

# **Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur osteochondraler Defekte**

Untersuchungen des Einflusses mechanobiologischer Belastungsformen auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in biodegradablen Tissue Engineering Matrices

&

Beobachtungen zur Abhängigkeit des angiotaktischen Verhaltens mesenchymaler Stammzellen und Meniskuszellen vom Differenzierungsgrad in Tissue Engineering Matrices

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**der naturwissenschaftlichen Fakultät IV**

**- Chemie und Pharmazie -**

**der Universität Regensburg**



**vorgelegt von**

**Detlef Schumann**

**aus Regensburg**

**2004**



# **Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur osteochondraler Defekte**

Untersuchungen des Einflusses mechanobiologischer Belastungsformen auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in biodegradablen Tissue Engineering Matrices

&

Beobachtungen zur Abhängigkeit des angiotaktischen Verhaltens mesenchymaler Stammzellen und Meniskuszellen vom Differenzierungsgrad in Tissue Engineering Matrices

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**der naturwissenschaftlichen Fakultät IV**

**- Chemie und Pharmazie -**

**der Universität Regensburg**



**vorgelegt von**

**Detlef Schumann**

**aus Regensburg**

**2004**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2000 bis März 2004 in der Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg. Die externe Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. M. Nerlich, fakultätsintern wurde sie durch Herrn Prof. Dr. A. Göpferich betreut.

Promotionsgesuch eingereicht am:

26. Mai 2004

Die Arbeit wurde angeleitet von

Prof. Dr. A. Göpferich

Prof. Dr. M. Nerlich

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. S. Elz (Vorsitz)

Prof. Dr. A. Göpferich

Prof. Dr. M. Nerlich

Prof. Dr. G. Franz

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Juni 2004

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 TISSUE ENGINEERING VON KNORPELREPARATURGEWEBE.....	1
1.2 MECHANOBIOLOGIE .....	6
1.3 BEDEUTUNG DER ANGIOGENESE BEI DER KNORPELREPARATUR.....	14
1.3.1 Knochenfrakturheilung und Angiogenese .....	15
1.3.2 Knorpelerhaltung und Angiogenese.....	16
1.4 ZUSAMMENFASSUNG .....	17
1.5 ZIEL DER ARBEIT .....	18
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>19</b>
2.1 BELASTUNGSAPPARATUREN .....	19
2.1.1 Mechanische Kompressionsapparat.....	19
2.1.2 Hydrostatische Druckapparat .....	21
2.1.3 Ultraschallapparat .....	23
2.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIE.....	25
2.3 KITS.....	27
2.4 VERBRAUCHSMATERIAL UND GERÄTE.....	27
2.5 ANTIKÖRPER UND ENZYME.....	29
2.6 OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER).....	29
2.7 PUFFER UND LÖSUNGEN .....	30
2.8 MEDIEN, MEDIENZUSÄTZE UND SEREN .....	33
2.9 ADHÄSIONS – UND WACHSTUMSFAKTOREN .....	33
2.10 BIOMATERIALIEN.....	34
2.11 ZELLMATERIAL.....	35
2.12 TIERE.....	35
2.13 INTRAVITALMIKROSKOPIE .....	35
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>37</b>
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN UND ZELLHERKUNFT .....	37
3.1.1 Gelenkknorpel- und Meniskuszellen .....	37
3.1.1.1 Zellgewinnung .....	37
3.1.1.2 Amplifikation:.....	38
3.1.1.3 Redifferenzierung .....	39
3.1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	40
3.1.2.1 Zellgewinnung .....	40
3.1.2.2 Percoll Gradienten-Trennung .....	40
3.1.2.3 Amplifikation.....	41
3.1.2.4 Differenzierung.....	41
3.1.3 In vitro Chondrogenesemodelle .....	42
3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	42
3.1.5 Trägermatrixbeladung .....	43
3.1.6 Durchflußzytometrie.....	44
3.2 BELASTUNGSVERFAHREN .....	45
3.2.1 Mechanische Kompression.....	45
3.2.1.1 Testung der Apparatur .....	45
3.2.1.2 Versuchsparameter.....	46
3.2.2 Hydrostatische Druckbelastung .....	47
3.2.2.1 Testung der Apparatur .....	47
3.2.2.2 Versuchsparameter.....	52
3.2.3 Belastung mit Ultraschall .....	53
3.2.3.1 Testung der Apparatur .....	53

3.2.3.2 Versuchparameter.....	53
3.3 ARBEITEN MIT RNA .....	54
3.3.1 Isolierung von total-RNA aus Zell-Matrix-Konstrukten und Zellaggregaten.	54
3.3.2 Reverse Transkription .....	55
3.4 ARBEITEN MIT DNA .....	56
3.4.1 Quantitative RT-PCR mittels Light Cycler .....	56
3.4.2 Agarose Gelelektrophorese.....	57
3.5 NASSCHEMISCHE ANALYSEVERFAHREN .....	58
3.5.1 DNA Bestimmung .....	58
3.5.2 Glykosaminoglykan (GAG) Bestimmung .....	58
3.5.3 Kollagen Bestimmung .....	59
3.5.4 Kollagenbiosynthesebestimmung .....	60
3.6 HISTOLOGISCHE METHODEN .....	60
3.6.1 Gewebepvorbereitung .....	60
3.6.2 Toluidinblau Färbung .....	61
3.6.3 Picrosirius Rot Färbung .....	62
3.6.4 TUNEL-Assay.....	62
3.7 IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN.....	62
3.7.1 Kollagen Typ I/II/X Färbung .....	64
3.7.2 Lektin Färbung.....	64
3.8 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	65
3.8.1 Allgemeine ELISA-Methode .....	65
3.8.2 ELISA zur Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1, MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2.....	65
3.9 ANGIOGENESEUNTERSUCHUNGEN .....	67
3.9.1 Modell Intravitalmikroskopie.....	67
3.9.2 Tiere .....	67
3.9.3 Operationstechnik .....	67
3.9.4 Versuchsaufbau .....	68
3.9.5 Gefäßdichtebestimmung.....	69
3.9.6 Gefäßfunktionabilitätsbestimmung .....	69
3.9.6.1 Fluoreszenzfärbung von Mäuseblut - Erythrozyten.....	70
3.9.6.2 Detektion und Dokumentation.....	70
3.10 STATISTIK.....	70
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
4.1 STAMMZELLNACHWEIS DURCH FLOWZYTOMETRIE .....	71
4.2 MECHANISCHE KOMPRESSION .....	73
4.2.1 Nasschemische Analyseverfahren .....	73
4.2.1.1 Zellproliferation .....	73
4.2.1.2 Glykosaminoglykangehalt .....	74
4.2.1.3 Kollagengehalt .....	75
4.2.2 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR).....	76
4.2.3 Zytokinexpression in Zellkulturmedienüberstand (ELISA).....	79
4.2.4 Kollagenbiosynthese .....	84
4.2.5 Histologie .....	86
4.2.6 Immunohistochemie.....	88
4.2.7 Tunel-Assay.....	90
4.3 HYDROSTATISCHER DRUCK.....	92
4.3.1 Nasschemische Analysenverfahren .....	92
4.3.1.1 Zellproliferation .....	92
4.3.1.2 Glykosaminoglykangehalt .....	93

4.3.1.3 Kollagengehalt .....	94
4.3.2 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR).....	95
4.3.3 Histologie .....	98
4.4 ULTRASCHALL .....	99
4.4.1 Zellmatrixkonstrukt 4 Minuten beschallt .....	99
4.4.1.1 Zellproliferation .....	99
4.4.1.2 Glykosaminoglykangehalt .....	100
4.4.1.3 Kollagengehalt .....	101
4.4.2 Zellmatrixkonstrukt 20 Minuten beschallt .....	102
4.4.2.1 Zellproliferation .....	102
4.4.2.2 Glykosaminoglykangehalt .....	103
4.4.2.3 Kollagengehalt .....	104
4.4.3 Zellmatrixkonstrukt 40 Minuten beschallt .....	105
4.4.3.1 Zellproliferation .....	105
4.4.3.2 Glykosaminoglykangehalt .....	106
4.4.3.3 Kollagengehalt .....	107
4.4.4 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR).....	108
4.4.4.1 Zellmatrixkonstrukt 4 Minuten beschallt.....	108
4.4.4.2 Zellmatrixkonstrukt 20 Minuten beschallt.....	108
4.4.4.3 Zellmatrixkonstrukt 40 Minuten beschallt.....	111
4.4.5 Zellaggregat 20 und 40 Minuten beschallt .....	114
4.4.5.1 Zellproliferation .....	114
4.4.5.2 Glykosaminoglykangehalt .....	115
4.4.5.3 Kollagengehalt .....	117
4.4.5.4 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR).....	119
4.4.6 Histologie .....	121
4.4.7 Immunohistochemie.....	123
4.4.8 Tunel-Assay.....	124
4.5 ANGIOGENESE .....	125
4.5.1 Einfluß des Differenzierungsgrades auf die Gefäßeinsprossung in Tissue Engineering Produkte .....	125
4.5.2 Einfluß der Zellart auf die Gefäßeinsprossung in Tissue Engineering Produkte .....	127
4.5.3 Histologie .....	129
4.5.4 Gefäßfunktionabilität .....	131
4.5.5 TGF- $\beta$ 1, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 – Expression in vitro in den Zellkulturmedienüberstand im Zellartvergleich .....	132
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>140</b>
5.1 AUSWIRKUNGEN MECHANOBIOLOGISCHER BELASTUNG AUF DIE CHONDROGENESE VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN (MSC) .....	140
5.1.1 In vivo Situation .....	140
5.1.2 Arten der ex vivo Belastung .....	144
5.1.3 Einfluss direkten mechanischen Druckes auf die Chondrogenese von MSC in dreidimensionalen Trägermatrizes .....	145
5.1.4 Einfluss zyklischen hydrostatischen Druckes auf die Chondrogenese von MSC in dreidimensionalen Trägermatrizes .....	153
5.1.5 Einfluss von niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall auf die Chondrogenese von MSC in Zellaggregaten und dreidimensionalen Trägermatrizes.....	156
5.1.6 Einfluss der Zellart und ihres Differenzierungsgrades auf das angiotaktische Verhalten in Tissue Engineering Matrizes.....	162

5.1.7 Einfluss der Trägermatrix und der Zellkulturbedingungen auf das Chondrogeneseverhalten von mesenchymalen Stammzellen .....	167
5.1.8 Mögliche Signalwege und Transduktionskaskaden der Mechanobiologie ...	171
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>183</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>187</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>210</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>212</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>213</b>
<b>11. LEBENSLAUF.....</b>	<b>220</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe

Der menschliche artikuläre Gelenkknorpel ist im Gegensatz zu anderen Gewebeformen wie beispielsweise Haut oder Knochen nur sehr beschränkt zur Selbstheilung fähig (Campbell 1969). Durch die langsame Zerstörung des Gelenkknorpels, bedingt durch Abnutzung oder Verletzungen, kann es zu schmerzhaften Reizzuständen sowie dem Verlust der Bewegungs- und Belastungsfähigkeit kommen. Im Allgemeinen schreitet der Gelenkverschleiß über viele Jahre hinweg langsam fort, wobei Episoden klinischer Besserung oder scheinbaren Stillstandes auftreten.

Bisherige klinische Therapieverfahren zur Knorpeldefektreparatur wie zum Beispiel das Shaving (Messner 1996), subchondrale Abrasionsarthoplastik (Johnson 2001), Mosaikplastiken (Hangody 1997) oder autologe Chondrozytentransplantation (Brittberg et al. 2001) erreichen zumindest eine Defektauffüllung, allerdings mit biomechanisch minderwertigem Ersatzgewebe, welches die Arthrose zumeist nicht verhindern kann. Viel versprechend dagegen sind in Entwicklung befindliche Verfahren, in denen außerhalb des menschlichen Körpers (in vitro) Reparaturgewebe erzeugt werden kann (Tissue Engineering). Den Begriff Tissue Engineering verwendeten erstmals 1987 Vertreter der US-amerikanischen National Science Foundation (NSF) in Washington, DC (Heineken 1991). Ein Jahr später wurde auf der ersten (von der NSF veranstalteten) Konferenz zum Tissue Engineering in Lake Tahoe, Kalifornien, folgende Definition geprägt:

„Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“ (Skalak 1988).

Ziel ist es, (erkrankte) Gewebe zu heilen, teilweise zu „rekonstruieren“ oder in ihrer Funktion zu unterstützen.

Zum Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe hat sich die folgende Vorgehensweise bewährt:

Patienten werden geeignete, chondrogene Zellen entnommen und in vitro proliferiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte werden die Zellen geerntet und unter Zugabe von chondroinduktiven Wachstumsfaktoren in chondrokonduktive, dreidimensionale Trägermatrizes eingebracht. Unter geeigneten Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre) erhält man nach mehreren Wochen ein implantierbares Knorpelreparaturgewebe.

Die Qualität des hierbei entstandenen Reparaturgewebes ist von sehr vielen Faktoren abhängig. Von großer Bedeutung sind vor allem das verwendete Zellmaterial, die mechanischen und biologischen Eigenschaften der Trägermatrix (Freed et al. 1994; Frenkel and Di Cesare 2004) sowie die verwendeten Wachstumsfaktoren (Trippel 1995).

Im Folgenden sind die bisher zum Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe hauptsächlich verwendeten Materialien tabellarisch dargestellt (Tabelle 1-1, 1-2, 1-3).

<b>Chondrogenetisches Zellmaterial</b>	
Chondrozyten	(Huckle et al. 2003)
Mesenchymale Stammzellen	(Johnstone et al. 1998; Barry et al. 2001)
Meniskuszellen	(Buma et al. 2004)

Tabelle 1-1 Chondrogenetisches Zellmaterial

Der Begriff chondrogenetisch leitet sich von osteogenetisch ab und beschreibt die Potenz von nicht differenzierten Zellen (wie z.B. Stammzellen), Knorpel bilden zu können. Im Regelfall stammen die Zellen vom Patienten selbst, sind also autologe Zellen. Dadurch werden die gefürchteten Abstoßungsreaktionen des Immunsystems vermieden.

<b>Chondrokonduktive Trägermatrizes</b>		
Natürliche Polymergele	Hyaluronsäure, Kollagen, Agarose, Alginat, Chitosan	(Atala et al. 1994; Grande et al. 1997; Risbud et al. 2001)
Synthetische, bioabbaubare Polymere	Polymilchsäure (PLLA), Polyglykolsäure (PGA), Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Komposit, Polyurethan	(Ma et al. 1995)  (Angele et al. 1999)  (Klompaker et al. 1991)
Copolymeren	PLGA	(Ma et al. 1995)
Injizierbar	Fibringel	(Silverman et al. 1999)

Tabelle 1-2 Chondrokonduktive Trägermatrizes

Chondrokonduktivität beschreibt die Eigenschaft von Matrizes, die Migration von Zellen in die Matrix und die Differenzierung beziehungsweise die Redifferenzierung von Zellen zu Knorpel positiv zu beeinflussen (Enneking 1991)

<b>Chondroinduktive Wachstumsfaktoren</b>	
Insulin	(Kellner et al. 2001)
Transforming growth factor- $\beta$ 1-3	(Huang et al. 2002; Tuli et al. 2003)
Insulin-like growth factor-I	(Bonassar et al. 2001; Fortier et al. 2002; Jin et al. 2003; Huang et al. 2004)
BMPs	(Hidaka et al. 2001; Hoffmann and Gross 2001)

Tabelle 1-3 Chondroinduktive Wachstumsfaktoren

Der Begriff chondroinduktiv beschreibt die Eigenschaft einer nicht gebundenen Komponente, die Knorpelbildung zu verbessern.

Neben dem bis heute gut untersuchten Einsatz von Chondrozyten in dreidimensionalen Trägermatrizes zur Knorpelreparatur wurden in den letzten Jahren vermehrt mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark auf ihr chondrogenes Potential untersucht (Caplan 1991; Johnstone et al. 1998; Barry et al. 2001). Knochenmarkstroma kann relativ einfach und auch für ältere Patienten nicht übermäßig belastend über Beckenkammspannpunktion gewonnen werden. Dieses Knochenmark enthält aktive Vorläuferzellen sowie multipotente Zellen und kann daher für das Tissue Engineering von autologen Implantaten für den jeweiligen Gewebespende ohne Bedenken bezüglich einer möglichen Gewebeabstoßung verwendet werden. Auch ethisch ist dieses Vorgehen ohne Vorbehalte (Caplan 1991).

Multipotente Stammzellen werden hierbei in Kombination mit chondroinduktiven Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) oder Insulin-like Growth Factor -I (IGF-I) und anderen bioaktiven Faktoren wie Dexamethason (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998) sowohl in der Aggregatkultur (Johnstone et al. 1998) als auch in 3D Trägermatrizes (Angele et al. 1999; Solchaga et al. 1999) zu Knorpelreparaturgewebe für artikuläre (Tuan 2003; Tuli et al. 2003) oder meniskale Knorpeldefekte (Port et al. 1996; Walsh et al. 1999) differenziert.

Das Wachstum, die Erhaltung und die Ossifikation von Knorpel sind fundamental für die Entwicklung des Skeletts und werden das ganze Leben lang durch mechanische Einflüsse bei physikalischen Aktivitäten reguliert (Carter and Wong 2003). Artikulärer Knorpel in synovialen Gelenken ist ständig statischen und dynamischen Belastungen zwischen 5-10MPa ausgesetzt (Ronsky et al. 1995; von Eisenhart et al. 1999), mit Spitzenbelastungen von 10-20MPa (100-200atm) bei körperlichen Aktivitäten wie dem Treppensteigen (Ateshian et al. 1994; Herberhold et al. 1999). Der kumulative Effekt aus allen diesen Belastungen bestimmt die Biologie des Gewebes und legt die Histomorphologie fest.

Ein Mehr an physikalischer Aktivität führt in vivo zu gesteigerter Knorpeldicke (Kurrat and Oberlander 1978; Rushfeldt et al. 1981), höherem Proteoglykangehalt und größerer mechanischer Festigkeit des Gewebes (Jurvelin et al. 1986; Kiviranta et al. 1988). Immobilisierung hat dagegen ein Ausdünnen und Aufweichen des nicht kalzifizierten artikulären Knorpelgewebes, eine gesteigerte subchondrale vaskuläre Eruption sowie

eine Abnahme des Proteoglykangehalts zur Folge (Smith et al. 1992; Vanwanseele et al. 2002). Dies kann aber durch Remobilisierung wieder normalisiert werden (Jurvelin et al. 1989; Haapala et al. 2000). Die mechanische Umgebung von Chondrozyten in artikulärem Knorpel ist somit von großer Bedeutung für die Gesundheit und Funktion von diarthrodialen Gelenken. Chondrozyten reagieren im Zusammenspiel mit anderen Umgebungs- und genetischen Einflussfaktoren auf mechanische Signale mit einer Regulation ihrer metabolischen Aktivität. Diese Fähigkeit erlaubt es dem artikulären Knorpel in vivo, sich durch Änderung der Struktur und Zusammensetzung den physikalischen Anforderungen des Körpers anzupassen (Guilak et al. 1999; Guilak 2000).

Trotz der relativen Stabilität der artikulären Knorpeldicke bei skelettaler Reife bleibt das Interface zwischen artikulärem Knorpel und subchondralem Knochen das ganze Leben über aktiv (Trueta 1968; Lane and Bullough 1980). Veränderungen der alltäglichen körperlichen Aktivität im Alter führen zu einer erniedrigten Gelenkbelastung und damit zur Reaktivierung der endochondralen Ossifikation. Diese löst durch das Voranschreiten der subchondralen Wachstumsfront (Grenze kalzifizierter Knorpel zu unmineralisiertem Knorpel) eine Knorpelausdünnung aus und hat damit die Degeneration des Knorpels zur Folge (Hudelmaier et al. 2001; Vanwanseele et al. 2002).

Die Stabilisierung der Wachstumsfront im ausgewachsenen Skelettkörper beruht wahrscheinlich auf dem gesteigerten hydrostatischen Druck und dem Abfall der oktahedralen Scherbelastung je tiefer man in den artikulären Knorpel eindringt (Beaupre et al. 2000). Die an der Knorpeloberfläche befindlichen abgeflachten Oberflächenchondrozyten sind während den alltäglichen, physiologischen Belastungen vermehrt Fluid flow, direktem Druck (Ratcliffe et al. 1984; Wong et al. 1996) und tangentialen Zugspannungen ausgesetzt und produzieren daraufhin größere Mengen an Kollagen (Typ II und Typ I) im Vergleich zu Proteoglykanen (Muir et al. 1970; Sasano et al. 1996). Zug- und Druckbelastungen beschleunigen hierbei das Knorpelwachstum und die Ossifikation und somit den Austausch des Knorpels mit Knochen (Carter 1987). Die Chondrozyten der mittleren und radialen Schichten im artikulären Knorpel mit geringem Flüssigkeitsaustritt erfahren dagegen bei physiologischen Belastungen hauptsächlich hydrostatischen Druck und bilden als Resultat große Mengen an GAG und Typ II Kollagen. Der lokale hydrostatische Druck inhibiert dabei das Knorpelwachstum und die Ossifikation und erhält damit den Knorpelphänotyp.

Die Beobachtung der Stimulation von Knorpelwachstum und Ossifikation durch mechanische Kompression ist nicht neu. Bereits 1862 erwähnten Hueter und Volkmann (Hueter 1862; Volkmann 1962), dass kompressive Belastung das Knorpelwachstum reguliert.

Pauwels untersuchte basierend auf den Erkenntnissen von Roux und Benninghoff Anfang des 20. Jahrhunderts in vivo Differenzierungsprozesse im skelettalen Gewebe (Roux 1881; Benninghoff 1924). Er vermutete (Pauwels 1941), dass eine Veränderung des Gewebevolumens (hydrostatische oder dilatationale Belastung) einerseits und eine Veränderung der Form (distortionale oder Scherbelastung) andererseits die Differenzierungsabläufe vom mesenchymalen Ursprung bis zu fibrösem oder knorpeligen Gewebe steuern. Diese Vermutung konnte 1987 von Carter (Carter 1987) im Tierversuch bestätigt werden.

Mechanobiologische Faktoren spielen somit eine Schlüsselrolle im Prozess zur Regulation der Knorpeldicke und der Erhaltung der stabilen Knorpelschichten im ausgewachsenen Skelettkörper (Beaupre et al. 2000).

### **1.2 Mechanobiologie**

Der Begriff Mechanobiologie ist relativ neu. 1997 lieferten Carter et al. die Definition:

„Mechanobiology is the study of how mechanical or physical conditions regulate biological processes“ (Carter et al. 1998).

Die Mechanobiologie wird prinzipiell als Gegenpol zur Biomechanik gesehen (van der Meulen and Huijskes 2002), welche als „die Wissenschaft, die Effekte von Kräften auf biologische Gewebe, Organe und Organismen in Bezug auf biologische und medizinische Problematiken, untersucht“, definiert ist (ESB 1978) (Willimczik 1989). Die Mechanobiologie verlagert somit die Betonung von der reinen Mechanik zur Untersuchung, durch mechanische Kräfte, ausgelöster biologischer Prozesse.

Jede Zelle interagiert mit ihrer Umgebung. Dies kann durch Zell-Zell Kontakte, die Anhaftung an die Extrazellulärmatrix (ECM), ihre Rezeptoren für lösliche Faktoren und auch über mechanische Belastungen und daraus resultierende Deformationen, geschehen. Keine Zelle in einem mehrzelligen Organismus existiert in einem stressfreien Zustand oder in Isolation von ihrer Umgebung. Mechanische Belastung, sei es durch äußere Einflüsse, durch Muskelkontraktion oder durch Wachstumsgradienten, stellt einen Haupteinflussfaktor in der skelettalen Morphogenese dar (Henderson and

Carter 2002). Zahlreiche differenzierte Zellarten, einschließlich glatte Muskelzellen, Kardiozyten, Skelettmuskelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Endothelzellen zeigen Veränderungen in ihrer Genexpression und Proliferation in Reaktion auf diese mechanischen Belastungen (Chiquet 1999; Jin et al. 2001).

Die Entwicklung von knorpeligem Gewebe ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stark von der es umschließenden Umgebung abhängig. Chondrozyten leben beispielsweise in einer Umgebung, die stark durch mechanische Kräfte beeinflusst wird (Darling and Athanasiou 2003). Die Kompression von Knorpel erzeugt eine Deformation der Zellen und der Zellmatrix (Guilak et al. 1995; Wong et al. 1997; Quinn et al. 1998), den Aufbau eines hydrostatischen Druckgradientens (Kim et al. 1995; Soltz and Ateshian 2000), Fluid Flow, Strömungspotentiale und -ereignisse (Gray et al. 1988; Urban et al. 1993). Darüber hinaus treten physikochemische Veränderungen einschließlich geänderten Matrixwassergehalts, Fixed Charge Density (FCD), mobiler Ionenkonzentrationen und osmotischen Druck, auf. Alle diese mechanischen, chemischen oder elektrischen Signale können den Matrixmetabolismus beeinflussen (Mow and Wang 1999; Guilak and Mow 2000).

In zahlreichen Tierversuchen konnte ein großer Einfluss mechanischer Belastung auf die Differenzierung von Chondrozyten *in vivo* gezeigt werden. Hohe Belastungen wurden meist durch physikalische Übungen, Osteotomie sowie durch invasive (Churches and Howlett 1982; Biewener and Bertram 1993) und nichtinvasive Belastungsapparaturen (Rubin and Lanyon 1984; Akhter et al. 1998) erzielt. Reduzierte Belastung dagegen wurde durch Neurektomie, Hinterbeinfixierung und Schwerkraftreduktion in der Raumfahrt erhalten (Vico et al. 2001; van der Meulen and Huiskes 2002). Durch die Implantation von Mikrobewegungsapparaturen in die Kondylen von Hunden konnte gezeigt werden, dass der Einfluss mechanischer Faktoren auf das differenzierende Gewebe stark von dessen Differenzierungsgrad abhängt (Prendergast et al. 1997; Carver and Heath 1999; Williamson et al. 2001). Undifferenziertes mesenchymales Gewebe bildet zum Beispiel unter hydrostatischem Druck (2MPa) und niedrigem Sauerstoffangebot *in vivo* in Knochenkonduktionskammern Knorpelgewebe (Tagil and Aspenberg 1999; Butler et al. 2000; de Rooij et al. 2001). Tissue Engineerte Knorpelkonstrukte (Chondrozyten in PGA Scaffolds, 4 Wochen *in vitro* kultiviert) zeigen dagegen *in vivo* in hydraulischen Knochenkammern (HBC) unter zyklischer mechanischer Belastung (0-5N, 0,5Hz) in einem gut durchbluteten Knochendefekt eine hohe Tendenz, Knochen zu bilden (Case et

al. 2003). Neben dem Einsatz von chondrogenem Zellmaterial, chondrokonduktiven Trägermatrizes und chondroinduktiven Wachstumsfaktoren stellen mechanische Kräfte daher einen weiteren entscheidenden Einflussfaktor für das Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe dar, um ein phänotypisch korrektes Gewebe zu erhalten.

Aus dieser Beobachtung heraus hat sich ein neuer Forschungszweig des Tissue Engineering, das so genannte Functional Tissue Engineering (FTE) entwickelt. Prinzip ist hierbei die Verwendung von physikalischen Stimuli während der in vitro Kultur, um die Entwicklung von biomechanisch funktionellem Gewebe zu beschleunigen und zu verbessern. Dabei wird versucht in vitro die gleichen Kulturbedingungen zu simulieren die auf das Gewebe in vivo wirken (Butler et al. 2000; Kim and Mooney 2000; Guilak et al. 2001). Zahlreiche in vitro Untersuchungen wurden unternommen, um herauszufinden welche Belastungen die größten Vorteile bei der Kultivierung von Chondrozyten bringen (Carver and Heath 1999; Smith et al. 2000).

Bis heute verwendete Belastungsformen und ihre Wirkung auf isolierte Chondrozyten, Knorpelimplantate und Tissue Engineerte Konstrukte sind in Tabelle 1-4 aufgeführt:

<b>Belastungsart</b>	<b>Belastetes Gewebe</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
Fluid Flow	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Matrixbildung	(Freed et al. 1999; Ghivizzani et al. 2000)
	Nativer Knorpel	Stimuliert anabolische Zellexpression	(Jacobs et al. 1998)
	Isolierte Chondrozyten	Steigerung der Proliferation, Kollagen Typ II mRNA Expression und TGF- $\beta$ 1 Sekretion	(Malaviya 1998)
Zyklische, mechanische Kompression	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Matrixbildung	(Buschmann et al. 1995; Elder et al. 2000; Davisson et al. 2002)

<b>Belastungsart</b>	<b>Belastetes Gewebe</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
Statische mechanische Kompression	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Erniedrigte Synthese von Matrixbestandteilen	(Lee et al. 2000; Mauck et al. 2000; Davisson et al. 2002)
Statische mechanische Kompression	Nativer Knorpel	Abnahme der Aggrecan und Typ II Kollagen mRNA Expression	(Burton-Wurster et al. 1993; Guilak et al. 1994; Buschmann et al. 1995; Wong et al. 1997)
Hydrostischer Druck (Physiologisch)	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Matrixbildung, steigert den Schwefeleinbau, die Expression von Aggrecan und Typ II Kollagen und senkt die MMP mRNA Level	(Smith et al. 1996; Millward-Sadler et al. 2000; Mizuno et al. 2002; Ikenoue et al. 2003)
	In vivo	Gesteigerte Proteoglykansynthese, Chondrogenese und inhibierte endochondrale Ossifikation	(Hall et al. 1991; Parkkinen et al. 1993; Carter et al. 1998)
	Nativer Knorpel	Steigerung der TGF- $\beta_1$ Freisetzung	(Hall et al. 1991; Takahashi et al. 1997)
	Isolierte Chondrozyten	Steigerung der Aggrecan, TGF- $\beta$ und Typ II Kollagen mRNA Expression	(Holmvall et al. 1995; Smith et al. 1996; Takahashi et al. 1997; Ikenoue et al. 2003)

<b>Belastungsart</b>	<b>Belastetes Gewebe</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
	In Vivo	Verbesserte Knorpelheilung	(Huang et al. 1997; Huang et al. 1999; Cook et al. 2001)
Zyklische Zugbelastung	Isolierte Chondrozyten	Anstieg Aggrecansynthese, Aggrecan und Typ II Kollagen, IL-1 $\beta$ , MMP-1/3/9, TIMP-1 und TNF-alpha mRNA Expression und MMP-9 sowie ATP Sekretion	(Holmvall et al. 1995; Fujisawa et al. 1999; Honda et al. 2000)
	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Proliferation und Expression von hypertrophen Chondrozytenmarkern	(Gannon et al. 1991; Wu and Chen 2000)
Hohe Scherbelastung	Nativer Knorpel	Steigert Freisetzung katabolischer Faktoren wie MMP, NO und Interleukinen, senkt Aggrecanexpression	(Smith et al. 1995; Fujisawa et al. 1999; Guilak 2000; Jin et al. 2000)
Niedrige Scherbelastung		Steigerung der Kollagen und GAG Synthese, TGF- $\beta$ Transkription und Produktion	(Freed et al. 1998; Martin et al. 2000; Gooch et al. 2001; Vunjak-Novakovic et al. 2002)
Perfusion	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Proliferation und GAG Synthese	(Pazzano et al. 2000; Davisson et al. 2002)
Simulierte, niedrige Schwerkraft	Tissue engineertes Knorpelreparaturgewebe	Gesteigerte Matrixbildung	(Freed et al. 1997)
Osmose	Isolierte Chondrozyten	Hypoton (<360mOsm)  Steigert Aggrecan Expression und Ca <sup>2+</sup> Freisetzung	(Guilak et al. 1999; Mow et al. 1999; Hung et al. 2003)

<b>Belastungsart</b>	<b>Belastetes Gewebe</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
		Hyperton (>360mOsm) Senkt Aggrecan Expression und steigert Ca <sup>2+</sup> Freisetzung	(Guilak et al. 1999; Hung et al. 2003)
Pulsierende elektromagnetische Felder (PEMF)	Isolierte Chondrozyten	Gesteigerte Proliferation und Produktion von ECM Bestandteilen	(Elliott 1988; Gierse 2001)
Nd:YAG Gepulstes Laserlicht (1064nm)	Nativer Knorpel	Stimuliert die Proteoglykan, Kollagen und DNA Synthese	(Herman and Khosla 1988)

Tabelle 1-4 Aktuelle mechanobiologische Belastungsformen und deren Wirkung auf isolierte Chondrozyten, Knorpelimplantate und Tissue Engineertes Knorpelreparaturgewebe

Alle innerhalb des physiologischen Druckbereichs durchgeführten, dynamischen Belastungsformen zeigten einen positiven Einfluss auf die Bildung der extrazellulären Matrixbestandteile von Knorpelgewebe wie Aggrecan und Typ II Kollagen.

Verletzende Kompression dagegen verursacht mechanische Fehler des Kollagennetzwerks (Kurz et al. 2001) und führt zu einem 30% Anstieg des Wassergehalts und einer erniedrigten Steife des Knorpelimplantates (Loening et al. 2000) gefolgt von einer gesteigerten Proteoglykandegradation und -freisetzung. Bei gleich bleibend hohen Drücken begehen die Zellen Apoptose (Loening et al. 2000). Statische Belastungen führen zu erniedrigter Biosynthese und Produktion der extrazellulären Matrixbestandteile von Knorpel.

Die stärkste mechanobiologische Stimulation der Chondrogenese ließ sich nicht durch den Einsatz einer einzelnen Belastungsform sondern durch die Kombination verschiedener mechanischer Belastungsmethoden (z.B. Fluid Flow/Perfusion in Kombination mit Scherbelastung (Vunjak-Novakovic et al. 2002)) in so genannten Bioreaktoren erzielen. Hierbei werden durch einen kontinuierlichen Medienaustausch optimal steuerbare Kulturbedingungen in Bioreaktoren hergestellt. Ein großer Nachteil dieses Verfahrens stellt das dauerhafte Verbleiben der zu untersuchenden Probe über die gesamte Experimentalzeit im Bioreaktorsystem dar. Dadurch werden die Variationsmöglichkeiten der Belastungsintensität und -dauer stark limitiert.

Eine Alternative stellt das Bioprocessing dar. Hierbei werden die Proben nur zur Belastung in die jeweiligen Apparaturen gegeben und im Anschluss wieder unter optimalen Kulturbedingungen bis zur nächsten Belastungsphase verwahrt. Ein Nachteil

dieses Verfahrens ist das erhöhte Kontaminationsrisiko.

Wie bereits zu Beginn erwähnt reagieren Chondrozyten in vivo neben der mechanischen Belastung auch auf chemische Stimuli. Zwei dieser biochemischen Regulatoren der Matrixbiosynthese in artikulären Gelenken sind der Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) und der Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) (Mauck et al. 2003). IGF-I steigert die Matrixbiosynthese und mitogene Aktivität der Chondrozyten, erniedrigt deren Matrixkatabolismus und ist in höheren Konzentrationen in akuten Knorpeldefekten (Fortier et al. 2001) und in osteoarthritischen Gelenken (Bujia et al. 1996; Fernihough et al. 1996) nachgewiesen worden (Trippel 1995; van Susante et al. 2000). TGF- $\beta$ 1 steigert die Produktion von großen, anionischen Proteoglykanen und ist in der Synovialflüssigkeit von immobilisierten Knien hochreguliert (Morales 1991; Nixon et al. 1998; Okazaki et al. 2001). Mechanochemische Stimuli (TGF- $\beta$ 1 + IGF-I + dynamische Kompression) haben positiv synergistische Effekte auf die Bildung von Knorpelgewebe sowohl in der zweidimensionalen Chondrozyten-Monolayerkultur als auch unter Verwendung von in dreidimensionalen Trägermatrices (Agarose Hydrogel) eingebrachten Chondrozyten (Mauck et al. 2003) gezeigt. IGF-I (100ng/ml) steigert beispielsweise in so genannten *Rotating Wheels* die Proteoglykansynthese von in PGA Scheiben eingebrachten Chondrozyten um ein Vielfaches (Gooch et al. 2001).

Neben der Verwendung von Chondrozyten beim Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe werden seit wenigen Jahren vermehrt die Einsatzmöglichkeiten von mesenchymalen Stammzellen untersucht (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998; Tuan et al. 2003). Mesenchymale Stammzellen sind an entscheidenden Gewebeprozessen bei skelettaler Erneuerung und der Teilreparatur osteochondraler Defekte in vivo beteiligt (Schematischer Ablauf siehe Abb. 1-2) (Draenert and Draenert 1980; Pan 1992).

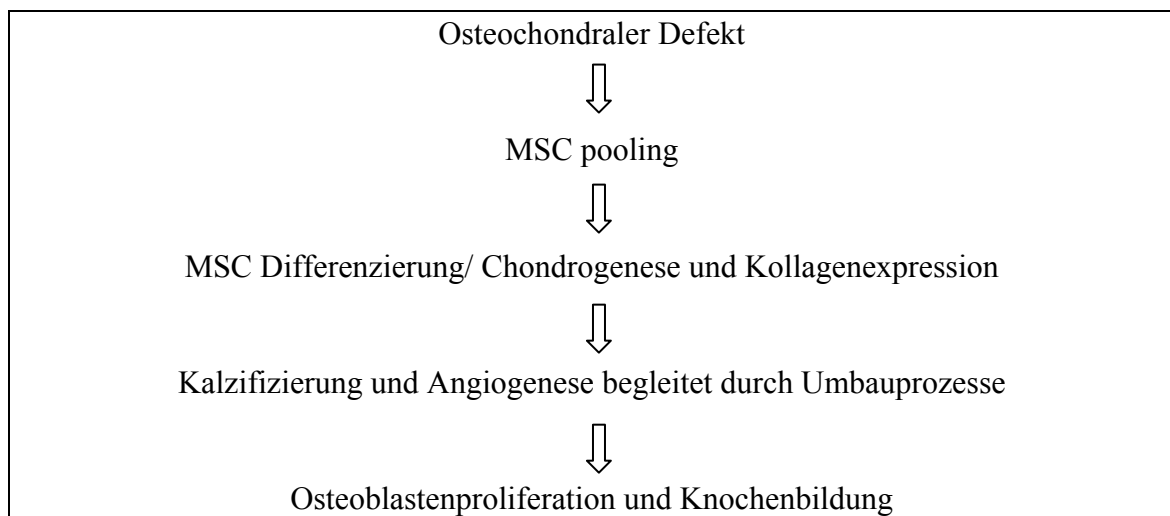


Abb. 1-2 Schematischer Ablauf der in vivo Reparatur osteochondraler Defekte

Bei osteochondralen bis zum subchondralen Knochen reichenden Verletzungen können mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark zur Defektstelle gelangen. Diese Defekte füllen sich aber meistens nur mit mechanisch weniger stabilem, fibrillärem Knorpel (Prendergast et al. 1997).

Basset und Herrmann zeigten bereits 1961, dass durch mechanische Belastung die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu unterschiedlichen Typen von Bindegewebszellen beeinflusst werden kann (Bassett and Herrmann 1961). Physikalische Faktoren wie direkte mechanische Kompression (Aaron and Ciombor 1996; Thomas and el Haj 1996; Carter et al. 1998), hydrostatischer Druck (Angele et al. 2003), elektromagnetische Felder (Aaron and Ciombor 1996) und Ultraschall (Naruse et al. 2000) spielen bei der Regulierung der Funktion mesenchymaler Progenitorzellen eine bedeutende Rolle (Caplan 1991). Undifferenziertes mesenchymales Gewebe entwickelt sich in vivo je nach der Art der mechanischen Belastung zu fibrösem Gewebe (hohe Zug und/oder Scherbelastung), Knorpel (hydrostatisch) oder Knochen (niedrige kompressive Belastung) (Carter et al. 1998).

In Tierversuchen veranschaulichte Duarte erstmals, dass eine pulsierende Ultraschalltherapie mit einer niedrigen Intensität die Heilung osteochondraler Defekte positiv beeinflusst und die Kallusbildung signifikant erhöht (Duarte 1983). Niedrigintensiv gepulster Ultraschall (LIPUS) stimuliert dabei die Freisetzung von TGF- $\beta_1$  und fördert dadurch die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten (Sakurakichi 2004). Darüber hinaus führt LIPUS zu einer gesteigerten

Kalziumabsorption von isolierten Mesenchymzellen und differenzierten Knorpel- und Knochenzellen (Ryaby 1989; Ryaby 1992).

Extracorporale Schockwellentherapie fördert eine Knochenheilung durch MSC Recruitment sowie durch TGF- $\beta_1$  und Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Expressionssteigerung (Chen 2004). TGF- $\beta_1$  und VEGF spielen dabei eine chemotaktische und mitogene Rolle (VEGF induziert Angiogenese) in der Rekrutierung und Differenzierung von MSC.

Über den Einfluss mechanobiologischer Faktoren auf die Chondrogenese von mesenchymalen Progenitorzellen in dreidimensionalen Tissue Engineering Matrices ist dagegen bislang nur sehr wenig bekannt.

Elder et al. konnten 2001 eine durch zyklische mechanische Kompression (9,25 KPa 0,33Hz je 2 Stunden über 3 Tage) gesteigerte chondrogene Differenzierung mesenchymaler Zellen in Agarosegel nachweisen (Elder et al. 2001). Perfusionskultursysteme zeigten darüber hinaus einen positiven Einfluss auf die Viabilität und Funktion von Knochenmarkszellen (Glowacki et al. 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Ausprägung der chondrozytenartigen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen durch einen niedrigen pO<sub>2</sub> begünstigt wird (Bassett and Herrmann 1961; Pawelek 1969). Für die translationale (10%, 2mm) und rotierende (25%, 90°) multidimensionale Belastung (0,0167Hz) von in Kollagengelen eingebetteten mesenchymalen Progenitorzellen, ohne weitere Zugabe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurde eine Steigerung der Typ I und Typ III Kollagen Expression nachgewiesen (Altman et al. 2002).

Untersuchungen über den Einfluss von zyklischer mechanischer Kompression, hydrostatischem Druck oder niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall auf das Chondrogeneseverhalten von mesenchymalen Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrices wurden bis heute nicht durchgeführt.

### **1.3 Bedeutung der Angiogenese bei der Knorpelreparatur**

Die Angiogenese, also die Neubildung von Gefäßen im Anschluß an bereits bestehende Gefäßstrukturen, ist vor allem an der embryonalen Entwicklung, der endochondralen Ossifikation und der Wundheilung beteiligt (Webadresse1; Risau 1997).

Artikulärer Knorpel enthält keine Blutgefäße. Aus diesem Grund können bei Verletzungen Stammzellen, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren nicht in ausreichender

Menge zur geschädigten Stelle transportiert werden, um eine vollständige Heilung zu erzielen (Buckwalter 1998). Abhilfe kann hierbei die Implantation von Tissue Engineertem Knorpelreparaturgewebe aus mesenchymalen Stammzellen schaffen. Zu dessen optimaler Integration bedarf es in vivo einer initialen Weiterversorgung des in vitro hergestellten Reparaturgewebes mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Dies ist einerseits über die Synovialflüssigkeit und andererseits über die Neubildung von Mikrogefäßen möglich. Auch bei der späteren Erhaltung des reparierten Knorpelgewebes kommt der Angiogenese bzw. ihrer Inhibierung eine große Bedeutung zu.

Für das Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe stellt die Angiogenese somit neben dem verwendeten Zellmaterial, der Trägermatrix, den eingesetzten Wachstumsfaktoren und der Mechanobiologie einen weiteren entscheidenden Einflussfaktor dar.

### **1.3.1 Knochenfrakturheilung und Angiogenese**

Mikrogefäße haben einen großen Einfluss auf den Heilungsprozess von osteochondralen Defekten (Hulth et al. 1990). Die erfolgreiche Knochenheilung vollzieht sich durch die Bildung von Endothelsprosslingen und deren Migration in das fibröse oder knorpelige Defektgewebe zur Überbrückung des Bruches (Winet 1996). Als Resultat der Gefäßdurchdringung werden knochenbildende Osteoblasten, knochenabbauende Osteoklasten sowie knorpelabbauende Chondroblasten in die knorpelige Matrix eingebracht und wandeln diese in Knochen um (Caplan 1990). Das Ausmaß und die Richtung der neuen Gefäßeinsprossung werden durch lokale Konzentrationen an Angiogenesefaktoren gesteuert. Während ruhende und proliferierende Chondrozyten antiangiogenetische Faktoren produzieren, setzen hypertrophe Chondrozyten und degenerierender Knorpel Faktoren frei, welche die Angiogenese und Neovaskularisation fördern (Alini et al. 1996). VEGF (Seko et al. 1999; Smith et al. 2001), CTGF (Schild and Trueb 2002), MMPs (Blain et al. 2001), Cbfa1 (Ziros et al. 2002) sind hierbei die am besten untersuchten Faktoren. Hervorzuheben ist vor allem der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Ferrara and Henzel 1989). VEGF, ein vaskulärer Permeabilitätsfaktor spielt eine bedeutende Rolle als Modulator der Vaskularisation und endochondralen Ossifikation während der embryonalen Entwicklung (Suzuki 1996; Gerber et al. 1999), der Wundheilung (Liekens et al. 2001) und der Frakturheilung (Villars et al. 2000; Street et al. 2002).

Endochondrale Ossifikation bezeichnet den Prozess, bei dem Knorpel durch Knochen ersetzt wird. Blutgefäßdurchdringung ist dabei der wichtigste Schritt. Blutgefäße der Metaphyse (Knorpel/Knochengrenze) durchdringen dabei den Knorpel an der Zone der hypertrophen Chondrozyten. Die Angiogenese ist somit unmittelbar mit der Chondrozytenhypertrophie verbunden (Harper and Kalgsbrun 1999).

### **1.3.2 Knorpelerhaltung und Angiogenese**

Die Aufrechterhaltung der avaskulären Umgebung in normalem adulten hyalinen Knorpel ist teilweise auf die Synthese von antiangiogenetischen Faktoren wie Cartilage Derived Inhibitor, Chondromodulin-I und Troponin I zurückzuführen, die die Neovaskularisierung durch Hemmung der Endothelzellentwicklung einschränken. Diese Hemmung der Angiogenese verlangsamt die endochondrale Ossifikation und bewahrt somit den gesunden Knorpel (Moses et al. 1999; Shukunami et al. 1999).

Die Avaskularität des Knorpels und damit dessen Erhaltung in vivo ist also neben dem Einfluss mechanobiologischer Faktoren auch durch eine Balance antiangiogenetischer und proangiogenetischer Faktoren bedingt (Descalzi Cancedda et al. 1995).

Welchen Einfluss der Differenzierungsgrad chondrogener Zellen wie mesenchymale Stammzellen oder Meniskuszellen auf ihr angiotaktisches Verhalten in vivo ausübt, wurde bis heute noch nicht untersucht.

#### **1.4 Zusammenfassung**

Auf dem Wege zur Heilung von Knorpeldefekten durch Einsatz von Tissue Engineertem Knorpelreparaturgewebe müssen zahlreiche Einflussfaktoren beachtet werden. Um ein natives Knorpel phänotypisch annähernd ähnliches Gewebe zu erhalten, bedarf es neben dem Einsatz von chondrogenen Zellen wie Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen in chondrokonduktiven Trägermatrizes und dem Zusatz geeigneter chondroinduktiver Wachstumsfaktoren auch mechanischer Beeinflussung. Zahlreiche Untersuchungen zeigten hierbei anabolische Effekte von Belastung auf die Extrazellulärmatrixbildung von Chondrozyten. Sehr wenig ist dagegen bis heute über die Auswirkungen mechanischer Belastungen auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen bekannt. Nach Implantation des Knorpelreparaturgewebes in den Patienten bedarf es für eine optimale Integration in den Gewebedefekt initial einer ausreichenden Versorgung an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. An diesem Prozess ist die Angiogenese beteiligt. Der Einfluss des Differenzierungsgrades chondrogener Zellen auf deren angiotaktisches Verhalten in vivo wurde bis heute nicht untersucht.

### **1.5 Ziel der Arbeit**

Die Fragestellung dieser Arbeit war zweigeteilt. Einerseits sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang mechanobiologische Belastungen einen Einfluss auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen in dreidimensionalen, chondrokonduktiven Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Kompositrägermatrizes haben. Hierfür wurden die Zell-Matrixkonstrukte mit Hilfe einer eigens konstruierten Druckapparatur zyklischer, direkter mechanischer Kompression, in einer weiteren speziell für diesen Zweck entwickelten Kompressionsapparatur hydrostatischen Druck und unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Ultraschallfrakturheilungsapparatur (SAFHS, Exogen) niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall, ausgesetzt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss der Differenzierungsgrad chondrogener Zellen, speziell mesenchymaler Stammzellen und Meniskuszellen auf deren angiotaktisches Verhalten in dreidimensionalen Trägermatrizes in vivo hat und welche angiogenen Faktoren daran beteiligt sein könnten. Hierfür wurde eine neue Methodik, die Intravitalmikroskopie zum Online Monitoring von Tissue Engineering Materialien in Rückenhautkammern von Mäusen, etabliert.

## 2. Material

### 2.1 Belastungsapparaturen

#### 2.1.1 Mechanische Kompressionsapparat

Zum Zwecke der direkten, zyklischen mechanischen Kompression der 3D- Zell-Matrix Konstrukte wurde eine computergesteuerte Belastungsapparatur entwickelt, gebaut und getestet (Abb. 2-1).

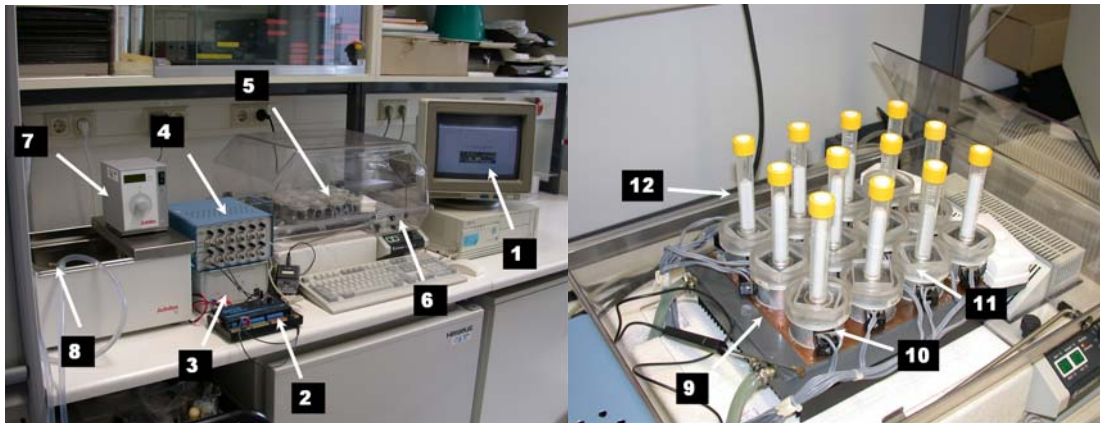


Abb. 2-1 Mechanische Druckapparatur aus Eigenherstellung

Unter Anwendung der SIOS-Interface Software Do-it (1) (AK ModulBau GmbH, Saerbeck, Deutschland) wurde ein Programm geschrieben, mit Hilfe dessen über ein SIOS-Interface (2) (AK ModulBau GmbH, Saerbeck, Deutschland), ein handelsübliches, stabilisiertes Netzgerät 12/24 V (3) (Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland) und einen Verstärker (4) (Elektrowerkstatt Biologie, Universität Regensburg) alle zwölf Elektromagneten (10) (RS Components, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) jeweils einzeln angesprochen werden können. Die Elektromagneten wurden zur Ableitung der während des Betriebs hohen Wärmeentwicklung auf eine wassergekühlte Kupferplatte (9) (Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg) geschraubt. Die Wasserumwälzung des Kühlsystems wurde mit Hilfe eines temperierbaren Wasserbads (7) (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) erzielt. Ein Sekundärkühlkreislauf (8) verhinderte eine Überhitzung vom Wasserspeicher des Wasserbads. Für jeden der zwölf Elektromagneten wurden spezielle Abstandhalter aus Plexiglas (11) angefertigt, um den direkten Kontakt der Belastungskammern mit den Magneten zu verhindern. Als Belastungskammern fungierten sterile Polypropylenzentrifugenröhrchen (12) (TPP, Trasadingen, Schweiz). Die zu belastenden Proben wurden steril in so genannten belastungsdefinierenden Halterungen (12b) (Abb. 2-3, Eigenherstellung) gegeben, welche eine maximale

Belastung der Proben von 40 % ihrer Gesamthöhe sowie durch Einkerbungen eine optimale Medienversorgung zulassen. Die Proben in den Halterungen wurden zur Belastung steril in die mit 4ml chondrogenem Medium (siehe Kapitel 3.1.3 In vitro Chondrogenesemodelle) gefüllten Belastungskammern eingelegt. Daraufhin wurde steril der durch sein Gewicht die Intensität der Belastung bestimmende, teflonbeschichtete Dauerstabmagnet (12a) (NeoLab, Heidelberg, Deutschland) in die Belastungskammer gegeben. Das gesamte Belastungssystem (Abb. 2-2) befand sich in einer temperierten Wärmebox (6) (Heidolph, Schwabach, Deutschland). Mit Hilfe der über die Interface Software angesteuerten Elektromagneten wurden die sich in den Belastungskammern befindlichen Dauerstabmagneten mit einer Frequenz von 0,33 Hz gehoben und gesenkt. Die Testung der Druckapparatur und die exakte Versuchsdurchführung werden im Kapitel 3.2.1 beschrieben.

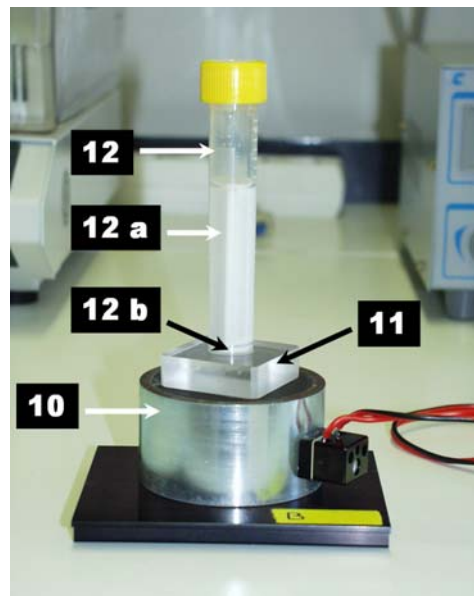


Abb. 2-2 Magnetische Druckeinheit

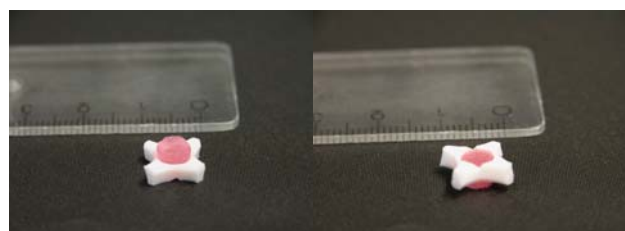


Abb. 2-3 Belastungsdefinierende Halterungen für Zell-Matrixkonstrukte. Das linke Bild zeigt die Aufsicht und das rechte Bild stellt die eingekerbte Unterseite dar

### 2.1.2 Hydrostatische Druckapparatur

Zur zyklischen, hydrostatischen Kompression der dreidimensionalen Zell-Matrix-Konstrukte und der Zellaggregate wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl Maschinenbau der Fachhochschule Regensburg eine computergesteuerte Belastungsapparatur entwickelt, gebaut und getestet.

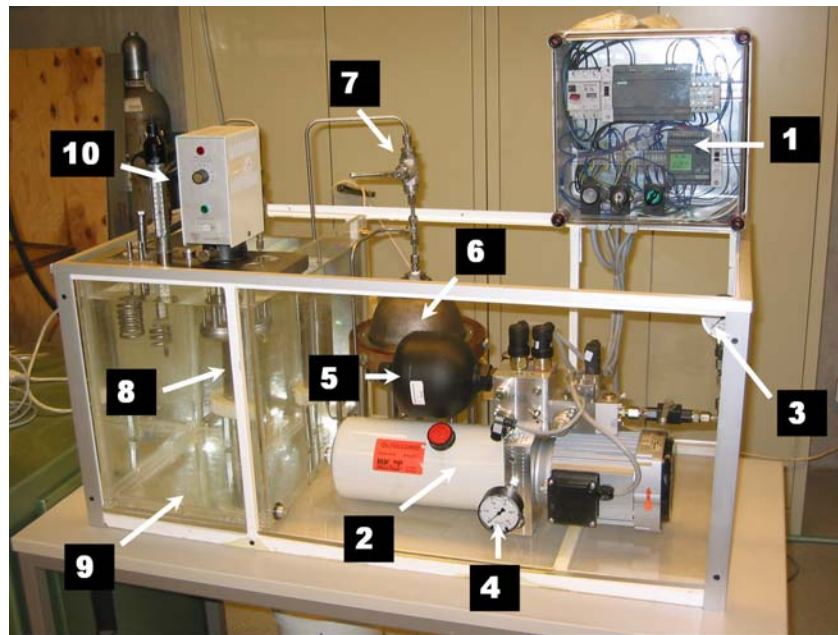


Abb. 2-4 Hydrostatische Druckapparatur

Zur Erzeugung von hydrostatischem Druck in einem semi-sterilen System wurde eine Druckapparatur mit zwei voneinander getrennten Kreisläufen konstruiert (Abb. 2-4). Der Druck wurde mit Hilfe einer SPS Logo Steuereinheit (1) (Siemens Typ 230 RC, Siemens, Deutschland) und einer Ölpumpe (2) (Knapp Micro Fluid, Barbing, Deutschland) in einem Ölkreislauf erzeugt und in einem Druckspeicher (5) bis zur Verwendung gespeichert. Der aktuelle Druck im Ölsystem konnte mit Hilfe von Manometern (3 und 4) kontinuierlich überprüft werden. Die Druckübertragung auf den Wasserkreislauf erfolgte über einen Medientrenner (6) mit faserverstärkter Membran. Die Luftfreiheit des Systems konnte über Entgasungseinrichtungen des Medientrenners (7) und der Druckkammer (im Deckel der Kammer integriert) gewährleistet werden. Die konstante Erwärmung der Druckkammer (8 und Abb. 2-5) auf 37°C wurde mit Hilfe einer automatisch temperierbaren Heizspirale (10) in einer mit Wasser gefüllten Plexiglaswanne erzielt. Die zu belastenden Proben wurden steril und luftblasenfrei in Belastungskammern aus Glas überführt (Abb. 2-6). Diese Glasfläschchen wurden mit

einem Schraubverschluss verschlossen, in dem sich eine teflonbeschichtetes Septum befindet. Diese Belastungskammern wurden mit speziellen Drahhalterungen in die wassergefüllte Druckkammer gestellt und mit einer Frequenz von 1 Hz belastet.

Die Testung der Druckapparatur und die exakte Versuchsdurchführung werden im Kapitel 3.2.2 beschrieben



Abb. 2-5 Edelstahldruckkammer mit Entlüftungssystem



Abb. 2-6 Belastungskammer mit Teflonmembran im Deckel

### 2.1.3 Ultraschallapparatur

Zur Ultraschall-Belastung der dreidimensionalen Zell-Matrix-Konstrukte und der Zellaggregate wurde das SAFHS<sup>®</sup> Fracture Healing System Model 2A der Firma Exogen Inc., USA verwendet (Abb. 2-7). Die zu belastenden Proben wurden hierbei in einer mit chondrogenem Medium definierten Volumens gefüllten, sterilen, geschlossenen, handelsüblichen 6-Well Platte beschallt. Zur verlustfreien Schallübertragung wurde auf die Kontaktzone zwischen den Schallköpfen und der 6-Well-Platte ein Ultraschallkontaktgel appliziert. Die Funktion der Schallköpfe konnte mit Hilfe der mitgelieferten Schallempfänger überprüft werden (Abb.2-8).

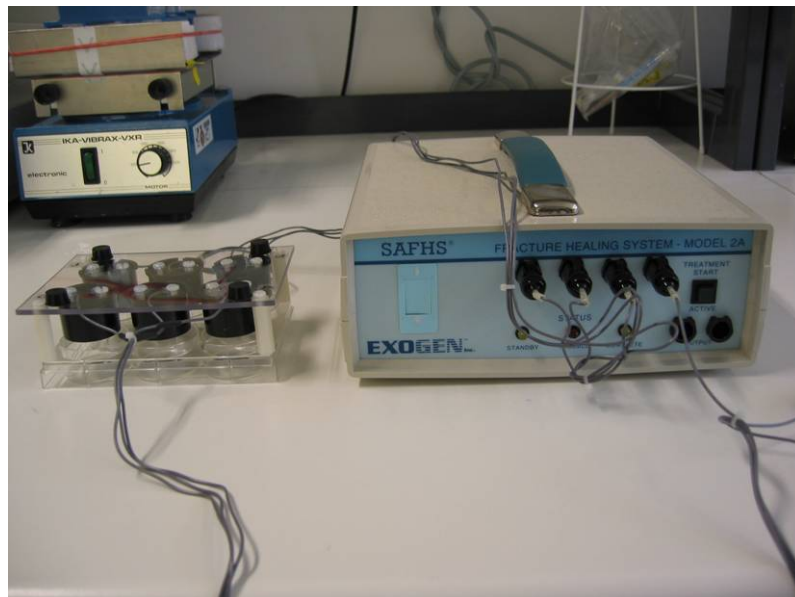


Abb. 2-7 SAFHS Ultraschallbelastungsapparatur der Firma Exogen mit für die Anwendung mit 6-Well-Platten modifizierten Schallgebern



Abb. 2-8 Schallempfänger

Gerätespezifikationen:

Ultraschallfrequenz	$1.5 \pm 5\%$ Megahertz (MHz)
Modulierende Signalbandbreite	$200 \pm 10\%$ Mikrosekunden (uS)
Wiederholungsrate	$1.0 \pm 10\%$ Kilohertz (kHz)
Effektiver Schallbereich	$3.88 \pm 1\%$ Quadratcentimeter (cm <sup>2</sup> )

Die Testung der Druckapparatur und die exakte Versuchsdurchführung werden im Kapitel 3.2.3 beschrieben

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

(100bp DNA-Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
1,9-Dimethyl-Methylene blue	Sigma Aldrich, Steinheim
1Kb DNA-Ladder 1000 $\mu$ g (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
3,3,5,5 Tetramethylbenzidin 99F%	Sigma Aldrich, Steinheim
4-Dimethylamino-pyridin	Fluka, Buchs, Schweiz
ABC-Stifte	SCI ScienceServices, München
ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim
Aggarose Typ IX	Sigma Aldrich, Steinheim
Albumin bovine	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammonium acetat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammonium dihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Antibiotic-Antimykotik	Gibco, Karlsruhe
Antistatic spray	Roth, Karlsruhe
ATCC-Medium	LGC Promochem, Wesel
Bienenwachs gelb	Roth, Karlsruhe
Biobond Tissue Section adhesive	Polysciences, Eppleheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chaps	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloramine T	Sigma Aldrich, Steinheim
Chondroitinsulfat A	Sigma Aldrich, Steinheim
Chondroitinsulfat C	Sigma Aldrich, Steinheim
cis-4-hydroxy-prolin	Sigma Aldrich, Steinheim
Cobaltchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
D+Saccharose	Roth, Karlsruhe
Density Marker Beads	Amersham, Braunschweig
Deoxyribonuclease I	Cellsystems, Katharinen
DEPC (diethyl pyrocarbonate)	Sigma Aldrich, Steinheim
DePex	Serva, Heidelberg
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylaminoethanol	Serva, Heidelberg
Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylmetylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNA (Heringssperma)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNA-Molecular-Weight-Marker II	Roche Diagnostics, Mannheim
DNAse	Cellsystems, Katharinen
dNTP's für cDNA	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA x2H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethydiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylene diamine tetra acid	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycolmonoethylether	Sigma Aldrich, Steinheim
FBS	PAN Biotech, Aidenbach
Gelatine vom Bovine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
Gelatine von Porcine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
GelLoadingSolution (DNA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glasperlen 2,85-3,3mm	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol)	Sigma Aldrich, Steinheim
ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim

L-4 Hydroxyprolin	Fluka, Buchs, Schweiz
L-Ascorbic acid (Vit C)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Linoleic acid	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
MinGelExtractionKit (50)	Qiagen, Hilden
Novocain 1%	Hoechst, Frankfurt
NucleaseFreeWater	Promega, Mannheim
Osmium Tetroxide 4% aqueous	Sigma Aldrich, Steinheim
Papain	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicilin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Pepsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Percoll	Biochrom, Berlin
Percoll	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphate buffered saline	Fluka, Buchs, Schweiz
Pikrinsäure	Riedel, Seelze
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
Primer für cDNA-Synthese (OligodT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Primer für LightCycler-PCR	TIB Molbiol, Berlin
L-2,3,4,5- <sup>3</sup> H Prolin	Amersham Biosciences
ProLong Antifade Kit	Molecular Probes, Göttingen
Protease	Sigma Aldrich, Steinheim
Puffer für RNA-Gel	Sigma Aldrich, Steinheim
RNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Rnase-Zap	Sigma Aldrich, Steinheim
RNA-Zol	Biozol, Eching
Roti-Phenol_Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
SDS Ultra Pur	Roth, Karlsruhe
Siriusrot F3BA	Chroma, Konegen
Soluene 350	Perkin Elmer, Rodgau
TEMED	Roth, Karlsruhe
TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
Thermoklar	Biomed, Oberschleißheim
Thimerosal	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
ToluidineBlue O	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton X - 100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe
TWEEN 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Ultraschallkontaktgel	Schoblocher, Landsberg
Wasser HPLC	Sigma Aldrich, Steinheim
Ziegenserum	Gibco, Karlsruhe

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a.

### 2.3 Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Grünberg
Carbonat-bicarbonat Buffer Caps	Sigma Aldrich, Steinheim
cDNA-Synthese-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
CellTracker Green	Molecular Probes, Göttingen
DIG-Oligonucleotide-Tailing-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Elisa TGF- $\beta$ 1	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa MMP-1	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa MMP-9	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa active MMP-9	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa MMP-13	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa TIMP-1	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa TIMP-2	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa sVEGF-R1	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa VEGF-R2	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa VEGF-D	R&D Systems, Wiesbaden
Elisa VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Light Cycler Kit (SybrGreen)	Roche Diagnostics, Mannheim
OsirisChondrogenesisKits	Osiris Therapeutics, Baltimore, USA

### 2.4 Verbrauchsmaterial und Geräte

Bio-Dot Apparatus	BioRad, München
Brutschrank CO <sub>2</sub> Heracell 240	Heraeus, Hanau
Calibrated Imaging Densitometer GS 710	BioRad, München
Calimatic – pH Meter 766	Knick, Berlin
Combitips plus 0,1/0,5/1/5/10/25/50 ml	Eppendorf, Hamburg
Druckmessfolien Super Low/Low	SPI, East Hanover, USA.
Elektromagneten RS 346-104 12V	RS Components, Walldorf
Elektronenmikroskop Zeiss EM 902	Zeiss, Oberkochen
EMax Microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg
FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenz ELISA Reader Fusion	Canberra Packard, Schwadorf
Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Homogenisator Xenox 40/E	Xenox, Niersbach
Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Kühlfalle Alpha 1-2	Christ, Osterode am Harz
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCyclerCapillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
Microtom HM360 – Semidünnschnitt	Microm, Berlin
Mikroskope:	Leitz, Wetzlar
	Optech, Toronto, Kanada
	Leitz, Wetzlar
	Axiotech Vario
	Zeiss, Oberkochen
	Leitz DMRD
	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera DMC 2	Polaroid, Offenbach



## 2.5 Antikörper und Enzyme

Collagenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Collagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, Steinheim
Streptavidin-Peroxidase-Polymer	Sigma Aldrich, Steinheim
Biotin-Conjugated Anti Collagen I	BioMol, Hamburg
Biotin-Conjugated Af.Pu. A.Collagen Type.II	BioMol, Hamburg
Biotin-Conjugated Anti Collagen X	BioMol, Hamburg
Lektin	Sigma Aldrich, Steinheim
Mouse IgG2a negative control-FITC, clone OX 34	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Mouse monoclonal Isotype Control IgG1-Fitc, clone W3/25	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD14-FITC, mouse IgG1, clone 61D3	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD29-FITC, mouse IgG1, clone 4B7R	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD 34-Fitc, mouse IgG2a clone AC 136	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD44-Fitc, mause IgG1, clone B-F24	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD 105-FITC, mouse IgG1, clone SN6	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CD166-FITC, mouse IgG1, clone 3A6	Acris Antibodies, Hiddenhausen

## 2.6 Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert. Alle Sense-Primer für PCR tragen den Zusatz 5', alle Antisense-Primer tragen den Zusatz 3'.

Oligonukleotid	Sequenz
5'GAPDH	5'-gAA ggT gAA ggT Cgg AgT C-3'
3'GAPDH	5'-gAA gAT ggT gAT ggg ATT TC-3'
5'Aggrecan	5'-ACT TCC gCT ggT CAg ATg gA-3'
3'Aggrecan	5'-TCT CgT gCC AgA TCA TCA CC-3'
5'Typ I Kollagen	5'-Agg gCC AAg ACg AAg ACA TC-3'
3'Typ I Kollagen	5'-AgA TCA CgT CAT CgC ACA ACA-3'
5'Typ II Kollagen	5'-TTC AgC TAT ggA gAT gAC AAT C-3'
3'Typ II Kollagen	5'-AgA gTC CTA gAg TgA CTg Ag-3'
5'Typ X Kollagen	5'-gAg gAA gCT TCA gAA AgC Tg-3'
3'Typ X Kollagen	5'-CTg gTT TCC CTA CAg CTg A-3'

Oligonukleotid	Sequenz
5'VEGF	5'-CCT TgC TgC TCT ACC TCC AC-3'
3'VEGF	5'-TCT CTC CTA TgT gCT ggC CT-3'
5'MMP-13	5'-TggTggTgA TgA AgA TgA TTT gTC T-3'
3'MMP-13	5'-AgT TAC ATC ggA CCA AAC TTT gAA g-3'
5'TIMP-1	5'-ATT CCg ACC TCg TCA TCA g-3'
3'TIMP-1	5'-CgT CCA CAA gCA ATg AgT g-3'
5'TIMP-2	5'-Tgg gTC ACg gAg AAg AAC ATC-3'
3'TIMP-2	5'-gAg CCg TCg CTT CTC TTg AT-3'

## 2.7 Puffer und Lösungen

Acetat-Citrat-Puffer

60g Natriumacetattrihydrat  
 23g Zitronensäuremonohydrat  
 6ml Essigsäure  
 17g Natriumhydroxid  
 ad 500ml mit Aqua.dest.  
 (pH 6,5)

Blockingpuffer für Immunhistochemie

60ml Aqua.dest., 120ml Tris 0,2M  
 (0,08M),  
 2400mg NaCl (0,8%), 450mg  
 Thiomersal (0,15%), 60ml Triton  
 4%(0,8%), 30ml Ziegenserum (10%),  
 30ml FCS (10%)

Chloramin-T Reagenz (0,056M)

1,27g Chloramin-T  
 20ml 50% n-Propanol  
 ad 100ml in Acetat-Citrat Puffer

Ehrlich's Reagenz (1M)

15g p-Dimethylaminobenzaldehyd  
 100ml n-Propanol/Perchlorsäure  
 (2:1 v/v)

DAB Stammlösung 10X	0,5% Diaminobenzidin in 0,1% BSA
DAB Arbeitslösung	200µl DAB/BSA +1800µl 0,1M mPBS +80µl Ni/Co + 6µl 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (direkt vor Verwendung)
DEPC H <sub>2</sub> O	500ml aqua bidest+ 500µl DEPC ( Diethylpyrocarbonat )
DNA Ladungspuffer	Sigma Aldrich, Steinheim
DMMB Reagenzlösung	40 mM NaCl 40 mM Glycin 46 µM DMMB (pH 3,0)
Ethidiumbromid Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
MEFO	25ml 0,2M Phosphat- Puffer, 25ml 37%ige Formaldehydlösung, 50ml Methanol 100%
Ni/Co Lösung (für DAB Arbeitslösung)	100mg NiCl <sub>2</sub> + 5mg CoCl <sub>2</sub> + 10mg BSA + 10ml H <sub>2</sub> O
Papain Puffer	5mM L-Cystein 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM EDTA 125 µg/ml Papain (pH 7,5)
PBE Puffer	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM EDTA (pH 7,5)
m-PBS- Puffer (1M)	47,2g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O + 6,6g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O + 36,0g NaCl mit a.d. auf 500g auffüllen pH zwischen 7,0 und 7,4
PBS	150mM NaCl 8mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,3)

Phenylhydrazin Lösung	200ml Waschpuffer ohne Triton 4mg Phenylhydrazin (=0,002%) Gesamtlösung wird geteilt: 2x100ml 100ml entsprechen Lösung 1 zu den zweiten 100ml gibt man 30µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6% (=0.03%) = Lösung 2
Picosiriusrotfärbelösung	0,5 g Sirius red F3B in 500ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung
Picosiriusrotwaschlösung	5ml konz. Essigsäure in 1l dest. Wasser
RNA Probenpuffer	4ml DEPC-H <sub>2</sub> O+ 1ml 1,25 M Tris pH=6,8 + 800µl 10%iges SDS (Natriumdodecylsulfat ) + eine Spatelspitze Bromphenolblau +eine Spatelspitze Xylencyanol
RNA-Sample-Loading_Buffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Safranin-O Färbelösung	2g Safranin-O bei 60°C in 100ml Wasser auflösen und heiß filtrieren
TAE-Puffer-	40mM Tris-HCL 1mM EDTA (pH 8,3)
TBE-Puffer	89mM Tris-HCL 89 mM H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> 2mM EDTA (pH 8,0)
TNE-Puffer (10x)	100mM Tris 10mM EDTA 2M NaCl (pH 7,4)
Toluidinblaufärbelösung	0,1g Toluidinblau in 100ml bidest. Wasser.
Trispuffer 0,2M	24,228g Tris , 1000ml aqua.dest. (pH 7)

Tris – Waschpuffer für Immunhistochemie	780ml Tris 0,2M , 2220ml Aqua.dest., 24,96g NaCl, 1200µl Triton 4% (Gesamt 3000ml)
Tyrodes Lsg: (1Liter Lösung)	9,73g Tyrodes Salz, 0,2g NaHCO <sub>3</sub> , 10ml Streptomycin-Penicillin, 990ml H <sub>2</sub> O

## 2.8 Medien, Medienzusätze und Seren

Calf Serum Heat inactivated.	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	PAA, Cölbe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	PAA, Cölbe

### Für mesenchymale Stammzellkulturen (MSC-Medium):

#### *Low Glucose DMEM (1000mg/l)*

+10% FCS hitzeinaktiviert., +10% FCS nicht hitzeinaktiviert., +Hepes Puffer 1%,  
+PenStrep 1%

#### Chondrogenesemedium

#### *High Glucose DMEM (0,11g/l)*

+1% Sodium- Pyruvat, ITS +3, +Dexamethason, TGFβ1 recombinant, Ascorbinsäure

## 2.9 Adhäsions – und Wachstumsfaktoren

ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim
Transforming Growth Factor-β1	R&D Systems, Wiesbaden
Ascorbinsäure:	0,0794g Ascorbinsäure, 20ml Tyrodes Lsg,
Dexamethason (Stock):	0,00392g Dexamethason, in 10ml 100% Ethanol
Dexamethason (Gebrauch):	200µl Stocklösung, 19,8ml <i>DMEM Low Glucose</i>

## 2.10 Biomaterialien

Die Hyaluronsäurebenzylester(Hyaff)-Gelatine-Kompositmatrix (Abb. 2-9 und 2-10) wurde vor jedem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch nach einem patentierten Herstellungsverfahren (Europäisches Patent Nr.: PCT/EP99/09444) frisch hergestellt. Das Hyaff-Gelatine Verhältnis betrug stets 70%–30%. Dieses Mischungsverhältnis hat sich in zahlreichen Vorversuchen sowohl mechanisch als auch biologisch bewährt. Die Porengröße der Trägermatrizes (Höhe 4mm, Ø5mm) betrug 350-450µm. In der Abbildung 2-10 wird anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in der linken und mittleren Spalte die hohe Porösität der Matrix und deren Sekundärporenbildung dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die zellbeladene Trägermatrix. Gut ersichtlich ist hierbei die optimale Adhäsion der Zellen in den Poren.



Abb. 2-9 Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Kompositmatrix in Aufsicht

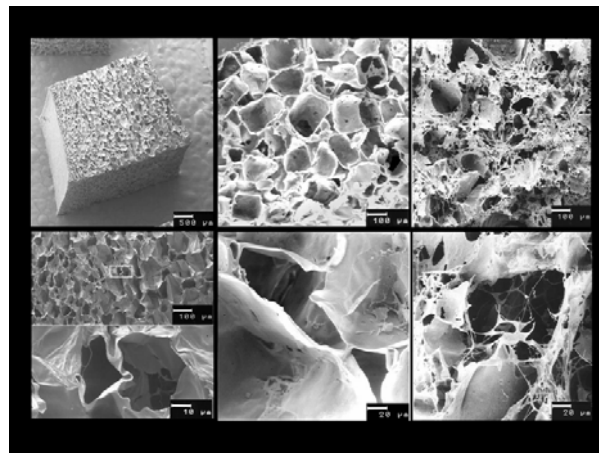


Abb. 2-10 Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahmen der verwendeten Tissue Engineering Trägermatrix.

## 2.11 Zellmaterial

Humane Chondrozyten
Humane mesenchymale Stammzellen (Nachweis über FACS, siehe 3.1.6)
Humane Meniskuszellen

Das verwendete humane Material wurde am Universitätsklinikum Regensburg mit ausdrücklichem Einverständnis der Patienten zu Forschungszwecken entnommen. Die Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg hat für die durchgeführten Studien ein positives Votum abgegeben (00/134 vom 10/2000).

Die Verfahren der Zellgewinnung werden im Kapitel Methoden erläutert.

## 2.12 Tiere

Balb/c nu/nu Mäuse

Harlan Winkelmann, Borcheln

## 2.13 Intravitalmikroskopie

Zur Untersuchung der Angiogenese in Tissue Engineering Matrices wurde ein neues Verfahren entwickelt, dessen Ursprünge in der Tumorforschung liegen (Guba et al. 2002). Hierfür werden immundefizienten Nacktmäusen eigens für diese Methode konstruierte, transparente Titanrückenhautkammern (Abb. 2-11) angenäht. Innerhalb dieser Kammern kann man nach Ruhigstellung der Tiere in speziellen Halterungen (Abb. 2-12) den Verlauf der Angiogenese in die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Abb. 2-13), einer Digitalmikroskopkamera (1) und eines SVHS Videorekorders (2) täglich über einen Zeitraum von maximal vierzehn Tagen dokumentieren.

Diese Versuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen: 621-2531.1-18/02).

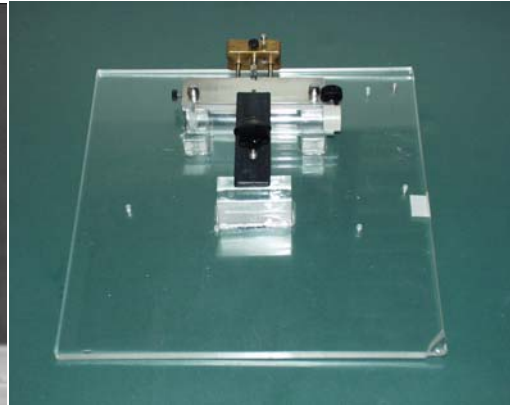
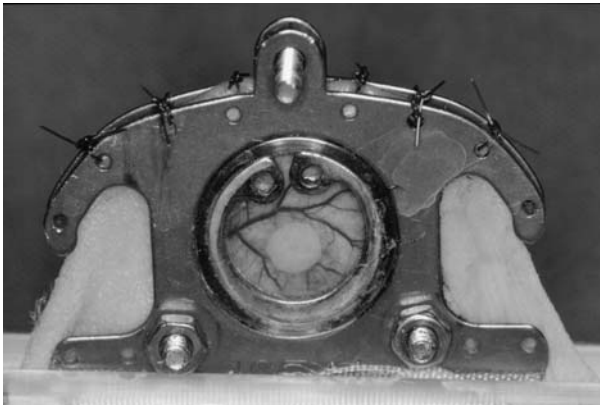


Abb. 2-11 Transparente Titanrückenhautkammer    Abb. 2-12 Fixierungsplatte aus Plexiglas

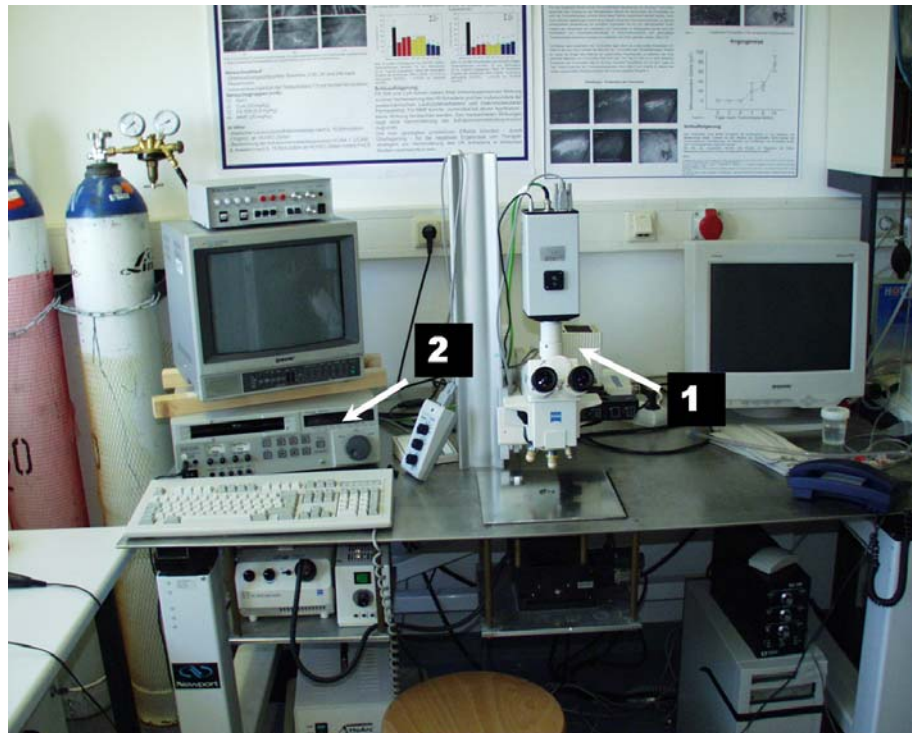


Abb. 2-13 Intravitalmikroskopievorrichtung mit Fluoreszenzmikroskop,  
Digitalmikroskopkamera und SVHS Videorekorder

## **3. Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden und Zellherkunft**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminar Flow) durchgeführt. Alle verwendeten Zellkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Hera Safe) kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium erneuert.

#### **3.1.1 Gelenkknorpel- und Meniskuszellen**

Der verwendete Gelenkknorpel stammte aus Gewebe, das Patienten im Alter zwischen 40 und 65 Jahren während der Operation zum totalendoprothetischen Gelenkflächenersatz entnommen wurde. Gründe für den Gelenkflächenersatz waren einerseits arthrotisch veränderte Hüft-, Knie- und Schultergelenke, andererseits totalendoprothetisch versorgte Schenkelhalsfrakturen. Es wurde makroskopisch intakter Knorpel entnommen, degenerative Knorpelareale wurden nicht verwendet.

Die verwendeten Meniskuszellen stammten aus Gewebe, das Patienten im Alter zwischen 18 und 65 Jahren beim totalendoprothetischen Gelenkflächenersatz oder Meniskusresektion nach Sportverletzungen entnommen wurde.

Intraoperativ wurde das entfernte Gewebstück steril in NaCl-Lösung (0,9 %) gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank gelagert (4°C). Spätestens sechs Stunden postoperativ erfolgte die Überführung des Knorpels in serumfreies RPMI-Medium mit erneuter Lagerung des Gewebes im Kühlschrank (4°C). Die Weiterverarbeitung wurde spätestens 24 Stunden nach Gewebeentnahme durchgeführt.

##### *3.1.1.1 Zellgewinnung*

##### Mechanische Dissoziation:

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde das Knorpelgewebe vom Knochen mit einem Skalpell getrennt und in kleine Stückchen mit maximaler Größe von 1mm<sup>3</sup> zerschnitten. Dabei wurden die Knorpelstückchen durch serumfreies RPMI-Medium vor dem Austrocknen bewahrt. Nach mechanischer Zerkleinerung des Knorpels wurden die Stückchen in einen Erlenmayerkolben (100 ml Volumen) gegeben, in dem sich ca. 30 Glaskugeln mit 2 mm Durchmesser zur mechanischen Durchmischung befanden.

### Enzymatische Dissoziation

20ml serumfreies RPMI-Medium und die Enzyme Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml), Hyaluronidase (Konzentration 0,1 mg/ml) und Desoxyribonuclease (Konzentration 0,15 mg/ml) sowie 1% Penicilin/Streptomycin wurden zugegeben. Zur siebzehnständigen, enzymatischen Dissoziation wurde der Erlenmayerkolben auf einer Heizplatte (37°C) fixiert, die wiederum auf einen Taumler gestellt wurde.

Die Zellsuspension wurde durch einen Filtrationsprozess (70µm Filter) von den nicht dissoziierten restlichen Knorpelstückchen und Debris getrennt.

Die Enzymreaktionen wurden durch die Zugabe von 20ml serumhaltigem RPMI-Medium gestoppt. Nach zweimaligem Abzentrifugieren mit 2000g (20°C; 5 Minuten) wurde das Zellpellet in 10ml RPMI-Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 3.1.4).

#### *3.1.1.2 Amplifikation:*

Die gewonnenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $10^6$  Zellen pro ml serumhaltigen RPMI-Mediums eingestellt und je  $10^6$  Zellen auf eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgebracht. Es wurden 15ml Medium zugegeben und die Amplifikation der Zellen im Brutschrank (37°C; 7% CO<sub>2</sub>; wasserdampfgesättigt) durchgeführt. Der Mediumwechsel in der Amplifikationsphase erfolgte alle drei Tage.

Nach Erreichen einer etwa 80% Konfluenz (Zellbedeckung des Kulturflaschenbodens) wurden die adhärenen Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst und in einem Verhältnis von 1:4 auf neue Kulturflaschen verteilt.

Hierzu wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen einmalig mit sterilem PBS Puffer gespült und 3ml Trypsin auf die kultivierten Zellen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von circa fünf Minuten bei 37°C im Brutschrank wurde das vollständige Ablösen der Zellen im Invertmikroskop kontrolliert und die Enzymreaktion durch die Zugabe von 9ml serumhaltigen RPMI-Mediums geblockt. Danach erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 2000g (20°C; 5 Minuten). Die gewonnene Zellsuspension wurde mit jeweils 4 ml serumhaltigem RPMI-Medium auf neue Kulturflaschen aufgeteilt (Gesamtvolumen: 16ml).

### *3.1.1.3 Redifferenzierung*

Redifferenzierung von amplifizierten Chondrozyten bedeutet, dass die dedifferenzierten Zellen, welche gelenkknorpeluntypische Matrixbestandteile produzieren, in einem geeigneten Umgebungsmilieu die erneute Produktion von gelenkknorpelspezifischer extrazellulärer Matrix wiederaufnehmen.

Die Gewinnung der in der Amplifikationsphase am Zellkulturflaschenboden adhärenen Zellen erfolgte beim Erreichen von zellulärer Konfluenz. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium abpipetiert, die Zellen einmalig mit sterilem PBS Puffer gespült und 3ml Trypsin auf die adhärente Zellschicht aufgebracht. Dabei wurde auf die vollständige Bedeckung der Zellschicht mit Trypsin geachtet. Die Inkubationszeit dauerte circa fünf Minuten bei 37°C im Brutschrank. In regelmäßigen Abständen wurde unter dem Invertmikroskop das Ablösen der Zellen überprüft. Bei Nachweis einer vollständigen Adhärenzaufhebung wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von serumhaltigem RPMI-Medium im Volumenverhältnis 3:1 gestoppt. Nach zweimaligem Reinigen mit Medium und Zentrifugation bei 2000g (20°C, 5 Minuten) wurden die gewonnenen Zellen auf ihre Vitalität getestet und in der Neubauerzählkammer gezählt (siehe 3.1.4. Bestimmung der Lebendzellzahl).

Für die Redifferenzierung amplifizierter Chondrozyten ist eine Kultivierung der Zellen in einer geeigneten dreidimensionalen Matrix erforderlich. Für diesen Zweck wurde in unserem Labor eine Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Kompositmatrix entwickelt (siehe Material 2.10).

Das chondrogene Leistungspotential des Zell-Matrix-Konstrukts ließ sich in einem in vitro Chondrogenesemodell (siehe 3.1.3) nachweisen.

### **3.1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

#### *3.1.2.1 Zellgewinnung*

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen stammten aus Knochenmark, welches Patienten im Alter zwischen 17 und 65 Jahren im Verlauf von Beckenkammspanoperationen entnommen wurde.

Hierfür wird das erhaltene Knochenmark intraoperativ mit einer verdünnten Heparin Lösung versetzt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C eingelagert. Spätestens zwölf Stunden nach der Entnahme wird das Knochenmark mittels Percoll Gradienten Trennung aufgereinigt, die MSC enthaltene Fraktion (Dichte: 1,077 g/ml) in serumhaltiges MSC Medium (siehe Material 2.8) aufgenommen und damit eine Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 3.1.4) durchgeführt.

Um einen Anhaltspunkt über die Qualität der erfolgten MSC Selektion zu gewinnen, wurde eine FACS Analyse zur Bestimmung der, nach aktuellem Wissensstand (siehe (Webadresse4)), wichtigsten mesenchymalen Stammzell - spezifischen Oberflächenmarker (positiv für CD 29, CD 44, CD 105 und CD 166; negativ für CD 14, CD 34 und CD 45) durchgeführt (siehe 3.1.6).

#### *3.1.2.2 Percoll Gradienten-Trennung*

Zur Selektionierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark bedient man sich der Percollgradiententrennung. Hierfür wird eine Mischung aus 22,05ml Percoll (Sigma) mit 2,45ml 1,5 M NaCl und 10,50ml Tyrodes Lösung erstellt und bei 20000 g in einer Ultrazentrifuge ein Dichtegradient aufgebaut. 10ml Knochenmark werden in 40ml MSC Medium (Zusammensetzung siehe Material 2.8) aufgenommen, vorsichtig mit einer Pipette gemischt und anschließend bei 2000g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird daraufhin bis auf 5ml abgesaugt und das entstandene Zellpellet vorsichtig auf den Percollgradienten gegeben. Nach einer weiteren 15 minütigen Zentrifugation bei 2000g in der Ultrazentrifuge, Rotor SS-34, Code -Nr. 05, wird die Fraktion mit der Dichte 1,077 g/ml (ca. 16ml des Überstands) entnommen und mit 30ml frischem MSC Medium gemischt. Nach einer letzten Zentrifugation (5 Minuten/2000g) wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in circa 30ml MSC Medium gegeben. Anschließend wird das Medium vorsichtig resuspendiert und ein Assay zur Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 3.1.4) durchgeführt.

### *3.1.2.3 Amplifikation*

Die gewonnenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $10^7$  Zellen pro ml serumhaltigen MSC-Mediums eingestellt und je  $10^7$  Zellen auf eine  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche ausgebracht. Es wurden 15ml Medium zugegeben und die Amplifikation der Zellen im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$ ; wasserdampfgesättigt) durchgeführt. Der Mediumwechsel in der Amplifikationsphase erfolgte alle drei Tage.

Nach Erreichen einer etwa 80% Konfluenz (Zellbedeckung des Kulturflaschenbodens) wurden die adhärennten Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst und zur Differenzierung weiterverarbeitet.

Hierfür wurde das Kultivierungsmedium abpipetiert, die Zellen einmalig mit sterilem PBS Puffer gespült und 3ml Trypsin auf den adhärennten Zellschicht aufgebracht. Dabei wurde auf die vollständige Bedeckung der Zellschicht mit Trypsin geachtet. Die Inkubationszeit dauerte etwa fünf Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank. In regelmäßigen Abständen wurde unter dem Invertmikroskop das Ablösen der Zellen überprüft. Beim Nachweis einer vollständigen Adhärenzaufhebung wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von serumhaltigem MSC-Medium im Volumenverhältnis 3:1 gestoppt. Nach zweimaliger Reinigung mit Medium und anschließender Zentrifugation ( $2000\text{g}/5$  Minuten/ $20^\circ\text{C}$ ) wurden die gewonnenen Zellen auf ihre Vitalität getestet und in der Neubauerzählkammer gezählt (siehe 3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl).

### *3.1.2.4 Differenzierung*

Eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen bedeutet, dass die adulten Stammzellen aus dem Knochenmark von Patienten, in einem geeigneten Umgebungsmilieu die Produktion von gelenknorpelspezifischer, extrazellulärer Matrix aufnehmen.

Für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist eine Kultivierung der Zellen in einer geeigneten dreidimensionalen Matrix erforderlich. Für diesen Zweck wurde in unserem Labor eine Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Kompositmatrix entwickelt (siehe Material 2.10).

Das chondrogene Leistungspotential des Zell-Matrix-Konstrukts ließ sich in einem in vitro Chondrogenesemodell (siehe 3.1.3) nachweisen.

### **3.1.3 In vitro Chondrogenesemodelle**

In Vorarbeiten konnte sowohl histologisch als auch nasschemisch gezeigt werden, dass eine Kombination aus 1% Ascorbinsäure, 1% Dexamethason, 1% ITS+3 , 1% Natriumpyruvat und 1% TGF- $\beta$ 1 in serumfreien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Chondrogenesemedium) die Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten/Meniskuszellen sowie die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu hyalinem Knorpel-ähnlichem Gewebe auslöst.

Hierbei kamen zwei unterschiedliche Zellkulturmodelle zur Anwendung. Im ersten Modell wurden die Zellen im sogenannten Aggregatzustand über 21 Tage beobachtet. Zur Herstellung dieser kugelförmigen Zellaggregate wurden die adhärennten Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst und einer Zellzählung unterworfen. Jeweils 200.000 Zellen wurden in einem 15ml Falconröhrchen bei 2000g/5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und der entnommene Medienüberstand zu späteren ELISA Untersuchungen bei -80°C gelagert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden Zellaggregate entnommen und histologisch, molekularbiologisch (RT-PCR) sowie nasschemisch (DNA, Glycosaminoglycane, Kollagen) untersucht (Johnstone et al. 1998).

Im zweiten Zellkulturmodell wurde das Chondrogenesepotential der Zellen mit Hilfe einer dreidimensionalen Trägermatrix (Eigenherstellung, siehe Material 2.10) untersucht. Hierfür wurden nach Erreichen von circa 80% Konfluenz jeweils zwei Millionen Zellen in 80 $\mu$ l Chondrogenesemedium (siehe oben) resuspendiert und in bioabbaubare, zylinderförmige, dreidimensionale Trägermatrizes (Höhe 4mm,  $\varnothing$  5mm, Porengröße 350-450 $\mu$ m, siehe Material 2.10) injiziert. Das Medium wurde wie auch bei den Zellaggregaten dreimal wöchentlich gewechselt und der entnommene Medienüberstand zu späteren ELISA Untersuchungen bei -80°C gelagert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Matrizes entnommen und histologisch, molekularbiologisch (RT-PCR) sowie nasschemisch (DNA, Glycosaminoglykane, Kollagen) untersucht (Angele et al. 1999).

### **3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Beim Vitalitätsassay wurden 50 $\mu$ l der konzentrierten Zellsuspension entnommen und mit 50 $\mu$ l Trypanblau (0,05%) resuspendiert. Trypanblau färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Hierdurch ist eine prozentuale Bestimmung von lebenden Zellen möglich.

Nach kurzer Einwirkzeit erfolgte die Vitalitätsprüfung und Zellzählung in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop. Die erzielte Zellzahl errechnet sich aus der Formel  $N = Z * X * 10^4$ , wobei Z die gezählte Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor, der sich aus dem Suspensionsvolumen (normalerweise 10ml) und der 2-fachen Verdünnung mit Trypanblau errechnet, und die Zahl  $10^4$  den „Kammerfaktor“ darstellen.

### **3.1.5 Trägermatrixbeladung**

Zur homogenen Einbringung der Zellen in die dreidimensionale Trägermatrix wurde ein spezielles Beladungsverfahren verwendet. Hierfür wurden 100µl Eppendorfpipettenspitzen mit schräg angeschnittenen Eppendorf Gelloaderpipettenspitzen kombiniert und autoklaviert (Abb. 3-1). Mit Hilfe einer 100µl Eppendorfpipette konnte man nach Einstechen in die poröse Trägermatrix das benötigte Volumen exakt applizieren. Aufgrund der hohen Porosität verteilte sich die Zell-Medium-Suspension annähernd homogen im Trägermaterial (histologisch nachgewiesen, Daten hier nicht gezeigt).

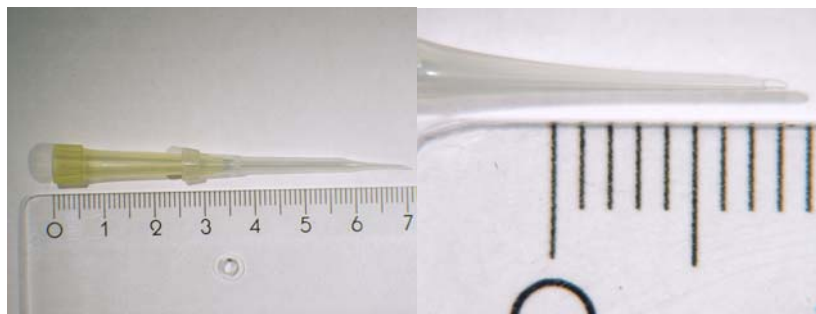


Abb. 3-1 Angeschliffene Eppendorfpipettenspitze zur homogenen Zellbeladung von Trägermatrizes

### **3.1.6 Durchflußzytometrie**

Alle durchflußzytometrischen Messungen wurden auf einem FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson) durchgeführt, als Listmode-Dateien gespeichert und die Auswertung in WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC- und PI-Farbstoffe. Die Messungen wurden mit drei beziehungsweise vier Parametern durchgeführt, die folgendermaßen belegt waren:

1. Forward scatter (FSC) Zellform/Zellgröße
2. Sideward scatter (SSC) Granularität
3. Fluoreszenzkanal 1 (F11-H) FITC-Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 3 (F13-H) PI-Fluoreszenzintensität

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen. Zur durchflußzytometrischen Untersuchung von Zellen wurden diese mit PBS (10% FCS v/v) gewaschen und auf FACS-Röhrchen verteilt (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen). Daraufhin wurden die Zellen bei 1200 U pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die anschließende Inkubation mit den Antikörpern (10 $\mu$ g/ml) fand in einem Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l statt. Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 Minuten wurden die Zellen in 1ml PBS (10% FCS v/v) resuspendiert und bei 1200 U wiederum pelletiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Nach Abtrennen des Überstandes erfolgte die Inkubation mit dem Sekundäantikörper (10 $\mu$ g/ml) für weitere 30 Minuten. Alle Inkubationen wurden auf Eis und im Dunkeln durchgeführt. In der Regel wurde jede Inkubation für 30 Minuten durchgeführt und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten zweimal mit PBS gewaschen. Alle Antikörperverdünnungen wurden mit PBS, das 10 % FCS beinhaltete, hergestellt.

## 3.2 Belastungsverfahren

### 3.2.1 Mechanische Kompression

#### 3.2.1.1 Testung der Apparatur

Nach der Konstruktion und Bau der computergesteuerten Belastungsapparatur (siehe Material 2.1.1) musste die für unsere zu belastenden Proben geeignete Belastungsintensität bestimmt werden. Hierfür wurden unsere Trägermatrizes in belastungsdefinierende Halterungen (maximal 40 % Kompression der Gesamtmatrixhöhe) (siehe Abb. 2-3) eingesetzt und sowohl im Trockenen als auch in wassergefüllten Belastungskammern (siehe Abb. 2-2) verschiedenen Drücken ausgesetzt. Die unterschiedlichen Drücke wurden über die Verwendung unterschiedlich schwerer Stabmagneten definiert. Der effektiv erzielte Belastungsdruck wurde rechnerisch ermittelt. Ziel war es, eine 40% Kompression der Trägermatrix zum Zeitpunkt der größten Belastung zu erreichen.

Rechnerisch:

Matrixdurchmesser 5 mm, Magnetgewicht (Stab) : 16 g

$\pi * r^2$  (Kreisfläche); 19,634954084936208 mm<sup>2</sup> ( r= 5mm/2)

$$\text{Druck (p)} = \frac{\text{Masse(kg)} * g(9,81m / s^{-2})}{\text{Fläche(m}^2\text{)}}$$

$$P = \frac{0,016 * 9,81}{0,000019634954084936208} = 7994,3 \text{ Pa} = 0,079943 \text{ bar} = 1,16 \text{ PSI}$$

Gemessen wurden die jeweils maximal erzielte Deformierung der Trägermatrix und die Reversibilität der erzielten Trägermatrixdeformierung im trockenen und im feuchten Zustand. Zur Anwendung kam der Druck, bei welchem an der Trägermatrix im feuchten Zustand eine 40 % Kompression (gemessen an der Gesamthöhe der Trägermatrix) mit maximaler Reversibilität der Trägermatrixstruktur (= ca. 8000 Pa) erzielt werden konnte (siehe Schema der mechanischen Kompression Abb. 3-2).

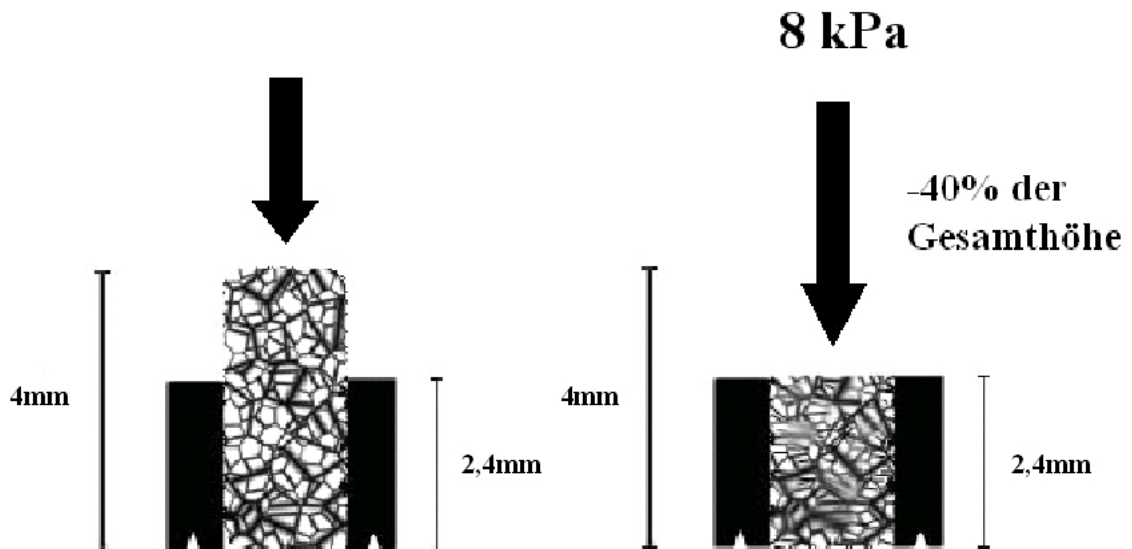


Abb. 3-2 Schema der mechanischen Kompression

### 3.2.1.2 Versuchsparameter

Zur zyklischen, mechanischen Belastung von Zell-Trägermatrix-Konstrukten wurden nach Erreichen einer etwa 80% Konfluenz jeweils 2 Millionen Zellen in 80µl ChondrogenesemEDIUM (siehe Material 2.8) resuspendiert und in bioabbaubare, zylinderförmige, dreidimensionale Trägermatrizes (Höhe 4mm, Ø 5mm, Porengröße 350-450µm, siehe Material 2.10) injiziert. Danach wurden die Matrizes unter sterilen Bedingungen in belastungsdefinierende Halterungen (siehe Material 2-3, zur Erzielung einer maximalen Kompression der Trägermatrix um 40% ihrer Gesamthöhe) fixiert und in sterile Kompressionskammern (siehe Material 2-2, 15ml Polypropylenröhrchen) überführt. Anschließend wurden 4ml frisch zubereitetes ChondrogenesemEDIUM (siehe Material 2.8) und ein steriler Dauermagnet definierten Gewichts in die Belastungskammern gegeben. Die Polypropylenröhrchen wurden daraufhin auf Elektromagneten innerhalb eines Warmluftinkubators platziert. Unter Verwendung der SIOS Interface Software Do-It wurde ein Programm zur Belastungssteuerung geschrieben. Die Elektromagneten erhielten eine sinusoidale Steigerung und Abschwächung der Stromspannung und bewegten damit die in den Belastungskammern befindlichen Stabmagneten auf und ab. Der Stabmagnet traf mit einer „physiologischen“ Frequenz von 0,33 Hz auf die Proben auf. Die maximale Belastungsstärke von 7994 Pa und 40% Gesamtkompression wurde wie in Punkt 3.2.1.1 beschrieben bestimmt. Die Proben wurden im Allgemeinen über einen Zeitraum von

sieben Tagen täglich vier Stunden lang belastet. Vor und nach der vierstündigen Belastungsphase wurde das alte Medium durch frisch hergestelltes Chondrogenesemedium ersetzt. Nach der Belastung blieben die Belastungskammern auf den auf Dauerabstoßung gepolten Elektromagneten (Proben ohne Belastung durch Stabmagnet) innerhalb des Warmluftinkubators. Ein Teil der Proben wurde direkt nach der siebentägigen Belastungsphase entnommen und zur späteren Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die verbleibenden Matrizes wurden anschließend über einen weiteren Zeitraum von 7 oder 14 Tagen (in der Regel 14 Tage) im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}/5\%/\text{CO}_2$  kultiviert, um ihnen ausreichend Zeit zur Differenzierung, Matrixbildung und Biosyntheseantwort zu geben. Danach wurden sie zur biochemischen, radiochemischen und molekularbiologischen Analyse sowie zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung entnommen und weiterverarbeitet. Die Gruppe der belasteten Proben wurde mit zwei unterschiedlich behandelten Kontrollgruppen verglichen. Die Zell-Matrix-Konstrukte der ersten Kontrollgruppe wurden abgesehen von der täglichen, zyklischen Belastung auf die gleiche Art behandelt wie die Experimentalgruppe, das heißt sie wurden ebenfalls in Halterungen in den Belastungskammern, aber ohne die Stabmagneten, auf freie Elektromagneten innerhalb des Warmluftinkubators platziert. Die zweite Kontrollgruppe wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum bei  $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert und nur für den zweimal täglich durchgeführten Mediumwechsel entnommen. Alle Experimente wurden an jeweils zwei Proben pro Versuchsbedingung durchgeführt. Der Zellkulturmedienüberstand nach Belastung wurde zur späteren immunologischen Analyse (ELISA) gesammelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.2 Hydrostatische Druckbelastung**

#### *3.2.2.1 Testung der Apparatur*

Nach Konstruktion und Bau der computergesteuerten Belastungsapparatur (siehe Material 2.1.2) in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Maschinenbau (Prof. Hammer) der Fachhochschule Regensburg wurde die Apparatur getestet. Um den Druckverlauf im Reaktor zu überprüfen, boten sich zwei Verfahren an. Das Aufkleben eines Dehnmessstreifens auf die Außenwand des Reaktors( Abb.3-3 und 3-4) ist hierbei die erste Möglichkeit. Die Dehnung des Gehäuses, die durch die Druckimpulse verursacht wird und vom Innendruck abhängig ist, kann dabei über diesen Dehnmessstreifen erfasst werden. Das ausgehende Signal wird durch einen

Messverstärker geleitet und am PC visualisiert.

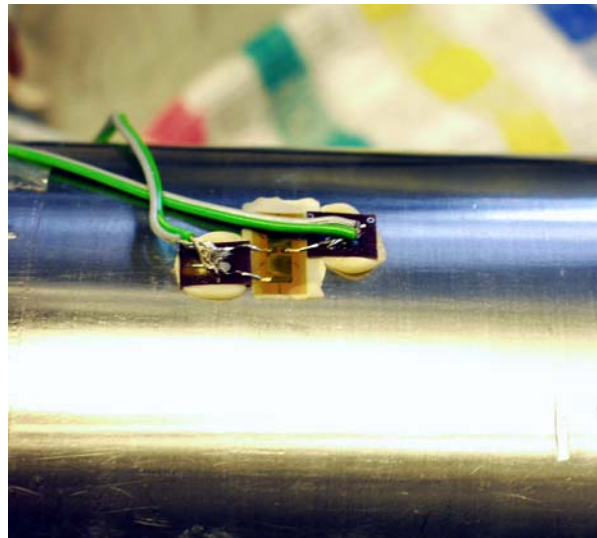
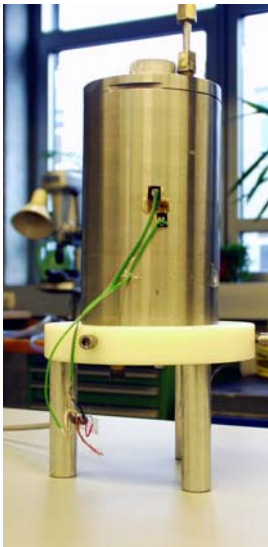


Abb. 3-3 und Abb.3-4 Dehnmessstreifen auf dem Außenmantel des Druckbehälters

Da die Kalibrierung der Dehnmessstreifen sehr kompliziert ist, beschloss man den Versuch dagegen mit einem Piezodruckaufnehmer (Abb.3-5) durchzuführen. Dieser wurde in den Reaktor eingeschraubt und lieferte somit ein unverfälschtes Ergebnis, denn der Aufnehmer stand im direkten Kontakt mit dem Druckmedium und dadurch waren keine Verluste durch die Behälterwand zu berücksichtigen.



Hersteller	Kistler
Type	6121 A1
Messbereich	0 ... 250 bar
Empfindlichkeit	-3,3 pC/bar
Linearität	± 0.4 % FSO
Temperatur	-80 ... 350°C

Abb. 3-5 Dynamischer Piezodruckaufnehmer

Durch den dynamischen Piezodruckaufnehmer (Abb. 3-5 ), der vor dem Versuch zur Sicherheit zusammen mit dem Ladungsverstärker neu kalibriert wurde, ließen sich der Druckverlauf und die Höhe des Druckes über einen PC und die Software LAB VIEW visuell in einem Diagramm darstellen (Daten nicht gezeigt).

Kalibrierung

Der Messverstärker und die zur Datenerfassung benötigte Software (LAB VIEW) wurden installiert bzw. programmiert. Für die Kalibrierung wurde ein Druckaufnehmer auf den Anschluss der Ölleitung, der sich unmittelbar hinter dem Impulsgeberventil befand, geschraubt (Abb. 3-6).



Druckaufnehmer



Druckregler

Abb.3-6 Druckaufnehmer im Ölkreislauf

Abb.3-7 Regelventil und Manometer

Ein Manometer und ein einstellbares Druckregelventil (Abb. 3-7), beide im System integriert, ermöglichten das Einstellen eines Druckes zwischen 0 und 160 bar. Am Verstärker (Mehrkanal Ladungsverstärker Typ 5019A von Kistler) wurden laut Bedienungsanleitung folgende Einstellungen vorgenommen (Abb. 3-8):



TS1.00E+1

SC1.00E+2

Abb.3-8 Einstellung Messverstärker

Die Werte 10pC/M.U. für (TS1.00E+1) und 100 M.U./V für (SC1.00E+2) wurden

eingegeben, dadurch ergibt die Multiplikation 1000 pC/V, also 1V Ausgangsspannung für 1000 pC Eingangsladung (Die Bezeichnung M.U. ist eine Abkürzung für Measuring Unit). Daraus folgt bei einer Empfindlichkeit des Druckaufnehmers von 13,3 pC/bar.

$$1000 \frac{pC}{V} = 1,0V$$

$$\frac{1000 \frac{pC}{V}}{13,3 \frac{pC}{bar}} = 75,18 \frac{V}{bar}$$

Bei einer Druckänderung von 1,0 bar verändert sich also die Spannung um 75,18 Volt. Als nächster Schritt erfolgte die Kalibrierung der Software, indem der errechnete Wert in das Programm LAB VIEW eingegeben wurde. So konnte in der Graphik die Höhe des Drucks direkt angezeigt werden. Auf der Skala entsprach nun eine Druckänderung von 1,0 bar genau 0,1 Volt.

Eine andere Möglichkeit des Skalenabgleichs ergab sich durch die Gleichungen eins bis drei.

$$(1) \quad F = P * A$$

$$(2) \quad A = \frac{D^2}{4} * \pi$$

$$(3) \quad P = \frac{F}{D^4} * 4 * \pi \quad \Rightarrow \text{entspricht dem Wert auf der Skala}$$

Der im System herrschende Druck konnte nun über den Druckaufnehmer am Bildschirm visualisiert werden. Als weitere Kontrolle wurden die hochsensitiven Druckmessstreifen Pressurex (Sensor Products, USA) zum Nachweis des Maximaldrucks im Versuchsverlauf verwendet.

Prinzip der Pressurex Druckmessstreifen:

Das Pressurex System besteht aus zwei unterschiedlich beschichteten Polyesterfilmen (Abb. 3-9). Das Transfer Sheet ist mit einer Schicht mikroverkapselter Farbpartikel beschichtet. Das Developer Sheet ist mit einer Farentwicklersubstanz imprägniert. Vor der Verwendung des Pressurex Systems mussten gleich große Streifen aus den beiden Folien herausgeschnitten und vorsichtig, mit der Kontaktfläche zueinander, aufeinander gelegt werden. Damit die Druckmessstreifen nicht gegeneinander verrutschen oder im

Kulturmedium aufschwimmen, wurden die Messstreifen vorsichtig mit Hilfe von Tesafilm wasserdicht aufeinander geklebt. Nach Aufbringen von Druck auf die Messstreifen reagierten die im Transfer Sheet integrierten Farbpartikel mit der Entwicklersubstanz des Developer Sheet und es kam zu einer definierten Farbentwicklung. Mit Hilfe eines mitgelieferten Farbintensitätsstandardbogens (Abb. 3-10), eines hochauflösenden Scanners (Calibrated Imaging Densitometer GS 710, BioRad) und einer Farbdichteauswertungssoftware (Quantity One, Version 4.0, BioRad) konnte der jeweilig erzielte Maximaldruck ermittelt werden. Abbildung 3-11 zeigt als Beispiel einen Farbintensitätsstandardbogen mit belasteten Pressurex Druckmessstreifen.

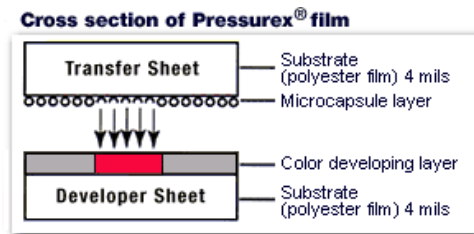


Abb. 3-9 Pressurex Prinzip Schema

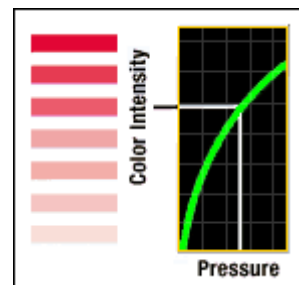


Abb.3-10 Farbintensitätsstandardbogen



Abb. 3-11 Farbintensitätsstandardbogen mit belasteten Pressurex Druckmessstreifen

### 3.2.2.2 *Versuchsparameter*

Zur zyklischen, hydrostatischen Belastung von Zell-Trägermatrix-Konstrukten wurden nach Erreichen einer circa 80% Konfluenz jeweils zwei Millionen Zellen in 80µl ChondrogenesemEDIUM (siehe Material 2.8) resuspendiert und in bioabbaubare, zylinderförmige, dreidimensionale Trägermatrizes (Höhe 4mm, Ø 5mm, Porengröße 350-450µm, siehe Material 2.10) injiziert. Danach wurden die Matrizes unter sterilen Bedingungen in gläserne Reaktionsgefäße (siehe Material Abb. 2-6) überführt. Nach luftblasenfreier Befüllung der Gefäße mit chondrogenem Medium wurden diese mit einem Schraubdeckel (siehe Material Abb. 2-6) verschlossen, der ein teflonbeschichtetes Gummiseptum enthielt. Zur Verhinderung von druckbedingten Wassereintritten in das Reaktionsgefäß wurde der Spalt zwischen Deckel und Glaskorpus zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. In speziellen Drahtalterungen wurden die Probengefäße in den Druckbehälter der Belastungsapparatur (siehe Material Abb. 2-5) eingebracht. Dieser war mit bidestilliertem Wasser gefüllt, welches mit Hilfe eines Wasserbades auf 37 °C temperiert wurde. Nach Verschluss und Entgasung des Systems wurden die Proben mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Druckstärke von 80-730 PSI (5,5 – 50 bar) zyklischen Druckimpulsen je vier Stunden täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen ausgesetzt. Da das flüssige Druckmedium inkompressibel ist, übertrug sich der Druck über das Septum direkt in das Innere der Fläschchen und somit auf die Zellen. Der Druck wurde mittels einer computergesteuerten Zahnradpumpe erzeugt (siehe Material Abb. 2-4). Nach der vierstündigen Belastungsphase wurden die Proben aus der Druckkammer entnommen, das Medium gewechselt und im Brutschrank bei 37°C/5%/CO<sub>2</sub> bis zur nächsten Druckbelastungsphase kultiviert. Ein Teil der Proben wurde direkt nach der siebentägigen Belastungsphase entnommen und zur späteren Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die verbleibenden Matrizes wurden anschließend über einen weiteren Zeitraum von 7 oder 14 Tagen (in der Regel 14 Tage) im Brutschrank bei 37°C/5%/CO<sub>2</sub> kultiviert, um ihnen ausreichend Zeit zur Differenzierung, Matrixbildung und Biosyntheseantwort zu geben.

Danach wurden sie für die biochemische und molekularbiologische Analyse sowie die histologische Untersuchung entnommen und weiterverarbeitet. Die Gruppe der belasteten Proben wurde mit zwei unterschiedlich behandelten Kontrollgruppen verglichen. Die Zell-Matrix-Konstrukte der ersten Kontrollgruppe wurden, abgesehen von der täglichen, zyklischen Belastung, auf die gleiche Art behandelt wie die

Experimentalgruppe, das heißt sie wurden ebenfalls in den Belastungsgefäßen kultiviert und während der Belastungsphase der Experimentalgruppe außerhalb der Brutschanks bei 37°C in einem Warmluftinkubator aufbewahrt. Die zweite Kontrollgruppe wurde für die gesamte Kulturzeit bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank in 15ml Falconröhrchen kultiviert und nur für den zweimal täglich durchgeführten Mediumwechsel entnommen. Alle Experimente wurden an jeweils zwei Proben pro Versuchsbedingung durchgeführt.

### **3.2.3 Belastung mit Ultraschall**

#### *3.2.3.1 Testung der Apparatur*

Mit Hilfe eines mitgelieferten Ultraschallsensors (siehe Material Abb. 2-8) wurden vor jedem Belastungszeitpunkt die Ultraschallköpfe der Ultraschallapparatur (siehe Material Abb. 2-7) auf ihre Funktion überprüft. Damit konnte laut Hersteller die Einhaltung der Gerätespezifikationen gewährleistet werden.

#### *3.2.3.2 Versuchsparameter*

Zur Belastung von Zell-Trägermatrix-Konstrukten mit Ultraschall wurden nach Erreichen einer 80% Konfluenz jeweils zwei Millionen Zellen in 80µl ChondrogenesemEDIUM (siehe Material 2.8) resuspendiert und in bioabbaubare, zylinderförmige und dreidimensionale Trägermatrizes (Höhe 4mm, Ø 5mm, Porengröße 350-450µm, siehe Material Abb 2-10) injiziert. Danach wurden die Matrizes unter sterilen Bedingungen in 6-Well-Zellkulturplatten überführt. Auf den sechs Ultraschallköpfen platziert wurden die Proben sieben Tage lang je 5, 20 oder 40 Minuten mit einer Pulsfrequenz von 1kHz und Intensität von 30 mW/cm<sup>2</sup> belastet. Die ideale Schallübertragung wurde mit Hilfe eines Ultraschallkontaktgels zwischen den Schallköpfen und der 6-Wellplatte gewährleistet. Dieser Versuchsaufbau wurde bereits von Nolte et al. zur Belastung von Chondrozyten verwendet (Nolte et al. 2001). Es konnte hierbei eine korrekte Schallübertragung auf das Medium nachgewiesen werden. Nach der jeweiligen Belastungsphase wurden die Proben von den Schallköpfen genommen, das Medium gewechselt und im Brutschrank bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> bis zur nächsten Druckbelastungsphase kultiviert. Ein Teil der Proben wurde direkt nach der siebentägigen Belastungsphase entnommen und zur späteren Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die verbleibenden Matrizes wurden anschließend über einen weiteren Zeitraum von 7 oder 14 Tagen (in der Regel 14 Tage) im Brutschrank bei 37°C/5%/CO<sub>2</sub> kultiviert, um ihnen ausreichend Zeit zur Differenzierung, Matrixbildung und

Biosyntheseantwort zu geben.

Danach wurden sie zur biochemischen und molekularbiologischen Analyse sowie zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung entnommen und weiterverarbeitet. Die Gruppe der belasteten Proben wurde mit zwei unterschiedlich behandelten Kontrollgruppen verglichen. Die Zell-Matrix-Konstrukte der ersten Kontrollgruppe wurden, abgesehen von der täglichen zyklischen Belastung, auf die gleiche Art behandelt wie die Experimentalgruppe, das heißt dass sie ebenfalls in den Belastungsgefäßen kultiviert und während der Belastungsphase der Experimentalgruppe außerhalb des Brutschranks aufbewahrt wurden. Die zweite Kontrollgruppe wurde für die gesamte Kulturzeit bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank in 15ml Falconröhrchen kultiviert und nur für den zweimal täglich durchgeführten Mediumwechsel entnommen. Alle Experimente wurden an jeweils zwei Proben pro Versuchsbedingung durchgeführt.

Nach exakt dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben wurden neben den dreidimensionalen Trägermatrizes auch aus 200.000 mesenchymalen Stammzellen bestehende Zellaggregate (Herstellung unter 3.1.3 beschrieben) mit niedrig-intensivem, gepulsten Ultraschall belastet, kultiviert und mit den gleichen Analyseverfahren ausgewertet.

### **3.3 Arbeiten mit RNA**

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt und die Arbeitsflächen mit RNaseZap vor jedem Arbeitsgang gereinigt. Es wurden nur sterile Glaswaren und Plastikreaktionsgefäße sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Wasser wurde mit 0,1% Diethylpyrocarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121 °C autoklaviert (DEPC Wasser).

#### **3.3.1 Isolierung von total-RNA aus Zell-Matrix-Konstrukten und Zellaggregaten**

Zur Isolierung von total-RNA wurde RNazol verwendet. Dazu wurden entweder eine Matrix oder drei Zellaggregate ohne weitere Vorbehandlung in RNazol aufgenommen, mit Hilfe eines Xenox Homogenisators und Rotilabo Mikrohomogenisatoren in Eppendorf-Cups mechanisch zerkleinert und die RNA nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die RNA wurde nach dem Präzipitationsschritt mit Isopropanol durch Zugabe von Ethanol (75% V/V) gewaschen, an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Der Gehalt von RNA in wäßrigen Lösungen wurde

spektralphotometrisch durch die Bestimmung der Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die RNA-Konzentration wurden daraus nach Sambrook et al. errechnet, wobei folgende Formel verwendet wurde (Sambrook 1989):

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = 40 \times E_{260}$$

Die Reinheit der Proben wurde durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm sowie durch Gelelektrophorese kontrolliert. Eine Extinktion bei 280nm wird im Wesentlichen durch Proteine verursacht. Der Quotient  $E_{260/280}$  liegt bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook 1989). Nach Auftrennung der RNA in die charakteristischen 18s und 28s Banden konnte anhand der Bandenstruktur und mit Hilfe eines internen Standards die Reinheit und Konzentration der eingesetzten RNA ermittelt werden.

### **3.3.2 Reverse Transkription**

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase; RTase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (=complementary DNA; cDNA). Für die Synthese von cDNA-Molekülen, die komplementär zu mRNA-Molekülen sind, wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Sie hybridisieren mit dem poly-A-Ende der mRNA und dienen so der RTase als Startbereich. Für die reverse Transkription wurden pro Ansatz 0,25µg gereinigte mRNA in dem folgenden Reaktionsansatz eingesetzt (First Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen).

Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes (pro Probe):

Oligo (dT)-Primer	1 µl
RNA in RNase freiem Wasser	0,25 µg
<u>dNTPs</u>	<u>1 µl</u>
mit Aqua dest.	auf 12 µl
5x First Strand Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
<u>Reverse Transkriptase</u>	<u>1 µl</u>
	19 µl

Der Ansatz wurde fünf Minuten bei 60°C (Annealing), 50-60 Minuten bei 42°C sowie

15 Minuten bei 70°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente durch PCR wurde die cDNA 1:5 mit DEPC Wasser vorverdünnt und 2 µl der erhaltenen cDNA-Lösung eingesetzt.

### **3.4 Arbeiten mit DNA**

#### **3.4.1 Quantitative RT-PCR mittels Light Cycler**

Zur Quantifizierung von mRNA aus Matrices und Zellaggregaten wurde wie folgt vorgegangen:

RNA wurde wie in 3.3.1 beschrieben aus Matrices und Zellaggregaten isoliert, wie in 3.3.2 in cDNA umgeschrieben und mittels der Light Cycler Technik, nach Angaben des Herstellers, quantifiziert. Hierzu wurde für jede Probe der folgende Ansatz hergestellt:

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20µl durchgeführt.

5'Primer	0,2 µl
3'Primer	0,2 µl
Fast Start	2 µl
MgCl <sub>2</sub> : je nach Molarität (siehe Tabelle 3-2)	
1mM	0 µl
2mM	0,8 µl
3mM	1,6 µl
4mM	2,4 µl
5mM	3,2 µl
<u>Wasser</u>	<u>auf 18 µl</u>
<u>cDNA</u>	<u>2 µl</u>
	20 µl

Hierbei wurden die Primer mit einer Konzentration von 0,05 pmol/µl eingesetzt. Beim Umgang mit dem Mastermix musste auf Lichtschutz geachtet werden. Der Versuchsansatz wurde dann in das Light Cycler Gerät gegeben. Nach einem Denaturierungsschritt von zehn Minuten bei 95°C wurden üblicherweise 40 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung:	95°C; 5 sek
Primerannealing:	siehe Tabelle 3-1 ; 5 sek
Elongation:	72°C; 25 sek

Oligonukleotid	Annealing-Temperatur	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
GAPDH	60 °C	3 mM
Aggrecan	60 °C	4 mM
Type I Collagen	60 °C	2 mM
Type II Collagen	60 °C	3 mM
Type X Collagen	60 °C	4 mM
VEGF	63 °C	3 mM
MMP 13	60 °C	2 mM
TIMP 1	60 °C	2 mM
TIMP 2	60 °C	2 mM

Tabelle 3-1 Annealing-Temperaturen und zugehörige MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen der verwendeten Primer

### 3.4.2 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration 1,5% (w/v) betrug. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromidstammlösung im Verhältnis 1:10<sup>4</sup> versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer elektrischen Spannung (5-10 V/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurden zusätzlich entsprechende DNA-Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard II, III, X, XIV) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254nm sichtbar gemacht und photographiert.

### 3.5 Nasschemische Analyseverfahren

#### 3.5.1 DNA Bestimmung

Zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden die Proben und der DNA Standard (4mg/ml, Calf Thymus DNA) über Nacht (16 Stunden) bei 60°C/800rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) in mit 500µl Papainpuffer (5mM L-Cystein, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 7,5; Gesamtgehalt Papain: 150 µg/ml) gefüllten Eppendorf-Cups verdaut.

Mit Hilfe des mitverdauten DNA Standardstocks konnte nach Erstellung einer Verdünnungsreihe mit Papainpuffer (40/30/20/10/5/2,5/1,0 µg/ml) eine Standardkurve erstellt werden. Zur Bestimmung der jeweiligen Konzentration wurden 30µl Probe/Standard mit 600µl Hoechst Dye (Sigma #33258, 1µg/ml in 1xTNE Puffer, pH 7,4) gemischt und fluorimetrisch (SFM 25, BioTek Kontron Instruments) bei einer Anregung von A<sub>360</sub> nm und einer Emission von A<sub>460</sub> nm vermessen.

Papainpuffer wurde als BLANK zur Hintergrundmessung verwendet. Alle Proben und Standards wurden dreifach pipettiert und gemessen. Notwendige Verdünnungen wurden mit Papainpuffer erstellt.

Der aus der Standardkurve bestimmte Wert wurde zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an DNA in der jeweiligen Matrix durch 2 dividiert, da sich die Standards auf einen Milliliter beziehen, die Proben aber nur in 500µl Verdauung aufgenommen wurden.

#### 3.5.2 Glykosaminoglykan (GAG) Bestimmung

Zur Bestimmung des GAG Gehalts wurde die bereits für die DNA Analyse mit Papainpuffer erstellte Matrixverdauung weiterverwendet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde vorab eine Stammlösung aus Chondroitinsulfat-A erstellt (Verdau von Chondroitinsulfat-A in Papainpuffer) und aus dieser die Standards mit linear absteigenden Konzentrationen von 40µg/ml bis 1µg/ml in Papainpuffer weiterverdünnt. Es wurden drei Ansätze à 50µl Probe/Blank(Papainpuffer)/Standard entnommen und jeweils mit 200µl DMMB Reagenzlösung in 96-Wellplatten pipettiert und gemischt. Die Messung erfolgte in einem ELISA Reader (E<sub>Max</sub> Microplate reader, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540nm. Notwendige Verdünnungen wurden mit Papainpuffer erstellt.

Der aus der Standardkurve bestimmte Wert wurde zur Berechnung der Gesamtkonzentration an GAG in der jeweiligen Matrix durch 2 dividiert, da sich die

Standards auf einen Milliliter beziehen, die Proben aber nur in 500µl Verdaulösung aufgenommen wurden.

### 3.5.3 Kollagen Bestimmung

Zur Bestimmung des Kollagen Gehalts wurde die bereits für die DNA Analyse mit Papainpuffer erstellte Matrixverdaulösung weiterverwendet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine Hydroxyprolinstocklösung (1mg/ml in Aqua.dest.) hergestellt und die einzelnen Standards nach folgendem Schema pipettiert (Tabelle 3-2):

1µl aus Stock =1µg	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	1	0
+x µl H <sub>2</sub> O..	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	24	25

Tabelle 3-2 Pipettierschema für Hydroxyprolinassay

Alle Standardproben wurden zur Herstellung einer Finalkonzentration von 2N NaOH mit 25µl 4N NaOH versetzt und vorsichtig gemischt. 250µl der Matrixverdaulösung wurden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (Alpha RVC, Christ) getrocknet und anschließend in 100µl 2N NaOH aufgenommen. Die Proben und Standards wurden daraufhin für vier Stunden in einem Dampftopf hydrolysiert.

50µl des jeweiligen Hydrolysats wurden nach dem Abkühlen mit 450µl Chloramine-T Reagenz versetzt, vorsichtig gemischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Oxidationsschritt).

Das farbgebende Chromophor wurde nach weiterer Zugabe von 500µl Ehrlich's Reagenz und einer 20 minütigen Inkubation bei 65°C entwickelt.

Die Messung erfolgte in einem ELISA Reader (E<sub>Max</sub> Microplate reader, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540nm.

Als BLANK wurde der letzte Standard (0µg) verwendet. Die Proben und Standards wurden jeweils doppelt pipettiert und gemessen.

Der aus der Standardkurve bestimmte Wert wurde zur Berechnung der Gesamtkonzentration an Kollagen in der jeweiligen Matrix mit dem Faktor 30 multipliziert.

Dieser Faktor ergab sich aus den folgenden Annahmen:

- Die Standards geben direkt den gemessenen Gehalt an (bezogen auf die Stocklösung: 1mg/ml)
- Die Proben wurden aber nur in 500µl Verdauung aufgenommen (Faktor x2)
- Die Proben sind nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge in 100µl 2N NaOH aufgenommen worden, wobei nur 50µl zur Gehaltsbestimmung verwendet wurden (Faktor x2)
- Der Anteil an Hydroxyprolin im Kollagen beträgt 13,3 % (Faktor x7,5).

### **3.5.4 Kollagenbiosynthesebestimmung**

Die Kollagenbiosyntheserate wurde durch Markierung der Matrizes mit 20 µCi <sup>3</sup>H-Prolin (L-{2,3,4,5-<sup>3</sup>H}-Proline, Amersham Biosciences, Nr. TRK 750) in 2ml ChondrogenesemEDIUM für 23 Stunden bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> am Tag 0/7/14/21 bestimmt. Im Anschluss an die Markierung wurden die Matrizes mit einer 1mM Prolin/PBS-Lösung bei 4°C (pro Waschschrift ca. 13ml Waschpuffer) gewaschen bis der Strahlungswert des Waschpuffers unter 2000 cpm/ml lag (ca. 5-6 Waschschrift à 10 Minuten). Im Anschluss wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung am Tag 22 bei -80°C gelagert. Am Tag 22 des jeweiligen Versuchs wurden alle Matrizes wie in Punkt 3.5.1 beschrieben in Papainpuffer verdaut. 100µl der Matrixverdauung wurden mit 10ml Hionic-Fluor (Packard, Nr. 601 3319) in einem Scintillationsröhrchen gemischt und die Strahlung (DPM, decays per minute) unter Verwendung eines β-Counters (Wallac WINSPECTRAL 1414 Liquid Szintillation Counter) gemessen. Der DNA Gehalt wurde wie in Punkt 3.5.1 beschrieben gemessen und mit den erhaltenen DPM in Relation gesetzt.

## **3.6 Histologische Methoden**

### **3.6.1 Gewebepreparation**

Direkt nach Entnahme am jeweiligen Versuchszeitpunkt (Tag 1/7/14/21) wurden die Proben in Mefo (siehe Material 2.7) zwei Stunden fixiert und anschließend über eine Saccharosereihe entwässert. Das Verfahren wurde wie folgt durchgeführt:

Im Anschluss an die Mefofixierung:

- 10 min. spülen mit Methanol/Phosphatpuffer (50/50 V/V)
- 30 min. spülen mit 0,1 M Phosphatpuffer

- 1h spülen mit 10% Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)
- über Nacht in 20% Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)
- 2h in 30% Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)

Danach wurde das Gewebe in Tissue Tek (Sakura) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Mit Hilfe eines Kryostaten (Microm) wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 12µm angefertigt und auf vorbeschichtete Adhäsivobjektträger aufgebracht. Nach zweimaligen vorsichtigem Waschen der Präparate in Aqua bidest. (zum Entfernen der Tissue Tek Reste), wurden die Schnitte mit einem PAP-Pen (hydrophober Slidemarker) umrahmt und zur jeweiligen Färbung weiterbearbeitet.

Im Anschluss an die folgenden gewebespezifischen Färbungen wurden die Präparate über eine Isopropanolreihe entwässert:

- 2x 5min. 70% Isopropanol p.A. (V/V)
- 2x 5min. 80% Isopropanol p.A. (V/V)
- 2x 5min. 90% Isopropanol p.A. (V/V)
- 2x 5min. 95% Isopropanol p.A. (V/V)
- 2x 5min. 100% Isopropanol p.A. (V/V)
- 2x 5min. 100% Xylol p.A.

Daraufhin wurden die Schnitte mit DePex- Lösung luftdicht eingedeckt und zur späteren Digitalphotoauswertung trocken aufbewahrt.

### **3.6.2 Toluidinblau Färbung**

Diese führt zu einer blauvioletten, metachromatischen Färbung der Extrazellulärmatrixbestandteile von Knorpelgewebe. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt.

- 1) Die Präparate mit Aqua bidest. spülen.
- 2) Mit Farbstoffgebrauchslösung (siehe Material 2.7) überschichten.
- 3) Inkubation bei Zimmertemperatur für 10-15 Minuten.
- 4) Nach gründlichem Spülen in bidestiliertem Wasser werden die Färbeergebnisse mikroskopisch kontrolliert
- 5) Eventuell nochmalige Färbung.
- 6) Nach Erreichen der gewünschten Farbeintensität Entwässerung der Präparate (siehe Punkt 3.6.1).

(Ausnahme: Nur kurzes, vorsichtiges spülen mit 70% Isopropanol, da Toluidinblau sich

darin rasch aus dem Präparat herauslöst)

### **3.6.3 Picrosirius Rot Färbung**

Diese führt zu einer roten Färbung der Kollagenanteile im Präparat. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt.

- 1) Die Präparate mit Aqua bidest. spülen.
- 2) Mit Farbstoffgebrauchslösung (siehe Material 2.7) überschichten.
- 3) Inkubation bei Zimmertemperatur für eine Stunde.
- 4) Nach gründlichem Spülen in der Picrosiriusrotwaschlösung (siehe Material 2.7) werden die Färbeergebnisse mikroskopisch kontrolliert
- 5) Eventuell nochmalige Färbung.
- 6) Nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität Entwässerung der Präparate durch 3x 5 Minuten spülen in 100% Ethanol und 2x 5 Minuten in 100% Xylol. .

### **3.6.4 TUNEL-Assay**

Während der Apoptose entstehen durch die DNA-Spaltung freie 3'-Enden. Der *Terminal Desoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL) - Assay* (Li 1996; Lucchinetti et al. 2002; Maaser et al. 2002) ermöglicht das Markieren der freien DNA-3'-Enden durch das Anhängen von fluoreszenzmarkiertem dUTP.

Die Präparate wurden einmal mit 200µl 1% BSA in PBS gewaschen und anschließend mit 0,1% Triton X-100 (10µl Triton-X-100 in 10ml PBS) zwei Minuten lang permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit 50µl TUNEL-Reaktionsmix (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch (Leitz DMRD, Leitz) untersucht. Apoptotische Zellen konnten über ihre grüne Fluoreszenz detektiert werden (Maaser et al. 2002).

### **3.7 Immunhistochemische Verfahren**

Die Präparatevorbereitung erfolgte wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte in PBS Puffer gewaschen. Die Blockade der Bindung nichtspezifischer Antikörper wurde durch eine 30minütige Inkubierung mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) enthaltenden PBS erreicht.

Der Verlauf einer immunhistochemischen Färbung wird in folgendem Schema gezeigt:

Die Präparate 2x 3min in Waschpuffer ohne Triton spülen.  
Anschließend 1x 3min in Waschpuffer mit Triton spülen.  
Daraufhin 30-45min mit Blockingpuffer überschichten (enthält Ziegen Serum zur Blockade unspezifischer Bindungen).  
Die Negativ Kontrollen bleiben über Nacht mit Blockingpuffer beschichtet.  
Die Präparate werden mit dem Primärantikörper beschichtet und über Nacht inkubiert.  
Am nächsten Tag die Präparate 3x5min in Waschpuffer ohne Triton spülen.  
Dann 1x5min in Waschpuffer mit Triton spülen.  
Anschließend 60 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubieren.  
Spülschritte mit Waschpuffer wie oben.  
Zur Blockierung unspezifischer Peroxidasen mit Phenylhydrazin – Lösung (siehe Material 2.7) behandeln.  
10min Lösung I  
20min Lösung II  
(Währenddessen die ABC Lösung herstellen; dieABC-Lsg. muß 30 Minuten vor der Verwendung aktiviert werden).  
Spülschritte mit Waschpuffer wie oben.  
Die Präparate 90 Minuten mit der ABC Lösung inkubieren.  
Spülschritte mit Waschpuffer wie oben (evtl. etwas länger).  
Die DAB-Lösung hinzugeben und die Färbung unter dem Mikroskop kontrollieren.  
Bei ausreichender Färbung die Reaktion durch spülen in Triton haltigem Waschpuffer stoppen.  
3x5 min. in Waschpuffer mit Triton spülen.  
Im Anschluss die Präparate mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe entwässern.  
Eindeckung der Präparate mit DePex.

Im Falle einer Fluoreszenzfärbung ändert sich die Abfolge der Arbeitsschritte beginnend nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wie folgt:

Spülung der Präparate mit Waschpuffer 3x5min. mit Triton/ 1x3min. ohne Triton.  
Die Präparate werden zwei Stunden lang im Dunkeln mit einem geeigneten Fluoreszenzantikörper, beispielsweise Fluorolink TM Cy<sup>TM</sup> 2 labelled Streptavidin inkubiert.  
Im Anschluß werden die Präparate 3x5min in Waschpuffer mit Triton gespült.  
Die Eindeckung der Objektträger erfolgt mit ProLong<sup>R</sup> Antifade Kit.

Nach dem Eindecken werden die Präparate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### **3.7.1 Kollagen Typ I/II/X Färbung**

Um den Kollagenantikörpern den Zugang zur Extrazellulärmatrix zu erleichtern, wurden die Präparate vor der Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper für 30 Minuten mit 1 % Pronase in 1 % BSA, PBS und anschließend für 30 Minuten mit Chondroitinase ABC (0.1 U/ml in 0.1 M Tris-acetate, Seikagaku) angedaut. Als Primäantikörper wurden Typ I Kollagen (Rockland, USA) in der Verdünnung 1:200, Typ II Kollagen (II-II6B3, Developmental Studies Hybridoma Bank) in der Verdünnung 1:100 und Typ X Kollagen (Rockland, USA) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Zur Visualization wurden die Schnitte mit dem jeweils spezifischen Biotin-konjugierten Sekundäantikörper behandelt, mit ABC Lösung aktiviert und mit Diaminobenzaldehyd (DAB) gefärbt.

### **3.7.2 Lektin Färbung**

Zur Gefäßdarstellung wurden die Präparate mit Biotin gelabelten Lektin (BS-I, Verd. 1:20, Sigma) aus *Bandeiraea Simplicifolia* als Antikörper behandelt. Hierbei wurde die hohe Affinität des Lektins zu Endothelzellen ausgenutzt.

### **3.8 Immunologische Methoden**

#### **3.8.1 Allgemeine ELISA-Methode**

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem sogenannten „Sandwich“-Prinzip. Die Mikrotiterplatte wird dazu mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den „Fang-Antikörper“ gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper nachgewiesen, dem sogenannten Sekundäntikörper, wobei dieser mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten Sekundäntikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den Sekundäntikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Am häufigsten werden Antikörper mit den Enzymen Peroxidase (POX) oder alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, Enzymmarkiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt.

#### **3.8.2 ELISA zur Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1, MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2**

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Bei diesen ELISAs liegt das „Sandwich“-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde bei allen Versuchen zu jedem Medienwechsel der Zellkulturüberstand abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Zur Untersuchung des zeitlichen Expressionsverlauf wurde bei zahlreichen Versuchen zusätzlich das 24 Stunden Medium entnommen, d.h. am Tag 1/7/14/21 der Zellkultur wurde das Medium gewechselt und nach 24 Stunden am Folgetag erneut durch frisches ChondrogenesemEDIUM ersetzt.

Die Besonderheiten der einzelnen ELISA-Kits sind in der folgenden Tabelle 3-3 beschrieben:

ELISA	Besonderheiten	Hersteller
TGF-β <sub>1</sub>	Latentes TGF β <sub>1</sub> muss vor dem Assay in seine immunoreaktive Form umgesetzt werden.	R&D Systems
VEGF		R&D Systems
VEGF-R1		R&D Systems
VEGF-R2		R&D Systems
VEGF-D		R&D Systems
MMP-1	Fluorometrischer Assay	R&D Systems
MMP-9	Fluorometrischer Assay	R&D Systems
MMP-13	Fluorometrischer Assay	R&D Systems
TIMP-1		R&D Systems
TIMP-2		R&D Systems

Tabelle 3-3 Besonderheiten der verwendeten ELISA

Durchführung eines Sandwich-ELISA Assays am Beispiel des VEGF ELISA:

Vor Beginn des Assays wird mit Hilfe des mitgelieferten VEGF Standards (mit 1ml Calibrator Diluent RD5K auf 2000 pg/ml eingestellt) eine Standardverdünnungsreihe (1000/500/250/125/62,5/31,2/15,6 pg/ml) mit der Calibrator Diluent RD5K Lösung als Nullwertstandard erstellt. 50µl Assay Diluent RD1W werden in jedes einzelne Well einer mit monoklonalen Mäuseantikörpern gegen VEGF beschichteten 96-Well Platte vorgelegt und mit 200µl Standard, Kontrolle oder Probe gemischt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Wells entleert und mehrmals mit Waschpuffer gespült. Im Anschluss daran werden 200µl VEGF Konjugat in jedes Well pipettiert und erneut bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wird in jedes Well 200µl Substratlösung hinzugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 50µl Stop Solution in jedes Well gegeben. Die Messung der optischen Dichte erfolgt

innerhalb von 30 Minuten mit einem ELISA Reader (Emax Microplate Reader, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540nm.

Abweichend von diesem Protokoll wurden die ELISA der Matrixmetalloproteinasen (MMP) durchgeführt:

#### MMP-ELISA:

Neben der notwendigen Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen mit p-aminophenylmercuric acetate (APMA) findet eine deutlich längere Inkubation mit Substrat (17-20 Stunden bei 37°C in feuchter Atmosphäre) statt. Es wurde keine Bestimmung der optischen Dichte sondern eine fluorimetrische Auswertung (Fluorometer Fusion , Canberra Packard) bei einer Excitation von 320nm und einer Emission von 405nm durchgeführt.

### **3.9 Angiogeneseuntersuchungen**

#### **3.9.1 Modell Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie stellt eine ursprünglich für die Tumorforschung entwickelte Untersuchungsmethode der Angiogenese in vivo dar. Unter Anwendung des Rückenhautkammermodells (Guba et al. 2002) konnte in einem in vivo Setting das Angiogeneseverhalten von Gefäßen in unterschiedlich differenzierte Zell-Matrix-Konstrukte mikroskopisch untersucht werden.

Diese Versuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen: 621-2531.1-18/02).

#### **3.9.2 Tiere**

Alle Tiere waren entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum. Es wurden männliche BALB/c nu/nu Mäuse der Firma Harlan Winkelmann, Borchon, verwendet. Besonders wichtig war, dass die Mäuse vor der Operation mindestens 22g Gewicht hatten. Als Spender für die Erythrozyten dienten ebenfalls männliche BALB/c nu/nu Mäuse.

#### **3.9.3 Operationstechnik**

An anästhesierten (Xylazin/Ketamin) BALB/c nu/nu Mäusen wurde beidseitig die Haut der Rückenhautfalte entfernt. Danach wurde an beiden Seiten ein Titanrahmen (Material

Abb. 2-11) angenäht und die Zell-Scaffold Konstrukte eingelegt. Das System wurde mit Hilfe eines in einen der Rahmen integrierten Glasfensters abgeschlossen.

### **3.9.4 Versuchsaufbau**

Die Implantation der Beobachtungskammer wurde während intraperitonealer Ketamin/Xylazinnarkose (100 mg/kg Ketamin und 10 mg Xylazin) durchgeführt. Für die Mikroskopie der Rückenhautkammer wurden die Tiere in Plexiglasröhren (siehe Material Abb. 2-12) schmerzfrei immobilisiert. Bereits in der Vorphase der Versuche wurden die Tiere durch Animierung mit Futterreizen auf ein Verweilen in den Plastikröhren konditioniert. Die Mäuse wurden täglich mit Hilfe eines Axiotech Vario Mikroskops und eines Videodokumentationssystems (Videokamera +S-VHS Video Rekorder) zur späteren Offline-Analyse des Gefäßwachstums und der Gefäßdichteentwicklung über 14 Tage intravitalmikroskopisch untersucht (Material Abb. 2-13). Alle Untersuchungen waren nach den bisherigen Erfahrungen schmerzfrei für die Tiere und konnten daher im Wachzustand durchgeführt werden. Nach Beendigung der Beobachtungszeit (nach 14 Tagen) wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren) getötet.

Es wurde der Einfluss verschieden differenzierter Zell-Matrix-Konstrukte auf das angiotaktische Verhalten untersucht. Vor Beginn der 14tägigen Beobachtungsphase musste das jeweilige Probenmaterial vorbereitet werden.

Die Versuchsdurchführung wird am folgenden Beispiel der Versuchsgruppen Leermatrix gegen MSC beimpfte Matrix näher erleutert:

14 nu/nu balb/c Mäusen wurden transparente Titan-Rückenhautkammern implantiert. In diese Kammern wurden biodegradable Matrices (Hyaluronsäurebenzylester/Gelatine-Kompositrängerscaffold) mit definierter Porengröße (350 µm) als Kontrollgruppe eingesetzt. Als Experimentalgruppe wurden die Matrices mit je einer Million synchronisierten mesenchymalen Stammzellen (Zellgewinnung siehe 3.1.2) beimpft und nach einer zweistündigen Adhäsionsphase bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> in die vorbereitete Rückenhautkammer eingesetzt. Die gerichtete Gefäßeinsprossung in diese Matrices wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen in vivo mikroskopisch dokumentiert. Abschließend wurden die Matrices bezüglich osteochondraler Differenzierung und Angiogenese histologisch aufgearbeitet (Toluidinblau und Lektin-oberflächenmarkerfärbungen) und das Videomaterial zur Gefäßdichtebestimmung ausgewertet.

Zur Kontrolle der operativen Methodik wurden bei jedem Versuch zwei Mäusen Rückenhautkammern ohne Trägermatrizes implantiert.

Versuchsvariationen sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Zellart	Vorbehandlung der Zellmatrixkonstrukte	Tierzahl
keine	Leermatrix	6
MSC	Direkt nach Zellernte eingesetzt	12
MSC	14 Tage bei 37°C/5%CO <sub>2</sub> in Chondrogenesemedium vorkultiviert	12
Meniskuszellen	Direkt nach Zellernte eingesetzt	6
Meniskuszellen	14 Tage bei 37°C/5%CO <sub>2</sub> in Chondrogenesemedium vorkultiviert	6

Tabelle 3-4 Versuchsvariationen der Angiogeneseversuche

Parallel zu allen Versuchen wurden mit der jeweiligen Zellart beimpfte Trägermatrizes in vitro in chondrogenem Medium kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde zur späteren Analyse an den Tagen 7/14/21 und 8/15/22 (24 Stunden Medium) gesammelt und bei -80°C gelagert. Ausgewertet wurde der Expressionsverlauf verschiedener für die Angiogenese wichtiger Zytokine (z.B. VEGF) und anderer Botenstoffe (z.B. MMP/TIMP) mittels Immunoassay.

### **3.9.5 Gefäßdichtebestimmung**

Zur Dichtebestimmung der neugebildeten Gefäße am Tag 14 wurde das mit dem Videodokumentationssystem aufgenommene Bildmaterial ausgewertet, Einzelbilder digital erzeugt und die maximale Gefäßlänge sowie die Gefäßdichte mit Hilfe einer speziell für diesen Zweck entwickelten Bilddokumentationssoftware vermessen (Dr.Günther Ackermann, Chirurgie).

Die Gefäßdichte wurde in Gefäßlänge (cm) durch Fläche (cm<sup>2</sup>), gekürzt also cm<sup>-1</sup> angegeben.

### **3.9.6 Gefäßfunktionabilitätsbestimmung**

Die Funktionabilität der in die Matrizes eingewachsenen, neugebildeten Gefäße wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Mäuseerythrozyten nachgewiesen.

### *3.9.6.1 Fluoreszenzfärbung von Mäuseblut - Erythrozyten*

Venöses Blut wurde aus der Vena cava inferior von zwei Balb/c nu/nu Mäusen invasiv unter Narkose entnommen. Die *Vena cava* inferior wurde nach Öffnung des Abdomens mit einer heparinisierten 27 G-Kanüle punktiert. Die Tiere wurden nachfolgend durch zervikale Dislokation getötet. Das erhaltene Blut wurde in PBS Puffer aufgenommen, die Erythrozyten durch Zentrifugation (1500 U/min) isoliert und im Anschluss zweimal mit PBS Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1500 U/min). Unter Verwendung des PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) wurden die Zellmembranen der Erythrozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH67 (die langen aliphatischen Schwänze des Farbstoffs binden hierbei an den Lipidregionen der Zellmembranen) markiert. 100 Millionen gelabelte Erythrozyten wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS Puffer (Zentrifugation bei 1500 U/min) über die Schwanzvene in das jeweils zu untersuchende Tier injiziert.

### *3.9.6.2 Detektion und Dokumentation*

Der Nachweis der Funktionabilität der in die Matrices gewachsenen, neugebildeten Gefäße konnte über die Detektion des mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten angereicherten Blutes erbracht werden. Hierfür wurden die Nacktmäuse wie in Punkt 3.9.4 beschrieben intravitalmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop Zeiss HBO100) untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe (EBQ100, Leistungselektronik Jena GmbH) angeregt. Der Blutfluss innerhalb der Gefäße wurde mit einer Videokamera (Sony 3CCD Color Video Camera) und eines SVHS Videorekorders (Panasonic) dokumentiert.

## **3.10 Statistik**

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den belasteten Proben und der unbelasteten Kontrolle über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen wurde für alle Experimente mit Hilfe der linearen Messwertwiederholung bestimmt. Zum Nachweis der Signifikanz der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen an den Einzelentnahmezeitpunkten Tag 0/7/14/21 wurde der Student's -T Test verwendet. Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11,5 der Firma SPSS Inc. durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Stammzellnachweis durch Flowzytometrie

Um einen Anhaltspunkt über die Qualität der erfolgten MSC Selektion zu gewinnen, wurde eine FACS Analyse zur Bestimmung der, nach aktuellem Wissensstand (siehe (Webadresse4)), wichtigsten mesenchymalen Stammzell - spezifischen Oberflächenmarker (positiv für CD 29, CD 44, CD 105 und CD 166; negativ für CD 14, CD 34 und CD 45) durchgeführt (siehe 3.1.6).

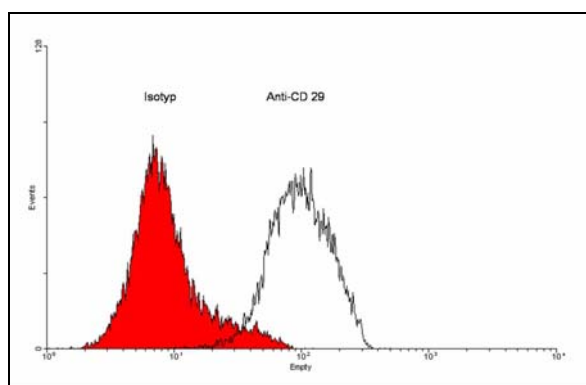


Abb.4-1 CD 29

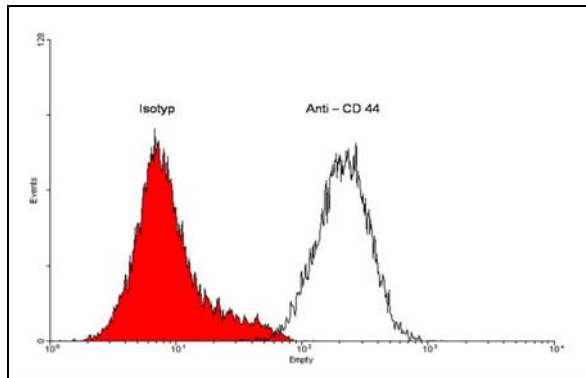


Abb.4-2 CD 44

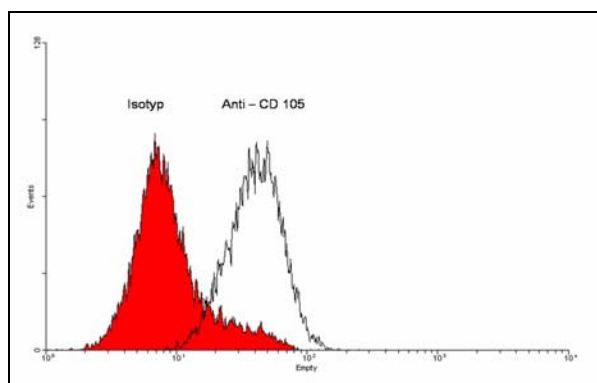


Abb.4-3 CD 105

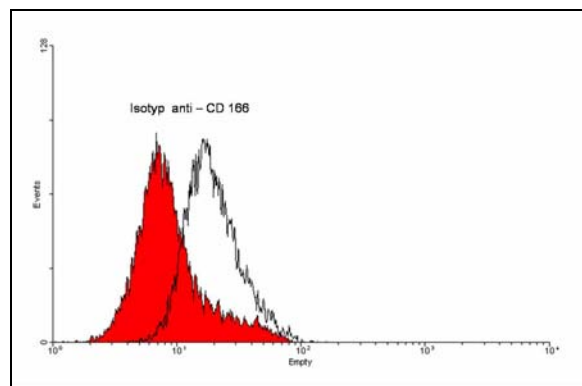


Abb.4-4 CD 166

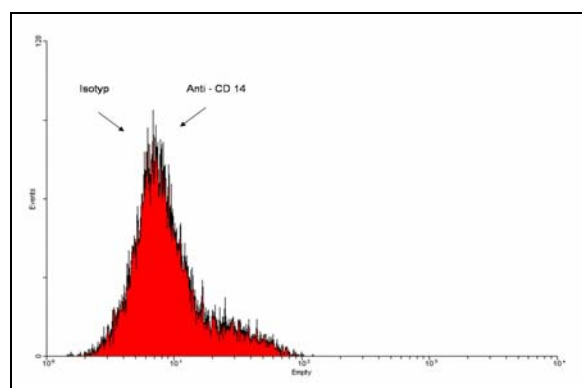


Abb.4-5 CD 14

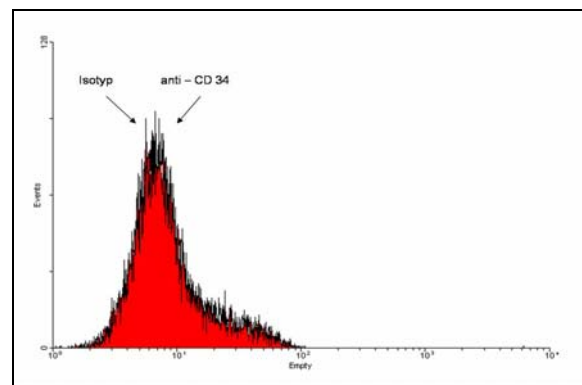


Abb.4-6 CD 34

Die Flowzytometrie zeigte eine positive Färbung für die stammzellspezifischen Oberflächenmarker CD 29, CD 44, CD 105 und CD 166 (Abb.4-1 bis 4-4) und eine negative Färbung für CD 14 (Abb.4-5) sowie CD 34 (Abb.4-6).

## 4.2 Mechanische Kompression

### 4.2.1 Nasschemische Analyseverfahren

#### 4.2.1.1 Zellproliferation

Das Proliferationsverhalten der mesenchymalen Stammzellen sowohl in den direkt kompressiv belasteten Gruppen als auch in den unbelasteten Kontrollgruppen wurde über den gesamten Experimentalzeitraum von 21 Tagen untersucht. Hierfür wurden an vier verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0/7/14/21) Proben entnommen und der DNA Gehalt der Zell-Matrixkonstrukte mit Hilfe einer modifizierten DNA Gehaltsbestimmungsmethode (Hoemann et al. 2002) (Hoechst Dye Methode, siehe Methoden 3.5.1) in Anlehnung an Kim et al. 1988 (Kim et al. 1988) bestimmt (Abb. 4-7).

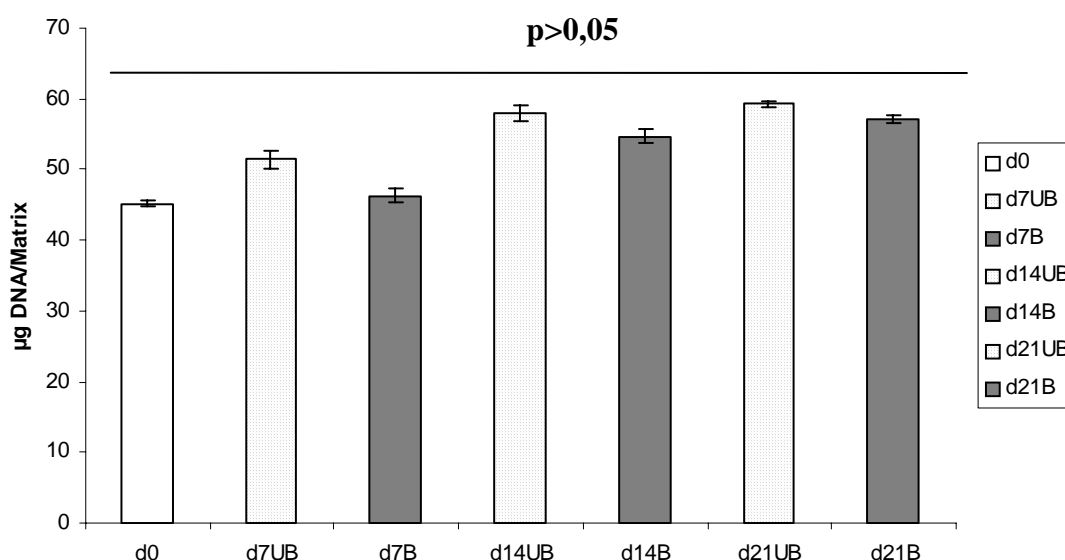
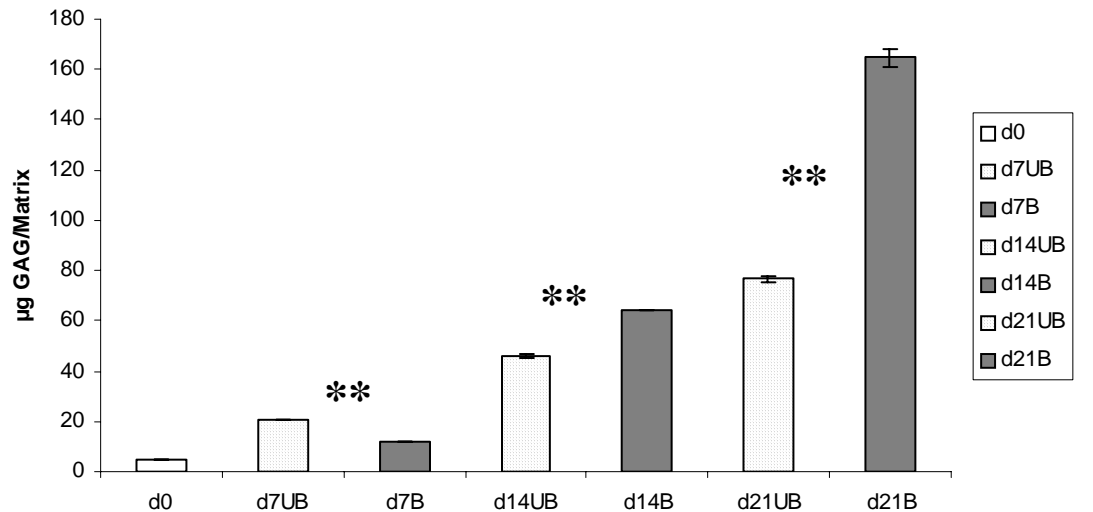


Abb. 4-7 DNA Gehalt Belastet (B) versus Unbelastet (UB)

Es ließ sich sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen als auch im Gruppenvergleich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikante Änderung der Zellzahl nachweisen ( $p > 0,05$ ). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.1.2 Glykosaminoglykangehalt

Die Quantifizierung der Hauptgrundsubstanzbestandteile von Knorpelgewebe, Glykosaminoglykan und Proteoglykan, erfolgte kolorimetrisch unter Anwendung des unseren Bedürfnissen angepassten DMMB Assays nach Hoemann et al. (Farndale et al. 1986; Chandrasekhar et al. 1987; Hoemann et al. 2002) (Abb. 4-8).



\*\*p<0,001

Abb. 4-8 Glykosaminoglykangehalt

Der am Tag 0 gemessene GAG Gehalt detektiert den Hauptbestandteil der verwendeten Trägermatrix, die Hyaluronsäure – ein Glykosaminoglykan. Dieser Ausgangswert wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Direkt nach der siebentägigen Belastungsphase ließen sich signifikante Unterschiede der belasteten Proben (B) gegenüber den unbelasteten Kontrollen (UB) nachweisen ( $p < 0,001$ ). Nach einer anschließenden siebentägigen, unbelasteten Kultivierung der Proben bei  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  im Brutschrank wiesen die belasteten Proben (B) am Tag 14 einen gegenüber der Kontrolle (UB) um 39,4% signifikant erhöhten GAG Gehalt auf ( $p < 0,001$ ). Dieser Trend verstärkte sich im Verlauf einer weiteren unbelasteten Kultivierung bis zum Tag 21 und führte zu einer deutlich signifikanten 114,7%igen Steigerung des GAG Gehalts der belasteten Proben (B) gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB) ( $p < 0,001$ ). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.1.3 Kollagengehalt

Zur quantitativen Bestimmung der wichtigsten Gerüstsubstanz des nativen Knorpelgewebes, des Kollagens, wurde in Anlehnung an saure Hydroxyprolin Assay Verfahren (Stegemann and Stalder 1967; Huszar et al. 1980; Reddy and Enwemeka 1996) die von uns modifizierte, alkalische Hydroxyprolin Assay Methode nach Reddy et al. (Reddy and Enwemeka 1996) verwendet (Abb. 4-9).

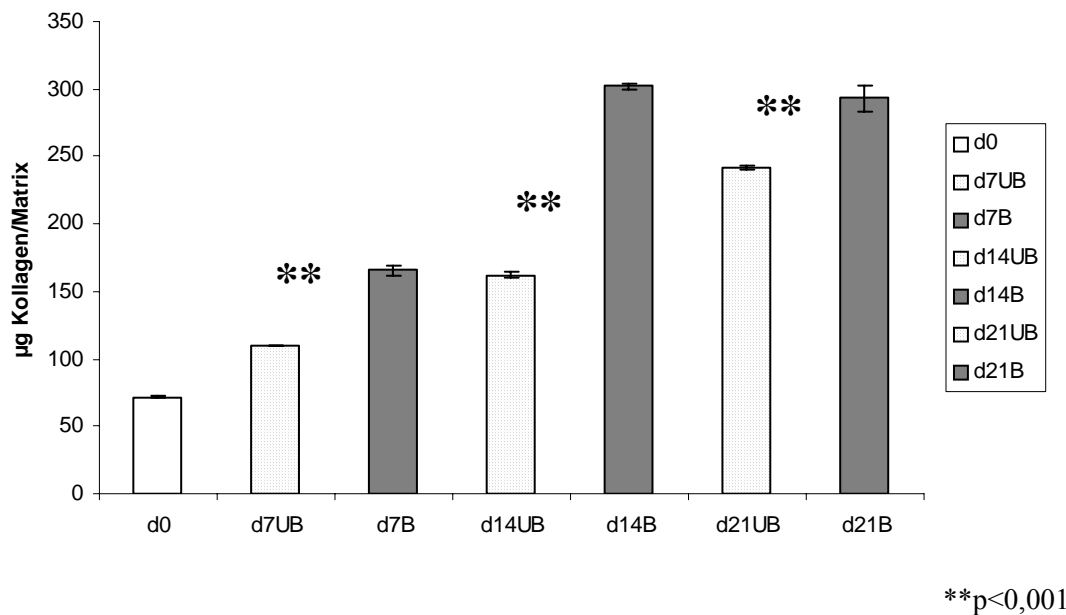


Abb. 4-9 Kollagengehalt

Der am Tag 0 gemessene Kollagengehalt lässt sich auf den zweiten Hauptbestandteil der Trägermatrix, die Gelatine (Kollagen Typ I) zurückführen und wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

An allen drei Untersuchungszeitpunkten (Tag 7/14/21) ließ sich ein signifikant höherer Kollagengehalt ( $p < 0,001$ ) in den belasteten (B) gegenüber den unbelasteten Proben (UB) aufzeigen. Am Tag 7 war der Kollagengehalt in der belasteten Gruppe um 50% gegenüber der unbelasteten Gruppe erhöht. Hervorzuheben ist Tag 14 mit einer 86 % Steigerung in der belasteten gegenüber der unbelasteten Gruppe. Am Tag 21 konnte in der belasteten Gruppe 21% mehr Kollagen als in der Kontrolle nachgewiesen werden. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.2 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR)

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR mittels LIGHT Cycler wurden die Proben aller vier Entnahmezeitpunkte (Tag 0/7/14/21) auf Expression chondrogener Markergene (Aggrecan, Typ I/II/X Kollagen) untersucht. Alle erhaltenen Expressionswerte wurden auf das Housekeeping Gene GAPDH standardisiert.

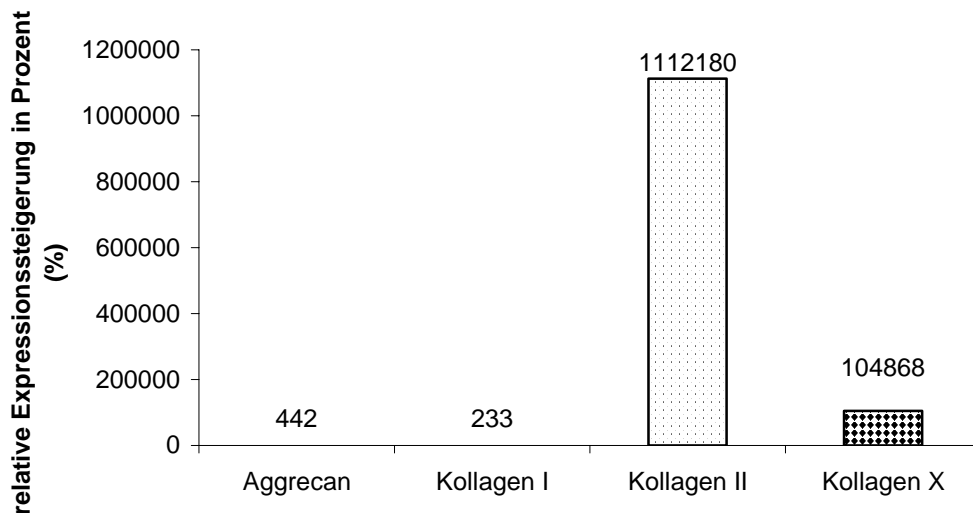


Abb. 4-10 Relative Expressionssteigerung der unbelasteten Kontrolle Tag 21 gegen Tag 1

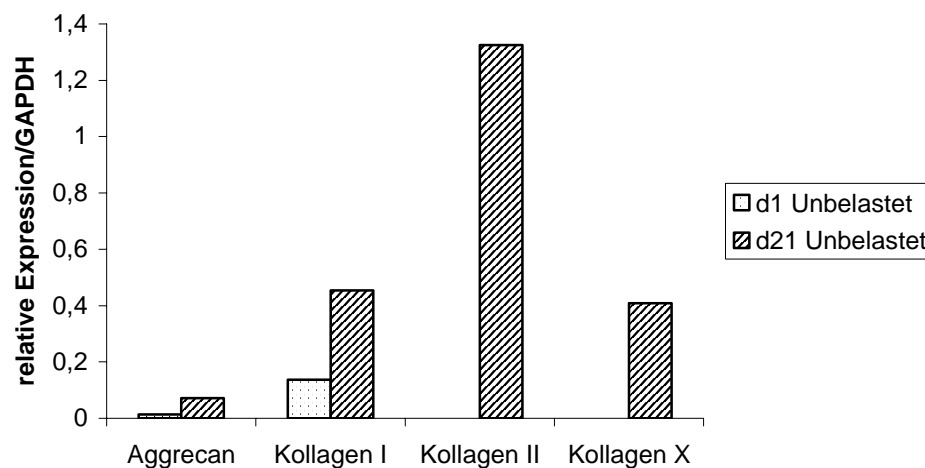


Abb. 4-11 Relative Expression gegen Housekeeping Gene GAPDH

In der unbelasteten Kontrollgruppe zeigte sich nach 21 Tagen Kultur in chondrogenem Differenzierungsmedium eine drastische Steigerung der Expression des knorpelspezifischen Typ II Kollagen Markers (111.218 fach) gegenüber Versuchsbeginn am Tag 1. Die Aggrecan Expression der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 steigerte sich um 442% gegenüber Tag 1, die Kollagen Typ I Expression nahm um

233% zu und die Kollagen Typ X Expression stieg auf das 1.0487 fache ihres Tag 1 Wertes an (Abb. 4-10 und Abb. 4-11).

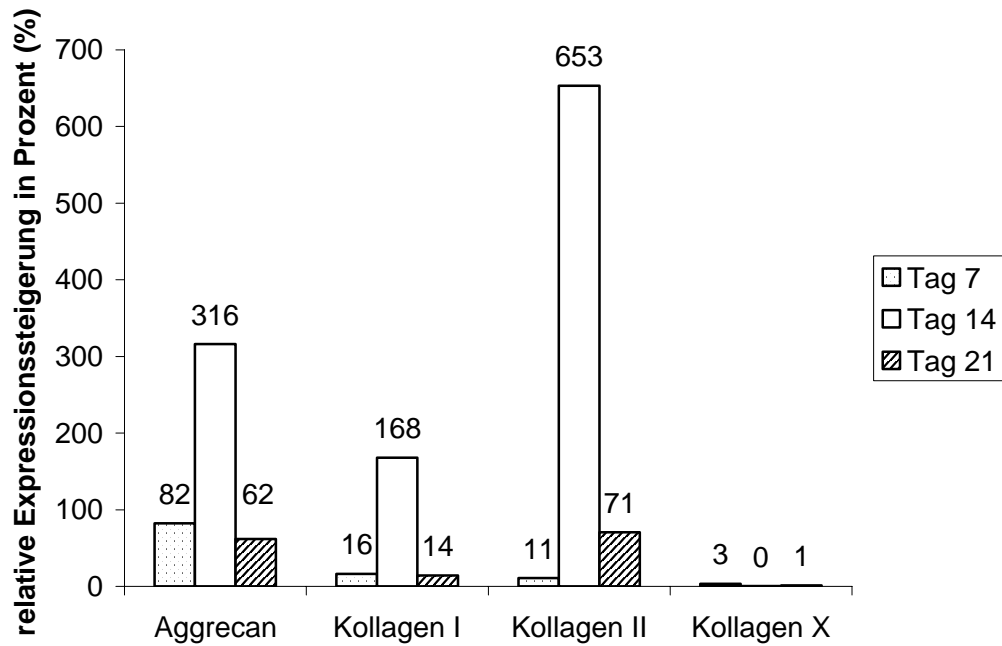


Abb. 4-12 Relative Expressionssteigerung Belastet gegen Unbelastet

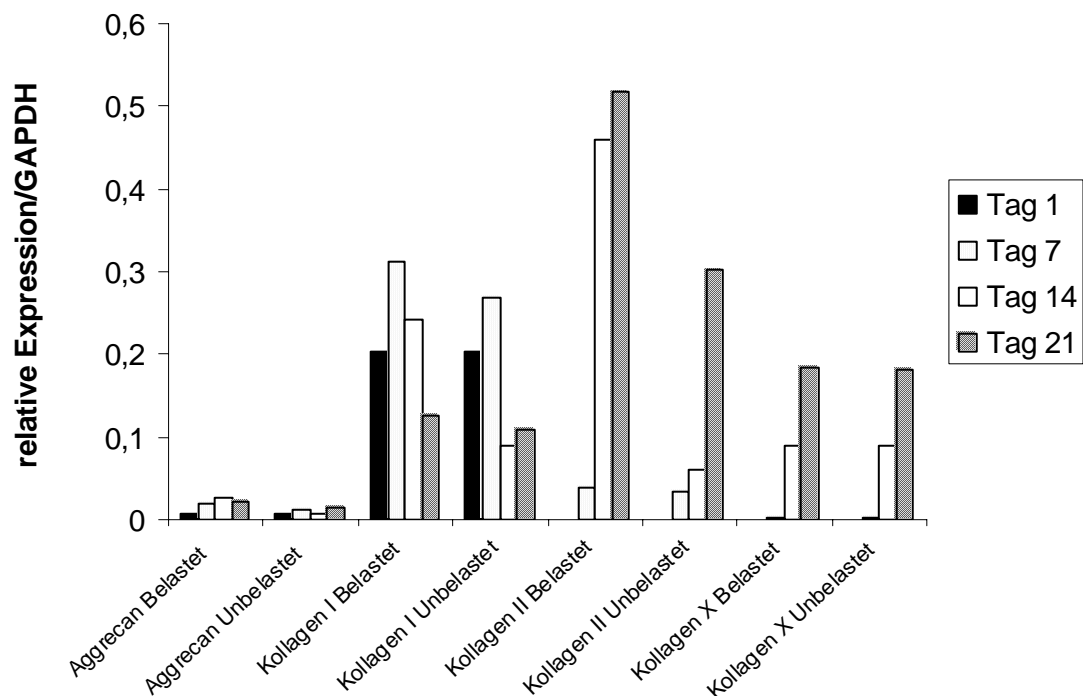


Abb. 4-13 Relative Expression gegen GAPDH

Die Aggrecan Expression der sieben Tage belasteten Proben zeigte am Tag 7 eine 82% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Eine mit 316% sogar noch

deutlich höhere Steigerung der Aggrecan Expression konnte am Tag 14 gefunden werden ( $p < 0,001$ ). Am Tag 21 wurde für die belasteten Proben eine Steigerung von 62% gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen ( $p < 0,001$ ).

Die Kollagen Typ II Markerexpression der belasteten Probe erzielte mit einer deutlich signifikanten 653% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle ihr Maximum am Tag 14 ( $p < 0,001$ ). Am Tag 7 und am Tag 21 der Kultur konnte mit 11% bzw. 71% ebenfalls eine Steigerung der Kollagen Typ II Markerexpression in den belasteten Proben nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ).

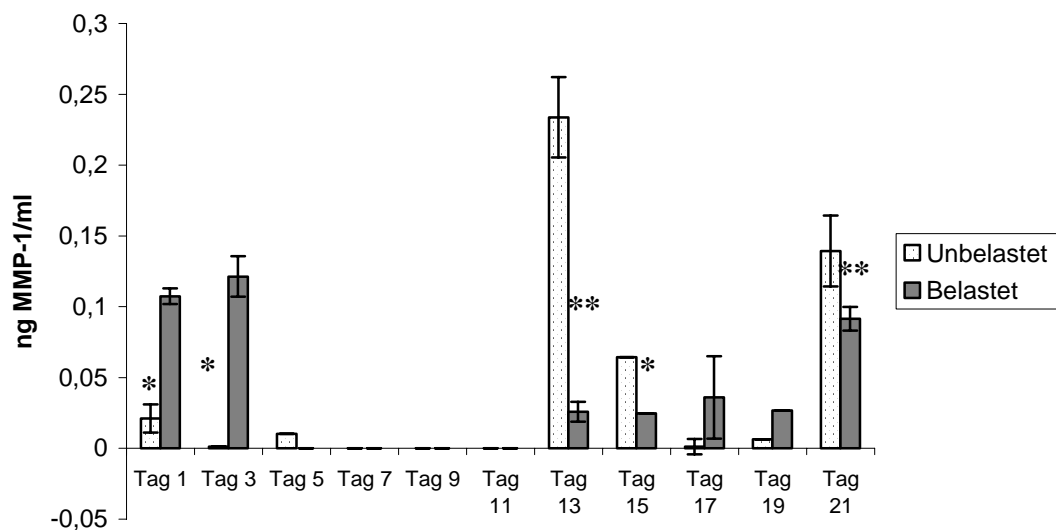
Die Kollagen Typ I Markerexpression der belasteten Proben zeigte eine signifikante Steigerung am Tag 14 (168%,  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbelasteten Kontrolle, erreichte aber nicht die Expressionslevel der hyalinen Knorpel spezifischen Marker Aggrecan und Kollagen Typ II.

Für Kollagen Typ X konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Proben über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen festgestellt werden ( $p > 0,45$ ).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.2.3 Zytokinexpression in Zellkulturmedienüberstand (ELISA)

Zur Bestimmung der Freisetzung der Matrixmetalloproteinasen (MMP)-1, 9 und 13, der Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP)-1 und 2 und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aus mesenchymalen Stammzellen unter Belastung und unter unbelasteten Bedingungen wurde der Zellkulturüberstand beider Gruppen täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen gesammelt. Die Konzentration der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren wurde mit Hilfe von spezifischen ELISAs quantifiziert.



\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$

Abb. 4-14 MMP-1 Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Die MMP-1 Freisetzung wurde initial am Tag 1 und Tag 3 der Kultur durch Belastung signifikant gegenüber der unbelasteten Gruppe gesteigert ( $p < 0,05$ ). Von Tag 5 bis Tag 11 konnte in beiden Gruppen keine MMP-1 Freisetzung detektiert werden. Beginnend mit Tag 13 zeigte sich eine statistisch signifikante deutliche Erhöhung der MMP-1 Freisetzung der unbelasteten Proben gegenüber der belasteten Gruppe ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-14).

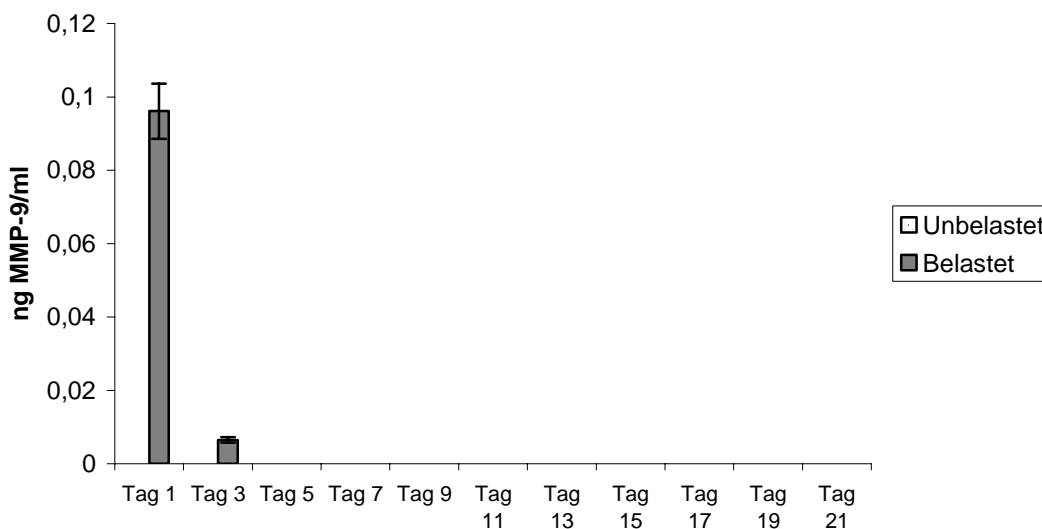
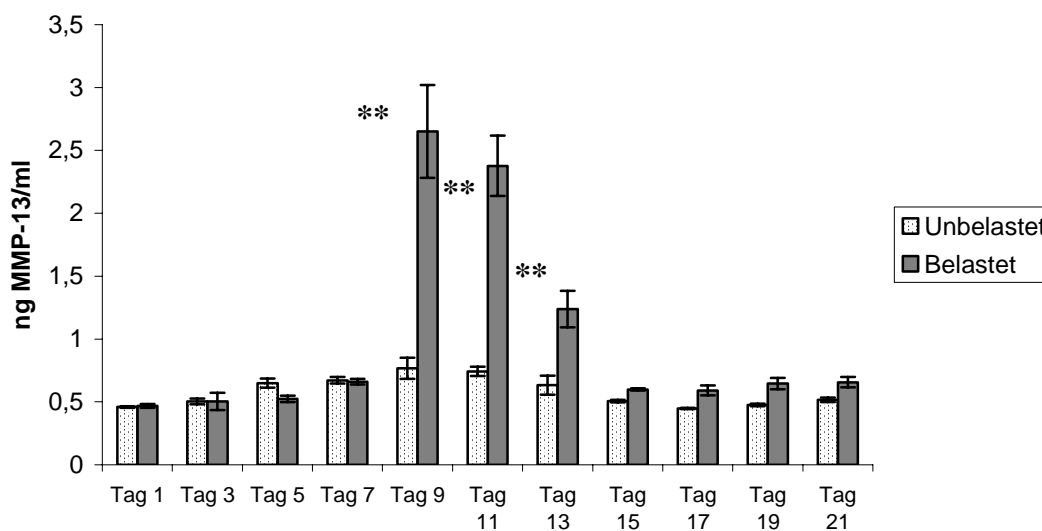


Abb. 4-15 MMP-9 Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Die Matrixmetalloproteinase MMP-9 wurde nur am Tag 1 bis Tag 3 und nur von den belasteten Proben in den Zellkulturmedienüberstand sezerniert. Die freigesetzte Menge an MMP-9 nahm hierbei um 93,3% von Tag 1 auf Tag 3 ab. Die unbelasteten Proben setzten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine detektierbaren Mengen an MMP-9 frei (Abb. 4-15).



\*\* p&lt;0,001

Abb. 4-16 MMP-13 Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Während der ersten und der letzten sieben Tage waren keine signifikanten Unterschiede in der Matrixmetalloproteinase-13 Freisetzung zwischen den belasteten und den

unbelasteten Proben erkennbar. Dagegen ließ sich in der Mitte des 21tägigen Untersuchungszeitraums, an den Tagen 9, 11 und 13, eine statistisch signifikante Steigerung der MMP-13 Sezernierung in der belasteten Gruppe gegenüber der unbelasteten nachweisen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-16).

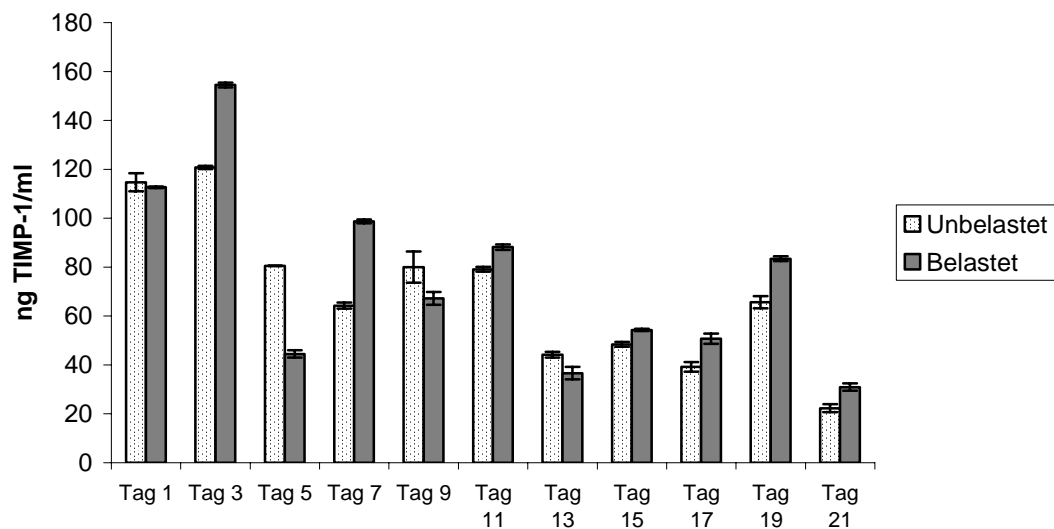


Abb. 4-17 TIMP-1 Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen ließen sich keine deutlich signifikanten Unterschiede zwischen den belasteten und den unbelasteten Proben erkennen. Der Trend zeigte jedoch eine Erhöhung der TIMP-1 Freisetzung in der belasteten Gruppe an den Tagen 3, 7, 11, 15 und 19. Die gesamte TIMP-1 Freisetzung zeigte in beiden Gruppen ein abnehmendes Konzentrationsgefälle beginnend von Tag 1 bis Tag 21 (Abb. 4-17).

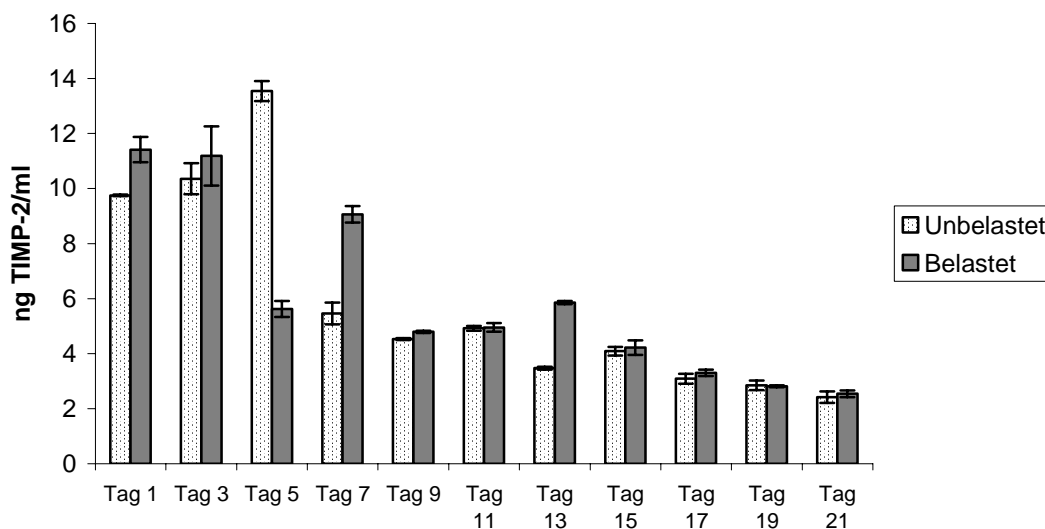


Abb. 4-18 TIMP-2 Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen zeigten sich keine deutlich signifikanten Unterschiede zwischen den belasteten und den unbelasteten Proben. Es wurde jedoch eine Steigerung der TIMP-2 Freisetzung in der belasteten gegenüber der unbelasteten Gruppe an den Tagen 1, 7 und 13 erkennbar. Die gesamte TIMP-2 Freisetzung zeigte in beiden Gruppen ein abnehmendes Konzentrationsgefälle beginnend von Tag 1 bis Tag 21 (Abb. 4-18).

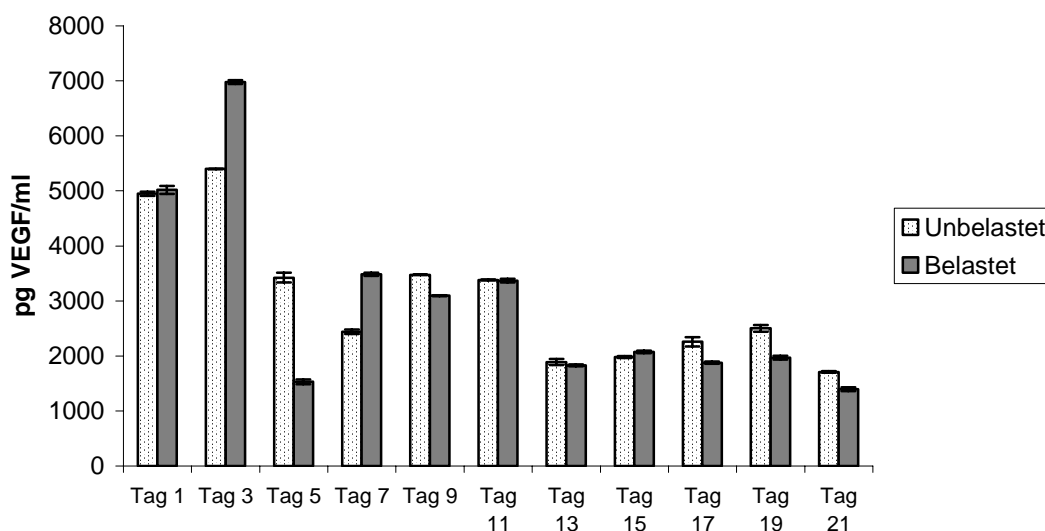


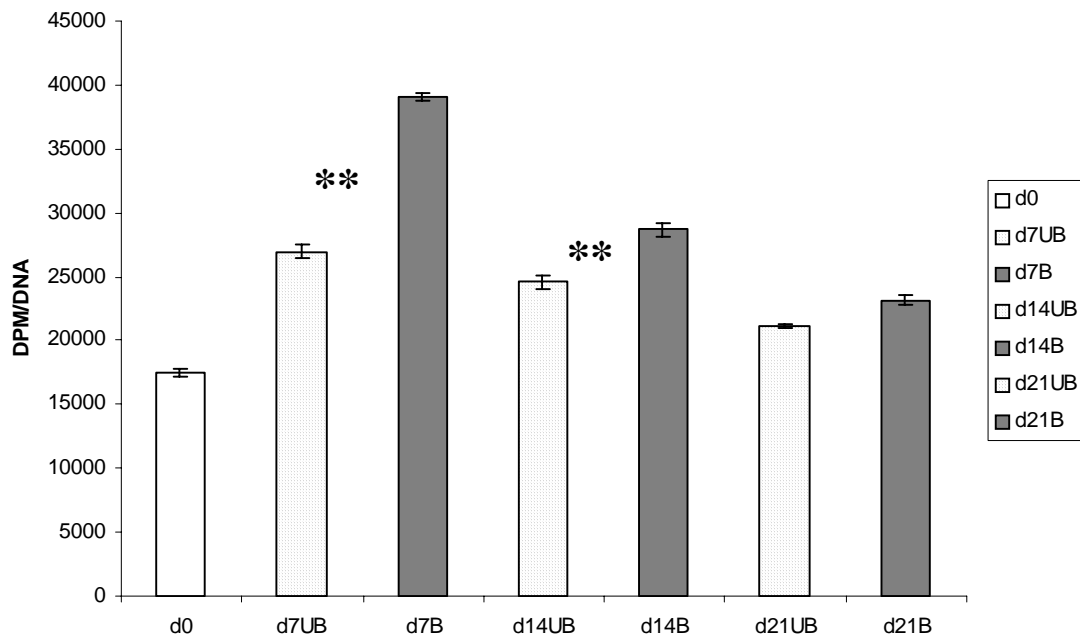
Abb. 4-19 VEGF Freisetzung in den Zellkulturüberstand

Die freigesetzte VEGF Menge nahm sowohl in der belasteten als auch in der unbelasteten Gruppe im Zeitverlauf der 21tägigen Untersuchung in zwei Schritten deutlich ab. Der erste Konzentrationsabfall zeigte sich von Tag 3 auf Tag 5 (UB: -37%/B: -78%). Von Tag 11 auf Tag 13 reduzierte sich die freigesetzte VEGF Menge um 44% in der unbelasteten und um 46% in der belasteten Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen konnten über den Untersuchungszeitraum von 21 Tage nicht nachgewiesen werden (Abb. 4-19).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.4 Kollagenbiosynthese

Zur Bestimmung der Kollagenbiosyntheseleistung der Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen, wurden diese an den jeweiligen Entnahmezeitpunkten (Tag 0, 7, 14, 21) für 24 Stunden mit tritiiertem Prolin markiert. Das eingebaute radioaktive Prolin wurde im Szintillationscounter gemessen und auf den jeweiligen DNA Gehalt standardisiert.



\*\* p<0,001

Abb. 4-20 Kollagenbiosynthese an den Tagen 0/7/14/21

Die belasteten Proben (B) zeigten am Tag 7 eine statistisch signifikante Steigerung der Kollagenbiosynthese um 45% gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB; p<0,001). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in abgeminderter Form (+17%) am Tag 14 nachgewiesen werden (p<0,001). Am Tag 21 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Belastungsgruppe und der Kontrolle mehr festgestellt werden (p=0,100) (Abb. 4-20).

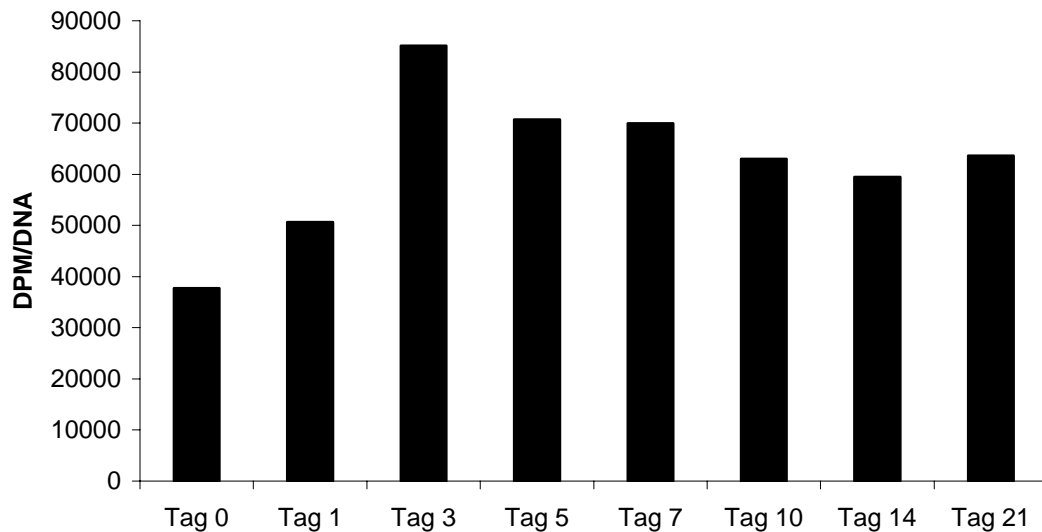


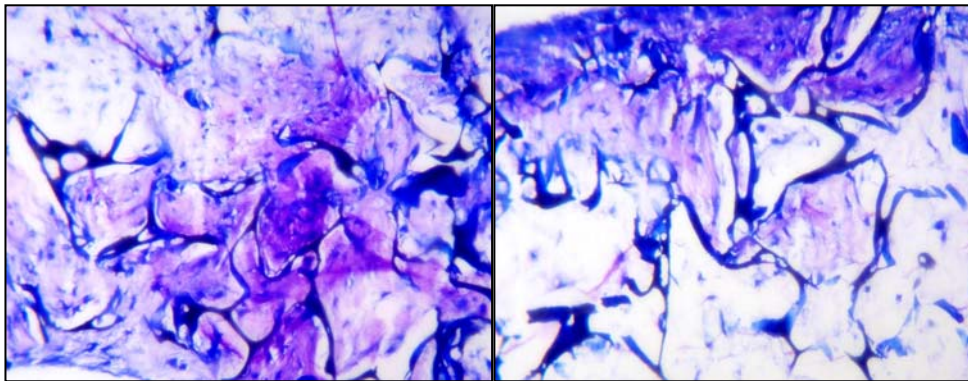
Abb. 4-21 Kollagenbiosynthese an den Tagen 0/1/3/5/7/10/14/21

Eine weitere, detaillierte Untersuchung der Kollagenbiosyntheseleistung innerhalb der belasteten Gruppe ergab eine maximale Kollagenbiosyntheseleistung am Tag 3 des 21tägigen Untersuchungszeitraums mit einem nachfolgenden zweistufigen Abfall der Kollagenbiosyntheseleistung (erstmalig -17% von Tag 3 auf Tag 5 und weiteren -10% von Tag 7 auf Tag 10 (gesamt: 27%)) (Abb. 4-21).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.5 Histologie

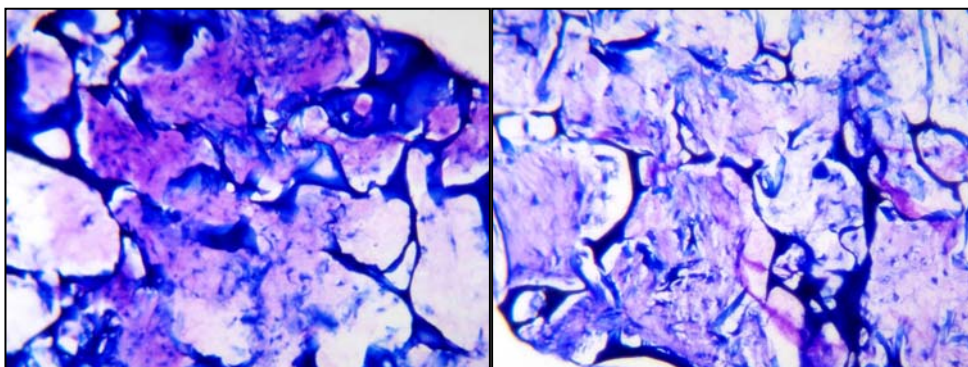
Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung konnte in beiden Versuchsgruppen (belastet/unbelastet) bereits am Tag 14 eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden (extrazelluläre, metachromatische Matrixablagerung; in den Abbildungen 4-22 und 4-23 als violette Färbung erkennbar), die sich bis Tag 21 noch intensiviert hat.



Belastet Tag 14

Unbelastet Tag 14

Abb. 4-22 Toluidinblaufärbung Tag 14



Belastet Tag 21

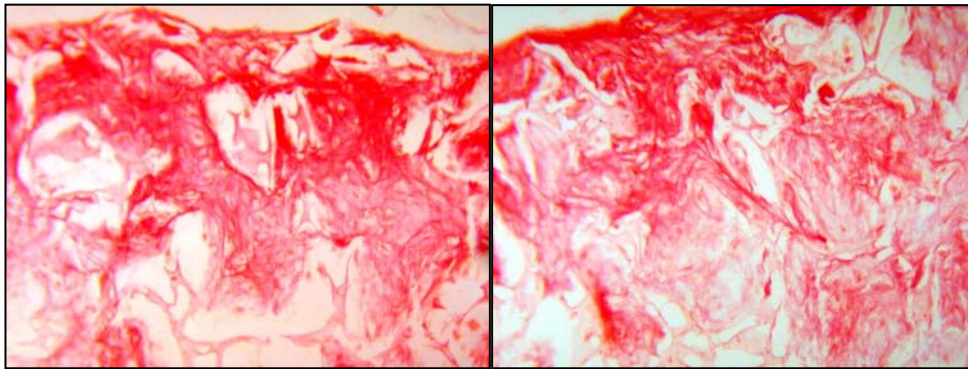
Unbelastet Tag 21

Abb. 4-23 Toluidinblaufärbung Tag 21

Sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 zeigte sich der positive Einfluss der mechanischen, kompressiven Belastung auf die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen. Es konnte an beiden Tagen in der belasteten Gruppe (vor allem im Zentrum des Tissue Engineering Scaffolds) eine gesteigerte metachromatische, extrazelluläre Matrixablagerung, mit einem größeren Abstand der Zellkerne zueinander, nachgewiesen werden (Abb. 4-22 und 4-23).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

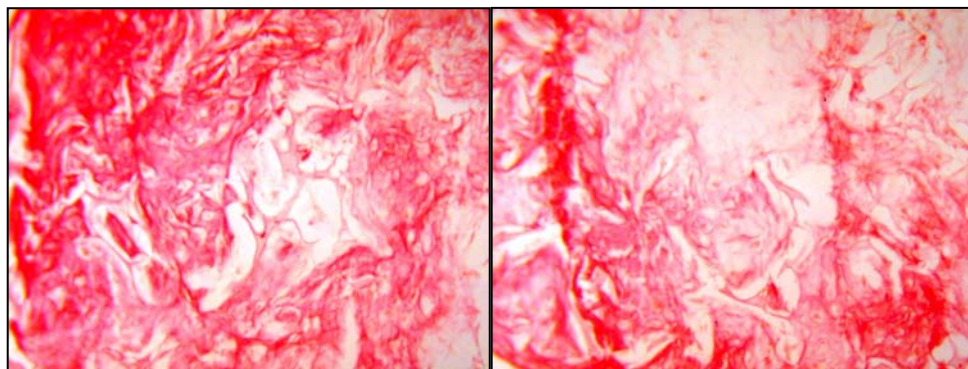
Die Bildung von Kollagen wurde histologisch mit Hilfe der Picosiriusrot Färbung untersucht.



Belastet Tag 14

Unbelastet Tag 14

Abb. 4-24 Picosiriusrot Färbung Tag 14



Belastet Tag 21

Unbelastet Tag 21

Abb. 4-25 Picosiriusrot Färbung Tag 21

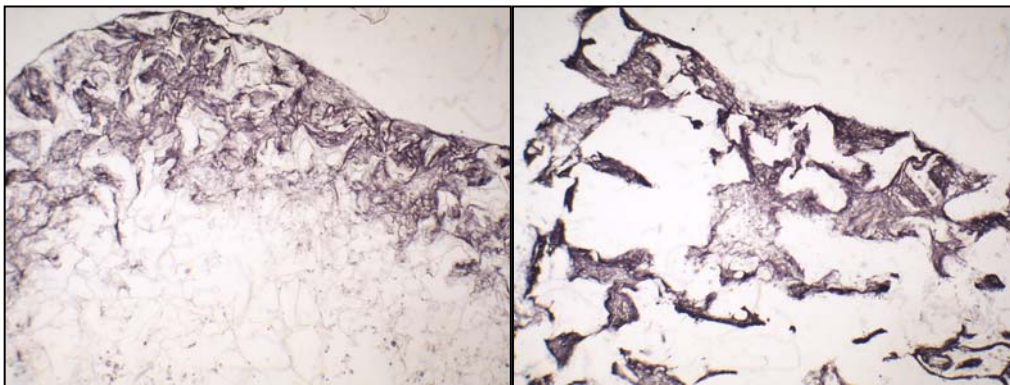
Hierbei zeigten sich am Tag 14 keine Unterschiede zwischen den belasteten und den unbelasteten Proben (Abb 4-24). Am Tag 21 konnte eine verstärkte Kollagenbildung in der belasteten Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 4-25).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.2.6 Immunohistochemie

Zur immunohistochemischen Differenzierung des neugebildeten Kollagens wurden die Proben nach der 21tägigen Kulturphase auf Typ I, II und X Kollagen gefärbt. Hierbei muss beachtet werden, dass alle genannten Antikörper eine Kreuzreaktivität zueinander besitzen.

##### Typ I Kollagen



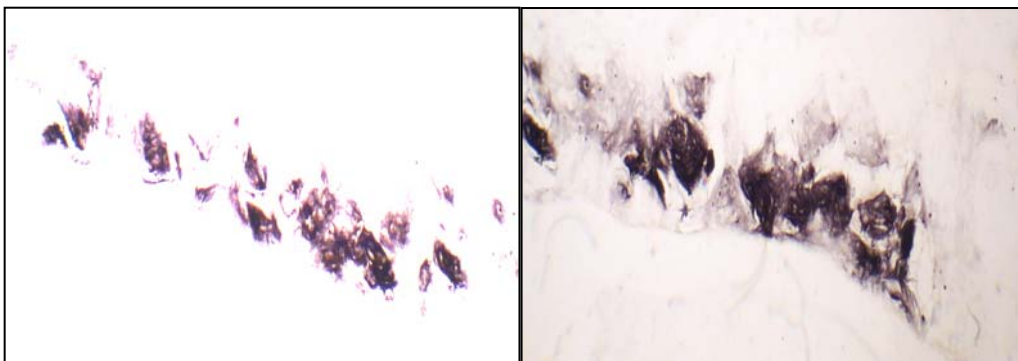
Belastet

Unbelastet

Abb. 4-26 Typ I Kollagenfärbung

Die unbelasteten Proben zeigten eine durchgängige Färbung auf Typ I Kollagen im gesamten Scaffold. Demgegenüber konzentrierte sich die Kollagen I Bildung in der belasteten Gruppe hauptsächlich auf den Randbereich der Tissue Engineering Matrices (Abb. 4-26).

##### Typ II Kollagen



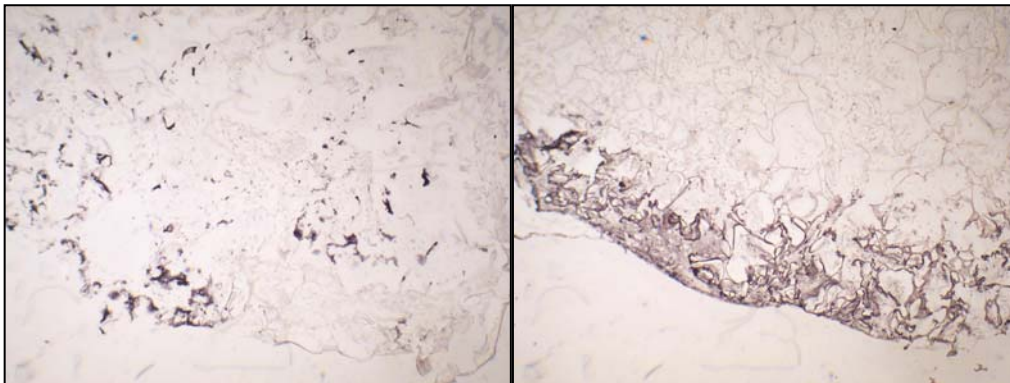
Belastet

Unbelastet

Abb. 4-27 Typ II Kollagenfärbung

Die immunhistochemische Färbung auf Typ II Kollagen zeigte keine Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen (belastet/unbelastet). In allen Proben zeigte sich eine Konzentration des Typ II Kollagens im Randbereich der Tissue Engineering Scaffolds (Abb. 4-27).

#### Typ X Kollagen



Belastet

Unbelastet

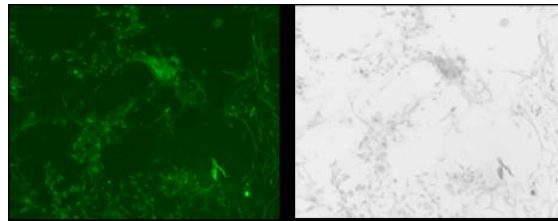
Abb. 4-28 Typ X Kollagenfärbung

Die Färbung auf Typ X Kollagen zeigte eine vermehrte Bildung im Randbereich der unbelasteten Matrizes. In den belasteten Proben zeigte sich eine nur sehr schwache, unspezifische Färbung im gesamten Scaffold (Abb. 4-28).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

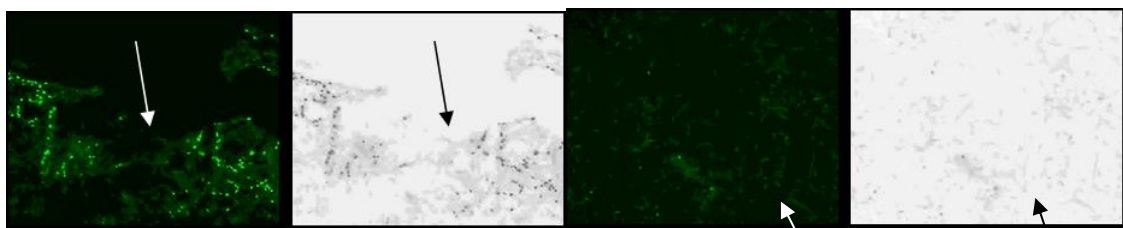
#### 4.2.7 Tunel-Assay

Um Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Apoptoseverhältnisse in unserem Tissue Engineering System durch mechanische Belastung treffen zu können, wurden Gefrierschnitte der Entnahmezeitpunkte 1, 14 und 21 Tage mit Hilfe des Tunel-Assay analysiert.



Kontrolle

Abb. 4-29 Tunelkontrollfärbung

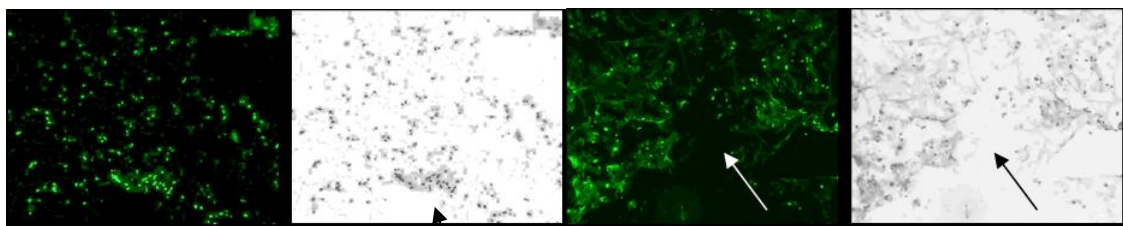


Belastet Tag 1

Unbelastet Tag 1

Abb. 4-30 Tunelfärbung Tag 1

Bereits am ersten Tag zeigte sich in der belasteten Gruppe im Randbereich eine leichte positive Apoptosereaktion. In der unbelasteten Gruppe war diese am ersten Tag nicht zu erkennen (Abb. 4-30).



Belastet Tag 14

Unbelastet Tag 14

Abb. 4-31 Tunelfärbung Tag 14

Am Tag 14 zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine gesteigerte Apoptose im gesamten Scaffold. Unterschiede zwischen den belasteten und den unbelasteten Proben ließen sich am Tag 14 keine feststellen (Abb. 4-31).

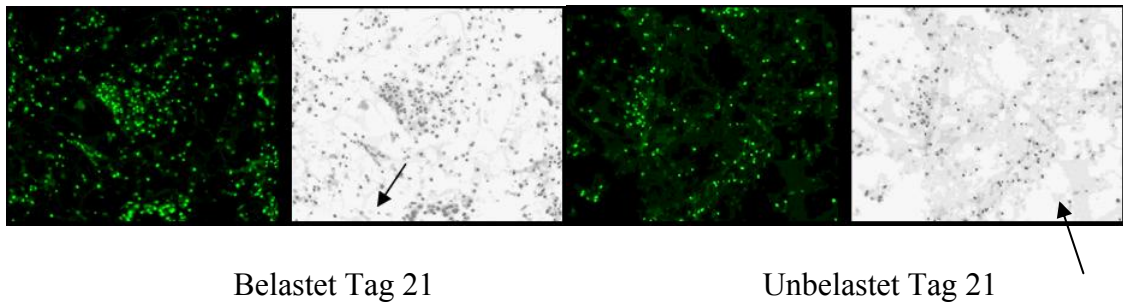


Abb. 4-32 Tunelfärbung Tag 21

Die belasteten Proben zeigten am Tag 21 gegenüber Tag 14 eine deutliche Steigerung der Apoptose im gesamten Scaffold. Die unbelastete Gruppe wies dagegen gegenüber Tag 14 keine detektierbare Erhöhung der Apoptose auf (Abb. 4-32).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.3 Hydrostatischer Druck

#### 4.3.1 Nasschemische Analysenverfahren

##### 4.3.1.1 Zellproliferation

Das Proliferationsverhalten der hydrostatisch belasteten Proben und der unbelasteten Kontrollen wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben bestimmt.

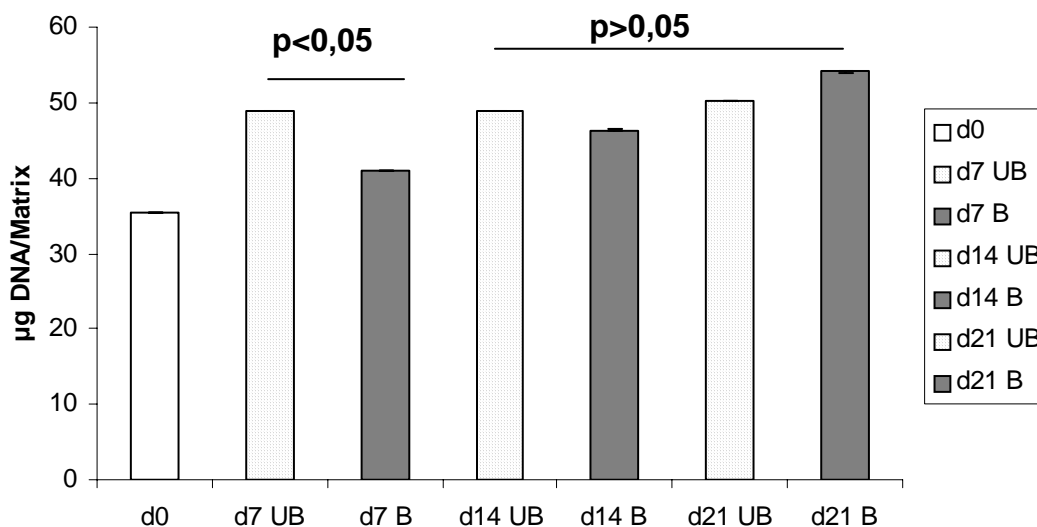
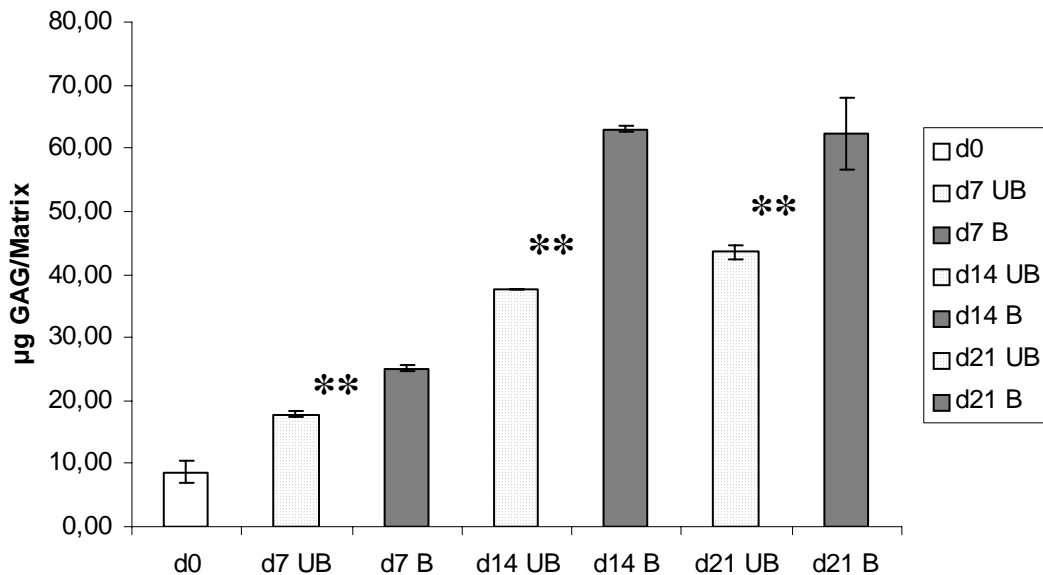


Abb. 4-33 DNA Gehalt

Vom Ausgangszustand am Tag 0 bis zum Tag 7 der Untersuchung stieg die Zellzahl in beiden Gruppen um circa 27 Prozent an. Hierbei konnte eine signifikant höhere Zellzahl in der unbelasteten Gruppe (UB) nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). An den weiteren Entnahmezeitpunkten konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der belasteten und der unbelasteten Gruppe gefunden werden ( $p > 0,05$ ) (Abb. 4-33). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.3.1.2 Glykosaminoglykangehalt

Die Quantifizierung der Hauptgrundsubstanzbestandteile von Knorpelgewebe, Glykosaminoglykan und Proteoglykan erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie unter 4.2.1.2 beschrieben.



\*\* p<0,001

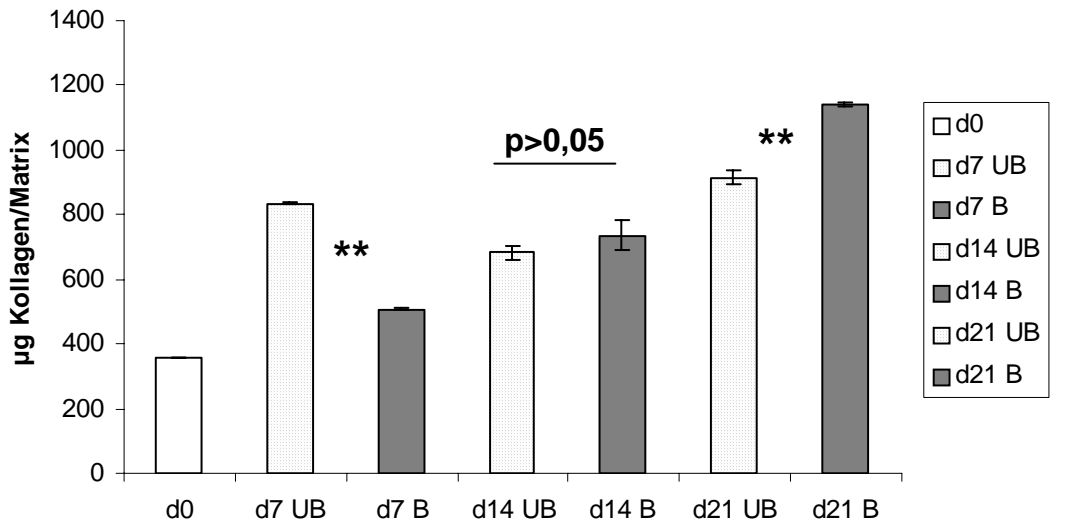
Abb. 4-34 Glykosaminoglykangehalt

Der am Tag 0 gemessene GAG Gehalt detektiert den Hauptbestandteil der verwendeten Trägermatrix, die Hyaluronsäure –ein Glykosaminoklykan. Dieser Ausgangswert wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Direkt nach der siebentägigen Belastungsphase ließen sich mit einer Steigerung der belasteten Proben um 40,3 % gegenüber den unbelasteten Kontrollen signifikante Unterschiede nachweisen ( $p<0,001$ ). Nach einer anschließenden siebentägigen, unbelasteten Kultivierung der Proben bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wiesen die belasteten Proben (B) am Tag 14 einen gegenüber der Kontrolle (UB) um 67,3 % erhöhten GAG Gehalt auf. Bis zum Tag 21 glich sich der GAG Gehalt der beiden Versuchsgruppen wieder etwas an, mit einem signifikanten 43,1 % höheren GAG Gehalt der belasteten Proben (B) gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB) ( $p<0,001$ ) (Abb. 4-34). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.3.1.3 Kollagengehalt

Die quantitative Bestimmung des Kollagenanteils wurde wie unter 4.2.1.3 beschrieben durchgeführt.



\*\* p<0,001

Abb. 4-35 Kollagengehalt

Der am Tag 0 gemessene Kollagengehalt lässt sich auf den zweiten Hauptbestandteil der Trägermatrix, die Gelatine (Kollagen Typ I) zurückführen und wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Direkt nach der siebentägigen Belastungsperiode zeigte sich mit +39% ein signifikant größerer Kollagengehalt in der unbelasteten Gruppe gegenüber der Belastungsgruppe ( $p<0,001$ ). Am Tag 14 konnten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p>0,05$ ). Eine deutliche Steigerung im Kollagengehalt gegenüber den unbelasteten Proben ließ sich dagegen mit +25% in der belasteten Gruppe am Tag 21 nachweisen ( $p<0,001$ ) (Abb. 4-35). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.3.2 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR)

Die Untersuchung der Proben aller vier Entnahmezeitpunkte (Tag 0/7/14/21) auf Expression chondrogener Markergene (Aggrecan, Typ I/II/X Kollagen) wurde unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR mittels LIGHT Cycler durchgeführt. Alle erhaltenen Expressionswerte wurden auf das Housekeeping Gene GAPDH standardisiert.

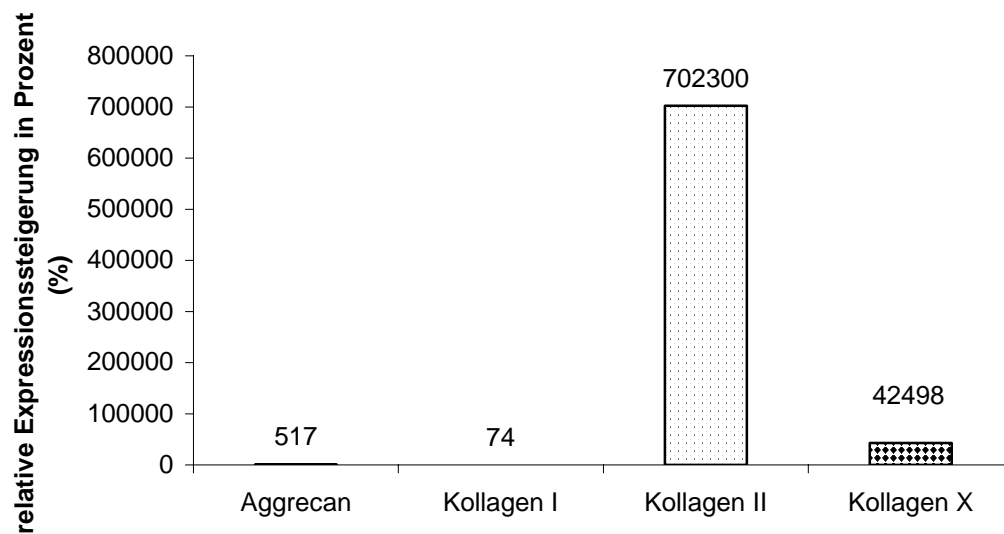


Abb. 4-36 Relative Expressionssteigerung der unbelasteten Gruppe Tag 21 versus Tag 1

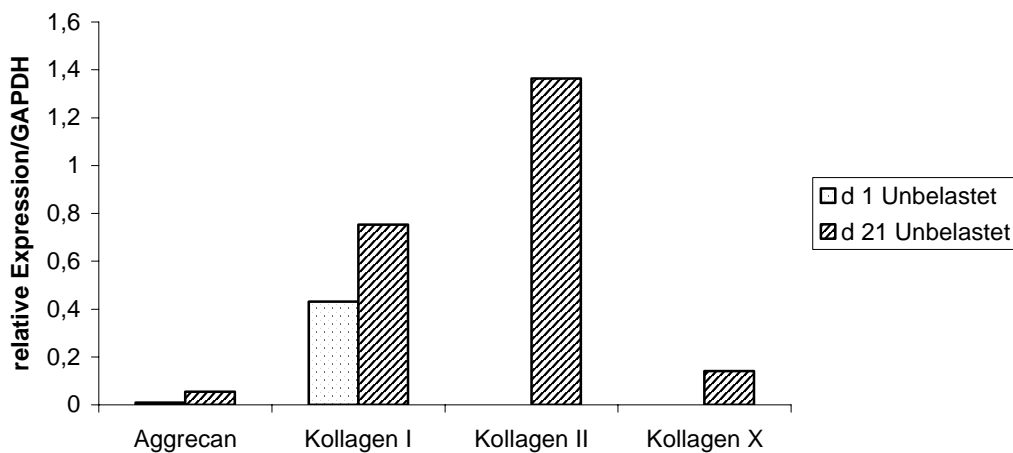


Abb. 4-37 Relative Expression der unbelasteten Kontrolle gegen GAPDH

In der unbelasteten Kontrollgruppe zeigte sich nach 21 Tagen Kultur in chondrogenen

Differenzierungsmedium eine drastische Steigerung der Expression des knorpelspezifischen Typ II Kollagen Markers (70.230fach) gegenüber Versuchsbeginn am Tag 1. Die Aggrecan Expression der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 steigerte sich um 517% gegenüber Tag 1, die Kollagen Typ I Expression nahm um 74% zu und die Kollagen Typ X Expression stieg auf das 4.250fache ihres Wertes am Tag 1 an (Abb. 4-36 und 4-37).

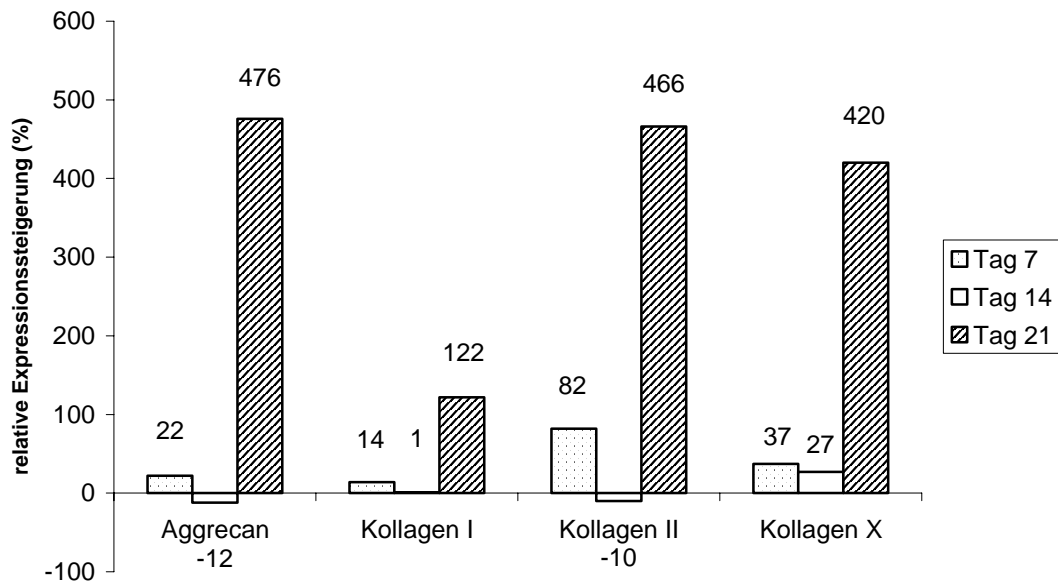


Abb. 4-38 Relative Expressionssteigerung der belasteten gegenüber der unbelasteten Gruppe in Prozent

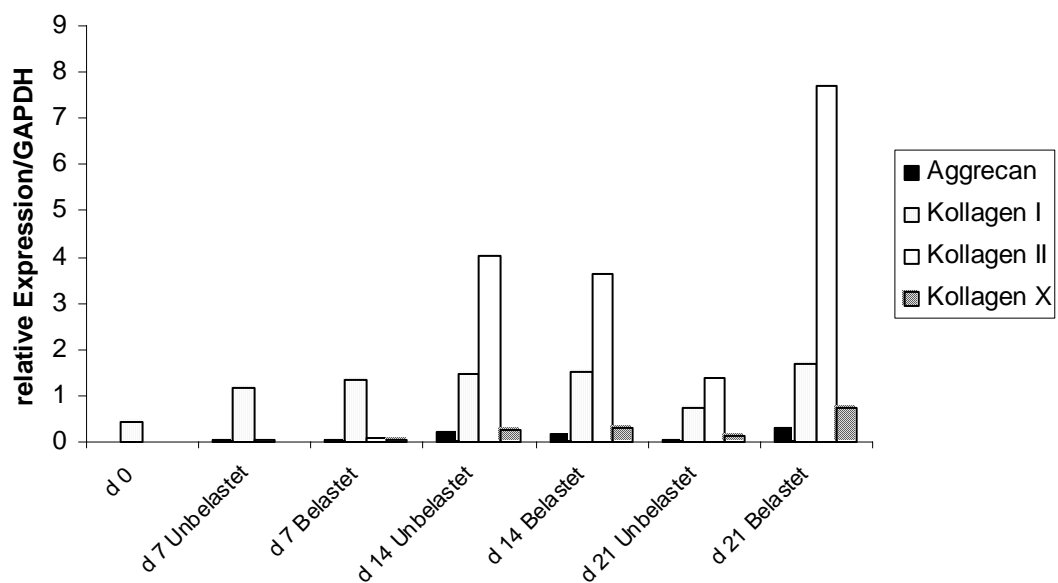


Abb. 4-39 Relative Expression gegen GAPDH

Die Aggrecan Expression der sieben Tage belasteten Proben zeigte am Tag 7 eine 22% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten am Tag 14 gefunden werden ( $p > 0,45$ ). Am Tag 21 wurde für die belasteten Proben eine Steigerung von 476% gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-38 und 4-39).

Die Kollagen Typ II Markerexpression der belasteten Probe erzielte eine 82% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle am Tag 7 ( $p < 0,001$ ). Am Tag 14 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden ( $p > 0,45$ ). Ihr Maximum an Kollagen Typ II Markerexpression erzielten die belasteten Probe mit einer deutlich signifikanten 466% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-38 und 4-39).

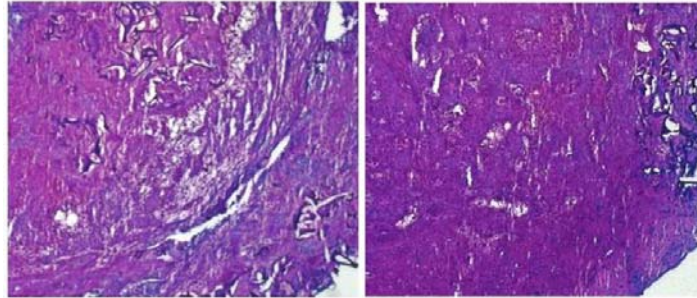
Die Kollagen Typ I Markerexpression der belasteten Proben zeigte eine signifikante Steigerung am Tag 21 (122%,  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbelasteten Gruppe, erreichte aber nicht die Expressionslevel der für hyalinen Knorpel spezifischen Marker Aggrecan und Kollagen Typ II (Abb. 4-38 und 4-39).

Für Kollagen Typ X konnten mit 37% am Tag 7 und 27% am Tag 14 signifikante Steigerungen der Markerexpression der belasteten Proben gegenüber den unbelasteten Kontrollen nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Das Maximum der Kollagen Typ X Expressionssteigerung der Belastungsgruppe versus Kontrolle wurde mit 420% am Tag 21 ermittelt (Abb. 4-38 und 4-39).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.3.3 Histologie

Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung konnte in beiden Versuchsgruppen (belastet/unbelastet) am Tag 21 eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden (extrazelluläre, metachromatische Matrixablagerung; in der Abbildung 4-40 als violette Färbung erkennbar), die sich durch Belastung noch intensivieren ließ.



Unbelastet

Belastet

Abb. 4-40 Toluidinblaufärbung

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4 Ultraschall

### 4.4.1 Zellmatrixkonstrukt 4 Minuten beschallt

#### 4.4.1.1 Zellproliferation

Das Proliferationsverhalten der für vier Minuten mit niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall belasteten Proben und der unbelasteten Kontrollen wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben, bestimmt.

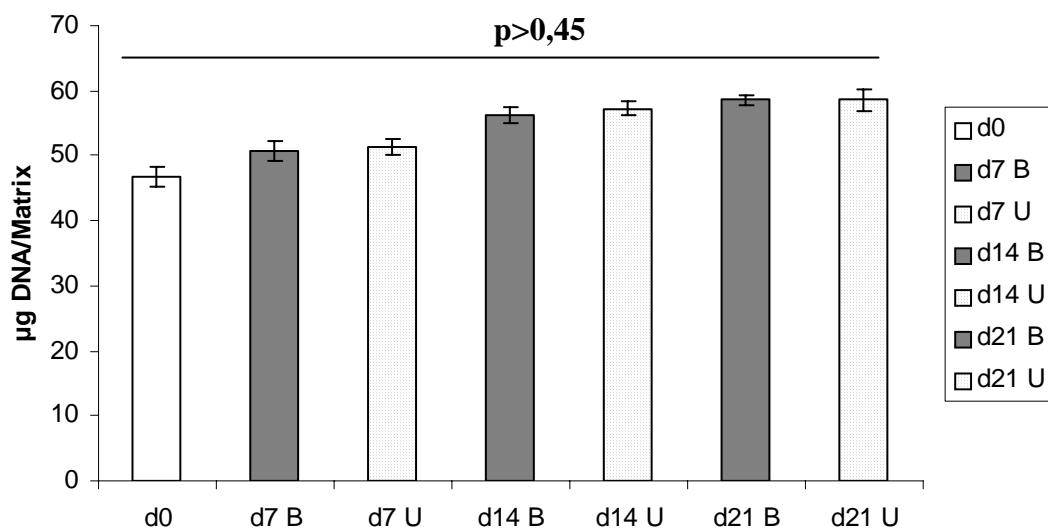


Abb. 4-41 DNA Gehalt 4 Minuten beschallt

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im DNA Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-41). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.1.2 Glykosaminoglykangehalt

Zur Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts wurde das gleiche, wie unter 4.2.1.2 beschriebene Verfahren verwendet.

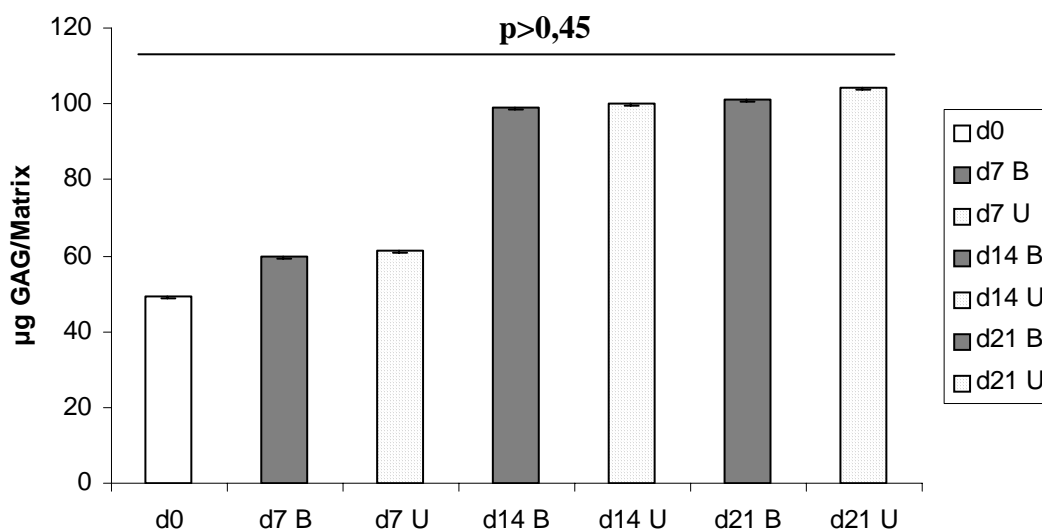


Abb. 4-42 Glykosaminoglykangehalt 4 Minuten beschallt

Der am Tag 0 gemessene GAG Gehalt detektiert die Hyaluronsäure, den Hauptbestandteil der verwendeten Trägermatrix. Dieser Ausgangswert wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Der höchste Anstieg an GAG Gehalt zeigte sich von Tag 7 auf Tag 14 mit 66% in der belasteten (B) und 64% in der unbelasteten Gruppe (U).

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im GAG Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-42).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.1.3 Kollagengehalt

Zur quantitativen Bestimmung des Kollagens wurde die von uns modifizierte, alkalische Hydroxyprolin Assay Methode nach Reddy et al. (Reddy and Enwemeka 1996) verwendet. Methodik: siehe 4.2.1.3

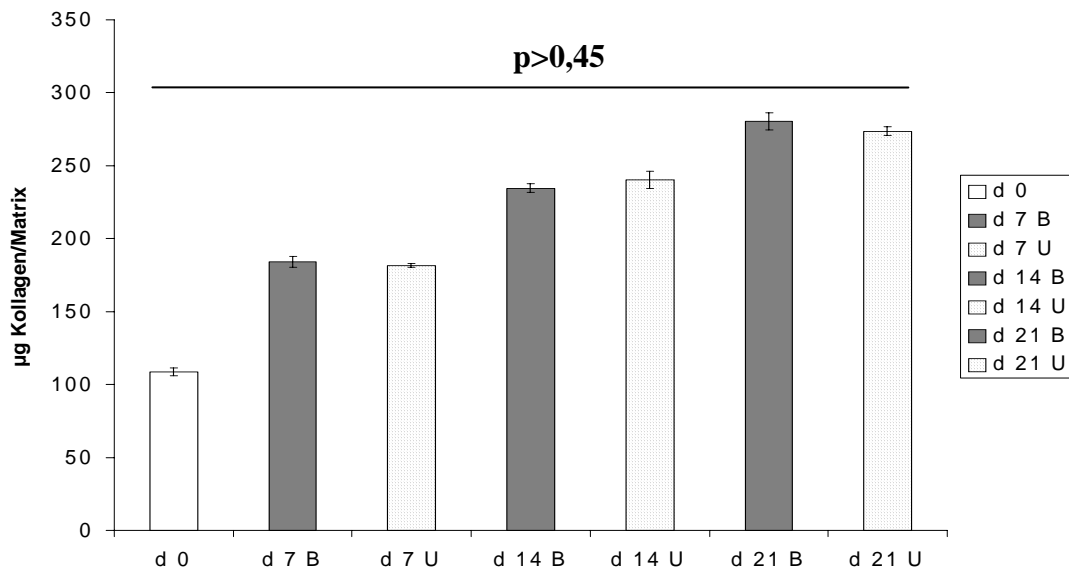


Abb. 4-43 Kollagengehalt 4 Minuten beschallt

Der am Tag 0 gemessene Kollagengehalt lässt sich auf den zweiten Hauptbestandteil der Trägermatrix, Gelatine (Kollagen Typ I) zurückführen und wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im Kollagen Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-43).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.2 Zellmatrixkonstrukt 20 Minuten beschallt

##### 4.4.2.1 Zellproliferation

Methodik: siehe 4.2.1.1.

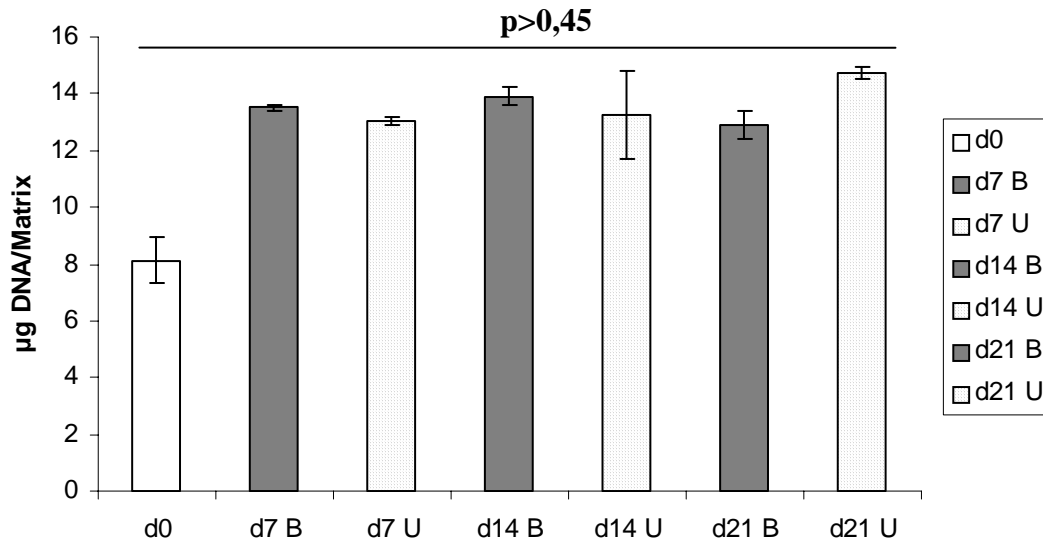


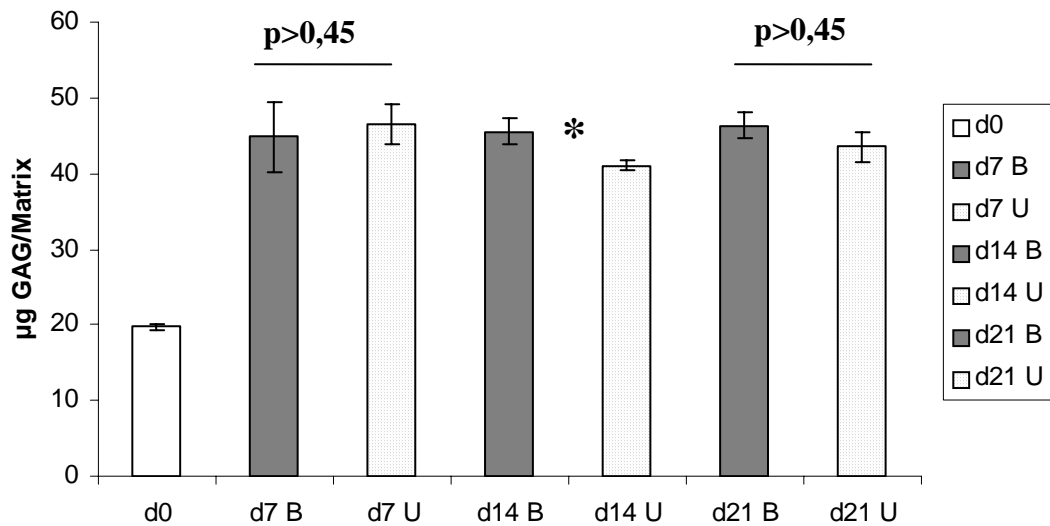
Abb. 4-44 DNA Gehalt 20 Minuten beschallt

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im DNA Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-44).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.2.2 Glykosaminoglykangehalt

Methodik: siehe 4.2.1.2



\*  $p < 0,05$

Abb. 4-45 Glykosaminoglykangehalt 20 Minuten beschallt

Der am Tag 0 gemessene GAG Gehalt detektiert die Hyaluronsäure, den Hauptbestandteil der verwendeten Trägermatrix. Dieser Ausgangswert wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Am Tag 14 ließ sich ein signifikanter Anstieg des GAG Gehalts in den belasteten (B) Proben gegenüber der unbelasteten Kontrolle (U) nachweisen (+11%,  $p < 0,05$ ).

Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Belastungsgruppe und der Kontrolle zeigten sich dagegen am Tag 7 und Tag 21 ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-45).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.2.3 Kollagengehalt

Methodik: siehe 4.2.1.3

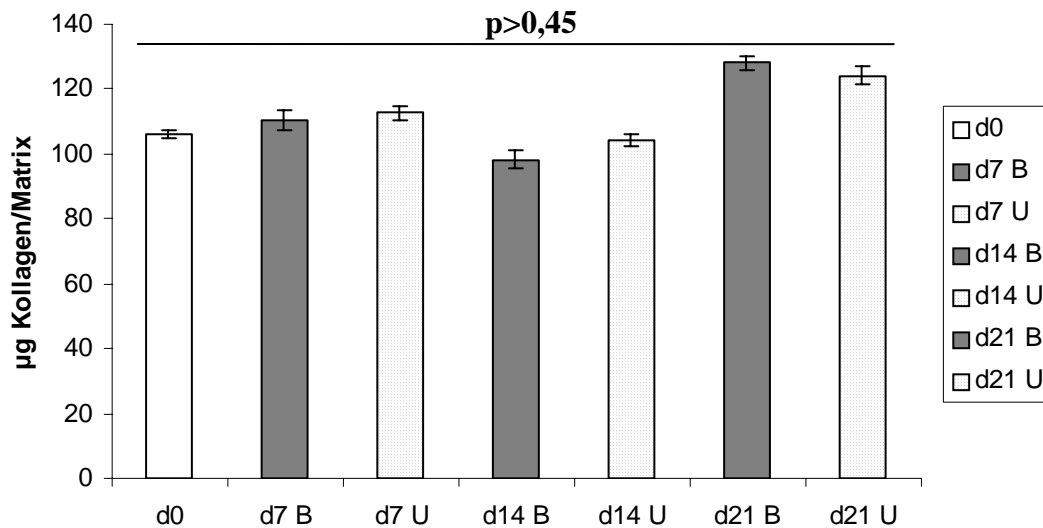


Abb. 4-46 Kollagengehalt 20 Minuten beschallt

Der am Tag 0 gemessene Kollagengehalt lässt sich auf den zweiten Hauptbestandteil der Trägermatrix, die Gelatine (Kollagen Typ I) zurückführen und wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im Kollagen Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-46).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.3 Zellmatrixkonstrukt 40 Minuten beschallt

##### 4.4.3.1 Zellproliferation

Methodik: siehe 4.2.1.1

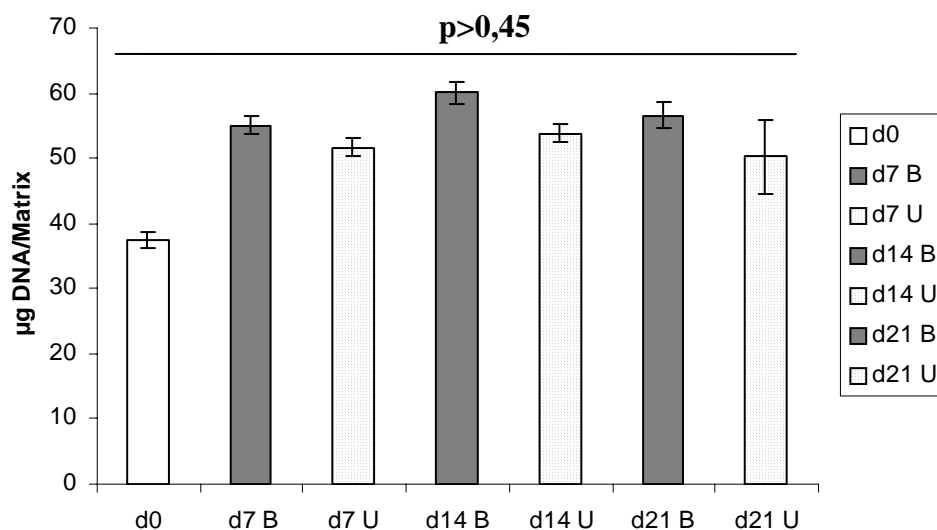


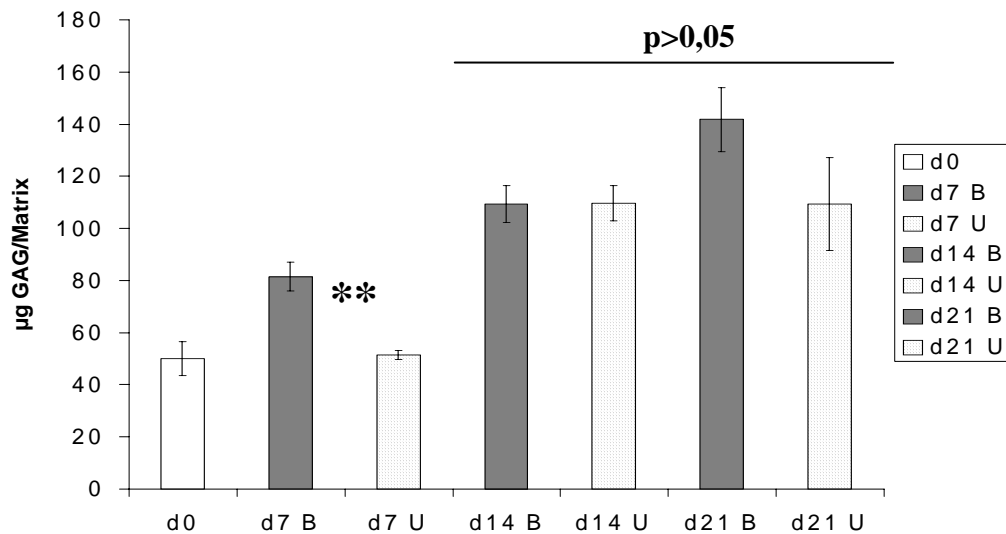
Abb. 4-47 DNA Gehalt 40 Minuten beschallt

Es ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im DNA Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten (U) Proben nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb.4-47).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.3.2 Glykosaminoglykangehalt

Methodik: siehe 4.2.1.2



\*\*  $p < 0,001$

Abb. 4-48 Glykosaminoglykangehalt 40 Minuten beschallt

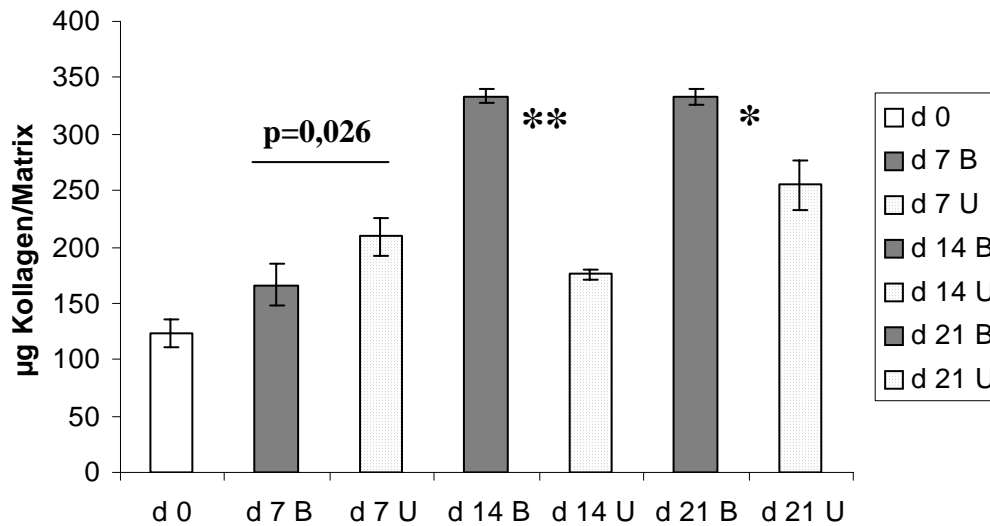
Der am Tag 0 gemessene GAG Gehalt detektiert den Hauptbestandteil der verwendeten Trägermatrix, „Hyaluronsäure“ –ein Glykosaminoklykan. Dieser Ausgangswert wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Die belastete Gruppe (B) zeigte am Tag 7 eine signifikante Steigerung des GAG Gehalts um 59% ( $p < 0,001$ ). Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten am Tag 14 gefunden werden. Am Tag 21 ließ sich ein um 30% höherer GAG in der Belastungsgruppe gegenüber der unbelasteten Kontrolle (U) nachweisen (nicht signifikant,  $p = 0,060$ ) (Abb. 4-48).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.3.3 Kollagengehalt

Methodik: siehe 4.2.1.3



\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$

Abb. 4-49 Kollagengehalt 40 Minuten beschallt

Der am Tag 0 gemessene Kollagengehalt lässt sich auf den zweiten Hauptbestandteil der Trägermatrix, Gelatine (Kollagen Typ I) zurückführen und wurde jeweils von den weiteren Probenwerten subtrahiert.

Nach einer anfänglich negativen Entwicklung am Tag 7 (-20%,  $p=0,026$ ) zeigte sich am Tag 14 ein statistisch signifikanter, starker Anstieg des Kollagengehalts in den belasteten (B) Proben gegenüber der unbelasteten Kontrolle (U) (+90%,  $p < 0,001$ ). Diese Entwicklung ließ sich auch am Tag 21 in abgemilderter Form nachweisen (+31%,  $p=0,004$ ) (Abb. 4-49).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.4 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR)

Der semiquantitative Nachweis der Expression chondrogener Markergene (Aggrecan, Typ I/II Kollagen) wurde für die Proben aller vier Entnahmezeitpunkte (Tag 0/7/14/21) mit Hilfe der RT-PCR mittels LIGHT Cycler durchgeführt. Alle erhaltenen Expressionswerte wurden auf das Housekeeping Gene GAPDH standardisiert.

##### 4.4.4.1 Zellmatrixkonstrukt 4 Minuten beschallt

Es zeigten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede in der Expression chondrogener Markergene (Aggrecan, Typ I/II Kollagen) zwischen den vier Minuten belasteten und den unbelasteten Proben. ( $p > 0,45$ , Daten nicht gezeigt). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

##### 4.4.4.2 Zellmatrixkonstrukt 20 Minuten beschallt

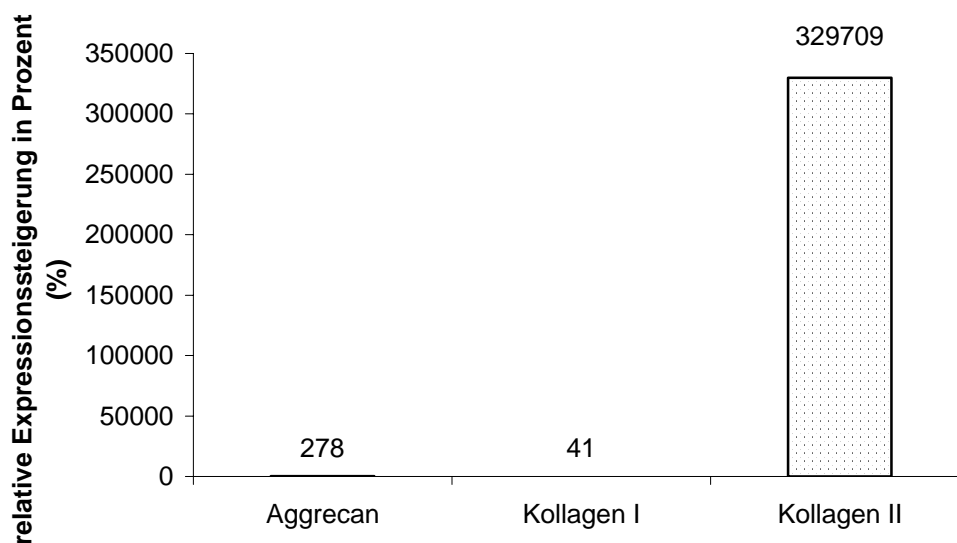


Abb. 4-50 Relative Expressionssteigerung der unbelasteten Gruppe Tag 21 versus Tag 1

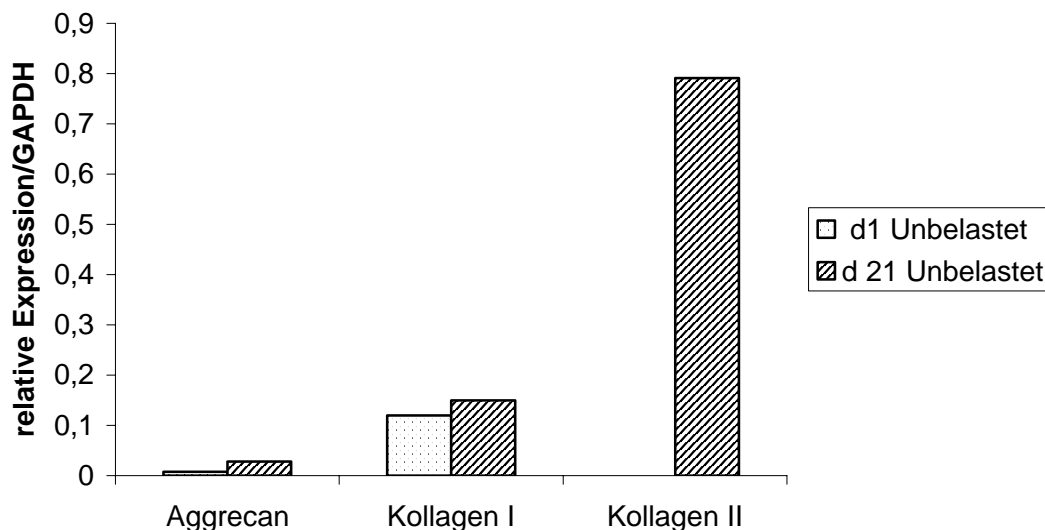


Abb. 4-51 Relative Expression gegen GAPDH

In der unbelasteten Kontrollgruppe zeigte sich nach 21 Tagen Kultur in chondrogenen Differenzierungsmedium eine deutliche Steigerung der Expression des knorpelspezifischen Typ II Kollagen Markers (32971 fach) gegenüber Versuchsbeginn am Tag 1. Die Aggrecan Expression der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 steigerte sich um 278% gegenüber Tag 1 und die Kollagen Typ I Expression nahm um 41% zu (Abb. 4-50 und 4-51).

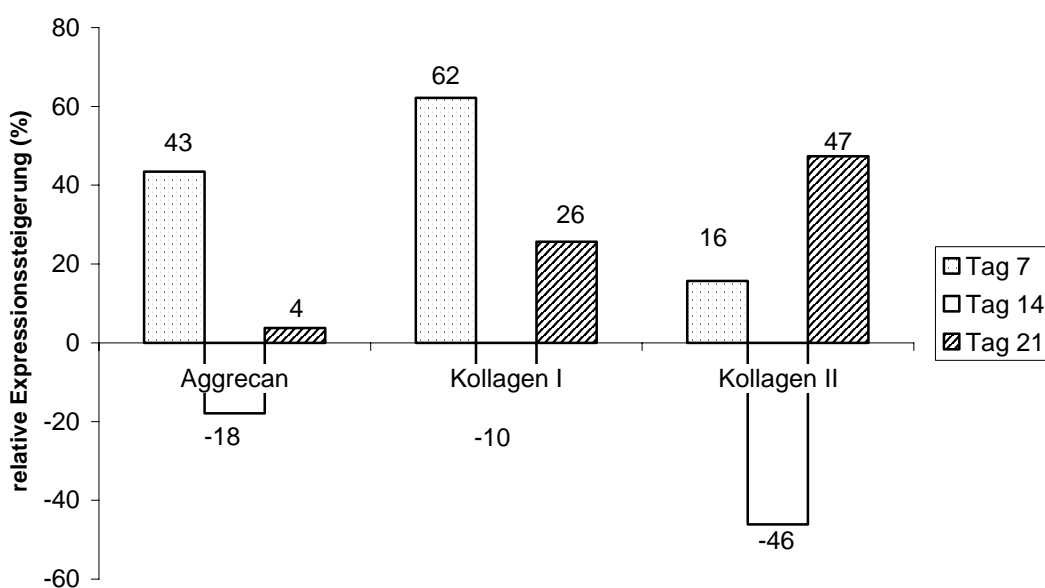


Abb. 4-52 Relative Expressionssteigerung Belastet gegen Unbelastet in Prozent

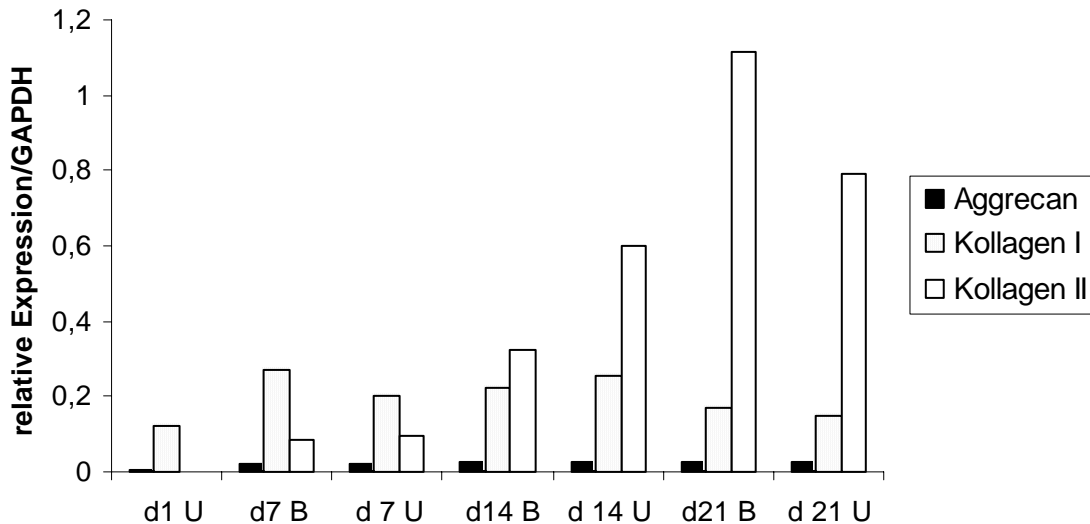


Abb. 4-53 Relative Expression gegen GAPDH

Die Aggrecan Expression der sieben Tage belasteten Proben (B) zeigte am Tag 7 eine 43% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle (U) ( $p < 0,001$ ). Am Tag 21 wurde für die belasteten Proben eine Steigerung von 4% gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen ( $p = 0,026$ ) (Abb. 4-52 und 4-53).

Die Kollagen Typ II Markerexpression der belasteten Probe erzielte eine 16% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle am Tag 7 ( $p < 0,001$ ). Ihr Maximum an Kollagen Typ II Markerexpression erzielten die belasteten Probe mit einer signifikanten 47% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-52 und 4-53).

Die Kollagen Typ I Markerexpression der belasteten Proben zeigte eine signifikante Steigerung am Tag 7 (62%,  $p < 0,001$ ) und Tag 21 (26%,  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbelasteten Gruppe, erreichte aber nicht die Expressionslevel des hyalinen Knorpel spezifischen Marker Typ II Kollagen (Abb. 4-52 und 4-53).

Die 20min. mit Ultraschall belasteten Proben zeigten für alle untersuchten chondrogenen Markergene einen Abfall der Expressionslevel am Tag 14 gegenüber der unbelasteten Kontrolle (Aggrecan: -18%, Kollagen I: -10%, Kollagen II: -46%;  $p < 0,001$ ) (Abb. 4-52 und 4-53).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.4.3 Zellmatrixkonstrukt 40 Minuten beschallt

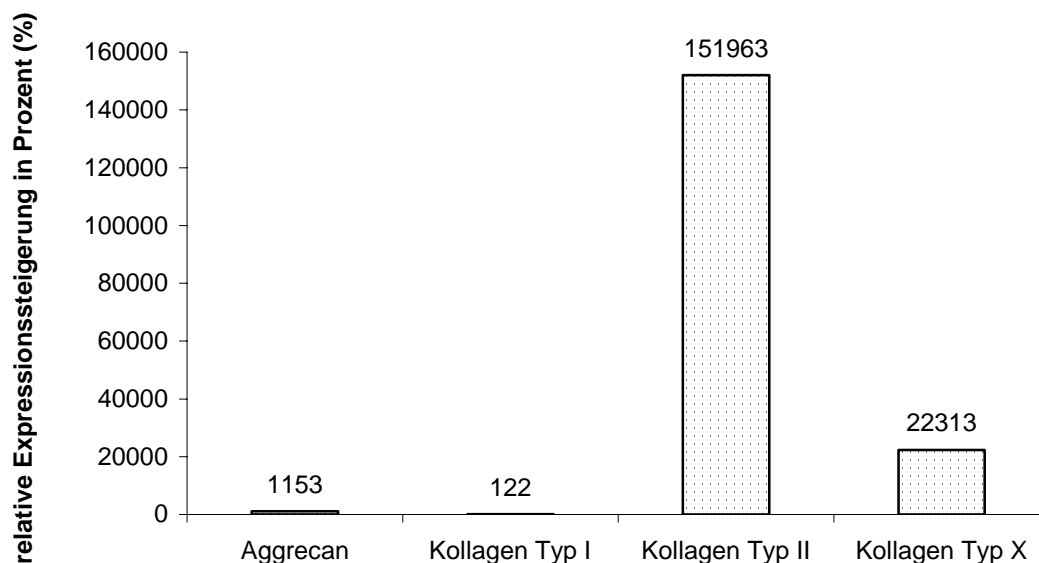


Abb. 4-54 Relative Expressionssteigerung der unbelasteten Gruppe Tag 21 versus Tag 1

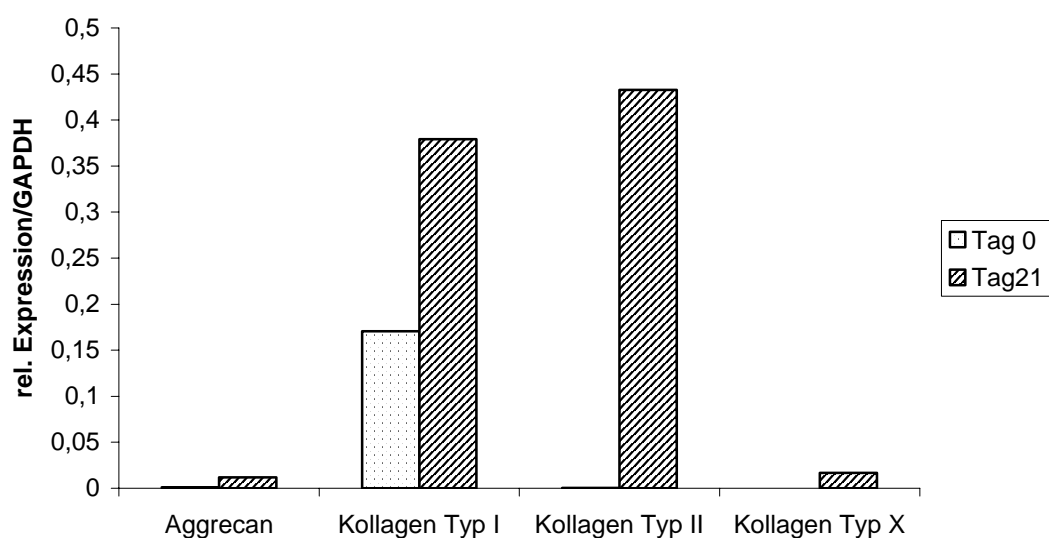


Abb. 4-55 Relative Expression gegen GAPDH

In der unbelasteten Kontrollgruppe zeigte sich nach 21 Tagen Kultur in chondrogenen Differenzierungsmedium eine große Steigerung der Expression des knorpelspezifischen Typ II Kollagen Markers (15196 fach) gegenüber Versuchsbeginn am Tag 1. Die Aggrecan Expression der unbelasteten Kontrolle am Tag 21 steigerte sich um 1153% gegenüber Tag 1, die Kollagen Typ I Expression nahm um 122% zu und die Kollagen Typ X Expression stieg auf das 2231 fache ihres Tag 1 Wertes an (Abb. 4-54 und 4-55).

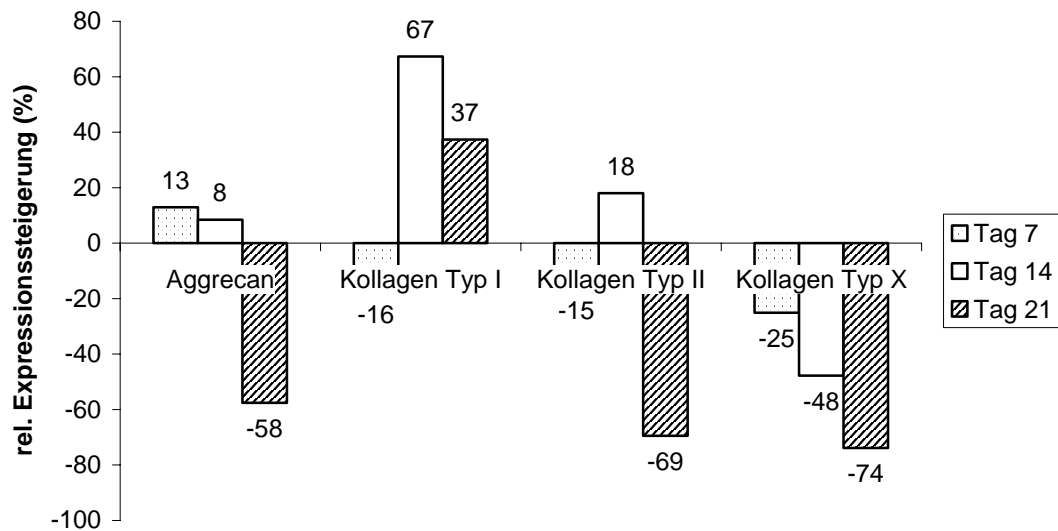


Abb. 4-56 Relative Expressionssteigerung Belastet gegen Unbelastet in Prozent

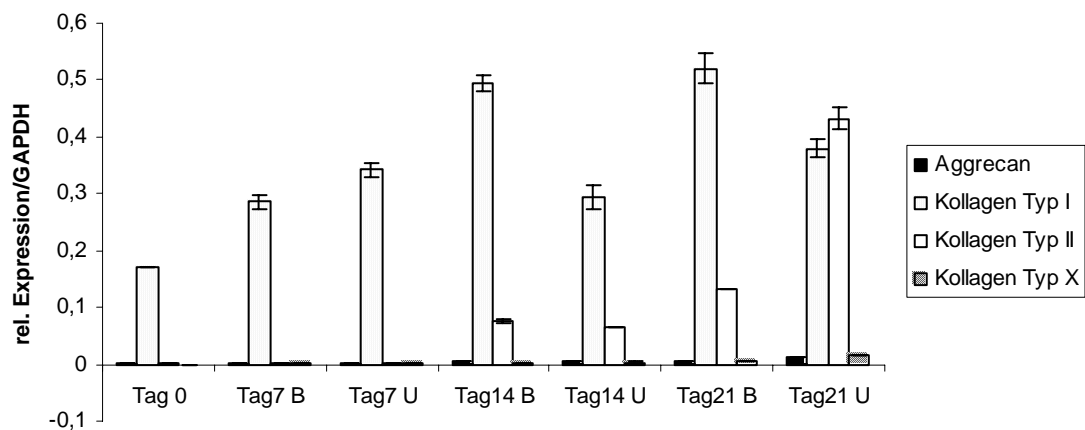


Abb. 4-57 Relative Expression gegen GAPDH

Die Aggrecan Expression der sieben Tage belasteten Proben (B) zeigte am Tag 7 eine 13% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle (U) ( $p < 0,001$ ). Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten am Tag 14 gefunden werden ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-56 und 4-57).

Die Kollagen Typ II Markerexpression der belasteten Probe erzielte eine 18% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle am Tag 14 ( $p < 0,001$ ). An den Tagen 7 und 21 wurde eine Absenkung der Genexpression der belasteten Proben gegenüber der unbelasteten Kontrolle mit -15% bzw. -69% nachgewiesen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-56 und 4-57).

Die Kollagen Typ I Markerexpression der belasteten Proben zeigte eine signifikante Steigerung am Tag 14 (67%,  $p < 0,001$ ) und 21 (37%,  $p < 0,001$ ) und einen Abfall der Expression am Tag 7 (-16%,  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbelasteten Gruppe. Die Expressionswerte überstiegen hierbei die Werte der anderen untersuchten Markergene (Aggrecan, Kollagen II und Kollagen X) um ein Vielfaches (Abb. 4-56 und 4-57).

Für Kollagen Typ X konnten mit -25% am Tag 7, -48% am Tag 14 und -74% am Tag 21 signifikante Abfälle der Markerexpression der belasteten Proben gegenüber den unbelasteten Kontrollen nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-56 und 4-57).

Die 40 min. mit Ultraschall belasteten Proben zeigten am Tag 21 für fast alle untersuchten chondrogenen Markergene, ausgenommen Kollagen Typ I, einen Abfall der Expressionslevel gegenüber der unbelasteten Kontrolle (Aggrecan: -58%, Kollagen I: +37%, Kollagen II: -69%; Kollagen X: -74%,  $p < 0,001$ ) (Abb. 4-56 und 4-57).

#### VEGF Expression

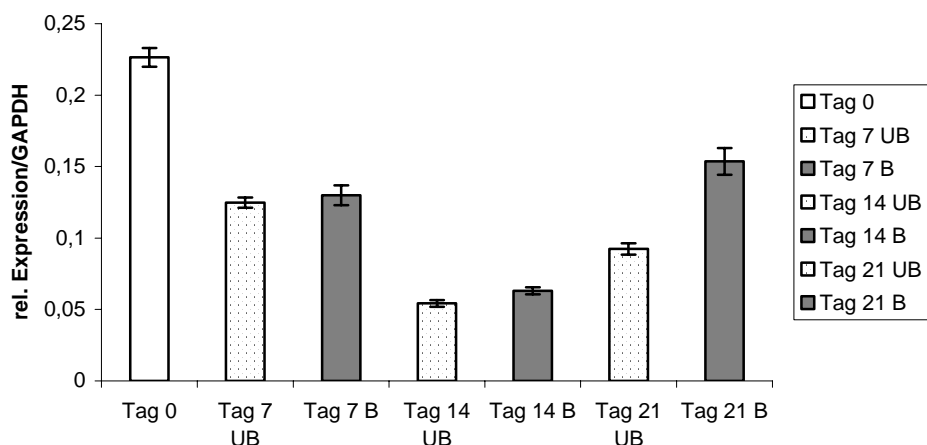


Abb. 4-58 Relative VEGF mRNA Expression gegen GAPDH

Die VEGF mRNA Expression der beiden Experimentalgruppen zeigte einen signifikanten Abfall von Tag 0 auf Tag 7 ( $p < 0,001$ ) mit einem Minimum an Tag 14 und einem erneuten Anstieg von Tag 14 auf Tag 21. In der 40 min. belasteten Gruppe (B) lies sowohl am Tag 14 mit +16% als auch am Tag 21 mit +66% eine signifikante Steigerung der VEGF mRNA Expression gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB) nachweisen ( $p < 0,001$  und  $p < 0,0001$ ) (Abb. 4-58).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.5 Zellaggregat 20 und 40 Minuten beschallt

##### 4.4.5.1 Zellproliferation

20 min. beschallt

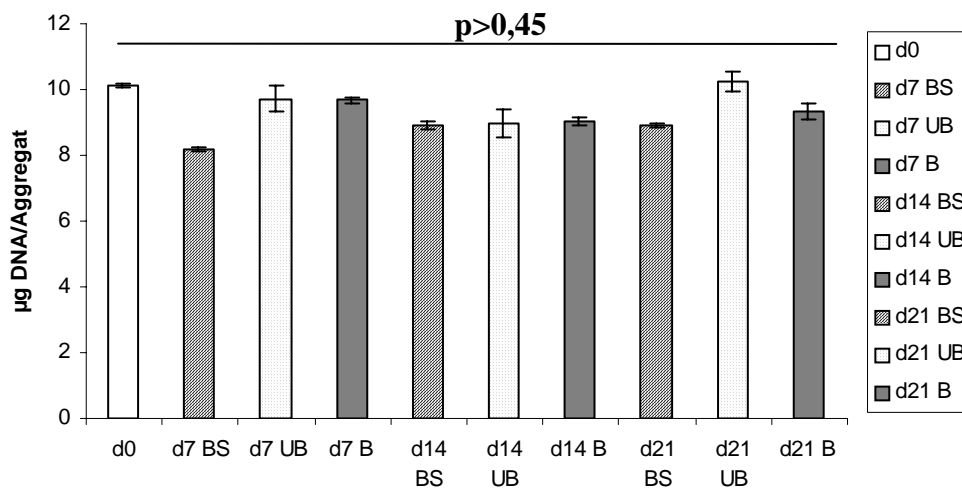


Abb. 4-59 DNA Gehalt 20 Minuten beschallt

40 min. beschallt

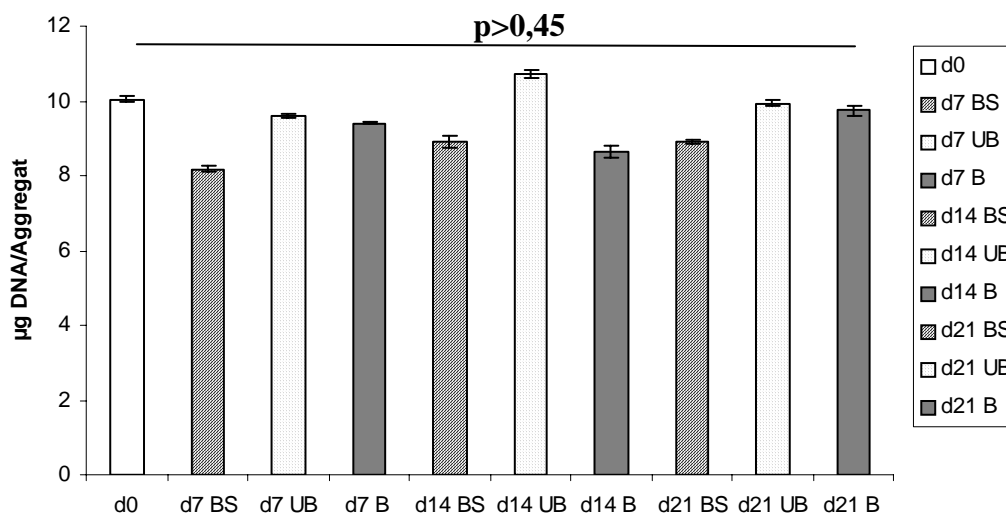


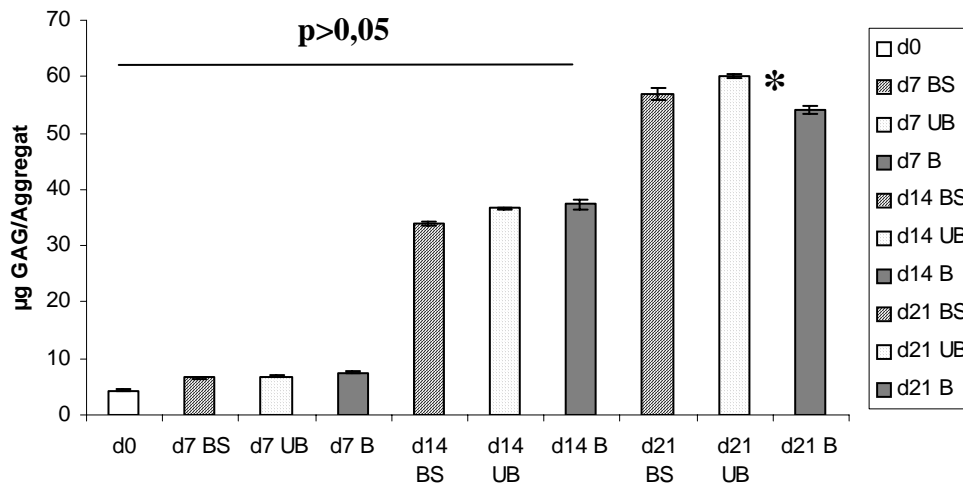
Abb. 4-60 DNA Gehalt 40 Minuten beschallt

Es ließen sich sowohl in der 20 Minuten als auch in der 40 Minuten Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im DNA Gehalt zwischen den belasteten (B) und den unbelasteten Proben (UB) nachweisen ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-59 und Abb. 4-60).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.5.2 Glykosaminoglykangehalt

20 min. beschallt

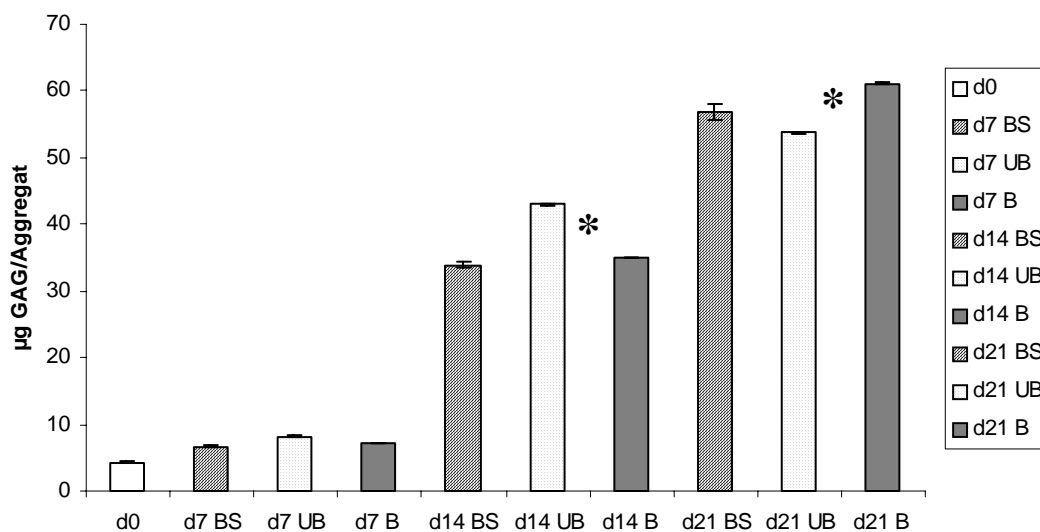


\*  $p < 0,05$

Abb. 4-61 Glykosaminoglykangehalt 20 Minuten beschallt

Bis Tag 21 ließen sich keine signifikanten Unterschiede im GAG Gehalt zwischen der Belastungsgruppe (B) und der unbelasteten Kontrolle (UB) nachweisen. Am Tag 21 konnte man eine leicht erhöhte GAG Konzentration in der unbelasteten Gruppe feststellen (+10%,  $p < 0,05$ ) (Abb. 4-61).

40 min. beschallt



\* p&lt;0,05

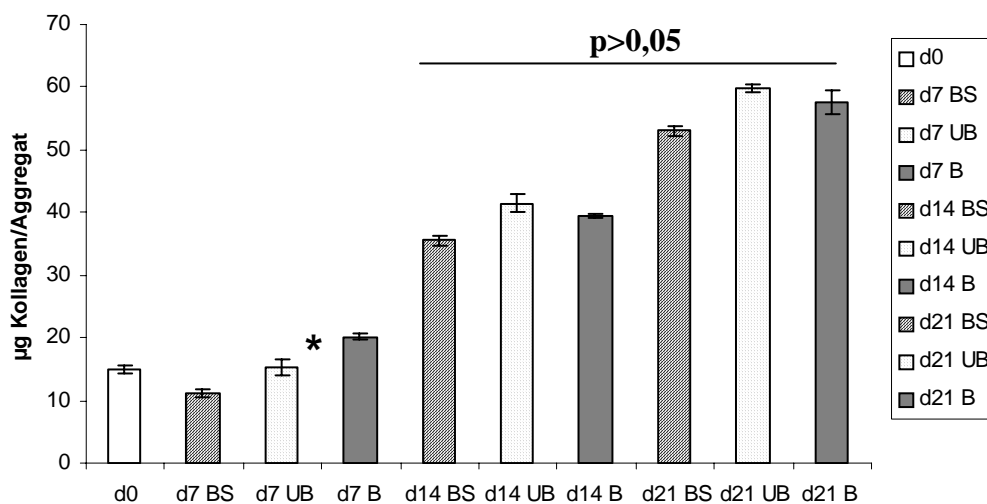
Abb. 4-62 Glykosaminoglykangehalt 40 Minuten beschallt

Die unbelastete Kontrolle (UB) zeigte am Tag 14 eine um 18% höhere GAG Konzentration als die Belastungsgruppe (B) ( $p < 0,05$ ). Erst am Tag 21 konnte ein gegenüber der Kontrolle um 14% gesteigerter GAG Gehalt in den belasteten Proben festgestellt werden ( $p < 0,05$ ) Abb. 4-62).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.5.3 Kollagengehalt

20 min. beschallt

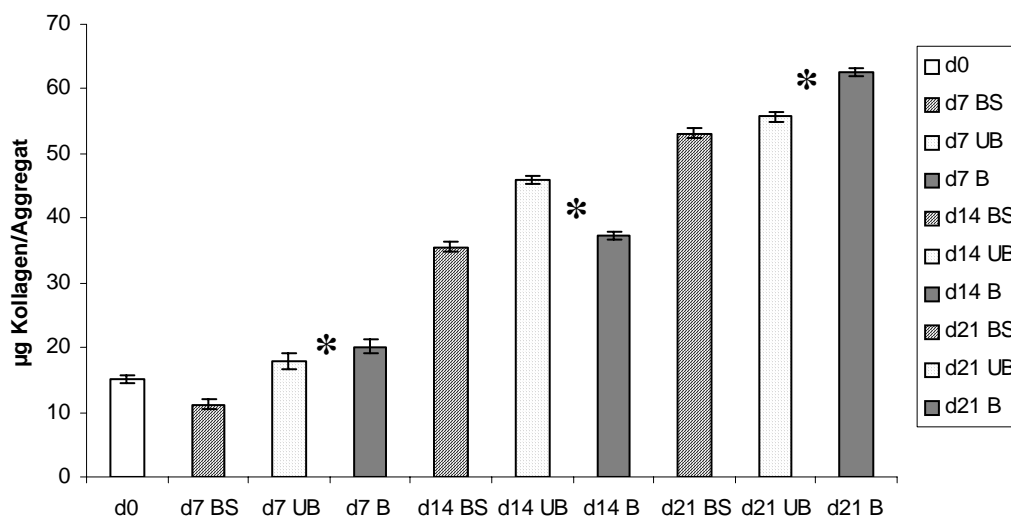


\* p &lt; 0,05

Abb. 4-63 Kollagengehalt 20 Minuten beschallt

Direkt nach der 7 tägigen Belastung war die Kollagenkonzentration in der belasteten Gruppe (B) gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB) um 32% erhöhet ( $p < 0,05$ ). An den übrigen Entnahmezeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede im Kollagengehalt festgestellt werden ( $p > 0,05$ ) (Abb. 4-63).

40 min. beschallt



\* p&lt;0,05

Abb. 4-64 Kollagengehalt 40 Minuten beschallt

Neben einer am Tag 14 um 19% gegenüber der unbelasteten Kontrolle (UB) erniedrigten Kollagenkonzentration der belasteten Proben (B) ( $p < 0,05$ ) konnte sowohl am Tag 7 als auch am Tag 21 ein um jeweils 12% gegenüber der Kontrolle erhöhter Kollagengehalt in der Belastungsgruppe festgestellt werden ( $p < 0,05$ ) (Abb. 4-64).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.4.5.4 Molekularbiologische Analysen (RT-PCR)

20 min. beschallt

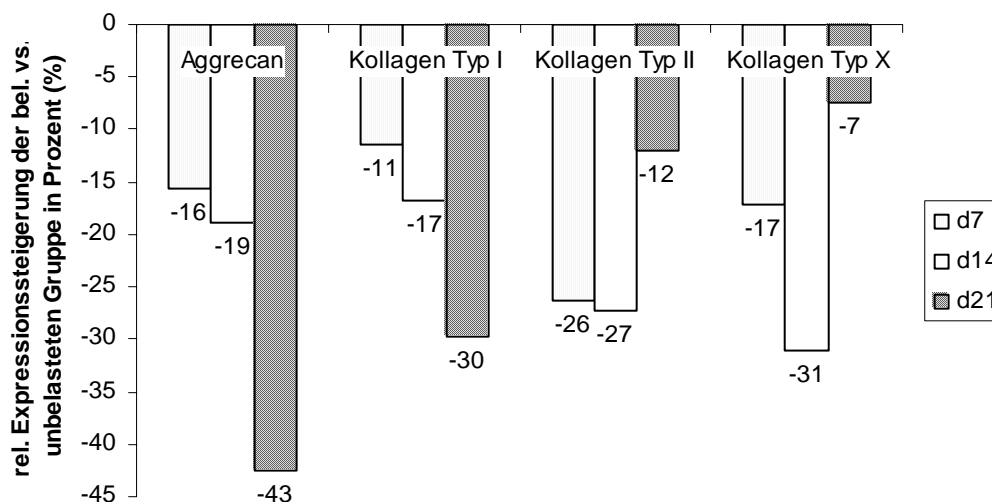


Abb. 4-65 Relative Expressionssteigerung Belastet gegen Unbelastet in Prozent

In der belasteten Gruppe wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen eine gegenüber der unbelasteten Kontrolle erniedrigte mRNA Expression an Aggrecan, Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Kollagen Typ X gemessen (Abb. 4-65 und Abb. 4-67).

40 min. beschallt

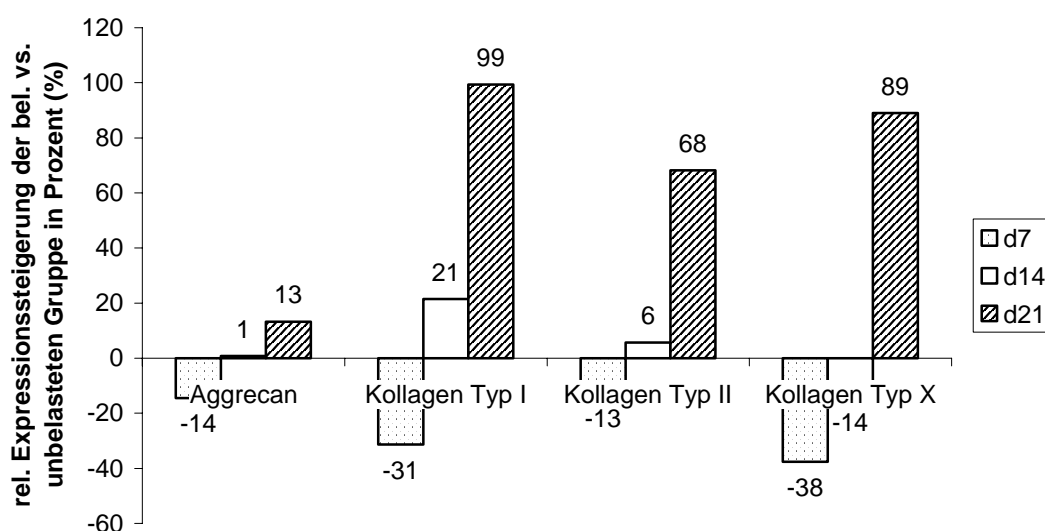


Abb. 4-66 Relative Expressionssteigerung Belastet gegen Unbelastet in Prozent

Die Aggrecan Expression der sieben Tage belasteten Proben zeigte am Tag 7 ein -14% Abfall gegenüber der unbelasteten Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Keine signifikante Veränderung der Aggrecan Expression konnte am Tag 14 gefunden werden ( $p > 0,45$ ). Am Tag 21 wurde für die belasteten Proben eine Steigerung von 13% gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen ( $p < 0,02$ ) (Abb. 4-66 und Abb. 4-67).

Die Kollagen Typ II Markerexpression der belasteten Probe erzielte mit einer signifikanten 68% Steigerung gegenüber der unbelasteten Kontrolle ihr Maximum am Tag 21 ( $p < 0,001$ ). Am Tag 7 wurde eine gegenüber den unbelasteten Proben um -13% erniedrigte mRNA Expression gefunden. Am Tag 14 der Kultur konnte mit 6% eine leichte Steigerung der Kollagen Typ II Markerexpression in den belasteten Proben nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ) (Abb. 4-66 und Abb. 4-67).

Die Kollagen Typ I Markerexpression der belasteten Proben zeigte eine signifikante Steigerung am Tag 14 (21%,  $p < 0,001$ ) und Tag 21 (99%,  $p < 0,001$ ) gegenüber der unbelasteten Kontrolle, erreichte aber zu allen Zeitpunkten nicht die Expressionslevel der hyalinen Knorpel spezifischen Marker Aggrecan und Kollagen Typ II (Vorsicht vielleicht nur Hintergrundrauschen!) (Abb. 4-66 und Abb. 4-67).

Für Kollagen Typ X konnte nach einer anfänglich erniedrigten mRNA Expression der belasteten Proben (Tag 7: -38%,  $p > 0,001$ ; Tag 14: -14%,  $p < 0,001$ ) eine am Tag 21 statistisch signifikante Steigerung um 89% gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ) (Abb. 4-66 und Abb. 4-67).

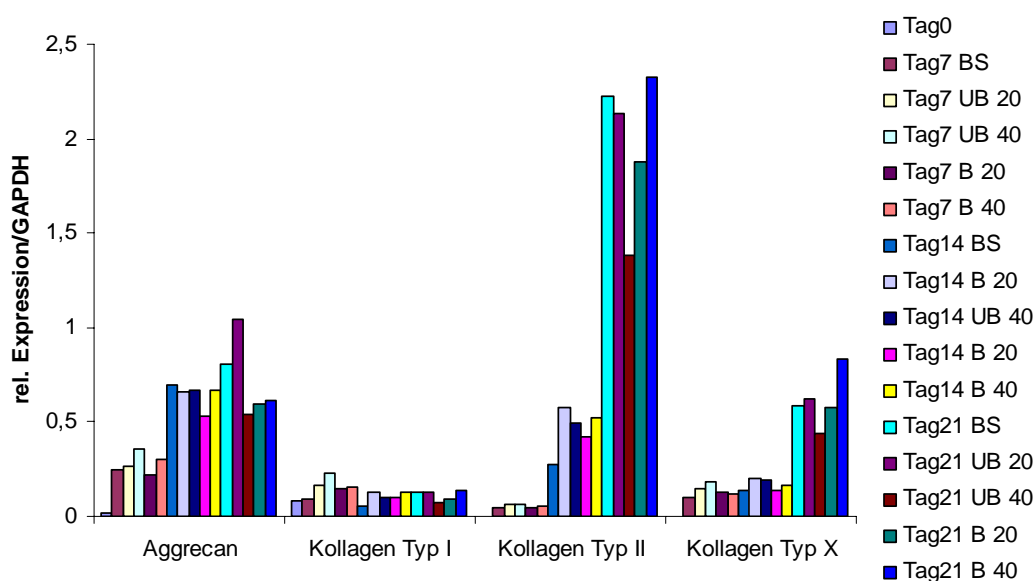
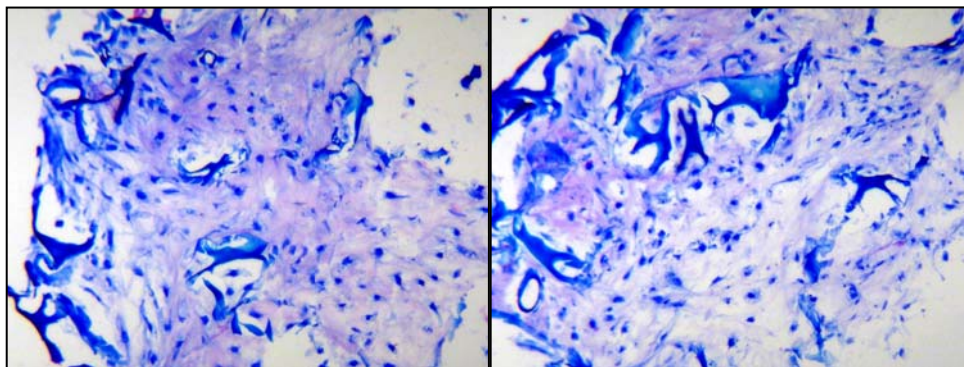


Abb. 4-67 Relative Expression gegen GAPDH

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.6 Histologie

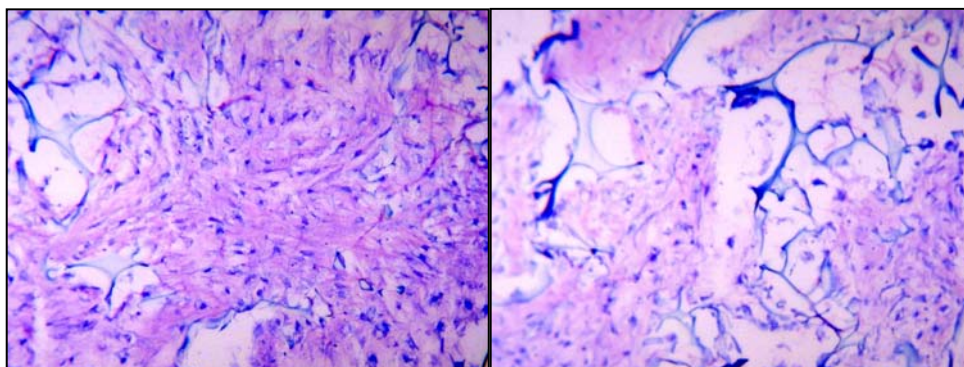
Mit Hilfe der Toluidinblau – Färbung konnte in der 40 Minuten beschallten dreidimensionalen Matrixkultur in beiden Versuchsgruppen (belastet/unbelastet) bereits am Tag 14 eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden (extrazelluläre, metachromatische Matrixablagerung; in den Abbildungen 4-68 und 4-69 als violette Färbung erkennbar), die sich bis Tag 21 noch intensiviert hat.



Belastet Tag 14

Unbelastet Tag 14

Abb. 4-68 Toluidinblaufärbung Tag 14



Belastet Tag 21

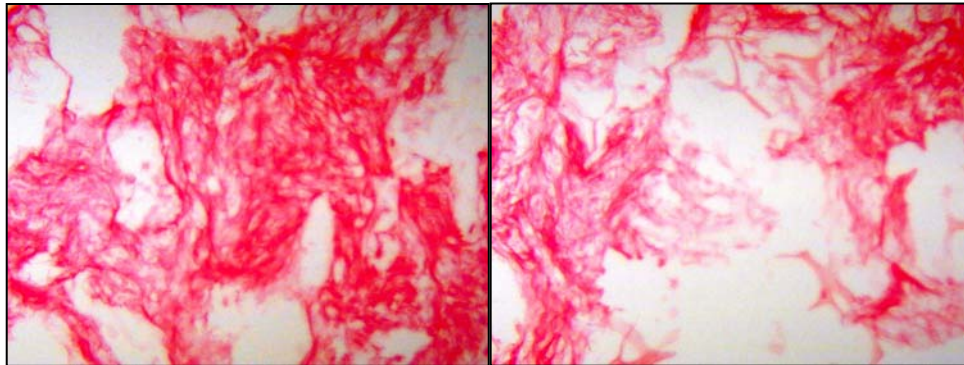
Unbelastet Tag 21

Abb. 4-69 Toluidinblaufärbung Tag 21

Sowohl am Tag 14 als auch am Tag 21 zeigte sich der schwach positive Einfluß der 40 minütigen Ultraschallbelastung auf die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen. Es konnte an beiden Tagen in der belasteten Gruppe (vor allem im Zentrum des Tissue Engineering Scaffolds) eine leicht gesteigerte metachromatische, extrazelluläre Matrixablagerung, mit einem etwas größeren Abstand der Zellkerne zueinander, nachgewiesen werden (Abb 4-68 und 4-69).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

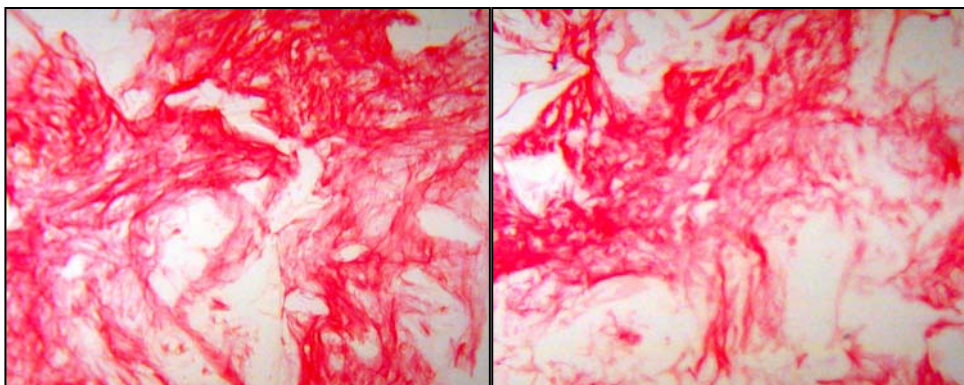
Die Bildung von Kollagen wurde histologisch mit Hilfe der Picosiriusrot Färbung untersucht.



Belastet Tag 14

Unbelastet Tag 14

Abb. 4-70 Picosiriusrot Färbung Tag 14



Belastet Tag 21

Unbelastet Tag 21

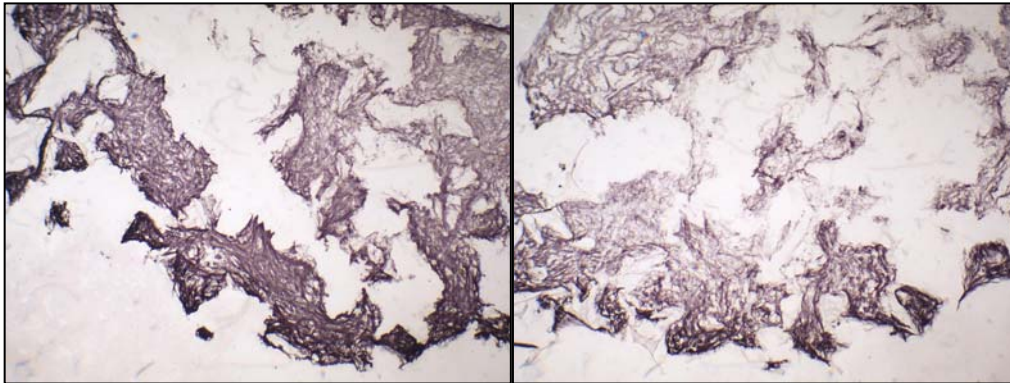
Abb. 4-71 Picosiriusrot Färbung Tag 21

Am Tag 14 und Tag 21 konnte eine jeweils leicht verstärkte Kollagenbildung in der belasteten Gruppe gegenüber der unbelasteten Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 4-70 und 4-71).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.4.7 Immunohistochemie

##### Typ I Kollagen



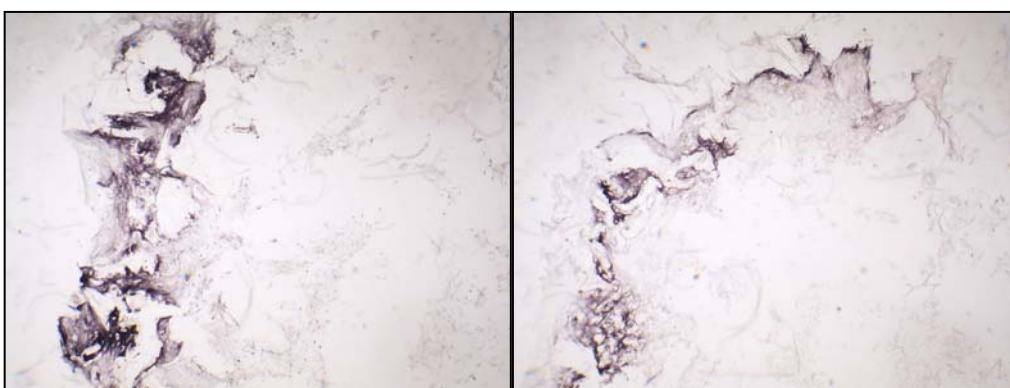
Belastet

Unbelastet

Abb. 4-72 Typ I Kollagen Färbung

In der belasteten Gruppe zeigte sich eine deutliche Färbung auf Typ I Kollagen im gesamten Scaffold. Dagegen konzentrierte sich die Färbung in der unbelasteten Kontrolle vor allem auf den Randbereich des Scaffolds (Abb. 4-72).

##### Typ II Kollagen

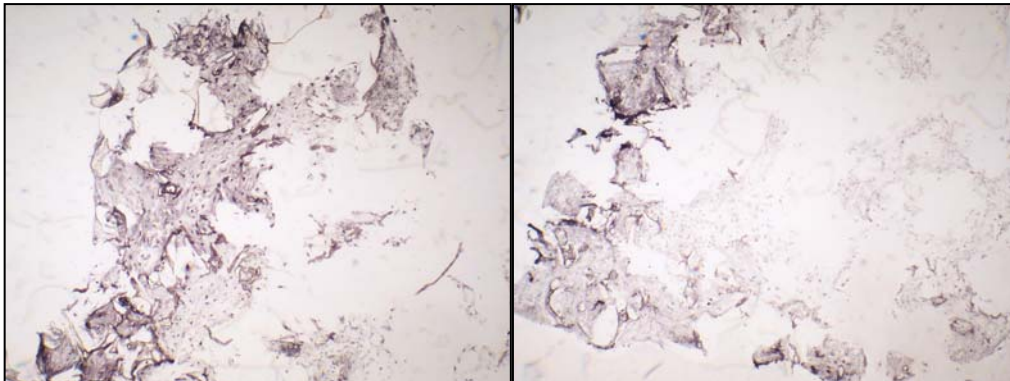


Belastet

Unbelastet

Abb. 4-73 Typ II Kollagen Färbung

Die immunhistochemische Färbung auf Typ II Kollagen zeigte eine gesteigerte Färbung in der belasteten Gruppe. In allen Proben zeigte sich eine Konzentration des Typ II Kollagens im Randbereich der Tissue Engineering Scaffolds (Abb. 4-73).

Typ X Kollagen

Belastet

Unbelastet

Abb. 4-74 Typ X Kollagen Färbung

Die Färbung auf Typ X Kollagen zeigte eine vermehrte Bildung im Randbereich der belasteten Matrices (Abb. 4-74).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

**4.4.8 Tunel-Assay**

Um Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Apoptoseverhältnisse in unserem Tissue Engineering System durch 40 minütige Ultraschallbelastung treffen zu können wurden Gefrierschnitte der Entnahmezeitpunkte 1,14 und 21 Tage mit Hilfe des Tunel-Assay analysiert.

Sowohl in den unbelasteten als auch in den belasteten Proben lies sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine Apoptose nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.5 Angiogenese

### 4.5.1 Einfluß des Differenzierungsgrades auf die Gefäßeinsprossung in Tissue Engineering Produkte

Zur Bestimmung des Einflusses des Differenzierungsgrades auf die Gefäßeinsprossung in Tissue Engineering Produkte wurden zellfreie Matrizes (Kontrolle), mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) beimpfte Matrizes und Tissue Engineertem knorpelähnlichen Gewebe über einen Zeitraum von 14 Tagen intravitalmikroskopisch untersucht.

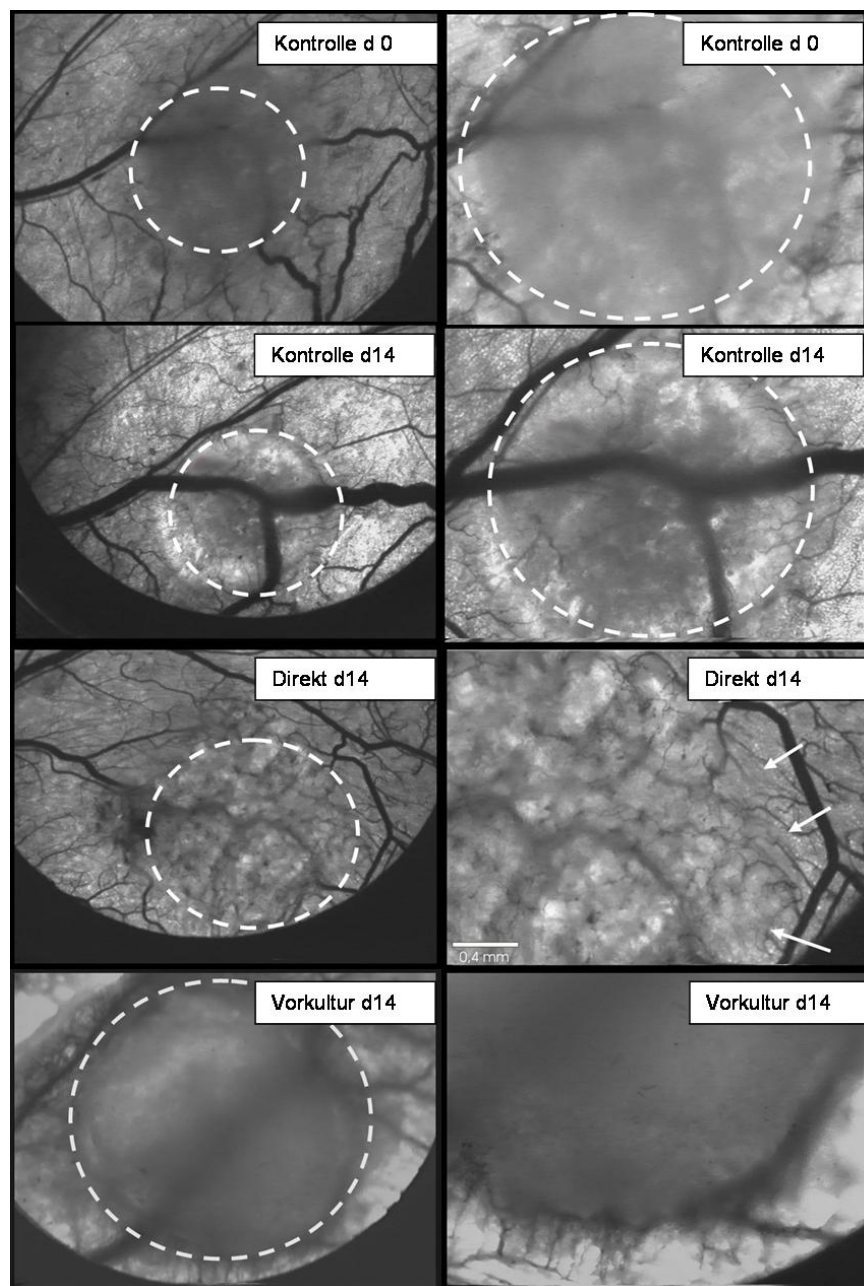


Abb. 4-75 Intravitalmikroskopische Aufnahmen verschieden differenzierter Stammzell-Matrix Konstrukte

Zu Beginn der Untersuchung (d0) sah man in der zellfreien Kontrollgruppe keine Gefäße in der Matrixstruktur. Nach 14 Tagen (Versuchende) fand man zahlreiche neu gebildete Gefäße in der Peripherie der zellfreien Kontrollen (Gefäßdichte: Peripherie  $53 \pm 5,3 \text{ cm}^{-1}$  / Zentrum  $1 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-75).

In der Versuchsgruppe der direkt nach Zellbeimpfung in die Rückenhautkammern eingelegten Matrices konnte nach bereits 3 Tagen eine erhebliche Einsprossung neu gebildeter Mikrogefäße in die Zellmatrix-Konstrukte gefunden werden (Daten hier nicht gezeigt). Am Tag 14 wurde sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum der Matrices eine erhebliche Gefäßdurchwachsung nachgewiesen (Gefäßdichte:  $54 \pm 4,9 \text{ cm}^{-1}$  /  $13 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-75).

Die 14 Tage in chondrogenen Differenzierungsmedium vorkultivierten Zellmatrix – Konstrukte (knorpelähnliches Gewebe) wiesen bei Versuchende eine starke, vollständig auf die Peripherie konzentrierte, Gefäßneubildung auf, ohne dass die Gefäße in die Struktur der Matrix eingedrungen sind. (Gefäßdichte:  $54 \pm 5,5 \text{ cm}^{-1}$  /  $0 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-75).

In der Tabelle 5-1 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengestellt. Es zeigten sich für den zentralen Bereich signifikante Unterschiede in der Gefäßdichte sowohl zwischen den zellfreien und den direkt zellbeladenen Matrices ( $p < 0,001$ ) als auch zwischen den direkt zellbeladenen und den 14 Tage vorkultivierten Zell-Matrix Konstrukten ( $p < 0,001$ ).

	<b>Peripherie</b>	<b>Zentral</b>
<b>Zell-freie Matrices</b>	$53 \text{ cm}^{-1}$	$1 \text{ cm}^{-1}$
<b>Direkt zellbeladen</b>	$54 \text{ cm}^{-1}$	$13 \text{ cm}^{-1}$
<b>14 Tage vorkultiviert</b>	$54 \text{ cm}^{-1}$	$0 \text{ cm}^{-1}$

Tabelle 5-1 Gefäßdichteüberblick der Versuchsgruppen am Tag 14

#### 4.5.2 Einfluß der Zellart auf die Gefäßeinsprossung in Tissue Engineering Produkte

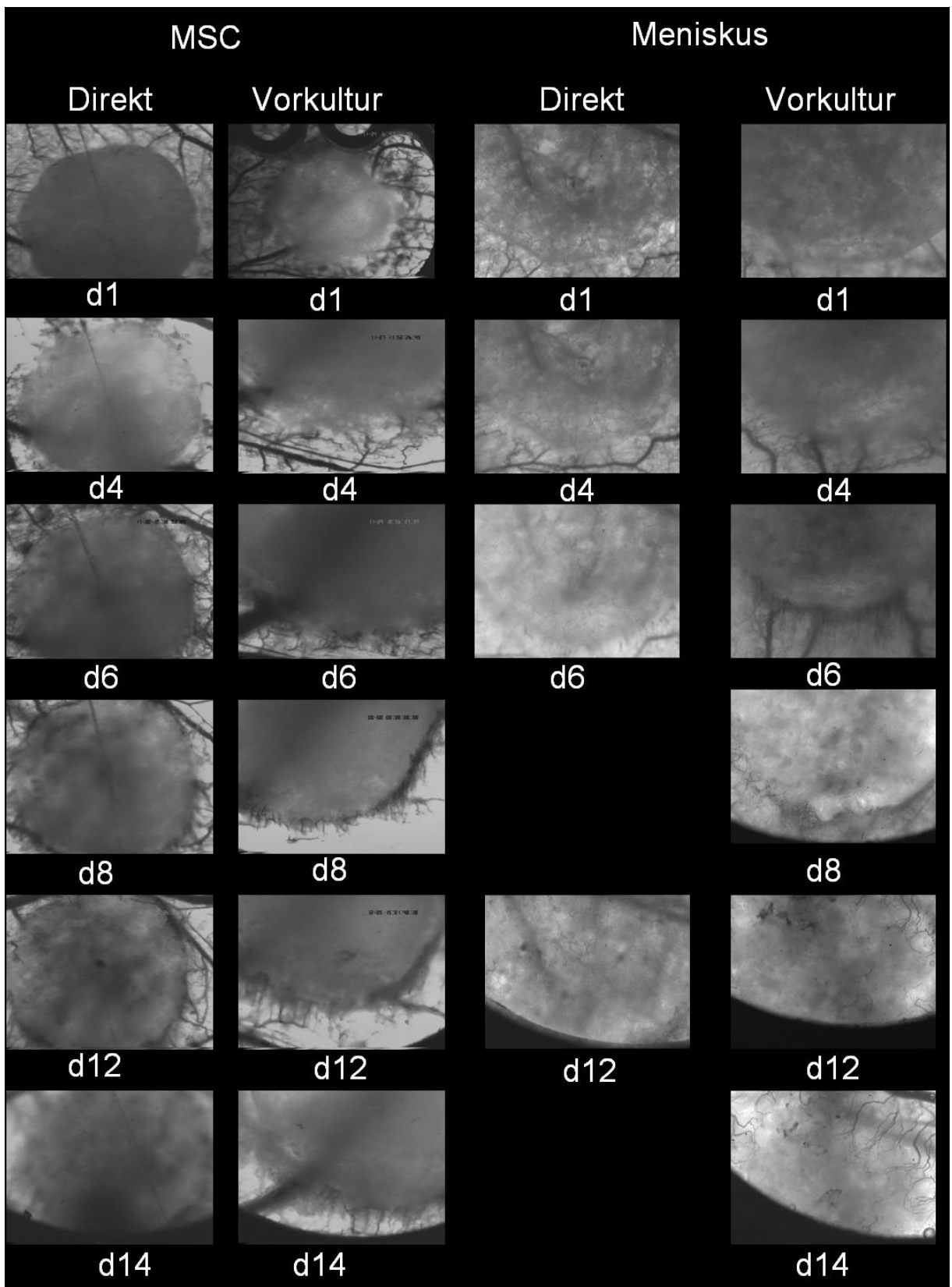


Abb. 4-76 Intravitalmikroskopische Aufnahmen verschieden differenzierter Stammzell-Matrix und Meniskuszell-Matrix Konstrukte

Zur Untersuchung des Einflusses der verwendeten Zellart wurden Matrizes mit humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und mit Meniskuszellen beschichtet. Die eine Hälfte der mit dem jeweiligen Zellmaterial besetzten Matrizes wurde direkt in die Rückenhautkammern der Nacktmäuse eingesetzt. Die andere Hälfte der beschichteten Matrizes wurde für 14 Tage in chondrogenen Differenzierungsmedium vorkultiviert und im Anschluss daran in die Rückenhautkammern eingesetzt und intravitalmikroskopisch untersucht.

In den direkt nach Zellbeschichtung eingesetzten MSC – Matrizes zeigte sich bereits nach 4 Tagen eine beginnende Gefäßeinsprossung im gesamten Matrixbereich (Gefäßdichte: Peripherie  $3 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  / Zentrum  $7 \text{ cm}^{-1}$ ). Bis zum Versuche am Tag 14 nahm die Durchwachsung der MSC – Matrizes mit Gefäßen noch deutlich zu. (Gefäßdichte:  $51 \pm 2,8 \text{ cm}^{-1}$  /  $14 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-76).

In der Versuchsgruppe der mit 14 Tage in chondrogenen Differenzierungsmedium vorkultivierten MSC-Matrizes zeigten sich wie bereits in der direkt beschichteten Gruppe eine Gefäßneubildung beginnend am Tag 4 der Untersuchung. Hierbei konzentrierte sich die Bildung neuer Gefäße aber bis zum Versuche am Tag 14 auf die Peripherie der Matrizes ohne dass die Gefäße tief in die Matrixstruktur eingedrungen sind (Gefäßdichte:  $55 \pm 3,4 \text{ cm}^{-1}$  /  $1 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-76).

Die Untersuchung der direkt nach Beimpfung mit Meniskuszellen eingesetzten Matrizes zeigte bereits nach 1 Tag in vivo eine beginnende Gefäßdurchwachsung im Zentrum der Matrizes (Gefäßdichte:  $2 \pm 0 \text{ cm}^{-1}$  /  $6 \text{ cm}^{-1}$ ). Bis zum Tag 12 (danach Abbruch dieser Versuchsgruppe wegen Unverträglichkeit der Rückenhautkammer) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Gefäßdichte sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum der Matrizes (Gefäßdichte:  $47 \pm 5,3 \text{ cm}^{-1}$  /  $13 \text{ cm}^{-1}$ ) (Abb. 4-76).

Am Tag 4 der intravitalmikroskopischen Untersuchung zeigte sich in den 14 Tage vorkultivierten mit Meniskuszellen beschichteten Proben eine erste Gefäßeinsprossung in der Peripherie der Matrizes (Gefäßdichte:  $8 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  /  $1 \text{ cm}^{-1}$ ). Im Verlauf der Untersuchung konnte bis zum Versuche am Tag 14 sowohl in der Peripherie ( $58 \pm 3,0 \text{ cm}^{-1}$ ) als auch im Zentrum ( $18 \text{ cm}^{-1}$ ) eine deutliche Erhöhung der Gefäßdichte nachgewiesen werden (Abb. 4-76).

### 4.5.3 Histologie

Mit Hilfe der Lektinfärbung konnte nach Versuche die Gefäßverteilung in den untersuchten Proben histologisch nachgewiesen werden. Untersucht wurden hierbei zellfreie Matrices (Kontrolle), direkt nach Zellbeschichtung in die Rückenhautkammern eingesetzte MSC-Matrices und 14 Tage vorkultivierte MSC-Matrices (Tissue engineeringes, knorpelähnliches Gewebe).

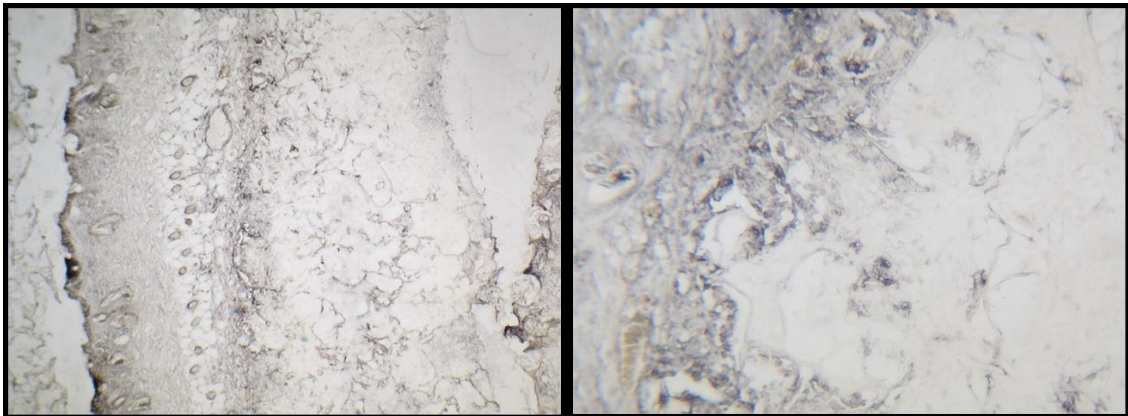


Abb. 4-77 Lektinfärbung der zellfreien Kontrollgruppe (Vergrößerung: Links x20, rechts x100)

In der zellfreien Kontrollgruppe zeigte sich eine deutliche Konzentration der Gefäße auf die Peripherie der Matrices. Nur vereinzelt konnten Gefäße im Zentrum der Matrices nachgewiesen werden (Abb. 4-77).

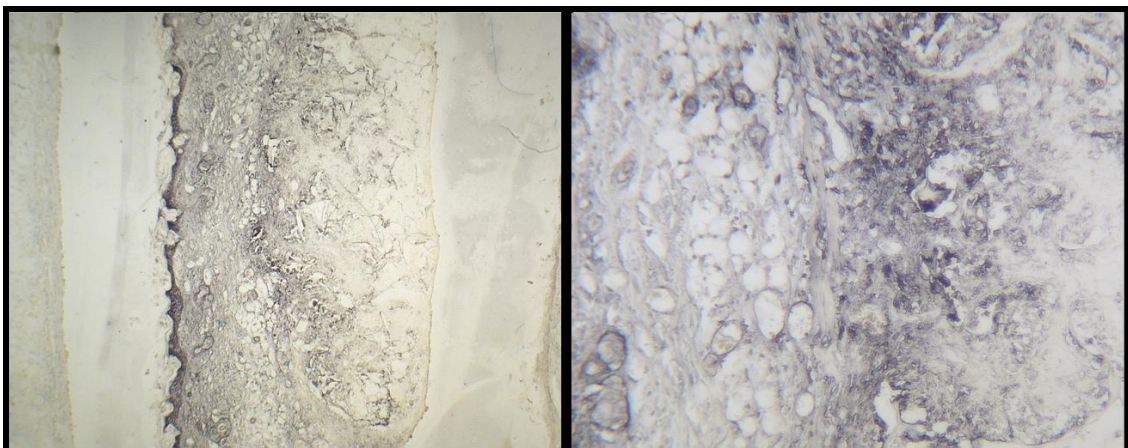


Abb. 4-78 Lektinfärbung der direkt stammzellbeladenen Matrixgruppe  
(Vergrößerung: Links x20, rechts x100)

Die direkt nach Zellbeimpfung untersuchten Matrices zeigten eine nach 14 Tagen den gesamten Matrixbereich betreffende Durchwucherung mit Gefäßen (Abb. 4-78).

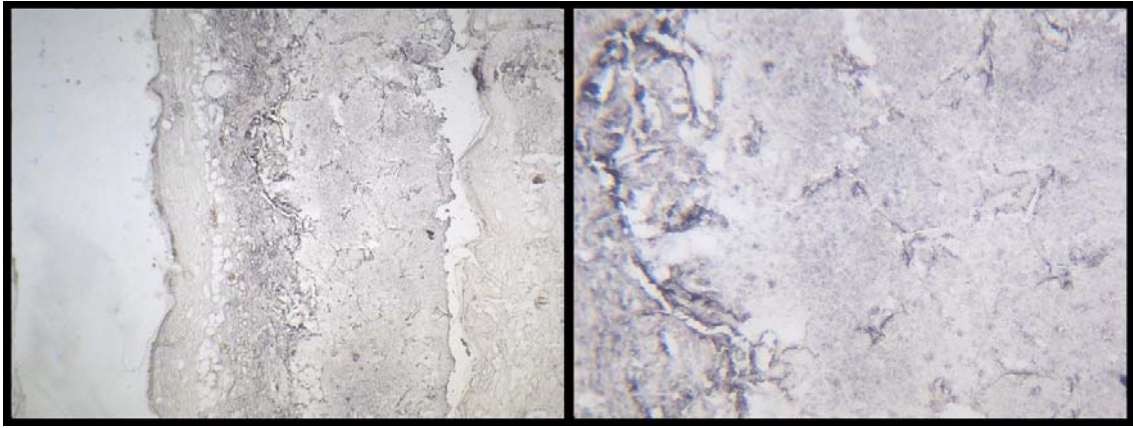


Abb. 4-79 Lektinfärbung der vorkultivierten Stammzell-Matrixgruppe  
(Vergrößerung: Links x20, rechts x100)

Die 14 Tage vorkultivierten Zell-Matrix Konstrukte zeigten eine Konzentration der Gefäße auf die Peripherie der Matrizes ohne das die Gefäße in die knorpelähnliche Struktur eindringen (Abb. 4-79).

#### 4.5.4 Gefäßfunktionabilität

Die Vitalität der neu gebildeten, die Matrices durchdringenden Gefäße wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten ermittelt.

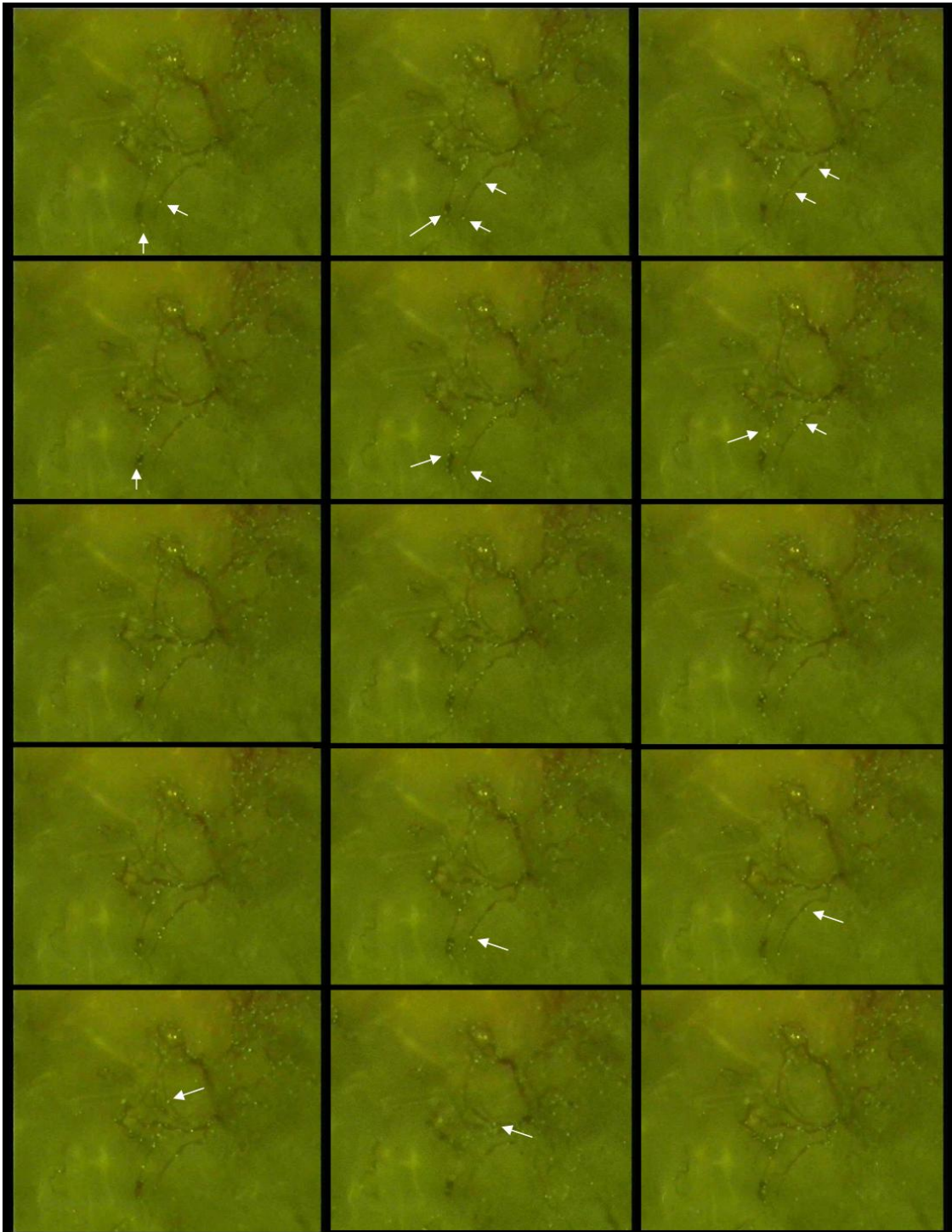


Abb. 4-80 Intravitalmikroskopische Aufnahmen des Flusses fluoreszenzgefärbter Erythrozyten in neugebildeten Gefäßen (Vitalitätsbestimmung)

Alle Gefäße wiesen einen raschen Durchfluss an fluoreszenzmarkierten Erythrozyten auf (weiße Pfeile zeigen den Fluss einzelner Erythrozyten auf) und bewiesen damit ihre

Funktionabilität (Abb. 4-80).

#### 4.5.5 TGF- $\beta$ 1, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 – Expression in vitro in den Zellkulturmedienüberstand im Zellartvergleich

Zur Bestimmung möglicher Einflussfaktoren für die angiogektischen Reaktionen der unterschiedlich differenzierten MSC und Meniskuszellen in Tissue Engineering Matrices wurden mit der jeweiligen Zellart beimpfte Matrices in vitro in Differenzierungsmedium über einen Zeitraum von 21 Tage kultiviert und das 24 Stunden Zellkulturmedium der Kulturstage 1-2, 7-8, 14-15, 21-22 gesammelt und zur späteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Konzentration der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren wurde mit Hilfe von spezifischen ELISAs quantifiziert.

##### TGF- $\beta$ 1

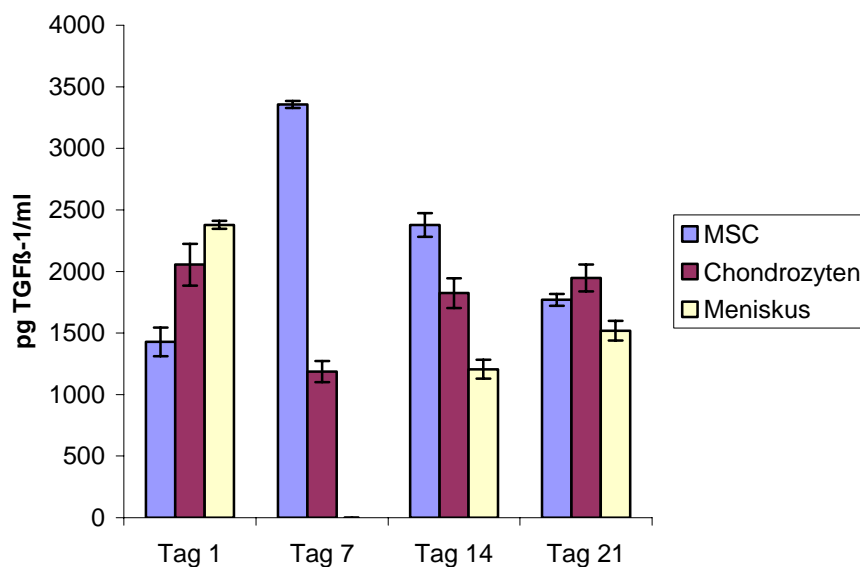


Abb. 4-81 TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Zellkulturüberstand

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) zeigten innerhalb der ersten 7 Kulturstage einen Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Sekretion um 135% auf 3355 pg/ml TGF- $\beta$ 1. Bis zum 21 Tag der Kultur ging die TGF- $\beta$ 1 Ausschüttung mit 1769 pg/ml wieder fast auf den Ausgangswert von 1428 pg/ml zurück (Abb. 4-81).

Die TGF- $\beta$ 1 Expression der Chondrozyten fiel innerhalb der 1 Woche um 42% auf 1187 pg/ml ab und erreichte bereits am Tag 14 wieder den gegenüber den MSC um etwa 600 pg/ml höheren Ausgangswert von ca. 2000 pg/ml (Abb. 4-81).

Der mit 2378 pg/ml höchste Ausgangswert an TGF- $\beta$ 1 konnte in der Meniskuszellgruppe nachgewiesen werden. Bis zum Tag 14 fiel dieser Wert um 49 % auf 1205 pg/ml ab. In der Woche bis zum Tag 21 stieg die TGF- $\beta$ 1 Expression wieder um 13 % an, erreichte aber mit 1519 pg/ml nicht mehr den Tag 1 Wert (Abb. 4-81).

### VEGF

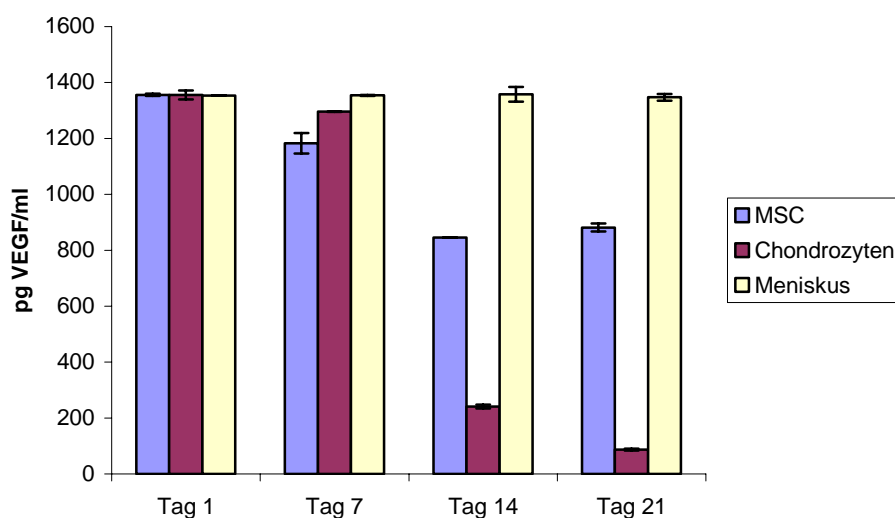


Abb. 4-82 VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand

Für alle drei untersuchten Zellarten konnte am Tag 1 mit ca. 1356 pg/ml die gleiche Ausgangskonzentration gemessen werden.

Die MSC und die Chondrozyten zeigten in der Woche von Tag 7 auf Tag 14 einen deutlichen Abfall der VEGF Sekretion auf -38% bzw. -82% des Ausgangswertes (Abb. 4-82).

Von Tag 14 bis Tag 21 blieb die VEGF Ausschüttung in der MSC Gruppe konstant bei 850 pg/ml. Die Chondrozyten zeigten einen weiteren Abfall der VEGF Konzentration im Zellkulturmedienüberstand um 11 % gegenüber Tag 1 auf 87 pg/ml (Abb. 4-82).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen blieb die ausgeschüttete VEGF Konzentration im Medienüberstand der Meniskuszellen bei konstanten 1355 pg/ml (Abb. 4-82).

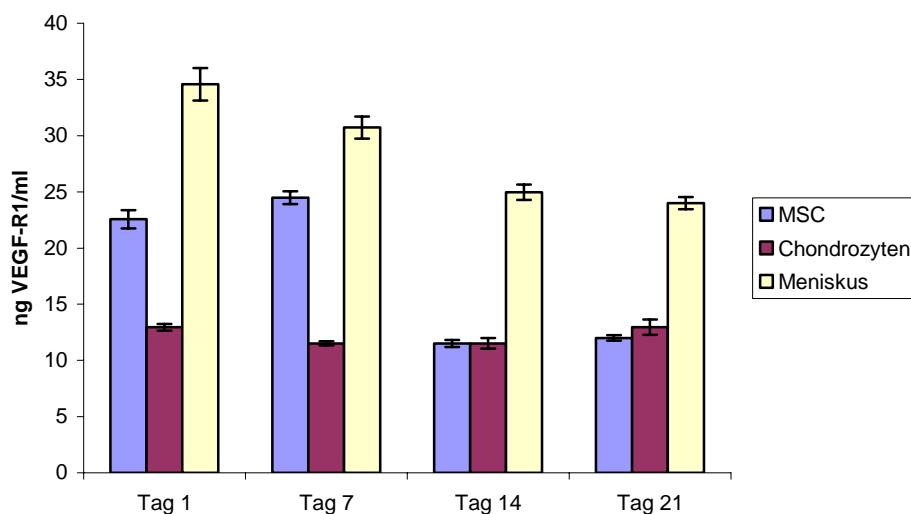
VEGF-R1

Abb. 4-83 VEGF-R1 Konzentration im Zellkulturüberstand

Die VEGF-R1 Freisetzung der MSC zeigte einen Konzentrationsabfall von Tag 7 (24,48 ng/ml) auf Tag 14 (11,52 ng/ml) um 49%. Es konnte danach keine deutliche Änderung der freigesetzten VEGF-R1 Menge bis Tag 21 festgestellt werden (Abb. 4-83).

Die mit Chondrozyten beimpften Matrices zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikante Veränderung der VEGF-R1 Sekretion in den Zellkulturmedienüberstand ( $p > 0,45$ ) (Abb. 4-83).

In der Meniskuszellgruppe fand man einen fast linearen Abfall der VEGF-R1 Freisetzung über alle 4 Untersuchungszeitpunkte mit einer Anfangskonzentration von 34,56 ng/ml bis zu einem VEGF-R1 Gehalt von 24 ng/ml am Tag 21 (Abb. 4-83).

VEGF-R2

In allen drei Zellarten konnte mit Hilfe des ELISAs keine VEGF-R2 Expression detektiert werden.

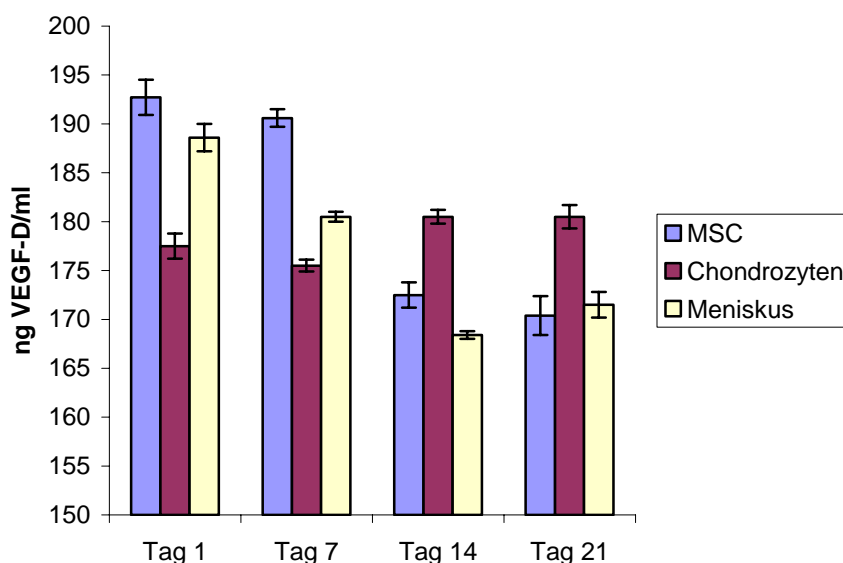
VEGF-D

Abb. 4-84 VEGF-D Konzentration im Zellkulturüberstand

Die MSC zeigten einen 11% Abfall an VEGF-D Sekretion von Tag 7 (191 ng/ml) auf Tag 14 (173 ng/ml) mit einer Ausgangskonzentration von 193 ng/ml. Von Tag 14 bis Versuchende lies sich keine Veränderung der VEGF-D Konzentration nachweisen (Abb. 4-84).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen lies sich in der Chondrozytengruppe nur am Tag 7 (175ng/ml) auf Tag 14 (180ng/ml) eine leichte Erhöhung der VEGF-D Konzentration zeigen, die bis Tag 21 konstant blieb (Abb. 4-84).

In der Gruppe der Meniskuszellen zeigte sich von Tag 1 (189ng/ml) bis Tag 14 (168ng/ml) ein annähernd linearer Abfall der VEGF-D Konzentration um 12,5%. Von Tag 14 auf Tag 21 konnte keine nennenswerte Konzentrationsänderung nachgewiesen werden (Abb. 4-84).

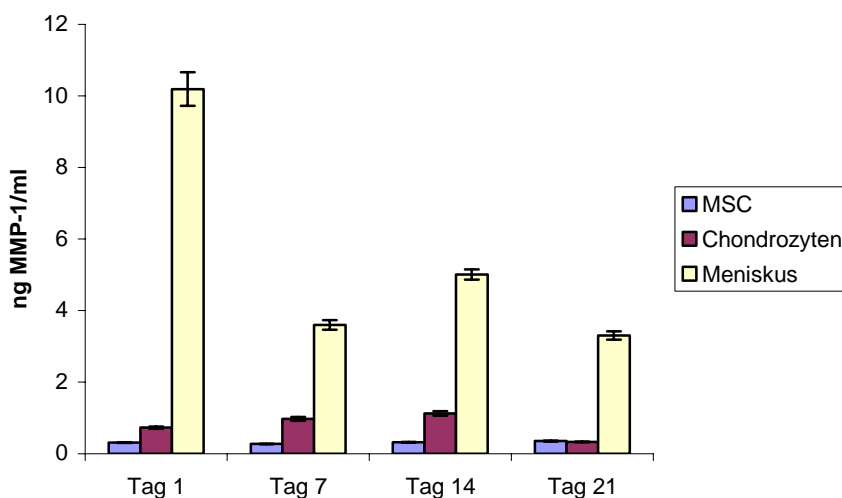
MMP-1

Abb. 4-85 MMP-1 Konzentration im Zellkulturüberstand

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen zeigten die Meniskuszellen als einzige Zellart eine Freisetzung an MMP-1. Hierbei konnte ein starker Abfall der MMP-1 Konzentration von Tag 1 (10,2 ng/ml) auf Tag 7 (3,6 ng/ml) um -65% gefunden werden. Nach einer leichten Steigerung der freigesetzten MMP-1 Menge an Tag 14 (5ng/ml) ging die gemessene MMP-1 Konzentration am Tag 21 wieder auf den Tag 7 Wert zurück (Abb. 4-85).

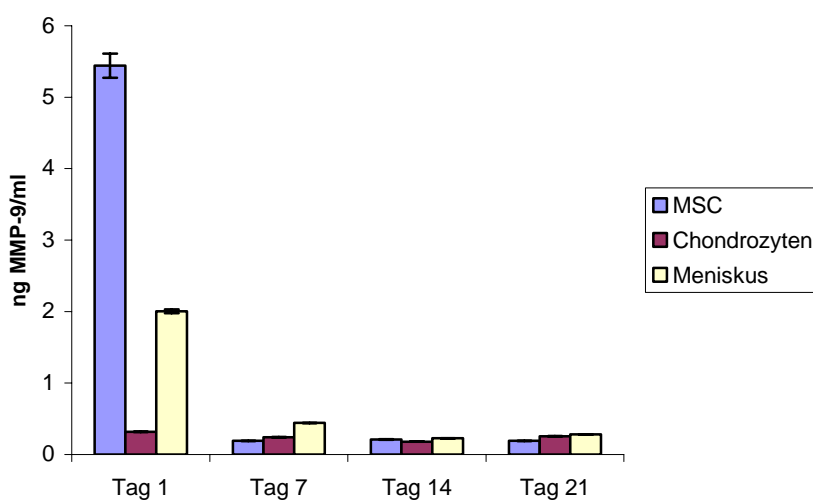
MMP-9

Abb. 4-86 MMP-9 Konzentration im Zellkulturüberstand

Am Tag 1 der Untersuchung konnte in der Gruppe der mesenchymalen Stammzellen

mit 5,44 ng/ml die höchste Freisetzung an MMP-9 festgestellt werden. Bereits nach einer Woche setzten die MSC nur noch unspezifische, nicht mehr nachweisbare Mengen an MMP-9 in das Zellkulturmedium frei (Abb. 4-86).

In der Gruppe der Chondrozyten konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum keine spezifisch nachweisbaren Mengen an MMP-9 gefunden werden (Abb. 4-86).

Die Meniskuszellen setzten zu Untersuchungsbeginn am Tag 1 2,0 ng/ml MMP-9 in den Zellkulturmedienüberstand frei. Bis zum Tag 7 fiel die nachgewiesene Konzentration an MMP-9 um 78% auf 0,44 ng/ml ab. Bereits am Tag 14 lies sich auch in der Gruppe der Meniskuszellen kein MMP-9 mehr detektieren (Abb. 4-86).

### MMP-13

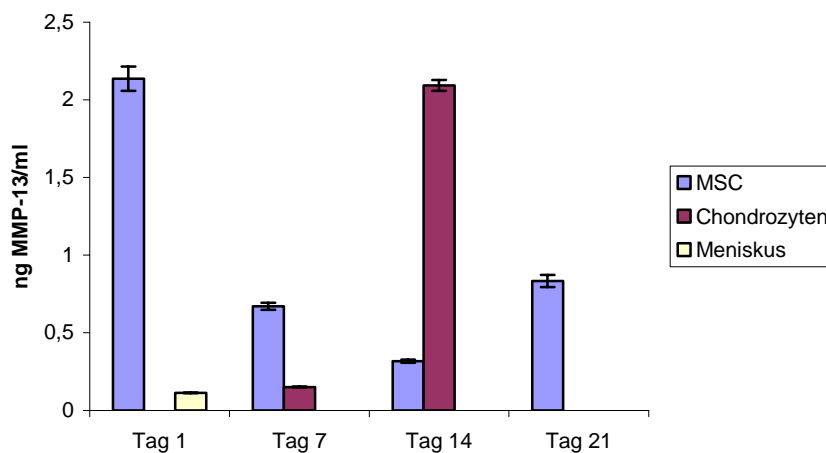


Abb. 4-87 MMP-13 Konzentration im Zellkulturüberstand

Die höchste Konzentration an freigesetzten MMP-13 konnte am Tag 1 der Untersuchung in der Gruppe der MSC gefunden werden (2,14ng/ml). Bereits nach 7 Tagen setzten sie MSC nur noch 69% weniger MMP-13 in den Zellkulturmedienüberstand frei (0,67ng/ml). Am Tag 14 wurde ein weiterer Abfall der MMP-13 Konzentration um 53% auf 0,32 ng/ml nachgewiesen werden. Bis zum Tag 21 konnte ein erneuter Anstieg des Gehalts an MMP-13 im Medium auf 0,83 ng/ml gezeigt werden (Abb. 4-87).

In der Gruppe der Chondrozyten wurde am Tag 14 mit 2,1ng/ml eine große Menge an MMP-13 freigesetzt. An den übrigen Untersuchungszeitpunkten konnte keine spezifisch messbare Menge an MMP-13 gefunden werden (Abb. 4-87).

Die Meniskuszellen haben über den gesamten Untersuchungszeitraum keine spezifisch

messbaren Mengen an MMP-13 freigesetzt (Abb. 4-87).

### TIMP-1

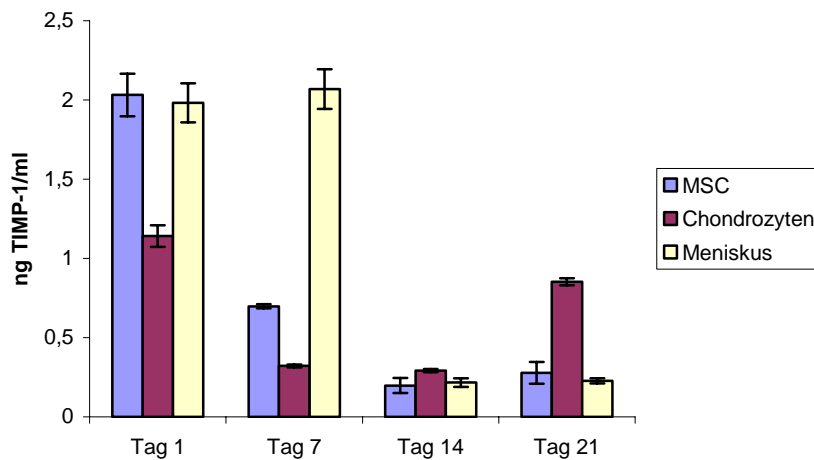


Abb. 4-88 TIMP-1 Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Freisetzung an TIMP-1 in der Gruppe der MSC war am Tag 1 der Untersuchung mit 2,03 ng/ml am höchsten. Bereits 7 Tage später konnte nur noch 66% weniger an TIMP-1 im Zellkulturüberstand gefunden werden. An den weiteren Untersuchungszeitpunkten konnten keine spezifischen Mengen an freigesetztem TIMP-1 mehr nachgewiesen werden (Abb. 4-88).

Die Gruppe der Chondrozyten setzte am Tag 1 mit 1,14 ng/ml nur halb so viel TIMP-1 frei wie die mesenchymalen Stammzellen. An den Untersuchungszeitpunkten Tag 7 und Tag 14 konnten mit 0,32 ng/ml und 0,29 ng/ml nur sehr geringe Mengen an TIMP-1 nachgewiesen werden. Zum Ende der Untersuchung am Tag 21 stieg die Menge an freigesetztem TIMP-1 wieder auf 0,85 ng/ml an (Abb. 4-88).

Nach anfänglich hohen Konzentrationen an TIMP-1 in der Meniskuszellgruppe (Tag 1: 1,98ng/ml/ Tag 7: 2,07ng/ml) konnten an den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten nur noch sehr geringe Mengen an TIMP-1 (Tag 14: 0,22ng/ml/ Tag 21: 0,23ng/ml) nachgewiesen werden (Abb. 4-88).

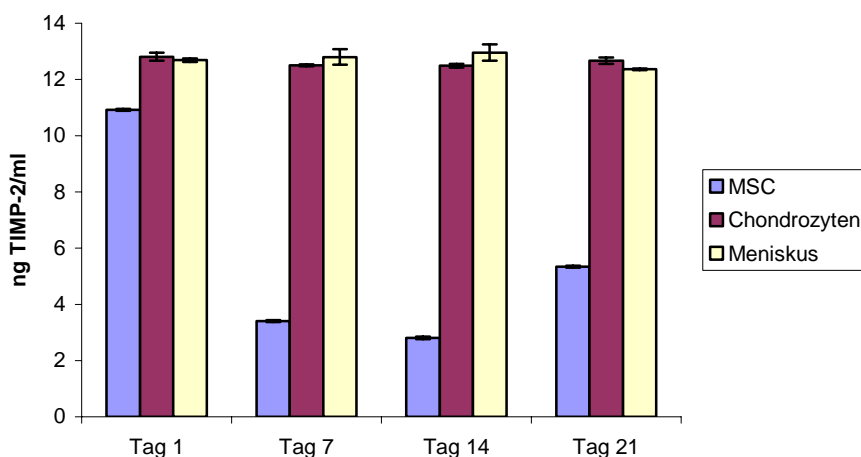
TIMP-2

Abb. 4-89 TIMP-2 Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Konzentration an freigesetzten TIMP-2 am Tag 1 in der Gruppe der mesenchymalen Stammzellen war 10,92 ng/ml. Am Tag 7 konnte nur noch um 69% weniger TIMP-2 im Zellkulturüberstand gefunden werden (3,41 ng/ml). Nach einem weiteren Abfall der Konzentration an TIMP-2 am Tag 14 (2,81 ng/ml) stieg die Menge an freigesetzten TIMP-2 am Tag 21 auf 5,34 ng/ml an (Abb. 4-89).

Sowohl in der Gruppe der Chondrozyten als auch bei den Meniskuszellen konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gleich bleibend hohe Konzentration an freigesetzten TIMP-2 im Zellkulturmedienüberstand bestimmt werden (12,66 ng/ml  $\pm$ 0,19 ng/ml) (Abb. 4-89).

Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Auswirkungen mechanobiologischer Belastung auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen (MSC)**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob und in welchem Ausmaß mechanobiologische Belastung einen Einfluss auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrizes hat. Hierfür wurden zur Applikation von direktem mechanischen, sowie zyklischem hydrostatischen Druck zwei speziell für diesen Zweck konstruierte Druckapparaturen gebaut. Zur Untersuchung von niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall auf das Chondrogeneseverhalten der MSC wurde ein kommerziell erhältliches Frakturheilungssystem (SAFHS, Exogen) verwendet. Die zweite Fragestellung dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss der Zellart und des Differenzierungsgrades der Zellen auf deren angiotaktisches Verhalten in Tissue Engineering Matrizes *in vivo*. Diese Untersuchungen wurden in Hinblick auf ein verbessertes *in vivo* Integrationsverhalten des Tissue Engineerten Reparaturgewebes durchgeführt.

Die mechanobiologischen und angiogenetischen Untersuchungen dieser Arbeit basieren auf Beobachtungen zur *in vivo* Reparatursituation osteochondralen Gewebes, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

#### **5.1.1 In vivo Situation**

Während der skelettalen Reparatur *in vivo* wird das Gewebe einer Vielzahl an mechanischen Belastungen ausgesetzt. Diese haben einen großen Einfluss auf die Qualität des Reparaturgewebes. Im Gelenkknorpel wirken *in vivo* neben Scherkräften vor allem zwei Haupttypen von Druckbelastungen, die kompressive und die hydrostatische Belastung. In der oberflächlichen Zone des Knorpels kommt es zu einer kompressiven Belastung und dadurch zu einem Ausstrom interstitieller Flüssigkeit in den Gelenkspalt. Dagegen findet in den tief gelegenen Schichten kein Fluss statt, hier wird hydrostatischer Druck aufgebaut und an den subchondralen Knochen weitergegeben (Wong and Carter 2003). Diese Belastungsformen können *in vitro* simuliert werden.

Die Fähigkeit von Knorpel hohen Belastungen standzuhalten, beruht vor allem auf seinen Hauptmatrixbestandteilen, den Proteoglykanen und den Typ II Kollagen (Heinegard and Paulsson 1987; Aydelotte et al. 1988; Sommarin et al. 1989) (siehe

Abb. 5-1 Aufbau der Extrazellulärmatrix von Knorpel). Knorpelproteoglykane schließen die großen aggregierenden Proteoglykane, die Aggrecane, Decorin, Fibromodulin und Biglykan ein. Die Kollagene im Knorpel setzen sich aus dem Hauptknorpelprotein Typ II Kollagen und einer Vielzahl von in geringerer Konzentration vorhandenen Kollagenen, wie Typ I/V/IX und Typ XI, zusammen (Eyre et al. 1987). Aggrecan und Typ II Kollagen interagieren über kovalente und ionische Bindungen sowie Wasserstoffbrücken und bauen eine stabilisierte belastungstragende Matrix auf. Die Aggrecane binden über nicht kovalente Brücken an Hyaluronat und bilden als negativ geladene Makromoleküle einen hydrierten Schutzmantel um die Chondrozyten (Hardingham and Muir 1972). Die ebenfalls negativ geladenen Proteoglykane im Knorpelgewebe ziehen hierbei auch Wassermoleküle an und bilden damit eine Matrix, die hauptsächlich aus Interstitialflüssigkeit besteht. Typ II Kollagen bildet ein fibröses Netzwerk aus quervernetzten Fibrillen, das zum Teil durch kleinere Proteoglykane und andere Kollagene stabilisiert wird. Der Schwelldruck der Proteoglykane wird durch das Kollagennetzwerk ausgeglichen und erlaubt dem Gewebe damit signifikant zu schwellen, dabei aber relativ steif zu bleiben. Die Kollagenfibrillen bilden ein strukturelles Gitter innerhalb der Matrix und definieren damit die ausgeprägten Zugbelastungseigenschaften des Knorpels.

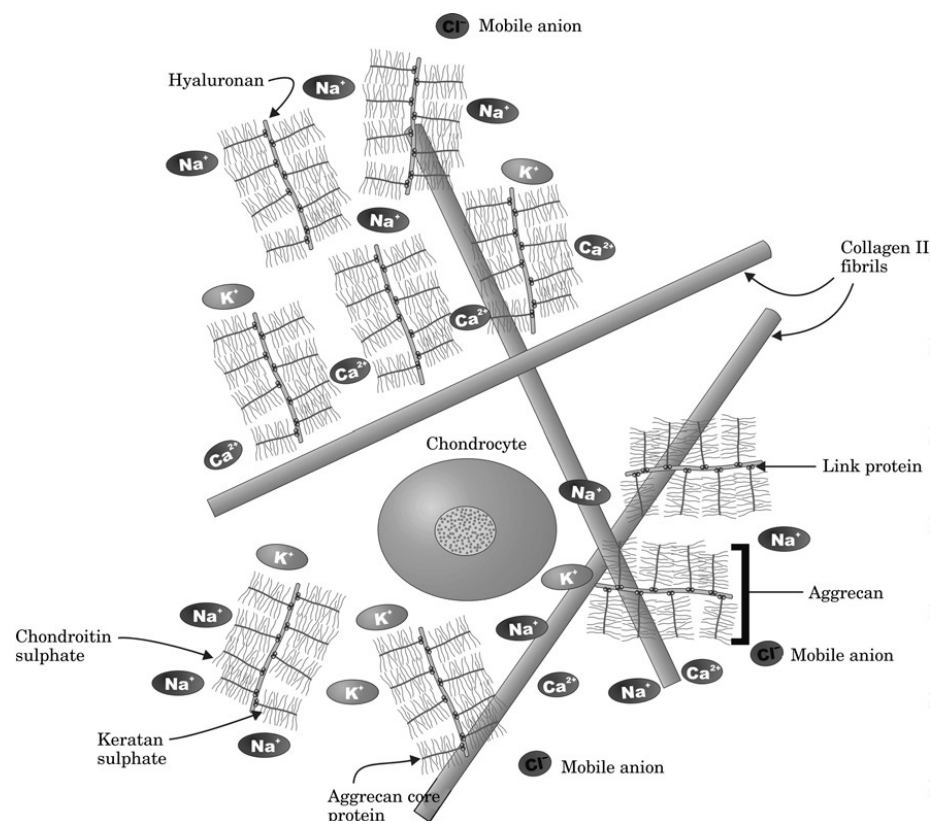


Abb. 5-1 Aufbau der Extrazellulärmatrix von Knorpel (Mobasheri et al. 2002)

Die Knorpelmatrix ist in drei verschiedene Zonen aufgeteilt: die interterritoriale-, die territoriale- und die Perizellulärzone.

Die interterritoriale Zone besteht vorwiegend aus Wasser und kleineren Elektrolyten, wie Kalium-, Natrium-, Chlorid- oder Kalzium- Ionen. In der Territorialzone findet man verstärkt Typ II Kollagen, Aggrecan, geringe Mengen anderer Kollagene, Proteoglykane, Proteine und Glykoprotein. Die für mechanische Reize sehr sensible Perizellulärzone besteht neben Typ II Kollagen vor allem aus Typ VI Kollagen und Proteoglykanen. Diese interagieren physikalisch über Rezeptoren an der Zelloberfläche (z.B. Integrine, CD44, Annexin V) mit den Chondrozyten, indem sie Matrixproteine wie Fibronectin, Hyaluronsäure und Kollagenmoleküle binden (Loeser 1993; von der Mark and Mollenhauer 1997; Quinn et al. 1998).

Einheiten von eingekapselten Chondrozyten mit ihrer sie umgebenden Perizellulärmatrix (Territorium) werden als Chondron bezeichnet (Poole et al. 1988). Die Primärfunktion des Chondrons ist biomechanischer, protektiver Natur; es dient aber auch als mechanischer Signalübermittler für Zell-Matrixinteraktionen (Poole et al. 1988; Greco et al. 1992).

Zur großen Widerstandsfähigkeit von Knorpel gegenüber Belastungen trägt auch der hohe osmotische Druck bei, der mit der „Fixed Density“ der negativen Ladungen ansteigt. Bei Druckbelastungen sinkt das Volumen, während die Ladungsdichte zunimmt. Für einen Ladungsausgleich ziehen die „Fixed Negative Charges“ Kationen ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  etc.) von außerhalb des Knorpelgewebes an, was zu einem hyperosmotischen, sauren Milieu führt (Kim et al. 1995; Guilak et al. 1999).

In zahlreichen Publikationen wurde ein förderlicher Einfluss von biomechanischer Belastung (z.B. mechanisch, hydrostatisch, osmotisch, Scherkraft, Ultraschall) auf die chondrogene Differenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten gezeigt (Sah et al. 1991; Takahashi et al. 1997; Wright et al. 1997; Carver and Heath 1999; Millward-Sadler et al. 2000; Bonassar et al. 2001; Grimshaw and Mason 2001; Lee et al. 2002). Es konnte festgestellt werden, dass mechanische Belastung einer der einflussreichsten extrazellulären Faktoren ist. Sie beeinflusst biosynthetische und katabolische Aktivitäten der Chondrozyten (Wu and Chen 2000). Isolierte Chondrozyten reagieren auf mechanische Kräfte mit einer Hochregulierung der mRNA Expression von Kollagen, Aggrecan und anderen Matrixmolekülen (Blain et al. 2001). An der in vivo Reparatur von skelettalen Defekten wie beispielsweise der Frakturheilung oder der artikulären

Knorpelregeneration sind mesenchymale Stammzellen beteiligt. Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden als mögliche Reparaturzellen für verschiedene Bindegewebsformen identifiziert. Dies beruht auf ihrer Fähigkeit, in eine Vielzahl von Zellarten der mesenchymalen Zelllinie differenzieren zu können (Johnstone et al. 1998; Angele et al. 1999; Pittenger et al. 1999; Jiang et al. 2002). Die Kultur von MSC in geeigneten Tissue Engineering Matrices und chondrogenem Medium wird in der Literatur beschrieben (Jaiswal et al. 1997; Angele et al. 1999; Sittinger et al. 1999). MSCs können aus dem durch Punktion des Beckenkamms von Patienten erhaltenen Knochenmark gewonnen werden. Im Gegensatz zu chondralen Reparaturtechniken, wie beispielsweise der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) erzeugt dieser leichte Eingriff keine zusätzlichen Defekte im Kniegelenk des Patienten.

Theoretische Modelle, die den Einfluss biomechanischer Belastung auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen während des skelettalen Wachstums und Morphogenese zeigen, wurden bereits erstellt. Verschiedene Belastungsformen resultieren dabei in verschiedenen Gewebearten (Carter et al. 1998; Tagil and Aspenberg 1999; Carter 2000). Hydrostatischer Druck fördert die Knorpelbildung (Buschmann et al. 1999), Zug- und Druckkräfte fördern dagegen abhängig von ihrer Intensität die Bildung von Knochen- oder fibrösem Gewebe (Carter et al. 1998). Einige Belastungsformen fördern die Kollagenproduktion (direkte Kompression), während andere die Proteoglykanbildung stimulieren (hydrostatischer Druck).

Während statischer Belastung stellt der eingeschränkte Massentransfer ein großes Problem dar (Bonassar et al. 2001; Elder et al. 2001). Die physikalische Kompression der Poren limitiert die Diffusion von Nährstoffen und Abbauprodukten der Zellen. Der Transport von Makromolekülen wird hierbei durch die verringerte Porengröße der ECM behindert (Jones et al. 1982). Takahashi et al. konnten für undifferenzierte mesenchymale Zellen und differenzierte Chondrozyten signifikante Unterschiede in der metabolischen Antwort auf kompressive Kräfte zeigen (Takahashi et al. 1998). Sie wiesen für embryonale mesenchymale Mäusezellen eine gesteigerte Chondrogenese in Reaktion auf statische kompressive Belastung nach. Im Gegensatz dazu zeigte eine statische Kompression von ausgewachsenem artikulären Knorpel eine reduzierte Knorpelmatrixbildung (Kim et al. 1994; Buschmann et al. 1995) bedingt durch eine Inhibierung der Proteoglykan und Proteinsynthese (Burton-Wurster et al. 1993; Guilak et al. 1994), erniedrigte Aggrecan mRNA Expression (Kim et al. 1996) und ein

Absinken des pH-Wertes der Medienumgebung aufgrund eines Anstiegs der negativen Ladungsdichte (FCD) (Kim et al. 1994).

Im Gegensatz dazu erleichtert die dynamische Belastung durch den Aufbau alternierender Druckgradienten im Scaffold den Massentransfer und hat dabei einen sekundären Mischungseffekt auf das umgebende Medium. Die Kompression des Scaffolds erzeugt einen höheren hydrostatischen Druck im Zentrum der Konstrukte als an der Oberfläche. Dies führt bei einer Veränderung der Druckintensitäten zur Änderung der Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb des Scaffolds (Darling and Athanasiou 2003).

Obwohl den Einflüssen bioaktiver Faktoren auf die Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen große Beachtung geschenkt wurde, ist noch sehr wenig über den Einfluss von mechanischer Belastung auf diese Zellen bekannt. Frühere Untersuchungen haben einen förderlichen Einfluss von zyklischem, hydrostatischen Druck auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Aggregatkultur gezeigt (Angele et al. 2003). Der Einfluss von biomechanischer Belastung auf die Expression chondrogener Marker von mesenchymalen Stammzellen während ihrer Differenzierung in Tissue Engineering Matrices ist bis heute noch unklar und wurde daher im ersten Teil dieser Studie untersucht.

### 5.1.2 Arten der ex vivo Belastung

Es lassen sich verschiedene Arten der ex vivo Belastung voneinander unterscheiden (siehe Abb. 5-2).

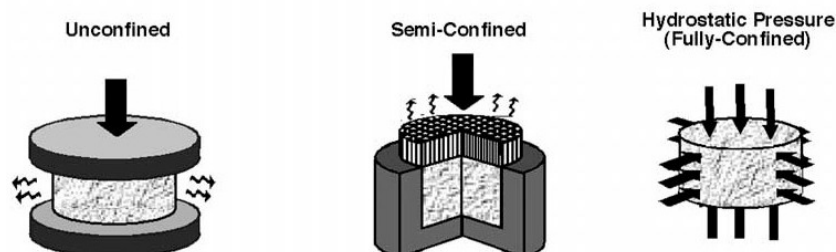


Abb. 5-2 Drei Formen der ex vivo Belastung (Wong and Carter 2003)

Bei der One-Dimensional Confined Compression, auch Semi-Confined Compression genannt, sind Seiten und Boden der Scaffold- oder Gewebehalterung undurchlässig, und die Konstrukte werden mit einer porösen Platte belastet. Dabei wird das Gewebe deformiert und eine intensive Ionendiffusion sowie ein hoher Fluid Flow axial in

Belastungsrichtung erzielt (Mow et al. 1980; Ateshian et al. 1997). In vivo Belastungsintensitäten werden hierbei eher selten erreicht. Eine andere Belastungsform ist die Unconfined Compression. Hierbei komprimieren zwei undurchlässige (Armstrong et al. 1984; Sah et al. 1989) oder permeable Platten (Mow et al. 1980; Holmes et al. 1985; Ateshian et al. 1997) das Konstrukt von oben und unten. Mit Hilfe der dritten Belastungsform, dem hydrostatischen Druck, wird das gesamte Konstrukt von allen Seiten belastet. Der Druck wird dabei über die eingeschlossene Flüssigkeit gleichmäßig übertragen und es kommt im Gegensatz zu den anderen Belastungsformen zu keiner Deformation des Gewebes.

Belastungsexperimente lassen sich auch über die Definition der Belastungsintensität beschreiben. Hierbei werden belastungsdefinierte (z.B. 1 MPa) Experimente (Mow et al. 1980), die eine im Zeitverlauf zur Aufrechterhaltung des Druckes steigende Belastung des Gewebes aufweisen, von kompressionsdefinierten (z.B. 40% der Gesamthöhe) Experimenten (Mow et al. 1980; Holmes et al. 1985) unterscheiden, bei denen es aufgrund des hohen Flüssigkeitsaustrittes zu einer stetigen Abnahme des Druckes kommt.

Darüberhinaus unterscheidet man bei dieser Art von Experimenten zwischen den sogenannten One-Step und Two-Step Prozessen. Bei One-Step Experimenten verbleiben die zu belastenden Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum in der Belastungsapparatur. Dort werden sie über ein semikontinuierliches Perfusionssystem mit Nährstoffen versorgt, sowie die Abbauprodukte entsorgt (Heath 1996; Carver and Heath 1999). Beim Two-Step Prozess werden die Proben zur Belastung in eine Belastungskammer gegeben und anschließend wieder in den Inkubator zur statischen Kultur überführt (Smith et al. 2000; Hansen et al. 2001; Angele et al. 2003).

### **5.1.3 Einfluss direkten mechanischen Druckes auf die Chondrogenese von MSC in dreidimensionalen Trägermatrizes**

Die Untersuchungen zum Einfluss direkter, zyklischer Belastung auf MSC-Matrix Konstrukte in dieser Arbeit wurden unter Verwendung einer selbst hergestellten Belastungsapparatur (siehe 2.1.1) durchgeführt. Mit Hilfe von speziell konstruierten Halterungen (siehe Abb. 2-3) wurde die maximale Kompression der Zell-Scaffold Konstrukte auf 40% der Gesamthöhe begrenzt; man spricht hier also von kompressionsdefinierter Belastung. Die Belastungsform lag dabei zwischen confined und semiconfined, da der Boden der Probenhalterungen offen, die Wände und die

Belastungsplatte dagegen undurchlässig sind (siehe Abb. 3-2). In biodegradable Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositmatrizes (siehe 2.10) injizierte mesenchymale Stammzellen wurden zur Untersuchung der Auswirkungen mechanischer Belastung während der Chondrogenese verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Hilfe der Flowzytometrie auf die relative Stammzellspezifität anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression untersucht. Zur Anwendung kamen die Zellen, welche eine stammzellspezifische positive Färbung auf CD 29, CD 44, CD 105 und CD 166 und eine negative Färbung für CD 14 sowie CD 34 gezeigt haben. Während der ersten sieben Tage der Kultur konnte keine extrazelluläre Ablagerung einer knorpelähnlichen Matrix im Zell-Scaffold-Konstrukt nachgewiesen werden (Angele et al. 1999). Daher wurden in der vorliegenden Studie in diesem Zeitraum mesenchymale Stammzellen und nicht chondrozytische Zellen selektiv belastet. Die größte Einflussnahme auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen ist in den ersten sieben Tagen möglich, wie Abbildung 5-3 verdeutlicht. Während dieser Zeit werden auf molekularer Ebene alle Bausteine der Extrazellulärmatrix exprimiert.

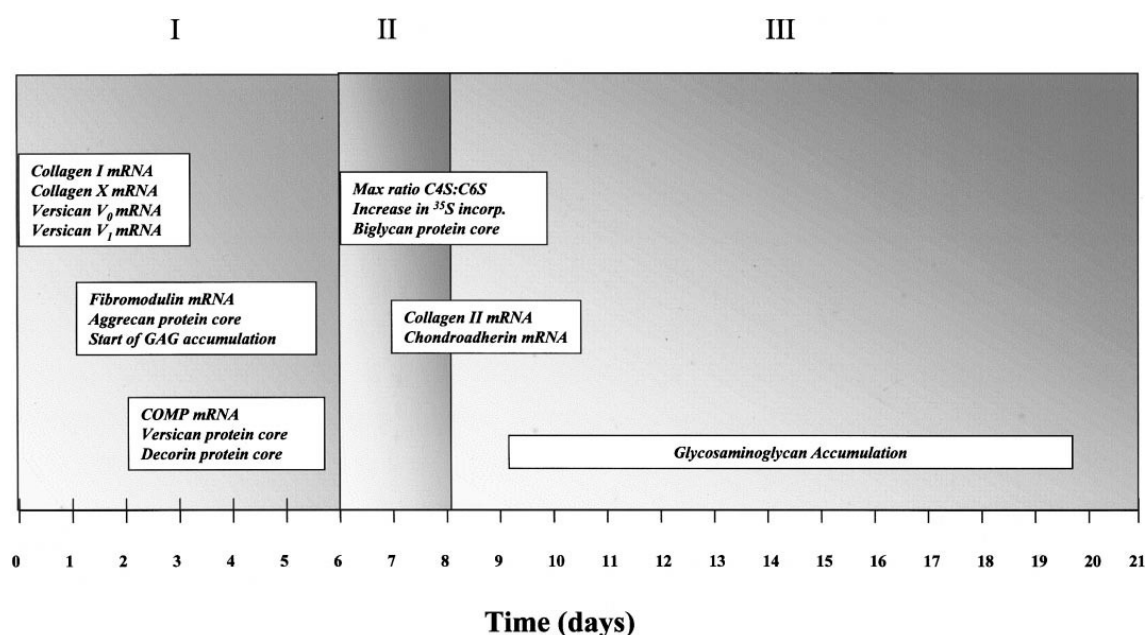


Abb. 5-3 Zeitablauf der Chondrogenese von MSC in Aggregatkultur (Barry et al. 2001)

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Tissue Engineertes Reparaturgewebe im frühen Stadium der Chondrogenese eine verbesserte Integrationsfähigkeit ins native Gewebe aufweist (Martin et al. 2000).

Der Einfluss mechanischer Kräfte auf die Stammzellen während der Zellkondensation und Chondrogenese ist bis heute noch sehr wenig untersucht worden. Dies liegt teilweise an der komplexen Verteilung der Belastungen während der beiden Situationen. Beispielsweise ist die Art der mechanischen Belastung im Gelenk *in vivo* weitaus komplexer als nur eine einfache mechanische Kompression. Gemäß Mow et al. liegt die alltägliche Druckbelastung menschlicher Gelenke zwischen 2,96 MPa und 9,86 MPa (Mow et al. 1992). Die Gelenkbelastung *in vivo* hat eine komplexe Kombination aus kompressiver, zug- und scherbedingter Deformation des Knorpels zur Folge. Nach der mechanischen Gewebedifferenzierungstheorie differenziert mesenchymales Gewebe abhängig vom Belastungsstimulus in fibröses Gewebe, in Knorpel oder in Knochen (Carter et al. 1988; Carter et al. 1998).

Belastungen von Chondrozyten und Knorpelgewebe unterhalb der physiologischen Intensität stimulieren katabolische Effekte (Bachrach et al. 1995). Demgegenüber stimulieren physiologische Drücke die Produktion von Knorpelmatrixbestandteilen (Sah et al. 1989; Larsson et al. 1991; Parkkinen et al. 1992; Kim et al. 1994). Supraphysiologische Belastungen resultieren in Gewebeverletzungen (Farquhar et al. 1996) sowie Freisetzung proinflammatorischer Botenstoffe (Honda et al. 2000) und Proteasen einschließlich Metalloproteinasen (Nguyen et al. 1989), Serinproteasen (Kempson et al. 1976) und Aggrecanasen (Sandy et al. 1992) und dadurch bedingtem Matrixabbau. Eine Hochregulierung der Aggrecan und Typ II Kollagen mRNA-Expression durch direkte mechanische Kompression (Buschmann et al. 1995; Ragan 2000) sowie durch hydrostatischen Druck (Toyoda et al. 2003) wurde für isolierte Chondrozyten und Knorpel explantate publiziert.

Während der dynamischen Kompression stellt der Konvektionstransport einen metabolischen Stimulus dar. Vor allem im Frühstadium der Kultur, zu dem die Tissue Engineering Konstrukte noch eine hohe Porösität aufweisen, spielt dieser eine bedeutende Rolle. Er kann einerseits direkt die Chondrozyten stimulieren (Smith et al. 1995) oder durch Veränderung der perizellulären Konzentrationen von makromolekularen Zytokinen, Wachstumsfaktoren, degradativen Enzymen, endogenen Enzyminhibitoren, neu synthetisierten Matrixmakromolekülen oder anderen Nährstoffen Einfluss auf die Knorpelbildung nehmen.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten hochporösen Tissue Engineering Scaffolds können zu Beginn der Kultur keinen physiologischen Belastungen standhalten. Aus

diesem Grund wurde eine mit 8kPa nur sehr geringe Belastung verwendet. Unsere Ergebnisse (siehe 4.2) zeigen, dass auch niedrige mechanische Belastung positive Auswirkungen auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in Tissue Engineering Matrices haben kann. Die Proben wurden einer zyklischen, mechanischen Belastung über vier Stunden pro Tag mit einer Frequenz von 0,33 Hz ausgesetzt, da bei dieser Geschwindigkeit bereits eine Stimulation der Extrazellulärmatrixsynthese von artikulären Chondrozyten nachgewiesen werden konnte (Smith et al. 1996; Salter et al. 2002).

Elder et al. konnten unter Anwendung zyklischer, mechanischer Kompression (0,33Hz und 9 kPa) während der Agarosegel Kultur eine gesteigerte chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Hühnerzellen nachweisen. (Elder et al. 2000; Elder et al. 2001).

In der vorliegenden mit humanen mesenchymalen Stammzellen durchgeführten Studie konnten unter ähnlichen Versuchsbedingungen (0,33Hz, 8 kPa) keine signifikanten Unterschiede im DNA-Gehalt der belasteten Proben und unbelasteten Kontrollen gefunden werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Es wird postuliert, dass mechanisch belastete Zellen ihre anabolischen Prozesse von der Proliferation auf die Produktion und Erhaltung der Extrazellulärmatrix verschieben (Palmoski and Brandt 1984; van Kampen et al. 1985).

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte diese Aussage mit Hilfe von hydrostatischen Belastungsexperimenten im physiologischen Druckbereich (5,03 MPa) für mesenchymale Stammzellen in Aggregatkultur bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine signifikant gesteigerte Proteoglykan –und Kollagenkonzentration ohne das es dabei zu einer Veränderung des DNA Gehaltes kam (Angele et al. 2003).

Die direkte, zyklische mechanische Kompression mesenchymaler Stammzellen in Trägermatrices ergab in den vorliegenden Untersuchungen ähnliche Ergebnisse. Die über sieben Tage je vier Stunden täglich applizierte mechanische Kompression steigerte signifikant die mRNA Expression chondrogener Marker (siehe 4.2.2) sowie die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile (siehe 4.2.1). Für den Kollagengehalt ließ sich bereits nach sieben Tagen in der belasteten Gruppe eine signifikante Steigerung gegenüber der unbelasteten Gruppe mit einem Maximum am 14. Tag der Kultur zeigen. Die Proteoglykankonzentration wies dagegen erst an den Tagen 14 und maximal an Tag 21 eine Steigerung in der belasteten Gruppe auf. Der Anstieg der Typ II Kollagen und

Aggrecan mRNA Expression wurde in der belasteten Gruppe nach 14 Tagen und 21 Tagen in Kultur gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem bereits von Barry et al 2001 gezeigten zeitlichen Ablauf der Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen überein (siehe Abb. 5-3). Sie gleichen außerdem dem bereits publizierten Einfluss zyklischer Belastung auf artikuläre Knorpelimplantate und isolierte Chondrozyten. Für diese wurde eine ebenfalls gesteigerte Proteoglykansynthese und Matrixproduktion gezeigt (Burton-Wurster et al. 1993; Torzilli et al. 1997; Darling and Athanasiou 2003). Der Einfluss mechanischer Belastung auf ausgewachsene Chondrozyten ist stark von der Intensität abhängig. Carver und Heath stellten eine gesteigerte Kollagenproduktion in equinen Chondrozyten fest, die dynamischer Belastung (6,90 MPa) ausgesetzt wurden. Signifikante Unterschiede im Glykosaminoglykgehalt gab es keine (Carver and Heath 1999). Bei niedrigeren Belastungsintensitäten (3,45 MPa) veränderte sich die Kollagenkonzentration nicht. Dafür wurde ein leichter Anstieg der Glykosaminoglykankonzentration nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte die vorliegende Studie zeigen, dass niedrige kompressive Belastung von 40% der Matrixgesamthöhe und 8 KPa eine signifikante Steigerung der chondrogenen Differenzierung menschlicher mesenchymaler Stammzellen zur Folge hat. Dies konnte anhand der erhöhten Typ II Kollagen und Aggrecan Expression sowie der Produktion knorpelspezifischer Proteine nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Kollagenbiosynthesebestimmung konnte der Nachweis erbracht werden, dass die durch Belastung erzielte Steigerung des Kollagengehalts vor allem mit dem anabolischen Einfluss der mechanischen Belastung begründet werden kann (siehe 4.2.4). Diese ergab eine deutliche Steigerung des Prolineinbaus in der Belastungsgruppe am letzten Tag der Belastung (Tag 7), gegenüber der Kontrolle mit einem Abfall bis Tag 21. In einer genaueren täglichen Untersuchung konnte eine maximale Kollagenbiosyntheseleistung in der Frühphase der Untersuchung am Tag 3 in der Belastungsgruppe nachgewiesen werden. Damit konnte eine Abgrenzung zum initial in der Kompositmatrix vorliegenden Typ I Kollagengehalt, in Form von Gelatine, geschaffen werden.

Auch histologisch konnte eine verbesserte Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen durch direkte, zyklische Kompression, vor allem im Zentrum der Tissue Engineering Scaffolds gezeigt werden (siehe 4.2.5). Evident wurde dies anhand einer intensiveren metachromatischen Färbung der Extrazellulärsubstanz (Toluidinblau) und

Picosiriusrotfärbung auf Kollagen. Begründen lassen sich diese Ergebnisse durch einen mit Hilfe der zyklischen Kompression gesteigerten Konvektionstransport von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen in das Scaffoldzentrum.

In der Immunhistochemie zeigte sich eine deutliche Verlagerung der Typ I und II Kollagenfärbung an den Scaffoldrandbereich in der belasteten Gruppe (siehe 4.2.6). Es lässt sich daraus schließen, dass es vor allem im Bereich der direkten Belastung zu einer gesteigerten Bildung dieser Kollagentypen kommt. Die Intensität der Typ II Kollagenfärbung ließ sich hierbei durch Belastung nicht beeinflussen. Für Typ X Kollagen zeigte sich dagegen eine geringere Farbintensität in der belasteten Gruppe. Das weist auf eine Verzögerung der Chondrozytenhypertropie durch direkte mechanische Belastung hin.

Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Apoptoseverhältnisse in unserem Tissue Engineering System durch mechanische Belastung wurden mit Hilfe des Tunnel-Assays getroffen (siehe 4.2.7). Hierbei zeigte sich bereits nach einem Tag Belastung eine gesteigerte Apoptose gegenüber der unbelasteten Kontrolle. Bis zum Tag 14 der Kultur haben sich die Verhältnisse dagegen in Hinblick auf die Zahl apoptotischer Zellen im Tissue Engineering Konstrukt wieder angeglichen. Zum Versuchsende am Tag 21 zeigte sich aber erneut eine verstärkte Apoptose im gesamten Scaffold der belasteten Proben. Eine Begründung hierfür könnte die gesteigerte Extrazellulärmatrixbildung in der belasteten Gruppe und die dadurch bedingte verringerte Nährstoffzufuhr in das Tissue Engineering Konstrukt sein.

Weitere Untersuchungen in dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Frage, ob für die mechanobiologischen Wirkungen auto- beziehungsweise parakrin sezernierte Stoffe mitverantwortlich sind, welche sich im Medienüberstand nachweisen lassen.

Zyklische mechanische Belastung steigert unter Einbeziehung der IL-4 Signalgebung über Typ II IL-4 Rezeptoren die Aggrecan, MMP-2, MMP-9 und MMP-13 mRNA Expression und senkt die MMP-3 mRNA Expression isolierter Chondrozyten und Knorpelimplantaten, ohne jedoch die Expression von TIMPs zu beeinflussen. Hierbei wird eine Beteiligung des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins und der Stretch Activated-Ionenkanäle angenommen (Salter et al. 2002; Blain et al. 2003). Die arthrotische Wirkung kompressiven Druckes wurde durch Fermor et al. (Fermor et al. 2002) näher beleuchtet. Durch kompressiven Druck kommt es zu einer Induktion der NO-Synthase-2 und der

Cyclooxygenase-2, die im Knorpel die Entzündungsmediatoren NO und Prostaglandin E2 produzieren. Dieser Effekt scheint auch bei der Arthroseinduktion in der Zellkultur durch Scherkräfte eine Rolle zu spielen (Smith et al. 1995; Lee et al. 2002). Darüber hinaus wurde eine Stimulation der Expression von CTGF publiziert, einem angiogenetischen Faktor, der in hypertrophen Chondrozyten gefunden wurde (Blain et al. 2001; Fermor et al. 2002; Carter and Wong 2003).

Ähnliche Ergebnisse konnten in dieser Studie für mesenchymale Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrizes nachgewiesen werden. Die belasteten Proben sezernierten vor allem während der ersten sieben Tage gegenüber der unbelasteten Kontrolle erhöhte Mengen an MMP-1 und MMP-9 sowie TIMP-2 und VEGF in den Zellkulturmedienüberstand. Die Freisetzung von MMP-13 (Kollagenase-3), einer Protease, die für den Abbau von Typ II Kollagen aus der Matrix vor der Gefäßinvasion zuständig ist, war dagegen an den Tagen 9, 11 und 13 signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert. Anhand dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Steigerung der Matrixproduktion durch mechanische Belastung mesenchymale Stammzellen, wie an Chondrozyten vielfach nachgewiesen, mit einer Arthroseinduktion vergesellschaftet ist. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt und muss in späteren Untersuchungen analysiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit auf eine weitere Optimierungsmöglichkeit im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpelreparaturgewebe hin. Der Steuerung der MMP Freisetzung scheint hierbei eine besondere Rolle zuzukommen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden sowohl die belasteten als auch die unbelasteten Zell-Matrix Konstrukte in chondrogenem Medium kultiviert. Dieses ist serumfrei und besteht aus einem DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt, ITS+3 (enthält Insulin), Pyruvat, Ascorbinsäure, Dexamethason und TGF- $\beta$ 1. Der Einfluss mechanischer Kompression auf die Initiation chondrogener Differenzierung wurde also nicht direkt untersucht. Trotzdem weisen die Ergebnisse dieser in vitro Studie auf die große Bedeutung der mechanischen Belastung während der skelettalen Geweberegeneration hin, wie es in vivo für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Zellen bei der sekundären Frakturheilung und der artikulären Geweberegeneration bereits nachgewiesen werden konnte.

Direkte Kompression verbessert die Zufuhr von TGF- $\beta$ 1 an die mesenchymalen Stammzellen in Tissue Engineering Scaffolds über den gesteigerten Massentransfer und

beschleunigt damit die Biosyntheseantwort der Zellen auf den Wachstumsfaktor (Mauck et al. 2003). Aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts tendieren lösliche Polypeptide wie TGF- $\beta$ 1 rasch nach ihrer intra-artikulären Aufnahme dazu, wieder aus dem System entfernt zu werden. Die dynamische Kompression wird somit klinisch durch den gesteigerten Transport von endogenen TGF- $\beta$ 1 in das Gewebe und die damit verbesserte Gewebereparatur bedeutsam (Pujol et al. 1994; Ohno et al. 1995; Karjalainen et al. 2003). In einem in vitro System hat die mechanische Belastung ebenfalls eine verstärkte Zuführung von exogenen Wachstums- und Nährstoffen in das Innere der Tissue Engineering Scaffolds zur Folge. Dies kann eine mögliche Erklärung für die vor allem im Zentrum der Matrices gefundene, gesteigerte Extrazellulärmatrixbildung sein.

Nach Entlastung entsteht eine hydrostatische Spannung in der Matrix, die zu einer Wiederaufnahme der ausgepressten Flüssigkeit führt (Suh et al. 1995; Eckstein et al. 1999). Dies hat einen weiteren positiven Einfluss auf die Versorgung der zentralen Zellen im Scaffold mit Nährstoffen.

Obwohl die direkte mechanische Kompression ein wichtiger Bestandteil der im Knorpel von Gelenken gefundenen Belastung darstellt, spielen noch andere Belastungsarten wie hydrostatischer Druck oder Scherkräfte eine bedeutsame Rolle. Wie differenzierende Zellen die Belastung registrieren, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Auch ist noch sehr wenig darüber bekannt, über welche Mechanismen diese Belastungen eine Steigerung der chondrogenen Marker Expression und Extrazellulärmatrixbildung auslösen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen durch zyklische Belastung im physiologischen Bereich gesteigert werden kann. Dabei kommt es zu einer Zunahme der Matrixbiosynthese, nicht der Zellproliferation. Außerdem handelt es sich bei der Steigerung der Chondrogenese nicht um einen isolierten Effekt des mechanischen Reizes, sondern um ein Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

#### **5.1.4 Einfluss zyklischen hydrostatischen Druckes auf die Chondrogenese von MSC in dreidimensionalen Trägermatrizes**

Im Anschluss an die mechanische Kompression wurde der Einfluss von zyklischem hydrostatischen Druck auf menschliche mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark während ihrer chondrogenen Differenzierung in Tissue Engineering Matrizes untersucht.

In elastischen Materialien werden die Begriffe hydrostatische Belastung und hydrostatischer Druck synonym verwendet. In komplexeren Strukturen wie z.B. poroelastischen zwei-Phasen Modellen (Fest-Flüssig) setzt sich die hydrostatische Gesamtbelastung des Gewebes aus hydrostatischer Belastung in der Festphase und hydrostatischem Druck in der Flüssigkeitsphase zusammen (Mow et al. 1991). In sich entwickelnden weichen Geweben ist die ECM weich. In diesem Fall, wie auch in unserem Modell, besteht die hydrostatische Belastung bei physiologischen Belastungsfrequenzen nur aus dem hydrostatischen Druck der Flüssigkeitsphase.

Zahlreiche biologische Reaktionen auf hydrostatische Drücke sind bekannt (Mentre and Hui Bon Hoa 2001). Die Dauer und die Intensität der hydrostatischen Belastung haben einen großen Einfluss. Zyklischer, hydrostatischer Druck mit physiologischem Ausmaß und physiologischer Frequenz steigert die Proteoglykansynthese (Hall et al. 1991; Mizuno et al. 2002), Typ II Kollagen und Aggrecan mRNA Expression (Smith et al. 1996; Smith et al. 2000; Mizuno et al. 2002; Ikenoue et al. 2003; Lee et al. 2003) sowie die Proteinproduktion (Smith et al. 1996; Vu and Werb 2000; Mizuno et al. 2002) isolierter Chondrozyten und Knorpel explantate. Er senkt die freigesetzten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, MCP-1) und Matrix degradierenden Enzymen (MMP-2) (Smith et al. 1996; Takahashi et al. 1997; Millward-Sadler et al. 2000), die NOS Expression sowie die NO Freisetzung (Bult et al. 1990; Lee et al. 2003) in Chondrozyten aus osteoarthritischem Knorpelgewebe (Lee et al. 2003). Außerdem steigert hydrostatischer Druck die TGF- $\beta$  Konzentration (Hall et al. 1991; Takahashi et al. 1997), wobei zu hohe Drücke die Proteoglykansynthese inhibieren, die Expression von Heat Shock Protein-70 (Takahashi et al. 1998; Sironen et al. 2000) steigern und unphysiologische Veränderungen des Golgiapparates und des Zytoskelettes hervorrufen können (Parkkinen et al. 1993; Jortikka et al. 2000). Höhere Belastungen verursachen darüber hinaus eine Expressionssteigerung von Genen, die mit der Entstehung von

Arthrose in Zusammenhang gebracht werden (Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und die Suppression der Proteoglykanexpression (Takahashi et al. 1998). Für Chondrozyten wurde ein positives Belastungsfenster von 0,1-15 MPa und 0,05 -1Hz gefunden (Carver and Heath 1999; Smith et al. 2000; Hansen et al. 2001).

Zyklischer hydrostatischer Druck steigert die Genexpression von TGF- $\beta$ , TIMP-1, Typ X Kollagen und VEGF isolierter Chondrozyten und Knorpelimplantate und reguliert die mRNA Konzentrationen von MMP-13, Vimentin und VEGF-R1 herunter (Holmvall et al. 1995; Kaarniranta et al. 2003; Karjalainen et al. 2003). Ein chondroprotektiver, antiangiogenetischer Effekt auf das Knorpelgewebe und eine verlangsamte Chondrozytendifferenzierung konnten nachgewiesen werden. Hydrostatischer Druck arretiert somit die endochondrale Ossifikation (Carter 2000; Carter and Wong 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Kollagen durch artikuläre Chondrozyten ansteigt, wenn diese auf Kollagen (Grande et al. 1997) zusammen mit TGF- $\beta_1$  und einer hohen Zelldichte (Vunjak-Novakovic 1996) unter intermittierendem hydrostatischen Druckeinfluss (Carver and Heath 1999) in einer kombinierten gut durchmischten Wachstumsatmosphäre kultiviert werden (Carver and Heath 1999). Aufgrund des hohen Kollagenanteils (30% Gelatine) der in dieser Arbeit verwendeten Trägermatrix wurden ähnliche Bedingungen geschaffen. In Vorarbeiten konnte hierbei der positive Einfluß des Kollagens auch für mesenchymale Stammzellen nachgewiesen werden (Angele et al. 1999).

Hydrostatische Belastung schont die strukturelle Integrität des Gewebes, da die Matrix keinen Zug- oder Scherkräften ausgesetzt ist. Aus diesem Grund konnte, wie bereits beschrieben, in Vorversuchen der Einfluss hydrostatischen Druckes auf mesenchymale Stammzellen in Aggregatkultur untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass physiologische hydrostatische Belastung von mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in Aggregatform (5,03 MPa, 1Hz, 4Stunden/Tag, 7 Tage) die Bildung von Matrixmolekülen (GAG und Kollagen) erhöht, ohne eine signifikante Steigerung der Zellzahl zu erzielen (Angele et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse für mesenchymale Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrizes gefunden. Der sieben Tage für je vier Stunden täglich applizierte hydrostatische Druck steigerte signifikant die mRNA Expression chondrogener Marker (siehe 4.3.2) und die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile bei konstant bleibender Zellzahl (siehe 4.3.1). Für den

Proteoglykangehalt ließ sich bereits nach sieben Tagen in der belasteten Gruppe eine signifikante Steigerung gegenüber der unbelasteten zeigen, mit einem Maximum an Tag 14 der Kultur. Die Kollagenkonzentration zeigte dagegen erst an den Tagen 14 und maximal an Tag 21 eine Steigerung in der belasteten Gruppe. Der Anstieg der Typ II Kollagen und Aggrecan Expression wurde in der belasteten Gruppe bereits nach sieben Tagen und maximal am Tag 21 in Kultur gefunden. Auch Typ X Kollagen konnte durch hydrostatischen Druck signifikant am Tag 21 gegenüber der unbelasteten Kontrolle gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für den Einfluss hydrostatischer Belastung auf artikuläre Knorpelimplantate und isolierte Chondrozyten publiziert (Takahashi et al. 1997; Kaarniranta et al. 2003; Karjalainen et al. 2003).

Auch histologisch konnte eine verbesserte Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen durch zyklische hydrostatische Belastung gezeigt werden. Ersichtlich ist dies anhand einer leicht intensiveren metachromatischen Färbung der Extrazellulärsubstanz (Toluidinblau) in der belasteten Gruppe (siehe 4.3.3).

Nach aktuellem Kenntnisstand wurden bisher keine vergleichenden Arbeiten zur zyklischen, direkten Kompression und hydrostatischen Druckbelastung mesenchymaler Stammzellen in 3D Trägermatrizes publiziert. Für die beiden Belastungsformen wurden in der Literatur durchaus verschiedene Effekte beschrieben. Die biologische Wirkung zyklischen kompressiven Druckes auf Knorpel wird kontrovers dargestellt. Teilweise wird eine Niederregulation der Matrixbiosynthese beschrieben, in einem anderen Experiment eine Hochregulation der Proteoglykansynthese bei Suppression der Proteinsynthese (Wong et al. 1999) sowie in einem weiteren eine vermehrte Expression beider Matrixbestandteile (Davisson et al. 2002). Dagegen wird durch hydrostatische Belastung im physiologischen Bereich relativ einheitlich eine Hochregulation von Proteinen und Proteoglykanen erreicht.

Dynamische mechanische Kompression und hydrostatischer Druck stellen somit aufgrund ihrer synergistischen, anabolischen Effekte auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen eine ideale Möglichkeit dar, die Qualität Tissue Engineerten Knorpelreparaturgewebes vor der Implantation in den Patienten zu optimieren.

Das in dieser Arbeit verwendete Zell-Matrix Konstrukt wurde bereits im Tierversuch am Kaninchen erfolgreich zur Reparatur von Gelenkknorpel- und Meniskusdefekten eingesetzt. Die besten histologischen Ergebnisse bezüglich der Chondrogenese und der Integration in das umgebende Knorpel- bzw. Meniskusgewebe wurde nach Vorkultur in chondrogenem Medium erzielt. Diese Arbeit zielte unter anderem darauf ab, die Bedingungen für die Vorkultur zu optimieren. Die optimalen Bedingungen sind dabei nicht durch das Generieren eines möglichst weit differenzierten Knorpelgewebes definiert. Die Integrationsfähigkeit in den Defekt ist mit entscheidend.

### **5.1.5 Einfluss von niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall auf die Chondrogenese von MSC in Zellaggregaten und dreidimensionalen Trägermatrizes**

Auf der Suche nach einer geeigneten Methode, die Integration und weitere chondrogene Differenzierung von bereits in vivo implantiertem Tissue Engineerten Knorpelreparaturgewebe zu steigern, haben wir den Einfluss eines bereits klinisch für schwer heilende Knochenfrakturen verwendeten Systems auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen untersucht. Es handelt sich dabei um niedrig-intensiven gepulsten Ultraschall (LIPUS).

Schallfrequenzen (Schallschwingungen) oberhalb von 20000 Hz nennt man Ultraschall. Im Jahr 1880 entdeckte der französische Physiker Pierre Curie den piezoelektrischen Effekt am Quarzkristall. Bei mechanischer Verformung von Kristallen mit polaren Achsen tritt elektrische Polarisierung auf (z.B. Quarz, Turmalin). Dieser Effekt zeigt sich auch im Körper (z.B. Knorpel oder Knochengewebe). Legt man an piezoelektrisches Material Wechselladung an, bewirkt dies den umgekehrten Effekt.

Ultraschall wird schon seit vielen Jahren für medizinische Zwecke in Bereichen der Chirurgie (mit einer sehr hohen Intensität zwischen 5 und 100 W/cm<sup>2</sup>) und der physikalischen Therapie von Gewebe und Muskulatur (relativ hohe Intensitäten zwischen 0,5 und 3 W/cm<sup>2</sup>) eingesetzt, wobei für beide Anwendungsformen eine beträchtliche Temperaturerhöhung im ausgesetzten Gewebe die bekannteste Nebenwirkung ist. Dagegen ist der diagnostische Ultraschall, der z.B. beim Fetalsonogramm zur Anwendung kommt, nicht-thermischer Natur und die Intensität viel kleiner (0,001 bis 0,05 W/cm<sup>2</sup>). Das niedrig-intensive gepulste Exogen-Ultraschallgerät arbeitet mit einer Intensität von nur 0,03 W/cm<sup>2</sup> und einer Frequenz

von 1,5 MHz, was dem Bereich sicherer Diagnostikverfahren entspricht. Der niedrig-intensive Ultraschall übt eine mikro-mechanische Kraft in Form von Druckwellen auf die Frakturstelle aus. Die Reaktion des Knochens auf mechanische Krafteinwirkung einschließlich einer Stimulation der vaskulären Aktivität wurde bereits untersucht (Wallace et al. 1994).

Einige tierexperimentelle (Duarte 1983; Pilla et al. 1990; Yang et al. 1996) und klinische Studien haben den stimulierenden Einfluss von niedrig-intensiven gepulsten Ultraschall bei der Frakturheilung (Kristiansen et al. 1997; Mayr 2000; Warden et al. 2000), Behandlung von Pseudoarthrosis (Pilla et al. 1990; Mayr et al. 2002) und Kallusdistraktion gezeigt. Für die Knorpelreparatur konnte ein positiver Einfluss von LIPUS in Kaninchen nachgewiesen werden (Cook et al. 2001). Es konnte vor allem in der frühen inflammatorischen Phase der Weichteilreparatur eine Heilungsverbesserung gefunden werden (ter Haar 1999). Bei experimenteller Osteoarthritis konnte ebenfalls eine verbesserte Knorpelheilung unter LIPUS gezeigt werden (Huang et al. 1997; Huang et al. 1999). Ultraschall-Behandlungen erzielten ihre größte Wirkung auf chondrozytische Zellen während der endochondralen Ossifikation (Yang et al. 1996; Parvizi et al. 2002; Zhang et al. 2003). LIPUS steigert die Aggrecan und Typ II Kollagen mRNA Expression (Wu 1996; Yang et al. 1996; Parvizi et al. 2002) und Produktion von Knorpelmatrixbestandteilen (Reher 1997; Parvizi et al. 2002) wahrscheinlich über eine gesteigerte Kalziumaufnahme (Ryaby 1989; Nolte et al. 2001) und senkt die Typ X Kollagen Expression in artikulären Chondrozyten ab (Zhang et al. 2003). LIPUS induziert keine hypertrophe Differenzierung in Chondrozyten in hyalinem Knorpel, verändert nicht deren hyalinen Knorpelphänotyp und induziert keine terminale Differenzierung (Zhang et al. 2002). In hypertrophen Chondrozyten dagegen steigert LIPUS die Typ X Kollagen mRNA Expression und stimuliert die Kalzifizierung in vivo und damit die endochondrale Ossifikation über einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Parvizi et al. 1999; Nolte et al. 2001; Mayr et al. 2002). Für isolierte Mesenchymzellen und differenzierten Knorpel und Knochenzellen konnte eine gesteigerte Kalziumabsorption in vitro nachgewiesen werden (Ryaby 1992). In einer neueren Studie zeigten Zhang et al. einen intensitätsabhängigen Einfluss von LIPUS auf die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten aus hyalinem Hühnerknorpel in Alginatgel (Zhang et al. 2003). Zwanzig Minuten Ultraschall Belastung bei  $2\text{mW}/\text{cm}^2$  führte zu einer gesteigerten Zellproliferation und verstärkten Extrazellulärmatrixbildung, wogegen  $30\text{mW}/\text{cm}^2$  keinen Einfluss auf die

Zellproliferation und Zelldifferenzierung im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle ergaben. Ultraschall sehr hoher Intensität ( $100\text{-}770\text{ mW/cm}^2$ ) wiederum fördert die Zellproliferation von Chondrozyten, ohne jedoch eine Steigerung der Differenzierungsfähigkeit herbeizuführen. LIPUS steigert die TGF  $\beta$  Freisetzung von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen und senkt diese für IL-6 und TNF- $\alpha$  (Li et al. 2003).

Therapeutischer Ultraschall ( $0,4\text{ W/cm}^2$ , 1MHz) stimuliert die Produktion angiogenetischer Faktoren wie IL-8, bFGF und VEGF und hat somit einen proangiogenetischen Einfluss (Young and Dyson 1990; Reher et al. 1999). Darüber hinaus steigert Ultraschall den Blutfluss zum verletzten Gewebe und stimuliert damit die Angiogenese (Kristiansen et al. 1997; Rawool 1998).

Als molekulare Mechanismen der Ultraschallbehandlung wurden die folgenden Abläufe beschrieben: Die Kompression von Mikrotubuli stimuliert die oszillatorische Bewegung von Mikrobläschen und führt so zu akustischen Strömungen, die einen direkten Effekt auf die Zellmembran haben können und damit die second messenger Aktivität steigern (Yang et al. 1996). Solche Veränderungen des Ionen- und Proteintransports können die intrazellulären Signale für Genexpression modifizieren (Mortimer and Dyson 1988; Ryaby 1989). Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der Kationenkanäle von Stretch Rezeptoren (Sachs 1991) und eine Beeinflussung des Zellmetabolismus und der Genexpression über Veränderungen der Anbindung des Zytoskeletts an die Extrazellulärmatrix gezeigt (Yang et al. 1996).

Für aus dem Knochenmark gewonnene Stromazellen konnte eine durch LIPUS gesteigerte Expression von c-fos und IGF-I gezeigt werden (Naruse et al. 2000). Sakurakichi et al wiesen erst kürzlich eine Stimulation von mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung in Chondrozyten in zweidimensionaler Kultur durch niedrig-intensiven gepulsten Ultraschall nach (Sakurakichi et al. 2004).

Der Zweck der Untersuchung in dieser Arbeit war die Bestimmung des Einflusses von niedrig-intensivem gepulsten Ultraschall auf menschliche mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark während ihrer chondrogenen Differenzierung in Zellaggregaten und Tissue Engineering Matrices. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Belastungsdauer untersucht.

Die Zellen wurden durch LIPUS zwei unterschiedlichen Formen der Belastung ausgesetzt. Einerseits dem mit 1,5 MHz hochfrequenten Ultraschall und andererseits einem 1 kHz Pulssignal (an/aus). Hierbei wirkt das 1,5MHz Signal rein hydrostatisch, da die Zellen mit einer Größe von 20  $\mu\text{m}$  das Signal mit einer Wellenlänge von 1,5 mm nicht registrieren. Das 1kHz Signal verursacht darüber hinaus aber zusätzlich eine Vibration im flüssigen Medium der Belastungskammern und überträgt somit die Belastung auf die Zellen (Parvizi et al. 2002).

Wie bereits in der Literatur für Chondrozyten gezeigt wurde, konnte für mesenchymale Stammzellen eine ähnliche Beeinflussung der Chondrogenese festgestellt werden. Der sieben Tage, täglich applizierte niedrig-intensive Ultraschall steigerte signifikant die mRNA Expression chondrogener Marker und die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile. Diese Steigerung war aber sehr von der Belastungsdauer und Kulturart (Zellaggregat oder Zell-Matrix Konstrukt) abhängig. Die 4 Minuten und auch die 20 Minuten täglich belasteten Zell-Matrix Konstrukte zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede im DNA-, GAG- und Kollagengehalt gegenüber der unbelasteten Kontrolle ( $p > 0,45$ ) (siehe 4.4.1 und 4.4.2). Für die 40 Minuten belasteten Zell-Matrix Konstrukte ließ sich dagegen bei gleich bleibender Zellzahl bereits nach der siebentägigen Belastungsphase eine signifikante Steigerung in der Proteoglykankonzentration gegenüber der unbelasteten Gruppe nachweisen ( $p < 0,001$ ), die sich im Zeitverlauf der Kultur wieder mit der Kontrolle egalisierte (siehe 4.4.3). Der Kollagengehalt zeigte dagegen erst am Tag 14 eine mit +90% deutliche Steigerung in der belasteten Gruppe gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) (siehe 4.4.3). Bei der molekularen Analyse konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 Minuten belasteten Zell-Matrix-Konstrukte und der unbelasteten Kontrolle gefunden werden (siehe 4.4.4.1). Die 20 Minuten beschallten Zell-Matrix Konstrukte zeigten dagegen bereits nach sieben Tagen einen signifikanten Anstieg vor allem der Typ I Kollagen und Aggrecan Expression gegenüber der Kontrolle. Nach einem Abfall der Aggrecan, Typ I und Typ II Kollagen Expression am Tag 14 konnten wir am Tag 21 eine signifikante Steigerung der Typ II Kollagen mRNA Expression in der zwanzig Minuten belasteten Gruppe gegenüber der Kontrolle nachweisen (+47%,  $p < 0,001$ ) (siehe 4.4.4.2). Einen negativen Einfluss auf die Expression von Aggrecan und Typ II Kollagen zeigte dagegen die 40minütige Belastung der mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Tissue Engineering Scaffolds am Tag 21. Demgegenüber wurde die Expression von Typ I Kollagen sowohl am Tag 14

(+67%,  $p < 0,001$ ) als auch am Tag 21 (37%,  $p < 0,001$ ) signifikant gegenüber der unbelasteten Kontrolle gesteigert (siehe 4.4.4.3).

Die Expression des für die endochondrale Ossifikation bedeutenden Wachstumsfaktors VEGF zeigte bei 40 minütiger Belastung einen signifikanten Abfall von Tag 0 auf Tag 7 ( $p < 0,001$ ) mit einem Minimum am Tag 14 und einem erneuten Anstieg von Tag 14 auf Tag 21.

Für die 20 Minuten und 40 Minuten beschallten mesenchymalen Stammzellen in Zellaggregatkultur konnten dagegen andere Einflüsse auf deren Chondrogeneseleistung nachgewiesen werden. Bei gleich bleibender Zellzahl zeigte sich für den Proteoglykangehalt in der 20 Minuten Gruppe ein leicht anabolischer Einfluss der Belastung am Tag 14. Dagegen konnte nur in der 40 Minuten beschallten Gruppe eine Steigerung der Proteoglykankonzentration am Tag 21 nachgewiesen werden (siehe 4.4.5.2). Der Kollagengehalt beider Gruppen zeigte nach sieben Tagen eine Steigerung durch die Ultraschallbelastung. Nur in der 40 Minuten belasteten Gruppe konnte dagegen auch am Tag 21 eine Steigerung der Kollagenkonzentration gegenüber der unbelasteten Kontrolle festgestellt werden (siehe 4.4.5.3).

Die 20 Minuten belasteten Proben zeigten bei der molekularbiologischen Analyse einen über den gesamten Untersuchungszeitraum negativen Einfluss der Belastung auf die mRNA Expression von Aggrecan, Typ I, II und X Kollagen. Für die 40 Minuten belasteten Zellaggregate ließ sich dagegen am Tag 21 eine vor allem für Typ II Kollagen signifikant gesteigerte mRNA Expression nachweisen (68%,  $p < 0,001$ ) (siehe 4.4.5.4).

Histologisch konnte eine verbesserte Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen durch niedrig-intensiven gepulsten Ultraschall, vor allem im Zentrum der Tissue Engineering Scaffolds nach 40minütiger Belastung gezeigt werden. Dies war ersichtlich anhand einer leicht verstärkten metachromatischen Färbung der Extrazellulärsubstanz (Toluidinblau) und Picrosiriusrotfärbung auf Kollagen (siehe 4.4.6).

In der Immunhistochemie zeigte sich am Tag 21 eine intensivere Typ I Kollagenfärbung in der belasteten Gruppe. Die Intensität der Typ II und Typ X Kollagenfärbung konnte hierbei durch Belastung nur leicht gesteigert werden (siehe 4.4.7).

Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Apoptoseverhältnisse in unserem Tissue Engineering System durch Ultraschallbelastung wurden mit Hilfe des Tunel-Assays

getroffen. Es ließ sich hierbei über den gesamten Untersuchungszeitraum im Gegensatz zur direkten, mechanischen Belastung keine Apoptose feststellen (Daten nicht gezeigt).

Niedrig-intensiv gepulster Ultraschall hat somit eine anabolische Wirkung auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* gezeigt. Dieser positive Einfluss ist hierbei aber stark von der Belastungsdauer und den Zellkulturbedingungen abhängig. Erst bei Verdoppelung der für die klinische Frakturheilung verwendeten Behandlungsdauer von 20 Minuten auf 40 Minuten zeigten die MSC in der Zellaggregatkultur eine Steigerung der mRNA Expression chondrogener Marker und der Produktion wichtiger Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Kollagen und Proteoglykan. Die MSC-Matrix Konstrukte zeigten dagegen nur bei 20 minütiger Belastung eine Steigerung der mRNA Expression chondrogener Marker, wobei die Produktion von Kollagen und Proteoglykan ihr Maximum in der 40 Minuten belasteten Gruppe hatte. Einen entscheidenden Einfluss haben hierbei wahrscheinlich die in den beiden Kulturformen unterschiedlich stark ausgeprägten Zell-Zell sowie Zell-Matrixkontakte. Diese können die über Integrine vermittelten Transduktionsprozesse auf mechanische Signale erheblich beeinflussen.

LIPUS kann somit zur Optimierung von Tissue Engineertem Reparaturgewebe *in vitro* eingesetzt werden. Ein unterstützender Einsatz zur Verbesserung der Integrationsfähigkeit und der Defektreparatur mit Tissue Engineertem Reparaturgewebe *in vivo* wird angenommen und muss in späteren Untersuchungen nachgewiesen werden.

### 5.1.6 Einfluss der Zellart und ihres Differenzierungsgrades auf das angiotaktische Verhalten in Tissue Engineering Matrices

Die körpereigene Reparaturfähigkeit osteochondraler Defekte und Menisken wird geprägt durch deren Gefäßanatomie. Die peripheren Anteile (20-30%) der Menisken sind über radiär angeordnete Kapillaräste an die Gefäßversorgung angeschlossen, während die avaskulären, zentralen Anteile über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit ihre Nährstoffe erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass Defekte in rein avaskulären Meniskus- oder artikulärem Knorpel kein endogenes Reparaturpotential aufweisen. Hingegen ist bei Mitverletzung vaskularisierter Zonen eine endogene Regeneration möglich (DeHaven and Arnoczky 1994; Setton et al. 1999). Hierbei wird das Defektareal jedoch mit einem qualitativ minderwertigen, gefäßreichen Narbengewebe aufgefüllt, welches morphologisch stark von Meniskus oder artikulärem Knorpel abweicht. Es wird angenommen, dass die putativen Reparaturzellen, mesenchymale Stammzellen aus dem umliegenden Synovialgewebe oder dem Gefäßsystem (Kim and Moon 1979; Draenert and Draenert 1980), nur bei Anschluss des Defektes an die Gefäßversorgung in das Defektareal gelangen können. Zur Regeneration eines Defektes mit Meniskus- oder artikulärem Knorpel- ähnlichen Gewebe müssen diese Zellen dann jedoch unter bestimmten Milieubedingungen zu Fibrochondrozyten differenzieren, um eine für Meniskus oder artikulären Knorpel typische Kollagen I- und II-haltige Matrix produzieren zu können (Klompaker et al. 1996). Dies ist durch rein endogene Reparaturmechanismen nicht erreichbar. Die Angiogenese, das heißt die Neubildung von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen (Webadresse1; Risau 1997), hat somit eine entscheidende Bedeutung für die in vivo Heilung osteochondraler oder meniskaler Defekte.

Der initiale Schritt der Angiogenese in vivo ist eine durch Stickstoffmonoxid (NO) ausgelöste Vasodilatation. NO reguliert die Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) Transkription hoch (Turpaev et al. 2001). Sauerstoffarmut (Hypoxia) induziert die VEGF Synthese durch Anbindung des Hypoxia Inducible Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) an die Hypoxia Responsezone der VEGF Genpromotorregion. Im Anschluß steigert VEGF die Gefäßpermeabilität nach Anbindung an VEGF-R2 über eine Veränderung der Zellmembranstruktur und Umverteilung der intrazellulären Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und Vascular Endothelial Cadherin. Daraufhin wird die Migration von Endothelzellen durch einen mittels VEGF stimulierten Austritt von Plasmaproteinen und einer durch Angiopoetin-2 und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) vermittelten

Degradation der Extrazellulärmatrix unterstützt. Nach Eintreffen der Endothelzellen bilden diese eine fadenartige Struktur und im Weiteren ein Lumen aus. Dies ist mit einem Ausdünnen der Endothelzellen und einer Fusion mit bereits existierenden Gefäßen verbunden. Verschiedene VEGF Isoformen, Angiopoetine und Integrine regulieren dabei den Lumendurchmesser. TGF $\beta$  stimuliert im Anschluss die Extrazellulärmatrixbildung zur Stabilisation der neu gebildeten Gefäße. VEGF alleine führt dagegen nur zur Entwicklung von nicht vollständig ausgebildeten, leckenden Gefäßen, die Ödeme und Entzündungsreaktionen auslösen können (Yancopoulos et al. 2000).

Die Reparatur osteochondraler und meniskaler Defekte ist in vivo stark von der Gefäßversorgung abhängig. Auch zur initialen Versorgung Tissue Engineertem Reparaturgewebes nach in vivo Implantation mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren werden Gefäße benötigt. Die Neovaskularisation ist hierbei von großer klinischer Relevanz. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von mesenchymalen Stammzellen sowie von Meniskuszellen auf deren angiotaktisches Verhalten in Tissue Engineering Scaffolds in Abhängigkeit von deren Differenzierungsgrad mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht.

Hierfür wurden Balb/c Nacktmäusen Titanrückenhautkammern aufgenäht, mit deren Hilfe man über einen Zeitraum von 14 Tagen das in vivo Gefäßwachstum in Zell-Matrix Konstrukte intravitalmikroskopisch untersuchen und per Videokamera dokumentieren kann (siehe 3.9). Diese Methodik bietet die Möglichkeit der direkten Beurteilung des Gefäßwachstums in Tissue Engineering Produkte. In diesem Zusammenhang wurden die Intravitalmikroskopie und die transparenten Rückenhautkammern noch nie verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das angiotaktische Verhalten von mesenchymalen Stammzellen und meniskalen Zellen in Tissue Engineering Matrices in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad untersucht. Undifferenzierte mesenchymalen Stammzellen zeigten hierbei einen starken angiotaktischen Einfluss (siehe 4.5.1). Bereits nach drei Tagen in vivo konnte man eine erhebliche Einsprossung neu gebildeter Mikrogefäße in die Zell-Matrix Konstrukte feststellen, die sich bis zum Versuchsende noch intensivierten. Dagegen zeigten in chondrogenem Differenzierungsmedium vierzehn Tage vorkultivierte Zell-Matrix Konstrukte nur im Randbereich eine vermehrte Gefäßneubildung, ohne dass die Gefäße in das Tissue Engineerte Gewebe eindrangen. Auch die zellfreien Trägermatrices zeigten am Tag 14 nur in der Peripherie eine Gefäßneubildung. Der hier

gezeigte antiangiogenetische Einfluss der Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Komposit-Matrix (siehe auch 5.1.6) bestätigt somit die bereits in der Literatur für Hyaluronsäure gefundenen Erkenntnisse (Feinberg and Beebe 1983). Diese Ergebnisse ließen sich auch histologisch mit Hilfe der gefäßspezifischen Lektinfärbung verifizieren (siehe 4.5.3).

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss der verwendeten Zellart analysiert werden. Hierfür wurden meniskale Zellen und mesenchymale Stammzellen nach dem oben beschriebenen Prinzip untersucht. Die meniskalen Zellen zeigten zu den mesenchymalen Stammzellen abweichende Ergebnisse (siehe 4.5.2). Neben einer sogar etwas früher beginnenden, im Vergleich zur MSC Gruppe ähnlich intensiven Gefäßdurchwachsung der mit nicht vorkultivierten Meniskuszellen beladenen Trägermatrizes zeigte sich auch für die 14 Tage vorkultivierten Meniskuszell-Matrix Konstrukte eine erhebliche Gefäßdurchwucherung mit einer deutlichen Steigerung der zentralen Gefäßdichte gegenüber der nicht vorkultivierten Meniskuszellgruppe. Mit MSC beladene Trägermatrizes, die zum Vergleich mit untersucht worden waren, konnten die in den ersten Versuchen gefundenen Ergebnisse bestätigen. Die Vitalität der neu gebildeten Gefäße wurde mit Hilfe von Gefäßfunktionabilitätstests (siehe 3.9.6) bestimmt und konnte für alle Versuche positiv bestätigt werden (siehe 4.5.4).

Für das Tissue Engineering von Knorpel- oder Meniskusreparaturgewebe stellt sich also die entscheidende Frage, welche Zellen verwendet werden müssen und bei welchem Differenzierungsgrad der Zell-Scaffold Konstrukte diese in vivo implantiert werden, um eine optimale initiale Gefäßversorgung zu erhalten, ohne dabei die endochondrale Ossifikation voranzutreiben.

Zur Bestimmung möglicher Einflussfaktoren für die angiotaktischen Reaktionen der unterschiedlich differenzierten MSC und Meniskuszellen in Tissue Engineering Matrizes wurden, wie in Punkt 3.8.2 beschrieben, Zellkulturmedienüberstände auf Expression an der Angiogenese beteiligter Faktoren untersucht. Als Vergleichszellart dienten Chondrozyten.

Meniskuszellen zeigten eine durchgehend hohe Freisetzung von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF und antiangiogenetischen Faktoren wie TIMP-2 über 21 Tage (siehe 4.5.5). Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Begründung für die, in dieser Arbeit gezeigte, fehlende Steuerbarkeit ihres angiotaktischen Verhaltens mittels Differenzierung.

Meniskuszellen sind aus diesem Grund vor allem zur Reparatur von Meniskusdefekten im Übergang der vaskularisierten zur avaskulären Zone geeignet.

Dagegen kann das angiotaktische Verhalten mesenchymaler Stammzellen durch Vorkultivierung in chondrogenem Medium beeinflusst werden. Die Stammzellen zeigten trotz des antiangiogenetischen Einflusses der Trägermatrix eine initial starke angiotaktische Wirkung. Die Abnahme der Gefäßeinsprossung nach ihrer Differenzierung beruht vermutlich auf der im Verlauf der Chondrogenese verringerten VEGF und MMP Freisetzung und mRNA Expression. Somit eignen sich mesenchymale Stammzellen abhängig von ihrem Differenzierungsgrad zur Reparatur avaskulärer osteochondraler und meniskaler Defekte. Sie erzielen initial die zur Versorgung des in vivo implantierten Reparaturgewebes mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren und somit einer verbesserten Integration erforderliche Gefäßversorgung. Im Verlauf der weiteren Differenzierung nimmt diese möglicherweise wieder ab und könnte damit das neu gebildete Knorpelgewebes vor der endochondralen Ossifikation, also dem Umbau des Knorpels zu Knochen, bewahren.

VEGF, MMPs und TGF- $\beta$ 1 sind mechanosensitive, an der endochondralen Ossifikation beteiligte Faktoren (Blain et al. 2001; Smith et al. 2001; Tamura et al. 2001; Mayr-Wohlfart et al. 2002; Schild and Trueb 2002). VEGF-121, VEGF-165 induzieren hierbei die Neovaskularisation durch Proliferation, Adhäsion und Migrationsförderung von Endothelzellen in vitro und in vivo (Eriksson and Alitalo 2002; Pufe et al. 2002). Der VEGF Rezeptor 1, die Fms-Like Tyrosine Kinase FLT-1 (Hattori et al. 2002; Gerber and Ferrara 2003) stimuliert die Stammzellrekrutierung, Mobilisation, Angiogenese sowie Entzündungsreaktionen (Shalaby et al. 1995), und steigert die Freisetzung von Proteinasen. Anti Flt1 unterdrückt die autoimmune Gelenkzerstörung bei Arthritis durch Hemmung der Degradation von Knorpelproteoglykanen, synovialer Entzündung und Neovaskularisation. VEGF Rezeptor 2, KDR existiert dagegen hauptsächlich auf multipotenten hämatopoetischen Stamzellen (Johansson et al. 1997; Luttun et al. 2002) und stellt damit in diesem Versuch ein weiteres Qualitätskriterium der mesenchymalen Stammzellen dar. MMP-13 ist das dominante proteolytische Enzym in hypertrophem Knorpel und wird für die Vaskularisation des kalzifizierten Knorpels benötigt (Knauper et al. 1996). MMP-13 hydrolysiert Typ II Kollagen (Fosang et al. 1996) und Aggrecan (Nagai and Aoki 2002; Wu et al. 2002) zur Vorbereitung der Invasion von Endothelzellen und mesenchymalen Zellen, aktiviert MMP-9 (Gelatinase B) und setzt

gespeicherte angiogenetische- und Wachstumsfaktoren frei. Die Inhibierung von MMP-13 unterdrückt den Abbau von Typ II/X Kollagen und die Kalziumaufnahme sowie die Gefäßinvasion in hypertrophen Knorpel und somit die endochondrale Knochenbildung (Seo et al. 2003; Suriawinata 2004). Tissue Inhibitor Metalloproteinasen (TIMPs) sind antiangiogenetische Faktoren, die unabhängig vom MMP Mechanismus die durch VEGF gesteigerte Endothelzellproliferation absenken und damit die Angiogenese inhibieren (Kim et al. 1992; Schott and Morrow 1993). TGF  $\beta$ 1 steigert die VEGF Expression von Chondrozyten (Kaigler et al. 2003) und stabilisiert die im Verlauf der Angiogenese neugebildeten Gefäße.

Der für die Angiogenese entscheidende Wachstumsfaktor ist VEGF. Kaigler et al konnten 2003 parallel zu unseren Versuchen zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark VEGF in ausreichenden Konzentrationen exprimieren, um die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen in dreidimensionalen Kollagenscaffolds zu erhöhen (Bassett and Herrmann 1961; Pawelek 1969; Lane et al. 1986). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass eine geringe Vaskularität und ein niedriger Sauerstoffpartialdruck die Chondrogenese undifferenzierter MSC stimulieren kann (Haigh et al. 2000). Die VEGF mRNA Expression nimmt dabei während der Chondrogenese ab und steigt kurz vor der angiogenetischen Invasion bei hypertrophen Chondrozyten an (Alini et al. 1996; Gerber et al. 1999). Nur hypertrophe Chondrozyten und nicht ruhende oder proliferierende Chondrozyten exprimieren VEGF (Harper and Klagsbrun 1999). Die Angiogenese ist somit unmittelbar mit der Chondrozytenhypertrophie verbunden (Moses et al. 1999; Shukunami et al. 1999). Die Aufrechterhaltung der avaskulären Umgebung in normalem adulten hyalinen Knorpel ist teilweise auf die Synthese von antiangiogenetischen Faktoren wie Cartilage Derived Inhibitor, Chondromodulin-I und Troponin I zurückzuführen, die die Neovaskularisierung durch Hemmung der Endothelzellentwicklung einschränken (Descalzi Cancedda et al. 1995). Diese Hemmung der Angiogenese verlangsamt die endochondrale Ossifikation und bewahrt somit den gesunden Knorpel. Die Avaskularität des Knorpels ist also durch die Balance von antiangiogenetischen und proangiogenetischen Faktoren bedingt (Angele et al. 1999).

### **5.1.7 Einfluss der Trägermatrix und der Zellkulturbedingungen auf das Chondrogeneseverhalten von mesenchymalen Stammzellen**

Ausgiebige Biomaterialforschung im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universität Regensburg führte zur Entwicklung einer neuen biodegradablen Trägermatrix mit guter Biokompatibilität und spezifischen biologischen Eigenschaften (Campoccia et al. 1998; Angele et al. 1999), welche auf die Knorpelreparatur abgestimmt wurde (siehe 2.10). Das porös aufgebaute Material besteht aus veresterter Hyaluronsäure und Gelatine, beides Derivate der physiologischen extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe. Durch die Derivatisierung der Grundkomponenten wird ein zu schneller Abbau der Trägermatrix durch körpereigene Enzyme verhindert und somit genügend Anfangsstabilität für die Entwicklung von Reparaturgewebe gewährleistet. Die verzögerte Hydrolysierung der Benzylderivate nach zwei bis drei Monaten erlaubt zudem eine Degradation der Matrix, wenn die Stabilitätsfunktion durch das entwickelte Reparaturgewebe übernommen wird. Die hierbei freigesetzten Degradationsprodukte sind natürlich vorkommende Substanzen der extrazellulären Matrix, welche zudem die Geweberegeneration unterstützen können. Weder die Einzelkomponenten des Biomaterials noch die Kompositmatrix zeigten in Voruntersuchungen Anzeichen von Toxizität oder lösten eine inflammatorische Gewebeantwort aus (Rooney and Kumar 1993; Wheatley et al. 1993). Weiterhin konnte für die natürlich vorkommenden Komponenten, Hyaluronsäure und Kollagen Typ I, aus deren Derivaten das entwickelte Biomaterial aufgebaut ist, eine fundamentale Rolle während der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden (Kim and Moon 1979; Arnoczky and Warren 1983; Angele et al. 1999). Hochmolekulare Hyaluronsäure zeigte eine chondroinduktive (Kujawa et al. 1986) und antiangiogenetische (Feinberg and Beebe 1983) Wirkung. Die gefäßhemmende Wirkung der Trägermatrix konnte auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Oligomere Abbauprodukte der Hyaluronsäure dagegen zeigten angiogenetische Einflüsse (Deed et al. 1997) und verbesserten die Integration von neugebildetem Gewebe in vivo (Solchaga et al. 1999; Caplan 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften der verwendeten Trägermatrix kann somit in Kombination mit den, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, initial angiotaktischen mesenchymalen Stammzellen die Integration des Reparaturgewebes in vivo noch weiter verbessert werden. In zahlreichen in vitro und in vivo Versuchen wurde gezeigt, dass die Hyaluronsäureester/Gelatine-Kompositmatrix ein geeignetes Implantat darstellt, um Zellwachstum und -differenzierung in diesem "embryonalen Milieu" zu erlauben. Das Biomaterial war

hierbei besonders geeignet, die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, welche als putative Reparaturzellen von Knorpeldefekten angesehen werden, zu stimulieren (Angele et al. 1999; Solchaga et al. 2000).

Einen weiteren förderlichen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der MSC haben in dieser Arbeit die Zellkulturbedingungen gezeigt. Die Ausprägung von chondrozytenartigen Eigenschaften wird bei mesenchymalen Zellen durch einen niedrigen  $pO_2$  begünstigt (Bonassar et al. 2001). Die Versorgung der Proben mit frischem Sauerstoff war in allen durchgeführten Belastungsexperimenten auf den Medienwechsel limitiert. Wahrscheinlich entwickelte sich hierbei während der belastungsfreien Zeit ein für die Chondrogenese günstiger  $pO_2$ .

Initial ergab sich aufgrund der hohen Porosität der Trägermatrix eine gute Versorgung der Zellen mit Nährstoffen aus dem umgebenden Medium. Dieser Konvektionstransport wurde im Zeitverlauf durch die sich bildende Extrazellulärmatrix eingeschränkt. Einen positiven Einfluss auf den Transport der Wachstumsfaktoren und Nährstoffe in das Gewebeinnere hatten hierbei die in dieser Arbeit untersuchten Belastungsformen. Dies konnte histologisch durch eine intensivierete metachromatische Färbung im Zentrum der Zell-Matrix Konstrukte gezeigt werden. Für Knorpelgewebe wiesen Bonassar et al. (2001) einen gesteigerten Transport von IGF-1 durch dynamische Kompression nach.

Im *in vitro* Chondrogenesemodell mit Zellaggregaten sind die Stammzellen dicht aneinander gedrängt. Vor der Knorpelmatrixproduktion aggregieren und kondensieren diese Zellen (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998). Die Kondensation der Zellen erfolgt auch nach deren Injektion in bioabbaubare Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositmatrizes, wie in dieser Studie gezeigt werden konnte. Von großer Bedeutung ist hierbei eine initial hohe Zellzahl bei der Scaffoldbesiedelung (Freed et al. 1993; Butnariu-Ephrat et al. 1996). Die hierbei auftretenden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen haben eine entscheidende Rolle bei der Produktion der ECM Materialien (Freed 1994).

Dicht aneinander gelagerte Zellen wurden bereits während der Regeneration von artikulärem Knorpeldefekten gefunden, wobei der subchondrale Knochen penetriert wurde und Knochenmarkszellen in den Defekt eindringen konnten (Shapiro et al. 1993).

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu knorpel-ähnlichem Gewebe wurde in dieser Arbeit durch Kultur in chondrogenem Medium erzielt. Dieses besteht gemäß Johnstone et al. (1998) aus TGF- $\beta$ 1, Dexamethason, Ascorbinsäure, ITS+3 und

Natriumpyruvat in serumfreien DMEM High Glucose Medium.

TGF- $\beta$ 1 ist ein bedeutender anaboler Wachstumsfaktor für die Chondrogenese (Redini et al. 1988; Ballock et al. 1997). Er steigert die Aggrecan und Typ II Kollagenproduktion (Su et al. 1998; Cawston et al. 1999), inhibiert matrixabbauende Enzyme (Kulyk et al. 1989; van der Kraan et al. 1992), und ist somit ein wichtiger Proliferations- und Differenzierungsfaktor (van Beuningen et al. 1994; Glansbeek et al. 1998). Auch in vivo wurde eine erhebliche Stimulation der Proteoglykansynthese durch TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen (Hirota et al. 2000; Tuli et al. 2003). Die TGF- $\beta$ 1 gesteuerte Chondrogenese von MSC über SMAD Signalwege und Aktivierung von ERK und p38 MAP-Kinasen (Johnstone et al. 1998) wird im Anschluss eingehender beschrieben.

Das verwendete Glukokortikoid Dexamethason wird für die chondrogene Differenzierung benötigt (Dearden et al. 1986; Mushtaq and Ahmed 2002). In vitro Versuche zeigten eine Reduktion der Proliferationsrate von Chondrozyten nach Dexamethasongabe (Siebler et al. 2001), eine erniedrigte Enzymaktivität prähypertropher Chondrozyten (Awad et al. 2003) und eine gesteigerte Proteinsynthese (Yasuda 1995). Der Einfluss von Dexamethason ist hierbei vom Grad der Differenzierung abhängig (Ahmed et al. 2002). In vivo konnte eine Beeinträchtigung des Knochenwachstums durch Dexamethason nachgewiesen werden (Pacifci 1990). Somit kommt Dexamethason eine chondroprotektive und differenzierungsfördernde Funktion zu. Die dabei im Einzelnen ablaufenden Prozesse sind bis heute unbekannt.

Ascorbinsäure ist in unserem Modell von großer Bedeutung für die Kollagensynthese (Hering et al. 1994). Sie ist an der Hydroxylierung von Protokollagen beteiligt und wird dabei selbst zu Dehydroascorbinsäure oxidiert. Darüber hinaus wurde eine Stimulation der Proliferation von bovinen artikulären Chondrozyten gezeigt (Kellner et al. 2001).

Das Insulin in dem von uns verwendeten ITS+3 zeigt in höherer Konzentration über den Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) Rezeptor auf Knorpel dieselbe Wirkung wie IGF-1 (Osborn et al. 1989; Pavasant et al. 1996). IGF-I ist ein anaboles Polypeptid und stimuliert die Chondrozytenproliferation und Synthese von ECM Bestandteilen, wie beispielsweise Kollagen, Proteoglykan und Hyaluronan (Rayan and Hardingham 1994). Durch Zugabe von 300ng/ml IGF-1 konnte beispielsweise eine Verdoppelung der Proteoglykansynthese in Knorpelimplantaten gefunden werden (Duncan and Turner 1995).

Natriumpyruvat, das Salz der alpha-Keto-Propionsäure (Brenztraubensäure), hat eine zellprotektive Funktion und ist als wichtiges Stoffwechselprodukt vor allem am aeroben und anaeroben Stoffwechsel der Kohlenhydrate (Glykolyse, Citratzyklus) beteiligt.

### 5.1.8 Mögliche Signalwege und Transduktionskaskaden der Mechanobiologie

Die Zellen des menschlichen Körpers sind wie bereits beschrieben zu jeder Zeit mechanischen Belastungen ausgesetzt. Diese können von einigen Pa (Scherbelastung an den Gefäßwänden) bis zu Millionen von Pa (Belastung auf den Hüftknorpel) variieren. Um zu verstehen, wie ein mechanischer Stimulus ein biologisches Signal für Zellen erzeugt, um ein Gewebe zu differenzieren oder zu adaptieren, muss man die relevanten Stimuli, die Signaltransduktionswege und die Antwortprozesse verstehen (Millward-Sadler et al. 1999). Postulierte Mechanotransduktionsmechanismen sind die mechanische Beeinflussung der Chondrozytenmembran und des Zellkerns und die Signalübertragung über Intergrine (Xu et al. 2000) oder Membranrezeptoren (Guilak et al. 1999; Roberts et al. 2001). Auch Veränderungen im Membranpotential über Ionenkanäle (Wright et al. 1992; Guilak et al. 1999; Hung et al. 2000), interzelluläre Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse (Gu et al. 1998; Mow et al. 1999; Lai et al. 2000) und elektrische Stimuli von piezoelektrischen Effekten und Strömungspotentialen (Mobasherri et al. 1998) können hierbei eine Rolle spielen. Darüber hinaus werden physikochemische Effekte wie Veränderungen des Wassergehalts, der Ionenkonzentration und des pH- Wertes angenommen (Duncan and Turner 1995; Stoltz and Wang 2002) (siehe Abb. 5-4).

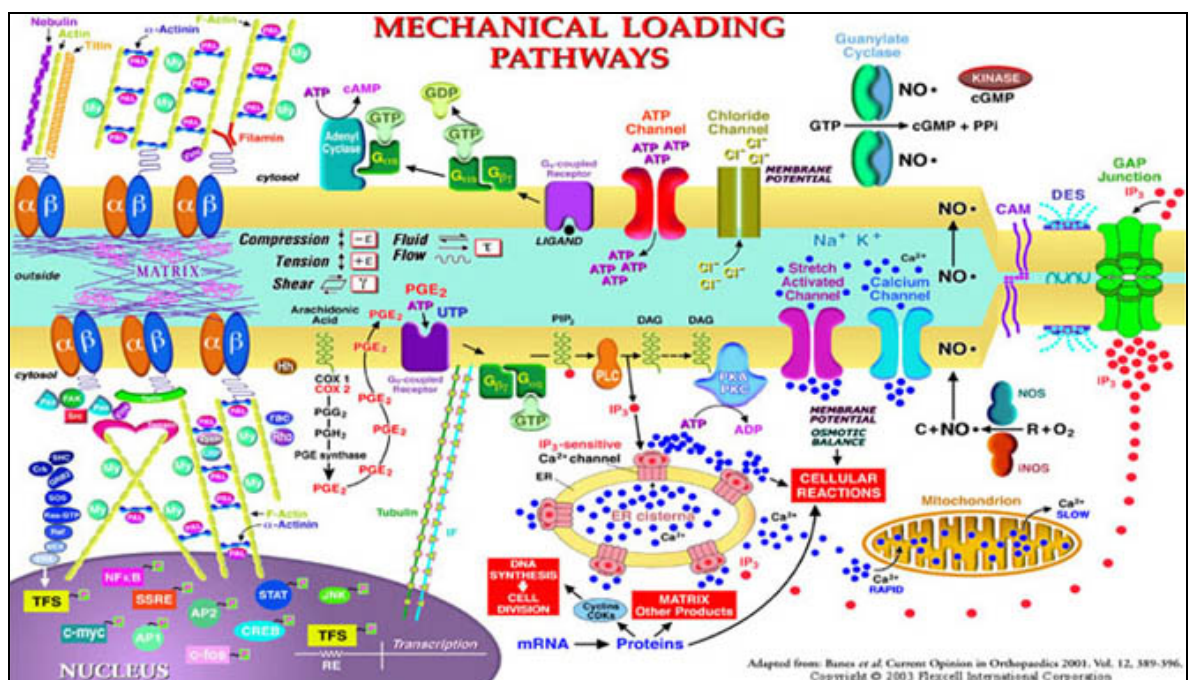


Abb. 5-4 Signalwege mechanischer Belastung ((Webadresse2) nach (Banes 2001))

Duncan und Turner (1995) haben hierfür einen 4-Schritt Mechanismus der Mechanotransduktion angenommen (Banes et al. 1995; Grodzinsky et al. 2000). Die Abläufe bei der Übermittlung des mechanischen Signals auf physiologische Prozesse beginnen dabei mit dem sogenannten Mechanical Coupling, also der Transformation der aufgetragenen Kräfte in detektierbare Stimuli durch die Zellen und der Initiierung eines physikalischen Prozesses. So können Druckbelastungen auf Knochen ein elektrokinetisches Potential auslösen. Dem folgt die Mechanotransduktion (Kessler et al. 2001; Wong and Carter 2003), die Umwandlung der verschiedenen Kräfte (primär oder sekundär) in elektrische, chemische oder biochemische Antworten über G-Proteine, Ionenkanäle oder/und mechanosensitive Elemente. Während der im Anschluss stattfindenden Signaltransduktion werden die physiologischen Signale intrazellulär in andere Signale umgewandelt. Diese lösen letztlich die Zellantwort aus, bestehend aus einer Regulation der Genexpression, der Proliferation sowie der Freisetzung autokriner oder parokriner Faktoren oder einer spezifischen Rezeptorexpression.

Zu den für mechanische Belastung sensiblen Genfamilien zählen beispielsweise ECM Proteine (Aggrecan, Kollagen), zellzyklusregulierende Wachstumsfaktoren (Zyklone, Cdk), Zytokine (IL-1/4/6), Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , FGF), zytoskeletale Proteine (Integrine), fokale Adhäsionsproteine, Proteasen wie die Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren sowie angiogenetische und antiangiogenetische Faktoren (VEGF, CTGF, Troponin, Chondromodulin) (Gray et al. 1988; Sah et al. 1989; Kim et al. 1994).

Über die genauen Signaltransduktionsmechanismen von Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen ist wenig bekannt (Holmvall et al. 1995; Loeser 2000). Wichtig scheint die Interaktion der Zellen über Oberflächenproteine wie zum Beispiel der Integrine (von der Mark and Mollenhauer 1997; Reid et al. 2000), Anchorin (Knudson et al. 1996) und CD44 (Buschmann et al. 1995; Giannoni et al. 2003)) mit Matrixbestandteilen wie Kollagen, Fibronectin und Hyaluronsäure zu sein (siehe Abb.5-5 (Wong and Carter 2003)).



Signaltransduktionskaskaden erfolgt über die Interaktion mit Adapterproteinen (Shc, Crk, p130<sup>Cas</sup>, paxillin, talin, vinculin, caveolin) oder anderen Proteinen wie focal adhesion kinase (FAK) oder pyk2. Verschiedenste Signaltransduktionskaskaden werden aktiviert (Hung et al. 2000; Forsyth 2001; Jin et al. 2001; Loeser 2002; Mobasheri et al. 2002). Bei den durch Zelladhäsion oder mechanische Reize integrinvermittelten Effekten scheint die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über MAP (Mitogen Activated Protein) Kinase Pathways eine entscheidende Rolle zu spielen (Han et al. 1994; Seger and Krebs 1995; Schaeffer and Weber 1999). Der MAPK Signalweg (siehe Abb. 5-5) ist die am besten untersuchte Signaltransduktionskaskade, verantwortlich für Änderungen der Genexpression bei Proliferation, Differenzierung und Entzündungsreaktionen (Kantomaa et al. 1994; Elder et al. 2001; Wu et al. 2001). MAP-Kinasen sind an der Übertragung mechanischer Signale während der Chondrozyten-Differenzierung beteiligt (Millward-Sadler et al. 2000; Loeser 2002; Giannoni et al. 2003). Auch für die Beteiligung von Cytokinen (IL-1, IL-4) an integrinvermittelten Reizen gibt es Hinweise (Loeser 2002).

Die Adhäsion von Chondrozyten über  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an Fibronectin aktiviert FAK sowie die MAP-Kinasen Extracellular Signal Regulated Kinase ERK1 und ERK2 (Forsyth et al. 2002). An humanen artikulären Chondrozyten führt die Zugabe von adhäsionsblockierenden Antikörpern gegen Integrin  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  zur Aktivierung der MAP-Kinasen: ERK1 und 2, c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase (JNK) sowie p38. Dies führt über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NF $\kappa$ B zur Steigerung der Expression von MMP-13, einer Kollagenase, die an der Arthroseentstehung beteiligt ist. Denselben Effekt hat die Zugabe von Fibronectinfragmenten, die ebenfalls die Adhäsion von Chondrozyten über  $\alpha 5\beta 1$  Integrine an Fibronectin hemmen. Die Inhibierung der Adhäsion von Chondrozyten an die extrazelluläre Matrix trägt somit zur Arthroseentstehung bei (Loeser et al. 2003). Der Aktivierung der MAP-Kinase-Pathways durch Fibronectinfragmente ist die Phosphorylierung der Proline-rich Tyrosin Kinase PYK2 durch Proteinkinase C vorgeschaltet (Lee et al. 2002). Über  $\beta 1$ -Integrine wird eine Aktivierung von Proteinkinase C- $\alpha$  durch mechanische Stimulation in humanen artikulären Chondrozyten ausgelöst (Segat et al. 2002). Die Kompression von Knorpelimplantaten führt zu einer frühzeitigen Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p 38 sowie einer verzögerten Aktivierung des JNK MAP- Kinase Pathways. P38 ist hierbei an der Typ II Kollagen Expression beteiligt (Atfi et al. 1997).



über  $\beta 1$ -Integrine vermittelten auto-/parakrinen Sekretion von Interleukin-4. Dieses bindet daraufhin an einen IL-4-Rezeptor und stimuliert damit die Hyperpolarisation der Zelle. Über diesen Mechanismus kommt es zu einer Steigerung der Aggrecan Expression und einer Suppression von MMP-3 (Clancy et al. 1997). Clancy et al. (1997) beschreiben darüber hinaus einen Synergismus der Wirkung von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, das als Fibronectinrezeptor fungiert, mit basischem FGF (Fibroblast Growth Factor) und IGF-1 bei der Steigerung der Proteoglykansynthese. Durch Adhäsion an Fibronectin ließ sich im Vergleich zur Adhäsion von Chondrozyten an Albumin eine Steigerung der Proteoglykansynthese induzieren. In Anwesenheit von Fibronectin konnte dieser Effekt durch Zugabe von bFGF und IGF-1 weiter signifikant gesteigert werden. In Abwesenheit von Fibronectin blieb die Zugabe der Wachstumsfaktoren ohne Auswirkung (Takahashi et al. 1997).

Ein möglicher Einflussfaktor für die mechanobiologischen Effekte an Knorpel ist auch die Regulation der Expression von Wachstumsfaktoren (Hoffmann and Gross 2001; Miyazono et al. 2001; Chang et al. 2002). An einer Chondrozyten ähnlichen Zelllinie wiesen Takahashi et al. (1997) durch zyklische hydrostatische Belastung mit einer Amplitude von 5 MPa eine Hochregulation von TGF- $\beta 1$  nach, durch Belastung mit einer Druckamplitude von 50 MPa kam es zu einer Verringerung der gefundenen Konzentration des Wachstumsfaktors. Darüber hinaus konnte eine Steigerung der Expression von IGF-1 durch Zentrifugation von Chondrozyten nachgewiesen werden (Maeda et al. 2001).

Die TGF- $\beta$  Familie besteht aus einer Reihe von Wachstumsfaktoren, von denen einige die Chondrogenese und Osteogenese beeinflussen. Zu ihr gehören neben den drei Isoformen TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$  und TGF- $\beta 3$  die Bone Morphogenic Proteins (BMPs) 2-8 und Growth Differentiation Factor (GDF) 5-7 (Piek et al. 1999; Grimaud et al. 2002; Mehra and Wrana 2002; Govinden and Bhoola 2003). Die Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie werden als große Propeptide synthetisiert und intrazellulär gespalten. TGF- $\beta$  wird beispielsweise in eine reife Form und ein Latency-Associated Peptide (LAP) gespalten, das bei der Sekretion nicht kovalent an den Wachstumsfaktor gebunden bleibt. Extrazellulär erfolgt dann die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch Lösen von LAP. Daran sind Proteasen wie Plasmin oder Cathepsin beteiligt. Die Wachstumsfaktoren sind zum Großteil als Homodimere biologisch aktiv, jedoch ist auch die Bildung von Heterodimeren mit unterschiedlicher biologischer Wirkung bekannt (Hoffmann and Gross 2001). Die

Wachstumsfaktoren vermitteln ihre biologische Wirkung über membranständige Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, also heteromere Proteine aus Typ I und Typ II Untereinheiten. Fünf verschiedene Typ II Rezeptoren sind bekannt, an welche die Wachstumsfaktoren initial binden. Diese verfügen über eine konstitutionelle Kinaseaktivität. Die Bindung von Wachstumsfaktoren stimuliert diese Typ II Rezeptoren zur Bildung von heteromeren Komplexen mit Typ I Rezeptoren, von denen sieben verschiedene Typen bekannt sind: Activin Receptor-Like Kinase (ALK) 1-7 (siehe Tabelle 5-1). Diese werden darauf hin durch Phosphorylierung aktiviert und lösen damit weitere intrazelluläre Signalkaskaden aus. Daneben ist die direkte Aktivierung der Typ I Rezeptoren möglich.

Durch verschiedene Affinitäten zu Wachstumsfaktoren aus der TGF- $\beta$  Familie werden auch die Signale der BMPs vermittelt. Vor allem die Rolle von ALK-3 und ALK-6, auch als BMP-Rezeptor IA und IB bezeichnet, wurde für die chondrogene Differenzierung untersucht. In der Embryogenese ist BMPR-IB, nicht aber BMPR-IA für die Chondrogenese notwendig. In der mesenchymalen Progenitorzelllinie C3H10T1/2 löst BMPR-IA, nicht aber IB, Chondrogenese aus. In der chondrogenen Progenitorzelllinie lösen beide Rezeptoren, aber nicht ALK-1 und ALK-2 chondrogene Differenzierung aus (Hoffmann and Gross 2001). Typ II Rezeptoren sind BMPR-II, T $\beta$ R-II und activin receptor Typ II (ActR-II) und ActR-IIB. Darüber hinaus bestehen noch akzessorische Rezeptoren, die die Bindung und Wirkung der Wachstumsfaktoren modulieren können, Endoglin und Betaglykan (Hu et al. 1998; Padgett et al. 1998; Padgett et al. 1998; Shen et al. 1998).

Intrazellulär werden die Signale über Smads vermittelt, eine Familie aus acht intrazellulären Molekülen (ten Dijke et al. 2000; Zimmerman and Padgett 2000). Diese lassen sich in drei Gruppen aufteilen. Rezeptorgebundene R-Smads (Smad1, 2, 3, 5 und 8) werden durch Phosphorylierung von Typ I Rezeptoren aktiviert, und zwar Smad 2 und 3 spezifisch durch Activin und TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren (siehe Abb.5-6) sowie Smad 1, 5 und 8 durch BMP-Rezeptoren (siehe Abb.5-7) (Zimmerman and Padgett 2000; Moustakas et al. 2001; Dennler et al. 2002; Mehra and Wrana 2002). Diese bilden mit Co-Smads (Smad 4) heteromere Proteine, die im Zellkern zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen. Smads verfügen über keine enzymatische Aktivität. Ihre Struktur ermöglicht ihnen die Interaktion mit DNA, DNA bindenden Proteinen, Coaktivatoren und Corepressoren von Transkriptionsfaktoren.

Inhibitorische I-Smads (Smad 6 und 7) werden im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie hochreguliert. Sie unterdrücken die Signaltransduktion durch Behinderung der Phosphorylierung von R-Smads und Degradation von Rezeptoren an der Zelloberfläche (Mehra and Wrana 2002).

Ligand	Typ-II-Rezeptor	Typ-I-Rezeptor	R-Smads
TGF- $\beta$ s	T $\beta$ RII	ALK5 (=T $\beta$ RI)	Smad2,3
		ALK1	Smad1,5,8
Activins	ActRII/IIB	ALK4 (=ActR1B)	Smad2,3
		ALK3 (=BMPRI1A)	Smad1,5,8
BMPs, GDFs	BMPRII	ALK2	Smad1,5,8
	ActRII/IIB	ALK3 (=BMPRI1A)	Smad1,5,8
		ALK6 (=BMPRI1B)	Smad1,5,8

Tabelle 5-1 Liganden, Rezeptoren und rezeptorgebundene Smads wichtiger Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie.

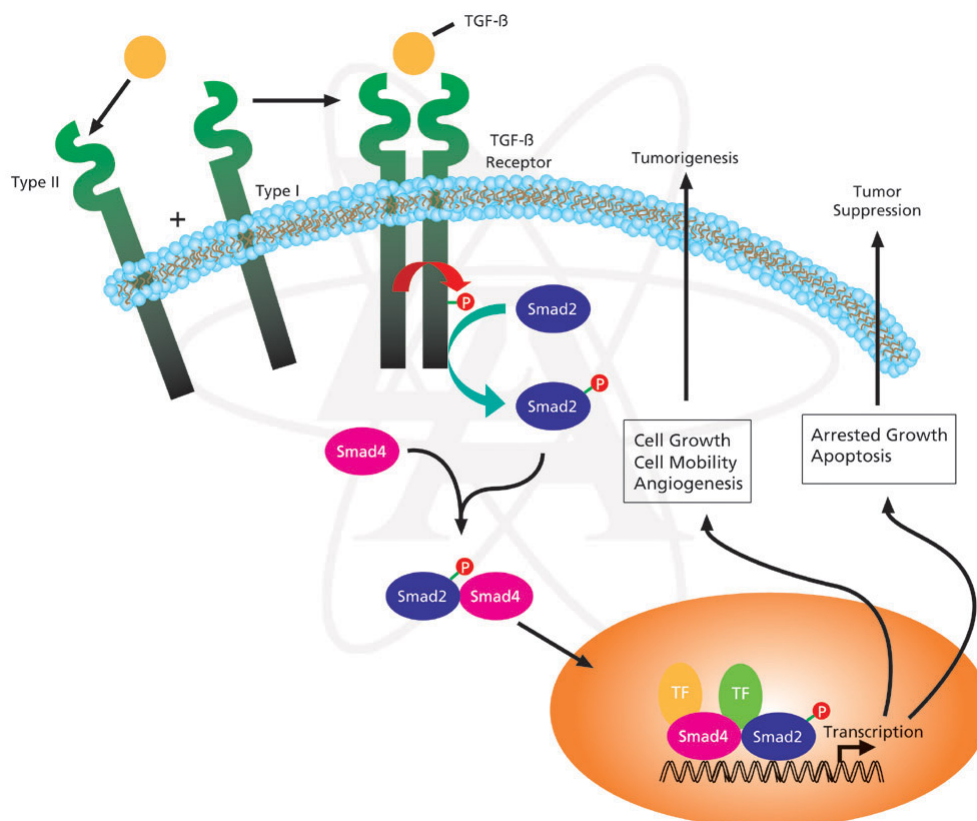


Abb. 5-6 TGF- $\beta$ 1 Signalweg (Webadresse3)

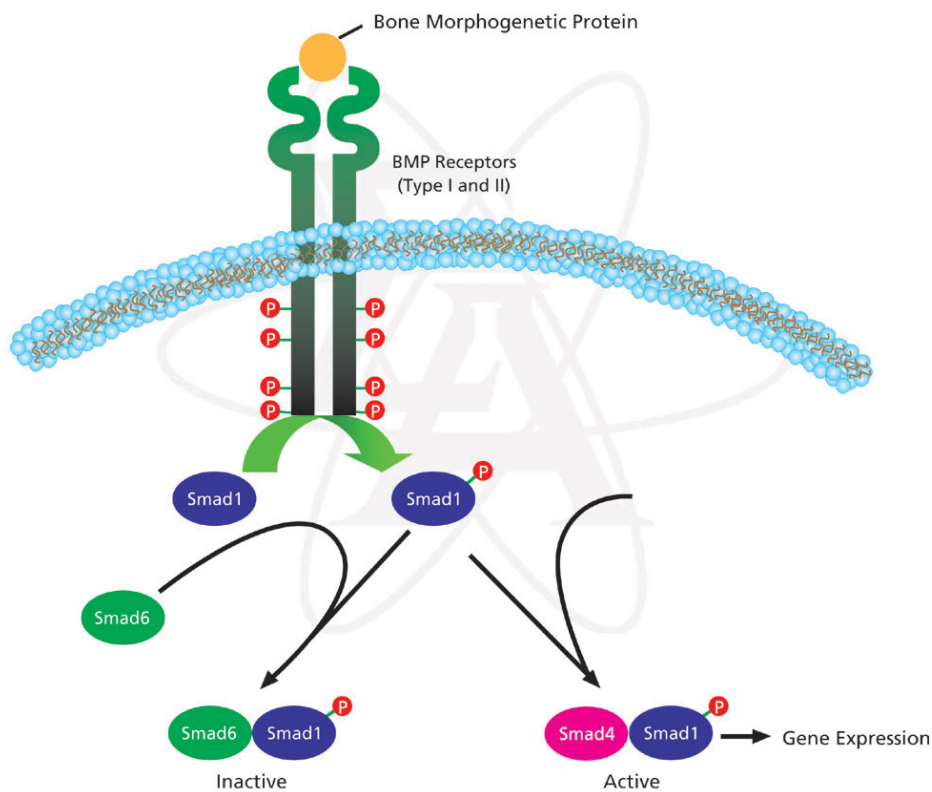


Abb. 5-7 BMP Signalweg (Webadresse3)

Neben diesen beiden Rezeptortypen existieren zwei in der Literatur oft als Typ III Rezeptoren bezeichnete membranständige Proteine, Betaglycan und Endoglin, welche die Wirkung von TGF- $\beta$  an seinen Rezeptoren modulieren können. Für andere Mitglieder dieser Wachstumsfaktorfamilie sind keine Typ-III-Rezeptoren bekannt. Betaglycan verstärkt in seiner membranständigen Form die Wirkung von TGF- $\beta$  durch Präsentation des Liganden für den Typ-II-Rezeptor, in löslicher Form wirkt es durch Bindung von TGF- $\beta$  inhibitorisch. Endoglin wirkt komplex, sowohl Überexpression als auch Mutationen können die TGF- $\beta$  Wirkung abschwächen (Piek et al. 1999; Zimmerman and Padgett 2000).

Eine große Anzahl von Molekülen kann diese Signaltransduktionsmechanismen modulieren. Hierzu zählen extrazelluläre oder transmembranöse Proteine, die Einfluss auf die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren haben. Daneben ist eine Reihe von zytoplasmatischen Proteinen bekannt, die mit den Rezeptoren oder Smads interagieren oder die Degradation der Smads regulieren und auf diesem Weg die biologische Wirkung der Wachstumsfaktoren auf verschiedenen Ebenen beeinflussen (Moustakas et al. 2001).

Daneben bestehen Überschneidungen mit anderen Signaltransduktionssystemen. Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie können zum einen MAP-Kinase Kaskaden auslösen. Über die Aktivierung von Erk, JNK und p38 wurde berichtet. Eine Hochregulation der MAP-Kinase TGF- $\beta$  Associated Kinase-1 (TAK-1) durch TGF- $\beta$  und BMP ist bekannt. Zum anderen bestehen Interaktionen zwischen Smad- und MAPK-Signalwegen. Dabei kann die Wirkung verschiedener Smads durch eine Phosphorylierung mittels MAP-Kinasen oder Proteinkinase C inhibiert werden. Die SMADs werden hierbei an einer anderen Stelle, als durch die membranständigen Wachstumsfaktorrezeptoren phosphoryliert (Piek et al. 1999; von Bubnoff and Cho 2001; Mehra and Wrana 2002; Tuan et al. 2003). Das Ausmaß sowie die Bedeutung dieser Wechselwirkungen sind jedoch nicht bekannt (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998).

TGF- $\beta$  kann wie bereits beschrieben bei adulten mesenchymalen Stammzellen in einem serumfreien System Chondrogenese auslösen (Tuan et al. 2003). Für die Induktion und den Erhalt von Chondrogenese in mesenchymalen Stammzellkulturen mittels TGF- $\beta$ 1 sind neben den Smads die MAP-Kinasen p38, ERK und JNK essentiell. Durch selektive Blockade dieser Enzyme kann die Expression knorpelspezifischer Gene auf jeweils unterschiedlichen Wegen signifikant reduziert oder unterdrückt werden (Sekiya et al. 2001; Sekiya et al. 2001). BMP-6 steigert die Expression knorpelspezifischer Gene in serumfreien Chondrogenesesystemen, die auf mesenchymalen Stammzellen und TGF- $\beta$  basieren (Majumdar et al. 2001). BMP-2 und BMP-9 können in dreidimensionalen Kultursystemen ohne TGF- $\beta$  bei adulten mesenchymalen Progenitorzellen Chondrogenese auslösen (Shukunami et al. 2000; Izzo et al. 2002). BMP-2 wirkt an Osteoblasten über Smad 1 und 5 osteoinduktiv und aktiviert gleichzeitig die MAP-Kinase p38. Durch Inhibition von p38 wird wiederum die Aktivierung von Smad 1 gesteigert. Das ist ein gutes Beispiel für die enge Verstrickung der beiden Signaltransduktionskaskaden (Lucchinetti et al. 2004).

Bei Chondrozytenkulturen ist bekannt, dass im serumfreien Milieu TGF- $\beta$  die Expression von  $\alpha$ 1-Integrin supprimiert, während es die Expression von  $\alpha$ 3- und  $\alpha$ 5-Integrin steigert. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich durch zyklische mechanische Belastung wieder ausgeglichen, da diese, wie bereits erwähnt, eine Hochregulierung der  $\alpha$ 1-Integrin Expression zur Folge hat (Aspenberg et al. 2000). Andererseits steigert auch IGF-1 die Expression von  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 3- und  $\alpha$ 5-Integrinen. Dies hat einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von differenzierten mesenchymalen

Stammzellen in den von uns verwendeten Hyaluronan-Gelatine-Trägermatrizes, da  $\alpha 1$ -Integrin im Gegensatz zu Integrin- $\alpha 3$  oder  $\alpha 5$  mit Kollagen IV interagieren kann. Ein Synergismus zwischen dem Fibronektinrezeptor  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und IGF-1 ist bekannt. In unserem Chondrogenesemodell wurde die Rolle von IGF-1 durch Insulin übernommen.

Die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wurde in einem in vivo Versuch an Ratten in undifferenziertem mesenchymalen Gewebe untersucht. Durch hydrostatische Belastung konnte im Gegensatz zur unbelasteten Kontrolle eine chondrogene Differenzierung des Gewebes histologisch nachgewiesen werden. Diese histologische Veränderung ging mit einer Niederregulierung von BMP-3 und ALK-2, einem BMP-Rezeptor einher (Fujisawa et al. 1999). Fujisawa et al. (1999) wiesen in einer Chondrozytenkultur die gleichzeitige Hochregulation von Interleukin-1 und MMP-2 sowie MMP-9 nach (Liacini et al. 2002). Interleukin-1 führt darüber hinaus zur Induktion von MMP-3 und MMP-13. Durch Unterdrückung der IL-1 nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden konnte dieser Effekt supprimiert werden (Forsyth et al. 2002). Eine partielle Inhibierung der durch Fibronektin über  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine vermittelten Hochregulation von MMP-13 durch Antikörper gegen IL-1-Rezeptoren wurde von Legendre et al. (2003) nachgewiesen. Diese untersuchten auch den Einfluss von IL-6 auf bovine Chondrozyten. IL-6 führte hierbei zusammen mit einem löslichen IL-6-Rezeptor zur Niederregulierung von Matrix-Proteinen und SOX-9, einem Transkriptionsfaktor, dem in der Chondrogenese eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird.

Auch mechanosensitive Ionenkanäle sind an der Transduktion mechanischer Reize beteiligt. Durch mechanische Stimulation werden Chondrozyten zur autokrinen Sekretion von Interleukin-4 (IL-4) angeregt, und es kommt zur Aktivierung von mechanosensitiven Ionenkanälen. Diese Mechanismen führen zur Induktion von Aggrecan und zur Suppression von MMP-3. Dieser Effekt konnte für gesunde humane artikulare Chondrozyten, nicht aber für Chondrozyten, die aus arthrotischem Knorpelgewebe isoliert wurden, nachgewiesen werden (Wu and Chen 2000).

Wu und Chen (2000) konnten zeigen, dass zyklischer mechanischer Stress zu einer Zunahme der Zellproliferation von dedifferenzierten Chondrozyten in einer künstlichen Matrix, führt. Dagegen bewirkt diese Belastung bei differenzierten und hypertrophen Chondrozyten eine Zunahme der Matrixproduktion, nicht aber eine Zunahme der Proliferation. Beide Effekte konnten durch Nifedipin, einem Calciumkanalblocker, inhibiert werden. Calciumkanäle scheinen somit sowohl an der Kontrolle der

Zellproliferation als auch der Extrazellulärmatrixbildung beteiligt zu sein. Dagegen inhibiert Gadolinium, ein Antagonist mechanosensitiver Ionenkanäle, nur die Zellproliferation unreifer Chondrozyten, nicht aber die Matrixproduktion differenzierter Chondrozyten. Natrium- und Kalium-Kanalblocker hatten auf beide Vorgänge keinen signifikanten Einfluss (Kronenberg 2003).

Der Effekt mechanischer Belastung auf Chondrozyten beruht also auf einer Vielzahl von Mechanismen, die über Rezeptoren auf der Zelloberfläche im Zusammenspiel mit löslichen (z-B. Wachstumsfaktoren, Zytokine) und nichtlöslichen extrazellulären Elementen (Matrix) die biologische Antwort auslösen. Letzten Endes münden alle Signaltransduktionsmechanismen, seien sie mechanisch oder humoral ausgelöst, in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung an spezifische DNA-Regionen die Expression verschiedener Gene regulieren. Wie diese Mechanismen weiter ablaufen, ist weitgehend unbekannt. Eine Schlüsselrolle als Transkriptionsfaktor spielt beispielsweise Sry-type HMG box-9 (SOX-9), das als Master Gene der Chondrogenese gilt. SOX-9 wird in mesenchymalen Zellen und in proliferierenden Chondrozyten, nicht aber in hypertrophen Chondrozyten gebildet (de Crombrughe et al. 2001; Huang et al. 2001; Tsuchiya et al. 2003). SOX-9, L-SOX-5 und SOX-6 steuern die Differenzierung von MSC zu Chondrozyten und stimulieren die Transkription einer Vielzahl von Knorpelmatrixgenen einschließlich Col2a1, Aggrecan und COMP über Bindung an die Promotorregion dieser Matrixbestandteile. SOX-9 inhibiert die Reifung prehypertropher Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten über den PTHrP Signalweg und stimuliert die Expression von Oberflächenproteinen die für die mesenchymale Kondensation notwendig sind. Ob SOX-9 selbst mechanosensitiv ist, ist bislang ungeklärt.

## 6. Zusammenfassung

Die Selbstheilungskraft osteochondralen Gewebes ist in vivo stark begrenzt. Neue Ansätze der in vitro Züchtung von knorpelartigem Reparaturgewebe unter Verwendung von mit Chondrozyten besiedelten Trägermatrizes mit anschließender in vivo Implantation zeigten dagegen bereits vielversprechende Ergebnisse. Jedoch konnte bis heute keine vollständige Heilung erzielt werden. Von größter Bedeutung für die in vivo Reparatur osteochondralem Gewebes sind sowohl mechanische Belastungen als auch die Gefäßversorgung des Defektareals. Über funktionsfähige Gefäße wird hierbei das traumatisierte Gewebe mit putativen Reparaturzellen, wie beispielsweise mesenchymale Stammzellen sowie Wachstumsfaktoren und Nährstoffe versorgt.

Vielfältige Belastungsversuche haben bereits einen positiven Einfluß auf die Extrazellulärmatrixbildung von dedifferentierten Chondrozyten gezeigt. Über die Wirkung mechanobiologischer Beeinflussung auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen ist dagegen wenig bekannt.

Aus diesem Grund wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der Einfluß von drei unterschiedlichen Belastungsformen auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen in dreidimensionalen, biodegradablen Trägermatrizes untersucht. Es sind dies zum einen die direkte mechanische Kompression, zum anderen der zyklische hydrostatische Druck, sowie der niedrig-intensiv gepulste Ultraschall. Für die ersten beiden Belastungsarten wurden spezielle Apparaturen entwickelt und zum Einsatz gebracht. Die Ultraschallbelastung der Zellen wurde mit Hilfe eines bereits klinisch angewandten, modifizierten Frakturheilungssystems durchgeführt, dem sogenannten SAFHS (Exogen, USA).

Die direkte zyklische, mechanische Kompression der mesenchymalen Stammzellen führte zu einer gesteigerten mRNA Expression knorpelspezifischer Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie zum Beispiel Aggrecan und Typ II Kollagen. Auch auf Proteinebene konnte eine gesteigerte Bildung von Glykosaminoglykanen und Kollagen bei gleich bleibender Zellzahl nachgewiesen werden. In der Histologie zeigte sich vor allem im Zentrum der Trägermatrix der belasteten Gruppe eine intensiviertere Färbung der Extrazellulärmatrix (Toluidinblau-Färbung) und des Kollagens (Picrosirius-Färbung). Dies lässt sich wahrscheinlich unter anderem auf eine verbesserte Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren über einen gesteigerten Konvektionstransport zurückführen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, trägt die direkte, zyklische mechanische Kompression zur Verbesserung der Chondrogeneseleistung mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrizes bei. Mit ihrer Hilfe kann somit die Bildung von nativem Knorpel ähnlichem Reparaturgewebe beschleunigt und dessen Qualität erheblich gesteigert werden.

Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Belastung der mesenchymalen Stammzellen mit zyklischem hydrostatischen Druck gefunden. Auch hierbei wurde die mRNA Expression von beispielsweise Aggrecan und Typ II Kollagen gegenüber der unbelasteten Kontrolle signifikant gesteigert. Sowohl die Konzentration an Glykosaminoglykanen als auch an Kollagenen konnte durch hydrostatischen Druck erheblich gesteigert werden, ohne dass sich die Zellzahl signifikant geändert hat. Histologisch zeigte sich keine so deutliche Verbesserung der Chondrogenese durch Belastung wie sie durch direkte, mechanische Kompression erzielt werden konnte. Dies lässt sich vermutlich auf den durch die hydrostatische Belastung unveränderten Konvektionstransport zurückführen.

Somit stellt auch die Belastung von chondrogenen Zellen mit zyklischem hydrostatischen Druck ein mögliches Verfahren zur Optimierung des Tissue Engineering von osteochondralem Reparaturgewebe dar.

Die klinische Anwendung niedrig-intensiv gepulsten Ultraschalls (LIPUS) zur verbesserten Frakturheilung ist seit einigen Jahren bekannt. Über den Einfluss von LIPUS auf mesenchymale Stammzellen in dreidimensionalen Trägermatrizes wurde bis heute dagegen nichts publiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl auf molekularer als auf Proteinebene ein anaboler Effekt der Belastung mit niedrig-intensiv gepulstem Ultraschall für mesenchymale Stammzellen nachgewiesen werden. Hierbei wurde der Einfluss sowohl auf die Zellen alleine in Form von Zellaggregaten als auch auf dreidimensionale Zell-Matrix-Konstrukte untersucht. Dieser positive Einfluss war aber stark von der Belastungsdauer und den Zellkulturbedingungen abhängig. Erst bei Verdoppelung der für die klinische Frakturheilung verwendeten Behandlungsdauer von 20 Minuten auf 40 Minuten zeigten die MSC in der Zellaggregatkultur eine Steigerung der mRNA Expression chondrogener Marker und der Produktion wichtiger Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Kollagen und Proteoglykan. Die Zell-Matrix-Konstrukte zeigten dagegen nur bei 20minütiger Belastung eine Steigerung der mRNA Expression chondrogener

Marker, wobei die Produktion an Kollagen und Proteoglykan ihr Maximum in der 40 Minuten lang belasteten Gruppe hatte.

LIPUS kann somit ebenso wie die direkte mechanische Kompression und die Belastung mit hydrostatischem Druck zur Optimierung von Tissue Engineertem Reparaturgewebe *in vitro* eingesetzt werden. Darüber hinaus bietet LIPUS aufgrund seiner indirekten Applikation der Belastung die Möglichkeit, bereits *in vivo* implantiertes Tissue Engineertes Reparaturgewebe zu beeinflussen.

Die zweite Fragestellung dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss der Zellart und des Differenzierungsgrades der Zellen auf deren angiogentisches Verhalten in Tissue Engineering Matrices *in vivo*. Hierfür wurden die bereits aus der Tumorforschung bekannten Modelle der Intravitalmikroskopie und der Rückenmarkkammer verwendet. Bis heute ist noch keine Anwendung dieser Modelle für die online Dokumentation der Gefäßneubildung in Tissue Engineering Konstrukte bekannt. Miteinander verglichen wurden mesenchymale Stammzellen und Meniskuszellen. Diese Untersuchungen wurden in Hinblick auf ein verbessertes *in vivo* Integrationsverhalten des Tissue Engineerten Reparaturgewebes durchgeführt.

Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Differenzierungsgrades und der Zellart auf das angiogentische Verhalten. Für mesenchymale Stammzellen konnte eine Abnahme der Gefäßneubildung nach ihrer Differenzierung nachgewiesen werden. Diese Tatsache beruht vermutlich auf der im Verlauf der Chondrogenese verringerten VEGF und MMP Freisetzung und mRNA Expression. Meniskuszellen zeigten dagegen eine durchgehend hohe Freisetzung von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF und antiangiogenetischen Faktoren wie TIMP-2 über 21 Tage. Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Begründung für die in dieser Arbeit gezeigte fehlende Steuerbarkeit ihres angiogentischen Verhaltens durch Differenzierung. Meniskuszellen scheinen sich aus diesem Grund vor allem zur Reparatur von Meniskusdefekten im Übergang der vaskularisierten zur avaskulären Zone zu eignen. Dagegen könnten sich mesenchymale Stammzellen abhängig von ihrem Differenzierungsgrad eher zur Reparatur avaskulärer osteochondraler und meniskaler Defekte einsetzen lassen. Sie erzielen initial eine Gefäßversorgung, die im Verlauf der weiteren Differenzierung möglicherweise wieder abnimmt. In diesem Fall wäre durch Einsatz von mesenchymalen Stammzellen eine gesteuerte Vaskularisierung des Reparaturgewebes, abhängig vom Differenzierungsgrad, möglich.

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Belastungsexperimente als auch die in vivo Angiogeneseversuche lieferten neu Erkenntnisse zur Optimierung des Tissue Engineering von osteochondralen Reparaturgewebe mit mesenchymalen Stammzellen. Direkte, mechanische Kompression und hydrostatischer Druck eigneten sich hierbei hervorragend, die Qualität des Reparaturgewebes erheblich zu verbessern. Darüber hinaus konnte mit dem LIPUS ein mögliches Verfahren zur Optimierung der Qualität und Intergrationsfähigkeit des Reparaturgewebes nach in vivo Implantation gefunden werden. Die gezeigte Abhängigkeit des angiotaktischen Verhaltens vom Differenzierungsgrad der Zellen und der verwendeten Zellart weist auf die große Bedeutung des Implantationszeitpunktes des Tissue Engineerten Reparaturgewebes hin. Dieser Aspekt wurde bis heute in der Literatur nicht beschrieben.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aaron, R. K. and D. M. Ciombor (1996). "Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool." J Orthop Res **14**(4): 582-9.
- Ahmed, S. F., P. Tucker, et al. (2002). "Short-term effects on linear growth and bone turnover in children randomized to receive prednisolone or dexamethasone." Clin Endocrinol (Oxf) **57**(2): 185-91.
- Akhter, M. P., D. M. Cullen, et al. (1998). "Bone response to in vivo mechanical loading in two breeds of mice." Calcif Tissue Int **63**(5): 442-9.
- Alini, M., A. Marriott, et al. (1996). "A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation." Dev Biol **176**(1): 124-32.
- Altman, G. H., R. L. Horan, et al. (2002). "Cell differentiation by mechanical stress." Faseb J **16**(2): 270-2.
- Angele, P., R. Kujat, et al. (1999). "Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge." Tissue Eng **5**(6): 545-54.
- Angele, P., J. U. Yoo, et al. (2003). "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro." J Orthop Res **21**(3): 451-7.
- Armstrong, C. G., W. M. Lai, et al. (1984). "An analysis of the unconfined compression of articular cartilage." J Biomech Eng **106**(2): 165-73.
- Arnoczky, S. P. and R. F. Warren (1983). "The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog." Am J Sports Med **11**(3): 131-41.
- Aspenberg, P., N. Basic, et al. (2000). "Reduced expression of BMP-3 due to mechanical loading: a link between mechanical stimuli and tissue differentiation." Acta Orthop Scand **71**(6): 558-62.
- Atala, A., W. Kim, et al. (1994). "Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension." J Urol **152**(2 Pt 2): 641-3; discussion 644.
- Ateshian, G. A., S. D. Kwak, et al. (1994). "A stereophotogrammetric method for determining in situ contact areas in diarthrodial joints, and a comparison with other methods." J Biomech **27**(1): 111-24.
- Ateshian, G. A., W. H. Warden, et al. (1997). "Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments." J Biomech **30**(11-12): 1157-64.
- Atfi, A., S. Djelloul, et al. (1997). "Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling." J Biol Chem **272**(3): 1429-32.
- Awad, H. A., Y. D. Halvorsen, et al. (2003). "Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells." Tissue Eng **9**(6): 1301-12.
- Aydelotte, M. B., R. R. Greenhill, et al. (1988). "Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism." Connect Tissue Res **18**(3): 223-34.

- Bachrach, N. M., W. B. Valhmu, et al. (1995). "Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment." J Biomech **28**(12): 1561-9.
- Ballock, R. T., A. Heydemann, et al. (1997). "Regulation of the expression of the type-II collagen gene in periosteum-derived cells by three members of the transforming growth factor-beta superfamily." J Orthop Res **15**(3): 463-7.
- Banes, A. J. (2001). Curr Opin in Orthopaedics **12**: 389-396.
- Banes, A. J., M. Tsuzaki, et al. (1995). "Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals." Biochem Cell Biol **73**(7-8): 349-65.
- Barry, F., R. E. Boynton, et al. (2001). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components." Exp Cell Res **268**(2): 189-200.
- Bassett, C. A. and I. Herrmann (1961). "Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro." Nature **190**: 460-1.
- Beaupre, G. S., S. S. Stevens, et al. (2000). "Mechanobiology in the development, maintenance, and degeneration of articular cartilage." J Rehabil Res Dev **37**(2): 145-51.
- Benninghoff, A. (1924). "Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß verschiedenartiger mechanischer Beanspruchung auf den Knorpel." Verh. Anat. Ges.(33): 194.
- Biewener, A. A. and J. E. Bertram (1993). "Skeletal strain patterns in relation to exercise training during growth." J Exp Biol **185**: 51-69.
- Blain, E. J., S. J. Gilbert, et al. (2001). "Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro." Arch Biochem Biophys **396**(1): 49-55.
- Blain, E. J., D. J. Mason, et al. (2003). "The effect of cyclical compressive loading on gene expression in articular cartilage." Biorheology **40**(1-3): 111-7.
- Bonassar, L. J., A. J. Grodzinsky, et al. (2001). "The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I." J Orthop Res **19**(1): 11-7.
- Brittberg, M., T. Tallheden, et al. (2001). "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update." Clin Orthop(391 Suppl): S337-48.
- Buckwalter, J. A. (1998). "Articular cartilage: injuries and potential for healing." J Orthop Sports Phys Ther **28**(4): 192-202.
- Bujia, J., P. Pitzke, et al. (1996). "Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar." Eur Arch Otorhinolaryngol **253**(6): 336-40.
- Bult, H., G. E. Boeckstaens, et al. (1990). "Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." Nature **345**(6273): 346-7.
- Buma, P., N. N. Ramrattan, et al. (2004). "Tissue engineering of the meniscus." Biomaterials **25**(9): 1523-32.
- Burton-Wurster, N., M. Vernier-Singer, et al. (1993). "Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants." J Orthop Res **11**(5): 717-29.
- Buschmann, M. D., Y. A. Gluzband, et al. (1995). "Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture." J Cell Sci **108** ( Pt 4):

---

1497-508.

- Buschmann, M. D., Y. J. Kim, et al. (1999). "Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow." Arch Biochem Biophys **366**(1): 1-7.
- Butler, D. L., S. A. Goldstein, et al. (2000). "Functional tissue engineering: the role of biomechanics." J Biomech Eng **122**(6): 570-5.
- Butnariu-Ephrat, M., D. Robinson, et al. (1996). "Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow." Clin Orthop(330): 234-43.
- Campbell, C. (1969). "The healing of cartilage defects." Clin Orthop(64): 45-63.
- Campoccia, D., P. Doherty, et al. (1998). "Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification." Biomaterials **19**(23): 2101-27.
- Caplan, A. I. (1990). "Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis." Clin Orthop(261): 257-67.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Caplan, A. I. (2000). "Mesenchymal stem cells and gene therapy." Clin Orthop(379 Suppl): S67-70.
- Carter, D. R. (1987). "Mechanical loading history and skeletal biology." J Biomech **20**(11-12): 1095-109.
- Carter, D. R. (2000). "Mechanobiology in rehabilitation science." J Rehabil Res Dev **37**(2): vii-viii.
- Carter, D. R., G. S. Beaupre, et al. (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration." Clin Orthop(355 Suppl): S41-55.
- Carter, D. R., P. R. Blenman, et al. (1988). "Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing." J Orthop Res **6**(5): 736-48.
- Carter, D. R. and M. Wong (2003). "Modelling cartilage mechanobiology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1437): 1461-71.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure." Biotechnol Bioeng **62**(2): 166-74.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure." Biotechnol Bioeng **62**(2): 166-74.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes." Biotechnol Bioeng **65**(3): 274-81.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage." Tissue Eng **5**(1): 1-11.
- Case, N. D., A. O. Duty, et al. (2003). "Bone formation on tissue-engineered cartilage constructs in vivo: effects of chondrocyte viability and mechanical loading." Tissue Eng **9**(4): 587-96.
- Cawston, T., C. Billington, et al. (1999). "The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover." Ann N Y Acad Sci **878**: 120-9.
- Chandrasekhar, S., M. A. Esterman, et al. (1987). "Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride." Anal Biochem **161**(1): 103-8.

- Chang, H., C. W. Brown, et al. (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." Endocr Rev **23**(6): 787-823.
- Chen, Y.-J. (2004). "Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats." J Orthop Res(in press).
- Chiquet, M. (1999). "Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress." Matrix Biol **18**(5): 417-26.
- Churches, A. E. and C. R. Howlett (1982). "Functional adaptation of bone in response to sinusoidally varying controlled compressive loading of the ovine metacarpus." Clin Orthop(168): 265-80.
- Clancy, R. M., J. Rediske, et al. (1997). "Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex." J Clin Invest **100**(7): 1789-96.
- Cook, S. D., S. L. Salkeld, et al. (2001). "Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound." Clin Orthop(391 Suppl): S231-43.
- Darling, E. M. and K. A. Athanasiou (2003). "Articular cartilage bioreactors and bioprocesses." Tissue Eng **9**(3): 565.
- Davisson, T., S. Kunig, et al. (2002). "Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage." J Orthop Res **20**(4): 842-8.
- Davisson, T., R. L. Sah, et al. (2002). "Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures." Tissue Eng **8**(5): 807-16.
- de Crombrughe, B., V. Lefebvre, et al. (2001). "Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 721-7.
- de Rooij, P. P., M. A. Siebrecht, et al. (2001). "The fate of mechanically induced cartilage in an unloaded environment." J Biomech **34**(7): 961-6.
- Dearden, L. C., H. D. Mosier, Jr., et al. (1986). "The effects of different steroids on costal and epiphyseal cartilage of fetal and adult rats." Cell Tissue Res **246**(2): 401-12.
- Deed, R., P. Rooney, et al. (1997). "Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan." Int J Cancer **71**(2): 251-6.
- DeHaven, K. E. and S. P. Arnoczky (1994). "Meniscus repair: basic science, indications for repair, and open repair." Instr Course Lect **43**: 65-76.
- Dennler, S., M. J. Goumans, et al. (2002). "Transforming growth factor beta signal transduction." J Leukoc Biol **71**(5): 731-40.
- Descalzi Cancedda, F., A. Melchiori, et al. (1995). "Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in vitro differentiation: dependence on extracellular matrix assembly." Eur J Cell Biol **66**(1): 60-8.
- Draenert, Y. and K. Draenert (1980). "Gap healing of compact bone." Scan Electron Microsc(4): 103-11.
- Duarte, L. R. (1983). "The stimulation of bone growth by ultrasound." Arch Orthop Trauma Surg **101**(3): 153-9.
- Duncan, R. L. and C. H. Turner (1995). "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." Calcif Tissue Int **57**(5): 344-58.
- Eckstein, F., M. Tieschky, et al. (1999). "Functional analysis of articular cartilage deformation, recovery, and fluid flow following dynamic exercise in vivo." Anat Embryol (Berl) **200**(4): 419-24.

- Elder, S. H., S. A. Goldstein, et al. (2001). "Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading." Ann Biomed Eng **29**(6): 476-82.
- Elder, S. H., J. H. Kimura, et al. (2000). "Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells." J Orthop Res **18**(1): 78-86.
- Elliott, J. P. (1988). "Time-varying magnetic fields: effects of orientation on chondrocyte proliferation." J Orthop Res(6): 259-264.
- Enneking, W. (1991). "Observations on massive retrieved human allografts." J Bone Joint Surg Am(73): 1123-42.
- Enomoto-Iwamoto, M., M. Iwamoto, et al. (1997). "Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes." J Bone Miner Res **12**(7): 1124-32.
- Eriksson, U. and K. Alitalo (2002). "VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies." Nat Med **8**(8): 775-7.
- Eyre, D. R., J. J. Wu, et al. (1987). "A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types." J Rheumatol **14 Spec No**: 25-7.
- Fanning, P. J., G. Emkey, et al. (2003). "Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage." J Biol Chem **278**(51): 50940-8.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle, et al. (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue." Biochim Biophys Acta **883**(2): 173-7.
- Farquhar, T., Y. Xia, et al. (1996). "Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact." J Orthop Res **14**(3): 417-23.
- Feinberg, R. N. and D. C. Beebe (1983). "Hyaluronate in vasculogenesis." Science **220**(4602): 1177-9.
- Fermor, B., J. B. Weinberg, et al. (2002). "Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway." Osteoarthritis Cartilage **10**(10): 792-8.
- Fernihough, J. K., M. E. Billingham, et al. (1996). "Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint." Arthritis Rheum **39**(9): 1556-65.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-8.
- Forsyth, C. (2001). "Stimulation of the alpha 5 beta 1 integrin activates MAP Kinase signaling in articular chondrocytes." Transactions of the 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society.
- Forsyth, C. B., J. Pulai, et al. (2002). "Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes." Arthritis Rheum **46**(9): 2368-76.
- Fortier, L. A., C. E. Balkman, et al. (2001). "Insulin-like growth factor-I gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury." J Orthop Res **19**(4): 720-8.
- Fortier, L. A., H. O. Mohammed, et al. (2002). "Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage." J Bone Joint Surg Br **84**(2): 276-88.
- Fosang, A. J., K. Last, et al. (1996). "Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)." FEBS Lett **380**(1-2): 17-20.

- Freed, L. E. (1994). "Composition of cell-polymer cartilage implants." Biotechnol. Bioeng.(43): 605.
- Freed, L. E., A. P. Hollander, et al. (1998). "Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system." Exp Cell Res **240**(1): 58-65.
- Freed, L. E., R. Langer, et al. (1997). "Tissue engineering of cartilage in space." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13885-90.
- Freed, L. E., I. Martin, et al. (1999). "Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis." Clin Orthop(367 Suppl): S46-58.
- Freed, L. E., G. Vunjak-Novakovic, et al. (1994). "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering." Biotechnology (N Y) **12**(7): 689-93.
- Freed, L. E., G. Vunjak-Novakovic, et al. (1993). "Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors." J Cell Biochem **51**(3): 257-64.
- Frenkel, S. R. and P. E. Di Cesare (2004). "Scaffolds for articular cartilage repair." Ann Biomed Eng **32**(1): 26-34.
- Fujisawa, T., T. Hattori, et al. (1999). "Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1." J Biochem (Tokyo) **125**(5): 966-75.
- Gannon, J. M., G. Walker, et al. (1991). "Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage." J Orthop Res **9**(4): 485-94.
- Gerber, H. P. and N. Ferrara (2003). "The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis." J Mol Med **81**(1): 20-31.
- Gerber, H. P., T. H. Vu, et al. (1999). "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." Nat Med **5**(6): 623-8.
- Ghivizzani, S. C., T. J. Oligino, et al. (2000). "Cartilage injury and repair." Phys Med Rehabil Clin N Am **11**(2): 289-307, vi.
- Giannoni, P., M. Siegrist, et al. (2003). "The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP)." Biorheology **40**(1-3): 101-9.
- Gierse, H. (2001). "Der Einfluss von PST auf humane Chondrozytenkulturen." Orthopädische Praxis **37**(5): 307-308.
- Glansbeek, H. L., H. M. van Beuningen, et al. (1998). "Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints." Lab Invest **78**(2): 133-42.
- Glowacki, J., S. Mizuno, et al. (1998). "Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture." Cell Transplant **7**(3): 319-26.
- Gooch, K. J., T. Blunk, et al. (2001). "IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development." Biochem Biophys Res Commun **286**(5): 909-15.
- Govinden, R. and K. D. Bhoola (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." Pharmacol Ther **98**(2): 257-65.
- Grande, D. A., C. Halberstadt, et al. (1997). "Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts." J Biomed Mater Res **34**(2): 211-20.
- Gray, M. L., A. M. Pizzanelli, et al. (1988). "Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response." J Orthop Res **6**(6): 777-92.
- Greco, F., N. Specchia, et al. (1992). "Ultrastructural analysis of the adaptation of articular cartilage to mechanical stimulation." Ital J Orthop Traumatol **18**(3):

311-21.

- Grimaud, E., D. Heymann, et al. (2002). "Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders." Cytokine Growth Factor Rev **13**(3): 241-57.
- Grimshaw, M. J. and R. M. Mason (2001). "Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension." Osteoarthritis Cartilage **9**(4): 357-64.
- Grodzinsky, A. J., M. E. Levenston, et al. (2000). "Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces." Annu Rev Biomed Eng **2**: 691-713.
- Gu, W. Y., W. M. Lai, et al. (1998). "A mixture theory for charged-hydrated soft tissues containing multi-electrolytes: passive transport and swelling behaviors." J Biomech Eng **120**(2): 169-80.
- Guba, M., P. von Breitenbuch, et al. (2002). "Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor." Nat Med **8**(2): 128-35.
- Guilak, F. (1995). "Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus." J Biomech **28**(12): 1529-41.
- Guilak, F. (2000). "The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage." Biorheology(37): 27-44.
- Guilak, F., D. L. Butler, et al. (2001). "Functional tissue engineering: the role of biomechanics in articular cartilage repair." Clin Orthop(391 Suppl): S295-305.
- Guilak, F., W. R. Jones, et al. (1999). "The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 59-70.
- Guilak, F., B. C. Meyer, et al. (1994). "The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants." Osteoarthritis Cartilage **2**(2): 91-101.
- Guilak, F. and V. C. Mow (2000). "The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage." J Biomech **33**(12): 1663-73.
- Guilak, F., A. Ratcliffe, et al. (1995). "Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study." J Orthop Res **13**(3): 410-21.
- Guilak, F., R. A. Zell, et al. (1999). "Mechanically induced calcium waves in articular chondrocytes are inhibited by gadolinium and amiloride." J Orthop Res **17**(3): 421-9.
- Haapala, J., J. Arokoski, et al. (2000). "Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization." Int J Sports Med **21**(1): 76-81.
- Haigh, J. J., H. P. Gerber, et al. (2000). "Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state." Development **127**(7): 1445-53.
- Hall, A. C., J. P. Urban, et al. (1991). "The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage." J Orthop Res **9**(1): 1-10.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-11.
- Hangody, L. (1997). "Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **5**(4): 262-267.

- Hansen, U., M. Schunke, et al. (2001). "Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering." J Biomech **34**(7): 941-9.
- Hardingham, T. E. and H. Muir (1972). "The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans." Biochim Biophys Acta **279**(2): 401-5.
- Harper, J. and M. Klagsbrun (1999). "Cartilage to bone--angiogenesis leads the way." Nat Med **5**(6): 617-8.
- Hattori, K., B. Heissig, et al. (2002). "Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment." Nat Med **8**(8): 841-9.
- Heath, C. A. (1996). "Mini-Review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro." Biotechnol Bioeng(50): 430.
- Heinegard, D. and M. Paulsson (1987). "Cartilage." Methods Enzymol **145**: 336-63.
- Heineken, F. (1991). "Tissue Engineering: A Brief Overview." J Biomech Eng(113): 111.
- Henderson, J. H. and D. R. Carter (2002). "Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures." Bone **31**(6): 645-53.
- Herberhold, C., S. Faber, et al. (1999). "In situ measurement of articular cartilage deformation in intact femoropatellar joints under static loading." J Biomech **32**(12): 1287-95.
- Hering, T. M., J. Kollar, et al. (1994). "Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension." Arch Biochem Biophys **314**(1): 90-8.
- Herman, J. H. and R. C. Khosla (1988). "In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism." J Rheumatol **15**(12): 1818-26.
- Hidaka, C., M. Quitoriano, et al. (2001). "Enhanced matrix synthesis and in vitro formation of cartilage-like tissue by genetically modified chondrocytes expressing BMP-7." J Orthop Res **19**(5): 751-8.
- Hirota, Y., T. Tsukazaki, et al. (2000). "Activation of specific MEK-ERK cascade is necessary for TGFbeta signaling and crosstalk with PKA and PKC pathways in cultured rat articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **8**(4): 241-7.
- Hoemann, C. D., J. Sun, et al. (2002). "A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage." Anal Biochem **300**(1): 1-10.
- Hoffmann, A. and G. Gross (2001). "BMP signaling pathways in cartilage and bone formation." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **11**(1-3): 23-45.
- Holmes, M. H., W. M. Lai, et al. (1985). "Singular perturbation analysis of the nonlinear, flow-dependent compressive stress relaxation behavior of articular cartilage." J Biomech Eng **107**(3): 206-18.
- Holmval, K., L. Camper, et al. (1995). "Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress." Exp Cell Res **221**(2): 496-503.
- Honda, K., S. Ohno, et al. (2000). "The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes." Eur J Cell Biol **79**(9): 601-9.
- Honda, K., S. Ohno, et al. (2000). "The effects of high magnitude cyclic tensile load on

- cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes." Eur J Cell Biol **79**(9): 601-9.
- Hu, P. P., M. B. Datto, et al. (1998). "Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling." Endocr Rev **19**(3): 349-63.
- Huang, J. R., S. L. Liu, et al. (2004). "[Stimulation of insulin-like growth factor-I to chondrogenesis of engineering cartilage tissue]." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **18**(1): 49-52.
- Huang, M. H., H. J. Ding, et al. (1997). "Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis." J Rheumatol **24**(10): 1978-84.
- Huang, M. H., R. C. Yang, et al. (1999). "Ultrasound effect on level of stress proteins and arthritic histology in experimental arthritis." Arch Phys Med Rehabil **80**(5): 551-6.
- Huang, Q., J. C. Goh, et al. (2002). "In Vivo Mesenchymal Cell Recruitment by a Scaffold Loaded with Transforming Growth Factor beta1 and the Potential for in Situ Chondrogenesis." Tissue Eng **8**(3): 469-82.
- Huang, W., U. I. Chung, et al. (2001). "The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 160-5.
- Huckle, J., G. Dootson, et al. (2003). "Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering." Novartis Found Symp **249**: 103-12; discussion 112-7, 170-4, 239-41.
- Hudelmaier, M., C. Glaser, et al. (2001). "Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage." Arthritis Rheum **44**(11): 2556-61.
- Hueter (1862). "Anatomische Studien an den Extremitätengelenken Neugeborener und Erwachsener." Virchows Arch(25): 572-99.
- Hulth, A., O. Johnell, et al. (1990). "Demonstration of blood-vessellike structures in cartilaginous callus by antilaminin and antiheparin sulfate proteoglycan antibodies." Clin Orthop(254): 289-93.
- Hung, C. T., D. R. Henshaw, et al. (2000). "Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization." J Biomech **33**(1): 73-80.
- Hung, C. T., M. A. LeRoux, et al. (2003). "Disparate aggrecan gene expression in chondrocytes subjected to hypotonic and hypertonic loading in 2D and 3D culture." Biorheology **40**(1-3): 61-72.
- Huszar, G., J. Maiocco, et al. (1980). "Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures." Anal Biochem **105**(2): 424-9.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.
- Ikenoue, T., M. C. Trindade, et al. (2003). "Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro." J Orthop Res **21**(1): 110-6.
- Izzo, M. W., B. Pucci, et al. (2002). "Gene expression profiling following BMP-2 induction of mesenchymal chondrogenesis in vitro." Osteoarthritis Cartilage **10**(1): 23-33.
- Jacobs, C. R., C. E. Yellowley, et al. (1998). "Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells." J Biomech **31**(11): 969-76.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified,

- culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." J Cell Biochem **64**(2): 295-312.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Jin, G., R. L. Sah, et al. (2000). "Biomechanical regulation of matrix metalloproteinase-9 in cultured chondrocytes." J Orthop Res **18**(6): 899-908.
- Jin, M., G. R. Emkey, et al. (2003). "Combined effects of dynamic tissue shear deformation and insulin-like growth factor I on chondrocyte biosynthesis in cartilage explants." Arch Biochem Biophys **414**(2): 223-31.
- Jin, M., E. H. Frank, et al. (2001). "Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants." Arch Biochem Biophys **395**(1): 41-8.
- Johansson, N., J. Westermarck, et al. (1997). "Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta." Cell Growth Differ **8**(2): 243-50.
- Johnson, L. L. (2001). "Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review." Clin Orthop(391 Suppl): S306-17.
- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." Exp Cell Res **238**(1): 265-72.
- Jones, I. L., A. Klamfeldt, et al. (1982). "The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro." Clin Orthop(165): 283-9.
- Jortikka, M. O., J. J. Parkkinen, et al. (2000). "The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure." Arch Biochem Biophys **374**(2): 172-80.
- Jurvelin, J., I. Kiviranta, et al. (1989). "Partial restoration of immobilization-induced softening of canine articular cartilage after remobilization of the knee (stifle) joint." J Orthop Res **7**(3): 352-8.
- Jurvelin, J., I. Kiviranta, et al. (1986). "Effect of physical exercise on indentation stiffness of articular cartilage in the canine knee." Int J Sports Med **7**(2): 106-10.
- Kaarniranta, K., M. A. Elo, et al. (2003). "Stress responses of mammalian cells to high hydrostatic pressure." Biorheology **40**(1-3): 87-92.
- Kaigler, D., P. H. Krebsbach, et al. (2003). "Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells." Tissue Eng **9**(1): 95-103.
- Kantomaa, T., M. Tuominen, et al. (1994). "Effect of mechanical forces on chondrocyte maturation and differentiation in the mandibular condyle of the rat." J Dent Res **73**(6): 1150-6.
- Karjalainen, H. M., R. K. Sironen, et al. (2003). "Gene expression profiles in chondrosarcoma cells subjected to cyclic stretching and hydrostatic pressure. A cDNA array study." Biorheology **40**(1-3): 93-100.
- Kellner, K., M. B. Schulz, et al. (2001). "Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application." J Drug Target **9**(6): 439-48.
- Kempson, G. E., M. A. Tuke, et al. (1976). "The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage." Biochim Biophys Acta **428**(3): 741-60.

- Kessler, D., S. Dethlefsen, et al. (2001). "Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype." *J Biol Chem* **276**(39): 36575-85.
- Kim, B. S. and D. J. Mooney (2000). "Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions." *J Biomech Eng* **122**(3): 210-5.
- Kim, J. M. and M. S. Moon (1979). "Effect of synovectomy upon regeneration of meniscus in rabbits." *Clin Orthop*(141): 287-94.
- Kim, K. J., B. Li, et al. (1992). "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies." *Growth Factors* **7**(1): 53-64.
- Kim, Y. J., L. J. Bonassar, et al. (1995). "The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression." *J Biomech* **28**(9): 1055-66.
- Kim, Y. J., A. J. Grodzinsky, et al. (1996). "Compression of cartilage results in differential effects on biosynthetic pathways for aggrecan, link protein, and hyaluronan." *Arch Biochem Biophys* **328**(2): 331-40.
- Kim, Y. J., R. L. Sah, et al. (1988). "Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258." *Anal Biochem* **174**(1): 168-76.
- Kim, Y. J., R. L. Sah, et al. (1994). "Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli." *Arch Biochem Biophys* **311**(1): 1-12.
- Kiviranta, I., M. Tammi, et al. (1988). "Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs." *J Orthop Res* **6**(2): 188-95.
- Klompaker, J., H. W. Jansen, et al. (1991). "Porous polymer implant for repair of meniscal lesions: a preliminary study in dogs." *Biomaterials* **12**(9): 810-6.
- Klompaker, J., R. P. Veth, et al. (1996). "Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity." *Biomaterials* **17**(17): 1685-91.
- Knauper, V., C. Lopez-Otin, et al. (1996). "Biochemical characterization of human collagenase-3." *J Biol Chem* **271**(3): 1544-50.
- Knudson, W., D. J. Aguiar, et al. (1996). "CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis." *Exp Cell Res* **228**(2): 216-28.
- Kristiansen, T. K., J. P. Ryaby, et al. (1997). "Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study." *J Bone Joint Surg Am* **79**(7): 961-73.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." *Nature* **423**(6937): 332-6.
- Kujawa, M. J., D. A. Carrino, et al. (1986). "Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size-dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture." *Dev Biol* **114**(2): 519-28.
- Kulyk, W. M., B. J. Rodgers, et al. (1989). "Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta." *Dev Biol* **135**(2): 424-30.
- Kurrat, H. J. and W. Oberlander (1978). "The thickness of the cartilage in the hip joint." *J Anat* **126**(1): 145-55.
- Kurz, B., M. Jin, et al. (2001). "Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression." *J Orthop Res* **19**(6): 1140-6.

- Lai, W. M., V. C. Mow, et al. (2000). "On the electric potentials inside a charged soft hydrated biological tissue: streaming potential versus diffusion potential." J Biomech Eng **122**(4): 336-46.
- Lane, J. M., M. Suda, et al. (1986). "Immunofluorescent localization of structural collagen types in endochondral fracture repair." J Orthop Res **4**(3): 318-29.
- Lane, L. B. and P. G. Bullough (1980). "Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage." J Bone Joint Surg Br **62**(3): 372-5.
- Larsson, T., R. M. Aspden, et al. (1991). "Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis in vitro." Matrix **11**(6): 388-94.
- Lee, D. A., T. Noguchi, et al. (2000). "The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs." Biorheology **37**(1-2): 149-61.
- Lee, H. S., S. J. Millward-Sadler, et al. (2002). "Activation of Integrin-RACK1/PKC $\alpha$  signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction." Osteoarthritis Cartilage **10**(11): 890-7.
- Lee, M. S., T. Ikenoue, et al. (2003). "Protective effects of intermittent hydrostatic pressure on osteoarthritic chondrocytes activated by bacterial endotoxin in vitro." J Orthop Res **21**(1): 117-22.
- Lee, M. S., M. C. Trindade, et al. (2002). "Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro." J Orthop Res **20**(3): 556-61.
- Li, J. K., W. H. Chang, et al. (2003). "Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation." Biomaterials **24**(13): 2379-85.
- Li, X. (1996). "Detection of Apoptosis and DNA Replication by Differential Labeling of DNA Strand Breaks with Fluorochromes of Different Color." Exp Cell Res **222**: 28-37.
- Liacini, A., J. Sylvester, et al. (2002). "Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes." Matrix Biol **21**(3): 251-62.
- Liekens, S., E. De Clercq, et al. (2001). "Angiogenesis: regulators and clinical applications." Biochem Pharmacol **61**(3): 253-70.
- Loening, A. M., I. E. James, et al. (2000). "Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis." Arch Biochem Biophys **381**(2): 205-12.
- Loeser, R. F. (1993). "Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins." Arthritis Rheum **36**(8): 1103-10.
- Loeser, R. F. (2000). "Chondrocyte integrin expression and function." Biorheology **37**(1-2): 109-16.
- Loeser, R. F. (2002). "Integrins and cell signaling in chondrocytes." Biorheology **39**(1-2): 119-24.
- Loeser, R. F., C. B. Forsyth, et al. (2003). "Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway." J Biol Chem **278**(27): 24577-85.
- Loeser, R. F., S. Sadiev, et al. (2000). "Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI

- collagen." Osteoarthritis Cartilage **8**(2): 96-105.
- Lucchinetti, E., C. S. Adams, et al. (2002). "Cartilage viability after repetitive loading: a preliminary report." Osteoarthritis Cartilage **10**(1): 71-81.
- Lucchinetti, E., M. M. Bhargava, et al. (2004). "The effect of mechanical load on integrin subunits alpha5 and beta1 in chondrocytes from mature and immature cartilage explants." Cell Tissue Res **315**(3): 385-91.
- Luttun, A., M. Tjwa, et al. (2002). "Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1." Nat Med **8**(8): 831-40.
- Ma, P. X., B. Schloo, et al. (1995). "Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage." J Biomed Mater Res **29**(12): 1587-95.
- Maaser, K., P. Grabowski, et al. (2002). "Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer." Clin Cancer Res **8**(10): 3205-9.
- Maeda, S., M. Yoshida, et al. (2001). "Effects of mechanical stimulation on gene expression of articular chondrocytes in polylayer culture." Tohoku J Exp Med **193**(4): 301-10.
- Majumdar, M. K., E. Wang, et al. (2001). "BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1." J Cell Physiol **189**(3): 275-84.
- Malaviya, P. (1998). "Fluid-induced shear stresses promote chondrocyte phenotype alteration." Trans. Annu. Meet. Orthop. Res. Soc(23): 228.
- Martin, I., B. Obradovic, et al. (2000). "Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage." Biorheology **37**(1-2): 141-7.
- Mauck, R. L., C. T. Hung, et al. (2003). "Modeling of neutral solute transport in a dynamically loaded porous permeable gel: implications for articular cartilage biosynthesis and tissue engineering." J Biomech Eng **125**(5): 602-14.
- Mauck, R. L., S. B. Nicoll, et al. (2003). "Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering." Tissue Eng **9**(4): 597-611.
- Mauck, R. L., M. A. Soltz, et al. (2000). "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels." J Biomech Eng **122**(3): 252-60.
- Mayr, E. (2000). "[More rapid recovery after fracture. When can ultrasound accelerate healing?. Interview by Petra Eiden.]" MMW Fortschr Med **142**(35): 10.
- Mayr, E., C. Mockl, et al. (2002). "[Is low intensity ultrasound effective in treatment of disorders of fracture healing?]" Unfallchirurg **105**(2): 108-15.
- Mayr-Wohlfart, U., J. Waltenberger, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts." Bone **30**(3): 472-7.
- Mehra, A. and J. L. Wrana (2002). "TGF-beta and the Smad signal transduction pathway." Biochem Cell Biol **80**(5): 605-22.
- Mentre, P. and G. Hui Bon Hoa (2001). "Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water." Int Rev Cytol **201**: 1-84.
- Messner, K. (1996). "The longterm prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. A 14 year clinical and radiographic follow-up in 28 young

- athelets." Acta Orthop Scand(67): 165-68.
- Millward-Sadler, S. J., M. O. Wright, et al. (2000). "Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes." Arthritis Rheum **43**(9): 2091-9.
- Millward-Sadler, S. J., M. O. Wright, et al. (2000). "Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage." Osteoarthritis Cartilage **8**(4): 272-8.
- Millward-Sadler, S. J., M. O. Wright, et al. (1999). "Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes." J Cell Biol **145**(1): 183-9.
- Miyazono, K., K. Kusanagi, et al. (2001). "Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling." J Cell Physiol **187**(3): 265-76.
- Mizuno, S., T. Tateishi, et al. (2002). "Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture." J Cell Physiol **193**(3): 319-27.
- Mobasheri, A., S. D. Carter, et al. (2002). "Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes." Cell Biol Int **26**(1): 1-18.
- Mobasheri, A., R. Mobasheri, et al. (1998). "Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca<sup>2+</sup>] and pH." Histol Histopathol **13**(3): 893-910.
- Morales, T. I. (1991). "Transforming growth factor-beta 1 stimulates synthesis of proteoglycan aggregates in calf articular cartilage organ cultures." Arch Biochem Biophys **286**(1): 99-106.
- Mortimer, A. J. and M. Dyson (1988). "The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts." Ultrasound Med Biol **14**(6): 499-506.
- Moses, M. A., D. Wiederschain, et al. (1999). "Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2645-50.
- Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, et al. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4359-69.
- Mow, V. C., S. C. Kuei, et al. (1980). "Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments." J Biomech Eng **102**(1): 73-84.
- Mow, V. C., A. Ratcliffe, et al. (1992). "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures." Biomaterials **13**(2): 67-97.
- Mow, V. C., A. Ratcliffe, et al. (1991). "Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a high weight bearing area of the knee joint: a tissue engineering study." J Biomech Eng **113**(2): 198-207.
- Mow, V. C. and C. C. Wang (1999). "Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage." Clin Orthop(367 Suppl): S204-23.
- Mow, V. C., C. C. Wang, et al. (1999). "The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 41-58.
- Muir, H., P. Bullough, et al. (1970). "The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications." J Bone Joint Surg Br **52**(3): 554-63.

- Mushtaq, T. and S. F. Ahmed (2002). "The impact of corticosteroids on growth and bone health." Arch Dis Child **87**(2): 93-6.
- Nagai, H. and M. Aoki (2002). "Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats." J Bone Miner Metab **20**(3): 142-7.
- Naruse, K., Y. Mikuni-Takagaki, et al. (2000). "Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 216-20.
- Nguyen, Q., G. Murphy, et al. (1989). "Degradation of proteoglycan aggregate by a cartilage metalloproteinase. Evidence for the involvement of stromelysin in the generation of link protein heterogeneity in situ." Biochem J **259**(1): 61-7.
- Nixon, A. J., J. T. Lillich, et al. (1998). "Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta." J Orthop Res **16**(5): 531-41.
- Nolte, P. A., J. Klein-Nulend, et al. (2001). "Low-intensity ultrasound stimulates endochondral ossification in vitro." J Orthop Res **19**(2): 301-7.
- Nolte, P. A., A. van der Krans, et al. (2001). "Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions." J Trauma **51**(4): 693-702; discussion 702-3.
- Ohno, M., J. P. Cooke, et al. (1995). "Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade." J Clin Invest **95**(3): 1363-9.
- Okazaki, R., A. Sakai, et al. (2001). "Sequential changes in transforming growth factor (TGF)-beta1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TGF-beta1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbit knees." J Bone Miner Metab **19**(4): 228-35.
- Osborn, K. D., S. B. Trippel, et al. (1989). "Growth factor stimulation of adult articular cartilage." J Orthop Res **7**(1): 35-42.
- Pacifici, M. (1990). "Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment." Biochem J **272**(1): 193-9.
- Padgett, R. W., S. H. Cho, et al. (1998). "Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling." Pharmacol Ther **78**(1): 47-52.
- Padgett, R. W., P. Das, et al. (1998). "TGF-beta signaling, Smads, and tumor suppressors." Bioessays **20**(5): 382-90.
- Palmoski, M. J. and K. D. Brandt (1984). "Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro." Arthritis Rheum **27**(6): 675-81.
- Pan, W. T. (1992). "The biochemistry of fracture healing." Curr Orthop(6): 207-213.
- Parkkinen, J. J., J. Ikonen, et al. (1993). "Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants." Arch Biochem Biophys **300**(1): 458-65.
- Parkkinen, J. J., M. J. Lammi, et al. (1992). "Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro." J Orthop Res **10**(5): 610-20.
- Parkkinen, J. J., M. J. Lammi, et al. (1993). "Altered Golgi apparatus in hydrostatically loaded articular cartilage chondrocytes." Ann Rheum Dis **52**(3): 192-8.
- Parvizi, J., V. Parpura, et al. (2002). "Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes." J Orthop Res **20**(1): 51-7.

- Parvizi, J., C. C. Wu, et al. (1999). "Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression." J Orthop Res **17**(4): 488-94.
- Pauwels (1941). Grundriß einer Biomechanik der Frakturheilung. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag.
- Pavasant, P., T. Shizari, et al. (1996). "Hyaluronan synthesis by epiphyseal chondrocytes is regulated by growth hormone, insulin-like growth factor-1, parathyroid hormone and transforming growth factor-beta 1." Matrix Biol **15**(6): 423-32.
- Pawelek, J. M. (1969). "Effects of thyroxine and low oxygen tension on chondrogenic expression in cell culture." Dev Biol **19**(1): 52-72.
- Pazzano, D., K. A. Mercier, et al. (2000). "Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture." Biotechnol Prog **16**(5): 893-6.
- Piek, E., C. H. Heldin, et al. (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." Faseb J **13**(15): 2105-24.
- Pilla, A. A., M. A. Mont, et al. (1990). "Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit." J Orthop Trauma **4**(3): 246-53.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Poole, C. A., M. H. Flint, et al. (1988). "Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure." J Orthop Res **6**(3): 408-19.
- Port, J., D. W. Jackson, et al. (1996). "Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model." Am J Sports Med **24**(4): 547-55.
- Prendergast, P. J., R. Huiskes, et al. (1997). "ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces." J Biomech **30**(6): 539-48.
- Pufe, T., B. Wildemann, et al. (2002). "Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat." Cell Tissue Res **309**(3): 387-92.
- Pujol, J. P., P. Galera, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and articular chondrocytes." Ann Endocrinol (Paris) **55**(2): 109-20.
- Quinn, T. M., A. J. Grodzinsky, et al. (1998). "Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants." J Cell Sci **111**(Pt 5): 573-83.
- Ragan, P. M. (2000). "Chondrocyte gene expression of aggrecan and type II A collagen is upregulated by dynamic compression and the response is related to the surrounding extracellular matrix density." Trans. Orthop. Res. Soc.(25): 639.
- Ratcliffe, A., P. R. Fryer, et al. (1984). "The distribution of aggregating proteoglycans in articular cartilage: comparison of quantitative immunoelectron microscopy with radioimmunoassay and biochemical analysis." J Histochem Cytochem **32**(2): 193-201.
- Rawool, D. (1998). "Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound." Trans. Radiol. Soc. North. Am.(83): 1185.
- Rayan, V. and T. Hardingham (1994). "The recovery of articular cartilage in explant culture from interleukin-1 alpha: effects on proteoglycan synthesis and degradation." Matrix Biol **14**(3): 263-71.

- Reddy, G. K. and C. S. Enwemeka (1996). "A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues." Clin Biochem **29**(3): 225-9.
- Redini, F., P. Galera, et al. (1988). "Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes." FEBS Lett **234**(1): 172-6.
- Reher, P. (1997). "Ultrasound for the treatment of osteoradionecrosis." J Oral Maxillofac Surg **55**(10): 1193-4.
- Reher, P., N. Doan, et al. (1999). "Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF." Cytokine **11**(6): 416-23.
- Reid, D. L., M. B. Aydelotte, et al. (2000). "Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes." J Orthop Res **18**(3): 364-73.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
- Risbud, M., J. Ringe, et al. (2001). "In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue." Cell Transplant **10**(8): 755-63.
- Roberts, S. R., M. M. Knight, et al. (2001). "Mechanical compression influences intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in chondrocytes seeded in agarose constructs." J Appl Physiol **90**(4): 1385-91.
- Ronsky, J. L., W. Herzog, et al. (1995). "In vivo quantification of the cat patellofemoral joint contact stresses and areas." J Biomech **28**(8): 977-83.
- Rooney, P. and S. Kumar (1993). "Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis." Differentiation **54**(1): 1-9.
- Roux (1881). Der Kampf der Teile im Organismus. Leipzig, Engelmann.
- Rubin, C. T. and L. E. Lanyon (1984). "Regulation of bone formation by applied dynamic loads." J Bone Joint Surg Am **66**(3): 397-402.
- Rushfeldt, P. D., R. W. Mann, et al. (1981). "Improved techniques for measuring in vitro the geometry and pressure distribution in the human acetabulum. II Instrumented endoprosthesis measurement of articular surface pressure distribution." J Biomech **14**(5): 315-23.
- Ryaby, J. T. (1989). "Low-intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures." Trans. Orthop. Res. Soc.(14): 15.
- Ryaby, J. T. (1992). "Low-intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF- $\beta$  synthesis in osteoblastic cells." Trans. Orthop. Res. Soc.(17): 590.
- Sachs, F. (1991). "Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review." Mol Cell Biochem **104**(1-2): 57-60.
- Sah, R. L., J. Y. Doong, et al. (1991). "Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants." Arch Biochem Biophys **286**(1): 20-9.
- Sah, R. L., Y. J. Kim, et al. (1989). "Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression." J Orthop Res **7**(5): 619-36.
- Sakurakichi, K. (2004). "Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis." J Orthop Res(in press).
- Sakurakichi, K., H. Tsuchiya, et al. (2004). "Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis." J Orthop Res **22**(2): 395-403.
- Salter, D. M., S. J. Millward-Sadler, et al. (2002). "Differential responses of chondrocytes from normal and osteoarthritic human articular cartilage to

- mechanical stimulation." Biorheology **39**(1-2): 97-108.
- Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandy, J. D., C. R. Flannery, et al. (1992). "The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain." J Clin Invest **89**(5): 1512-6.
- Sasano, Y., M. Furusawa, et al. (1996). "Chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage." Anat Embryol (Berl) **194**(3): 247-52.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-44.
- Schild, C. and B. Trueb (2002). "Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor." Exp Cell Res **274**(1): 83-91.
- Schott, R. J. and L. A. Morrow (1993). "Growth factors and angiogenesis." Cardiovasc Res **27**(7): 1155-61.
- Segat, D., R. Comai, et al. (2002). "Integrins alpha(6A)beta 1 and alpha(6B)beta 1 promote different stages of chondrogenic cell differentiation." J Biol Chem **277**(35): 31612-22.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J **9**(9): 726-35.
- Sekiya, I., D. C. Colter, et al. (2001). "BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells." Biochem Biophys Res Commun **284**(2): 411-8.
- Sekiya, I., P. Koopman, et al. (2001). "Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes." J Endocrinol **169**(3): 573-9.
- Seko, Y., N. Takahashi, et al. (1999). "Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes." Biochem Biophys Res Commun **254**(2): 462-5.
- Seo, D. W., H. Li, et al. (2003). "TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism." Cell **114**(2): 171-80.
- Setton, L. A., F. Guilak, et al. (1999). "Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair." Clin Orthop(367 Suppl): S254-72.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-6.
- Shapiro, F., S. Koide, et al. (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **75**(4): 532-53.
- Shen, X., P. P. Hu, et al. (1998). "TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein." Mol Biol Cell **9**(12): 3309-19.
- Shukunami, C., H. Akiyama, et al. (2000). "Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells." FEBS Lett **469**(1): 83-7.
- Shukunami, C., K. Iyama, et al. (1999). "Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral bone formation." Int J Dev Biol **43**(1): 39-49.
- Siebler, T., H. Robson, et al. (2001). "Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for the growth plate." Horm Res **56 Suppl 1**:

---

7-12.

- Silverman, R. P., D. Passaretti, et al. (1999). "Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer." Plast Reconstr Surg **103**(7): 1809-18.
- Sironen, R., M. Elo, et al. (2000). "Transcriptional activation in chondrocytes submitted to hydrostatic pressure." Biorheology **37**(1-2): 85-93.
- Sittinger, M., C. Perka, et al. (1999). "Joint cartilage regeneration by tissue engineering." Z Rheumatol **58**(3): 130-5.
- Skalak, R. (1988). Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. New York, Alan Liss.
- Smith, J. D., N. Davies, et al. (2001). "Cyclic stretch induces the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells." Endothelium **8**(1): 41-8.
- Smith, R. L., B. S. Donlon, et al. (1995). "Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro." J Orthop Res **13**(6): 824-31.
- Smith, R. L., J. Lin, et al. (2000). "Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression." J Rehabil Res Dev **37**(2): 153-61.
- Smith, R. L., S. F. Rusk, et al. (1996). "In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure." J Orthop Res **14**(1): 53-60.
- Smith, R. L., K. D. Thomas, et al. (1992). "Rabbit knee immobilization: bone remodeling precedes cartilage degradation." J Orthop Res **10**(1): 88-95.
- Solchaga, L. A., J. E. Dennis, et al. (1999). "Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage." J Orthop Res **17**(2): 205-13.
- Solchaga, L. A., J. U. Yoo, et al. (2000). "Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects." J Orthop Res **18**(5): 773-80.
- Soltz, M. A. and G. A. Ateshian (2000). "Interstitial fluid pressurization during confined compression cyclical loading of articular cartilage." Ann Biomed Eng **28**(2): 150-9.
- Sommarin, Y., T. Larsson, et al. (1989). "Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage." Exp Cell Res **184**(1): 181-92.
- Stegemann, H. and K. Stalder (1967). "Determination of hydroxyproline." Clin Chim Acta **18**(2): 267-73.
- Stoltz, J. F. and X. Wang (2002). "From biomechanics to mechanobiology." Biorheology **39**(1-2): 5-10.
- Street, J., M. Bao, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9656-61.
- Su, S., J. A. DiBattista, et al. (1998). "Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in articular chondrocytes is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases." J Cell Biochem **70**(4): 517-27.
- Suh, J. K., Z. Li, et al. (1995). "Dynamic behavior of a biphasic cartilage model under cyclic compressive loading." J Biomech **28**(4): 357-64.
- Suriawinata, A. (2004). "TIMP-2 inhibits angiogenesis, independent of MMP mechanism." Lab Invest **84**(1): 6-7.

- Suzuki, F. (1996). "Roles of cartilage matrix proteins, chondromodulin-I and -II, in endochondral bone formation: a review." Connect Tissue Res **35**(1-4): 303-7.
- Tagil, M. and P. Aspenberg (1999). "Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo." J Orthop Res **17**(2): 200-4.
- Takahashi, I., G. H. Nuckolls, et al. (1998). "Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells." J Cell Sci **111**(Pt 14): 2067-76.
- Takahashi, K., T. Kubo, et al. (1998). "Hydrostatic pressure induces expression of interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha mRNAs in a chondrocyte-like cell line." Ann Rheum Dis **57**(4): 231-6.
- Takahashi, K., T. Kubo, et al. (1997). "Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line." J Orthop Res **15**(1): 150-8.
- Tamura, I., J. Rosenbloom, et al. (2001). "Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways." Am J Physiol Cell Physiol **281**(5): C1524-32.
- ten Dijke, P., K. Miyazono, et al. (2000). "Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling." Trends Biochem Sci **25**(2): 64-70.
- ter Haar, G. (1999). "Therapeutic ultrasound." Eur J Ultrasound **9**(1): 3-9.
- Thomas, G. P. and A. J. el Haj (1996). "Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro." Calcif Tissue Int **58**(2): 101-8.
- Torzilli, P. A., R. Grigiene, et al. (1997). "Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system." J Biomech **30**(1): 1-9.
- Toyoda, T., B. B. Seedhom, et al. (2003). "Upregulation of aggrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure." Biorheology **40**(1-3): 79-85.
- Trippel, S. B. (1995). "Growth factor actions on articular cartilage." J Rheumatol Suppl **43**: 129-32.
- Trueta, J. (1968). "[Anatomy of blood vessels of the femur head and its sensitivity to traumatic damage]." Hefte Unfallheilkd **97**: 18-28.
- Tsuchiya, H., H. Kitoh, et al. (2003). "Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 338-43.
- Tuan, R. S. (2003). "Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 137-41.
- Tuan, R. S., G. Boland, et al. (2003). "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering." Arthritis Res Ther **5**(1): 32-45.
- Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk." J Biol Chem **278**(42): 41227-36.
- Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone." Stem Cells **21**(6): 681-93.
- Turpaev, K., D. Litvinov, et al. (2001). "Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in cultured human articular chondrocytes." Biochimie **83**(6): 515-22.

- Urban, J. P., A. C. Hall, et al. (1993). "Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes." J Cell Physiol **154**(2): 262-70.
- van Beuningen, H. M., P. M. van der Kraan, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint." Lab Invest **71**(2): 279-90.
- van der Kraan, P., E. Vitters, et al. (1992). "Differential effect of transforming growth factor beta on freshly isolated and cultured articular chondrocytes." J Rheumatol **19**(1): 140-5.
- van der Meulen, M. C. and R. Huiskes (2002). "Why mechanobiology?. A survey article." J Biomech **35**(4): 401-14.
- van Kampen, G. P., J. P. Veldhuijzen, et al. (1985). "Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures." Arthritis Rheum **28**(4): 419-24.
- van Susante, J. L., P. Buma, et al. (2000). "Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations." J Orthop Res **18**(1): 68-77.
- Vanwanseele, B., F. Eckstein, et al. (2002). "Knee cartilage of spinal cord-injured patients displays progressive thinning in the absence of normal joint loading and movement." Arthritis Rheum **46**(8): 2073-8.
- Vanwanseele, B., E. Lucchinetti, et al. (2002). "The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions." Osteoarthritis Cartilage **10**(5): 408-19.
- Vico, L., M. Hinsenkamp, et al. (2001). "Osteobiology, strain, and microgravity. Part II: studies at the tissue level." Calcif Tissue Int **68**(1): 1-10.
- Villars, F., L. Bordenave, et al. (2000). "Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF?" J Cell Biochem **79**(4): 672-85.
- Volkman (1962). "Chirurgische Erfahrungen über Knochenverbiegungen und Knochenwachstum." Arch Pathol Anat(24): 512-40.
- von Bubnoff, A. and K. W. Cho (2001). "Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?" Dev Biol **239**(1): 1-14.
- von der Mark, K. and J. Mollenhauer (1997). "Annexin V interactions with collagen." Cell Mol Life Sci **53**(6): 539-45.
- von Eisenhart, R., C. Adam, et al. (1999). "Quantitative determination of joint incongruity and pressure distribution during simulated gait and cartilage thickness in the human hip joint." J Orthop Res **17**(4): 532-9.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-33.
- Vunjak-Novakovic, G. (1996). "Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage." AIChE J.(42): 850.
- Vunjak-Novakovic, G., B. Obradovic, et al. (2002). "Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage." Biorheology **39**(1-2): 259-68.
- Wallace, A. L., E. R. Draper, et al. (1994). "The vascular response to fracture micromovement." Clin Orthop(301): 281-90.
- Walsh, C. J., D. Goodman, et al. (1999). "Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model." Tissue Eng **5**(4): 327-37.
- Warden, S. J., K. L. Bennell, et al. (2000). "Acceleration of fresh fracture repair using the sonic accelerated fracture healing system (SAFHS): a review." Calcif Tissue

- Int **66**(2): 157-63.
- Webadresse1 [www.vascularweb.org](http://www.vascularweb.org).
- Webadresse2 "[www.flexcell.com](http://www.flexcell.com)."
- Webadresse3 "[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)."
- Webadresse4  
"[www.cambrexbioproductseurope.com/poieticsmesanchymalproductlist.htm](http://www.cambrexbioproductseurope.com/poieticsmesanchymalproductlist.htm)."
- Wheatley, S. C., C. M. Isacke, et al. (1993). "Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning." Development **119**(2): 295-306.
- Williamson, A. K., A. C. Chen, et al. (2001). "Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage." J Orthop Res **19**(6): 1113-21.
- Willimczik, K. (1989). Biomechanik der Sportarten. Reinbek bei Hamburg, Rowohlt Verlag.
- Winet, H. (1996). "The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy." Bone **19**(1 Suppl): 39S-57S.
- Wong, M. and D. R. Carter (2003). "Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective." Bone **33**(1): 1-13.
- Wong, M., M. Siegrist, et al. (1999). "Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins." Matrix Biol **18**(4): 391-9.
- Wong, M., P. Wuethrich, et al. (1997). "Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage." J Orthop Res **15**(2): 189-96.
- Wong, M., P. Wuethrich, et al. (1996). "Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography." J Orthop Res **14**(3): 424-32.
- Wright, M. O., K. Nishida, et al. (1997). "Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for alpha 5 beta 1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor." J Orthop Res **15**(5): 742-7.
- Wright, M. O., R. A. Stockwell, et al. (1992). "Response of plasma membrane to applied hydrostatic pressure in chondrocytes and fibroblasts." Connect Tissue Res **28**(1-2): 49-70.
- Wu, C. W. (1996). "Exposure to low-intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes." Trans. Orthop. Res. Soc.(21): 622.
- Wu, C. W., E. V. Tchetina, et al. (2002). "Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization." J Bone Miner Res **17**(4): 639-51.
- Wu, Q., Y. Zhang, et al. (2001). "Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation." J Biol Chem **276**(38): 35290-6.
- Wu, Q. Q. and Q. Chen (2000). "Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals." Exp Cell Res **256**(2): 383-91.
- Xu, Z., M. J. Buckley, et al. (2000). "Cyclic tensile strain acts as an antagonist of IL-1 beta actions in chondrocytes." J Immunol **165**(1): 453-60.

- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.
- Yang, K. H., J. Parvizi, et al. (1996). "Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model." J Orthop Res **14**(5): 802-9.
- Yasuda, T. (1995). "Effects of dexamethasone on terminal differentiation and matrix mineralisation in rat growth plate chondrocyte cultures." Biomedical Research(16): 319-325.
- Yoo, J. U., T. S. Barthel, et al. (1998). "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells." J Bone Joint Surg Am **80**(12): 1745-57.
- Young, S. R. and M. Dyson (1990). "Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions." Ultrasonics **28**(3): 175-80.
- Zhang, Z. J., J. Huckle, et al. (2002). "The influence of pulsed low-intensity ultrasound on matrix production of chondrocytes at different stages of differentiation: an explant study." Ultrasound Med Biol **28**(11-12): 1547-53.
- Zhang, Z. J., J. Huckle, et al. (2003). "The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production." Ultrasound Med Biol **29**(11): 1645-51.
- Zimmerman, C. M. and R. W. Padgett (2000). "Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators." Gene **249**(1-2): 17-30.
- Ziros, P. G., A. P. Gil, et al. (2002). "The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells." J Biol Chem **277**(26): 23934-41.

## **8. Abkürzungen**

ABTS	2'2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure)
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
DAB	Diamminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMMB	Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DPM	Decays per minute
ECM	Extrazellulärmatrix
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCD	Fixed Charge Density
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FTE	Functional Tissue Engineering
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HBC	Hydraulic Bone Chamber
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IGF	Insulin like growth Factor
i.v.	intravenös
kD	kilo Dalton
KDR	Kinase-insert Domain Receptor
kHz	kilo Hertz
kPa	kilo Pascal

LIPUS	Low-intensity pulsed ultrasound
MAP	Mitogen Activated Protein
MHz	Megahertz
MSC	mesenchymal progenitor cells
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NFκB	Nuklear Faktor κB
Pa	Pascal
PBS	Phosphate Buffered Saline
pC	pico Coulomb = elektrische Ladung Q
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGA	Polyglykolsäure
PI	Propidiumiodid
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
POX	Peroxidase
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAFHS	Sonic Accelerated Fracture Healing System
SOX	Sry-type-HMG box
TIMP	Tissue Inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor necrosis factor
TGF	Transforming Growth Factor
TUNEL	Terminal Desoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick End Labeling
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, bedanken:

Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich sage ich Dank für die Überlassung eines hoch interessanten Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Förderung zur Teilnahme an Fortbildungen und zahlreichen Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich möchte ich für die Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, danken. Die Promotion wurde mir dadurch erst ermöglicht.

Insbesondere gilt mein Dank Dr. Peter Angele und Dr. Richard Kujat für ihre vorbildliche Betreuung und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Die zahlreichen Anregungen und intensiven wie produktiven Diskussionen haben zum großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Tanja Weinfurter möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der molekularen Analyse und ihre Freundschaft danken.

Frau Daniela Drenkard für ihre zahlreichen konstruktiven Lösungsvorschläge und ihrer Unterstützung bei den „kontaminationsfreudigen“ Versuchen.

Mein herzlicher Dank geht auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Angele. Es hat täglich Spaß gemacht in dieser Atmosphäre zu arbeiten. Wir haben viel zusammen gelacht, wodurch man über so manches nicht gelungene Experiment leichter hinwegkam.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Verlobten Cornelia bedanken, die mich seit Beginn meines Studiums und auch während der Promotion bestens unterstützt und auf diesem Weg bestärkt haben.

## 10. Publikationen

Angele P, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Müller R, Nerlich M.

Biodegradable hyaluronan-ester/gelatin composite matrices for osteochondral differentiation of mesenchymal progenitor cells.

Biomaterialien 4 (1): 11-18 (2003)

Angele P, Schumann D, Nerlich M, Kujat R.

Cyclic, mechanical compression of mesenchymal progenitor cells enhances the expression of chondrogenic markers in tissue engineering scaffolds.

Biorheology (2004) (im Druck)

Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R.

Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices.

Biomaterials 25 (14): 2831-41 (2004)

Angele P., Schumann D., v Breitenbuch P., Kujat R., Steinbauer M., Nerlich M.

Intravital Microscopy shows different angiogenic effects in cell-based tissue engineering constructs depending on their cellular stage of differentiation

Tissue Engineering 9 (4): 830 (2003)

Angele, P., Schumann, D., Breitenbuch, P.v., Kujat, R., Guba,M., Nerlich, M.

Differenzierungsabhängiger Einfluß von Tissue-Engineering-Produkten auf das Angiogeneseverhalten.

Hefte zum „Unfallchirurg“: 292-294 (2002)

Angele P., Schumann D., v. Breitenbuch P., Koehl G., Kujat R., Steinbauer M., Guba M., Nerlich M.

Cell-based Tissue Engineered constructs show different angiogenic effects depending on their cellular stage of differentiation

Trans Ortho Res Soc 965 (2003)

Peter Angele, Detlef Schumann, Michael Nerlich, Richard Kujat

Enhanced chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells loaded in Tissue Engineering Scaffolds by cyclic, mechanical compression.

Trans Ortho Res Soc 835 (2004)

Angele P., Winkler F., Kujat R., Pöppel N., Schumann D., Angele MK., Kinner B., Nerlich M.

Integrin-expression during chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and meniscal cells in comparison to native meniscus.

Trans Ortho Res Soc 884 (2003)

Schumann, D., Breitenbuch, P., Angele, P., Kujat, R., Steinbauer, M., Nerlich, M.

Intravitalmicroscopy for the Online-Monitoring of angiogenesis in Tissue Engineering Products for repair of osteochondral defects.

Eur J Trauma 28:28-29 (2002).

Schumann, D., Breitenbuch, P.v., Kujat, R., Steinbauer, M., Guba, M., Nerlich, M., Angele, P.

Intravitalmikroskopie zum Online-Monitoring der Angiogenese in Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reperatur osteochondraler Defekte.

Langenbeck Arch Chir; Suppl.I: 477-479 (2002).

D. Schumann, R. Kujat, M. Nerlich, P. Ulanski, M. Angele, P. Angele

Radiation crosslinking of polyvinylpyrrolidone: A new method for the physicochemical stabilization of Tissue Engineering scaffolds.

Biomaterials Supplement (2003)

D. Schumann, R. Kujat, M. Nerlich, P. Angele

Influence of low-intensity pulsed ultrasound on the chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.

Tissue Engineering 9 (4): 799-800 (2003)

D. Schumann, R. Kujat, M. Nerlich, P. Angele

Influence of cyclic, biomechanical compression on the chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.

Tissue Engineering 9 (4): 800 (2003)

M. Nerlich, D. Schumann, R. Kujat, P. Angele

Mechanobiological conditioning on mesenchymal stem cells during chondrogenesis

Shock, Vol. 21, Supplement: 136 (2004)

Winkler, F., Angele, P., Kujat, R., Pöpl, N., Schumann, D., Nerlich, M.

Integrinexpression during chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and meniscal cells.

Eur J Trauma; 28:131 (2002)

### **Forschungspreise**

Günther Schlag Memorial Award for the best presentation of a young scientist: age under 35; für die Arbeit:

Intravitalmicroscopy for the Online-Monitoring of angiogenesis in Tissue Engineering Products for repair of osteochondral defects.

Eurotrauma Kongress 2002, Wien

Forumspreis "Experimentelle Unfallchirurgie" 2003 der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, für die Arbeit:

Einfluß von zyklischer, biomechanischer Kompression auf chondrogene

Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Tissue Engineering-Matrices

Dt Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2003

### **Präsentationen nach Einladung**

Different angiogenic effects in Tissue Engineered Products depending on their cellular stage of differentiation

Innovations in Children Surgery 2002, Münster

Cyclic, mechanical compression of mesenchymal progenitor cells enhances the expression of chondrogenic markers in tissue engineering scaffolds.

3rd International Symposium on Mechanobiology of Cartilage and Chondrocyte 2003, Brüssel

Mechanobiological conditioning of mesenchymal stem cells during chondrogenesis.

6<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis 2004, München

Mechanobiologische Verfahren zur Optimierung von Knorpel Tissue Engineering aus mesenchymalen Stammzellen.

Tissue Engineering Wochen 2004, Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Wien

### **Kongressbeiträge**

Angele P., Schumann D., v Breitenbuch P., Koehl G., Kujat R., Steinbauer M., Guba M., Nerlich M.

Different angiogenic effects by cell-based Tissue Engineered products depending on their cellular stage of differentiation.

5th Annual meeting GZG, Regensburg 2002

Angele, P., Schumann, D., Nerlich, M., Kujat, R.

Einfluß von zyklischer, biomechanischer Kompression auf chondrogene

Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Tissue Engineering-Matrices.

Dt Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2003

Angele P., Schumann D., v Breitenbuch P., Koehl G., Kujat R., Steinbauer M., Guba M., Nerlich M.

The Intravitalmicroscopy model: A new testing method for chondroconductive scaffolds regarding angiogenesis

49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, USA 2003

Angele Peter, Schumann Detlef, Kujat Richard, Nerlich Michael

Cyclic, mechanical compression of mesenchymal progenitor cells enhances the expression of chondrogenic markers in Tissue Engineering Scaffolds

Tissue Engineering Society International, 6<sup>th</sup> Annual International Conference, Orlando, USA 2003

Angele P., Schumann D., v Breitenbuch P., Kujat R., Steinbauer M., Nerlich M.

Intravital Microscopy shows different angiogenic effects in cell-based tissue engineering constructs depending on their cellular stage of differentiation

2<sup>nd</sup> Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua, Italien 2003

Angele P., Schumann D., Nerlich M., Kujat R.

Enhanced chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells loaded in Tissue Engineering Scaffolds by cyclic, mechanical compression

50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, USA 2004

D. Schumann, P.v. Breitenbuch, R.Kujat, M. Steinbauer, M.Guba, M. Nerlich, P. Angele

Intravitalmikroskopie zum Online-Monitoring der Angiogenese in Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur osteochondraler Defekte

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Chir. Forum, Berlin 2002

Schumann D., Breitenbuch P., Angele P., Kujat R., Steinbauer M., Nerlich M.

Intravitalmicroscopy for the Online-Monitoring of angiogenesis in Tissue Engineering Products for repair of osteochondral defects.

5th European Trauma Congress, Wien 2002

Winkler F., Angele P., Kujat R., Pöpl N., Schumann D., Nerlich M.  
Integrin-expression during chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and  
meniscal cells.

5th European Trauma Congress, Wien 2002

Schumann D., Kujat R., Nerlich M., Angele P.  
Influence of cyclic, biomechanical compression on the chondrogenic differentiation of  
mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.

2nd Symposium of Cellular Therapy, Regensburg 2003

Schumann, D., Kujat, R., Nerlich, M., Ulanski, P., Angele, M., Angele, P.  
Radiation crosslinking of polyvinylpyrrolidone: A new method for the physicochemical  
stabilization of Tissue Engineering scaffolds.

Annual Meeting of Society for Biomaterials, Reno, USA 2003

D. Schumann, P. Angele, R. Kujat, M. Nerlich  
Kompressive, zyklische Druckbelastung und ihr Einfluß auf die chondrogene  
Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Tissue Engineering-Matrices  
Tissue Engineering Symposium, Regensburg 2003

Schumann Detlef, Kujat Richard, Nerlich Michael, Angele Peter  
Treatment of mesenchymal progenitor cells with low-intensity pulsed ultrasound  
enhances the expression of chondrogenic markers in Tissue Engineering Scaffolds  
Tissue Engineering Society International, 6<sup>th</sup> Annual International Conference, Orlando,  
USA 2003

D. Schumann, R. Kujat, M. Nerlich, P. Angele  
Influence of low-intensity pulsed ultrasound on the chondrogenic differentiation of  
mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.

2<sup>nd</sup> Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua, Italien 2003

D. Schumann, R. Kujat, M. Nerlich, P. Angele  
Influence of cyclic, biomechanical compression on the chondrogenic differentiation of

mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.

2<sup>nd</sup> Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua, Italien 2003

## **11. Lebenslauf**

Name: Detlef Schumann  
Beruf: Apotheker  
Geburtsdatum: 30. April 1974  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

07/1993 Allgemeine Hochschulreife  
Werner von Siemens Gymnasium, Regensburg

1993-1994 Wehrdienst bei der Bundeswehr

1994-1999 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg

03/1997 1. Staatsexamen

03/1999 2. Staatsexamen

05/1999- 11/1999 Pharmaziepraktikum in der Thurn und Taxis Apotheke,  
Donaustauf

11/1999- 04/2000 Industriepraktikum bei Pharmaceutical Manufacturing,  
Regensburg  
(ehemals Bristol Myers Squibb)

07/2000 3. Staatsexamen  
Approbation zum Apotheker

seit 09/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für  
Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg  
Anfertigung einer Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr.  
Michael Nerlich und Prof. Dr. Achim Göpferich