu beurteilen, wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) für den MTT-Assay verwendet. Dieses imponiert in Lösung als gelbliche Farbe, welche durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen in vitalen Chondrozyten den Gelenkknorpel durch daraus entstehende Kristalle dunkel färbt (Abb. 12: unten). Demensprechend bleibt bei avitalem Gelenkknorpel aufgrund fehlender metabolischer Aktivität eine Färbung aus (Abb. 12: oben).

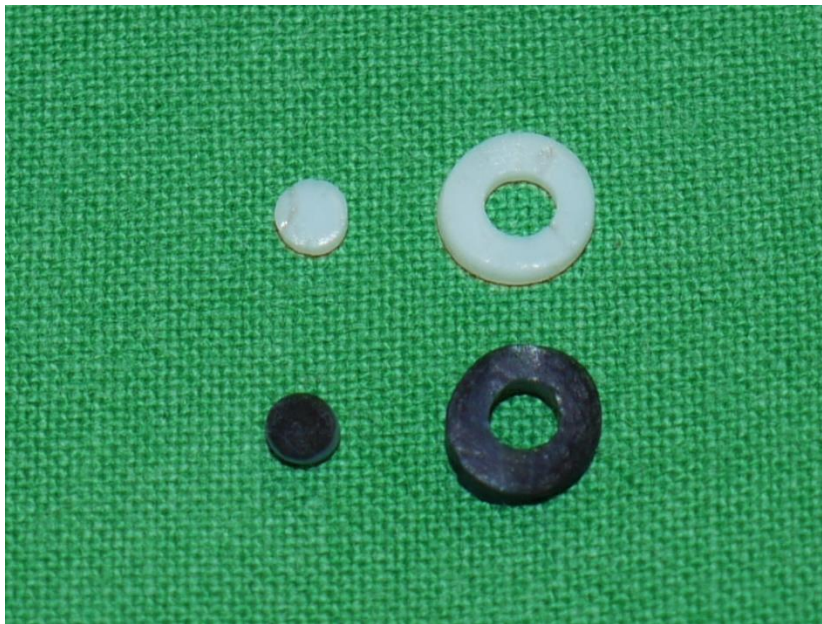


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung des MTT-Assay anhand von Konstrukten aus dem Disc-Ring-Modell. Oben: Bei avitalem Gelenkknorpel bleibt eine Dunkelfärbung aus. Unten: Vitaler Gelenkknorpel färbt sich dunkel.

Die Gelenkknorpelkonstrukte wurden für 24 h in Chondrozyten-Nährmedium inkubiert und schließlich dem Assay unterzogen, um initiale toxische Wirkungen zu identifizieren. Des Weiteren wurden Proben nach 21 d in vitro Kultivierung getestet. Zuvor wurde das Chondrozyten-Nährmedium jeweils abgesaugt und die Knorpelkonstrukte mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Konstrukte in der MTT-Lösung versenkt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Farbreaktion wurde makroskopisch beurteilt und dokumentiert.

3.7 Histologie

Um die Integrationseigenschaften der unterschiedlichen Kleberkompositionen zu beurteilen, wurden histologische Paraffinschnitte der Konstrukte angefertigt, mittels immunhistochemischer DAB-Färbung Kollagen II und Aggrecan angefärbt und schließlich lichtmikroskopisch beurteilt. Proben für die Histologie wurden zufällig und repräsentativ aus den entsprechenden Versuchsreihen ausgewählt.

3.7.1 Paraffinschnitte

Die histologischen Proben wurden über Nacht in 3.7 % Formalin in PBS fixiert. Anschließend wurden sie zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann in Paraffin eingebettet. Aus den eingebetteten Proben wurden mittels Mikrotom 2 µm Scheiben geschnitten und auf Superfrost™ Ultra Plus Objektträgern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gesammelt.

3.7.2 Immunhistochemische Färbungen

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe, um das in den Schnitten vorhandene Paraffin herauszulösen. Dazu wurde folgendes Protokoll angewendet:

- 3 x 3 min Xylol
- 3 x 3 min 100 % Ethanol
- 2 x 3 min 90 % Ethanol
- 2 x 3 min 80 % Ethanol
- 1 x 3 min 70 % Ethanol
- 1 x 3 min 50 % Ethanol
- 2 x 3 min vollentsalztes Wasser

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das EnVision G|2 Doublestain System (Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet und mit kleinen Anpassungen nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Diaminobenzidin (DAB)-Färbung. Die Schnitte wurden zunächst auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrahmt und schließlich für 10 min mit Proteinase K angedaut und schließlich mit IHC-Block-Lösung für 20 min geblockt. Als primäre Antikörper wurden die monoklonalen IgG Antikörper Anti-Collagen II (IHC 1:100, Acris, Clone II-4C11) und Anti-Aggrecan (IHC 1:300, Thermo Scientific, Clone 969D4D11) verwendet, welche in einer feuchten Kammer für 2 h inkubiert wurden. Schließlich wurden die Proben mit TBS-T für 3 x 3 min gewaschen, wonach die Färbung mit dem sekundären Antikörper (HRP Anti-mouse,

Methoden

polyclonal IgG/rabbit IHC/1:100, Dako, P0161) in der feuchten Kammer für 1 h erfolgte. Nach erneutem analogen Waschen mit TBS-T wurde die DAB-Lösung entsprechend des Kits zubereitet und die Proben für 5 min inkubiert. Nach dem Waschen mit Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 3 min. Im Anschluss an die Färbungen und erneutem Spülen mit Wasser wurden mittels DAPI Eindeckmedium ImmunoSelect® die Deckgläser auf die Objektträger mit den darauf befindlichen histologischen Proben aufgebracht.

Die histologischen Schnitte wurden schließlich lichtmikroskopisch mit einem Olympus BX51 Mikroskop untersucht. Dieses war an eine DP71 Digitalkamera (Olympus Hamburg, Deutschland) angeschlossen, womit die Digitalisierung erfolgte. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der dazugehörigen Software Olympus CellSens Dimension bearbeitet.

3.8 Herstellung von Klebergelen

Zur Beurteilung des Verhaltens der Kleberkompositionen in flüssiger Umgebung wurden Klebergele angefertigt. Dazu wurden jeweils 12,5 µl, also ein 1:1 Verhältnis der entsprechenden Komponenten, in eine zylindrische 25 µl Teflonform pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 10 s wurden die entstandenen Gele in eine 24-Well-Multiwellplatten transferiert. Anschließend wurden die Gele in PBS getränkt und bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte täglich eine visuelle Inspektion und Beurteilung der Gele mit anschließender Dokumentation der Beobachtungen. In Abb. 12 sind exemplarisch mehrere Gelzylinder abgebildet. Im Rahmen der fotografischen Aufnahme wurde zur besseren Darstellbarkeit hier etwas Gewebefarbstoff dazugegeben.

Methoden

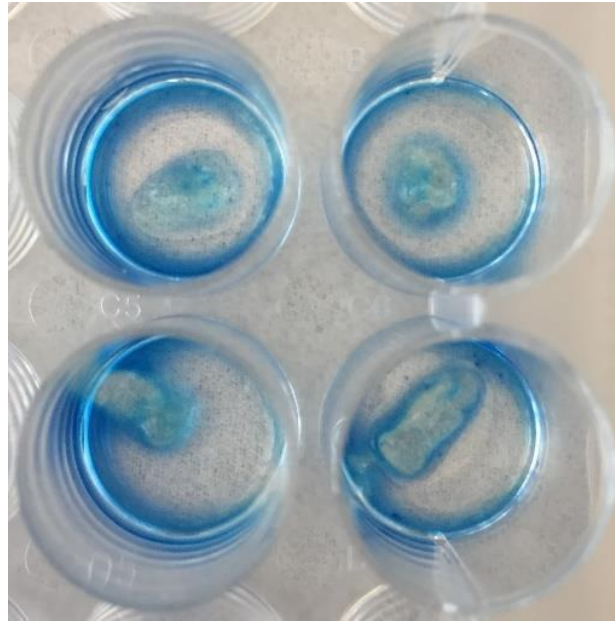


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Klebergele. Die zylindrischen Gele wurden in PBS getränkt bei 37 °C gelagert und täglich inspiziert. Zur besseren Erkennbarkeit wurde für diese Aufnahme etwas Gewebefarbstoff hinzugegeben.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung wurde selbstständig durch den Autor mit der Software IBM SPSS Statistics 25 durchgeführt. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Proben wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt und diese schließlich mittels Q-Q Plots visuell verifiziert. Zur Ermittlung der Varianzhomogenität wurde ein Levene-Test durchgeführt. War diese gegeben, wurde mit Hilfe einer ANVOA, unter Anwendung des Tukey-HSD als Post-Hoc-Test, die Signifikanz berechnet. Im Falle einer Varianzheterogenität wurde mit dem Dunnett-T3 als Post-Hoc-Test eine Welch-ANOVA zur Berechnung der Signifikanz durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf einen p-Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Die Untersuchung und Weiterentwicklung eines PEG-basierten Adhäsivums für die laterale Gelenkknorpelintegration beinhaltete 3 wesentliche Aspekte:

- die biomechanische Messung der Adhäsionskraft
- die histologische mikroskopische Untersuchung
- und die Untersuchung der Zytotoxizität.

Ausgangspunkt für die Entwicklung waren die unter dem Namen CoSeal™ vermarkteten Komponenten, bestehend aus einer Succinimidyl-Glutarat- und einer Thiol-Komponente. Anhand der daraus entstandenen Ergebnisse und gewonnenen Erkenntnisse wurden die Komponenten auf die speziellen Bedürfnisse von Gelenkknorpel angepasst. Neben Anpassung der PEG-Komponenten wurde HA-SH als Komponente eingesetzt und die Hypothese überprüft, ob dieses die Integration in das als adhäsives Hydrogel vorliegende PEG-Adhäsivum fördert. Für die biomechanischen Untersuchungen wurde das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Disc-Ring-Modell verwendet.

Ein supplementärer Inhalt dieser Arbeit umfasst die Etablierung des Tensile-Tests des Sandwich-Modells. Dieses wurde parallel zu den Kleberuntersuchungen entwickelt. Dazu wurden repräsentative Kleberkompositionen auf PEG- sowie Glutaraldehydbasis verwendet. Verglichen wurden:

- der Einfluss der axialen Geschwindigkeit auf die Messergebnisse und
- die Standardabweichung der gemessenen Adhäsionskraft bei unterschiedlichen Klebstoffen.

4.1 Biomechanische Messungen

Die reaktive Komponente von CoSeal™ ist das 4SG-PEG mit seinen 4 reaktiven Succinimidyl-Glutarat-Gruppen pro Molekül. Diese reagieren zum einen mit den Thiol-Gruppen des ebenfalls vierarmigen 4T-PEGs und formieren so das schließlich vorliegende adhäsive Hydrogel. Die adhäsiven Eigenschaften kommen dadurch zustande, dass das 4SG-PEG ebenfalls mit den in Gelenkknorpel vorkommenden Amin-Gruppen reagiert. CoSeal™ wird mit einem dualen Applikator appliziert, allerdings wurde für die experimentelle Untersuchung eine sequenzielle Applikation gewählt, um eine kurzzeitige primäre Reaktion des 4SG-PEGs mit dem Knorpel zu ermöglichen und so eine stärkere Adhäsion zu erzielen. Makroskopisch imponierte nach vollständiger Applikation ein klares, solides, innerhalb weniger Sekunden polymerisiertes Hydrogel. Die hohe Adhäsionskraft wurde bereits durch ein starkes Kleben auf der aus Plastik bestehenden Arbeitsoberfläche apparent, weshalb schließlich eine Teflonunterlage benutzt wurde und akribisch auf eine akkurate Applikation geachtet wurde. Bei den Konstrukten der Kontrollgruppe wurde eine Knorpeldisc ohne Applikation von Kleber in den Ring platziert.

4.1.1 Zeitliche Dynamik der Adhäsionskräfte

Für die erste Untersuchung wurden die Komponenten entsprechend der Zusammensetzung von CoSeal™ gewählt. Hierzu wurde zunächst die initiale Adhäsionskraft ermittelt. Um eine Aussage hinsichtlich der Dynamik der Adhäsionskraft treffen zu können, wurden weitere Messungen 45 min, 2 h und 24 h nach dem Kleben durchgeführt. Bis zur Messung wurden die Konstrukte in PBS getränkt aufbewahrt. Schließlich wurde die Adhäsionskraft nach 21 d in vitro Kultivierung ermittelt. Parallel dazu wurde das 4T-PEG durch HA-SH als zweite Komponente ersetzt und die gleichen Untersuchungen vorgenommen. Die Messergebnisse sind in Abb. 14 aufgeführt.

Ergebnisse

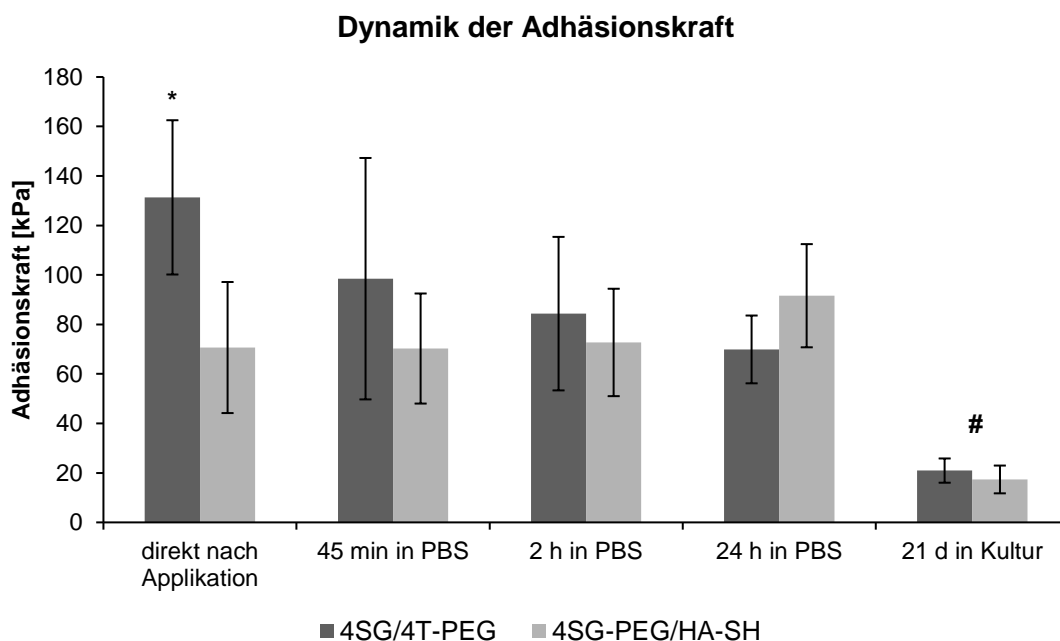


Abbildung 14: Die Dynamik der Adhäsionskräfte des Klebers mit der 4SG-PEG-Komponente mit 4T-PEG oder HA-SH als zweite Komponente zu verschiedenen Messzeitpunkten; Mittelwerte mit Standardabweichung; *: signifikant höher gegenüber 4SG-PEG/HA-SH direkt nach Applikation; #: signifikant geringer gegenüber Klebern direkt nach Applikation, 45 min in PBS, 2 h in PBS und 24 h in PBS. 4SG/4T-PEG direkt nach Applikation: $n=15$, 45 min in PBS: $n=7$, 2 h in PBS: $n=7$, 24 h in PBS: $n=6$. 4SG/HA-SH direkt nach Applikation: $n=17$, 45 min in PBS: $n=9$, 2 h in PBS: $n=11$, 24 h in PBS: $n=14$.

Die Adhäsionskraft des 4SG/4T-PEG-Klebers, also die Sofortadhäsion ohne Inkubationszeit, betrug $131,4 \pm 31,2$ kPa (Abb. 14: direkt nach Applikation). Diese war nach 21 d Kultivierung mit $20,9 \pm 4,9$ kPa signifikant geringer (Abb. 14: 21 d in Kultur). Auch beim 4SG-PEG/HA-SH-Kleber zeigte sich mit $17,4 \pm 5,6$ kPa nach 21 d eine signifikant geringere Adhäsionskraft im Vergleich zur initialen Adhäsionskraft von $70,7 \pm 26,5$ kPa (Abb. 14: direkt nach Applikation und 21 d in Kultur).

Vergleicht man die Sofortadhäsionskraft ohne Kultivierung der beiden Kleberkompositionen, zeigte sich mit $131,4 \pm 31,2$ kPa und $70,7 \pm 26,5$ kPa eine signifikant höhere Sofortadhäsionskraft bei Verwenden der 4T-PEG-Komponente (Abb. 14: direkt nach Applikation). Nach 21 d in Kultur war dieser signifikante Unterschied mit $20,9 \pm 4,9$ kPa und $17,4 \pm 5,6$ kPa allerdings nicht mehr zu beobachten (Abb. 14: 21 d in Kultur). Betrachtet man die Messergebnisse der drei Messzeitpunkte nach 45 min, 2 h und 24 h, erkennt man einen Abwärtstrend der Adhäsionskraft bei Verwendung der 4T-PEG-Komponente. Bei Verwendung der HA-SH-Komponente imponierte sie

Ergebnisse

hingegen konstant. So war statistisch bereits nach 45 min kein signifikanter Unterschied zwischen den Adhäsionskräften der beiden Kleberkompositionen mehr nachweisbar.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich die 4T-PEG-Komponente prinzipiell erfolgreich durch HA-SH ersetzen lässt und sich ebenfalls ein funktionierendes Adhäsivum formiert. Zwar ging dies auf Kosten der initialen Adhäsionskraft, welche sich jedoch weiterhin in einem suffizienten Bereich befand, jedoch war dieser Unterschied nach 45 min in PBS statistisch nicht mehr signifikant nachweisbar. Des Weiteren war festzustellen, dass nach 21 d in Kultur kein signifikanter Unterschied der Adhäsionskraft der beiden Kompositionen bestand.

4.1.2 Degradationsverhalten und Anpassung der Kleberkomponenten

Aus den biomechanischen Messungen der beiden 4SG-PEG-Kleber hatten sich suffiziente Sofortadhäsionskräfte ergeben. Allerdings war ein kurzfristiger Abwärtstrend bei Verwendung der thiolhaltigen Komponente zu beobachten und insgesamt hatten sich nach 21 d in vitro Kultur bei beiden Klebern deutlich niedrigere Adhäsionskräfte messen lassen. Um eine Verbesserung dieser Klebereigenschaften zu erzielen, wurde das Degradationsverhalten genauer untersucht.

Um die Kleber in Bezug auf die Degradation zu charakterisieren, wurde ein Degradationsversuch durchgeführt. Dieser beinhaltete die Anfertigung von zylindrischen Klebergelen der entsprechenden Kompositionen mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Hierzu wurden die beiden Komponenten jeweils mit einem 1:1-Verhältnis in eine zylindrische Teflonform gegeben und die entstandenen Klebergelzylinder in PBS versenkt. Schließlich wurden die Gele bei 37 °C inkubiert und täglich visuell inspiziert. Die dokumentierten Ergebnisse sind in Tab. 11 aufgeführt. Die 4SG/4T-PEG-Klebergele hatte sich bereits nach 5 d komplett aufgelöst und es waren keine soliden Anteile mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu waren die 4SG-PEG/HA-SH-Klebergele erst nach 19 d komplett degradiert. Allerdings wiesen sie bereits nach 16 d nur noch eine stückige Konsistenz auf und die Gele lagen in Form von mehreren Fragmenten in PBS vor.

Ergebnisse

Tabelle 12: Verhalten der Klebergele in PBS getränkt. Aus den verschiedenen Klebern wurden zylindrische Klebergele angefertigt, bei 37 °C in PBS getränkt inkubiert und täglich inspiziert.

Komposition des Klebergels	Verhalten in PBS getränkt bei 37 °C
4SG/4T-PEG	Nach 5 d komplett degradiert
4SG-PEG/HA-SH	Nach 16 d nur noch einzelne Fragmente, nach 19 d komplett degradiert
4C/4A-PEG	Nach 28 d noch in Form
4C-PEG/HA-SH	Nach 28 d noch in Form

Auf Basis der nun vorliegenden Ergebnisse sollten die Kleberkomponenten sinnvoll angepasst werden, um die langfristige Adhäsion zu verbessern. Beide Adhäsiva hatten sich in flüssiger Umgebung schnell komplett degradiert. Die konsekutive Hypothese war, dass stabilere Bindungen innerhalb der Klebermatrix eine langsamere Degradation derer zur Folge haben können, was wiederum zu einer besseren Langzeitintegration führt. Aufgrund der in flüssigem Medium nachgewiesenen spontanen Degradation wurde die Hydrolyse als hauptverantwortlicher Degradationsprozess angesehen. Es boten sich folgende Möglichkeiten zur Anpassung der Komponenten an:

- Das thiolhaltige 4T-PEG wurde durch das aminhaltige 4A-PEG ersetzt (Abb. 15: 4A-PEG). Die entstehende Amid-Bindung weist im Vergleich zur schwächeren Thioester-Bindung eine stärkere Resilienz gegenüber Hydrolyse und Aminolyse auf (Abb. 16).
- Das 4SG-PEG wurde durch 4-Succinimidyl-Carbonat-PEG (4C-PEG) ersetzt (Abb. 15: 4C-PEG). Letzteres weist ebenfalls eine längere Hydrolyse-Halbwertszeit auf¹³⁸. Somit sollte zum einen in Kombination mit der neuen 4A-PEG-Komponente als auch mit der HA-SH-Komponente ein stabileres, langsamer degradierendes Adhäsivum entstehen.

Ergebnisse

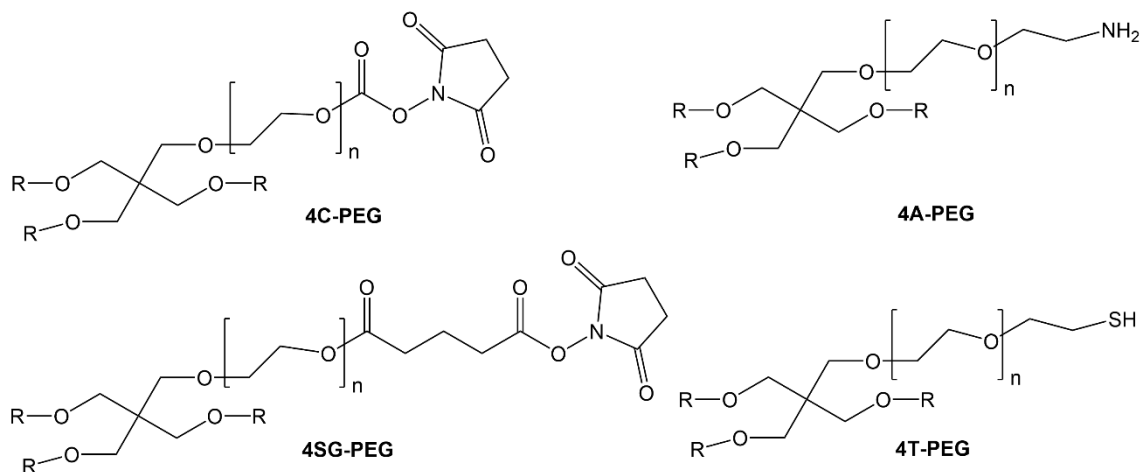


Abbildung 15: Strukturelle Darstellung der Polyethylenglykol-Polymere.

Es ergaben sich also zwei neue Kleberzusammensetzungen mit potenziell verbesserter Langzeitadhäsion:

- das 4C/4A-PEG-Adhäsivum und
- das 4C/4-HA-SH-Adhäsivum.

In Abb. 16 ist der Reaktionsmechanismus des 4C-PEG mit dem 4A-PEG strukturell dargestellt. Wie bei den CoSeal™-Komponenten entsteht ein adhäsives PEG-Hydrogel-Netzwerk. Für die Zubereitung der neuen Kleber wurden die Puffer jeweils übernommen.

Die beiden neuen Kompositionen wurden zunächst ebenfalls auf ihr Degradationsverhalten untersucht. Wie in Tab. 12 aufgeführt, waren beide Klebergele nach 28 d in PBS noch in Form und wiesen keine makroskopischen Zeichen einer Degradation auf. Die erwünschte Wirkung durch die erfolgten Anpassungen konnte somit experimentell verifiziert werden. Alle Adhäsiva wurden im nächsten Schritt vergleichend biomechanisch und histologisch untersucht.

Ergebnisse

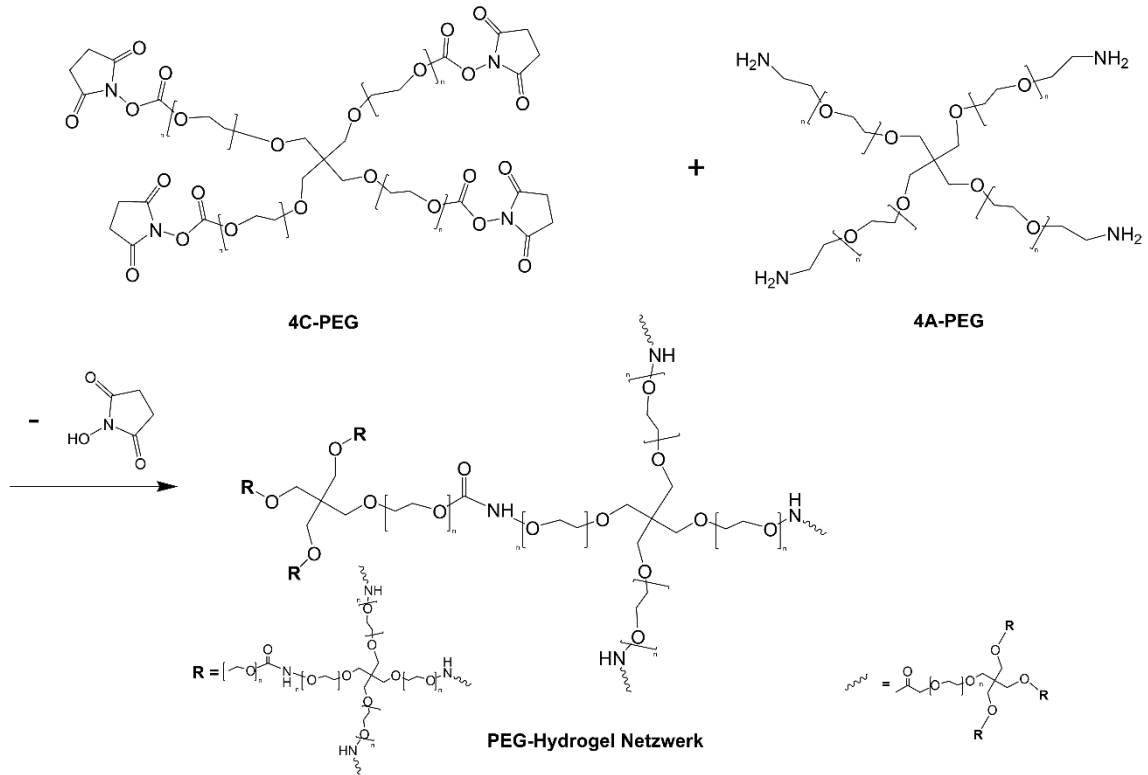


Abbildung 16: Darstellung der Struktur des vierarmigen Succinimidyl-Carbonat-Polyethylenglykols (4C-PEG) und des vierarmigen Amin-Polyethylenglykols (4A-PEG). Die Amin-Gruppen des 4A-PEG reagieren mit den Carbonyl-Gruppen des 4C-PEG. Es entsteht eine kovalente Amidbindung zwischen den PEG-Molekülen mit einem freien N-Hydroxy-Succinimid als Nebenprodukt. Aus einem Netzwerk multipler solcher kovalenten Bindungen entsteht in Summe das adhäsive PEG-Hydrogel.

Ergebnisse

4.1.3 Vergleich der Initialadhäsion

Zunächst erfolgte der biomechanisch im Push-Out-Test ermittelte Vergleich der Sofortadhäsionskräfte. Die Ergebnisse samt Kontrollgruppe sind in Abb. 17 aufgeführt.

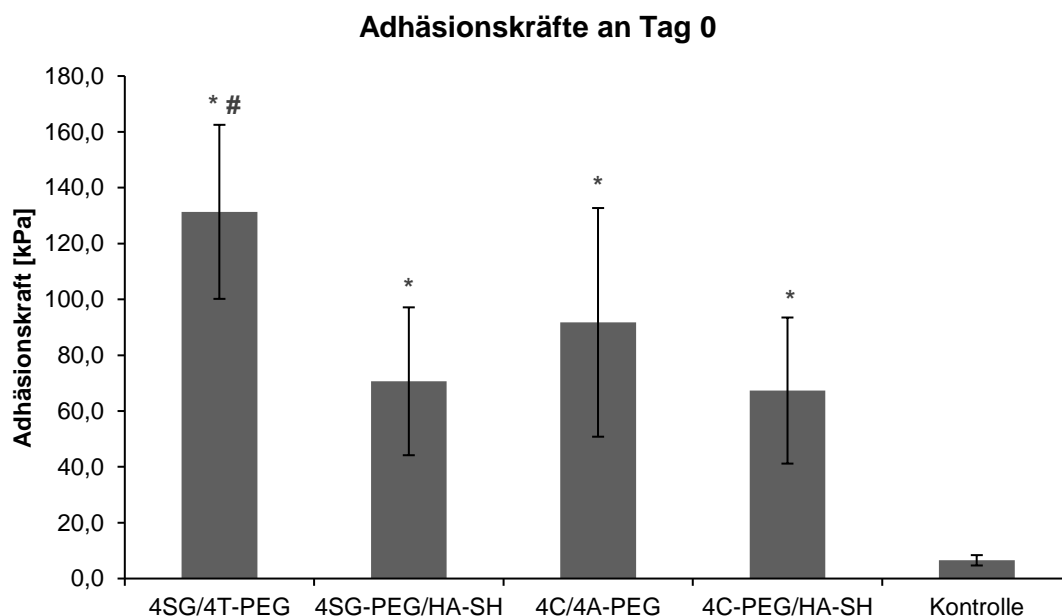


Abbildung 17: Grafische Darstellung der initialen Adhäsionskräfte an Tag 0; Mittelwerte mit Standardabweichung; *: signifikant höher gegenüber Kontrolle, #: signifikant höher gegenüber HA-SH-haltigen Klebern. 4SG/4T-PEG: n=15; 4SG-PEG/HA-SH: n=17; 4C/4A-PEG: n=7; 4C-PEG/HA-SH: n=6; Kontrolle: n=6.

Die Sofortadhäsionskraft des 4SG/4T-PEG-Adhäsivums stellte sich auch gegenüber dem 4C/HA-SH-Kleber signifikant höher dar. Die beiden HA-SH-Kleber wiesen mit $70,7 \pm 26,5$ kPa und $67,3 \pm 26,2$ kPa quasi die gleiche initiale Adhäsionskraft auf. Auch wenn der ermittelte Wert des 4C/4A-PEG-Klebers mit $91,8 \pm 41,0$ kPa niedriger erschien als der des 4SG/4T-PEG-Klebers ($131,4 \pm 31,2$ kPa) war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Die 4C-PEG-Komponente schien somit ähnliche Eigenschaften in der Sofortadhäsion aufzuweisen wie die 4SG-PEG-Komponente und der hypothetisch postulierte Reaktionsmechanismus *in vitro* zu funktionieren. Gegenüber der Kontrollgruppe, in welcher die Discs lose und ohne Klebstoff in den äußeren Ring platziert wurden, waren alle Kompositionen signifikant stärker klebend. Letztlich ließ sich feststellen, dass alle 4 Kleber eine suffizient hohe Sofortadhäsion aufwiesen. Zwar klebte der 4SG/4T-PEG-Kleber etwas stärker, jedoch ist dieser Effekt vor dem Hintergrund der bekannten abnehmenden Dynamik aus dem Vorversuch als nur von kurzzeitiger Prävalenz zu werten.

Ergebnisse

4.1.4 Vergleich der Langzeitadhäsion nach 21 Tagen in vitro Kultivierung

Bei im Push-Out-Test nachgewiesener suffizienter Initialadhäsion aller Kleberkompositionen erfolgte schließlich die biomechanische Testung und der Vergleich der Langzeitadhäsionskräfte. Es wurden als Kontrolle erneut Konstrukte verwendet, bei denen die Disc lose und ohne Verwendung eines Adhäsivums in den Ring platziert wurden.

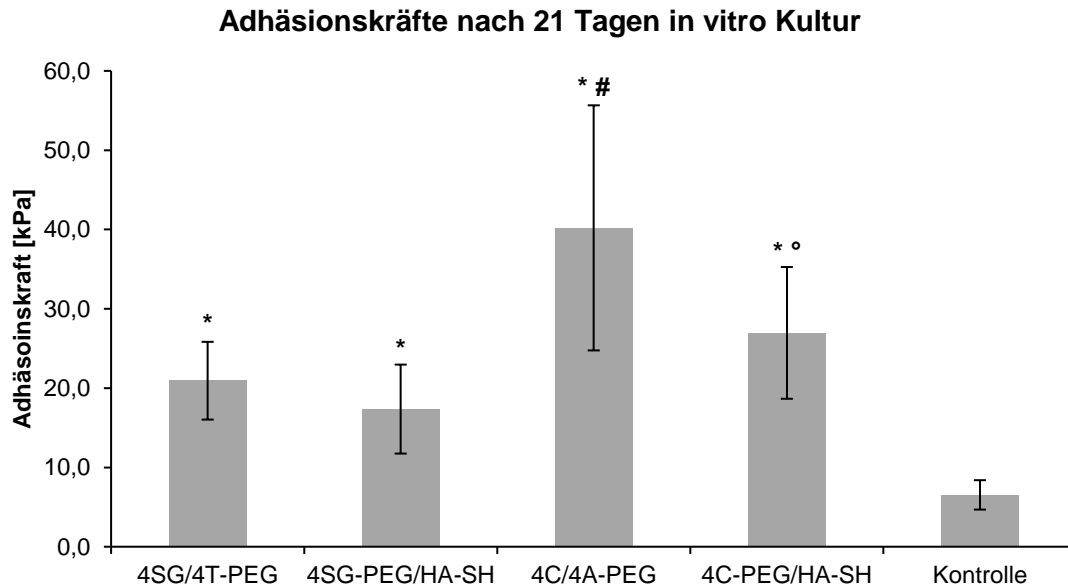


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Adhäsionskräfte nach 21 d in vitro Kultur. Mittelwerte mit Standardabweichung. *: signifikant höher gegenüber Kontrolle. #: signifikant höher gegenüber allen anderen Klebern. °: signifikant höher gegenüber 4SG-PEG/HA-SH. 4SG/4T-PEG: n=9; 4SG-PEG/HA-SH: n=10; 4C/4A-PEG: n=8; 4C-PEG/HA-SH: n=8; Kontrolle: n=6.

Die Adhäsionskräfte aller vier Kleber waren nach 21 d in vitro Kultur signifikant stärker gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 18: Kontrolle). Mit $40,2 \pm 15,5$ kPa wies der 4C/4A-PEG-Kleber die insgesamt signifikant höchste Adhäsionskraft gegenüber allen anderen Kompositionen auf (Abb. 18: 4C/4A-PEG). Interessant war auch der Vergleich der beiden HA-SH-Kleber. In Kombination mit der 4C-PEG-Komponente wies er mit $27,0 \pm 8,3$ kPa eine signifikant höhere Langzeitadhäsionskraft als mit der 4SG-PEG-Komponente auf, welche nur $17,4 \pm 5,6$ kPa betrug (Abb. 18: 4C-PEG/HA-SH, 4SG-PEG/HA-SH). Letztlich ließ sich feststellen, dass durch die Substitution der 4SG-PEG mit der 4C-PEG-Komponente innerhalb der HA-SH-haltigen und HA-SH-freien Kleber eine signifikante Verbesserung der Langzeitadhäsionskraft erzielt wurde.

Ergebnisse

4.1.5 Sofortadhäsion und Langzeitintegration im Vergleich

Alle untersuchten Adhäsiva wiesen signifikant höhere Initialadhäsionskräfte im Vergleich zur Langzeitadhäsionskraft auf, wie in Abb. 19 zusammenfassend dargestellt. Alle gemessenen Adhäsionskräfte der Initialadhäsion und Langzeitintegration waren signifikant höher als die jeweils ermittelten Kontrollen, wie bereits in den vorherigen Abschnitten dargestellt.

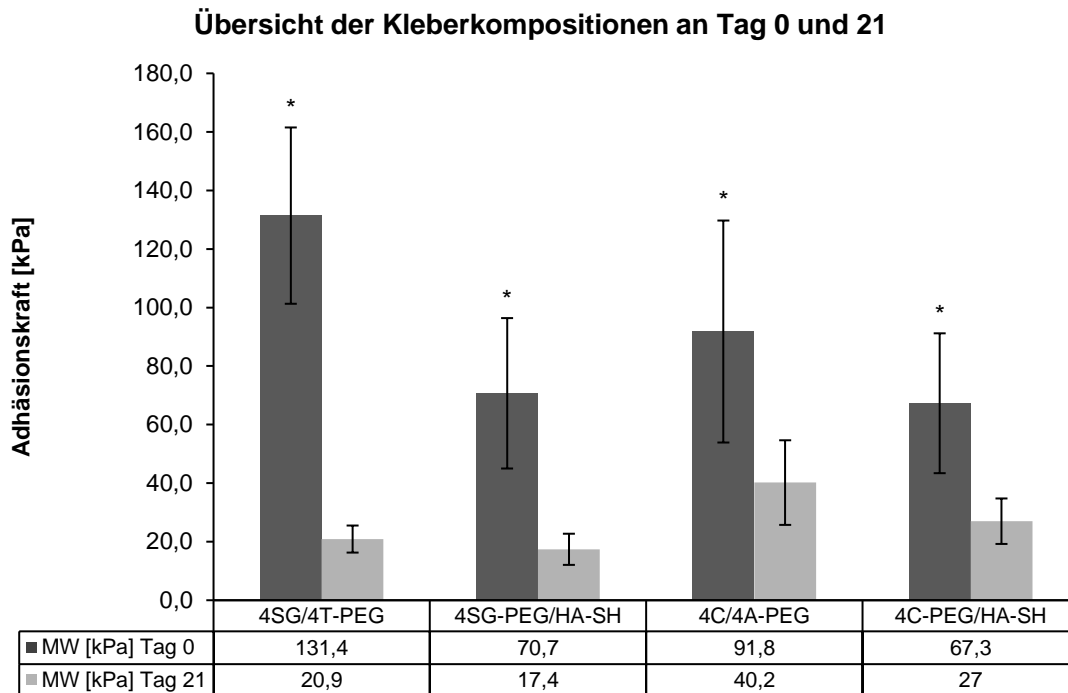


Abbildung 19: Grafische und tabellarische Darstellung der Sofortadhäsionskräfte und der Langzeitadhäsionskräfte nach 21 d *in vitro* Kultur der unterschiedlichen Kleberkompositionen. MW=Mittelwert. *: signifikant höher gegenüber Adhäsionskraft an Tag 21.

Es gab jedoch deutliche Unterschiede bei den langfristigen Adhäsionskraftverlusten. Mit Succinimidyl-Glutarat als Komponente betrug die Adhäsionskraft nach 21 d nur noch 15,9 % des an Tag 0 gemessenen Wertes in Kombination mit dem PEG-Thiol bzw. 24,6 % in Kombination mit HA-SH. Durch die Substitution und Inkorporation der Succinimidyl-Carbonat-Gruppe konnte der Kraftverlust deutlich reduziert werden. Bei der Kombination mit HA-SH betrug die Adhäsionskraft nach 21 d noch 40,1 % des Ausgangswertes und der Kraftverlust konnte im Vergleich zum Succinimidyl-Glutarat somit fast halbiert werden. In Kombination mit dem für das PEG-Thiol substituierten PEG-Amin betrug die Adhäsionskraft nach 21 d noch 43,8 % des Ausgangswertes. Der Kraftverlust der CoSeal™ entsprechenden Zusammensetzung war somit etwa dreimal so hoch.

Ergebnisse

Durch die vorgenommenen Anpassungen konnte der Verlust der Adhäsionskraft in der Langzeitintegration somit deutlich reduziert werden, sowohl bei der HA-haltigen als auch der HA-freien Variante. Den größten Kraftverlust wies dabei CoSeal™ auf, während der 4C/4A-PEG-Kleber den geringsten Kraftverlust zu verzeichnen hatte. Die zugrunde liegenden Ursachen der in den biomechanischen Messungen ermittelten Ergebnisse der Langzeitintegration wurden schließlich in der histologischen Begutachtung weiterführend untersucht.

4.2 Histologie

Zur Beurteilung der Knorpelintegration wurden geklebte Konstrukte in vitro in Chondrozyten Nährmedium bei 37 °C im Inkubator kultiviert und nach 21 d histologisch untersucht. Das Nährmedium wurde unter sterilen Bedingungen alle 2 bis 3 d gewechselt. Für den EZM-Nachweis wurden als repräsentative Hauptbestandteile Kollagen II und Aggrecan immunhistochemisch angefärbt. Bei der mikroskopischen Inspektion wurden folgende Aspekte berücksichtigt und untersucht:

- Die Integrität bzw. der Grad der Degradation des Adhäsivums
- Die Prävalenz der Färbung innerhalb der Klebermatrix als Zeichen der Integration
- Die Prävalenz von Chondrozytenmigration in die Klebermatrix

Bei den folgenden Abbildungen handelt es sich jeweils um repräsentative Aufnahmen. Abgebildet sind Längsschnitte der Knorpelkonstrukte mit der Disc in der einen und dem Ring in der anderen Hälfte des Bildes. Rot angefärbt ist dabei jeweils das Aggrecan oder Kollagen II innerhalb der EZM. Gut zur erkennen sind dabei die Chondrone mit den paarig angeordneten Chondrozyten. Zwischen Knorpeldisc und -ring befindet sich der Defektspace. In ihm befindet sich die je nach Kleberkomposition unterschiedlich konfigurierte Klebermatrix. Diese erscheint entweder farblos oder, im Falle einer positiven Kollagen II- oder Aggrecan-Färbung, rot. In manchen Aufnahmen ist im Defektspace eine positive Färbung auch außerhalb der Klebermatrix zu erkennen. Die Ergebnisse werden im Folgenden einzeln dargestellt.

4.2.1 4SG-PEG/HA-SH

Bei Untersuchung des 4SG-PEG/HA-SH-Klebers imponierte ein zum größten Teil stückig konfiguriertes adhäsives Hydrogel im Defektspace in Form kleiner, runder Fragmente (Abb. 20: B und D, Pfeile). Nur abschnittsweise war der Kleber in seiner Integrität erhalten (Abb. 20: A und C). Jedoch zeigten sich auch in Regionen höherer Kleberintegrität nur wenige Kleber-Knorpel-Kontakte.

Es ließen sich sowohl Aggrecan als auch Kollagen II in den stückig konfigurierten (Abb. 20: D, Pfeile) als auch in den intakten Kleberanteilen (Abb. 20: A und C) nachweisen als Zeichen möglicher beginnender Integrationsprozesse.

In den untersuchten Proben waren innerhalb des Knorpels zahlreiche Chondrozyten zu erkennen, auch in unmittelbarer Umgebung des Defektspace. Vereinzelt waren Chondrozyten an der Kleber-Knorpel-Grenze zu erkennen (Abb. 20: C, Pfeil). Vollständig in die Klebermatrix migrierte Chondrozyten konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse

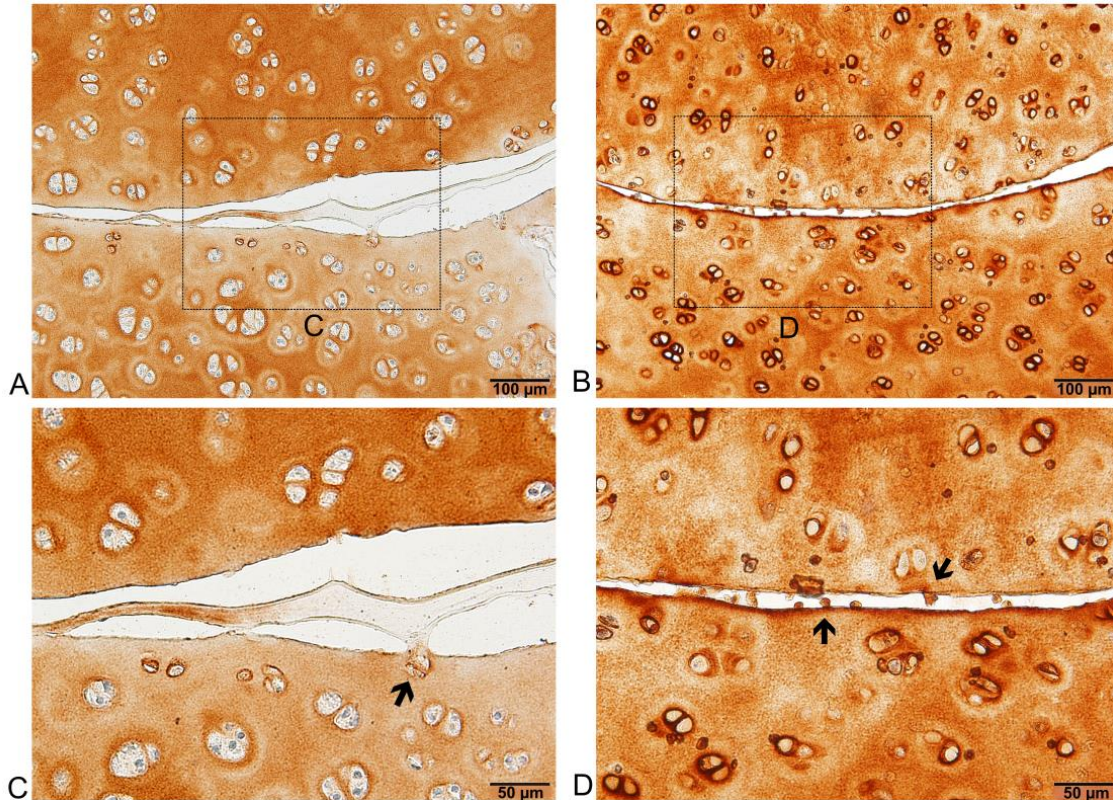


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen der 4SG-PEG/HA-SH-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A, C: Kollagen II-Färbung; B, D: Aggrecan-Färbung.

4.2.2 4C-PEG/HA-SH

Der 4C-PEG/HA-SH-Kleber imponierte in seiner Integrität deutlich intakter als der 4SG-PEG/HA-SH-Kleber. Es waren viele Abschnitte mit vollständigem Kleber-Knorpel-Kontakt identifizierbar (Abb. 21: B). Auch wenn in einzelnen Abschnitten der Kleber zwar in seiner Integrität intakt war, erschienen einige Anteile in der Kontinuität unterbrochen zu sein (Abb. 21: F). Dies ist möglicherweise auch als Beschädigung im Rahmen des Herstellungsprozesses der histologischen Präparate zu werten. In anderen Präparaten schienen die fehlenden Kontaktzonen jedoch eher auf eine mangelhafte Verteilung des Adhäsivums beim Klebeprozess zurückzuführen zu sein (Abb. 21: A, C, D).

Es ließen sich in nahezu allen untersuchten Präparaten Kollagen II und Aggrecan im Defektpalt nachweisen (Abb. 21: A, C-E, G, H). Der genaue Integrationsgrad bzw. die die Konfiguration ließ sich in drei Typen aufteilen:

- (I) Es gab Kollagen II-Produktion in den Defektpalt außerhalb der Klebermatrix (Abb. 21: A, D). Der Kleber selbst schien dabei von der EZM bzw. vom Kollagen II im Defektpalt verdrängt worden zu sein.

Ergebnisse

Möglicherweise handelt es sich dabei auch um einen in die Klebermatrix hineinproduzierenden Prozess, die jedoch deutlich auszumachende Kleber-Kollagen II-Grenze spricht eher gegen diese Annahme.

- (II) In den untersuchten Präparaten imponierten eindeutig mit Kollagen II und Aggrecan durchzogene Kleberanteile (Abb. 21: A, C und G, H). Typisch war zudem der zwar teilweise prävalente Kleber-Knorpel-Kontakt, der jedoch nicht über längere Abschnitte erhalten blieb. Außerdem waren migrierte Chondrozyten im Bereich der Knorpel-Kleber-Grenze typisch, die jedoch nicht in die Klebermatrix eindringen. (Abb. 21: C, Pfeile)
- (III) Der höchste Integrationsgrad war gekennzeichnet durch einen vollständig mit Kollagen II ausgefüllten Defektspace (Abb. 21: E). Im Gegensatz zu Grad II umfasste dieser nicht nur vereinzelte Abschnitte, sondern war über längere Strecken hinweg nachweisbar. Ein weiteres Merkmal war der Nachweis von Chondrozyten im Defektspace (Abb. 21: E, Pfeile). Auch wenn dieser Integrationsgrad nur in wenigen Präparaten ersichtlich war, ist er mit hochgradiger Integration vereinbar.

Insgesamt machte der 4C-PEG/HA-SH-Kleber nach 21 d einen in seiner Integrität intakteren Eindruck als der 4SG/HA-SH-Kleber. Dieser Eindruck deckt sich mit den im Degradationsversuch getroffenen Erkenntnissen. Die Kontaktflächen von Kleber und Knorpel waren zahlreicher mit teils hochgradig integriert erscheinenden Präparaten sowie Kollagen II- und Aggrecanproduktion in die Klebermatrix. Zusammenfassend ist von einem heterogenen Bild zu berichten mit unterschiedlich ausgeprägtem Integrationsgrad, wobei die mäßig ausgeprägte Integration das Bild dominierte.

Ergebnisse

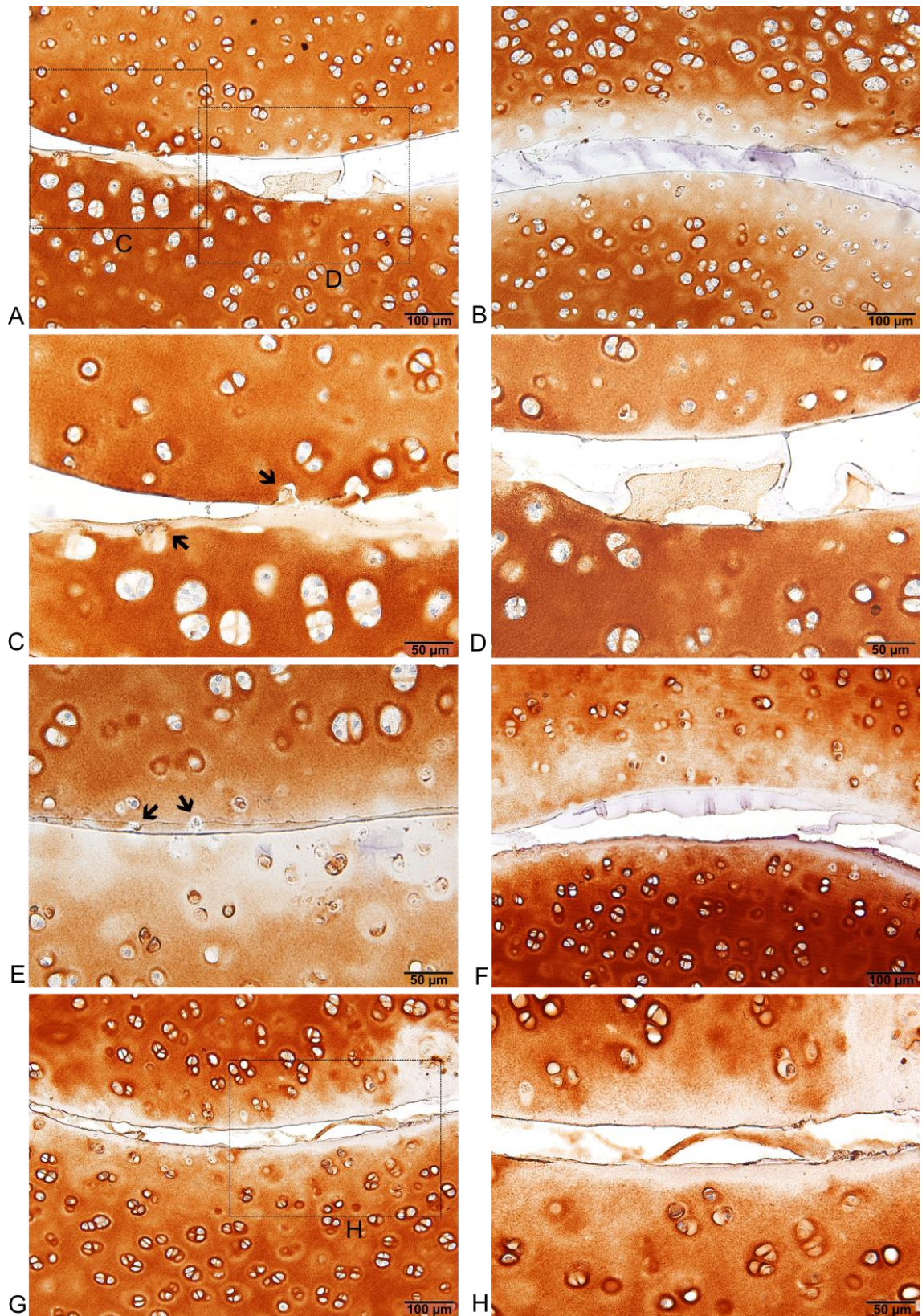


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen der 4C-PEG/HA-SH-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A-E: Kollagen II-Färbung; F-H: Aggrecan-Färbung.

Ergebnisse

4.2.3 4C/4A-PEG

Der ebenfalls untersuchte 4C/4A-PEG-Kleber beinhaltete im Gegensatz zu den beiden oben gezeigten Zusammensetzungen keine HA-SH als Komponente. Insgesamt imponierte der Kleber in Vergleich zu den HA-SH-haltigen in seiner vorliegenden Konfiguration am intaktesten. Die untersuchten Präparate wiesen keine fragmentierten oder inkompletten Anteile auf (Abb. 22: A-D). Dementsprechend war der Kleber-Knorpel-Kontakt Richtung Disc und Ring großflächig vorhanden.

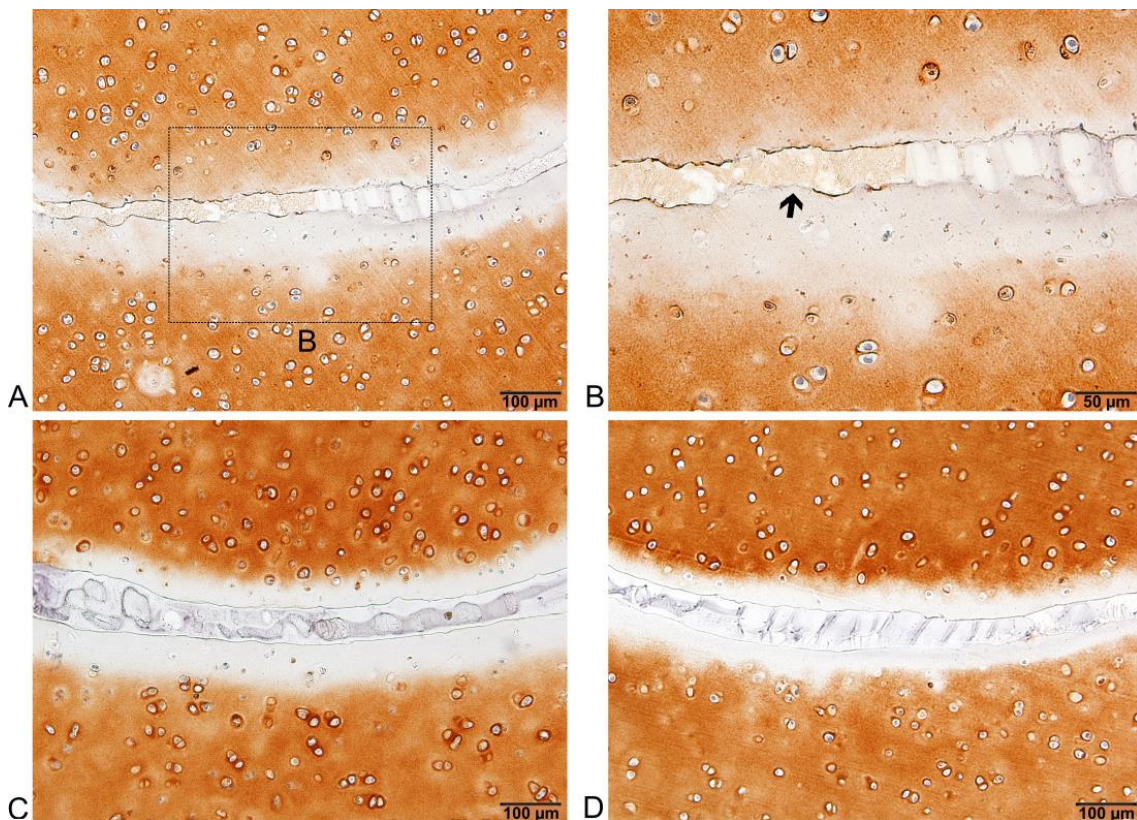


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen der 4C/4A-PEG-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A-C: Kollagen II-Färbung; D: Aggrecan-Färbung.

Sichere Kollagen II- oder Aggrecanproduktion in die Klebermatrix war in den untersuchten Proben nicht nachweisbar. Jedoch zeigten wenige Regionen Kollagen II-Produktion in den Defektspace mit Verdrängung der Klebermatrix (Abb. 22: A und B, Pfeil). Diese Areale wiesen eine Konfiguration wie die in Abb. 21 A und D als Grad I-Integration klassifizierten Anteile des 4C/HA-SH-Klebers auf. Wie an dortiger Stelle bereits erwähnt, lässt sich nicht abschließend beweisen, dass es sich dabei tatsächlich um eine Verdrängung handelt. Dennoch ist der Unterschied zu den Grad II und III

Ergebnisse

konfigurierten Arealen deutlich apparent. Für eine Chondrozytenmigration in Richtung des Klebers und Defektspaltes gab es keinen Anhaltspunkt.

Betrachtet man die Defektränder, fällt ein weiterer Aspekt auf. Anders als bei den HA-SH-haltigen Zusammensetzungen wurden beim 4C/4A-PEG-Kleber im Bereich der Schnittränder aggrecan- und kollagenarme Zonen ersichtlich (Abb. 22: C, D). Diese zogen sich über den gesamten Defektrand fort. Lediglich die Bereiche, in denen Kollagen II im Defektspalt zu erkennen war, wies auch der Defektrand eine positive Färbung auf (Abb. 22: A, B).

Zusammenfassend ergab die histologische Untersuchung bei allen drei untersuchten Adhäsiva ein unterschiedliches Bild. Die hier gewonnen Erkenntnisse wurden schließlich zusammen mit den Ergebnissen aus den biomechanischen Tests diskutiert und in Kontext gebracht. Zunächst wurden die Adhäsiva auf ihre Zytokompatibilität untersucht.

4.3 Zellvitalität und Zytotoxizität der Kleber

Zur Untersuchung der Gelenkknorpelvitalität wurde der MTT-Assay angewendet. Dadurch war es möglich, Rückschlüsse auf potenziell zytotoxische Wirkungen der Kleber zu ziehen. Es wurden mehrere geklebte Konstrukte der unterschiedlichen Kleberkompositionen sowie der Kontrollgruppe an Tag 1 und Tag 21 untersucht und makroskopisch beurteilt. Als Totkontrolle wurde ein Konstrukt für 2 h eingefroren und anschließend ebenfalls dem Assay unterzogen. Eine dunkelblaue bis schwärzliche Farbänderung war als Nachweis metabolischer Aktivität und somit vitalen Gelenkknorpels zu werten. Bei den zuvor eingefrorenen Knorpelkonstrukten blieb aufgrund fehlender vitaler Zellen eine solche Färbung aus.

In Abb. 23 sind exemplarisch einige Konstrukte der unterschiedlichen Kleberkompositionen nach MTT-Assay abgebildet. Zuvor wurden diese für 21 d in Chondrozyten-Nährmedium kultiviert und die biomechanische Messung mittels Push-Out-Test durchgeführt. Anschließend wurden Disc und Ring zusammen makroskopisch auf Zellvitalität untersucht. Bereits nach 24 h in vitro Kultivierung konnte bei allen Adhäsiva eine vorhandene Zellvitalität, ohne unmittelbare zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Wie nun in Abb. 23 zu sehen, waren auch nach 21 d alle dem MTT-Assay unterzogenen Konstrukte vollständig dunkel verfärbt. Es wurde dabei vor allem Augenmerk auf die inneren, dem Klebespalt zugewandten Schnittränder gelegt. Auch dort ließ sich eine homogene Dunkelfärbung aller untersuchter Konstrukte feststellen.

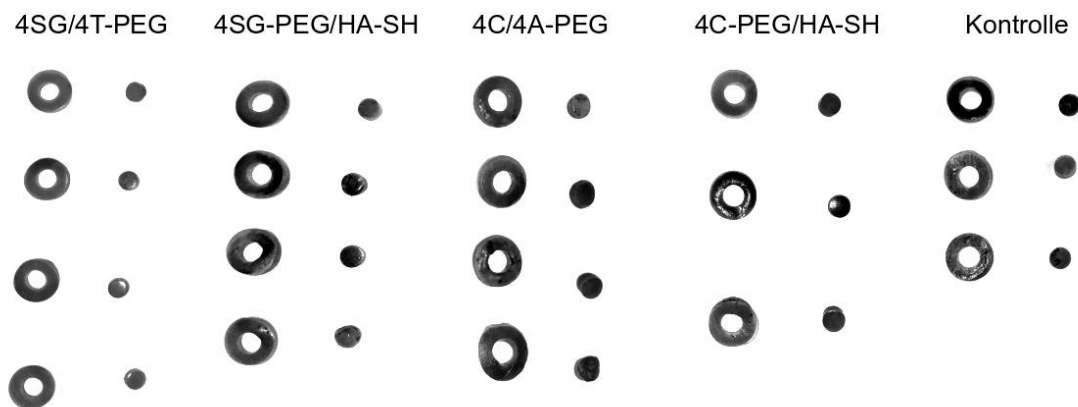


Abbildung 23: MTT-Färbung der Knorpelkonstrukte nach 21 d in vitro Kultur. Zuvor wurden die Konstrukte biomechanisch getestet. Es imponiert eine homogene Dunkelfärbung, auch an den dem Klebespalt hingewandten Flächen. Die weißen Aufhellungen entsprechen Lichtreflexen.

Ergebnisse

Zusammenfassend ließ sich also zu allen ermittelten Zeitpunkten metabolisch vitaler Gelenkknorpel nachweisen. Zytotoxische Wirkungen der unterschiedlichen Kleber waren in vitro nicht nachweisbar.

4.4 Entwicklung des Tensile-Tests für das Sandwich-Modell

Für die Untersuchungen der PEG-basierten Adhäsiva wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte Disc-Ring-Modell und der dazugehörige Push-Out-Test verwendet. Ein weiterer Inhalt dieser Arbeit umfasst die Entwicklung eines Versuchsaufbaus für den Tensile-Test für die biomechanische Testung der Konstrukte des Sandwich-Modells. Die Präparationstechnik zur Isolation des Gelenkknorpels aus bovinen Knien und die entsprechenden Vorrichtungen zur Herstellung der Knorpelscheiben wurden in der Arbeitsgruppe bereits entwickelt und etabliert. Zur Herstellung der Konstrukte wurden, wie im Methoden-Teil erläutert, zwei Scheiben zu einem Sandwich zusammengeklebt. Die Entwicklung des Tensile-Tests umfasste mehrere Schritte. Zunächst musste eine geeignete Versuchsvorrichtung und dessen Einzelteile hergestellt werden. Als nächstes musste ein geeignetes Prüfungsprotokoll festgelegt bzw. ermittelt werden. Im letzten Schritt wurden vergleichende Untersuchungen zwischen dem Tensile-Test und dem Push-Out-Test durchgeführt.

4.4.1 Entwicklung der Versuchsvorrichtung

Der erste Entwicklungsschritt umfasste die Entwicklung und Fertigung der Einzelteile der Versuchsvorrichtung. Grundidee des Versuchsaufbaus war es, die obere und untere Knorpelscheibe separat voneinander zu fixieren, um so mit Hilfe der Prüfmaschine die Zugkraft zu ermitteln, welche bis zum Versagen des Klebers nötig ist. Dazu musste sich die Traverse mit dem daran montierten Kraftaufnehmer, anders als beim Push-Out-Test, nach oben bewegen. Der Vorgang des Fixierens der beiden Knorpelscheiben musste auf eine Art und Weise erfolgen, bei der möglichst wenig am Konstrukt manipuliert wird, damit es zu keiner Beschädigung oder Verfälschung der Messergebnisse kommt.

Um dies zu erreichen, wurden Metallstäbe mit einem Durchmesser von 6 mm, demselben wie für die Knorpelscheiben, gefertigt (Abb. 24: links). Außerdem wurde eine Aufhängevorrichtung hergestellt, welche oben an den Kraftaufnehmer aufgehängt werden kann und unten mittels einer Schraube den oberen Stab fixieren kann (Abb. 23: links, mittig). Die Vorrichtungen wurden durch Feinmechanik Sauer in Würzburg gefertigt. Um die Metallstäbe mit den Knorpelscheiben zu fixieren, wurden die Stäbe zuerst mit Leukosilk® Fixierpflaster umschlagen (Abb. 23: rechts). Für die Verbindung zwischen den mit Pflaster umwickelten Stäben und den Knorpelscheiben wurde jeweils ein Tropfen Sekundenkleber (Stanger®) verwendet. Die Umwicklung diente der einfachen Wiederverwendbarkeit der Stäbe, da sich der Sekundenkleber somit einfach und rückstandslos vom Stab entfernen ließ und gleichzeitig durch die raue

Ergebnisse

Fixierpflasteroberfläche eine bessere Adhäsion erreicht werden konnte. Zudem war durch die Verwendung von Sekundenkleber nur eine minimale Manipulation am Konstrukt nötig. Es wurde bei der Verwendung genauestens darauf geachtet, dass der Sekundenkleber nicht auf Arealen außerhalb der zu klebenden Fläche aufgetragen wurde.



Abbildung 24: Die Einzelteile der Versuchsvorrichtung des Tensile-Tests. Links, Mitte: Die speziell durch Feinmechanik Sauer angefertigten Metallstäbe und die Aufhängevorrichtung. Rechts: Die Einzelteile im fertig aufgebauten Tensile-Test. Zwischen Metallstäben und Knorpelscheiben wurde Fixierpflaster für eine bessere Fixierung und Wiederverwendbarkeit der Stäbe verwendet.

Das Protokoll des Tensile-Tests umfasste dementsprechend mehrere Schritte und ist in Abb. 25 schematisch abgebildet.

- Zuerst wurde der obere Metallstab mittels Aufhängevorrichtung an den Kraftaufnehmer gehangen, der untere Metallstab in den Schraubstock geklemmt und die Stäbe manuell aufeinander ausgerichtet. Schließlich wurde ein Tropfen Sekundenkleber auf die untere umwickelte Stabfläche gegeben und das Konstrukt vorsichtig mit einer feinen Pinzette darauf platziert (Abb. 25: links).
- Nach 30 s Klebezeit wurde nun die obere umwickelte Stabfläche ebenfalls mit einem Tropfen Sekundenkleber versehen und die Traverse vorsichtig nach unten gefahren, bis die beiden Flächen einander berührten (Abb. 25: zweite von links).
- Nach erneuter 30-sekündiger Klebezeit konnte nun die biomechanische Messung erfolgen. Hierzu wurde entsprechend der zuvor festgelegten und

Ergebnisse

programmierten Geschwindigkeit die Traverse nach oben gefahren (Abb. 25: zweite von rechts).

- Nach Versagen des getesteten Adhäsivums wurde die Messung beendet (Abb. 25: rechts).

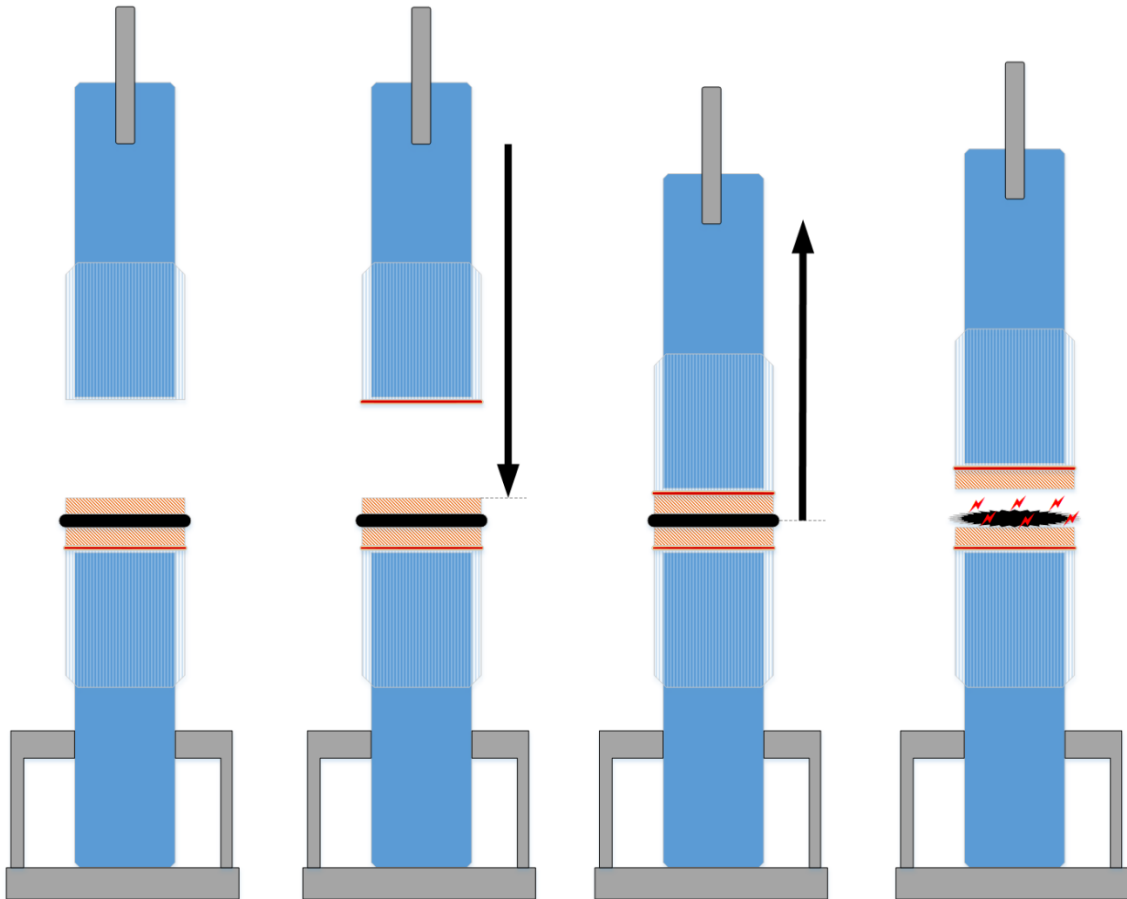


Abbildung 25: Schema des Protokolls des Tensile-Tests. Links: Das Knorpelkonstrukt, bestehend aus zwei mit dem Adhäsivum (schwarz) zusammengeklebten Knorpelscheiben (rosa), wird mit Sekundenkleber (rot) auf den unteren mit Fixierpflaster (grau) umwickelten Metallstab (blau) fixiert. Zweite von links: Der obere Metallstab wird mit Kleber versehen und die Traverse nach unten gefahren, bis er dem Konstrukt aufliegt. Zweite von rechts: Die Traverse wird entsprechend des festgelegten Messprotokolls nach oben gefahren. Rechts: Bei Versagen des Klebers wird die Messung beendet.

4.4.1 Einfluss Messgeschwindigkeit auf die Adhäsionskraft

Für die Etablierung eines Protokolls zur Messung der Adhäsionskraft im Tensile-Test musste eine standardisierte Geschwindigkeit der axialen Bewegung der Traverse mit dem daran befestigten Kraftaufnehmer und Aufhängevorrichtung nach oben, weg vom Knorpelkonstrukt, festgelegt werden. Es stellte sich die Frage, ob eine Abhängigkeit

Ergebnisse

zwischen der ermittelten Adhäsionskraft und der Messgeschwindigkeit, auch in Hinblick auf die Höhe der Standardabweichung, bestand. Um dies zu ermitteln, wurde mit einem repräsentativen Adhäsivum eine Messreihe mit einer schnelleren und einer langsameren Bewegung durchgeführt und hierzu die Geschwindigkeiten $4 \mu\text{m/s}$ und $10 \mu\text{m/s}$ untersucht. Als repräsentatives Adhäsivum wurde eine angepasste Dosierung der Komponenten des Gewebeklebers BioGlue® (45 % BSA und 2,5 % Glutaraldehyd 4:1), welcher in der Arbeitsgruppe bereits ausführlich im Rahmen der Entwicklung des Push-Out-Tests untersucht wurde, verwendet ¹³⁹. Die Vorbereitung und Messung erfolgte entsprechend des zuvor festgelegten und erläuterten Prüfungsprotokolls.

Die Ergebnisse der Messreihen sind in Abb. 26 aufgezeigt. Wurde die Messung mit einer Geschwindigkeit von $4 \mu\text{m/s}$ durchgeführt, zeigte sich eine Adhäsionskraft von $27,8 \pm 11,9 \text{ kPa}$. Bei einer Messgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m/s}$ wurde eine Adhäsionskraft von $30,9 \pm 14,9 \text{ kPa}$ ermittelt. Statistisch war kein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den ermittelten Adhäsionskräften als auch zwischen der Höhe der Standardabweichungen eruiert. Die standardisierte Geschwindigkeit des Prüfungsprotokolls wurde schließlich auf $6 \mu\text{m/s}$ festgelegt.

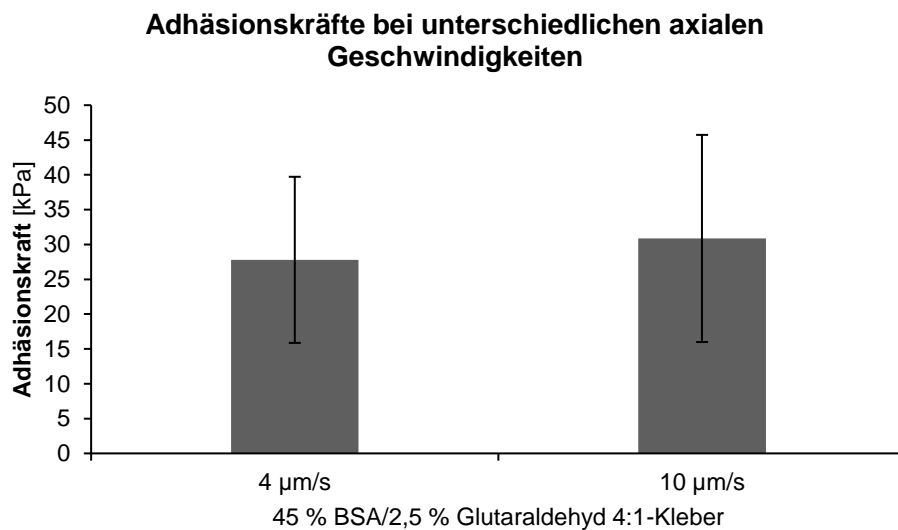


Abbildung 26: Adhäsionskräfte im Tensile-Test bei $4 \mu\text{m/s}$ und $10 \mu\text{m/s}$ mit Standardabweichungen. Es wurde ein Adhäsivum aus in ihrer Dosis und Konzentration angepassten BioGlue® Komponenten verwendet, welche zuvor bei der Entwicklung des Push-Out-Tests Anwendung fanden (45 % BSA und 2,5 % Glutaraldehyd 4:1) ¹³⁹. $4 \mu\text{m/s}$: $n=10$; $10 \mu\text{m/s}$: $n=9$.

Ergebnisse

4.4.3 Vergleich der Standardabweichungen beim Tensile- und Push-Out-Test

Ziel eines biomechanischen Modells ist es, möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Qualitätsmerkmal ist dabei vor allem eine niedrige Standardabweichung einer Messgruppe. Als Standardversuch wurde in der Arbeitsgruppe der Push-Out-Test verwendet und er diente als Referenz für den Tensile-Test. Um die Standardabweichungen der beiden Tests zu vergleichen, wurde jeweils eine Messreihe mit dem 4SG/4T-PEG-Kleber als Referenzadhäsivum durchgeführt. Die Messergebnisse sind zusammen mit den Standardabweichungen in Abb. 27 aufgeführt. Beim Tensile-Test war eine Standardabweichung von 25,9 kPa zu ermitteln. Diese lag beim Push-Out-Test mit 30,1 kPa etwas höher, insgesamt aber im selben Bereich. Die Anzahl der gemessenen Konstrukte waren pro Test mit 15 Messungen im Push-out- und 16 Messungen im Tensile-Test nahezu gleich und somit war eine direkte Vergleichbarkeit gegeben. Festhalten ließ sich, dass in Hinblick auf die Höhe der Standardabweichungen als Qualitätsmerkmal der Tensile-Test und Push-Out-Test als gleichwertig anzusehen sind.

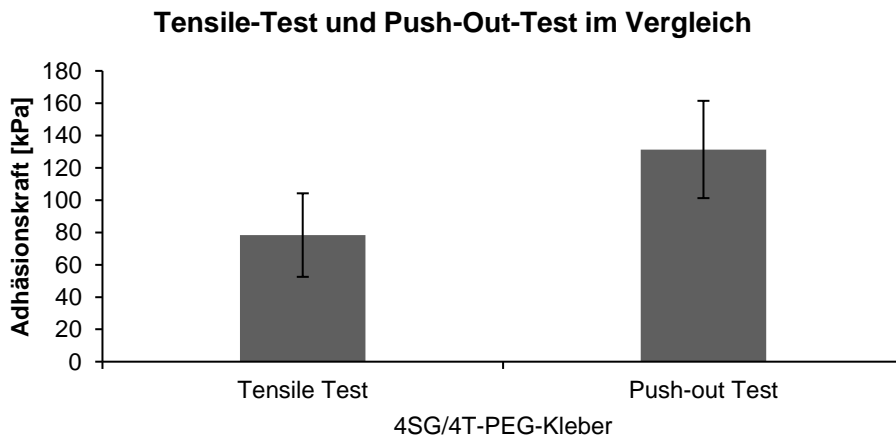


Abbildung 27: Vergleich der Standardabweichungen beim Tensile- und Push-Out-Test. Der 4SG/4T-PEG-Kleber wurde als Referenzadhäsivum verwendet. Die Standardabweichung des Tensile-Tests betrug 25,9 kPa und des Push-Out-Tests 30,1 kPa. Tensile-Test: $n=16$; Push-Out-Test: $n=15$.

4.4.2 Potenzielle Fehlerquellen beim Tensile-Test

Der Tensile-Test hatte sich als zuverlässiges Versuchsmodell mit hoher Reproduzierbarkeit erwiesen. Dennoch müssen potenzielle Fehlerquellen Erwähnung finden. In Abb. 28 ist links unten schematisch die Messkurve einer regelgerechten Kraftmessung abgebildet. Sie besteht aus einem rasch erreichten Spitzenwert mit im

Ergebnisse

Anschluss rapide abfallender Kraftkurve. Idealerweise ist von gleichen punktuellen Zugkräften an unterschiedlichen beliebigen Punkten der Klebefläche auszugehen ($F_1=F_2=F_3$). Realistisch ist jedoch von minimalen punktuellen Differenzen auszugehen ($F_1 \sim F_2 \sim F_3$), weshalb sich die zunächst steil abfallende Messkurve schließlich etwas abflacht, bis sie auf 0 kPa abfällt (Abb. 28: links). Erklärung hierfür können unter anderem kleine verbleibende Kleberfragmente bzw. -briden sein, welche sich erst nach weiterem Zug lösen.

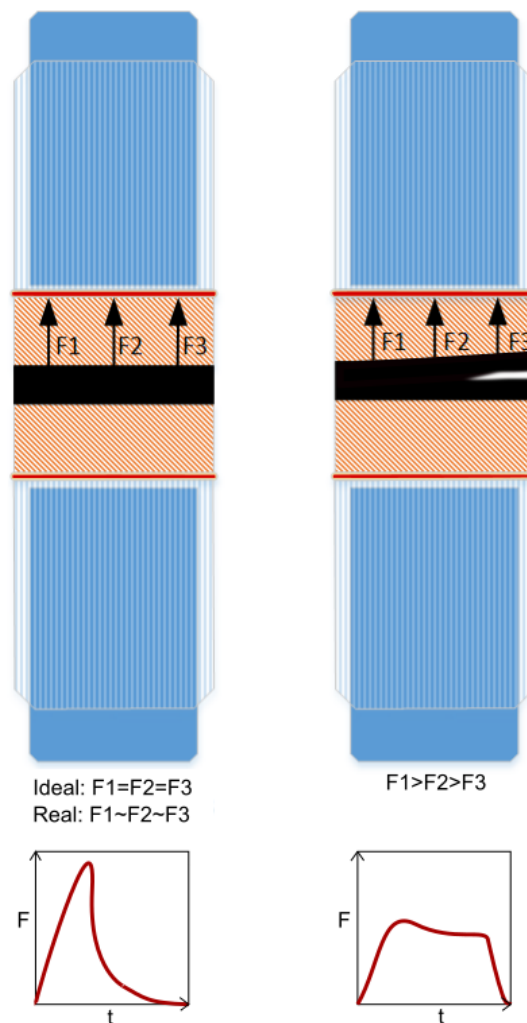


Abbildung 28: Die Wirkung der Zugkräfte im Tensile-Test und „Peeling“. Links: Schematische Darstellung einer regelrechten Messung im Tensile-Test. Die punktuell wirkenden Zugkräfte sind auf der Klebspaltoberfläche idealerweise gleich ($F_1=F_2=F_3$) und realistisch etwa gleich ($F_1 \sim F_2 \sim F_3$). Die Messkurve zeigt eine schnell erreichte Spitze mit schließlich rapidem Abfall. Mitte: Beim „Peeling“ sind die punktuellen Zugkräfte unterschiedlich groß. Die Messkurve erreicht keine eindeutige Spitze und erreicht ein charakteristisches Plateau. F =Adhäsionskraft, t =Zeit.

Ergebnisse

Ein in den Messkurven weniger Proben beobachtetes Phänomen war das Nichterreichen eines eindeutigen Spitzenwertes, wie in Abb. 28 unten mittig und rechts dargestellt. Stattdessen wurde ein lang persistierendes Messplateau erreicht. Bei genauerer Inspektion konnte als Ursache ein ungleichmäßiges Versagen der Kleberoberfläche identifiziert werden, welches als „Peeling“ bezeichnet wurde. Ursächlich hierfür sind auf physikalischer Ebene große Differenzen zwischen den punktuell wirkenden Zugkräften an unterschiedlichen Punkten der Kleberoberfläche ($F_1 > F_2 > F_3$), was schließlich zum besagten „Peeling“-Effekt führt. Um das Auftreten des „Peelings“ zu reduzieren, wurde akribisch auf eine korrekte Positionierung der Konstrukte im Versuchsaufbau geachtet. Dabei muss die Klebefläche perpendicular, also in möglichst perfektem rechtem Winkel zur wirkenden Zugkraft positioniert werden. Als Gegenversuch wurden Konstrukte gezielt leicht schief im Versuchsaufbau eingebracht, um ein „Peeling“ zu provozieren. Dies führte dann zu den für das „Peeling“ als typisch postulierten plateauartigen Messkurven. Letztlich wurde das Bild der „Peeling“-Messkurve als Ausschlusskriterium für eine valide Probenmessung festgelegt.

5 Diskussion

Das kommerziell erhältliche Adhäsivum CoSeal™ stellte mit seiner beschriebenen hohen Sofortadhäsionskraft einen interessanten Kandidaten für die Verwendung beim TE von Gelenkknorpel dar. Eine wissenschaftlich experimentelle Untersuchung dieses oder eines ähnlichen zweikomponentigen PEG-Adhäsivums war bis dato bei Anwendung zur lateralen Integration von Gelenkknorpel nicht erfolgt. Die gewonnenen ersten Ergebnisse wurden genutzt, um das Adhäsivum anzupassen. Neben den veränderten funktionellen Gruppen, wurde auch thioliertes HA als Komponente verwendet, um zu überprüfen, inwiefern dieses in Kombination mit PEG die Integration fördert. Die Ergebnisse aus Biomechanik und Histologie sollen nun in Kontext gebracht und diskutiert werden.

Das Sandwich-Modell und der Tensile-Test bieten neben dem Disc-Ring-Modell eine Alternative für die qualitativ hochwertige experimentelle Untersuchung von Gelenkknorpel. Es konnte für den Tensile-Test erfolgreich ein geeigneter Versuchsaufbau entwickelt werden. Die Ergebnisse aus den vergleichend mit dem Push-Out-Test durchgeführten Untersuchungen sollen nun ebenso diskutiert werden.

5.1 Sofortadhäsion

Erster Schritt dieser Arbeit war es, die Eignung der CoSeal™-Komponenten als Adhäsivum zur lateralen Gelenkknorpelintegration im Disc-Ring-Modell zu eruieren. Die von Wallace et al. eher nebenbei beschriebene Adhäsionskraft an einer Kollagenoberfläche konnte im Push-Out-Test an Gelenkknorpel verifiziert werden ¹¹⁷.

Um die ermittelten Werte besser einordnen zu können, muss man einen Blick auf die in der Arbeitsgruppe bereits im Push-Out-Test untersuchten Kleber werfen. Im Vergleich zu Fibrinkleber, welcher Initialadhäsionskräfte von 13.5 ± 3.9 kPa aufwies und dessen schwache Adhäsionskraft bereits in anderen Versuchen ermittelt wurde, waren die des 4SG/4T-PEG-Klebers mehr als neunmal so stark ¹⁴⁰⁻¹⁴². Als Beispiel für besonders starke Kleber ist BioGlue® zu nennen, welcher aus BSA und Glutaraldehyd besteht. Unter Anpassung der Komponenten (10 % Glutaraldehyd, Verhältnis 1:1) konnten im Push-Out-Test Maximaladhäsionskräfte von 239,2 kPa erreicht werden ¹³⁹. Die Adhäsionskraft des nichtmodifizierten BioGlue® selbst lag jedoch etwa im Bereich der CoSeal™-Komponenten ¹³⁹. Mit $131,4 \pm 30,1$ kPa ist die Initialadhäsion des 4SG/4T-PEG-Klebers also als hoch einzustufen.

Nach Substitution der 4T-Komponente mit HA-SH war die Initialadhäsion des Klebers mit $70,7 \pm 25,7$ kPa statistisch signifikant geringer. Bei der Untersuchung der Dynamik der Adhäsionskräfte in den ersten 24 h konnte jedoch gezeigt werden, dass die Klebekraft des 4SG/4T-PEG-Klebers bereits nach 45 min im wässrigen Medium nicht mehr signifikant höher als die des 4SG-PEG/HA-SH-Klebers war. Auch bei den Messungen nach 2 h und 24 h bestätigte sich diese Annäherung.

Um die Genese dieser doch recht rapiden Abnahme der Adhäsionskraft zu klären, wurde das Degradationsverhalten der beiden Kleber in flüssiger Umgebung untersucht. Dafür wurden zylindrische Klebergele in PBS getränkt und ihre Konsistenz regelmäßig beurteilt. Bereits nach 5 d hatte sich das 4SG/4T-PEG-Klebergel vollständig aufgelöst. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Wallace et al., welche eine vollständige Degradation nach mehreren 100 h beschrieben ¹¹⁷. Insgesamt schien es jedoch im Vergleich zu ähnlichen PEG-Hydrogelen schneller zu degradieren ^{117,143,144}. Zusammen mit der HA-SH-Komponente war der Kleber insgesamt etwas stabiler, hatte allerdings nach 16 d seine solide ursprüngliche Konfiguration verloren und war nach 19 d komplett degradiert. Da es sich dabei um eine makroskopische Untersuchung handelt, ist davon auszugehen, dass eine sich auf die Adhäsionskraft auswirkende Degradation bereits früher vorlag.

Diskussion

Der in diesem Versuch untersuchte degradierende Prozess war die Hydrolyse, welcher allgemein einer der wichtigsten bekannten Prozesse bei PEG- und HA-Hydrogelen darstellt^{145–148}. Um eine langsamere hydrolytische Degradation zu erreichen, wurde als primär reaktive Komponente des vierarmigen PEGs das Succinimidyl-Glutarat durch das Succinimidyl-Carbonat substituiert¹³⁸. Zusammen mit der thiofunktionalisierten HA entsteht so weiterhin eine Thioester-Bindung. Das vierarmige PEG-Thiol wurde durch ein vierarmiges PEG-Amin ersetzt, um so zusammen mit dem 4A-PEG eine stabilere Amid-Bindung zu erreichen. Der 4C/4A-PEG- und 4C-PEG/HA-SH-Kleber zeigten schließlich im Degradationsversuch eine über den Beobachtungszeitraum von 4 Wochen stabile Konfiguration, ohne makroskopischen Nachweis einer durch Hydrolyse bedingten Degradation. Die gemessene Initialadhäsion des 4C/4A-PEG-Adhäsivums war mit $91,8 \pm 37,9$ kPa statistisch gleichwertig mit der des 4SG/4T-PEG-Adhäsivums. Auch der 4C-PEG/HA-SH-Kleber war mit $67,3 \pm 23,9$ kPa statistisch auf demselben Niveau wie sein 4SG-PEG/HA-SH-haltiger Vergleichspartner.

5.1.1 Charakterisierung und Anpassung der Sofortadhäsion

Die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsiva kleben nach dualer Applikation mittels entsprechenden Applikators spontan und es ist keine Zugabe eines Katalysators oder Aktivators notwendig. Die Zeit bis zur adhäsiven Wirkung wird also durch die Reaktionszeit der verwendeten Komponenten miteinander und mit dem zu klebenden Substrat bestimmt. Bei adhäsiven Hydrogelen entspricht sie der Gelierungszeit und beträgt bei CoSeal™, als auch bei den angepassten Kompositionen, wenige Sekunden.

Durch *Veränderung des pH-Wertes* des T-Puffers kann sie relevant beeinflusst werden. Bei einem pH-Wert von 9,4 statt 9,6 beträgt sie bei CoSeal™ bereits 23 s und bei einem pH-Wert von 7 über 60 s¹¹⁷.

Auch die *Variation der Polymerkonzentration (w/v)* kann sich auf die Gelierungszeit auswirken. Jin et al. untersuchten ein weiteres, potenziell injizierbares PEG/HA-SH-Hydrogel¹⁴⁹. Als zweite Komponente wurde ein vierarmiges PEG-Vinylsulfon verwendet, welches mittels Michael-Addition mit HA-SH ein Hydrogel bildet. Je nach Variation der Polymerkonzentration (w/v) konnten Gelierungszeiten von <1 min bis 14 min erreicht werden. Auf die adhäsiven Eigenschaften wurde das Hydrogel allerdings nicht untersucht.

Die *Struktur des „crosslinkers“*, also der reaktiven Komponente, bestimmt die grundlegenden Gelierungseigenschaften, welche durch die eben genannten Parameter weiter angepasst werden können. Kroger et al. untersuchten verschiedene PEG-

Diskussion

„crosslinker“ und konnten nachweisen, dass diese in ihrer Struktur gezielt verändert werden können, um langsamere oder schnellere Gelierungszeiten zu erreichen ¹⁴⁴. So führt eine längere Kohlenwasserstoffkette oder die Integration einer zusätzlichen Methyl-Gruppe beispielsweise zu einer längeren Gelierungszeit ^{144,150}. Wichtig zu erwähnen ist, dass sich eine Veränderung der eben genannten Stellschrauben ebenso auf das Degradationsverhalten auswirken kann, was in dieser Arbeit veranschaulicht wurde.

Nichtspontanklebende Adhäsiva im Bereich des Gelenkknorpel-TE werden in der Regel mit UV-Licht aktiviert, also fotoaktiviert. Man spricht auch von einer Fotopolymerisation oder einem „photocrosslinking“ ¹⁵¹. Ein prominentes Beispiel ist die von Elisseff et al. entwickelte Chondroitinsulfat-/PEG-Kombination, welche bereits klinisch erprobt wird ^{116,130,152,153}. Die Applikation eines nichtspontanklebenden Adhäsivums umfasst mehrere Arbeitsschritte. So muss der nicht aktivierte Kleber zunächst aufgetragen werden. Im nächsten Schritt muss dieser mittels einer UV-Lichtquelle aktiviert werden, um seine adhäsive Wirkung zu entfalten. Relevant ist, dass UV-Licht und der Fotoinitiator potenziell zytotoxisch wirken können ^{154,155}. Dies bedeutet außerdem, dass mit der Lichtquelle zusätzliche für die medizintechnische Anwendung zugelassene Apparaturen notwendig sind. Bei spontanklebenden Adhäsiva beschränkt sich die Applikation nur auf einen Schritt. Bei CoSeal™ und den in dieser Arbeit angepassten Kompositionen ist die einfache Applikation mittels dualen Applikators möglich. Eine einfachere und schnellere Applikation kann in der klinischen Anwendung zu einer verkürzten Operationszeit führen, was wiederum das Risiko für mit prolongierter Operationszeit assoziierten Komplikationen, wie postoperativen Wundinfektionen, senken kann ¹⁵⁶.

5.2 Langzeitintegration

Nach den Versuchen zur Sofortadhäsion wurde schließlich Augenmerk auf die Langzeitintegration gelegt. Um eine suffiziente laterale Gelenkknorpelintegration zu erreichen, müssen mehrere dynamische Prozesse berücksichtigt werden. Die intrinsischen Prozesse und Eigenschaften des Adhäsivums müssen mit denen des Gelenkknorpels im Gleichgewicht stehen. Anders ausgedrückt, muss die zunächst bestehende initiale Adhäsionskraft im passenden zeitlichen Rahmen durch die Langzeitadhäsionskraft abgelöst werden. Die zunächst hohe und im Rahmen der Kleberdegradation abnehmende Adhäsionskraft muss also durch die fortschreitende Knorpelintegration wieder zunehmen.

Die intrinsischen Prozesse beinhalten im Wesentlichen das Degradationsverhalten des Adhäsivums. Wie bereits im Rahmen der Gelierungszeit bzw. Zeit bis zur adhäsiven Wirkung beschrieben, kann die Degradationszeit des adhäsiven Hydrogels durch Anpassung der chemischen Struktur beeinflusst werden. Bei den von Kroger et al. untersuchten PEG-„crosslinkern“ konnte gezeigt werden, dass die Länge der Kohlenwasserstoffkette und sterische Hinderung, beispielsweise durch Addition einer Methyl-Gruppe, zu einer langsameren Degradation führt, während zusätzliche elektronenziehende Gruppen diese beschleunigen¹⁴⁴. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass eine Verlängerung der Degradationszeit auch zu einer Verlängerung der Gelierungszeit führen kann, so dass ggf. eine Anpassung der zuvor genannten Gelierungsparameter nötig ist, um die gewünschten Eigenschaften zu erreichen.

Da sich CoSeal™ auch nach Inkorporation von HA-SH als zu schnell degradierend erwies, wurde 4C-PEG als in Verbindung stabilerer „crosslinker“ gewählt. Das PEG-Thiol wurde zudem durch ein PEG-Amin ersetzt, um eine stabilere Amid-Bindung zu erreichen. Das langsamere Degradationsverhalten konnte nicht nur makroskopisch im Degradationsversuch, sondern auch in den biomechanischen Versuchen bestätigt werden. Die Langzeitadhäsionskraft der herkömmlichen CoSeal™-Komposition konnte durch die genannte Substitution von $20,9 \pm 4,9$ kPa auf $40,2 \pm 15,5$ kPa verdoppelt werden. Auch in Kombination mit HA-SH konnte durch die Substitution des „crosslinkers“ eine signifikante Verbesserung der Langzeitadhäsionskraft von $17,4 \pm 5,6$ kPa auf $27,0 \pm 8,3$ kPa erzielt werden. Die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zu Fibrinkleber hatten Langzeitadhäsionskräfte von $108,9 \pm 46,2$ kPa ergeben, was eine deutliche Steigerung zur Initialadhäsionskraft darstellt¹⁴⁰. Histologisch kam dabei eine gute Knorpel-Knorpel-Integration zur Darstellung. Bei den in dieser Arbeit untersuchten

Adhäsiva ist im Gegensatz dazu eine Abnahme im Vergleich zur initialen Adhäsion zu beobachten. Die histologische Untersuchung zeigte, dass die gemessene Langzeitadhäsionskraft abhängig von der an Tag 21 vorliegenden Integrität der Klebermatrix war. Der 4C/4A-PEG-Kleber hatte die meisten Kleber-Knorpel-Kontakte und gleichzeitig die höchste Adhäsionskraft, während diese mit dem 4C/HA-SH-Kleber abnahm und der 4SG/HA-SH-Kleber mit der niedrigsten Adhäsionskraft auch die wenigsten Kontraktflächen und die geringste Integrität aufwies.

5.2.1 Die prointegrative Wirkung von Hyaluronsäure

Die histologische Untersuchung hat bestätigt, dass HA-SH als zweite Kleberkomponente Kollagen II- und Aggrecanproduktion als repräsentative EZM-Bestandteile in die Klebermatrix begünstigt, während die HA-SH-freie Komposition dies nicht zuließ. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Unterman et al., welche HA nichtkovalent in PEG-basierte Hydrogele inkorporierten und eine verbesserte Heilung von osteochondralen Defekten nachweisen konnten ¹⁵⁷.

Dass die Anwesenheit einer physiologischen Anzahl von Chondrozyten in zuvor zellarmen Arealen zur Erlangung einer funktionellen Integration führt und die Chondrozytenmigration einen wichtigen Faktor hierfür darstellt, konnte bereits experimentell bewiesen werden ¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Beginnende Chondrozytenmigration konnte in den histologischen Untersuchungen dieser Arbeit nur bei HA-SH-haltigen Klebern dargestellt werden. Es kann somit postuliert werden, dass HA eine migrationsfördernde Wirkung auf Chondrozyten hat, welche sicherlich auch mitverantwortlich für die nachgewiesene Aggrecan- und Kollagen II-Produktion ist.

Die Erkenntnisse über die integrationsfördernden Eigenschaften von Chondrozyten hat man sich auch im Bereich der Gelenkknorpeladhäsiva versucht, zu Nutze zu machen, indem man isolierte Chondrozyten in das Adhäsivum integriert ¹⁶². Eine solche Anpassung hat jedoch den deutlichen Nachteil, dass sich der Herstellungsaufwand, die Lagerungsfähigkeit, die Haltbarkeit und die Anwendbarkeit sowie auch Kosten eines entsprechenden Adhäsivums zum Negativen entwickeln. Idealerweise sollte ein Adhäsivum ein entsprechendes Milieu zur Migration von Chondrozyten aus dem vitalen Gelenkknorpelgewebe bieten.

Einen weiteren Hinweis auf die prointegrative Wirkung von HA liefert die hypointense Randzone, welche beim 4C/4A-PEG-Adhäsivum und weniger bei den HA-haltigen Adhäsiva zum Vorschein kam. Eine solche Zone wurde bereits in anderen Versuchen

beschrieben und wird als Folge des Schneidetraumas im Rahmen der Konstruktherstellung gewertet¹⁰⁵. Eine zytotoxisch bedingte Genese kann aufgrund der durchweg unauffälligen MTT-Assays aller Kleber als unwahrscheinlich betrachtet werden. Somit ist davon auszugehen, dass die Repopulation der hypointensen Zone auf die Anwesenheit von HA zurückzuführen ist.

Da eine hypozelluläre Randzone ein Hindernis zur Erlangung einer Integration darstellt, wurden bereits verschiedene Enzyme, wie beispielsweise Chondroitinase ABC, Kollagenase oder Trypsin zum Andau der Defektränder und hinsichtlich ihrer prointegrativen Wirkung untersucht^{108,163,164}. Zwar wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, inwiefern sich eine zusätzliche enzymatische Behandlung auf die Integration auswirkt, aber sie liefert Belege, dass die Repopulation auch ohne einen solchen zusätzlichen Schritt möglich ist. Dies ist auch im Sinne der zuvor diskutierten einfachen Anwendbarkeit von Vorteil.

5.2.2 Der Zusammenhang zwischen Degradation und Langzeitintegration

Trotz der nachgewiesenen EZM-Bestandteile in den HA-SH-Klebern konnte keine suffiziente Langzeitintegration erreicht werden. Zwar brachte der 4C-PEG-„crosslinker“ eine Besserung, die sich aber nicht auf einem Niveau mit dem Referenzadhäsivum Fibrin befindet. Das angepasste langsamere Degradationsverhalten scheint also nicht auszureichen, um die notwendige Langzeitintegration ausgehend vom Gelenkknorpel zu erzielen.

Eine mögliche Erklärung ist das komplexe Degradationsverhalten der adhäsiven Hydrogele in unmittelbarer Umgebung des Gelenkknorpels, welches sich von dem in Umgebung von reinem PBS unterscheiden kann. Reid et al. konnten zeigen, dass das Degradationsverhalten von PEG-Hydrogelen vom umgebenden Gewebe abhängig ist und entsprechend variiert¹⁶⁵. Hinzu kommen die allgemeinen Limitierungen eines in vitro Versuches, welcher eine kontrollierte idealisierte biochemische Umgebung darstellt, frei von unerwünschten mechanischen und enzymatischen Einflüssen.

Bei den HA-SH-haltigen Klebern kann des Weiteren die Hyaluronidase als HA-spaltendes Enzym, welches vom Gelenkknorpel exprimiert wird, eine weitere wichtige Rolle im Degradationsprozess spielen. Dafür spricht, dass beim 4C-PEG/HA-SH-Gel in PBS getränkt und somit hyaluronidasefreier Umgebung nach 28 d noch keine Degradation zu erkennen war, während das entsprechende Adhäsivum in der histologischen Untersuchung deutliche Zeichen der Degradation im Knorpelspalt

Diskussion

aufwies. Die Bioaktivität von HA ist stark vom Molekulargewicht und seinen Wechselwirkungen mit anderen EZM-Bestandteilen abhängig und es kann sowohl eine Hoch- als auch eine Runterregulation der Hyaluronidase Folge sein ^{157,166–168}. Über die genauen Abläufe kann nur spekuliert werden, da unklar bleibt, wie sich die im Adhäsivum kovalent gebundene HA in ihrem biologischen Verhalten im Vergleich zur natürlich vorkommenden HA verhält, wie bereits von Unterman et al. festgestellt wurde ¹⁵⁷.

Ein weiterer Faktor, welcher möglicherweise zur frühzeitigen Degradation der Adhäsiva im Klebespalt der Knorpelkonstrukte führen kann, ist deren Quellungsverhalten. Bei verschiedenen PEG-Klebern sind Quellungsraten von bis zu 400 % beschrieben ^{111,169}. Durch die begrenzten räumlichen Verhältnisse im Klebespalt kann es möglicherweise zu einem Herausquellen des Klebers kommen. Dies stellt zum einen eine zusätzliche mechanische Belastung dar, die möglicherweise zu Schäden innerhalb der Klebermatrix führt. Zum anderen bietet ein herausgequollener Kleber eine größere Oberfläche für potenziell degradierende Faktoren.

Die hier diskutierten Überlegungen veranschaulichen die Komplexität und Multimodalität des Zusammenspiels der intrinsischen und extrinsischen Prozesse der Knorpelintegration. Ein Schlüsselaspekt bei der Entwicklung eines Adhäsivums ist dessen Degradationsrate, welche auf die Integrationsrate des Gelenkknorpels abgestimmt sein muss.

5.2.3 Zytotoxizität

Eine zytotoxische Wirkung aller in dieser Arbeit untersuchten Kleberkompositionen konnte im MTT-Assay ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Arbeiten ^{117,149}. Limitierend muss an dieser Stelle natürlich erwähnt werden, dass es sich beim MTT-Assay um einen in vitro Versuch handelt. In vivo Versuche wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Somit ist eine Aussage bezüglich potenzieller anaphylaktischer oder immunologischer Reaktionen in vivo nicht abschließend möglich. Dennoch wurden CoSeal™ als auch andere PEG-haltige Adhäsiva und HA-haltige Konstrukte bereits ausführlich in vivo untersucht und es konnte eine suffiziente Verträglichkeit bestätigt werden ^{111,117,149,170}. Berichte über allergische Reaktionen auf PEG-haltige Komponenten gibt es nur in wenigen Einzelfällen ^{111,169}.

5.3 Das Sandwich-Modell und der Tensile-Test zur Messung der Zugkräfte

Bei der Entwicklung von Adhäsiva spielen nicht nur die biochemischen Eigenschaften eine wichtige Rolle. Je nach zu klebendem Gewebe müssen auch eine Reihe von physikalischen Eigenschaften gegeben sein. Um die physikalischen Belastungen standardisiert und reproduzierbar messen zu können, werden biomechanische Versuchsmodelle benötigt. Auf Gelenkknorpel wirken vor allem Druck-, Scher- und Zugkräfte. Das in der Arbeitsgruppe etablierte Disc-Ring-Modell ermöglicht mittels Push-Out-Test die Simulation der auf eine Gelenkfläche senkrecht wirkende Belastung und misst vor allem die Druckkraft, mit der ein Kleber bis zum Versagen belastet werden kann. Da in vivo auch Zugkräfte einen relevanten Anteil der Belastungen auf den Gelenkknorpel ausmachen, wurde in dieser Arbeit der Tensile-Test als biomechanisches Versuchsmodell etabliert.

5.3.1 Vergleich des Sandwich-Modells mit dem Disc-Ring-Modell

Die Präparation und Herstellung der beiden Knorpelscheiben, welche zusammengeklebt das Konstrukt des Modells ergeben, wurde aus dem Disc-Ring-Modell übernommen. Insgesamt ließ sich feststellen, dass die Herstellung der Disc-Ring-Konstrukte durch das zusätzliche Herausstanzen und zuvor Markieren der Disc sowie dessen akkurate Reimplantation in den Ring manuell anspruchsvoller und zeitintensiver war als die Herstellung der Sandwich-Konstrukte, bei der diese Schritte entfielen. Die spätere Vorbereitung und Durchführung der jeweiligen biomechanischen Tests waren in ihrem Anspruch an manuelles Geschick hingegen als gleich zu werten. Da ein geringerer Anspruch an die manuelle Geschicklichkeit sich positiv auf die Reproduzierbarkeit auswirkt, ist dies eine positiv zu erwähnende Annehmlichkeit des Sandwich-Modells. In Bezug auf die Messergebnisse hatten sich die ermittelten Standardabweichungen bei einem repräsentativen Kleber in beiden Tests als gleichwertig erwiesen.

Es stellt sich schließlich die Frage, warum trotz der vorteilhaften Aspekte das Sandwich-Modell, auch in dieser Arbeit, nicht als Standardmodell gewählt wurde. Diesbezüglich können mehrere Aspekte diskutiert werden. Zum einen wird für ein Konstrukt des Sandwich-Modells doppelt so viel Knorpel benötigt wie im Disc-Ring-Modell. Dies ist mit einer längeren Präparations- und Herstellungszeit verbunden, als auch höheren Materialkosten. Außerdem simuliert der Push-Out-Test die tatsächlich in vivo wirkenden Belastungskräfte realistischer, da sich der Tensile-Test auf die Zugkräfte beschränkt.

Nichtsdestotrotz nehmen das Sandwich-Modell und der Tensile-Test eine wichtige Rolle ein. Es sollte nicht unbedingt als Alternative zum Disc-Ring-Modell angesehen werden,

Diskussion

sondern vielmehr als Modell zur weiterführenden Untersuchung. Während sich das Disc-Ring-Modell als geeignetes Modell zur primären Untersuchung von Adhäsiva etabliert hat, können im Sandwich-Modell andere spezifische Fragestellungen untersucht werden. Die offensichtlichste mögliche Fragestellung ist dabei die Untersuchung der speziellen Zugkraft assoziierten Eigenschaften. Durch die sandwichartige Konfiguration der Konstrukte können die beiden geklebten Knorpelscheiben zudem einfach zusätzlich, beispielsweise mit einer chirurgischen Gefäßklammer, zusammengeklemt werden. Dies würde ohne viel zusätzlichen technischen Anspruch die Untersuchung von mechanischen Stimuli auf die regenerativen Prozesse ermöglichen, was sich im Disc-Ring-Modell schwieriger gestaltet. Der positive Einfluss solcher mechanischer Stimuli, welche in statischer und dynamischer Form in vivo stets prävalent sind, konnte bereits in mehreren Arbeiten belegt werden ¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Auch das Degradationsverhalten von PEG-Hydrogelen kann durch mechanische Reize beeinflusst werden, was die Notwendigkeit eines Versuchsmodells zur entsprechenden Untersuchung unterstreicht ¹⁷⁵.

Als Fazit festzuhalten ist, dass das Sandwich-Modell ein geeignetes, in seiner Reproduzierbarkeit mit dem Disc-Ring-Modell vergleichbares Modell darstellt, welches vor allem zur Untersuchung weiterführender spezifischer Fragestellungen geeignet ist.

5.4 Ausblick

Historisch betrachtet, hat sich das Feld der Bioadhäsiva enorm weiterentwickelt. Während sie ursprünglich primär für den Wundverschluss und zur Hämostase entwickelt wurden, gewinnen sie im Bereich des TE zunehmend an Bedeutung¹¹¹. Die Auswahl an bei der Entwicklung zur Verfügung stehenden Substrate wächst stetig und somit auch die möglichen Kombinationsmöglichkeiten. Des Weiteren entwickeln sich die Möglichkeiten der chemischen Modifikation ebenso weiter. Einige Substanzgruppen scheinen besonders vielversprechend zu sein und rücken in Zukunft womöglich mehr und mehr in den Fokus. Für die experimentelle Untersuchung dieser zunehmenden Quantität an Materialien werden effizientere Versuchsmodelle benötigt.

Eine dieser sich in der Entwicklung befindlichen Gruppen sind von der Natur inspirierte Adhäsiva. Die aktuell wohl prominentesten untersuchten Vertreter sind „mussel adhesive proteins“ (MAPs), welche für die starke Adhäsionskraft von Muscheln auf den verschiedensten Oberflächen in wässriger Umgebung verantwortlich sind. Die katecholhaltige Aminosäure L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) konnte als für die adhäsiven Eigenschaften hauptverantwortlicher Bestandteil der MAPs identifiziert werden^{176,177}. In einem biomechanischen Schermodell konnten Adhäsionskräfte über 200 kPa gemessen und selbst kommerziell erhältliche Cyanoakrylatkleber übertroffen werden¹⁷⁸. Da zur Gewinnung von 1 g L-DOPA jedoch 10.000 Muscheln benötigt werden, hat man sich zunehmend auf die synthetische Herstellung fokussiert¹⁷⁹. Auch die Funktionalisierung anderer Polymere mit MAPs wird untersucht. Messersmith et al. gelang es, L-DOPA funktionalisierte, lineare PEG-Hydrogele zu synthetisieren, welche in ihrem Degradationsverhalten modifizierbar sind¹⁸⁰⁻¹⁸². Auf Basis dieser Untersuchungen wurde ein Adhäsivum bestehend aus einem funktionalisierten vierarmigen PEG entwickelt und im Rahmen von extrahepatischer Inseltransplantation getestet. Neben nur minimaler Inflammation konnte in vivo eine gute, bis zu einem Jahr andauernde, Adhäsion nachgewiesen werden¹⁸³. Grundsätzlich ist eine Anwendung auch für Gelenkknorpel denkbar, da sich das verwendete Trägerpolymer in Form von einem vierarmigen PEG mit einem Molekulargewicht von 10 kDa nicht von dem in dieser Arbeit verwendeten PEG unterscheidet und die grundsätzliche Eignung belegt werden konnte. Speziell für die Anwendung an Gelenkknorpel fabrizierten Berberich et al. ein von den MAPs abgeleitetes adhäsives Hydrogel, bestehend aus katecholfunktionalisierten Poly(2-alkyl-2-oxazolin)-Polymeren und Fibrinogen¹⁸⁴. Die adhäsiven Eigenschaften wurden an porzinem Gelenkknorpel im Disc-Ring-Modell ermittelt. Neben Initialadhäsionskräften von $20,08 \pm 3,57$ kPa konnten

Diskussion

Langzeitadhäsionskräfte von 24.73 ± 11.66 kPa im Push-Out-Test gemessen werden. Histologisch konnten die prointegrativen Eigenschaften durch den Nachweis von Grad III-Integration bestätigt werden. Zytotoxische Wirkungen waren nicht nachweisbar. Insgesamt ist festzustellen, dass MAPs im Gelenkknorpel-TE bis dato nur wenig Anwendung erfahren haben, jedoch viel Potential aufweisen^{184–186}. Auch weitere maritime Organismen sowie Landtiere, wie beispielsweise Geckos, weisen erstaunliche adhäsive Eigenschaften auf und die experimentelle Charakterisierung dieser Stoffe und Ermittlung potenzieller Anwendungsgebiete sind Gegenstand der aktuellen Forschung^{111,187–189}.

Die Inkorporation von chemotaktischen Agenzien in den Kleber ist keine grundsätzlich neue Idee und ein EZM-produktionsstimulierender Effekt verschiedener Stoffe konnte bereits nachgewiesen werden^{36,105,106}. Auch wenn die Beantwortung der Frage nach der prointegrativen Wirkung dieser bereits untersuchten Agenzien speziell bei PEG-Klebern noch aussteht, werden bereits Untersuchungen zu neuen prointegrativen Faktoren durchgeführt. Eine vielversprechende Idee ist die Inkorporation von Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in den Kleber, wie es bereits in anderen HA- und PEG-basierten Hydrogelen durchgeführt wurde^{157,168,190–193}.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass sich solche das Adhäsivum verkomplizierende Weiterentwicklungen, wie bereits an anderer Stelle diskutiert, negativ auf die intraoperative Anwendbarkeit, die Lagerungseigenschaften und den Preis auswirken können. Die frühe Definition der intraoperativen Anwendung ist außerdem von großer Bedeutung, da sie die Grundeigenschaften des Adhäsivums bestimmt. An ein im Rahmen einer Arthroskopie in flüssiger Umgebung zu applizierendes Adhäsivum müssen deutlich andere Ansprüche gestellt werden als an eines, welches im Rahmen einer offen chirurgischen Operation appliziert wird. Erfolgt diese frühzeitige Definition nicht, kann es möglicherweise zu Fehlentwicklungen kommen, welche zu spät erkannt werden könnten. Zukünftig müssen bei der Entwicklung diese Aspekte berücksichtigt werden, da sonst eine Kommerzialisierung eines Produktes unrealistisch erscheint.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, inwiefern in Zukunft eine Trennung zwischen Adhäsivum und Scaffold bzw. Implantat notwendig ist. Gerade PEG-basierte Scaffolds sind als adhäsive Hydrogele ein gutes Beispiel dafür, wie beide Eigenschaften kombiniert werden können. Ein ähnlicher Ansatz ist die Beschichtung von Implantaten mit funktionalen, adhäsiv wirkenden Gruppen, wie beispielsweise das „collagen adhesion protein“ (CNA), wie es Allon et al. mit einem Polyvinylalkohol-Implantat

Diskussion

durchführten ¹⁹⁴. Die MAPs scheinen hierfür ebenso interessante Kandidaten zu sein, wie Han et al. mit der Funktionalisierung von Chondroitinsulfat mit einem MAP zeigen konnten ¹⁹⁵. Vorteil dieser Herangehensweise wäre der Wegfall eines zusätzlichen Arbeitsschrittes. Außerdem würde die zusätzliche Implantat-Kleber-Grenzfläche entfallen und nur noch eine Grenzfläche zwischen Implantat und Knorpel bestehen, welche integriert werden muss. Auch die zusätzlichen möglichen immunologischen Reaktionen bzw. zytotoxischen Wirkungen des Adhäsivums oder dessen Abbauprodukte würden keine Rolle mehr spielen. Diese vielversprechende Gruppe wird auch als „adhesive tissue engineered scaffolds“ (ATEs) bezeichnet ¹²⁷. Von 3D-gedruckten ATEs verspricht man sich zudem eine auf das native Gewebe zugeschnittene Struktur erreichen zu können, indem die Vorteile verschiedener funktionaler Komponenten und Zellpopulationen kombiniert werden ¹²⁷.

Gerade der Blick in die Zukunft offenbart, dass die Quantität an potentiellen adhäsiven Substanzen als auch die technischen Möglichkeiten und die damit potentiellen Anwendungsformen, sei es als eigenständiges Adhäsivum oder in Form einer adhäsiven funktionalen Gruppe, enorm ist. Dies bedeutet auch, dass neben den klassischen wissenschaftlichen Anforderungen an ein biomechanisches Versuchsmodell auch weitere, insbesondere ökonomische Anforderungen zusätzlich von Bedeutung sind. Um mehr Testungen zu ermöglichen, spielt ein kosteneffizienter Einsatz der Forschungsmittel eine bedeutende Rolle. Von Vorteil sind hier unter anderem wiederverwendbare Materialien, wie sie beim entwickelten Tensile-Test größtenteils genutzt werden. Außerdem wird der effiziente Einsatz der nicht wiederverwendbaren Materialien, vor allem des bovinen Gelenkknorpels weiter optimiert werden. Allerdings sollte nicht nur der quantitative, sondern auch der qualitative Datengewinn berücksichtigt werden. Damit ist im Falle von Gelenkknorpel nicht nur die Optimierung der Reproduzierbarkeit, sondern auch der Testmethodik gemeint, um die komplexen, auf ein Gelenk wirkenden Kräfte zu simulieren, was wie zuvor diskutiert signifikante Auswirkungen auf die Ergebnisse haben kann.

Wie wichtig diese Optimierungen sind, kann man anhand von PEG verdeutlichen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich vierarmige PEG-Moleküle eines gleichen Molekulargewichts mit gleicher Substitution, gleichen Puffern und zwei unterschiedlichen funktionalen Gruppen verwendet. Speziell das 4C-PEG hat bis dato kaum Anwendung erfahren. Auf dem Markt sind aktuell dutzende ähnliche PEG-Konfigurationen erhältlich. Die Anpassungs- und Kombinationsmöglichkeiten sind so zahlreich, dass es kaum

Diskussion

möglich ist, alleine eine grundlegende Charakterisierung der entsprechenden Hydrogele durchzuführen. Um jedoch die Entwicklungen auf dem Gebiet des TE für Gelenkknorpel voranzutreiben, ist es umso wichtiger, größere Versuchsreihen durchzuführen, da sich schon eine kleine Anpassung signifikant auf die Klebereigenschaften auswirken kann. Möglich ist dies nur mit entsprechenden Versuchsmodellen, wofür diese Arbeit einen Beitrag geleistet hat.

6 Zusammenfassung

Gelenkknorpel besitzt aufgrund seiner avaskulären Natur und der fehlenden mitotischen Aktivität der Chondrozyten bei Schäden kaum Potential zur Selbstheilung. Traumatische Läsionen und degenerative Veränderungen münden im Krankheitsbild der Osteoarthritis, welches mit dem Untergang des Gelenkknorpels einhergeht. Ein neuerer Therapieansatz ist das Tissue Engineering von Gelenkknorpel, wobei jedoch die laterale Integration der Implantate mit dem nativen Knorpelgewebe problematisch bleibt. Ein Adhäsivum kann neben einer adäquaten Sofortadhäsion die Langzeitintegration fördern.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Polyethylenglykol (PEG)-basierte Zweikomponentenkleber, ausgehend vom kommerziell erhältlichen Gewebekleber CoSeal™, auf ihre Eignung für Gelenkknorpel untersucht. Dabei wurde Hyaluronsäure (HA) als physiologischer Bestandteil von Gelenkknorpel in thiolierter Form (HA-SH) als Komponente verwendet und auf seine prointegrativen Eigenschaften untersucht.

Der den CoSeal™-Komponenten entsprechende 4-Succinimidyl-Glutarat/4-Thiol-PEG (4SG/4T-PEG)-Kleber hatte sich trotz seiner hohen Sofortadhäsionskraft auch nach der Substitution des 4T-PEG mit HA-SH als zu schnell in flüssiger Umgebung degradierend gezeigt, um eine suffiziente Langzeitintegration zu erreichen. Durch die Verwendung der langsamer degradierenden funktionellen 4-Succinimidyl-Carbonat-PEG (4C-PEG)-Komponente konnte die Langzeitadhäsionskraft in Kombination mit 4-Amin-PEG (4A-PEG) durch die stabilere Amid-Bindung zum einen und in Kombination mit HA-SH zum anderen signifikant gesteigert werden. Immunhistochemisch konnten bei beiden HA-haltigen Klebern Zeichen von Knorpelintegration nachgewiesen werden, während der 4C/4A-PEG-Kleber keine Integrationszeichen aufwies. Im 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT)-Assay war bei keinem Adhäsivum eine zytotoxische Wirkung zu erkennen.

Insgesamt bieten die untersuchten PEG-basierten Adhäsiva im Vergleich zu den weitverbreiteten Fibrinklebern eine deutlich höhere Sofortadhäsion, welche vergleichbar mit glutaraldehydbasierten Klebern ist. Allerdings können die initialen adhäsiven Kräfte, trotz histologisch nachweisbaren Integrationszeichen bei Inkorporation von HA, nicht langfristig aufrechterhalten werden, so dass Fibrinkleber weiterhin die Spitzengruppe in Sachen Langzeitadhäsion bilden. Da PEG eine ausgezeichnete Biokompatibilität, einfache Anwendbarkeit und zahlreiche weitere chemische Anpassungsmöglichkeiten

Zusammenfassung

zur Feinabstimmung der Degradationseigenschaften bietet, ist in Zukunft ein erfolgreicher Einsatz auch im Bereich von Gelenkknorpel denkbar.

Für die experimentelle Untersuchung von Adhäsiva und Gelenkknorpel werden biomechanische Versuchsmodelle benötigt. Der Tensile-Test des Sandwich-Modells konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert und ein Protokoll festgelegt werden. In einem vergleichenden Versuch mit dem Push-Out-Test des Disc-Ring-Modells, welches als Referenzmodell dient, konnte in Bezug auf die Reproduzierbarkeit und Qualität der Messergebnisse die Gleichwertigkeit gezeigt werden. Insgesamt bietet er eine gute Alternative zum Push-Out-Test, um weiterführende Fragestellung, wie z.B. extrinsische Kraftwirkungen auf das Konstrukt, zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

1. Mow, V. C., Ratcliffe, A. & Poole, A. R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**, 67–97 (1992).
2. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health* **1**, 461–8 (2009).
3. Armiento, A. R., Stoddart, M. J., Alini, M. & Eglin, D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomaterialia* **65**, 1–20 (2018).
4. Mow, V. C., Kuei, S. C., Lai, W. M. & Armstrong, C. G. Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments. *Journal of Biomechanical Engineering* **102**, 73 (1980).
5. Zhu, W., Mow, V. C., Koob, T. J. & Eyre, D. R. Viscoelastic shear properties of articular cartilage and the effects of glycosidase treatments. *Journal of Orthopaedic Research* **11**, 771–781 (1993).
6. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. *Taschenlehrbuch Histologie*. (Georg Thieme Verlag, 2019).
7. Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *Journal of anatomy* **138 (Pt 1)**, 113–38 (1984).
8. Aydelotte, M. B., Greenhill, R. R. & Kuettner, K. E. Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connective tissue research* **18**, 223–34 (1988).
9. Malda, J., Benders, K. E. M., Klein, T. J., de Grauw, J. C., Kik, M. J. L., Hutmacher, D. W., Saris, D. B. F., van Weeren, P. R. & Dhert, W. J. A. Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthritis and cartilage* **20**, 1147–51 (2012).
10. Schumacher, B. L., Block, J. A., Schmid, T. M., Aydelotte, M. B. & Kuettner, K. E. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Archives of biochemistry and biophysics* **311**, 144–52 (1994).
11. Clark, J. M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **9**, 246–57 (1991).
12. Zhang, Y., Wang, F., Tan, H., Chen, G., Guo, L. & Yang, L. Analysis of the mineral composition of the human calcified cartilage zone. *International Journal of Medical Sciences* **9**, 353–360 (2012).
13. Fawns, H. T. & Landelss, J. W. Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage. *Annals of the rheumatic diseases* **12**, 105–13 (1953).

Literaturverzeichnis

14. Alexopoulos, L. G., Setton, L. A. & Guilak, F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomaterialia* **1**, 317–325 (2005).
15. Egli, P. S., Herrmann, W., Hunziker, E. B. & Schenk, R. K. Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *The Anatomical record* **211**, 246–57 (1985).
16. Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A. & Rosenberg, L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *The Journal of cell biology* **93**, 921–37 (1982).
17. Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **5**, 509–22 (1987).
18. Poole, C. A., Ayad, S. & Schofield, J. R. Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of cell science* **90 (Pt 4)**, 635–43 (1988).
19. Guilak, F., Alexopoulos, L. G., Upton, M. L., Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A. & Haider, M. A. The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1068**, 498–512 (2006).
20. Guilak, F. & Mow, V. C. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *Journal of biomechanics* **33**, 1663–73 (2000).
21. Mow, V. C. & Guo, X. E. Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. *Annual Review of Biomedical Engineering* **4**, 175–209 (2002).
22. Hunziker, E. B., Michel, M. & Studer, D. Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microscopy research and technique* **37**, 271–84 (1997).
23. Alford, J. W. & Cole, B. J. Cartilage Restoration, Part 1. *The American Journal of Sports Medicine* **33**, 295–306 (2005).
24. Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* **47**, 477–86 (1998).
25. Woo, S. L.-Y. & Buckwalter, J. A. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *Journal of Orthopaedic Research* **6**, 907–931 (1988).
26. Torzilli, P. A., Grigiene, R., Borrelli, J. & Helfet, D. L. Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. *Journal of biomechanical engineering* **121**, 433–41 (1999).
27. Lawrence, R. C., Felson, D. T., Helmick, C. G., Arnold, L. M., Choi, H., Deyo, R. A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M. C., Hunder, G. G., Jordan, J. M., Katz, J. N., Kremers, H. M., Wolfe, F. & National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States:

Literaturverzeichnis

- Part II. *Arthritis & Rheumatism* **58**, 26–35 (2008).
28. Flanigan, D. C., Harris, J. D., Trinh, T. Q., Siston, R. A. & Brophy, R. H. Prevalence of Chondral Defects in Athletes' Knees. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **42**, 1795–1801 (2010).
 29. Tanchev, P. Osteoarthritis or Osteoarthrosis: Commentary on Misuse of Terms. *Reconstructive Review* **7**, (2017).
 30. Dwyer, T., Martin, C. R., Kendra, R., Sermer, C., Chahal, J., Ogilvie-Harris, D., Whelan, D., Murnaghan, L., Nauth, A. & Theodoropoulos, J. Reliability and Validity of the Arthroscopic International Cartilage Repair Society Classification System: Correlation With Histological Assessment of Depth. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* **33**, 1219–1224 (2017).
 31. Outerbridge, R. E. The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery* **43-B**, 752–757 (1961).
 32. Brittberg, M. & Winalski, C. S. Evaluation of cartilage injuries and repair. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* **85**, 58–69 (2003).
 33. Niemeyer, P., Pestka, J. M., Erggelet, C., Steinwachs, M., Salzman, G. M. & Sdkamp, N. P. Comparison of Arthroscopic and Open Assessment of Size and Grade of Cartilage Defects of the Knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* **27**, 46–51 (2011).
 34. Vignon, E., Arlot, M., Patricot, L. M. & Vignon, G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clinical orthopaedics and related research* **121**, 303–308 (1976).
 35. Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R. A., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Bayliss, M. T., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P. & Tekoppele, J. M. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *The Biochemical journal* **350 Pt 2**, 381–7 (2000).
 36. Boushell, M. K., Hung, C. T., Hunziker, E. B., Strauss, E. J. & Lu, H. H. Current strategies for integrative cartilage repair. *Connective Tissue Research* **58**, 393–406 (2017).
 37. Ogata, K. & Whiteside, L. A. Barrier to material transfer at the bone-cartilage interface: measurement with hydrogen gas in vivo. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **145**, 273–276 (1979).
 38. Lane, L. B. & Bullough, P. G. Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **62**, 372–5 (1980).
 39. Borgohain, B., Kumar, B., Muthusamy, M., Sathyanarayana, V. & Balasubramanian, S. Risks of concomitant trauma to the knee in lower limb long bone shaft fractures: A retrospective analysis from a prospective study population. *Advanced Biomedical Research* **3**, 49 (2014).
 40. Jiménez, G., Cobo-Molinos, J., Antich, C. & López-Ruiz, E. Osteoarthritis: Trauma vs Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1059**, 63–83 (2018).
 41. Furukawa, T., Eyre, D. R., Koide, S. & Glimcher, M. J. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **62**, 79–89 (1980).

Literaturverzeichnis

42. Nehrer, S., Spector, M. & Minas, T. Histologic Analysis of Tissue After Failed Cartilage Repair Procedures. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **365**, 149–162 (1999).
43. Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I. & Rodeo, S. A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine* **36**, 413–425 (2017).
44. Jackson, D. W., Lalor, P. A., Aberman, H. M. & Simon, T. M. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **83**, 53–64 (2001).
45. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* **10**, 432–463 (2002).
46. Mankin, H. J. The response of articular cartilage to mechanical injury. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **64**, 460–6 (1982).
47. Lohmander, L. S., Dahlberg, L., Ryd, L. & Heinegård, D. Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury. *Arthritis & Rheumatism* **32**, 1434–1442 (1989).
48. Brown, T. D., Johnston, R. C., Saltzman, C. L., Marsh, J. L. & Buckwalter, J. A. Posttraumatic Osteoarthritis: A First Estimate of Incidence, Prevalence, and Burden of Disease. *Journal of Orthopaedic Trauma* **20**, 739–744 (2006).
49. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**, 230–237 (2010).
50. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 1697–1707 (2012).
51. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.-P. & Roughley, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **22**, 351–384 (2008).
52. Billingham, R. C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H. & Poole, A. R. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 1534–1545 (1997).
53. Troeberg, L. & Nagase, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta* **1824**, 133 (2012).
54. Xia, B., Di Chen, D., Zhang, J., Hu, S., Jin, H. & Tong, P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcified tissue international* **95**, 495–505 (2014).
55. Mort, J. S. & Billington, C. J. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Research* **3**, 337 (2001).
56. Zhen, G. *et al.* Inhibition of TGF- β signaling in subchondral bone mesenchymal stem cells attenuates osteoarthritis. *Nature medicine* **19**, 704 (2013).
57. Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**, 597–604 (2007).

Literaturverzeichnis

58. Vincent, T. L. & Watt, F. E. Osteoarthritis. *Medicine* **42**, 213–219 (2014).
59. Sacitharan, P. K. Ageing and osteoarthritis. *Subcellular Biochemistry* **91**, 123–159 (2019).
60. Hawker, G. A., Stewart, L., French, M. R., Cibere, J., Jordan, J. M., March, L., Suarez-Almazor, M. & Gooberman-Hill, R. Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis – an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, 415–422 (2008).
61. Abramoff, B. & Caldera, F. E. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Medical Clinics of North America* **104**, 293–311 (2020).
62. Kohn, M. D., Sassoon, A. A. & Fernando, N. D. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **474**, 1886–1893 (2016).
63. Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **16**, 494–502 (1957).
64. Potter, H. G., Linklater, J. M., Allen, A. A., Hannafin, J. O. A. & Haas, S. B. Magnetic Resonance Imaging of Articular Cartilage in the Knee. An Evaluation with Use of Fast-Spin-Echo Imaging. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **80**, (1998).
65. Lohmander, L. S., Englund, P. M., Dahl, L. L. & Roos, E. M. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: Osteoarthritis. *American Journal of Sports Medicine* **35**, 1756–1769 (2007).
66. Menashe, L., Hirko, K., Losina, E., Kloppenburg, M., Zhang, W., Li, L. & Hunter, D. J. The diagnostic performance of MRI in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* **20**, 13–21 (2012).
67. Hunter, D. J., Arden, N., Conaghan, P. G., Eckstein, F., Gold, G., Grainger, A., Guermazi, A., Harvey, W., Jones, G., Hellio Le Graverand, M. P., Laredo, J. D., Lo, G., Losina, E., Mosher, T. J., Roemer, F. & Zhang, W. Definition of osteoarthritis on MRI: results of a Delphi exercise. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**, 963–969 (2011).
68. Shmerling, R. H., Fuchs, H. A., Lorish, C. D., Nichols, L. A., Partridge, A. J., Sanchez-Guerrero, J., Sands, R. A. & Liang, M. H. Guidelines for the initial evaluation of the adult patient with acute musculoskeletal symptoms. *Arthritis & Rheumatism* **39**, 1–8 (1996).
69. Michael, J. W. P., Schlüter-Brust, K. U. & Eysel, P. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Deutsches Arzteblatt International* **107**, 152 (2010).
70. Gibson, J. N., White, M. D., Chapman, V. M. & Strachan, R. K. Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **74**, 534–7 (1992).
71. Ogilvie-Harris, D. J. & Jackson, R. W. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **66**, 660–5 (1984).
72. McLaren, A. C., Blokker, C. P., Fowler, P. J., Roth, J. N. & Rock, M. G. Arthroscopic débridement of the knee for osteoarthrosis. *Canadian journal of*

Literaturverzeichnis

- surgery. Journal canadien de chirurgie* **34**, 595–8 (1991).
73. Moseley, J. B., O'Malley, K., Petersen, N. J., Menke, T. J., Brody, B. A., Kuykendall, D. H., Hollingsworth, J. C., Ashton, C. M. & Wray, N. P. A Controlled Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine* **347**, 81–88 (2002).
 74. Harwin, S. F. Arthroscopic Debridement for Osteoarthritis of the Knee: Predictors of Patient Satisfaction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* **15**, 142–146 (1999).
 75. Sledge, S. L. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clinics in sports medicine* **20**, 365–77 (2001).
 76. Alford, J. W. & Cole, B. J. Cartilage Restoration, Part 2: Techniques, Outcomes, and Future Directions. *The American Journal of Sports Medicine* **33**, 443–460 (2005).
 77. Chubinskaya, S., Haudenschild, D., Gasser, S., Stannard, J., Krettek, C. & Borrelli, J. Articular Cartilage Injury and Potential Remedies. *Journal of Orthopaedic Trauma* **29**, S47–S52 (2015).
 78. Hangody, L. & Füles, P. Autologous Osteochondral Mosaicplasty For The Treatment Of Full-Thickness Defects Of Weight-Bearing Joints. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* **85**, 25–32 (2003).
 79. Tomford, W. W., Springfield, D. S. & Mankin, H. J. Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopedics* **15**, 1183–8 (1992).
 80. Stevenson, S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **69**, 573–82 (1987).
 81. Homminga, G. N., Bulstra, S. K., Kuijer, R. & van der Linden, A. J. Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondrial graft. *Acta orthopaedica Scandinavica* **62**, 415–8 (1991).
 82. Angermann, P., Riegels-Nielsen, P. & Pedersen, H. Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation. Poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years. *Acta orthopaedica Scandinavica* **69**, 595–7 (1998).
 83. Homminga, G. N., Bulstra, S. K., Bouwmeester, P. S. & van der Linden, A. J. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **72**, 1003–7 (1990).
 84. Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Åkerlund, E. L. & Lindahl, A. Autologous Chondrocyte Transplantation. *The American Journal of Sports Medicine* **30**, 2–12 (2002).
 85. Browne, J. E., Anderson, A. F., Arciero, R., Mandelbaum, B., Moseley, J. B., Micheli, L. J., Fu, F. & Erggelet, C. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clinical orthopaedics and related research* **436**, 237–45 (2005).
 86. Gooding, C. R., Bartlett, W., Bentley, G., Skinner, J. A., Carrington, R. & Flanagan, A. A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *The Knee* **13**, 203–10 (2006).

Literaturverzeichnis

87. Cherubino, P., Grassi, F., Bulgheroni, P. & Ronga, M. Autologous Chondrocyte Implantation Using a Bilayer Collagen Membrane: A Preliminary Report. *Journal of Orthopaedic Surgery* **11**, 10–15 (2003).
88. Gomoll, A. H., Probst, C., Farr, J., Cole, B. J. & Minas, T. Use of a type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *The American journal of sports medicine* **37 Suppl 1**, 20S-23S (2009).
89. Knutsen, G., Drogset, J. O., Engebretsen, L., Grøntvedt, T., Isaksen, V., Ludvigsen, T. C., Roberts, S., Solheim, E., Strand, T. & Johansen, O. A Randomized Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture Findings at Five Years. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* **89**, 2105 (2007).
90. Saris, D. B. F. *et al.* Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Structural Repair When Treating Symptomatic Cartilage Defects of the Knee in a Randomized Controlled Trial versus Microfracture. *The American Journal of Sports Medicine* **36**, 235–246 (2008).
91. Dozin, B., Malpeli, M., Cancedda, R., Bruzzi, P., Calcagno, S., Molfetta, L., Priano, F., Kon, E. & Marcacci, M. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine* **15**, 220–6 (2005).
92. Bekkers, J. E. J., Inklaar, M. & Saris, D. B. F. Treatment Selection in Articular Cartilage Lesions of the Knee. *The American Journal of Sports Medicine* **37**, 148–155 (2009).
93. Minas, T., Gomoll, A. H., Rosenberger, R., Royce, R. O. & Bryant, T. Increased Failure Rate of Autologous Chondrocyte Implantation after Previous Treatment with Marrow Stimulation Techniques. *The American Journal of Sports Medicine* **37**, 902–908 (2009).
94. Schinhan, M., Gruber, M., Dorotka, R., Pilz, M., Stelzeneder, D., Chiari, C., Rössler, N., Windhager, R. & Nehrer, S. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation in a compartmentalized early stage of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **21**, 217–225 (2013).
95. Caron, M. M. J., Emans, P. J., Coolsen, M. M. E., Voss, L., Surtel, D. A. M., Cremers, A., van Rhijn, L. W. & Welting, T. J. M. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and cartilage* **20**, 1170–8 (2012).
96. Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature reviews. Rheumatology* **11**, 21–34 (2015).
97. Bartlett, W., Skinner, J. A., Gooding, C. R., Carrington, R. W. J., Flanagan, A. M., Briggs, T. W. R. & Bentley, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **87**, 640–5 (2005).
98. Zeifang, F., Oberle, D., Nierhoff, C., Richter, W., Moradi, B. & Schmitt, H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover

Literaturverzeichnis

- technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *The American journal of sports medicine* **38**, 924–33 (2010).
99. Basad, E., Ishaque, B., Bachmann, G., Stürz, H. & Steinmeyer, J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* **18**, 519–27 (2010).
 100. Shapiro, F., Koide, S. & Glimcher, M. J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **75**, 532–553 (1993).
 101. Khan, I., Gilbert, S., Singhrao, S., Duance, V. & Archer, C. Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *European Cells and Materials* **16**, 26–39 (2008).
 102. Hunziker, E. B. & Quinn, T. M. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **85-A Suppl 2**, 85–92 (2003).
 103. Redman, S. N., Dowthwaite, G. P., Thomson, B. M. & Archer, C. W. The cellular responses of articular cartilage to sharp and blunt trauma. *Osteoarthritis and cartilage* **12**, 106–16 (2004).
 104. Tew, S. R., Kwan, A. P. L., Hann, A., Thomson, B. M. & Archer, C. W. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: Role of apoptosis. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 215–225 (2000).
 105. McGregor, A. J., Amsden, B. G. & Waldman, S. D. Chondrocyte repopulation of the zone of death induced by osteochondral harvest. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**, 242–248 (2011).
 106. Mishima, Y. & Lotz, M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**, 1407–12 (2008).
 107. Qiu, W., Murray, M. M., Shortkroff, S., Lee, C. R., Martin, S. D. & Spector, M. Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **8**, 383–91.
 108. Bos, P. K., DeGroot, J., Budde, M., Verhaar, J. A. N. & van Osch, G. J. V. M. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: Implications for integrative cartilage repair. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 976–985 (2002).
 109. Janssen, L. M., In der Maur, C. D., Bos, P. K., Hardillo, J. A. & van Osch, G. J. V. M. Short-duration enzymatic treatment promotes integration of a cartilage graft in a defect. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* **115**, 461–8 (2006).
 110. Quinn, T. M. & Hunziker, E. B. Controlled Enzymatic Matrix Degradation for Integrative Cartilage Repair: Effects on Viable Cell Density and Proteoglycan Deposition. *Tissue Engineering* **8**, 799–806 (2002).
 111. Mehdizadeh, M. & Yang, J. Design Strategies and Applications of Tissue Bioadhesives. *Macromolecular Bioscience* **13**, 271–288 (2013).

Literaturverzeichnis

112. Ebnesajjad, S. & Landrock, A. *Adhesives technology handbook*. (William Andrew Publishing, 2014).
113. Kinloch, A. *Adhesion and adhesives: science and technology*. (Springer Dordrecht, 2012).
114. Lenaerts, V. & Gurny, R. *Bioadhesive drug delivery systems*. (CRC Press, 1989).
115. Derjaguin, B. V., Toporov, Y. P., Muller, V. M. & Aleinikova, I. N. On the relationship between the electrostatic and the molecular component of the adhesion of elastic particles to a solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science* **58**, 528–533 (1977).
116. Wang, D.-A., Varghese, S., Sharma, B., Strehin, I., Fermanian, S., Gorham, J., Fairbrother, D. H., Cascio, B. & Elisseeff, J. H. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nature materials* **6**, 385–92 (2007).
117. Wallace, D. G., Cruise, G. M., Rhee, W. M., Schroeder, J. A., Prior, J. J., Ju, J., Maroney, M., Duronio, J., Ngo, M. H., Estridge, T. & Coker, G. C. A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *Journal of biomedical materials research* **58**, 545–55 (2001).
118. Qiu, L., Qi See, A. A., Steele, T. W. J. & Kam King, N. K. Bioadhesives in neurosurgery: a review. *Journal of Neurosurgery* **133**, 1928–1938 (2019).
119. Fakhari, A. & Berkland, C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia* **9**, 7081–7092 (2013).
120. Zheng Shu, X., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y. & Prestwich, G. D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 1339–1348 (2004).
121. Chircov, C., Grumezescu, A. M. & Bejenaru, L. E. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* **59**, 71–76 (2018).
122. Bian, S., He, M., Sui, J., Cai, H., Sun, Y., Liang, J., Fan, Y. & Zhang, X. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **140**, 392–402 (2016).
123. Cadena, M., Ning, L., King, A., Hwang, B., Jin, L., Serpooshan, V. & Sloan, S. A. 3D Bioprinting of Neural Tissues. *Advanced healthcare materials* **10**, (2021).
124. Hong, Y., Zhou, F., Hua, Y., Zhang, X., Ni, C., Pan, D., Zhang, Y., Jiang, D., Yang, L., Lin, Q., Zou, Y., Yu, D., Arnot, D. E., Zou, X., Zhu, L., Zhang, S. & Ouyang, H. A strongly adhesive hemostatic hydrogel for the repair of arterial and heart bleeds. *Nature Communications* **10**, (2019).
125. Wang, M. & Kornfield, J. A. Measuring shear strength of soft-tissue adhesives. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **100**, 618–623 (2012).
126. Jouan, A. & Constantinescu, A. A critical comparison of shear tests for adhesive joints. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **84**, 63–79 (2018).
127. Chen, S., Gil, C. J., Ning, L., Jin, L., Perez, L., Kabboul, G., Tomov, M. L. &

Literaturverzeichnis

- Serpooshan, V. Adhesive Tissue Engineered Scaffolds: Mechanisms and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, (2021).
128. Reindel, E. S., Ayroso, A. M., Chen, A. C., Chun, D. M., Schinagl, R. M. & Sah, R. L. Integrative repair of articular cartilage in vitro: adhesive strength of the interface region. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **13**, 751–760 (1995).
129. Englert, C., Blunk, T., Müller, R., von Glasser, S. S., Baumer, J., Fierlbeck, J., Heid, I. M., Nerlich, M. & Hammer, J. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis research & therapy* **9**, (2007).
130. Strehin, I., Nahas, Z., Arora, K., Nguyen, T. & Elisseeff, J. A versatile pH sensitive chondroitin sulfate-PEG tissue adhesive and hydrogel. *Biomaterials* **31**, 2788–97 (2010).
131. Ahsan, T. & Sah, R. L. Biomechanics of integrative cartilage repair. *Osteoarthritis and cartilage* **7**, 29–40 (1999).
132. Obradovic, B., Martin, I., Padera, R. F., Treppo, S., Freed, L. E. & Vunjak-Novakovic, G. Integration of engineered cartilage. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 1089–97 (2001).
133. Schaefer, D. B., Wendt, D., Moretti, M., Jakob, M., Jay, G. D., Heberer, M. & Martin, I. Lubricin reduces cartilage--cartilage integration. *Biorheology* **41**, 503–8 (2004).
134. Khan, I. M., Gonzalez, L. G., Francis, L., Conlan, R. S., Gilbert, S. J., Singhrao, S. K., Burdon, D., Hollander, A. P., Duance, V. C. & Archer, C. W. Interleukin-1 β enhances cartilage-to-cartilage integration. *European cells & materials* **22**, 190–201 (2011).
135. Irwin, R. M., Bonassar, L. J., Cohen, I., Matuska, A. M., Commins, J., Cole, B. & Fortier, L. A. The clot thickens: Autologous and allogeneic fibrin sealants are mechanically equivalent in an ex vivo model of cartilage repair. *PLoS ONE* **14**, (2019).
136. Shin, J., Lee, J. S., Lee, C., Park, H. J., Yang, K., Jin, Y., Ryu, J. H., Hong, K. S., Moon, S. H., Chung, H. M., Yang, H. S., Um, S. H., Oh, J. W., Kim, D. I., Lee, H. & Cho, S. W. Tissue Adhesive Catechol-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Effective, Minimally Invasive Cell Therapy. *Advanced Functional Materials* **25**, 3814–3824 (2015).
137. Pabbruwe, M. B., Esfandiari, E., Kafienah, W., Tarlton, J. F. & Hollander, A. P. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* **30**, 4277 (2009).
138. Vaillard, V. A., Menegon, M., Neuman, N. I. & Vaillard, S. E. mPEG-NHS carbonates: Effect of alkyl spacers on the reactivity: Kinetic and mechanistic insights. *J. Appl. Polym. Sci* **135**, 47028 (2018).
139. Kossmann, A. Knorpelintegration - Etablierung eines Push-out-Modells und Untersuchung von BioGlue® als Knorpeladhäsivum. (Universität Würzburg, 2019).

Literaturverzeichnis

140. Berberich, O., Kiepe, F., Kossmann, A., Böck, T., Meffert, R., Hölscher-Doht, S., Richter, W. & Blunk, T. Extracellular matrix development and cell invasion at the defect site in an in vitro model for cartilage integration. in *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie* (2017).
141. Sierra, D. H., Eberhardt, A. W. & Lemons, J. E. Failure characteristics of multiple-component fibrin-based adhesives. *Journal of biomedical materials research* **59**, 1–11 (2002).
142. Kazusa, H., Nakasa, T., Shibuya, H., Ohkawa, S., Kamei, G., Adachi, N., Deie, M., Nakajima, N., Hyon, S. H. & Ochi, M. Strong adhesiveness of a new biodegradable hydrogel glue, LYDEX, for use on articular cartilage. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* **11**, 180–186 (2013).
143. West, J. L. & Hubbell, J. A. Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. *Macromolecules* **32**, 241–244 (1998).
144. Kroger, S. M., Hill, L., Jain, E., Stock, A., Bracher, P. J., He, F. & Zustiak, S. P. Design of Hydrolytically Degradable Polyethylene Glycol Crosslinkers for Facile Control of Hydrogel Degradation. *Macromolecular Bioscience* **20**, (2020).
145. Schuurmans, C. C. L., Brouwer, A. J., Jong, J. A. W., Boons, G. J. P. H., Hennink, W. E. & Vermonden, T. Hydrolytic (In)stability of Methacrylate Esters in Covalently Cross-Linked Hydrogels Based on Chondroitin Sulfate and Hyaluronic Acid Methacrylate. *ACS Omega* **6**, 26302–26310 (2021).
146. Chang, C. Y., Chan, A. T., Armstrong, P. A., Luo, H. C., Higuchi, T., Strehin, I. A., Vakrou, S., Lin, X., Brown, S. N., O'Rourke, B., Abraham, T. P., Wahl, R. L., Steenbergen, C. J., Elisseeff, J. H. & Abraham, M. R. Hyaluronic Acid-Human Blood Hydrogels for Stem Cell Transplantation. *Biomaterials* **33**, 8026 (2012).
147. Lau, C. M. L., Jahanmir, G. & Chau, Y. Local environment-dependent kinetics of ester hydrolysis revealed by direct ¹H NMR measurement of degrading hydrogels. *Acta biomaterialia* **101**, 219–226 (2020).
148. Sargeant, T. D., Desai, A. P., Banerjee, S., Agawu, A. & Stopek, J. B. An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration. *Acta biomaterialia* **8**, 124–32 (2012).
149. Jin, R., Moreira Teixeira, L. S., Krouwels, A., Dijkstra, P. J., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M. & Feijen, J. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomaterialia* **6**, 1968–1977 (2010).
150. Zustiak, S. P. & Leach, J. B. Hydrolytically degradable poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds with tunable degradation and mechanical properties. *Biomacromolecules* **11**, 1348 (2010).
151. Ifkovits, J. L. & Burdick, J. A. Review: Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering* **13**, 2369–2385 (2007).
152. Sharma, B., Fermanian, S., Gibson, M., Unterman, S., Herzka, D. A., Cascio, B., Coburn, J., Hui, A. Y., Marcus, N., Gold, G. E. & Elisseeff, J. H. Human Cartilage Repair with a Photoreactive Adhesive-Hydrogel Composite. *Science translational medicine* **5**, 167ra6 (2013).

Literaturverzeichnis

153. Wolf, M. T., Zhang, H., Sharma, B., Marcus, N. A., Pietzner, U., Fickert, S., Lueth, A., Albers, G. H. R. & Elisseeff, J. H. Two-Year Follow-Up and Remodeling Kinetics of ChonDux Hydrogel for Full-Thickness Cartilage Defect Repair in the Knee. *Cartilage* **11**, 447 (2020).
154. Elisseeff, J., Anseth, K., Sims, D., McIntosh, W., Randolph, M. & Langer, R. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3104–3107 (1999).
155. Fedorovich, N. E., Oudshoorn, M. H., van Geemen, D., Hennink, W. E., Alblas, J. & Dhert, W. J. A. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials* **30**, 344–353 (2009).
156. Cheng, H., Chen, B. P. H., Soleas, I. M., Ferko, N. C., Cameron, C. G. & Hinoul, P. Prolonged Operative Duration Increases Risk of Surgical Site Infections: A Systematic Review. *Surgical Infections* **18**, 722 (2017).
157. Unterman, S. A., Gibson, M., Lee, J. H., Crist, J., Chansakul, T., Yang, E. C. & Elisseeff, J. H. Hyaluronic Acid-Binding Scaffold for Articular Cartilage Repair. *Tissue Engineering. Part A* **18**, 2497 (2012).
158. Giurea, A., DiMicco, M. A., Akeson, W. H. & Sah, R. L. Development-associated differences in integrative cartilage repair: roles of biosynthesis and matrix. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **20**, 1274–1281 (2002).
159. Peretti, G. M., Campo-Ruiz, V., Gonzalez, S., Randolph, M. A., Xu, J. W., Morse, K. R., Roses, R. E. & Yaremchuk, M. J. Tissue engineered cartilage integration to live and devitalized cartilage: a study by reflectance mode confocal microscopy and standard histology. *Connective tissue research* **47**, 190–199 (2006).
160. Peretti, G. M., Randolph, M. A., Caruso, E. M., Rossetti, F. & Zaleske, D. J. Bonding of cartilage matrices with cultured chondrocytes: an experimental model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **16**, 89–95 (1998).
161. Monaco, G., El Haj, A. J., Alini, M. & Stoddart, M. J. Ex Vivo Systems to Study Chondrogenic Differentiation and Cartilage Integration. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* **6**, (2021).
162. Balakrishnan, B., Joshi, N., Jayakrishnan, A. & Banerjee, R. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration. *Acta biomaterialia* **10**, 3650–3663 (2014).
163. Lee, M. C., Sung, K. L. P., Kurtis, M. S., Akeson, W. H. & Sah, R. L. Adhesive force of chondrocytes to cartilage. Effects of chondroitinase ABC. *Clinical orthopaedics and related research* **370**, 286–294 (2000).
164. Sah, Li, K., Ashan, T. & Sah, R. Effect of trypsin treatment on integrative cartilage repair in vitro. *Trans Orthop Res Soc* **42**, (1996).
165. Reid, B., Gibson, M., Singh, A., Taube, J., Furlong, C., Murcia, M. & Elisseeff, J. PEG Hydrogel Degradation and the Role of the Surrounding Tissue Environment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **9**, 315 (2015).
166. Volpi, N., Schiller, J., Stern, R. & Soltes, L. Role, Metabolism, Chemical

Literaturverzeichnis

- Modifications and Applications of Hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry* **16**, 1718–1745 (2009).
167. Menzel, E. J. & Farr, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer letters* **131**, 3–11 (1998).
168. Chung, C., Beecham, M., Mauck, R. L. & Burdick, J. A. The Influence of Degradation Characteristics of Hyaluronic Acid Hydrogels on In Vitro Neocartilage Formation by Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **30**, 4287 (2009).
169. Spotnitz, W. D. & Burks, S. Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox. *Transfusion* **48**, 1502–1516 (2008).
170. Nettles, D. L., Vail, T. P., Morgan, M. T., Grinstaff, M. W. & Setton, L. A. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Annals of biomedical engineering* **32**, 391–397 (2004).
171. Williams, G. M., Chan, E. F., Temple-Wong, M. M., Bae, W. C., Masuda, K., Bugbee, W. D. & Sah, R. L. Shape, loading, and motion in the bioengineering design, fabrication, and testing of personalized synovial joints. *Journal of biomechanics* **43**, 156–165 (2010).
172. Butler, D. L., Goldstein, S. A., Gulberg, R. E., Guo, X. E., Kamm, R., Laurencin, C. T., McIntire, L. V., Mow, V. C., Nerem, R. M., Sah, R. L., Soslowky, L. J., Spilker, R. L. & Tranquillo, R. T. The impact of biomechanics in tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **15**, 477–484 (2009).
173. Jin, M., Frank, E. H., Quinn, T. M., Hunziker, E. B. & Grodzinsky, A. J. Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Archives of biochemistry and biophysics* **395**, 41–48 (2001).
174. Lee, H. P., Gu, L., Mooney, D. J., Levenston, M. E. & Chaudhuri, O. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes. *Nature materials* **16**, 1243 (2017).
175. Nicodemus, G. D., Shiple, K. A., Kaltz, S. R. & Bryant, S. J. Dynamic compressive loading influences degradation behavior of PEG-PLA hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering* **102**, 948–959 (2009).
176. Waite, J. H. Nature's underwater adhesive specialist. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **7**, 9–14 (1987).
177. Strausberg, R. L. & Link, R. P. Protein-based medical adhesives. *Trends in Biotechnology* **8**, 53–57 (1990).
178. Ninan, L., Stroshine, R. L., Wilker, J. J. & Shi, R. Adhesive strength and curing rate of marine mussel protein extracts on porcine small intestinal submucosa. *Acta biomaterialia* **3**, 687 (2007).
179. Wang, J., Liu, C., Lu, X. & Yin, M. Co-polypeptides of 3,4-dihydroxyphenylalanine and L-lysine to mimic marine adhesive protein. *Biomaterials* **28**, 3456–3468 (2007).
180. Messersmith, P. B., Zeng, X. P., Westhaus, E., Lee, B. & Eberle, N. Synthesis and characterization of DOPA-PEG conjugates. *Abstracts of papers of the American Chemical Society* **219**, U442–U442 (2000).

Literaturverzeichnis

181. Lee, B. P., Dalsin, J. L. & Messersmith, P. B. Enzymatic and non-enzymatic pathways to formation of DOPA-modified PEG hydrogels. *Abstracts of papers of the American Chemical Society* **222**, U319–U320 (2001).
182. Lee, B. P., Dalsin, J. L. & Messersmith, P. B. Synthesis and gelation of DOPA-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules* **3**, 1038–1047 (2002).
183. Brubaker, C. E., Kissler, H., Wang, L. J., Kaufman, D. B. & Messersmith, P. B. Biological performance of mussel-inspired adhesive in extrahepatic islet transplantation. *Biomaterials* **31**, 420 (2010).
184. Berberich, O., Blöhbaum, J., Hölscher-Doht, S., Meffert, R. H., Teßmar, J., Blunk, T. & Groll, J. Catechol-modified poly(oxazoline)s with tunable degradability facilitate cell invasion and lateral cartilage integration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **80**, 757–769 (2019).
185. Madhurakkat Perikamana, S. K., Lee, J., Lee, Y. Bin, Shin, Y. M., Lee, E. J., Mikos, A. G. & Shin, H. Materials from Mussel-Inspired Chemistry for Cell and Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **16**, 2541–2555 (2015).
186. Ivarsson, M., Prenkert, M., Cheema, A., Wretenberg, P. & Andjelkov, N. Mussel Adhesive Protein as a Promising Alternative to Fibrin for Scaffold Fixation during Cartilage Repair Surgery. *Cartilage* **13**, 663S-671S (2021).
187. Balkenende, D. W. R., Winkler, S. M. & Messersmith, P. B. Marine-Inspired Polymers in Medical Adhesion. *European polymer journal* **116**, 134 (2019).
188. Geim, A. K., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Novoselov, K. S., Zhukov, A. A. & Shapoval, S. Y. Microfabricated adhesive mimicking gecko foot-hair. *Nature materials* **2**, 461–463 (2003).
189. Lee, H., Lee, B. P. & Messersmith, P. B. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* **448**, 338–341 (2007).
190. Steinmetz, N. J. & Bryant, S. J. Chondroitin sulfate and dynamic loading alter chondrogenesis of human MSCs in PEG hydrogels. *Biotechnology and bioengineering* **109**, 2671–82 (2012).
191. Li, J., Huang, Y., Song, J., Li, X., Zhang, X., Zhou, Z., Chen, D., Ma, P. X., Peng, W., Wang, W. & Zhou, G. Cartilage regeneration using arthroscopic flushing fluid-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel. *Acta biomaterialia* **79**, 202–215 (2018).
192. Skaalure, S. C., Dimson, S. O., Pennington, A. M. & Bryant, S. J. Semi-interpenetrating networks of hyaluronic acid in degradable PEG hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **10**, 3409–3420 (2014).
193. Jin, R., Moreira Teixeira, L. S., Krouwels, A., Dijkstra, P. J., Van Blitterswijk, C. A., Karperien, M. & Feijen, J. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomaterialia* **6**, 1968–1977 (2010).
194. Allon, A. A., Ng, K. W., Hammoud, S., Russell, B. H., Jones, C. M., Rivera, J. J., Schwartz, J., Hook, M. & Maher, S. A. Augmenting the articular cartilage-implant interface: functionalizing with a collagen adhesion protein. *Journal of Biomedical Materials Research. Part a* **100**, 2168 (2012).

Literaturverzeichnis

195. Han, L., Wang, M., Li, P., Gan, D., Yan, L., Xu, J., Wang, K., Fang, L., Chan, C. W., Zhang, H., Yuan, H. & Lu, X. Mussel-Inspired Tissue-Adhesive Hydrogel Based on the Polydopamine-Chondroitin Sulfate Complex for Growth-Factor-Free Cartilage Regeneration. *ACS Applied Materials and Interfaces* **10**, 28015–28026 (2018).

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
4A-PEG	4-Arm Polyethylenglykol-Amin
4C-PEG	4-Arm Polyethylenglykol-Succinimidyl-Carbonat
4SG-PEG	4-Arm Polyethylenglykol-Succinimidyl-Glutarat
4T-PEG	4-Arm Polyethylenglykol-Thiol
Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
ADAMTS	Englisch: A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type motif
ATEs	Englisch: adhesive tissue engineered scaffolds
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter
CNA	Englisch: collagen adhesion protein
d	Tage
Da	Dalton
DAB	4-Dimethylamino-Benzaldehyd
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DS	Substitutionsgrad
EZM	Extrazellulärmatrix
F	Kraft
Fmax	Maximalkraft
g	Gramm
h	Stunden
H.E.	Hämatoxilin-Eosin
HA	Hyaluronsäure
HA-SH	Thiolierte Hyaluronsäure

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
ICRS	International Cartilage Repair Society
IGF-1	Englisch: insulin-like growth factor I
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
l	Liter
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MACT	Matrixgestützte autologen Chondrozyten-Transplantation
MAPs	Adhäsive Muskelproteine
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milimolar
mm ²	Quadratmillimeter
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
MW	Molekulargewicht
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
OATS	Osteochondraler Autograft Transfer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco A)
PDGF	Englisch: platelet derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
R	Radius
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
TGF-β	Englisch: transforming growth factor-β
U	Units
UV	Ultraviolett
w/v	Gewichtsprozent
ZVAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung der Zonen des Gelenkknorpels: (I) Tangentialzone, (II) Übergangszone, (III) Radiärzone, (IV) Zone des mineralisierten Knorpels. Es imponieren die typischen Konfigurationen der Kollagenfibrillen und Chondrozyten in den unterschiedlichen Zonen. 3
- Abbildung 2: Darstellung der Struktur des vierarmigen Succinimidyl-Glutarat-Polyethylenglykols (4SG-PEG) und des vierarmigen Thiol-Polyethylenglykols (4T-PEG). Die Thiol-Gruppen des 4T-PEG reagieren mit den Carbonyl-Gruppen des 4SG-PEG. Es entsteht eine kovalente Thioester-Bindung zwischen den PEG-Molekülen mit einem freien N-Hydroxy-Succinimid als Nebenprodukt. Aus einem Netzwerk multipler solcher kovalenten Bindungen entsteht in Summe das adhäsive PEG-Hydrogel. 20
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der adhäsiven Wirkung von CoSeal™. Die 4SG-PEG-Komponente (schwarz) reagiert nach Applikation mit den Amin-Gruppen (blau) des Gelenkknorpels. Die 4T-PEG-Komponente (grün) führt zur Quervernetzung und Bildung des adhäsiven Hydrogels. 21
- Abbildung 4: Darstellung der Struktur einer mit Thiol-Gruppe funktionalisierten Hyaluronsäure (HA-SH). Als Substitut zur 4T-PEG-Komponente kann zusammen mit der 4SG-PEG-Komponente eine kovalente Thioester-Bindung entstehen und resultierend ein PEG/HA-SH Netzwerk. 22
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der adhäsiven Wirkung des adhäsiven Hydrogels nach Substitution der 4T-PEG-Komponente mit thiofunktionalisierter Hyaluronsäure (HA-SH, rot). 22
- Abbildung 6: Fotografische Darstellung eines Schweinekniees. Links: Vor Eröffnung der Gelenkkapsel. Rechts: Nach Eröffnung der der Gelenkkapsel mittels Durchtrennung des Ligamentum patellae und U-förmiger Inzision. Die Patella ist nach oben geklappt mit Blick auf den Gelenkknorpel der tibialen Gelenkfläche. 35

Abbildung 7: Fotografische Darstellung eines frisch aus der tibialen Gelenkfläche isolierten porzinen Gelenkknorpelstückes. Bis zur Weiterverarbeitung wurde dieser in einem Falcon Tube in PBS getränkt aufbewahrt.	36
Abbildung 8: Darstellung der Gerätschaften zur Herstellung der Knorpelkonstrukte. Links: Isolierter Gelenkknorpel, zwei herausgestanzte Knorpelzylinder und die Biopsiestanze. Mitte: Vorrichtung zum Kürzen des Knorpelzylinders auf 1 mm Höhe. Rechts: Vorrichtung zum Herausstanzen des mittigen Knorpelkerns beim Disc-Ring-Modell. Daneben ein mit Gewebefarbstoff markiertes Konstrukt zur späteren richtigen Positionierung.	37
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung der Knorpelkonstrukte. Oben: Mit Hilfe einer Biopsiestanze wurden Zylinder mit 6 mm Durchmesser aus den zuvor isolierten Gelenkknorpelstücken gestanzt. Links: Die weiteren Schritte für das Disc-Ring-Modell. Rechts: Die weiteren Schritte für das Sandwich-Modell.	38
Abbildung 10: Darstellung des Versuchsaufbaus des Push-Out-Tests. Oben: Schematische, beschriftete Darstellung. Unten: Fotografische Darstellung.....	42
Abbildung 11: Darstellung des Versuchsaufbaus des Tensile-Tests. Oben: schematische, beschriftete Darstellung. Unten: fotografische Darstellung.....	44
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung des MTT-Assay anhand von Konstrukten aus dem Disc-Ring-Modell. Oben: Bei avitalem Gelenkknorpel bleibt eine Dunkelfärbung aus. Unten: Vitaler Gelenkknorpel färbt sich dunkel.	45
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Klebergele. Die zylindrischen Gele wurden in PBS getränkt bei 37 °C gelagert und täglich inspiziert. Zur besseren Erkennbarkeit wurde für diese Aufnahme etwas Gewebefarbstoff hinzugegeben.....	48

Abbildung 14: Die Dynamik der Adhäsionskräfte des Klebers mit der 4SG-PEG-Komponente mit 4T-PEG oder HA-SH als zweite Komponente zu verschiedenen Messzeitpunkten; Mittelwerte mit Standardabweichung; *: signifikant höher gegenüber 4SG-PEG/HA-SH direkt nach Applikation; #: signifikant geringer gegenüber Klebern direkt nach Applikation, 45 min in PBS, 2 h in PBS und 24 h in PBS. 4SG/4T-PEG direkt nach Applikation: n=15, 45 min in PBS: n=7, 2 h in PBS: n=7, 24 h in PBS: n=6. 4SG/HA-SH direkt nach Applikation: n=17, 45 min in PBS: n=9, 2 h in PBS: n=11, 24 h in PBS: n=14.....	51
Abbildung 15: Strukturelle Darstellung der Polyethylenglykol-Polymere.....	54
Abbildung 16: Darstellung der Struktur des vierarmigen Succinimidyl-Carbonat-Polyethylenglykols (4C-PEG) und des vierarmigen Amin-Polyethylenglykols (4A-PEG). Die Amin-Gruppen des 4A-PEG reagieren mit den Carbonyl-Gruppen des 4C-PEG. Es entsteht eine kovalente Amidbindung zwischen den PEG-Molekülen mit einem freien N-Hydroxy-Succinimid als Nebenprodukt. Aus einem Netzwerk multipler solcher kovalenten Bindungen entsteht in Summe das adhäsive PEG-Hydrogel.....	55
Abbildung 17: Grafische Darstellung der initialen Adhäsionskräfte an Tag 0; Mittelwerte mit Standardabweichung; *: signifikant höher gegenüber Kontrolle, #: signifikant höher gegenüber HA-SH-haltigen Klebern. 4SG/4T-PEG: n=15; 4SG-PEG/HA-SH: n=17; 4C/4A-PEG: n=7; 4C-PEG/HA-SH: n=6; Kontrolle: n=6.	56
Abbildung 18: Grafische Darstellung der Adhäsionskräfte nach 21 d in vitro Kultur. Mittelwerte mit Standardabweichung. *: signifikant höher gegenüber Kontrolle. #: signifikant höher gegenüber allen anderen Klebern. °: signifikant höher gegenüber 4SG-PEG/HA-SH. 4SG/4T-PEG: n=9; 4SG-PEG/HA-SH: n=10; 4C/4A-PEG: n=8; 4C-PEG/HA-SH: n=8; Kontrolle: n=6.....	57
Abbildung 19: Grafische und tabellarische Darstellung der Sofortadhäsionskräfte und der Langzeitadhäsionskräfte nach 21 d in vitro Kultur der unterschiedlichen Kleberkompositionen. MW=Mittelwert. *: signifikant höher gegenüber Adhäsionskraft an Tag 21.....	58

Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen der 4SG-PEG/HA-SH-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A, C: Kollagen II-Färbung; B, D: Aggrecan-Färbung.	61
Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen der 4C-PEG/HA-SH-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A-E: Kollagen II-Färbung; F-H: Aggrecan-Färbung.	63
Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen der 4C/4A-PEG-Kleberkonstrukte nach 21 d Kultivierung. A-C: Kollagen II-Färbung; D: Aggrecan-Färbung.	64
Abbildung 24: MTT-Färbung der Knorpelkonstrukte nach 21 d in vitro Kultur. Zuvor wurden die Konstrukte biomechanisch getestet. Es imponiert eine homogene Dunkelfärbung, auch an den dem Klebespalt hinggerichteten Flächen. Die weißen Aufhellungen entsprechen Lichtreflexen.....	66
Abbildung 25: Die Einzelteile der Versuchsvorrichtung des Tensile-Tests. Links, Mitte: Die speziell durch Feinmechanik Sauer angefertigten Metallstäbe und die Aufhängevorrichtung. Rechts: Die Einzelteile im fertig aufgebauten Tensile-Test. Zwischen Metallstäben und Knorpelscheiben wurde Fixierpflaster für eine bessere Fixierung und Wiederverwendbarkeit der Stäbe verwendet.	69
Abbildung 26: Schema des Protokolls des Tensile-Tests. Links: Das Knorpelkonstrukt, bestehend aus zwei mit dem Adhäsivum (schwarz) zusammengeklebten Knorpelscheiben (rosa), wird mit Sekundenkleber (rot) auf den unteren mit Fixierpflaster (grau) umwickelten Metallstab (blau) fixiert. Zweite von links: Der obere Metallstab wird mit Kleber versehen und die Traverse nach unten gefahren, bis er dem Konstrukt aufliegt. Zweite von rechts: Die Traverse wird entsprechend des festgelegten Messprotokolls nach oben gefahren. Rechts: Bei Versagen des Klebers wird die Messung beendet.....	70

Abbildung 27: Adhäsionskräfte im Tensile-Test bei 4 $\mu\text{m/s}$ und 10 $\mu\text{m/s}$ mit Standardabweichungen. Es wurde ein Adhäsivum aus in ihrer Dosis und Konzentration angepassten BioGlue® Komponenten verwendet, welche zuvor bei der Entwicklung des Push-Out-Tests Anwendung fanden (45 % BSA und 2,5 % Glutaraldehyd 4:1) ¹³⁹ . 4 $\mu\text{m/s}$: n=10; 10 $\mu\text{m/s}$: n=9.	71
Abbildung 28: Vergleich der Standardabweichungen beim Tensile- und Push-Out-Test. Der 4SG/4T-PEG-Kleber wurde als Referenzadhäsivum verwendet. Die Standardabweichung des Tensile-Tests betrug 25,9 kPa und des Push-Out-Tests 30,1 kPa. Tensile-Test: n=16; Push-Out-Test: n=15.	72
Abbildung 29: Die Wirkung der Zugkräfte im Tensile-Test und „Peeling“. Links: Schematische Darstellung einer regelrechten Messung im Tensile-Test. Die punktuell wirkenden Zugkräfte sind auf der Klebspaltoberfläche idealerweise gleich ($F_1=F_2=F_3$) und realistisch etwa gleich ($F_1 \sim F_2 \sim F_3$). Die Messkurve zeigt eine schnell erreichte Spitze mit schließlich rapidem Abfall. Mitte: Beim „Peeling“ sind die punktuellen Zugkräfte unterschiedlich groß. Die Messkurve erreicht keine eindeutige Spitze und erreicht ein charakteristisches Plateau. F =Adhäsionskraft, t =Zeit.	73

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	International Cartilage Repair Society (ICRS) Klassifikation.....	6
Tabelle 2:	Outerbridge Klassifikation	7
Tabelle 3:	Radiologische Klassifikation der Osteoarthrose nach Kellgren und Lawrence	10
Tabelle 4:	Überblick der verwendeten Instrumente	29
Tabelle 5:	Überblick der verwendeten allgemeinen Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 6:	Überblick der verwendeten Chemikalien	31
Tabelle 7:	Überblick der verwendeten Antikörper.....	32
Tabelle 8:	Überblick der verwendeten Kleberkomponenten	32
Tabelle 9:	Überblick der verwendeten Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 10:	Überblick der verwendeten Software.....	34
Tabelle 11:	Überblick der Lösungen der Kleberkomponenten.....	39
Tabelle 12:	Verhalten der Klebergele in PBS getränkt. Aus den verschiedenen Klebern wurden zylindrische Klebergele angefertigt, bei 37 °C in PBS getränkt inkubiert und täglich inspiziert.....	53

IV Danksagung

Mein Dank geht in erster Linie an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk, für die Betreuung der Arbeit. Er vermittelte mir das Werkzeug für wissenschaftliches Arbeiten und Denken, was die Grundlage für meine wissenschaftliche Karriere legte. Zudem bedanke ich mich für die exzellente Zusammenarbeit mit Herrn Dr. habil. Jörg Teßmar und dem involvierten FMZ-Team.

Neben dem gesamten Team Tissue Engineering bin ich Herrn Oliver Berberich für die exzellente praktische Betreuung und die entstandene, über das Labor hinausgehende Freundschaft besonders dankbar.

Weiterer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, Annett, Ingolf und Saskia, für die motivierenden und inspirierenden Worte.

Meiner Partnerin, Laura, möchte ich für die stets geduldige Ermutigung und Unterstützung zur Vollendung dieser Arbeit tiefe Dankbarkeit ausdrücken.