

**AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROFESSOR DR. MED. MICHAEL NERLICH  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**EINFLUSS VON WACHSTUMSFAKTOREN  
AUF DIE IN VITRO INTEGRATION VON  
GEZÜCHTEM KNORPEL UND GELENKKNORPEL**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Wolfgang Stosiek

2009

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Carsten Englert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, 12. August 2009

Für meine geliebten Eltern  
und  
meinen Großvater

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 9 -</b>
<i>3.1</i>	<i>Der Gelenkknorpel.....</i>	<i>- 9 -</i>
3.1.1	Aufbau und Eigenschaften des Gelenkknorpels.....	- 9 -
3.1.2	Traumatische Gelenkknorpelverletzungen.....	- 13 -
3.1.3	Degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels.....	- 14 -
<i>3.2</i>	<i>Integrationsmechanismen von Gelenkknorpelwunden.....</i>	<i>- 15 -</i>
3.2.1	Elastizitätsmodul des Gelenkknorpels.....	- 15 -
3.2.2	Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Integration.....	- 16 -
<i>3.3</i>	<i>Aktuelle Therapiemöglichkeiten von Knorpelverletzungen .....</i>	<i>- 16 -</i>
3.3.1	Lavage, Shaving und Debridement: .....	- 17 -
3.3.2	Pridie-, Beck'sche Bohrung und Mikrofrakturierung.....	- 17 -
3.3.3	Osteochondrale Transplantation.....	- 18 -
3.3.4	Perichondrium und Periostlappenplastiken .....	- 18 -
3.3.5	Tissue Engineering bei Knorpeldefekten .....	- 19 -
<i>3.4</i>	<i>Stand der Forschung: In vitro Integration von Regeneratknorpel/ Tissue Engineered Cartilage.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>3.5</i>	<i>Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Entzündungs- und Vernarbungsprozesse .....</i>	<i>- 22 -</i>
3.5.1	Gelenkknorpel .....	- 22 -
3.5.2	TE-Knorpel (tissue engineered cartilage / Regeneratknorpel) .....	- 23 -
<i>3.6</i>	<i>Fragestellung.....</i>	<i>- 26 -</i>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>- 27 -</b>
<i>4.1</i>	<i>Materialien .....</i>	<i>- 27 -</i>
<i>4.2</i>	<i>Züchtung des TE-Knorpels .....</i>	<i>- 28 -</i>
<i>4.3</i>	<i>Probenpräparation und Geometrie.....</i>	<i>- 29 -</i>
4.3.1	Der nativen Gelenkknorpelblöcke .....	- 29 -
4.3.2	Der TE-Knorpelblöcke .....	- 29 -
<i>4.4</i>	<i>Das in vitro Knorpelintegrationsmodell .....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>4.5</i>	<i>Nachweis der Zellvitalität.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>4.6</i>	<i>Gewebekultur von Knorpelblockpaaren .....</i>	<i>- 34 -</i>

<i>4.7 Mechanische Untersuchungen nach Gewebekultivierung .....</i>	- 35 -
4.7.1 Einspannung der Zugproben .....	- 35 -
4.7.2 Messdatenerfassung und Genauigkeit .....	- 36 -
<i>4.8 Histologie.....</i>	- 37 -
<i>4.9 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....</i>	- 37 -
<i>4.10 Biochemische Analytik.....</i>	- 38 -
4.10.1 Proteoglykanmessung der Knorpelblöcke .....	- 38 -
4.10.2 Zellzahlmessung mittels DNA-Assay .....	- 38 -
<i>4.11 Auswertung und Statistik .....</i>	- 39 -
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>40 -</b>
<i>5.1 Vorversuche .....</i>	- 40 -
5.1.1 Etablierung des Integrationsmodells .....	- 40 -
5.1.2 Festlegung der besten Kulturbedingungen .....	- 44 -
5.1.3 Lage des TE-Knorpelblockes zum Gelenk-Knorpelblock.....	- 44 -
5.1.4 Einfluss der Dicke der Knorpelblockpaare.....	- 45 -
5.1.5 Einfluss der dynamischen Kultivierung in der Integrationskultur.....	- 47 -
5.1.6 Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium auf die Integration .....	- 48 -
5.1.7 Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium auf die Zellproliferation .....	- 50 -
5.1.8 Einfluss von Ascorbinsäure im Standardmedium auf die Extrazellulärmatrixsynthese .....	- 51 -
5.1.9 Einfluss der Zellkulturdauer des Regeneratknorpels und der Gewebskulturdauer auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren .....	- 53 -
<i>5.2 Einfluss von Insulin.....</i>	- 55 -
5.2.1 Einfluss von Insulin in der Regeneratknorpelkultur auf die nachfolgende Integrationskultur ..	- 55 -
5.2.2 Einfluss von Insulin in der Gewebekultur (TE-Knorpel-Knorpelblockpaare) .....	- 57 -
5.2.3 Einfluss von Insulin in der Gewebskultur auf die Zellzahl der TE-Knorpelblöcke.....	- 58 -
5.2.4 Einfluss von Insulin während der Gewebskultur auf die Extrazellulärmatrix (Proteoglykan) der TE-Knorpelblöcke.....	- 58 -
<i>5.3 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblöcken-</i>	<i>58 -</i>
5.3.1 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf die Zellzahl der TE-Knorpelblöcke .....	- 59 -
5.3.2 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf den Extrazellulärmatrixanteil Proteoglykan der TE-Knorpelblöcke.....	- 60 -
<i>5.4 Vergleich der oben aufgeführten Daten der Gelenkknorpelintegration und der Integration des TE- Knorpelstückes mit nativem Gelenkknorpel (in Zusammenarbeit mit A. Benditz).....</i>	<i>60 -</i>
<i>5.5 Einfluss der Kombination von Insulin und Testosteron auf die Integration von TE-Knorpelblöcken -</i>	<i>64 -</i>
<i>5.6 Histologie und Rasterelektronenmikroskopie der Integrationszone zweier Knorpelblöcke .....</i>	<i>67 -</i>

<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72 -</b>
6.1	<i>Vorversuche .....</i>	- 73 -
6.2	<i>Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration auf die Integration .....</i>	- 74 -
6.3	<i>Gewebekulturdauer und Integration.....</i>	- 75 -
6.4	<i>Einfluss von Insulin auf die Integration von TE-Knorpelblöcken.....</i>	- 76 -
6.5	<i>Einfluss von Testosteron auf die Integration des TE-Knorpelstückes.....</i>	- 77 -
6.6	<i>Vergleich der oben aufgeführten Daten der Gelenkknorpelintegration und der Integration des TE-Knorpelstückes mit nativem Gelenk-knorpel (in Zusammenarbeit mit A. Benditz).....</i>	- 79 -
6.7	<i>Einfluss der Kombination von Insulin und Testosteron auf die Integration von TE-Knorpelblöcken -</i>	80 -
6.8	<i>Histologie und REM .....</i>	- 80 -
6.9	<i>Vergleich zu anderen Modellen .....</i>	- 81 -
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82 -</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85 -</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>93 -</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>96 -</b>

## 2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Flussdiagramm der Knorpelprobenherstellung und Präparation
- Abbildung 2:** Herstellen der Gelenkknorpelblöcke mit definierter Geometrie
- Abbildung 3a:** Fluoroskopische Gewebsuntersuchung zur Vitalitätsbestimmung (Positiv -, Negativbeispiel)
- Abbildung 3b:** Fluoroskopische Gewebsuntersuchung zur Vitalitätsbestimmung (vor und nach Integrationsperiode)
- Abbildung 4:** Geometrie der Gelenkknorpelblöcke und Positionierung in der Kulturmutter
- Abbildung 5:** Probenhalterung für die mechanische Testmaschine
- Abbildung 6:** Erstes Schneideinstrument für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke
- Abbildung 7:** Zweite Generation des Schneideinstruments für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke
- Abbildung 8:** Dritte Generation des Schneideinstruments für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke (Versuch 4 – 11)
- Abbildung 9:** Darstellung der gemessenen mechanischen Integration in Abhängigkeit von der Lage des TE-Knorpelblockes während der Gewebskultur
- Abbildung 10:** Gemessene mechanische Integration in Abhängigkeit der Dicke der kultivierten TE-Knorpelblöcke
- Abbildung 11:** Die Dicke der Knorpelblöcke ist relevant für den Anpressdruck im Bereich der Knorpelblocküberlappungsszone
- Abbildung 12:** Gemessene mechanische Integration in Abhängigkeit der Kulturbedingungen
- Abbildung 13:** Integration von nativen Knorpelblöcken unter Einfluss von Ascorbinsäure
- Abbildung 14:** Integration von TE-Knorpel- zu Knorpelblöcken unter Einfluss von Ascorbinsäure
- Abbildung 15:** Zellzahl eines TE-Knorpel- und Knorpelblockes in Abhängigkeit der Ascorbinsäurekonzentration während der Gewebeblockkultur
- Abbildung 16:** Gehalt an Glycosaminoglycan der Blockpaare nach Gewebeart
- Abbildung 17:** Einfluss der Zellkulturdauer des Regeneratknorpels und der Gewebskulturdauer auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren
- Abbildung 18:** Einfluss der Gewebskulturdauer auf die mechanische Integration

- Abbildung 19:** Einfluss von Insulin in der Regeneratknorpelkultur auf die nachfolgende Integrationskultur
- Abbildung 20:** Einfluss von Insulin in der Gewebskultur (TE-Knorpel-Knorpelblock) auf die mechanische Integration
- Abbildung 21:** Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur (TE-Knorpel-Knorpelblock) auf die mechanische Integration
- Abbildung 22:** Vergleichende Darstellung der mechanischen Integration von Gelenkknorpel- und TE-Knorpelblöcken
- Abbildung 23:** Vergleichende Darstellung des Glycosaminoglycangehaltes von Gelenkknorpel- und TE-Knorpelblöcken
- Abbildung 24:** Vergleichende Darstellung des Desoxyribonukleinsäuregehaltes von Gelenkknorpel- und TE-Knorpelblöcken
- Abbildung 25:** Einfluss der Kombination von Testosteron und Insulin auf die TE-Knorpelblock-Knorpelblockintegration im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium
- Abbildung 26:** Gesamt-DNA-Gehalt eines Knorpelblockes oder TE-Knorpelblockes in Abhängigkeit der Stimulation mit Testosteron und Insulin
- Abbildung 27:** Glycosaminoglycangehalt von Knorpelblock und TE-Knorpelblock nach der Integrationskultur
- Abbildung 28:** Histologie der Integrationszone eines Knorpelblockes zu einem TE-Knorpelblock
- Abbildung 29:** Histologische Darstellung der Integrationszone zweier Knorpelblöcke
- Abbildung 30:** Histologische Darstellung der Integrationszone von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren
- Abbildung 31:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Integrationszone eines Gelenkknorpelblockpaars
- Abbildung 32:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Integrationszone eines TE-Knorpel-Gelenkknorpelblockes

### 3 Einleitung

Gelenkbeteiligende Knochenbrüche heilen nach einer Wiederherstellung der Form, Stellung und Größe des verletzten Gelenks knöchern sehr gut wieder zusammen. Im Gegensatz dazu verbleibt in der Regel ein Gewebsdefekt mit mangelnder Überbrückung der Gelenkknorpelfläche des über dem Knochen liegenden Gelenkknorpels [19,118]. Solch verletzungs- und heilungsbedingte Gelenkknorpeldefekte können im weiteren Verlauf zu einem vorzeitigen Gelenkverschleiß, einer Arthrose führen [20]. Diese bekannt dramatische Entwicklung eines gelenkbeteiligenden Bruches führte und führt zu regen Forschungsaktivitäten, die Wundheilung des Gelenkknorpels zu analysieren und therapeutisch zu verbessern. Die vorliegende Studie führt Entwicklungen weiter, die sich bisher entweder mit der Integration des Gelenkknorpels [86] oder mit neuen Techniken der Gewebszüchtung (Tissue Engineering) beschäftigt haben [38,64,111]. Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln mit dem die Integrationseigenschaften von künstlich gezüchteten Knorpelkonstrukten mit nativem Gelenkknorpel standardisiert untersucht und verbessert werden können.

#### 3.1 Der Gelenkknorpel

##### 3.1.1 Aufbau und Eigenschaften des Gelenkknorpels

Knorpelgewebe ist ein wichtiger Bestandteil des Stütz- und Bewegungsapparates. Es überzieht die Enden von Skelettknochen und ermöglicht ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen.

Durch seinen verbundartigen Aufbau, bestehend aus einem Bindegewebsnetz, das mehrheitlich aus Kollagen Typ II und Proteoglykanen besteht, kann der hyaline Gelenkknorpel sowohl Zug- als auch Druckkräften gut widerstehen. Die Kombination von Proteoglykanen, die Wassermoleküle binden, mit dem engen Maschenwerk des Kollagennetzes, das durch seinen porigen Aufbau den Wasserverlust zusätzlich verringert, führt zu einem sehr hohen Wassergehalt des Gelenkknorpels.

Die beiden wesentlichen Eigenschaften des Gelenkknorpels sind somit eine sehr hohe Druckbelastungsfähigkeit durch den hohen Wassergehalt und eine gute Widerstandsfähigkeit gegen Zugbelastungen durch die Struktur der Kollagenfasern.

Die Chondrozyten, die Zellen des hyalinen Knorpels, liegen eingebettet in extrazellulärer Matrix (ECM) und machen ungefähr 1 – 10 % des gesamten Knorpelvolumens aus. Sie sind für den belastungsabhängigen Umbau und die ständige Erneuerung der ECM verantwortlich, die von einem Netzwerk aus Kollagenen und Proteoglykanen gebildet wird und für die Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels verantwortlich ist [93]. Der Gelenkknorpel wird durch Diffusion der Synovialflüssigkeit, in der sowohl neu synthetisierte Moleküle und Wachstumsfaktoren als auch Abfallprodukte enthalten sind, ernährt. Chondrozyten haben einen überwiegend anaeroben Stoffwechsel, da ein relativ großer Abstand zu den Kapillaren besteht, was die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen erschwert [47].

Der Gelenkknorpel lässt sich histologisch in vier Zonen unterteilen, die sich in Größe und Form der Zellen, der Orientierung zur Gelenkfläche und in der metabolischen Aktivität unterscheiden [21]:

- I. Die sogenannte *Tangentialzone*, welche die oberste Schicht des Kollagennetzwerkes darstellt, weist parallel zueinander ausgerichtete Kollagenfibrillen des Typs II auf. Diese ist von einer Mikrometer dicken Schicht, der Lamina splendens, bedeckt. Kollagen Typ I und spezifische Protein- wie auch Phospholipidstrukturen sind in dieser Schicht erhöht und vermindern die Reibung der Gelenkflächen zueinander. Das darunter liegende Kollagennetzwerk in der Tangentialzone ist den Scherbelastungen entsprechend ausgerichtet [34,112].
- II. In der *Übergangszone* werden die Knorpelzellen runder und lagern sich zu Chondronen zusammen. Der Gehalt an Proteoglykanen ist im Vergleich zur ersten Zone erhöht.
- III. Die *Radiärzone* ist die breiteste Schicht des hyalinen Knorpels, in der sich die Chondrozyten säulenförmig anordnen. Zwischen diesen „Säulen“ verlaufen starke Kollagenfaserbündel und die Konzentration an Proteoglykanen ist hier am höchsten. Die Chondrozyten in der Radiärzone sind bis zu zehnmal synthetisch aktiver als in den oberflächlichen Zonen des hyalinen Knorpels [117].
- IV. Der Übergang zum subchondralen Knochen wird als *Zone des mineralisierten Knorpels* bezeichnet, da sich in der ECM bereits Calciumphosphatkristalle befinden. Diese ist von der Radiärzone durch die sogenannte „Tidemark“ getrennt, die einen hohen Kalziumgehalt besitzt und sich in der Histologie als basophile Linie darstellt. Die Tidemark ist nicht völlig geschlossen, so dass ein Austausch von ernährenden Substanzen zwischen dem kalzifizierten und dem nicht kalzifizierten Knorpel möglich ist.

Der Gelenkknorpel besteht aus einer Zellart, den so genannten **Chondrozyten**, die für den Auf- und Abbau der Bestandteile der ECM verantwortlich sind. Der Metabolismus der Knorpelzellen ist an die jeweilige Belastungssituation angepasst und wird von verschiedenen Parametern wie zum Beispiel dem mechanischen Druck, Wachstumsfaktoren und dem Alter beeinflusst [112]. Bei einer Knorpeldegeneration versuchen die Chondrozyten die entstandenen Schäden an der ECM durch vermehrte Proliferation und Steigerung der metabolischen Aktivität zu kompensieren. Durch die erhöhte Mitoserate kommt es zu Zellnestern, die von neu synthetisierten Matrix-Molekülen umgeben sind. Diese Strukturen können oft im osteoarthrotischen Knorpel nachgewiesen werden [14]. Dieser aktivierte Zustand kann über Jahre anhalten, bis dann im letzten Stadium des degenerativen arthrotischen Prozesses die Chondrozyten den Knorpelverlust nicht mehr ausgleichen können und selbst zugrunde gehen [17]. Von den untergehenden Knorpelzellen werden Enzyme freigesetzt, die die Matrixstruktur weiter zerstören und die mechanische Stabilität verringern. Durch die weitere Belastung des geschwächten Knorpels wird der degenerative Prozess beschleunigt [83].

Die Chondrozyten sind eingebettet in der **Extrazellulären Matrix (ECM)**, deren Hauptaufgabe in der Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften des Knorpels besteht. Sie setzt sich etwa aus 60% Kollagenen, 20 – 25% Proteoglykanen und 10 – 25% aus nicht – kollagenen Proteinen und Glykoproteinen zusammen. Der Aufbau der ECM ist nicht homogen, sie besteht aus einer territorialen und einer perizellulären Matrix, die sich um die Chondrozyten anordnet und diese bei Deformation des Knorpels schützt. Zwischen den Knorpelzellen liegt die interterritoriale Matrix, die für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist. Für die Aufrechterhaltung der Knorpelzusammensetzung und den Austausch von Nähr- und Abfallstoffen ist Bewegung und eine wechselnde Be – und Entlastung unerlässlich [16]. Bei der Belastung wird der Gelenkknorpel komprimiert, was zu einem Flüssigkeitsausstrom aus der Matrix führt und so einen Austausch von Stoffwechselprodukten und Metaboliten ermöglicht.

Der Hauptbestandteil der faserartigen ECM sind **Kollagene**, die für die Zugfestigkeit des hyalinen Knorpels verantwortlich sind, während die Proteoglykane die viskoelastischen Eigenschaften und die Druckfestigkeit ausmachen [7]. Die Zusammensetzung des Kollagennetzwerkes hängt von der Belastungszone ab und ist für die gleichmäßige Kraftübertragung auf den Knochen wichtig.

Den Hauptbestandteil bildet mit 90% das Typ II Kollagen, dessen Fibrillen extrem stark sind und einen enormen Belastungswiderstand aufweisen. Weitere Kollagene sind Typ VI, IX, X und XI, die zur Stabilisierung des Kollagennetzwerkes beitragen [93]. Durch unphysiologisch hohe Druckbelastungen, wie zum Beispiel bei einem Sprung aus großer Höhe, kann das Kollagennetzwerk zerreißen. Dies führt zu einem Anstieg des Wassergehalts und Steifigkeitsverlust des Gelenkknorpels. Der Gesamtgehalt an Typ II Kollagen ändert sich nicht, allerdings werden die Querverbindungen des kollagenen Netzwerkes beschädigt, was einen Verlust der mechanischen Stabilität zur Folge hat [62].

Die **Proteoglykane** sind Zuckereiweißstrukturen und haben eine hohe Wasserbindungskapazität, wodurch sie wesentlich zu den viskoelastischen Eigenschaften und der Druckfestigkeit des hyalinen Gelenkknorpels beitragen. Sie werden von den Chondrozyten gebildet und bestehen aus einem Kernprotein, an das multiple Polysaccharideinheiten, die Glykosaminoglykane (GAG), gebunden sind.

Die Proteoglykane besitzen Carboxyl- und Sulfatgruppen, durch die sie negativ geladen sind und sehr gut mit kationischen Färbungen (z.B. Safranin-Orange) quantitativ als auch histologisch bestimmt werden können. Ein Verlust von Proteoglykanen und eine daraus resultierende mangelhafte Anfärbung korreliert mit dem Verletzungsausmaß des Gelenkknorpels [68].

Für den hyalinen Gelenkknorpel ist das Proteoglykan Aggrecan charakteristisch, das aus zwei Glykosaminoglykanketten, dem Chondroitinsulfat und dem Keratansulfat, besteht. Hyaluronsäure bindet viele Aggrecanmoleküle und bewirkt so den typischen Aufbau der Proteoglykane [112]. Die Elastizität der ECM wird vor allem durch den enormen Quellungsdruck aufrechterhalten, der einerseits durch die hohe Wasserbindungskapazität der Proteoglykane und andererseits durch deren ladungsabhängige Abstoßung zustande kommt. Dadurch können enorme Druckkräfte, die auf den Gelenkknorpel einwirken, gleichmäßig auf die Gelenkfläche übertragen werden.

### 3.1.2 Traumatische Gelenkknorpelverletzungen

Gelenkknorpelverletzungen kann man in drei Kategorien einteilen [18]:

- I. Mikroverletzungen der Gelenkoberfläche, die keine sichtbaren Unterbrechungen der Oberfläche zeigen, aber mit einer Schädigung der Matrix und der Zellen einhergehen
- II. Partielle Gelenkknorpeldefekte, die Schädigungen der Gelenkknorpelfläche ohne Einbeziehung der subchondralen Knochenplatte darstellen
- III. Osteochondrale Defekte, die eine Miteinbeziehung der Tidemark und des darunter liegenden subchondralen Knochens aufweisen

Repetitive Belastungen können zu **Mikroverletzungen der Gelenkoberfläche** führen und zu einer Überlastung des Gelenkknorpels. Im Verlauf kommt es dadurch zu einem Ungleichgewicht zwischen dem mechanischen Abbau der Matrixmoleküle und dem Matrixaufbau durch die Chondrozyten. Die faserartige Extrazellulärmatrix des Gelenkknorpels lockert sich auf und der Proteoglykangehalt nimmt ab, so dass der Gelenkknorpel mechanisch weich wird. Dieser erste Schritt der Degeneration wird als Chondromalazie bezeichnet. Durch die verminderte impulsartige mechanische Übertragung der Druckbelastung entwickelt sich zuerst eine Verjüngung der subchondralen Lamelle. In den weiteren Stadien der Gelenkknorpeldegeneration kommt es zu einer Verdickung der subchondralen Lamelle, was radiologisch ein sicheres Zeichen von Gelenkverschleiß, der Arthrose, ist [106].

**Partielle Gelenkknorpeldefekte** sind als reine Knorpelgewebsverluste definiert, die eine Beteiligung der subchondralen Lamelle ausschließt. Da der adulte Gelenkknorpel keine Blutgefäße besitzt und über die Gelenkflüssigkeit ernährt wird, kann sich kein typisches Hämatom der Wundfläche bilden. Hunziker konnte darstellen, dass sich Zellen aus der Gelenkschleimhaut an der Oberfläche eines solchen Knorpeldefektes anlagern können und zu einem minderwertigen fibrokartilaginären Narbengewebe führen [48]. Die am Wundbereich befindlichen Zellen können Extrazellulärmatrix bilden und bis zu einer Entfernung von 75 µm die Gewebsstruktur verändern [27]. Eine Zellteilung und Wanderung ist den ortsständigen Chondrozyten aber nicht möglich, so dass es auch zu keinem vollständigen Gewebsaufbau durch diese Zellen kommen kann [12, 93].

Die Belastung des Gelenkknorpelwundrandes an der Gelenkknorpeloberfläche führt zu einer Spannungskonzentration, da die Last nun über eine verminderte Fläche übertragen werden muss. Die höchste mechanische Druckbelastung entsteht somit an der Wundranddecke. Dies führt zu den typischen Riesenzellen, wenn die Belastung das physiologische Maß von 20 MPa überschreitet. Die Ecke flacht ab und aus der Tiefe wird in begrenztem Maße Gewebe nachgebildet, so dass es zu einer Nivellierung des Defektes kommen kann [67].

**Osteochondrale Knorpeldefekte** sind tiefe Verletzungen des Gelenkknorpels, die die subchondrale Knochenplatte perforieren und dadurch auch Gefäße des Endosts verletzen. Dadurch kommt es zu einer Einblutung in den Defekt mit der Bildung eines Fibrinkoagels, welches sich gut mit den knöchernen Rändern des Defektes, aber nicht mit dem umliegenden Knorpel verbindet. Im Bereich des Knochenmarks synthetisieren viele aktive Osteoblasten neuen Knochen. Anschließend kommt es zu einer Einsprossung von Blutkapillaren in den Knochendefekt. Entlang der gebildeten Fibrinstränge wandern nun mesenchymale Stammzellen in den Defekt ein und beginnen das Fibrin zu resorbieren. Innerhalb von etwa zwei Wochen differenzieren sich die Stammzellen zu Chondrozyten aus, die dann proteoglykanhaltige ECM bilden. In einem weiteren Zeitraum von vier bis acht Wochen bildet sich ein knorpelartiges Reparaturgewebe und nach etwa einem halben Jahr ist eine klassische Knorpelschichtung mit Tidemark zu erkennen. In den meisten Fällen zeigen sich degenerative Veränderungen des neu entstandenen Gewebes, wie Fissuren und Risse in der Oberfläche und Abbau von Proteoglykanen [98].

Klinisch ist die mangelnde Gelenkknorpelwundheilung aus gelenkbeteiligenden Brüchen bekannt. Diese Brüche weisen zum Beispiel am Tibiakopf nach knöcherner Heilung eine Fissur des Knorpels auf [11]. Durch die Unterbrechung der Kontinuität der Gelenkoberfläche gelangt Gelenkflüssigkeit, unter anderem bestehend aus Proteoglykan 4 (PRG 4), in den Knorpelwundspalt. Dies behindert die Integration von gegenüberliegenden Knorpeloberflächen und somit eine Selbstheilung [34]. Durch weitere mechanische Belastung vergrößert sich der Knorpelwundspalt und es kommt zur weiteren Degeneration des Gelenkknorpels, die dann im Vollbild der Arthrose enden kann [20, 35, 57].

### 3.1.3 Degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels

Im Laufe eines Lebens ist der Gelenkknorpel extremen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt, die zu Defekten der Oberfläche und zur Knorpeldegeneration führen können.

Bei physiologischer Belastung sind die Chondrozyten im Gleichgewicht von anabolen und katabolen Reizen, wodurch die strukturelle und funktionelle Integrität der ECM aufrechterhalten wird. Wenn dieses Gleichgewicht nun mehrheitlich zum Katabolismus verschoben wird, hat dies die Degeneration der ECM zur Folge. Dafür gibt es mannigfaltige Gründe. Zu den wichtigsten Mechanismen gehören die erworbenen oder altersbezogenen Veränderungen des Stoffwechsels, vor allem des Hormonstoffwechsels und der Alterungsprozess der Zellen. Trotz gleich bleibenden mechanischen Belastungen wird die Widerstandsfähigkeit des Körpers durch diesen Prozess mit dem Altern schwächer, was eine Arthrose zur Folge hat [39]. Besteht zusätzlich eine statische Veränderung des Achsskeletts, so kann die chronisch mechanische Überlastung schneller zu einer Arthrose führen.

Die rheumatoide Arthritis gehört zu einer der häufigsten Erkrankungen meist älterer Menschen und geht mit einer Degeneration des Gelenkknorpels einher. Die natürliche Barriere des Gelenkknorpels für Gefäße ist durch eine unnatürliche Entzündungsreaktion aufgehoben. Die Repellentfaktoren, die Botenstoffe, die das Überwuchern der Gelenkhaut über den Gelenkknorpel verhindern und auch der Hormonstoffwechsel sind gestört. Dies sind aber nur zwei bekannte Mechanismen aus einem komplexen Geschehen, welches die rheumatoide Arthritis beschreibt.

## 3.2 Integrationsmechanismen von Gelenkknorpelwunden

### 3.2.1 Elastizitätsmodul des Gelenkknorpels

Sowohl die biochemische und mikroskopische Struktur des Ersatzknorpels als auch die des verletzten Gelenkknorpels ist eng mit deren mechanischen Eigenschaften verbunden.

Deshalb können durch die Messung von mechanischen Parametern des Gelenkknorpels und des Reparaturgewebes etwaige Verletzungen und Degenerationsprozesse diagnostiziert werden [6,41,59,110]. So konnte Broom aufzeigen, dass mikro- und makroskopisch unauffälliges Gelenkknorpelgewebe im ersten Stadium der Degeneration schon einen bis zu vierhundertfachen Festigkeitsverlust erleidet [15].

Die Festigkeit des Gelenkknorpels wird maßgeblich von der geladenen Extrazellulärmatrix mit ihren funktionellen Carboxylgruppen beeinflusst. Die Carboxylgruppen sind in der Matrix gebunden und elektrostatisch geladen, wodurch Wassermoleküle angezogen werden. Durch das Collagennetzwerk mit Interkonnektionen entwickeln sich Poren, durch die die Wassermoleküle perfundieren müssen. Die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels werden zum einen durch die Ladungsdichte der funktionellen Gruppen und zum anderen durch die Verbindungen des Kollagennetzwerkes bestimmt.

Klinisch findet sich bei verminderter Ladungsdichte der funktionellen Gruppen und Auflockerung des Kollagennetzwerkes das Korrelat der Chondromalazie.

Welche Ursachen die Festigkeitsveränderung des Gelenkknorpels und ggf. eines Regeneratgewebes haben, wird weiterhin in der Literatur diskutiert. Festzuhalten bleibt, dass knorpeliges Narbengewebe durch die bisher angewendeten chirurgischen, medikamentösen oder experimentellen Methoden nicht die mechanischen Eigenschaften erreicht wie originäres Gelenkknorpelgewebe, welches in seiner Dicke und seinem Elastizitätsmodul ortsabhängig ist.

### **3.2.2 Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Integration**

Auch die extrazelluläre Matrix, die reich an Proteoglykanen ist, könnte die Integrationsprozesse beeinflussen. Von einigen dieser Proteoglykane, wie zum Beispiel Biglykan und Decorin, ist bekannt, dass sie antiadhäsive Eigenschaften besitzen [91], was integrationsbehindernd wirken könnte [46].

Hills argumentierte dagegen, dass die Schmiereigenschaften der Phospholipide in der Gelenkflüssigkeit die Integration vermindern, was jedoch nur mechanisch und nicht biologisch in einem Integrationsmodell dargestellt wurde [43].

Der verminderte Einfluss der originären Zellen auf die Wundheilung wie auch das Einwandern von synovialen Zellen in oberflächliche Knorpelwunden oder das Einwandern von mesenchymalen Stammzellen über ein Einbluten bei gelenkflächenfrakturierenden Verletzungen muss bei der Interpretation der oben genannten *in vitro* und *in vivo* Versuche berücksichtigt werden. Für die *in vitro* Integration des Gelenkknorpels ist die Collagenapposition maßgeblich [27]. Eine Inhibition der Collagensynthese durch Beta-Aminopropionitrile führt zu einem vollständigen Versagen der *in vitro* Integration [1].

Ein Wachstumsfaktoreneinsatz sollte für eine *in vivo* Anwendung zwei Ziele verfolgen: Zum einen wäre eine erhöhte Collagensynthese der originären Zellen und zum anderen eine Differenzierung der einwandernden Zellen anzustreben.

## **3.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten von Knorpelverletzungen**

Gelenkknorpelschädigungen gehören zu den Hauptgründen für die Invalidität von Erwachsenen, wobei die häufigsten Ursachen traumatische Verletzungen, Osteoarthritis und Osteochondrosis dissecans sind. Eine der großen Herausforderungen der letzten Jahre war die Entwicklung einer Behandlungsstrategie zur Wiederherstellung einer Knorpeloberflächenkongruenz, die eine normale Gelenkfunktion mit freier und schmerzloser Beweglichkeit ermöglicht und eine weitere Knorpeldegeneration verhindern soll.

Bisher konnte bei fortgeschritten Arthrose nur die Implantation einer Endoprothese durchgeführt werden, die allerdings bei jungen sportlichen Patienten keine lebenslange Therapie darstellt.

Die Arthroskopie dient der Diagnostik und bietet auch die Möglichkeit einer minimalinvasiven Therapie.

### **3.3.1 Lavage, Shaving und Debridement:**

Eine der ältesten und einfachsten Methoden zur Therapie von Knorpeldefekten ist die arthroskopische Lavage, bei der das Gelenk mit physiologischer Kochsalzlösung von Entzündungsmediatoren und Zelldedritus frei gespült wird [65].

Bei einer Gelenkknorpelschädigung kommt es oft zum Loslösen von freien Gelenkkörpern und zur Fransenbildung des Defektes, was dann eine reaktive Synovitis auslösen kann. Durch Abfräsen der Knorpelwunde und Entfernung der Synovia kann bei einem Großteil der Patienten eine Beschwerdefreiheit auch für einen längeren Zeitraum erreicht werden. Diese arthroskopischen Techniken stellen allerdings nur eine temporäre symptomatische Therapie dar und führen nicht zur Regeneration des Knorpeldefekts [22]. Darüber hinaus ist der Effekt der arthroskopischen Lavage sehr kontrovers diskutiert. In einer prospektiv randomisierten Studie wurden 180 Patienten mit Osteoarthritis in eine Placebo-Gruppe mit Scheinarthroskopie und eine Gruppe mit durchgeführter Arthroskopie mit Debridement und Lavage eingeteilt. Nach 24 Monaten konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Schmerzreduktion oder der Funktionsverbesserung festgestellt werden [74].

### **3.3.2 Pridie-, Beck'sche Bohrung und Mikrofrakturierung**

#### **Penetration des subchondralen Knochens**

Durch die Mikrofrakturierung des Knorpels und die Anbohrung des subchondralen Knochens wird eine Blutung aus dem Markraum induziert, wodurch es zur Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt kommt, die sich dann zu chondrogenen Zellen ausdifferenzieren und eine extrazelluläre Matrix bilden [89]. In einer umfangreichen Nachuntersuchung von 1400 Patienten über einen Zeitraum von 2-8 Jahren wurde eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik nachgewiesen [102]. Histologisch zeigte sich, dass der Reparaturknorpel aus hyalinem und aus Faserknorpel bestand. Diese Technik eignet sich vor allem für junge, sportlich aktive Patienten mit einem isolierten herdförmigen Knorpeldefekt, der von gesundem Knorpel umgeben ist, insbesondere dann, wenn dadurch der Einbau einer Endoprothese verzögert werden kann [3].

### 3.3.3 Osteochondrale Transplantation

Die **Osteochondrale Transplantation**, sowohl autolog als auch allogen, ist eine schon lange angewandte Technik, bei der Knorpelknochenzylinder von weniger belasteten Zonen des Gelenkes in die Hauptbelastungszone mit dem Knorpeldefekt transplantiert werden [71]. Die Indikationen für diese Technik sind fokale Läsionen, die traumatisch oder durch aseptische Knochennekrosen entstanden sind. Bei Arthrose mit großflächigen Knorpeldefekten kann dieses Verfahren nicht angewendet werden [53].

Ein Problem bei dieser Methode bleibt die mangelnde Integration an der Knorpel-Knorpelgrenze, die zur Spaltbildung und weiteren Defekten führt. Es zeigt sich in den Verlaufskontrollen sowohl klinisch als auch experimentell [58] keine Integration der Knorpelwundränder. Die histologische Untersuchung der Verbindung des Reparationsgewebes zum umliegenden artikulären Knorpel zeigt regelmäßig eine Diskontinuität. Auch an Stellen der gewebsartigen Überbrückung besteht keine mechanisch stabile Integration des Reparations- zum Gelenkknorpelgewebe, da die Kollagenfibrillen in den einzelnen Kompartimenten sich nicht miteinander verbinden [60]. Experimentell ist die Integration von Gelenkknorpelgewebe in einem bovinen Modell sowohl für adultes als auch juveniles Gelenkknorpelgewebe nachgewiesen worden [86].

Die Technik der osteochondralen Transplantation hat bis heute klinische Relevanz, wobei man immer noch wenig über die Mechanik an der Gelenkoberfläche der Transplantate weiß. So beschäftigt sich Kleemann mit der Frage, ob die mechanische Stabilität der Knorpel-Knochenzylinder nach der Transplantation einen Einfluss auf die Langzeitergebnisse hat. In der Histologie traten degenerative Prozesse sowohl im Bereich des Knorpels als auch im Bereich des Knochens auf, was an guten Langzeitergebnissen dieser Methode zweifeln lässt [54].

### 3.3.4 Perichondrium und Periostlappenplastiken

Bei der Transplantation von Perichondrium aus einer sternumnahen Rippe oder von Periost aus der medialen Tibiafläche geht man von der Annahme aus, dass diese Gewebe die biologische Potenz zur Chondrogenese haben [87]. Die Gewebe werden in den Defekt eingenäht oder mittels Fibrinkleber eingeklebt und bilden dann hyalinartigen Knorpel aus. Diese Methode ist auch nur für die Behandlung von umschriebenen Defekten, nicht aber zur Arthrosetherapie geeignet. Klinische Nachuntersuchungen zeigten, dass es mittelfristig zu einer Ossifikation und arthrotischen Veränderungen kam [36].

### 3.3.5 Tissue Engineering bei Knorpeldefekten

Bei der Technik des Tissue Engineering werden lebende Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel gewonnen, durch enzymatischen Verdau von der extrazellulären Matrix getrennt und in einer Zellkultur mit Wachstumsfaktoren zur Proliferation gebracht. Danach werden die Chondrozyten von der Zellkultur auf verschiedene biokompatible Trägermaterialien übertragen und so eine Besiedlung ermöglicht. Nach der Verbindung mit der Matrix findet keine weitere Proliferation der Chondrozyten statt. In einem weiteren Kultivierungsabschnitt wird die typische extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels, bestehend aus Glykosaminoglykanen und Kollagen, gebildet und dabei die Trägermatrix abgebaut. Danach wird das entstandene Gewebskonstrukt mit unterschiedlichen Techniken in den Knorpeldefekt des Patienten implantiert [88,100].

Grande et al. führte 1989 in einem Tierversuch die erste **Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)** durch und läutete damit die Ära des Tissue Engineering in der Knorpelforschung ein [40]. Er entnahm eine Knorpelbiopsie, isolierte die Chondrozyten und vermehrte sie in einer Zellsuspension, die dann unter einen Periostlappen in den Knorpeldefekt eingespritzt wurde. Der Autor konnte die Auffüllung des Defektes mit knorpelähnlichem Gewebe feststellen. 1994 wendete Brittberg et al. diese Methode erstmals bei 23 Patienten an und konnte bei einem Teil der Patienten hyalinartigen Knorpel in dem Defekt nachweisen [13]. Pettersson et al. therapierte 101 Patienten mit der ACT und auch hier konnte hyalinartiger Knorpel nachgewiesen werden [84].

Knutsen et al. propagierte 2004 sogar, dass diese Methode keine makroskopischen, histologischen oder klinischen Vorteile gegenüber der Technik des Microfracturing hätte und zudem einen erheblich größeren Aufwand darstellen würde [55]. Mit der Methode der ACT kann keine „restitutio ad integrum“ erreicht werden, da es sich um ein Narbengewebe, mehrheitlich aus Faserknorpel handelt.

Eine Alternative zur ACT ist die Verwendung von **Mesenchymalen Stammzellen (MSC)**, um Knorpeldefekte aufzufüllen. Bei dieser Methode werden durch eine Knochenmarkspunktion multipotente Stammzellen entnommen. Danach wird durch unterschiedliche Faktoren (TGF- $\beta$ 1, Hyaluronsäure, Synovialflüssigkeit) eine chondrogene Ausdifferenzierung induziert [89].

Die *in vivo* Reimplantation kann im Anschluss daran auf festen Trägermaterialien oder mittels Injektion unter einen Periostlappen durchgeführt werden. Wakitani et al. führte 2002 die erste autologe humane MSC Implantation in einen Knorpeldefekt am medialen Femurkondylus durch.

Die mesenchymalen Stammzellen waren in ein Kollagengel eingebettet und wurden unter einem Periostlappen implantiert [114]. Die Implantation führte zwar histologisch zu einem verbesserten Gewebeaufbau, im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte aber keine Besserung der klinischen Symptomatik festgestellt werden.

### **Trägermaterialien beim Tissue Engineering**

Dreidimensionale Trägermaterialien bieten den zuvor isolierten Chondrozyten die Möglichkeit, sich anzuhafte, zu differenzieren und Matrix zu produzieren, um so komplexe Gewebestrukturen zu schaffen. Die Trägermaterialien sollten dabei biokompatibel sein und sich mit zunehmender Matrixbildung selbst abbauen, wobei die Abbauprodukte nicht toxisch sein dürfen. Für den Einsatz im Gelenk müssen die Konstrukte mechanisch stabil sein, um einem großen Druck oder Druckveränderungen standhalten zu können. Materialien, die diese Voraussetzungen erfüllen, sind injizierbare Gele oder auf Kollagen und Glycosaminoglycanen basierende Polymere, wie zum Beispiel PLA (Poly-lactid acid) oder PGA (Poly-glykolic acid). Freed et al. publizierte 1993 die Verwendung von bioresorbierbaren Polymerstrukturen als Trägermaterialien für humane Knorpelzellen [36].

### **3.4 Stand der Forschung: *In vitro* Integration von Regeneratknorpel/ Tissue Engineered Cartilage**

Für die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten werden aktuell verschiedene Techniken des Tissue Engineering eingesetzt, wobei die Integration des Gewebskontraktes mit dem nativen Knorpel an der Knorpel-Knorpelgrenze ein bis heute noch nicht gelöstes Problem darstellt [2,109].

Bei *in vivo* Versuchen wird häufig die unvollständige Integration von gegenüberliegenden Knorpelwundflächen beschrieben [76,82]. Deshalb beschäftigen sich viele *in vitro* Versuche mit der Analyse und Lösung dieser Fragestellung. Es ist bekannt, dass eine Integration von Gelenkknorpel *in vitro* möglich ist und diese vor allem von der Kollagenquervernernetzung abhängt [1,27]. Ferner weiß man, dass die Kollagenquervernernetzung und damit die Integration von Gelenkknorpel durch Bestandteile der Synovialflüssigkeit, wie zum Beispiel Proteoglykan 4, behindert wird [34].

Obradovic entwickelte als erster ein Modell mit einem fünf Wochen lang *in vitro* gezüchteten TE-Knorpelstück, das zu einem Zylinder zugeschnitten wird, der dann in einen nativen Knorpelring eingepasst wird. In dieser Kombination wird die TE-Scheibe mit dem Knorpelring weitere ein bis acht Wochen lang kultiviert.

Die mechanische Integration wird durch ein Herausdrücken der Scheibe aus dem Ring untersucht und die gemessene Kraft bezogen auf die Integrationsfläche in Kilopascal quantifiziert [77]. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass *in vitro* gezüchteter TE-Knorpel, bestehend aus juvenilen bovinen Chondrozyten und einer PGA Matrix, eine stärkere Integration aufweist als TE-Knorpel aus adulten bovinen Chondrozyten mit der gleichen Matrix. Durch eine Vorbehandlung der Integrationszone mit Trypsin wird die mechanische Integration noch weiter verbessert.

Hunter, der ein ähnliches Modell wie Obradovic verwendet, zeigt, dass die Integration der TE-Knorpelscheibe im Vergleich zu einer Gelenkknorpelscheibe schwächer ist [45].

Tognana et al. zeigt, dass das Wachstum und die Integrationseigenschaften von TE-Knorpel sich durch eine längere Kultivierung verbessert. Bei den TE-Knorpelstücken, die angrenzend an devitalisierten Knochen mit hoher Durchlässigkeit acht Wochen lang kultiviert wurden, zeigten sich neben dem größten Wachstum auch die besten Integrationseigenschaften im Disc-Ring-Modell [108].

Zhang verwendete ein ähnliches Modell und untersuchte vor allem die Zellvitalität an der Integrationszone. Nach zwei Wochen Integrationszeit konnte zwischen dem TE-Knorpel und dem nativen Knorpelgewebe eine azelluläre Zone mit einem Kollagennetzwerk nachgewiesen werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Integration von der Zellvitalität in der Integrationszone beider Gewebearten abhängig ist [119].

Moretti untersuchte an dem von Obradovic eingeführten Disc-Ring-Modell, ob die Gewebsscheibe, die an Volumen während der Kulturdauer zunimmt, zu einer Verfälschung der wahren mechanischen Integration führt. Der „push-out“ Test könnte durch ein Verklemmen der größeren Gewebsscheibe im Gewebsring zu falsch hohen Werten führen. Darüber hinaus stellte er fest, dass sich durch die Kultivierung von Knorpelgewebe die oberste Grenzschicht verändert und vermehrt Kollagen Typ I aufweist. Er kam zu dem Ergebnis, dass nach einer Entfernung dieser Kapsel die mechanischen Integrationswerte viel geringer sind [73].

In den vorangestellten Untersuchungen wird ein Disc-Ring-Modell verwendet, um mittels eines „push-out“ Tests die mechanische Integrationsstärke zu bestimmen. Obwohl all diese Arbeiten wertvolle Daten und Einblicke in die Integrationsprozesse von *in vitro* gezüchtem Knorpel mit nativem Gelenkknorpel liefern, haben sie doch alle einen entscheidenden Nachteil: Das in den Knorpelring eingebrachte Gewebe kann durch Wachstum und Wasseraufnahme seinen Durchmesser vergrößern und so mechanisch stecken bleiben.

Dieser Zustand führt zu einer Überschätzung der gemessenen Integration und lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die stattgefundene Integration zu.

Aus diesem Grund ist der Scherbruch – oder Zugversuch eine alternative Methode zur mechanischen Bestimmung der Integration, ohne dass die oben beschriebenen Begleiteffekte auftreten würden [73]. In der physiologischen Gelenkbewegung wirken nicht ausschließlich Druckkräfte, sondern auch Zug- und Scherkräfte auf den Knorpel ein, wie zum Beispiel bei der Roll-Gleit-Bewegung des Kniegelenkes. Deshalb könnte das hier verwendete Modell wichtige Daten für die spätere klinische Anwendung der Knorpeltransplantation ins Gelenk bringen.

Es ist bekannt, dass eine Integration zwischen *in vitro* gezüchtetem Knorpel und nativem Knorpelgewebe prinzipiell möglich ist. Wenig hingegen weiß man über den Einfluss von Hormonen, Zytokinen und Neurotransmittern, der in dieser Arbeit, im Vergleich zur Integration zweier nativer Knorpelscheiben untersucht werden soll.

### **3.5 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Entzündungs- und Vernarbungsprozesse**

#### **3.5.1 Gelenkknorpel**

Die Unversehrtheit des Gelenkknorpels wird durch das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen aufrechterhalten, die wiederum von Botenstoffen, den Zytokinen, gesteuert werden. Man nimmt an, dass eine Fehl- oder Überregulation dieser Mediatoren für die Entstehung von vielen Gelenkerkrankungen verantwortlich ist.

Westacott konnte zum Beispiel nachweisen, dass das Zytokin IL-1 (Interleukin) und der TNF alpha (Tumor Nekrose Faktor) bei Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis erhöht sind [116]. Billinghurst behandelte bovinen Knorpel mit IL-1 alpha und kam zu dem Ergebnis, dass dieses Interleukin für die Denaturierung von Typ-II-Kollagen und für einen Verlust von Proteoglykanen verantwortlich war [9].

Temple untersuchte die Auswirkung von IL-1alpha auf die mechanischen Eigenschaften des bovinen Gelenkknorpels. Es zeigte sich, dass sowohl das Kollagennetzwerk geschwächt wird als auch der Gehalt an GAG (Glykosaminoglykanen) unter der Einwirkung von IL-1alpha abnimmt, was dann zeitabhängig zu einer relevanten Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften führt [107].

Da Silva untersuchte an einem *in vivo* Modell den Einfluss von Steroidhormonen auf Entzündungsreaktionen sowie die Produktion von Zytokinen und deren Einfluss auf die Knorpeldegeneration.

Er fand heraus, dass ein Mangel an Estradiol, Androgen und Progesteron zu einem Anstieg von IL-1, gefolgt von Entzündung und Knorpeldegeneration, führte. Dieser Effekt war aber bei Gabe der Hormone teilweise reversibel und Testosteron hatte sogar antagonistische Effekte zu IL-1, bezogen auf die Proteoglykansynthese [25].

Straub untersuchte die Wechselwirkungen von Corticosteroiden und Norepinephrinen bezüglich deren entzündungshemmenden Effekten bei rheumatoider Arthritis in einer kombinierten *in vivo* und *in vitro* Studie. In der *in vivo* Studie wurden Patienten mit rheumatoider Arthritis mit Corticosteroiden behandelt und im Vergleich zur Kontrollgruppe auf die Entzündungsreaktion im Gelenk untersucht. Das Ergebnis war, dass die IL Konzentration sowie die T-Zellen- und Makrophagenproduktion verringert waren und es damit zu einer Verminderung der Entzündung im Gelenk kam.

Bei der *in vitro* Studie wurden Zellen aus der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis und von Patienten mit Osteoarthritis entnommen, um die Effekte von Corticosteroiden und Norepinephrinen getrennt und in Kombination zu untersuchen. Bei den Synoviozyten von den Patienten mit rheumatoider Arthritis kam es durch den Einsatz beider Hormone zu einem additiven Effekt bezüglich der Entzündungshemmung [103].

Der Effekt von Hydrocortison wurde auch von Wang an humanen Chondrozyten in einem *in vitro* Modell untersucht. Er konnte zeigen, dass durch die einwöchige Einwirkung von Hydrocortison die Interleukinkonzentration heruntergeregt wurde, wohingegen die ECM Produktion, vor allem Aggrecan, Typ II Kollagen und Fibronektin, signifikant zur Kontrollgruppe zunahm [115].

Unabhängig von dem neuroendokrinen Einfluss auf systemischer Ebene, kann auch eine lokale Steroidhormonproduktion durch deren Inaktivierung und durch deren Umwandlung eine entscheidende Rolle bei der Regulation von entzündlichen Prozessen spielen [95].

Wie oben beschrieben, konnte vielfach gezeigt werden, dass Hormone sowohl die Entzündungsreaktionen als auch den Stoffwechsel und die Matrixproduktion von Knorpelgeweben entscheidend beeinflussen. Über den unterstützenden oder hemmenden Effekt von Hormonen auf die Knorpelintegration hingegen weiß man bis heute relativ wenig.

### **3.5.2 TE-Knorpel (tissue engineered cartilage / Regeneratknorpel)**

Es konnte in vielen Veröffentlichungen nachgewiesen werden, dass Zytokine und Steroidhormone einen entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel des Gelenkknorpels und des TE-Gewebes haben.

So zum Beispiel untersuchte Kellner in einem *in vitro* Modell den Einfluss von Insulin bei der Züchtung von TE-Knorpelgewebe (tissue engineered cartilage).

Es wurden dafür bovine Gelenkknorpelzellen isoliert und auf eine abbaubare Polyglycolsäurematrix (PGA) aufgetragen. Danach wurden sie sieben Wochen lang mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0,05 – 50 µg/ml) kultiviert. Es stellte sich heraus, dass sich bei allen Insulinkonzentrationen das Wachstum des TE-Knorpelgewebes, der GAG-Gehalt zum Volumen und die mechanischen Eigenschaften der TE-Knorpelstücke verbesserten.

Es zeigte sich eine typische glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung des Insulins mit einem Konzentrationsoptimum bei 2,5 µg/ml [51].

Auch Moretti untersuchte an einem kombinierten *in vitro* und *in vivo* Modell, wie Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren künstlich gezüchtete TE-Knorpelstücke beeinflussen. Er bestätigte die voraus gegangenen Ergebnisse von Kellner [72].

Rotter untersuchte mit einem *in vivo* Schweinemodell, in welcher Weise Interleukin-1alpha TE-Knorpelgewebe beeinflusst. Er kam zu dem Ergebnis, dass die lokalen Entzündungsreaktionen mit Expression von IL-1alpha zu einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften des Knorpelkonstruktes führen [92].

In der Publikation von Cortial werden Chondrozyten insgesamt vier Wochen lang auf einer Kollagenmatrix kultiviert. Einem Teil der Proben wurde nach 14 Tagen Interleukin-1beta zugesetzt und eine Genexpressionsanalyse mittels real-time PCR durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine vermehrte Bildung von Entzündungsmediatoren und eine Reduktion von Kollagen Typ II und Aggrecan unter dem Einfluss von IL-1beta [24].

IL-1 scheint somit auf *in vitro* gezüchteten TE-Knorpelstücken ähnliche Wirkungen zu haben wie auf einen nativen Gelenkknorpel (siehe 3.5.1). In der Veröffentlichung von Appel wird eine Lipidmatrix verwendet, die mit Wachstumsfaktoren beladen werden kann, um sie dann im Kultivierungsprozess dosiert wieder abzugeben. Auf der Matrix wurde mit verschiedenen Insulinkonzentrationen über vier Wochen ein künstlicher Knorpel gezüchtet. Man konnte damit belegen, dass das freigesetzte Insulin konzentrationsabhängig die Entwicklung der Knorpelregenerate stimulierte, was man an einer Erhöhung am GAG- und Kollagen-Gehalt erkennen konnte [5].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Insulin und Steroidhormone einen wesentlichen Einfluss auf TE-Knorpelgewebe haben. Die Integration von TE-Knorpelgewebe zu dem Gelenkknorpelgewebe ist dagegen wenig untersucht.

Eine der wenigen Arbeiten stellt die Veröffentlichung von Petersen dar, der in einer *in vivo* Studie die Integration von *in vitro* gezüchteten TE-Knorpel mit nativem Gelenkknorpel untersuchte. Es wurden 26 und 52 Wochen nach Implantation von TE-Knorpel in Femurkondylen von Minipigs Proben entnommen. Dabei konnte ein hyalinartiger Knorpel nachgewiesen werden.

Ein Spalt zwischen dem TE-Knorpel und dem nativen Knorpel stellte sich nicht dar. Der hyaline Aufbau konnte auch durch eine hohe Synthese von Kollagen Typ II in dem Gewebe nachgewiesen werden [81].

Neben dieser *in vivo* Studie sind nur die 5 oben genannten *in vitro* Studien bekannt, die sich mit der Integration von TE-Knorpel zum Gelenkknorpel beschäftigen. Diese Modelle leiden unter einer mangelhaften mechanischen Analyse. Das verwendete push-out Modell kann zwischen wahrer Integration und Verpressung nicht unterscheiden. Der Einfluss von Botenstoffen auf die Integration von TE-Knorpel zum Gelenkknorpel ist gar nicht untersucht.

### 3.6 Fragestellung

In dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen behandelt:

- 1) Etablierung des *in vitro* Integrationsmodells nach Reindel für TE-Knorpel zu nativen Gelenkknorpelblöcken.
  - a) Vergleichende Untersuchungen der Integration von TE-Knorpel/Gelenkknorpel *in vitro* zu Gelenkknorpel/Gelenkknorpel *in vitro*.
  - b) Einfluss von Ascorbinsäure auf die Integration von TE-Knorpel/Gelenkknorpel *in vitro* zu Gelenkknorpel/Gelenkknorpel *in vitro*.
  - c) Einfluss der Kulturperiode auf die mechanisch messbare Integration von TE-Knorpel/Gelenkknorpel *in vitro* zu Gelenkknorpel/Gelenkknorpel *in vitro*.
- 2) Einfluss von Insulin:
  - a) Während der Kultivierung des TE-Knorpels und der anschließenden Integration mit Gelenkknorpel.
  - b) Während der Integrationsperiode des TE-Knorpels mit Gelenkknorpel.
- 3) Einfluss des Steroidhormons Testosteron auf die Integration von TE-Knorpel/Gelenkknorpel *in vitro* zu Gelenkknorpel/Gelenkknorpel *in vitro*.
- 4) Einfluss einer Kombination aus Insulin und Testosteron auf die Integration von TE-Knorpel/Gelenkknorpel *in vitro* zu Gelenkknorpel/Gelenkknorpel *in vitro*.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

Substanz	Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land
Typ II Kollagenase		CellSystem	St. Katharinen, Deutschland
Papainase		CellSystem	St. Katharinen, Deutschland
Fetales bovines Serum	FBS	PAN	Deutschland
High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium	31885-023, DMEM	Gibco	Deutschland
Calcium- and Magnesium freier Phosphatsalzpuffer	PBS	Gibco	Deutschland
nicht-essentielle Aminosäuren	11140-035	Gibco	Deutschland
L-Glutamin	25030-024	Gibco	
Prolin	81709	Fluka	Deutschland
Ascorbinsäure	A-0278	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ascorbinsäure-2-Phosphat	A-8960	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Desoxyribonukleinsäure	DNA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dimethylmethylenblau		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eosin		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Hematoxylin		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N-2-hydroxyethylpiperazin N'-2-ethansulfonsäure	15630-056, HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin	15070-022	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Safranin-O		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypanblau		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Diaminobenzidin	DAB	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Testosteron	T 1500	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Östrogen	17-β-Estradiol, E8875	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trans-Dehydroepiandrosteron	D 4000, DHEA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
rekombinantes humanes IL-1β	I 94401	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Formalin 37 %		Merck	Darmstadt, Deutschland
p-Dimethylaminobenzaldehyd	p-DAB	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bovines Insulin (Pankreas)		Merck	Darmstadt, Deutschland
Antikörper gegen Kollagen Typ I und II		Biotrend	Köln, Deutschland
StreptABCComplex/HRP mouse/rabbit		DAKO A/S	Dänemark
Rekombinantes humanes IGF-I		Roche Pharma Research	Penzberg, Deutschland
Nadeln		Unimed	Lausanne, Schweiz
<b>Assay</b>			
L-Cystein		Merck	Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> EDTA		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DANN			
Hoechst Dye	Sigma #33258	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
NaCl			
Chondroitinsulfat A			
1,9 Dimethylmethylenblau	DMMB	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut		J. T. Baker	Deventer, Holland
Ameisensäure	Formic acid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumformiat	Sodium formate		
Papain		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Gewebe	Gelenknorpel	Lokale Metzgereien (Fam. Stierstorfer)	Wenzenbach, Deutschland

Das **Standardmedium für die Gewebskultur** besteht aus DMEM; 10% FBS; 4,5 g/l Glucose; 584 mg/L Glutamin; 50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin; 10 mM Hepes; 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren; 0,4 mM Prolin. Diesem Kulturmedium wird standardisiert 100 µg/ml Ascorbinsäure hinzugefügt.

Für eine Reihe von Experimenten entfällt diese Substitution als Negativkontrolle oder zur spezifischen Substitution, was in den folgenden Versuchsreihen speziell ausgewiesen wird.

**Testosteron** (trans-Testosterone, 17 $\beta$ -Hydroxy-3-oxo-4-androsterone) wird als Trockenpulver bezogen und in DMSO in einer Stammlösung von 1 mol/l gelöst. Aus dieser Stammlösung erfolgen die weiteren Verdünnungsreihen und dem Volumen entsprechende Substitution in das Standardmedium.

Das **Insulin** wird in einer Stammlösung von 1mg/ml vom Kooperationspartner Dr. Torsten Blunk, Pharmazeutische Technologie, bezogen. Die gewünschte Konzentration Insulin im Standardmedium wird durch entsprechende Substitution von 0,25  $\mu$ g/ml oder 2,5  $\mu$ g/ml Insulinstammlösung auf 99,975 ml Standardmedium erreicht.

Das präparierte Kulturmedium wird auf die Tagesmengen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

## 4.2 Züchtung des TE-Knorpels

Die Züchtung des TE-Knorpels (tissue engineered cartilage) erfolgt unter der Leitung von Dr. Torsten Blunk in der Abteilung Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg [51].

Die Chondrozyten für die Züchtung werden aus nativem Knorpel von Kälbern gewonnen. Durch den Verdau des Knorpels mit Typ II Kollagenase werden die Chondrozyten aus dem Gewebsverband herausgelöst und in einem Kulturmedium in Suspension gebracht (Abbildung 1 (5)). Das Medium wird wie folgt zusammengesetzt: DMEM; 10% FBS; 4,5 g/l Glucose; 584 mg/L Glutamin; 50 U/ml Penicillin; 50  $\mu$ g/ml Streptomycin; 10 mM Hepes; 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren; 0,4 mM Prolin und 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure. Das Medium wird in dieser Zusammensetzung auch für Zellbesiedelung der Trägermatrices verwendet.

Als Trägermaterial wird eine PGA-Matrix (Polyglycolic acid) mit einem Faserdurchmesser von 12-14  $\mu$ m, einer Porosität von 96 % und einer Dichte von 62 mg/cm<sup>3</sup> von Albany International (Mansfield, MA) verwendet. Es werden Scaffolds von 20 mm Durchmesser und 5 mm Dicke ausgeschnitten, dann 1 h lang mit UV Licht sterilisiert und mit 70 % Ethanol behandelt. Nachdem sie gründlich mit PBS gespült sind, werden die Scaffolds auf Nadeln, die in einem Silikonpfropfen befestigt sind, aufgesteckt (Abbildung 1(7)). Der Silikonpfropfen wird dann auf die Öffnung eines „Spinner flasks“ mit einem magnetischen Rührstab gesteckt, mit 110 ml Kulturmedium (siehe oben) gefüllt und unter physiologischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) bei 60 rpm 24 h lang belassen. Danach wird das Medium gewechselt und die Zellsuspension mit ca. 40 Millionen Chondrozyten eingefüllt (Abbildung 1(6)).

In den nächsten 48 h können sich die Chondrozyten, die durch einen Rührstab mit 50 Umdrehungen pro Minute bewegt werden, an die Polymerfasermatrix (Scaffolds) anheften (Abbildung 1(8)). Im Anschluss werden die besiedelten Matrices (Scaffolds) in „6 well-plates“ (mit je 6 ml Kulturmedium und 1% FBS) überführt und in den Vorversuchen 4 Wochen, danach 8 Wochen lang im Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. In dieser Phase werden die Polymerfasern nahezu vollständig resorbiert und ein hyalinartiger Regeneratkorpel (tissue engineered cartilage) gebildet, den wir in dieser Form als TE-Korpelstück bezeichnen. Das Kulturmedium wird jeden zweiten Tag gewechselt.

## 4.3 Probenpräparation und Geometrie

### 4.3.1 Der nativen Gelenkknorpelblöcke

Die Gelenkknorpelblöcke werden aus den Hinterläufen von 8 bis 12 Wochen alten Kälbern bei einem Metzger aus der Region (Metzgerei Stierstorfer, Wenzenbach, Deutschland) gewonnen. Die Tiere werden vor der Schlachtung von einem Tierarzt auf ihren Gesundheitszustand und auf iatogene Hormonbehandlung untersucht.

Das Kälberknie wird nach dem Bolzenschuss aus dem Kadaver in einem Stück herausgelöst, wobei auf die Unversehrtheit der Kniegelenkskapsel geachtet wird. Das Knie mit anhängendem Gewebe wird sofort auf 4°C gekühlt und innerhalb von 2 Stunden nach Schlachtung im Labor verarbeitet. Das Femur wird dann in einen zuvor steril abgedeckten Schraubstock eingespannt und das Gelenk mit einer medial parapatellaren Kapsulotomie eröffnet. Von diesem Zeitpunkt an wird das Gelenk kontinuierlich mit PBS (=Dulbecco's phosphat buffered saline), das mit Penicillin und Streptomycin versetzt ist, befeuchtet.

Mit einer sterilisierten oszillierenden Knochensäge werden nun aus dem femuro-patellaren Gleitlager osteochondrale Blöcke mit einer angestrebten Kantenlänge von 10 mm und einer Höhe von ca. 20 mm herausgeschnitten und bei 4°C in PBS, mit Penicillin und Streptomycin aufbewahrt. Dies geschieht innerhalb von 4 Stunden nach der Schlachtung des Tieres. (Abbildung 1 (1))

### 4.3.2 Der TE-Knorpelblöcke

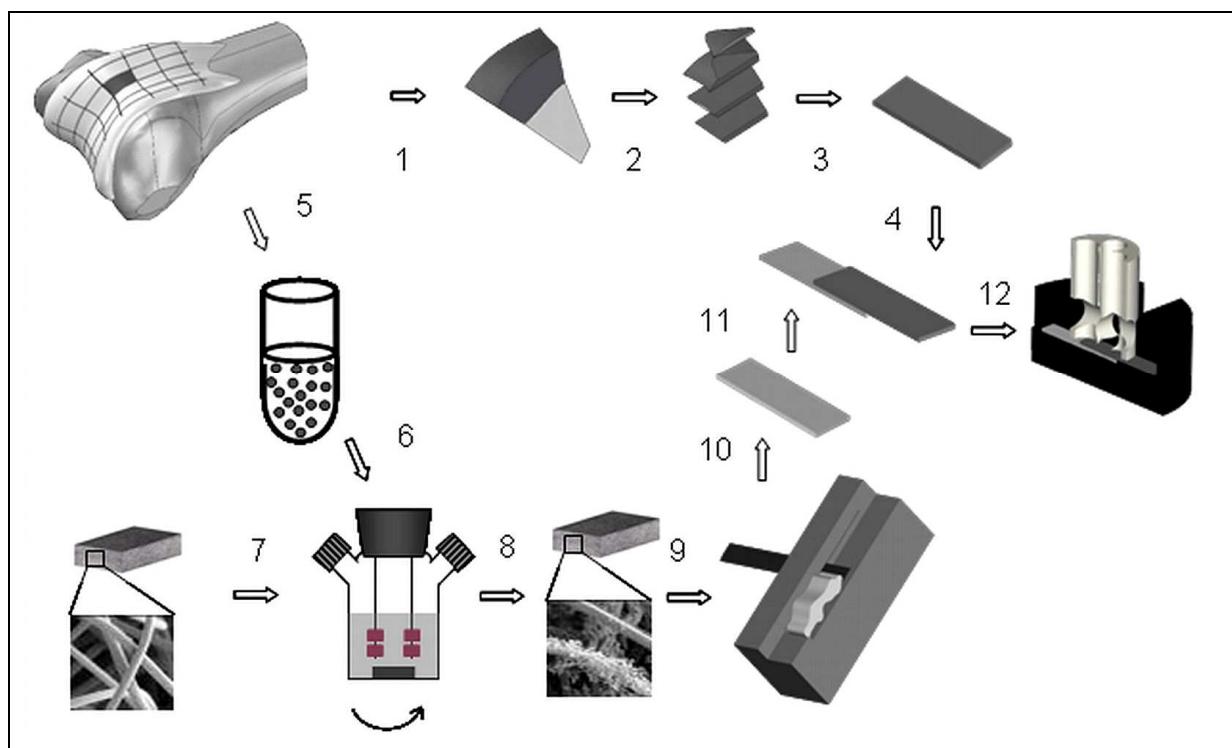
Die Präparation der TE-Knorpelstücke in geometrisch definierte TE-Knorpelblöcke zu schneiden, stellt sich aus mehreren Gründen als äußerst schwierig dar. Eine Einspannung in das Schlittenmikrotom ist nicht möglich, da es sich nur um ein TE-Knorpelstück ohne Knochenanteil handelt. Außerdem ist der TE-Knorpel deutlich weicher als der Gelenkknorpel.

Es wird deshalb mit verschiedenen Schnittinstrumenten experimentiert, um die gleiche Blockgeometrie wie bei den Gelenkknorpelblöcken ( $0,25 \times 2,5 \times 8 \text{ mm}$ ) zu erreichen.

Der genaue Aufbau und die jeweils erreichten Ergebnisse sind detailliert in Punkt „5.1.1 Etablierung des Integrationsmodells beschrieben“.

#### 4.4 Das *in vitro* Knorpelintegrationsmodell

Es wird ein experimentelles *in vitro* Tiermodell zur Gelenkknorpelintegration verwendet. Dieses Modell wurde erstmals von Reindel beschrieben [86], von Englert modifiziert und wird auch in dieser Arbeit angewendet [32].



**Abbildung 1: Flussdiagramm der Knorpelprobenherstellung und Präparation**

Präparation der nativen Knorpelblöcke (1-4), Kultivierung der TE-Knorpelblöcke, mit Präparation (5-11) und das Zusammenlegen beider Blöcke im Kulturgefäß (12).

Aus dem femoropatellaren Gleitlager von Kälbern werden mit einer oszillierenden Säge Knorpelknochenblöcke herausgeschnitten (1) und mit einem Mikrotom in Knorpelscheiben mit definierter Dicke geschnitten (2). Aus diesen Scheiben werden Gelenkknorpelblöcke mit definierter Länge und Breite herauspräpariert (3) zwei Blöcke bilden eine Stichprobe für das Integrationsmodell (4).

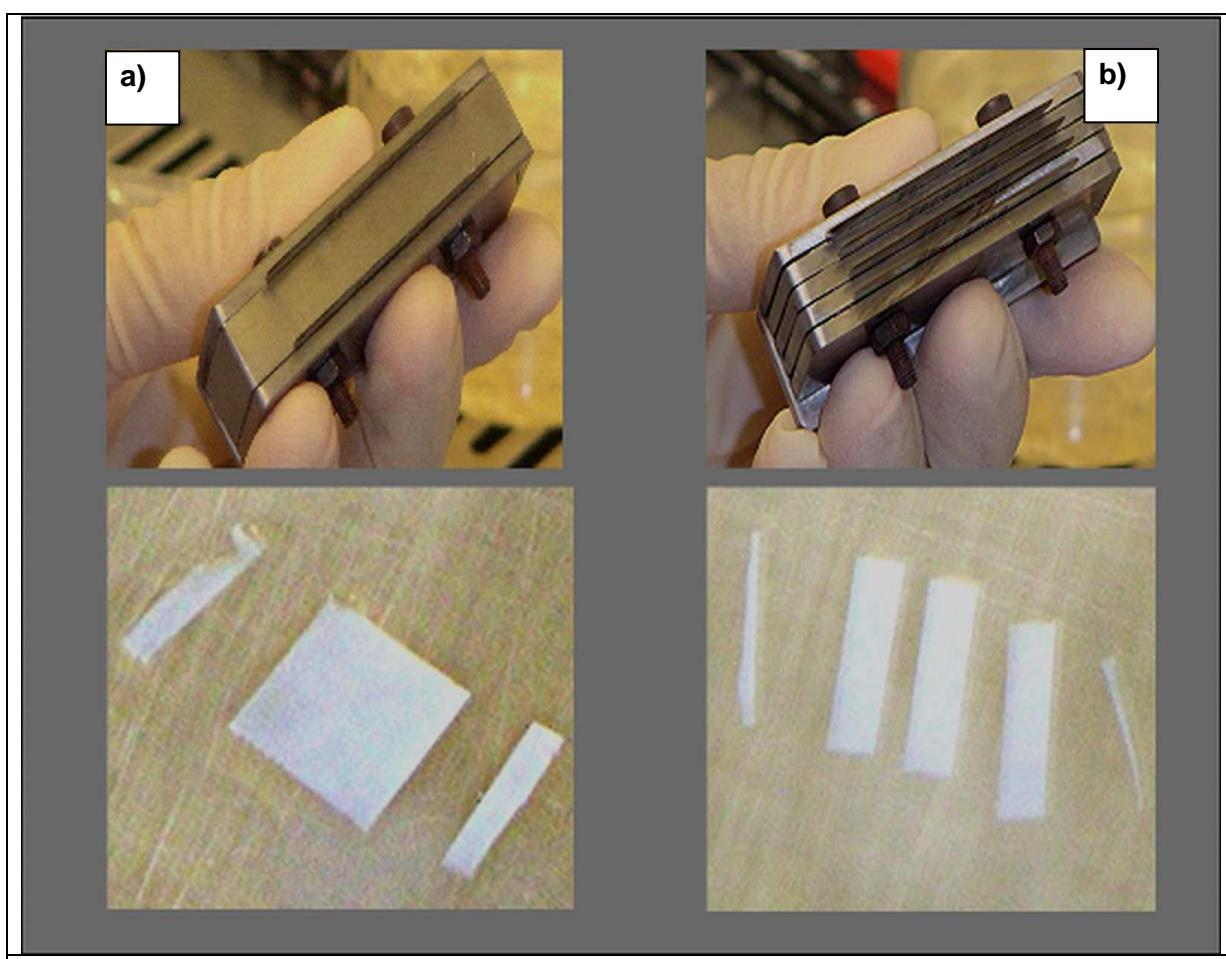
Für die Züchtung des Regeneratknorpelgewebes (TE-Knorpel) werden Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel des femoropatellaren Gleitlagers von Kälbern herausgelöst (5). Die Zellen werden in „Spinner-flasks“ durch eine kontinuierliche Rotation des Zellkulturmediums auf Polyglykolsäurematrices besiedelt (6,7). Diese Zell-Matrix-Konstrukte werden in „6-well-plates“ 4 oder 8 Wochen lang kultiviert (8). Es entsteht ein ungeformtes Regeneratknorpelstück (TE-Knorpelstück), das weiter zugeschnitten werden muss. Das TE-Knorpelstück wird mit speziellen Schneideinstrumenten zunächst in Scheiben definierter Dicke und anschließend in TE-Knorpelblöcke definierter Länge und Breite geschnitten (10). Der zugeschnittene Gelenkknorpelblock wird mit dem TE-Knorpelblock zusammengelegt (11) und in einer Kulturkammer mit einem Stempel fixiert (12). In dieser Position erfolgt eine standardisierte Gewebekultur nach der die Integration beider Blöcke mechanisch im Scherbruchversuch untersucht wird.

Die Knorpel-Knochenblockzylinder (Abbildung 1 (1)) werden in einem Schlittenmikrotom (HM440 Microm, Deutschland) mit dem knöchernen Anteil eingespannt und von der Gelenkfläche auf den Knochen zugehend in Knorpelscheiben geschnitten (2).

Die oberste Lage der Gelenkknorpeloberfläche (Lamina splendens) mit einer Dicke von 0,20 mm wird auf 0,50 mm abgehoben und verworfen, da diese Schicht sehr schlechte Integrationseigenschaften besitzt [34].

Anschließend erfolgen drei Schnitte mit einer Schichtdicke von jeweils 250 µm (2). Diese Knorpelscheiben werden bis zum nächsten Präparationsschritt in PBS-Lösung zwischengelagert.

In dem folgenden Präparationsschritt werden aus diesen Knorpelscheiben mit einem Zweiklingenskalpell (eigene Herstellung, Zwischenraum von Klinge zu Klinge 8 oder 2,5 mm) drei Knorpelblöcke mit einer definierten Größe von 8 x 2,5 x 0,25 mm geschnitten (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Herstellen der Gelenkknorpelblöcke mit definierter Geometrie**

- a) Zweiklingenskalpell, um die Knorpelscheibe in eine definierte Breite von 8 mm zu schneiden.
- b) Vierklingenskalpell mit einem Abstand von 2,5 mm zwischen den Klingen, um aus der Knorpelscheibe 2,5 mm breite Gelenkknorpelblöcke zu schneiden.

Das TE-Knorpelstück wird mit einer anderen Methode zu TE-Knorpelscheiben (siehe 4.3.2) verarbeitet. Die TE-Knorpelscheiben werden mit derselben Methode zu TE-Knorpelblöcken geschnitten. Alle Präparationsschritte erfolgen in PBS-Lösung.

## 4.5 Nachweis der Zellvitalität

Die Zellvitalität und die Zelldichte sind entscheidende Voraussetzungen für eine gute Integration der zwei Knorpelscheiben [119]. Deshalb wird direkt vor und nach der Integrationsperiode die Zellvitalität mit dem „Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224)“ (Molecular Probes, Oregonon USA) stichprobenartig untersucht.

Der Test besteht aus zwei Komponenten, dem so genannten „Calcein AM“ und dem „Ethidium homodimer-1“. Lebende Zellen haben eine intrazelluläre Esterase Aktivität, durch die das nicht fluoreszierende, zellgängige Calcein AM in das intensiv fluoreszierende Calcein umgewandelt wird. Dieses verbleibt bei vitalen Zellen intrazellulär und erzeugt ein intensives grün fluoreszierendes Licht, das bei einer Wellenlänge von 495 nm – 515 nm sichtbar gemacht werden kann.

Tote Zellen hingegen haben keine intakte Zellmembran, wodurch das Ethidium homodimer-1 intrazellulär eindringen und sich an die freiliegende DNA anlagern kann. Dadurch bekommt das Ethidium homodimer-1 eine hellrot fluoreszierende Farbe, die bei einer Wellenlänge 495 nm – 635 nm sichtbar wird. Dieser Effekt ist bei vitalen Zellen nicht möglich, da sie eine intakte Zellmembran haben.

Für die Tests werden beide Komponenten bei Raumtemperatur aufgetaut und wie folgt zusammengemischt:

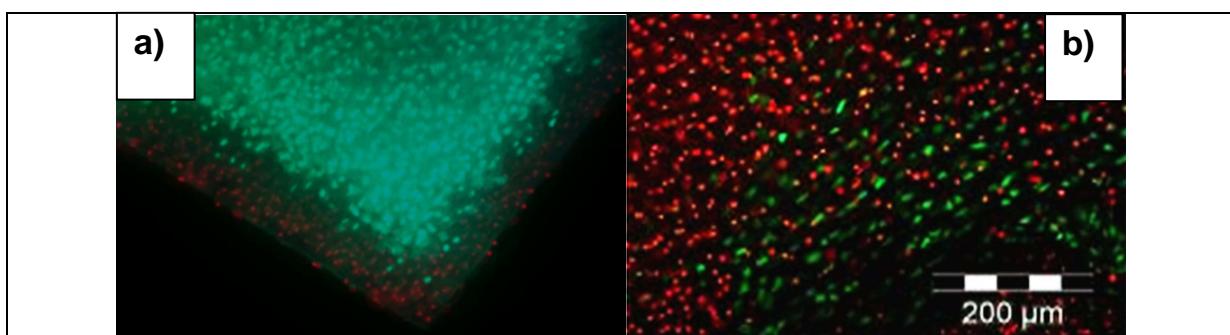
20 µl von Ethidium homodimer-1 werden mit 10 ml sterilem PBS vermischt, was eine 4 µM Lösung ergibt. Danach werden 5 µl des 4 mM Calcein AM zu der schon bestehenden 10 ml Lösung dazugegeben, was eine Lösung mit 2 µM Calcein AM und 4 µM Ethidium homodimer-1 ergibt. Diese Lösung wird in Eppendorfcups zu 2 ml aliquotiert und bei -20°C Grad eingefroren.

Für einen Vitalitätstest wird jeweils ein Eppendorfcup bei Raumtemperatur aufgetaut und die Knorpelprobe auf einem Objektträger 20 min lang inkubiert. Dies muss unter Lichtausschluss erfolgen, da Calcein AM durch Licht hydrolysiert wird.

Zur Untersuchung der Zellvitalität wird nach 20 min. Inkubationszeit in einer Dunkelkammer das rot-grün Verhältnis unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RBE) ausgewertet.

Die Bilderfassung ist standardisiert mit einem 40x Objektiv und einer hoch auflösenden Digitalkamera (Spot2000) mit Softwarekontrolle (Software Metamorph, Universal Imaging Corporation, West Chester, NY, USA).

Die Auflösung beträgt 0,69 µm/Pixel. Bei den als vital klassifizierten Knorpelscheiben findet sich ein Bild, mit dicht stehenden grünen Punkten, entsprechend lebenden Chondrozyten und einer avitalen Zone von 8 µm am Rande des Knorpelblocks. In diesem Bereich werden durch das Schneiden des Gewebes die Knorpelzellen abgetötet (Abbildung 3a (a)). Die avitalen Stichproben zeigen diese Rotfärbung über die gesamte Knorpelfläche (Abbildung 3a (b)).

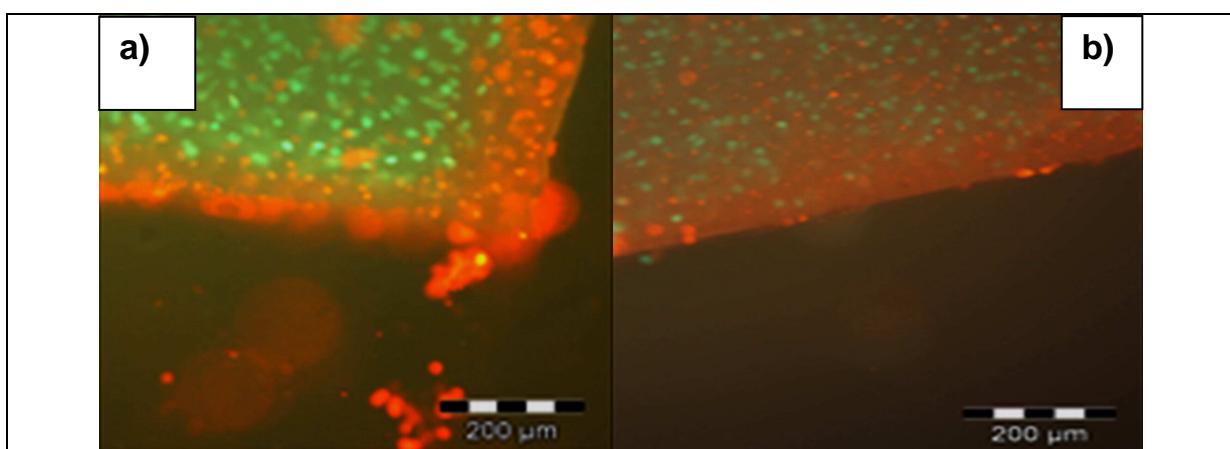


**Abbildung 3a: Fluoroskopische Gewebsuntersuchung zur Vitalitätsbestimmung (Positiv -, Negativbeispiel)**

a) Beispiel einer Live/Dead Kit Untersuchung. Die Schnittränder sind rot markiert und damit avital. Das Knorpelgewebe ist mehrheitlich grün markiert als Zeichen für lebende Zellen.

b) Beispiel einer Live/Dead Kit Untersuchung mit avitalem Gelenkknorpelgewebe. Es finden sich nur vereinzelt noch lebende Zellen (grün markiert).

Es werden nur Stichproben mit einem „lebend/tot-Quotienten“ von 9/1 für Integrationsuntersuchungen eingesetzt und auch nach der Integrationsperiode und mechanischen Auswertung auf die Vitalität geprüft (Abbildung 3b).



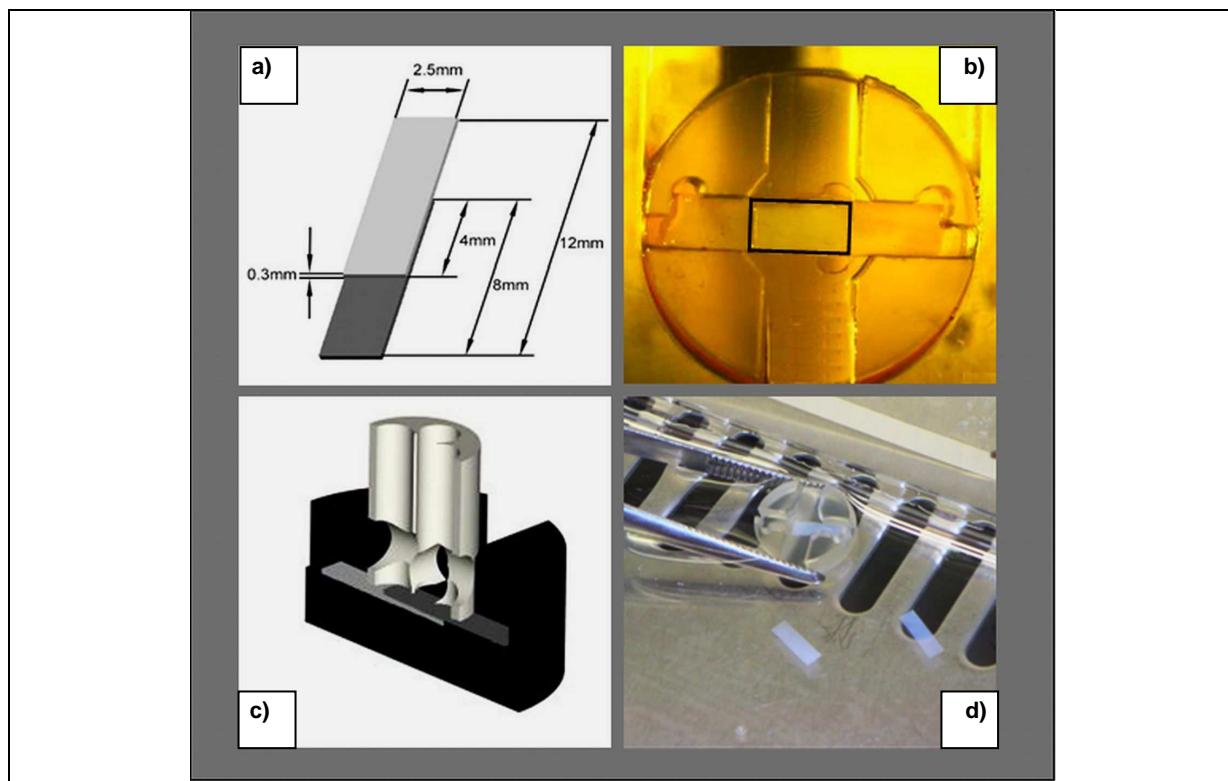
**Abbildung 3b: Fluoroskopische Gewebsuntersuchung zur Vitalitätsbestimmung (vor und nach Integrationsperiode)**

a) Es wird eine typische Vitalitätsprüfung eines Knorpelblocks vor Gewebekultivierung, nach Schnittpräparation dargestellt. Der Schnittrand ist durch eine hohe Dichte an toten, roten Zellen charakterisiert.

b) Die Verlaufskontrolle nach 14 Tagen Gewebekultur zeigt einen vergleichbaren „lebend/tot-Quotient“ bei etwas geringerer Intensität der Fluoreszenz.

## 4.6 Gewebekultur von Knorpelblockpaaren

Die Knorpelblöcke werden in Kulturgefäßen in Paaren zusammengelegt, so dass eine Überlappungsregion von  $2,5 \times 4$  mm entsteht (Abbildung 4). Das Kulturgefäß wird aus Polysulfon nach Design (PD Dr. Englert) und Vorlage nach Reindel [86] gefräst. Dieses Gefäß mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Höhe von 7 mm passt in eine Vertiefung einer „24-Lochplatte“ mit einem Restvolumen von 1 ml. Die Knorpelpaare werden mit dem Polysulfonhalter in eine Vertiefung der Platte abgelegt und mit 750  $\mu\text{l}$  Medium (Standardmedium siehe 4.1) benetzt. Im Inkubator erfolgt bei  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$  die Kultivierung. Die Kultivierungsdauer wird nach Versuchsanordnung mit 14 oder 28 Tagen festgelegt. Das Kulturmedium wird alle 2 Tage gewechselt.



**Abbildung 4: Geometrie der Gelenkknorpelblöcke und Positionierung in der Kulturmutter**

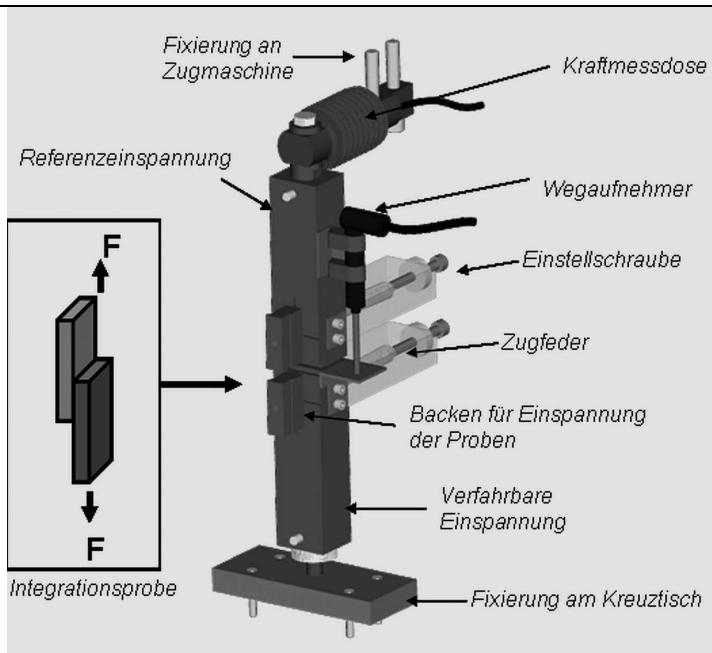
- a) Grafische Darstellung der Abmessungen der Knorpelblöcke.
- b) Lage der Knorpelblöcke in der Kulturmutter, die Überlappungszone, in der die Integration stattfindet ist schwarz umrandet und wurde lichtmikroskopisch vermessen
- c) Schemazeichnung der Kulturmutter mit beiden Knorpelblöcken, die mit dem Stempel komprimiert in Position gehalten werden.
- d) Einlegen der geschnittenen Knorpelblöcke in die Kulturmutter, die mit einer Pinzette fixiert wird. Die Präparation und das Einlegen findet in PBS-Lösung statt.

## 4.7 Mechanische Untersuchungen nach Gewebekultivierung

Bei jeder Stichprobe werden vor den mechanischen Versuchen stereomikroskopisch die genauen Abmessungen ermittelt (Olympus SZX12) und zur Bestimmung der Spannungs-Dehnungswerte verwendet (Abbildung 4b).

### 4.7.1 Einspannung der Zugproben

Zur Erzeugung der Haltekraft kommen zwei unabhängige Prinzipien gleichzeitig zur Anwendung. Die Knorpelblockprobenpaare werden über Vakuum angesaugt, durch zwei federvorgespannte Backen an den Enden eingeklemmt und gehalten. Die Verklemmung entspricht der Spannkraft der Federkennlinie einer jeden Backe, welche getrennt einstellbar sind. Eine Vakuumpumpe (Pfeiffer DUO 012A Volumenstrom 12 l/h) erzeugt an den Ansaugstellen (Durchmesser 1,2 mm) abzüglich aller Verluste und Leckagen eine Haltekraft von 0,2 N. So kann eine sichere Übergabe der Stichprobe von der Vakumsaugplatte an die Einspannung gewährleistet werden (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Probenhalterung für die mechanische Testmaschine**

Technische Zeichnung der gefertigten Einspannungsvorrichtung für die mechanische Messung der Scherbruchspannung der Gelenkknorpelintegrationsproben.

Die Einspannbacken halten die Proben an den beiden Enden auf einer Länge von 2 mm. Aufgrund der Probengeometrie ergibt sich eine Einspannungsfläche von 5 mm<sup>2</sup>. Der Anpressdruck wird über die Vorspannung der Feder stufenlos eingestellt und kann zwischen 5 N bis 20 N variiert werden.

Somit kann ein maximaler Anpressdruck von  $4 \text{ N/mm}^2$  erreicht werden. Bei diesem Anpressdruck liegt noch keine Schädigung oder Schwächung der Probe im Einspannungsbereich vor, wobei dennoch ein Durchrutschen verhindert wird.

Die Aufnahme der Zugproben aus der Kulturkammer und die Übergabe an die Prüfmaschine erfolgt durch einen porösen Stempel mit variablem Vakuumsystem. Die Stichprobe wurde exakt senkrecht mittels einer vorgegebenen Einspannungsvorrichtung mit Vakuumssystem für die Stichprobenaufnahme platziert. Über einen Anschlag wird gewährleistet, dass alle Stichproben an ihren Enden reproduzierbar in der Probenhalterung gefasst werden. Der Bereich der Messlänge befindet sich somit immer exakt in der Mitte zwischen den Einspannungen. Die untere Aufnahme kann über einen spielfreien Kreuztisch (Leica Auflösung 0,01 mm) axial zentriert werden, so dass mögliche überlagerte Biegebelastungen ausgeschlossen werden können. Die genaue axiale Ausrichtung der beiden Aufnahmen erfolgt mit Endmaßen. Die Verfahrgeschwindigkeit für die Zugversuche beträgt in allen Fällen 2 mm/min.

#### 4.7.2 Messdatenerfassung und Genauigkeit

Der Messbereich der für den Zugversuch verwendeten Kraftmessdose beträgt  $\pm 10 \pm 0,02 \text{ N}$ . Das elektronische Kraftsignal der Messdose wird auf  $\pm 10 \text{ V}$  verstärkt und steht an einem Analogausgang zur Verfügung.

Die Längenänderung der Proben während des Versuchs wird über einen induktiven Wegaufnehmer (HBM WA/10 mm) mit einem Messbereich von  $(5 \pm 0,01 \text{ mm})$  indirekt über die Einspannungsvorrichtung aufgenommen. Der Grundkörper des Aufnehmers ist direkt an der Referenzeinspannung befestigt. Der frei bewegliche Anker liegt auf der unteren Einspannungsvorrichtung auf. Die Prüfdistanz zwischen den Einspannungen beträgt 8 mm. Diese wird mit einem Endmaß ( $8 \pm 0,001 \text{ mm}$ ) exakt justiert und über einen Endanschlag an der Zugprüfmaschine fixiert. Sie stellt somit die Ausgangslänge  $l_0$  für alle Zugversuche dar.

Das elektronische Signal des induktiven Wegaufnehmers wird durch einen 5 kHz-Trägerfrequenzmessverstärker ebenfalls auf  $\pm 10 \text{ V}$  verstärkt. Nach dem elektrischen Abgleich von Verstärker und Aufnehmer werden mit Hilfe einer Mikrometerschraube (Steinmeyer  $25 \pm 0,01 \text{ mm}$ ) die Kalibrierwerte zwischen Weg und dem entsprechenden Signal ermittelt.

Die beiden aufbereiteten differentiellen Analogsignale werden über eine Anschlusseinheit (National Instruments, SCB 68) der Datenerfassungskarte (National Instruments PCI-MIO-16 E-4) und eine 12 Bit AD-Wandlung mit einer Auflösung von 5 mV/V weiterverarbeitet.

Die Auflösung des Kraftsignals beträgt  $\pm 0,08$  N, die erzielte Genauigkeit der Verformung liegt bei  $\pm 0,06$  mm.

Zur Verarbeitung der Messsignale wurde in LABView ein geeignetes Programm erstellt. Die gerätebedingte Abtastrate beträgt 20 Hz. In der Software wurde ein elektronischer Filter integriert, um das hochfrequente Rauschen des Maschinensignals zu unterdrücken. Alle Messwerte werden als Textdateien gespeichert und können so mit verschiedenen Programmen ausgewertet werden.

## 4.8 Histologie

Ein Teil der Stichproben wird für histologische Untersuchungen präpariert. Diese werden in einer 2 %igen Glutaraldehydlösung konserviert. Nach 30 min werden die Proben in 10 % Formalin oder durch Einfrieren bei -18°C fixiert. Die formalinfixierten Proben werden in Paraffin eingebettet und Querschnitte mit einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Entparaffinierte Schnitte werden mit Safranin-O und Toluidinblau-Färbung zur Darstellung des Proteoglykangehalts [61] gefärbt. Aus den gefrorenen Proben werden Gefrierschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen und Typ II Kollagen beimpft. Durch einen zweiten Antikörper gegen den ersten Antikörper beladen mit DAB kann dieser sichtbar gemacht werden (StreptAvidinBiotin-Kits). Bei den histologischen Schnitten ist der Knorpelblock immer oben und der TE-Knopelblock immer unten positioniert.

## 4.9 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie werden einige Stichproben sowohl von nativ-nativ Knorpelblöcken als auch von nativ-TE Knorpelblöcken in der im Labor etablierten und publizierten Technik vorbereitet [4]. Die Stichproben werden in Glutaraldehyd fixiert und anschließend mit Phosphatpuffer (pH 7,4) abgespült. Nun wird die Entwässerung mit aufsteigenden Ethanol- und Acetonkonzentrationen durchgeführt. Die dehydrierten Gewebeproben werden mit einer flüssigen Karbon-Dioxid Lösung ausgetrocknet und in einem „Sputter Coater“ (Polaron) mit Gold überzogen. Die so präparierten Gewebeproben werden dann mit einem ZEISS DSM 940 Mikroskop oder LEO 1445 mikroskopiert und fotografiert.

## 4.10 Biochemische Analytik

### 4.10.1 Proteoglykanmessung der Knorpelblöcke

Ein Teil der Stichproben wird nach den Zugversuchen mit einem Papain-Puffer (bez. auf 50 ml PBS: 0.0363 g L-Cystein, 0.1117 g Na<sub>2</sub>EDTA → pH 6.0, 326 µl Papain) versetzt, über 18 h bei 60 °C verdaut und anschließend bei -78 °C gelagert.

Eine Standardkurve wird aus einer Stammlösung mit einem Chondroitinsulfatgehalt von 7 mg/ml in 8 Graduierungen ebenfalls in oben beschriebenem Papain-Puffer bei 60°C über 18 h verdaut. Am nächsten Tag wird daraus die Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe von 40 µg/ml, 30 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml hergestellt.

Das DMMB Reagenz wird wie folgt hergestellt: Lösung von 18 mg 1,9-Dimethylethylenblau (DMMB) in 5 ml absoluten Alkohol, Addition von 2 ml Ameisensäure und 2 g Natriumformiat. Das Ganze wird mit <sub>d</sub>H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von einem Liter gebracht, wobei der pH-Wert bei ungefähr 3.0 liegt.

Aus den jeweiligen Stichproben wird dreimal ein Teil in ein „96 well-plate“ mit jeweils einem Volumen von 50 µl/well aliquotiert. Ein jedes Well wird mit 200 µl DMMB-Reagenz versetzt und im Anschluss im ELISA mit einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

### 4.10.2 Zellzahlmessung mittels DNA-Assay

Es wird eine Standardkurve aus einer DNA-Stammlösung mit einem DNA-Gehalt von 5 mg/ml erzeugt, indem eine Aliquotierung in entsprechender Konzentration durchgeführt wird. Die Aliquots werden in Papainpuffer bei 60 °C über Nacht (18 h) verdaut. Am nächsten Tag wird die Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe von 40 µg/ml, 30 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml hergestellt.

Der Assaypuffer wird wie folgt hergestellt: lichtgeschützte Lösung von Hoechst Dye (#33258) in <sub>d</sub>H<sub>2</sub>O 1 mg/ml.

Herstellung von 10-fach konzentriertem TNE Puffer: Es werden 12,11g Tris, 100 mM 3,72g EDTA, Na<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O 10 mM, 116,89 NaCl 2M mit 800 ml <sub>d</sub>H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit konzentrierter Salzsäure auf ein pH von 7.4 eingestellt. Das Volumen wird auf einen Liter mit <sub>d</sub>H<sub>2</sub>O ergänzt. Nach Bedarf erfolgt die Verdünnung auf 1/10.

Der Assaypuffer setzt sich aus 1 µl Hoechst Dye Stammlösung und 10 ml TNE-Lösung zusammen.

Die laborchemischen Stichproben werden jeweils dreifach in ein „96 well-plate“ in einer Menge von 10 µl/well eingebracht, mit 200 µl Assaypuffer versetzt und bei 360 nm im ELISA vermessen.

#### **4.11 Auswertung und Statistik**

Die Datenerfassung und die deskriptive Statistik erfolgt mittels Excel für Windows 2003. Jede Stichprobe und der daraus abgeleitete Wert wird durch eine Untersuchung numerisch codiert und nach jeder Datenübertragung erfolgt eine Konsistenzprüfung. In dieser Form werden die Daten in SPSS 16.0 "german edition for windows" überführt. Die schließende Statistik erfolgt mittels SPSS. Die Prüfung der Normalverteilung wird durch den „Kruskal-Wallis“ Test untersucht. Für nicht normal verteilte Werte kommt der „Mann-Whitney-U“ Test zur Anwendung. Normalverteilte Werte werden durch eine einfaktorielle ANOVA Analyse und ggf. mit einem post-hoc Tukey Test auf signifikante Unterschiede analysiert. Die Signifikanz wird mit einem Wert von  $p \leq 0.05$  angenommen.

Die grafische Darstellung erfolgt mit SigmaPlot, wobei die Mediane der einzelnen Gruppen in Box Plots mit der jeweiligen 25th und 75th Percentile dargestellt sind und die Fehlerbalken über und unter den Box Plots jeweils die 90th und 10th Percentile anzeigen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vorversuche

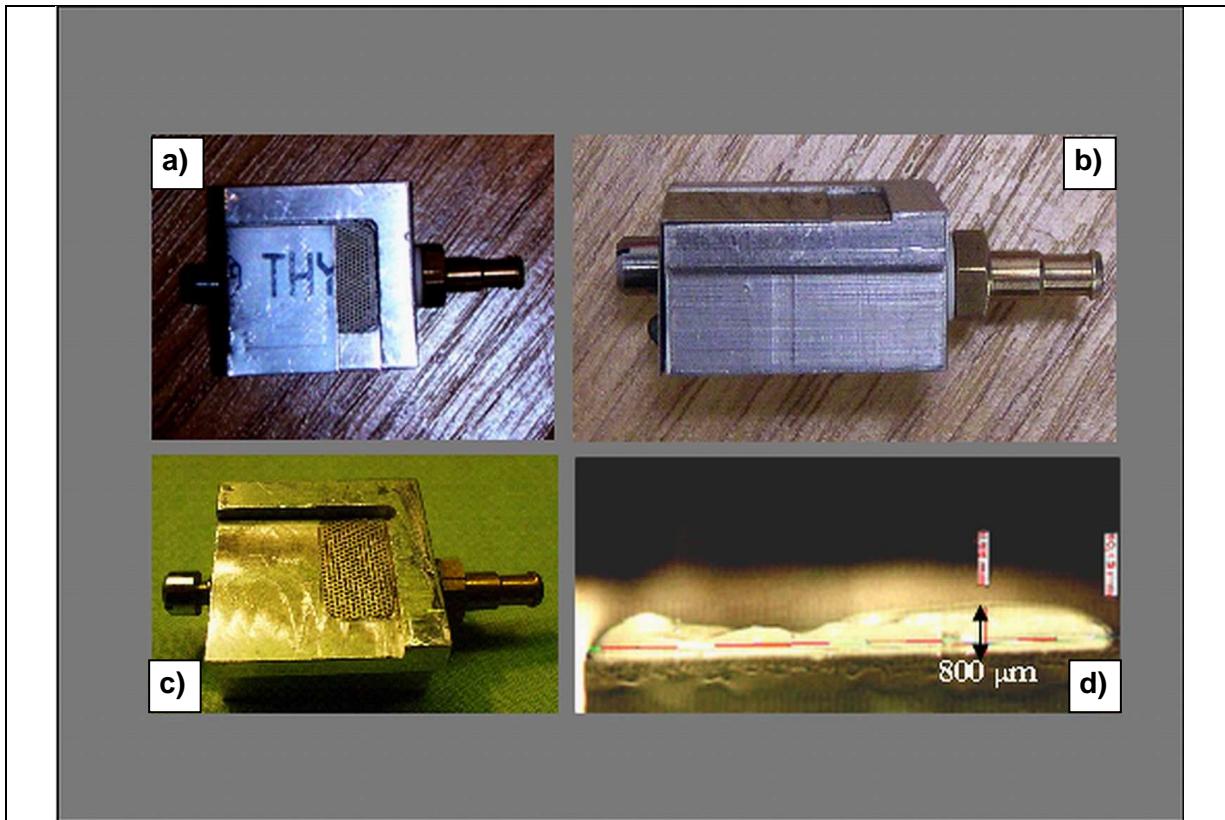
#### 5.1.1 Etablierung des Integrationsmodells

Die Präparation des TE-Knorpels war in den ersten Versuchen aus mehreren Gründen schwierig. Die Kultivierung des TE-Knorpels wurde, wie oben beschrieben, auf Matrices (Scaffolds) durchgeführt und es konnten TE-Knorpelstücke mit etwa 20 mm Länge, 15 mm Breite und 10 mm Höhe gezüchtet werden. Da es sich bei diesem TE-Knorpel nicht um einen Knorpel-Knochenzylinder wie bei der Präparation des Gelenkknorpels handelte, fehlte die feste Komponente des Knochens zum Einspannen ins Mikrotom. Der gezüchtete TE-Knorpel hatte außerdem eine weichere Konsistenz als der Gelenkknorpel, was die Schnittführung zur Erstellung einer exakten Probengeometrie erschwerte.

Deshalb wurde nach mehreren frustranen Vorversuchen für die Präparation des TE-Knorpels (Abbildung 6) ein neues Schneideinstrument von Dipl.-Ing. (FH) Johann Fierbeck von der Fachhochschule Regensburg entworfen und angefertigt. Mit diesem konnte eine ausreichende Fixierung der TE-Knorpelstücke erreicht werden. Das TE-Knorpelstück wurde dabei von drei Seiten gehalten und die Schneideklinge konnte durch diese Fixierung in definierter Position zum TE-Knorpelstück geführt werden (Abbildung 7 und 8).

Bei den **ersten frustranen Versuchen** wird für die Präparation des TE-Knorpelstückes ein Metallquader mit einer Länge und Breite von 35 mm und einer Höhe von 20 mm entworfen. Im Inneren des Quaders befindet sich ein kleiner Hohlraum, mit einer feinmaschigen Lochplatte bedeckt, der über den Anschluss auf der rechten Seite durch einen Schlauch mit einer Vakuumpumpe verbunden ist. Dadurch kann ein Unterdruck erzeugt werden, der das TE-Knorpelstück ansaugt und so in seiner Position auf der Lochplatte hält. Die Oberseite des Quaders hat auf 2 Seiten einen Schnittrand von 5 mm Breite und 2 mm Höhe (Abbildung 6c). Dieser soll eine zusätzliche Fixierung des TE-Knorpelstückes ermöglichen. Der Metallquader dient zur Einspannung ins Schlittenmikrotom (Zeiss Microm HM440E, Deutschland) und zur Präparation der TE-Knorpelscheiben. Das Ergebnis dieser Methode ist, dass dem Regeneratknorpel durch das Vakuum Wasser entzogen und so das Volumen des TE-Knorpelstückes wesentlich verringert wird. Es kann keine glatte Oberfläche der TE-Knorpelscheiben mit dieser Technik geschnitten werden (Abbildung 6d).

Im **zweiten Versuch** wird zusätzlich zu dem Vakuumgitter und dem Stoßrand noch ein Metallplättchen angefertigt, das durch eine Schraube verschoben werden kann, um das TE-Knorpelstück zusätzlich zu fixieren (Abbildung 6a,b). Dadurch kann aber die Qualität der Präparation nur unwesentlich verbessert werden.



**Abbildung 6: Erstes Schneideinstrument für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke**

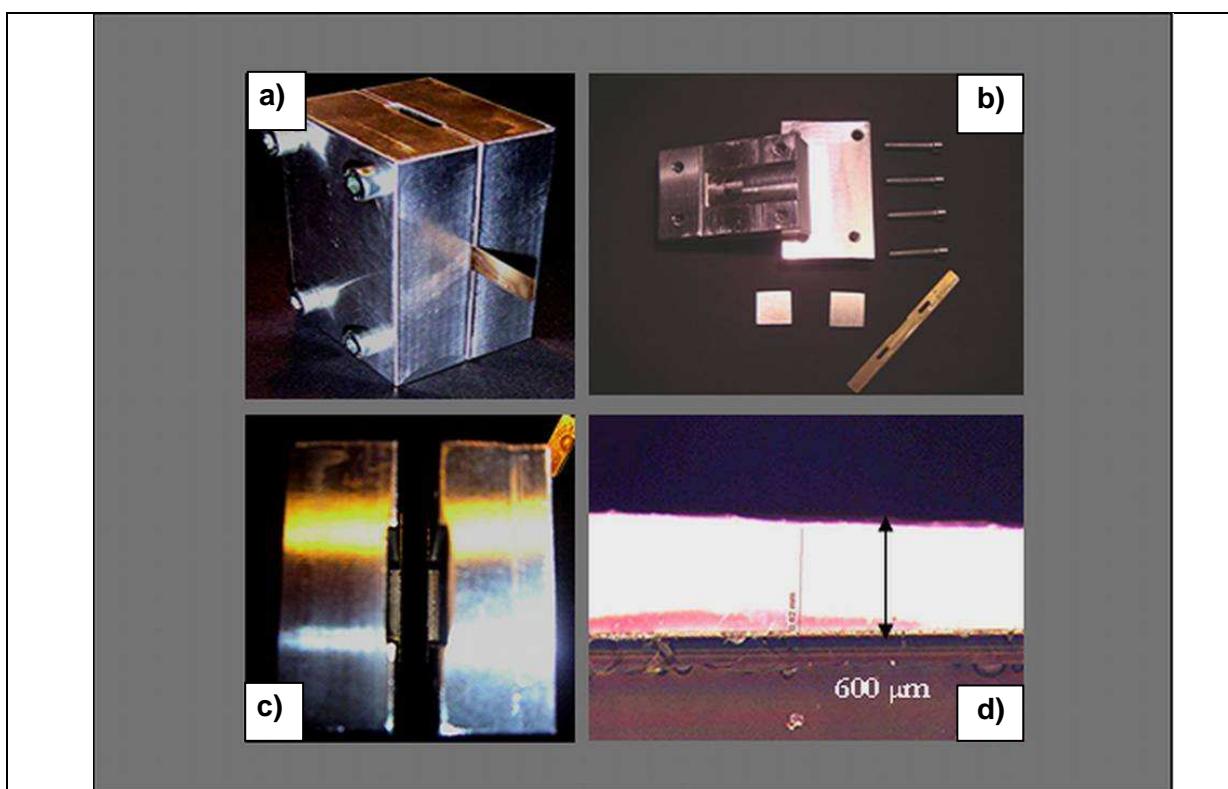
- a) Aufnahme von oben, mit Metallplättchen und Verstellschraube links
- b) Aufnahme von der Seite, mit Vakuumansaugstutzen auf der rechten Seite, mit Stoßrand und Metallplättchen mit Verstellschraube links.
- c) Aufsicht von schräg oben mit Lochplatte zum Ansaugen des TE-Konstruktes
- d) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Knorpelformkörpers von der Seite, (Objektträger unten), mit Vermessung der Dicke, sehr inhomogene Oberfläche

Im **dritten erfolgreichen Versuch** wird ein neues Schneideinstrument entwickelt, das aus zwei Metallquadern, von denen jeder eine Länge von 50 mm, einer Breite von 35 mm und eine Dicke von 20 mm hat. Jeder Quader hat eine gefräste Kammer auf einer Seite, die 40 mm lang, 20 mm breit und 4 mm tief ist. Es befinden sich vier Bohrungen an jeder Ecke des Quaders, über die beide mittels Schrauben verbunden werden können (Abbildung 7).

Es entsteht somit durch die beiden gefrästen Hälften eine Kammer mit 8 mm Tiefe, in die das TE-Knorpelstück hineingelegt werden kann.

Um Knorpelscheiben mit unterschiedlicher Dicke schneiden zu können, werden kleine Metallplättchen mit definierter Dicke von 250 µm, 500 µm und 1000 µm in die Schnittkammer eingelegt. Das TE-Knorpelstück wird mittels einer Mikrotomklinge, die zwischen die Metallblöcke geschoben wird, in Scheiben der gewünschten Dicke geschnitten. Durch dieses Schneideinstrument kann eine optimale Fixierung des TE-Knorpelstückes erreicht werden und somit TE-Knorpelscheiben mit einer glatten Oberfläche und definierter Dicke geschnitten werden.

Allerdings können mit diesem Versuchsaufbau nur TE-Knorpelscheiben mit einer Dicke bis zu 600 µm geschnitten werden, was sich in einem späteren Versuch als zu dick für die Kulturkammer herausstellt (Abbildung 7 d).



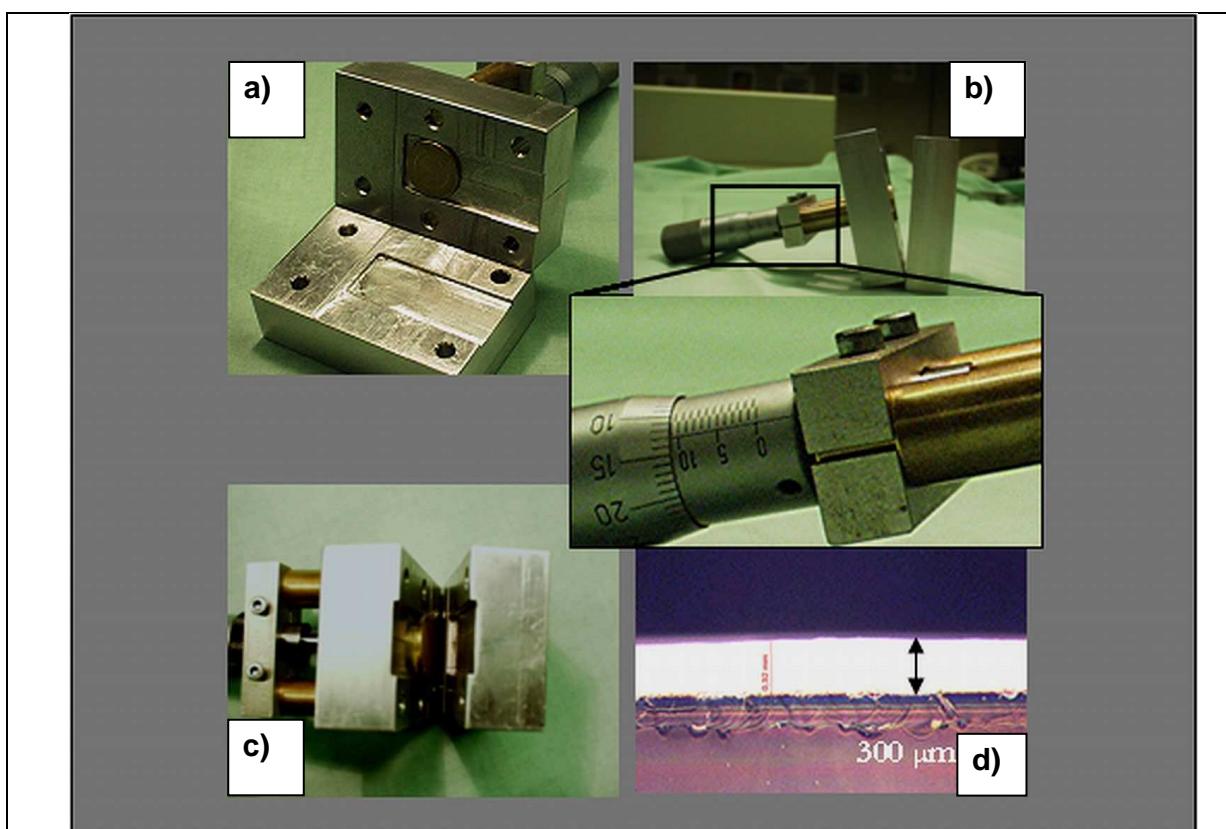
**Abbildung 7: Zweite Generation des Schneideinstruments für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke**

- a) Aufsicht von schräg oben, mit eingeführter Mikrotomklinge zur Durchtrennung des TE-Knorpelstückes
- b) 2 Metallquader mit je 4 Bohrungen für 4 Schrauben mit Muttern. 2 Metallplättchen und eine Mikrotomklinge
- c) Aufsicht, mit Einblick in die das TE-Knorpelstück aufnehmende Schnittkammer
- d) Lichtmikroskopische Aufnahme einer geschnittenen Knorpelscheibe von der Seite, (Objektträger unten), mit Vermessung der Schnittdicke. Es stellt sich eine homogene Oberfläche mit geradem Schnitt und einer Schnittdicke von 600 µm dar.

Im **vierten Versuch** wird dieses Schneideinstrument nochmals modifiziert, um das Problem der zu großen Schichtdicken zu lösen.

Es wird aus einem der beiden Quader im Bereich der gefrästen Kammer ein Zylinder mit einem Durchmesser von 19 mm herausgefräst und mit einem passenden Stempel versehen.

Auf der Außenseite des Quaders wird mittels zwei Schrauben eine Vorrichtung befestigt, die mit einer skalierten Rändelschraube versehen ist, mit der ein Stempel stufenlos in die gefräste Kammer und somit auf das zu schneidende TE-Knorpelstück gedrückt werden kann. Es können TE-Knorpelscheiben mit einer definierten Dicke weiter zu TE-Knorpelblöcken mit einer definierten dreidimensionalen Form geschnitten werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Dritte Generation des Schneideinstruments für die Präparation des TE-Knorpelstückes zum Schneiden der Knorpelscheiben mit definierter Dicke (Versuch 4 – 11)**

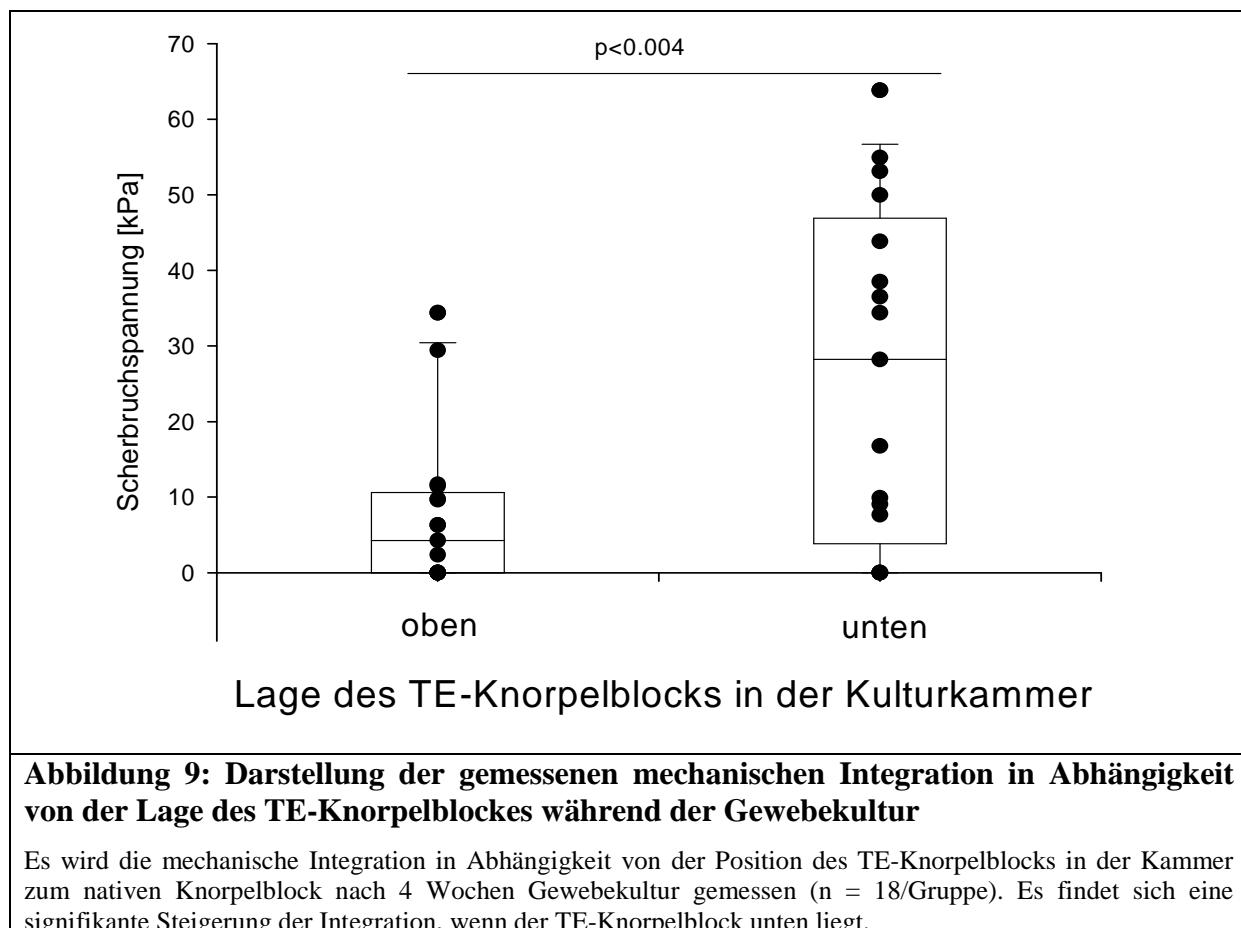
- Aufsicht von schräg oben, auf geöffnete Schnittkammer mit Zylinder
- Aufnahme von der Seite, mit stufenlos verstellbarer Rändelschraube, mit der der Stempel je nach gewünschter Dicke den Knorpel fixiert, Vergrößerung zeigt die Skalierung der Rändelschraube
- Aufsicht von oben mit Schnittkammer, im linken Block im Bereich der Schnittkammer ist der zylindrische Stempel erkennbar
- Lichtmikroskopische Aufnahme eines Knorpelstückes von der Seite, (Objektträger unten), mit Vermessung der Dicke, homogene Oberfläche mit geradem Schnitt und 300 µm Dicke

### 5.1.2 Festlegung der besten Kulturbedingungen

Das Integrationsmodell nach Reindel, modifiziert nach Englert, wurde schon in mehreren Vorversuchen mit zwei Gelenkknorpelblöcken verwendet. Da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten TE-Knorpel um ein neues Gewebe handelt, müssen in verschiedenen Vorversuchen die besten Kulturbedingungen für die Integration untersucht werden.

### 5.1.3 Lage des TE-Knorpelblockes zum Gelenk-Knorpelblock

Das TE-Knorpelstück hat andere mechanische Eigenschaften bezüglich der Festigkeit und der Elastizität im Vergleich zum nativen Knorpelblock. Der verwendete Stempel zum Anpressen der beiden Knorpelblöcke sinkt in den TE-Knorpelblock ein, jedoch nicht in den Gelenkknorpelblock. Es erfolgt ein vergleichender Versuch, ob die Lage des TE-Knorpelblockes zum nativen Knorpelblock in der Kulturkammer und damit zum Stempel einen Einfluss auf die Integration hat (Abbildung 9).



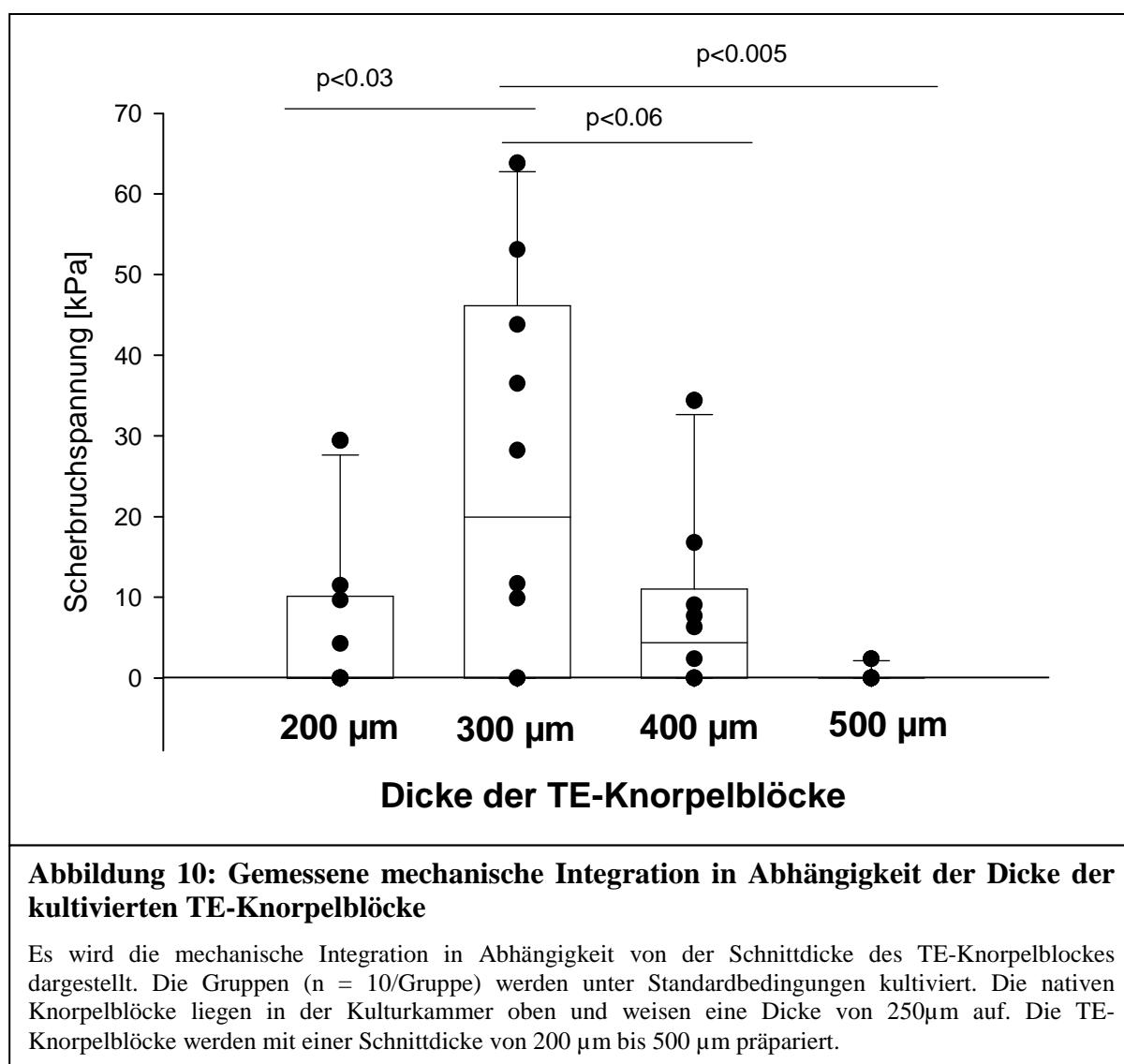
In Abbildung 9 stellt die erste Gruppe Knorpelblockpaare mit oben liegendem TE-Knorpelblock in der Kulturkammer dar. Es integrierten 10 von 18 Stichproben.

Die zweite Gruppe stellt den unten liegenden TE-Knorpelblock dar, in dieser Gruppe integrierten 13 von 18 Stichproben.

Die Integration wird als Scherbruchspannung in kPa gemessen und ergibt für die erste Gruppe einen Median von 4,27 kPa und für die zweite Gruppe einen Median von 28,21 kPa. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen mit einem p-Wert von 0,003 im Mann-Whitney-U Test. In den folgenden Versuchen wird der TE-Knorpelblock einzeln unten in der Kulturkammer positioniert.

#### 5.1.4 Einfluss der Dicke der Knorpelblockpaare

In Vorversuchen wurde der Einfluss der Knorpelblockdicke nativer Knorpelblöcke auf die Integration untersucht, wobei sich eine gute Integration bei Knorpelblöcken mit einer Schnittdicke von 250 µm zeigte (siehe Dissertation Achim Benditz 2008).



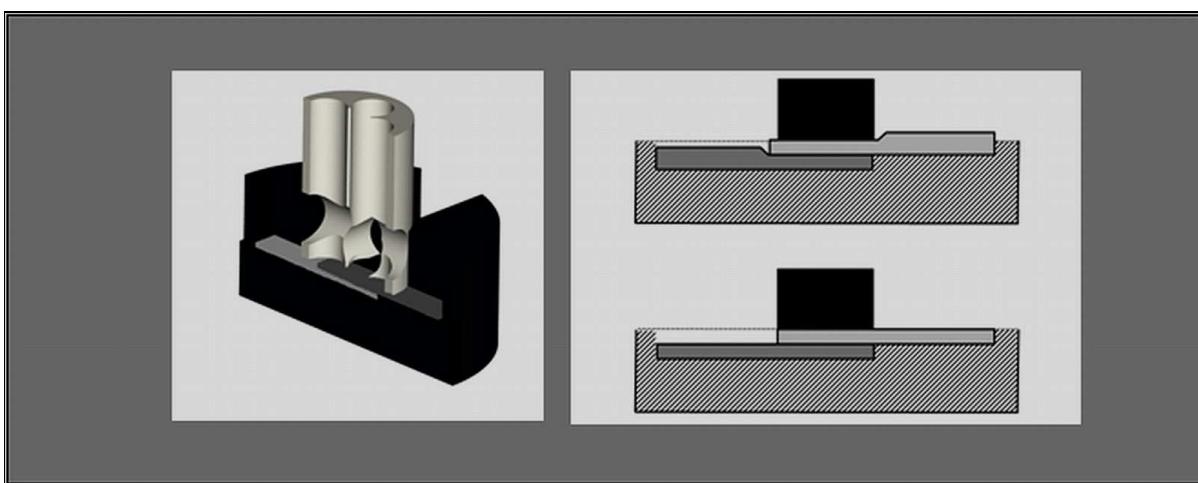
Da der TE-Knorpelblock andere mechanische Eigenschaften aufweist, soll in einem weiteren Vorversuch geklärt werden, ob mit dickeren TE-Knorpelblöcken eine bessere Integration erreicht wird.

Als Medium wird für diesen Vorversuch Standardmedium (siehe oben) mit Ascorbinsäure 100 µg/ml verwendet. Die Züchtungszeit und damit die Kulturdauer des Regeneratknorpels beträgt für diese Versuchsreihe 8 Wochen und die Integrationskultur mit dem Gelenkknorpel 4 Wochen.

Es werden 4 Gruppen ( $n = 10$ ) mit unterschiedlicher Dicke des TE-Knorpelblockes gebildet. Die erste Gruppe mit einer Dicke von 200 µm des TE-Knorpelblockes ergibt eine Integration bei 4 von 10 Knorpelblockpaaren mit einem Median von 0 kPa. Die zweite Gruppe wird mit einer TE-Knorpelblockdicke von 300 µm präpariert. Es integrieren 7 von 10 Knorpelblockpaaren mit einem Median von 19,9 kPa. In der dritten Gruppe sind die TE-Knorpelblöcke 400 µm dick. Es integrieren 6 von 10 Stichproben mit einem Median von 4,3 kPa. Die vierte Gruppe mit einer TE-Knorpelblockdicke von 500 µm ergibt eine integrierte Stichprobe von 10 kPa und somit ein Median von 0 kPa.

Es ergibt sich somit ein hochsignifikanter Unterschied zugunsten der zweiten Gruppe, mit einer Schnittdicke des TE-Knorpelblockes von 300 µm. In den folgenden Versuchen wird der TE-Knorpelblock mit einer Schnittdicke von 300 µm präpariert. Die Gelenkknorpelblöcke werden mit einer Schnittdicke von 250 µm belassen.

In Abbildung 11 ist eine Schemazeichnung der Kulturmutter mit den darin liegenden Knorpelblöcken und dem Stempel zu sehen. Im rechten Bild ist schematisch der Effekt von dickeren Knorpelblöcken mit dem höheren Anpressdruck auf die Integrationszone dargestellt.

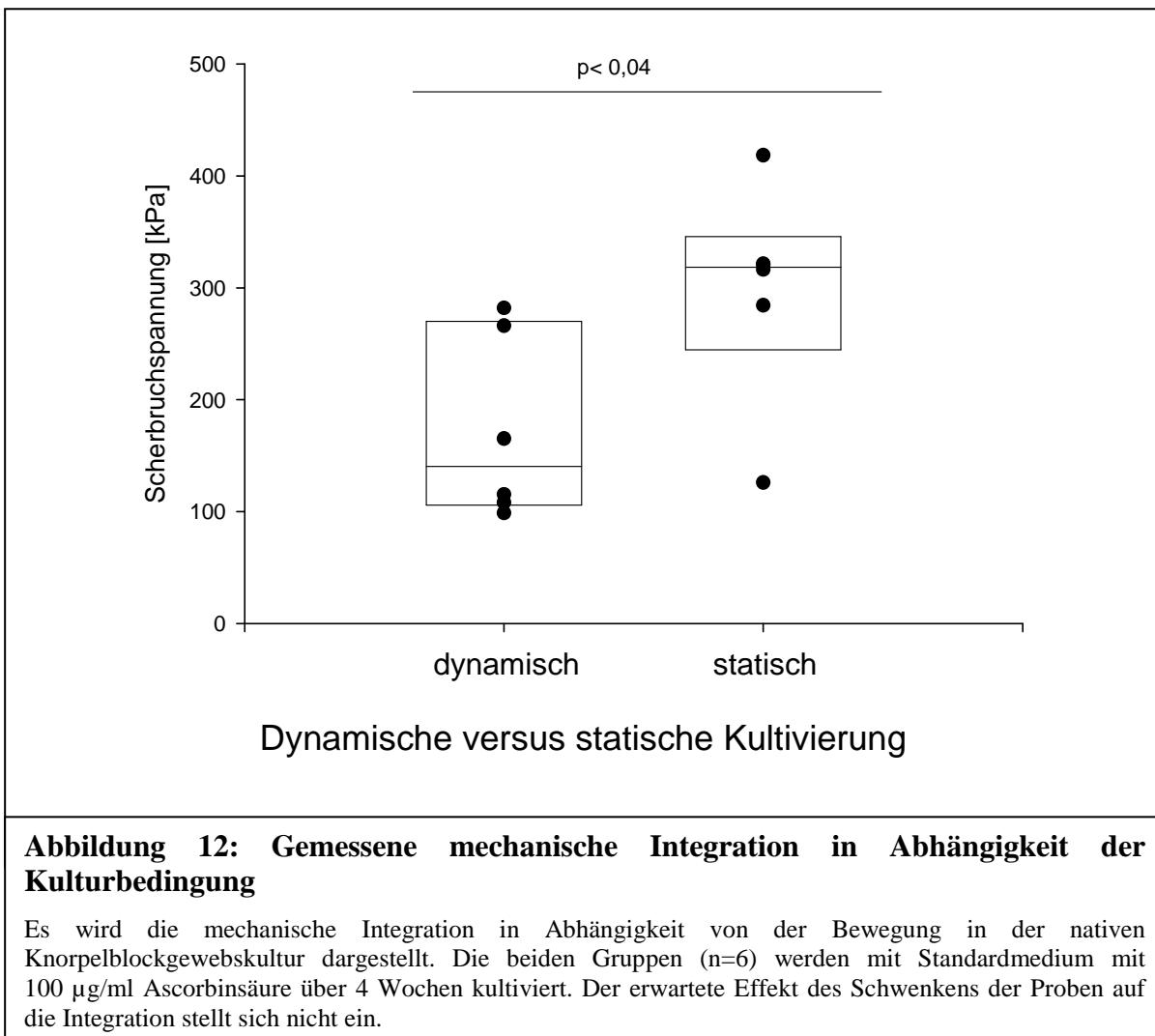


**Abbildung 11: Die Dicke der Knorpelblöcke ist relevant für den Anpressdruck im Bereich der Knorpelblocküberlappungsszone**

- a) Schemazeichnung der Kulturmutter mit den beiden Knorpelblöcken und Stempel.
- b) Schemazeichnung mit zwei Knorpelblöcken in der Kulturmutter, oben illustriert die Kompression durch den dickeren TE-Knorpelblock im Vergleich zur Standardeinstellung (unten)

### 5.1.5 Einfluss der dynamischen Kultivierung in der Integrationskultur

In einem weiteren Teilversuch sollte die These untersucht werden, ob eine konstante Bewegung der Kulturkammer eine bessere Diffusion und damit Ernährung der Knorpelblöcke durchs Medium erzeugt.

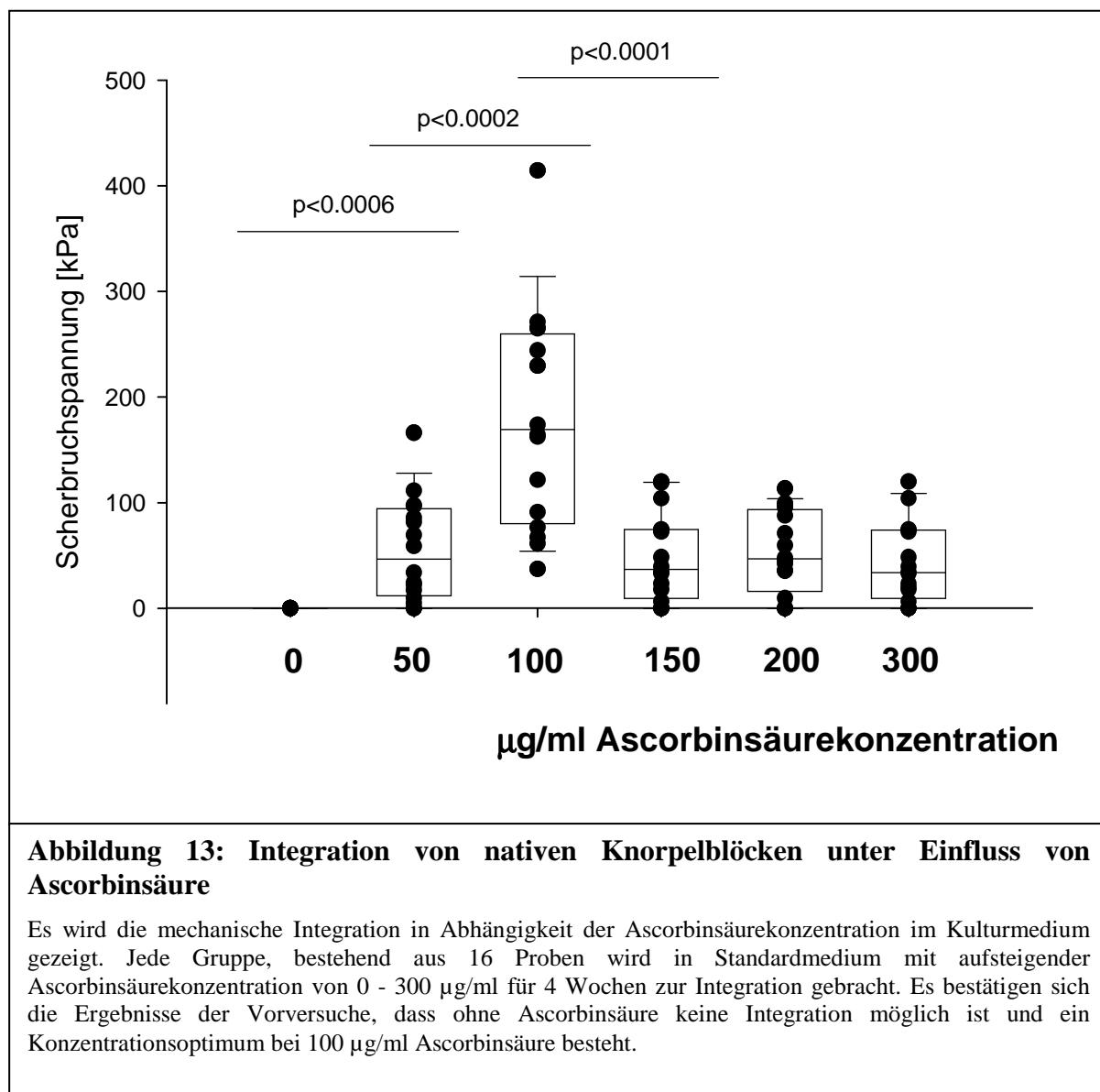


In der dynamischen Gruppe kann eine Integration zwischen den beiden nativen Knorpelblöcken mit einem Median von 140,2 kPa gemessen werden. In der Kontrollgruppe zeigt sich ein Median von 318,2 kPa mit einem Signifikanzniveau von  $p<0,04$ . Eine konstante Bewegung während der Integrationskultur führt zu einer Verschlechterung der mechanisch messbaren Integration. In den folgenden Versuchen erfolgt eine Kultivierung der Knorpelblockpaare unter statischen Kulturbedingungen.

### 5.1.6 Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium auf die Integration

Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Ascorbinsäure für die Integration essentiell ist. Ohne Ascorbinsäure bleibt das Gewebe zwar vital in der gewählten Kulturdauer, es ergibt sich aber nie eine messbare mechanische Integration. Um eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Ascorbinsäure auf die Integration zu untersuchen, erfolgen Versuche sowohl mit den Paarungen TE-Knorpel- zu Gelenkknorpelblock und 2 Gelenkknorpelblöcken mit aufsteigenden Ascorbinsäurekonzentrationen.

Zur Vereinheitlichung wird die Kulturdauer für die Integration auf 4 Wochen festgelegt. Der Stichprobenumfang wird mit  $n = 16$  pro Gruppe und Durchführung von 4 unabhängigen Teilversuchen mit je 4 Stichproben festgelegt (Abbildung 13).

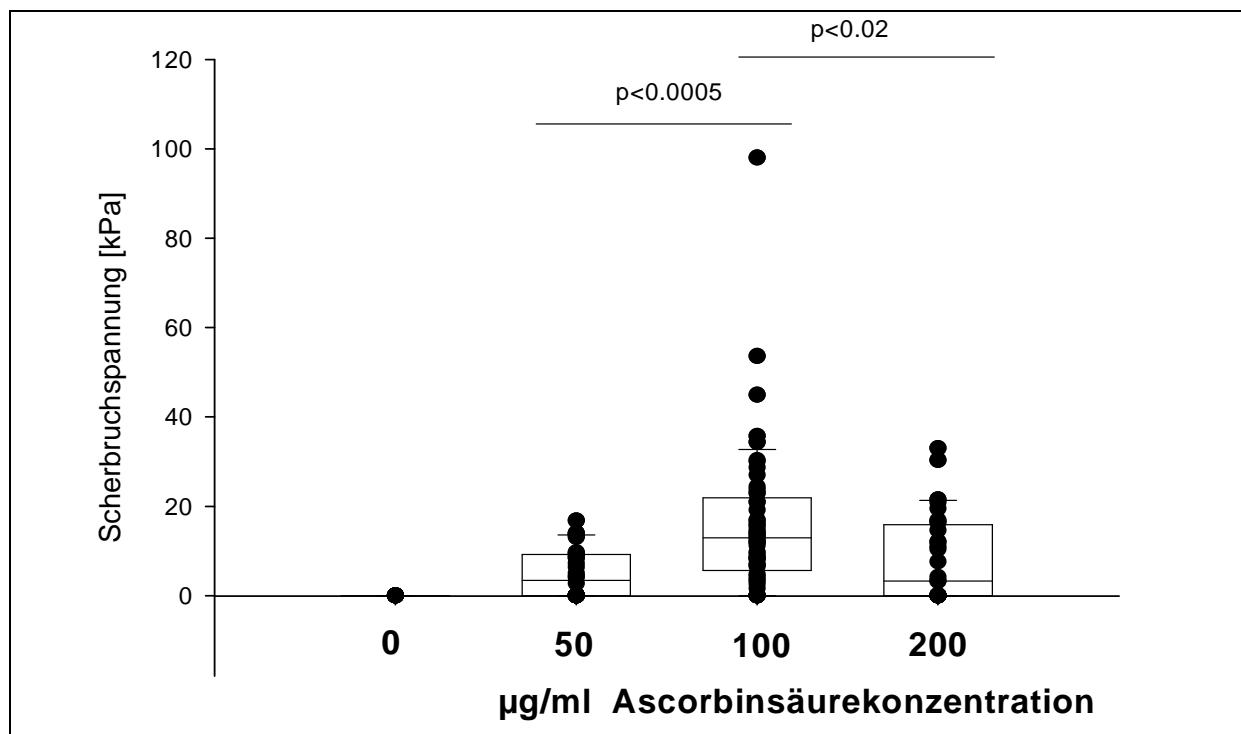


In der zweiten Gruppe bei einer Ascorbinsäurekonzentration von 50 µg/ml zeigt sich bei 14 von 16 Stichproben eine Integration und es ergibt sich ein Median von 46,51 kPa. Die Gruppe 3 (100 µg/ml), zeigt ein Integrationverhältnis von 16/16 Stichproben. Der Median beträgt 169,11 kPa und ist signifikant, was die Ergebnisse der Vorversuche nun auch für eine Kulturdauer von 4 Wochen bestätigt (Abbildung 13).

In den Gruppen mit höherer Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium zeigt sich eine Verschlechterung im Vergleich zur Gruppe 3, und kein signifikanter Unterschied zur Gruppe 2. Es wird darüber hinaus eine Dosisfindungskurve mit Herstellung von 150, 200 und 300 µg/ml Ascorbinsäure im Standardmedium untersucht. Es zeigen sich mit Medianen von 36,91 kPa, 46,76 kPa und 33,7 kPa ähnliche Werte zu Gruppe 2 und eine signifikante Verminderung zu Gruppe 3.

Die Dosisfindungskurve weist eine Ascorbinsäurekonzentration von 100 µg/ml im Standardmedium als die Beste aus.

Die dargestellte Dosis-Wirkungsbeziehung der Ascorbinsäurekonzentration sollte im folgenden für TE-Knorpelgewebe nachvollzogen werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Integration von TE-Knorpel- zu Knorpelblöcken unter Einfluss von Ascorbinsäure**

Vier Gruppen mit einem minimalen Stichprobenumfang von 17 werden in Standardmedium mit aufsteigender Ascorbinsäurekonzentration von 0 – 200 µg/ml für 4 Wochen kultiviert. Es bestätigen sich die Ergebnisse des Vorversuches mit nativen Gelenkknorpelblöcken, dass ohne Ascorbinsäure keine Integration möglich ist und ein Konzentrationsoptimum bei 100 µg/ml Ascorbinsäure besteht.

Die erste Gruppe wird ohne Zugabe von Ascorbinsäure kultiviert und es kommt, wie in den Vorversuchen mit zwei nativen Knorpelblöcken, bei keiner Stichprobe zu einer Integration. In der zweiten Gruppe integrierten 17 von 32 Stichproben mit einem Median von 3,44 kPa. In der dritten Gruppe (100 µg/ml Ascorbinsäure im Standardmedium) kommt es in 46 von insgesamt 53 kultivierten Proben zu einer Integration. Der Median liegt bei 12,96 kPa. In der vierten Gruppe (200 µg/ml Ascorbinsäure) reduziert sich der Median auf 3,2 kPa (Abbildung 14).

Die Dosis-Wirkungsbeziehung der Ascorbinsäurekonzentration im Kulturmedium in der Knorpelblockkultur für 2 und 4 Wochen sind im Kurvenverlauf ähnlich, wie auch zur TE-Knorpel-Knorpelblockkultur.

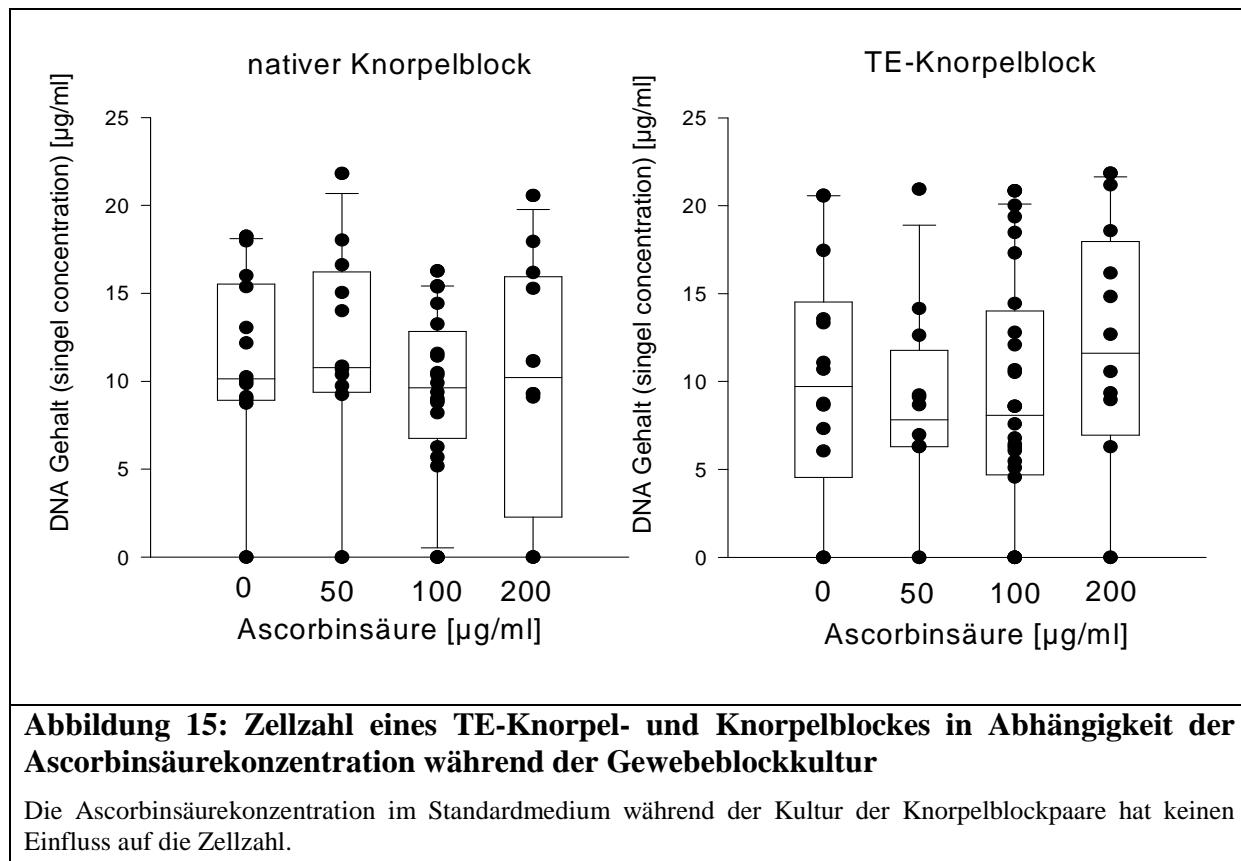
Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen einer Ascorbinsäurekonzentration von 50 µg/ml im Standardmedium zu 100 µg/ml ( $p<0,0005$ ) und zwischen 100 zu 200 µg/ml ( $p<0,02$ ).

Aufgrund dieser Ergebnisse werden in den folgenden Versuchen als Positiv-Negativkontrolle zwei Gruppen mit einer Ascorbinsäurekonzentration von 0 oder 100 µg/ml verwendet.

### **5.1.7 Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium auf die Zellproliferation**

Wie sich in den Versuchen gezeigt hat, beeinflusst Ascorbinsäure ganz entscheidend die Integration sowohl beim Gelenkknorpelgewebe als auch beim TE-Knorpel. Welchen Einfluss die Ascorbinsäure auf die Zellproliferation hat, soll durch eine nachfolgende laborchemische Analyse der Stichproben durch den DNA-Gehalt untersucht werden. Dafür werden die TE-Knorpel- und Knorpelblöcke nach der mechanischen Auswertung durch den Scherbruchversuch, jeweils einzeln in Papain-Puffer (siehe 4.10.2) über 18 h bei 60 °C verdaut und anschließend bei -78 °C gelagert. Danach erfolgt die Analyse der Zellzahl mit einem DNA-Assay. Es werden aus jeder Gruppe 4 Stichproben randomisiert ausgewählt und Aliquots von diesen entnommen. Die Aliquots werden zur DNA-Bestimmung wie unter 4.10.2 dargestellt, aufbereitet und vermessen.

Es ergibt sich weder für den TE-Knorpel noch für die nativen Knorpelblöcke ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Zellzahl eines TE-Knorpel- und Knorpelblockes in Abhängigkeit der Ascorbinsäurekonzentration während der Gewebeblockkultur**

Die Ascorbinsäurekonzentration im Standardmedium während der Kultur der Knorpelblockpaare hat keinen Einfluss auf die Zellzahl.

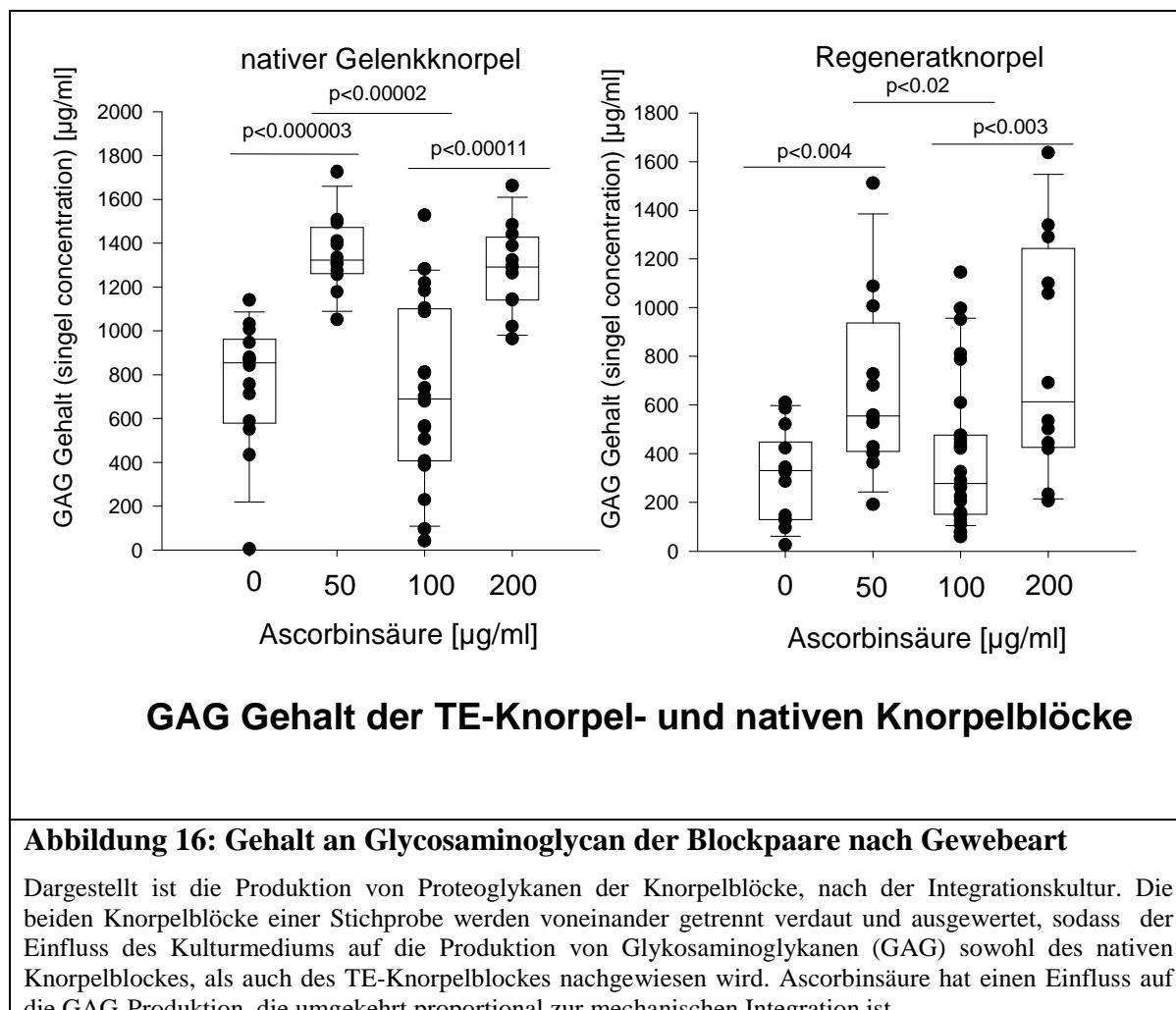
Bei der Auswertung der Zellzahl der TE-Knorpelblöcke zeigt sich allenfalls eine leicht erhöhte Zellzahl bei den Gruppen, die ganz ohne Ascorbinsäure und mit 200 µg/ml Ascorbinsäure kultiviert werden.

Auch bei der Auswertung der Zellzahl der nativen Knorpelblöcke anhand des DNA-Gehalts kann ebenfalls kein signifikanter Einfluss der ansteigenden Ascorbinsäurekonzentration auf die Zellzahl festgestellt werden.

Da die Unterschiede bezüglich der Zellzahl sowohl für den TE-Knorpel als auch den Gelenkknorpel sehr gering sind, ist davon auszugehen, dass Ascorbinsäure keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation von Chondrozyten hat.

### 5.1.8 Einfluss von Ascorbinsäure im Standardmedium auf die Extrazellularmatrixsynthese

Eine weitere laborchemische Analyse der Stichproben soll den Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration auf die Produktion der extrazellulären Matrix untersuchen. In gleicher Weise wie zur Zellzählanalyse werden Aliquots aus den Gruppen entnommen und zur Accrecananalyse vorbereitet (siehe Kapitel 4.10.1). Danach werden die Stichproben mit Dimethylethylenblau Reagenz (DMMB) versetzt und bei 570 nm photometrisch vermessen (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Gehalt an Glycosaminoglycan der Blockpaare nach Gewebeart**

Dargestellt ist die Produktion von Proteoglykanen der Knorpelblöcke, nach der Integrationskultur. Die beiden Knorpelblöcke einer Stichprobe werden voneinander getrennt verdaut und ausgewertet, sodass der Einfluss des Kulturmediums auf die Produktion von Glykosaminoglykanen (GAG) sowohl des nativen Knorpelblocks, als auch des TE-Knorpelblocks nachgewiesen wird. Ascorbinsäure hat einen Einfluss auf die GAG-Produktion, die umgekehrt proportional zur mechanischen Integration ist.

Bei der Auswertung der Gruppen zeigt sich, dass der Proteoglykangehalt der TE-Knorpelblöcke in der Gruppe mit 0 µg/ml und 100 µg/ml Ascorbinsäure am niedrigsten liegt mit einem Median von 313,41 µg/ml und 277,95 µg/ml GAG-Gehalt. Die Gruppen mit 50 und 200 µg/ml haben durchschnittlich einen GAG-Gehalt von 554,99 µg/ml und 613,93 µg/ml ohne signifikanten Unterschied. Die mit 100 µg/ml Ascorbinsäure kultivierte Gruppe hat somit die geringste Produktion an Proteoglykanen und die beste mechanisch gemessene Integration. Die Unterschiede sind zwischen den Gruppen, wie in der Grafik dargestellt, signifikant.

In der vergleichbaren Proteoglykananalyse für die nativen Knorpelblöcke zeigt sich die gleiche Tendenz. Bei der Gruppe, die ohne Ascorbinsäure kultiviert wird, ergibt sich mit einem Median von 854,66 µg/ml ein geringerer Wert an Proteoglykanen als bei den mit 50 µg/ml Ascorbinsäure. Diese haben mit einem Median von 1322,25 µg/ml eine fast doppelt so hohe Produktion an Proteoglykanen.

Die Gruppe der nativen Knorpelblöcke, die unter der Stimulation von 100 µg/ml Ascorbinsäure die mit Abstand besten Integrationswerte erzielt, hat mit einem Median von 689,53 µg/ml GAG-Gehalt die geringste Proteoglykanproduktion aller Proben dieses Versuches. Wenn die Ascorbinsäure auf 200 µg/ml erhöht wird, steigt der Median auf 1292,20 µg/ml GAG-Gehalt und die Produktion von Proteoglykanen wieder signifikant an. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind signifikant.

Ascorbinsäure beeinflusst somit sowohl den TE-Knorpel als auch den Gelenkknorpel in gleicher Weise, bezogen auf die Proteoglykanproduktion der ECM.

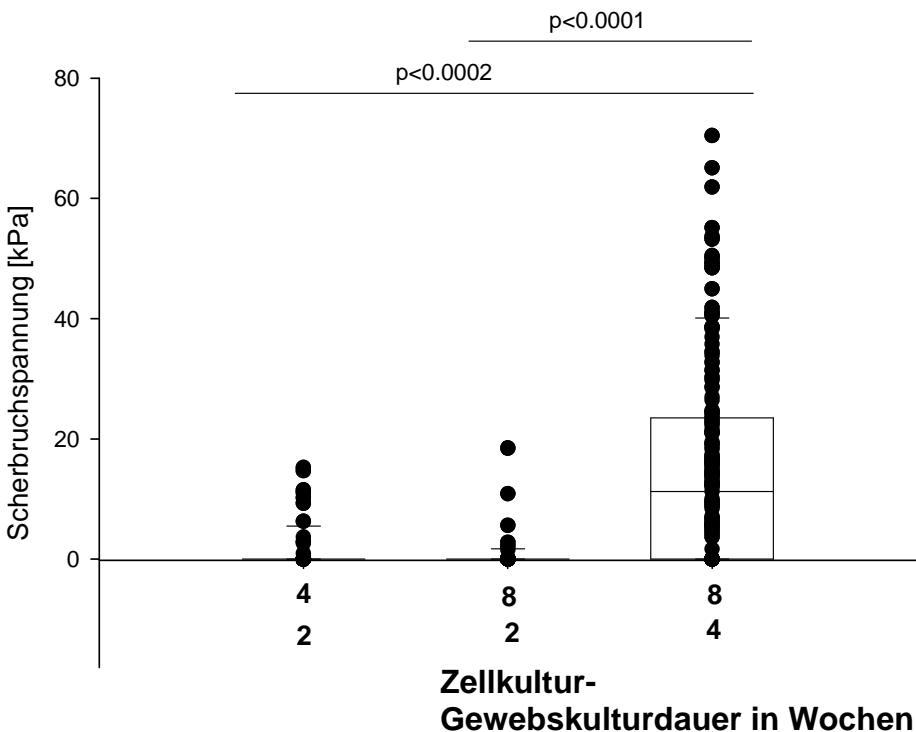
### **5.1.9 Einfluss der Zellkulturdauer des Regeneratknorpels und der Gewebskulturdauer auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren**

Die erste Versuchsreihe (Abbildung 17) mit einem Stichprobenumfang von 72, aufgeteilt in 3 unabhängige Teilversuche, beträgt die Zellkultur zur Herstellung der TE-Knorpelstücke 4 Wochen. Die Gewebskultur (Integration) wird 2 Wochen lang durchgeführt. Unter diesen Bedingungen integrieren 12 von 72 Stichproben mit einem Median von 0 kPa.

Bei der zweiten Versuchsreihe, mit einem Stichprobenumfang von 56, aufgeteilt in 3 unabhängige Teilversuche, wird die Zellkultur der TE-Knorpelstücke von 4 auf 8 Wochen verdoppelt, die Gewebskultur zur Integration bleibt mit 2 Wochen gleich.

Die TE-Knorpelstücke sind sehr viel stabiler in der Präparation. Das Gewicht und das Volumen der TE-Knorpelstücke erhöht sich um 30 % im Vergleich zur Zellkulturdauer von 4 Wochen. 6 von 56 Stichproben weisen eine mechanisch messbare Integration auf. Der Median beträgt 0 kPa. Die Zellkultur zur Herstellung der TE-Knorpelstücke hat einen Einfluss auf die Qualität der daraus präparierten TE-Knorpelblöcke. Es zeigt sich, dass die mechanische Integration davon nicht beeinflusst ist.

In der dritten Versuchsreihe mit einem Stichprobenumfang von 171, aufgeteilt in 3 unabhängige Teilversuche, bleibt die Zellkulturdauer zur Züchtung der TE-Knorpelstücke mit 8 Wochen unverändert zur zweiten Versuchsreihe, die Gewebskulturdauer hingegen wird von 2 auf 4 Wochen verdoppelt. 113 von 171 Stichproben integrieren mit einem Median dieser Gruppe von 11,24 kPa.



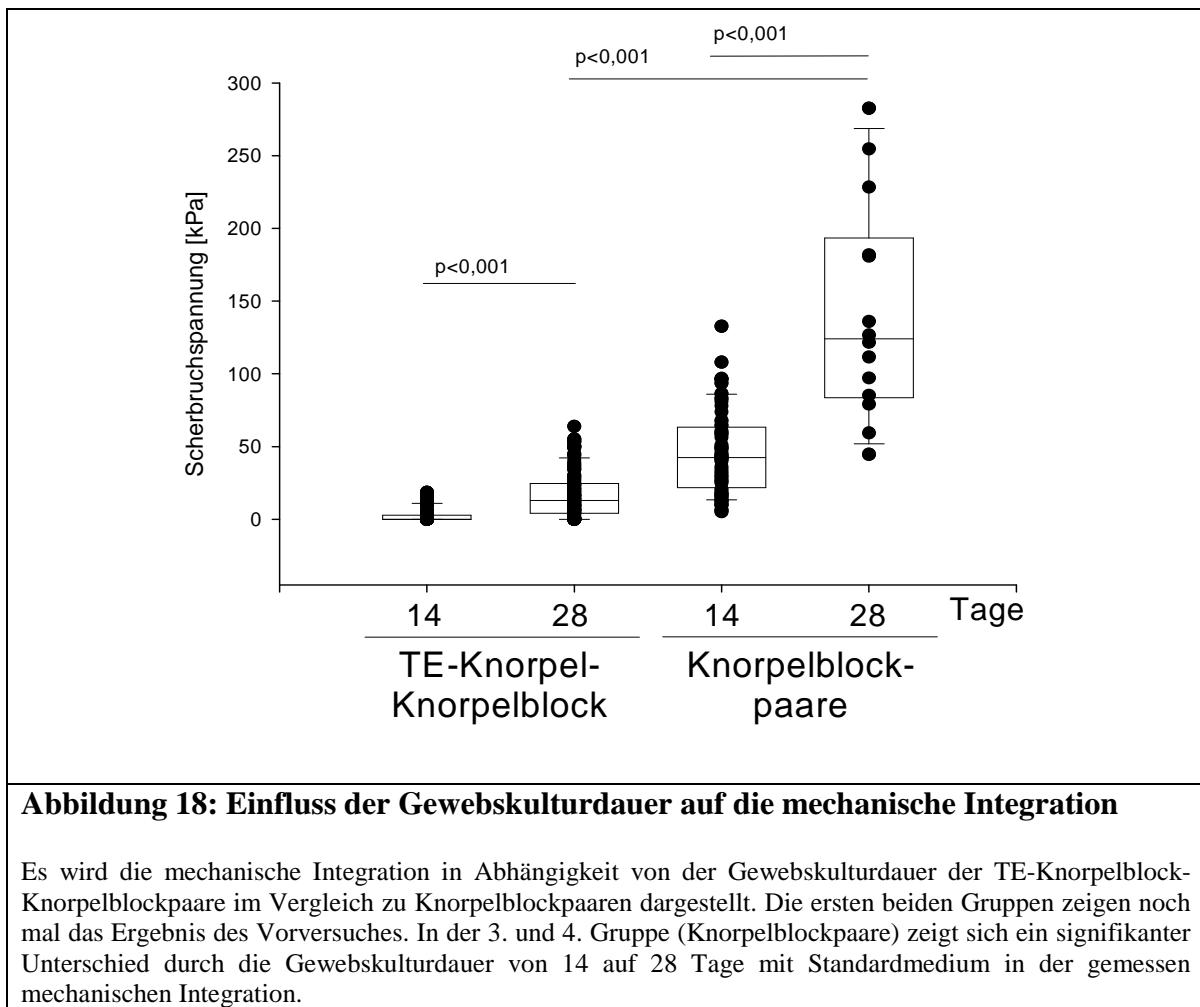
**Abbildung 17: Einfluss der Zellkulturdauer des Regeneratknorpels und der Gewebskulturdauer auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren**

Es wird die mechanische Integration in Abhängigkeit der Zell- und Gewebskultur dargestellt. In diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine mechanische Integration von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren erst mit einer Zell- und Gewebskultur von 8 und 4 Wochen messbar ist.

Die nächste Versuchsreihe (Abbildung 18) untersucht mit einem Stichprobenumfang von 82, aufgeteilt in 3 unabhängige Teilversuche, den Faktor Zeit (14 versus 28 Tage) in der Gewebskultur für Knorpelblockpaare. Die Kultivierung erfolgt mit Standardmedium mit 100 µg/ml Ascorbinsäure.

Da für die Integration von TE-Knorpelblöcken die Zellkultur- als auch Gewebskulturdauer entscheidend ist, soll eine Vergleichsserie darstellen, ob die Gewebskulturdauer auch die Knorpelblockintegration beeinflusst.

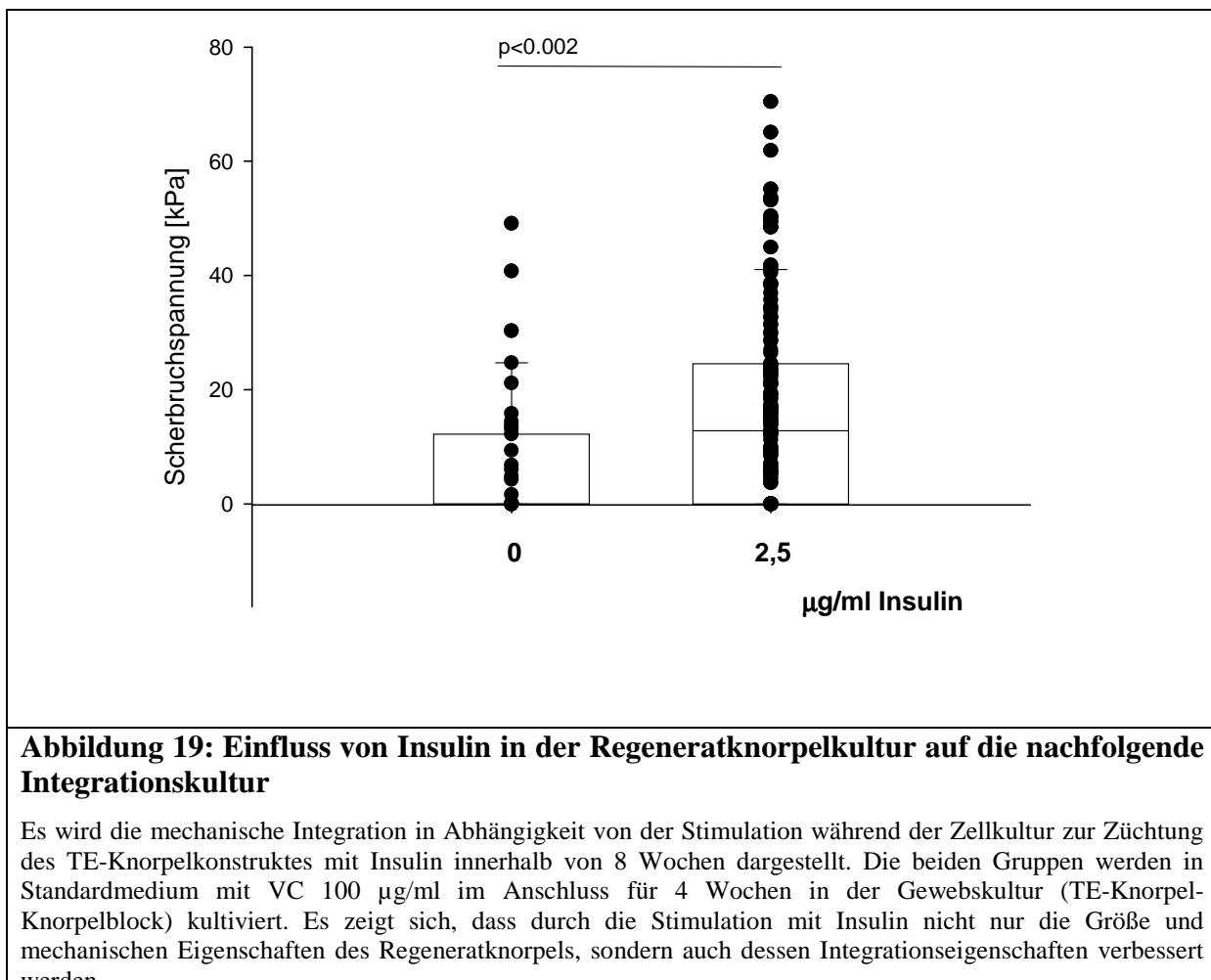
In der Gruppe 14 Tage integrieren 51 der 64 Stichproben mit einem Median von 48,21 kPa. In der Gruppe 28 Tage integrieren 18 von 18 Stichproben mit einem Median von 127,35 kPa. Der Unterschied beider Gruppen mit inhomogenen Stichprobenumfang ist signifikant. Die ersten beiden Gruppen der Abbildung 18 zeigen im Vergleich die Ergebnisse des Vorversuches mit TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren in Abhängigkeit von der Zeit. .



## 5.2 Einfluss von Insulin

### 5.2.1 Einfluss von Insulin in der Regeneratknorpelkultur auf die nachfolgende Integrationskultur

Aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die mechanischen Eigenschaften von Regeneratknorpel positiv durch Insulin in der Zellkulturphase beeinflusst werden können. Es soll in den nachfolgenden Versuchen geprüft werden, ob die Addition von Insulin in einer Konzentration von 2,5 µg/ml zum Standardmedium während der Züchtung des Regeneratknorpels im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die ohne Insulin gezüchtet wird, die nachfolgende Gewebskultur bezüglich der mechanischen Integration beeinflusst.

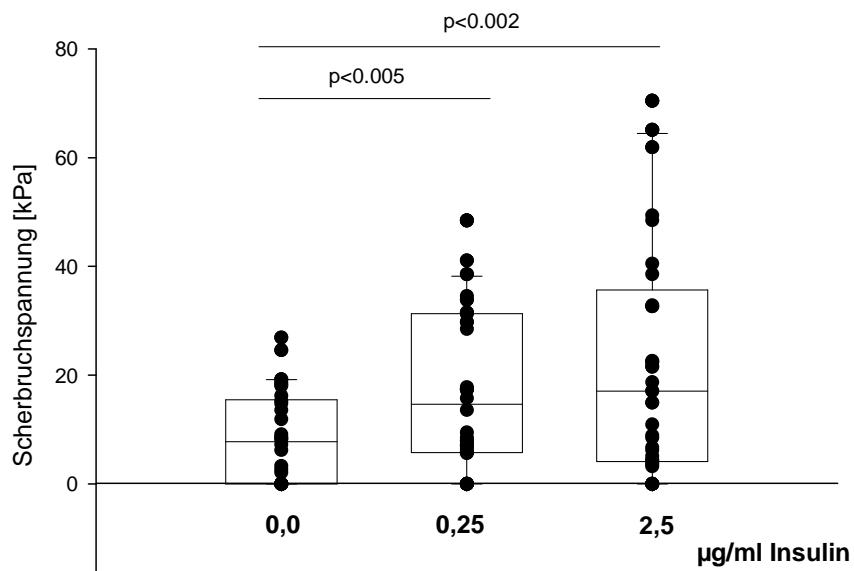


Diese Versuchsreihe untersucht mit einem Stichprobenumfang von 80, aufgeteilt in 4 unabhängige Teilversuche, den Faktor Insulin (0 versus 2,5 µg/ml) in der Zellkultur für TE-Knorpelblöcke, die nachfolgend in der Gewebskultur (TE-Knorpel-Knorpelblockpaare) verwendet werden. Zur Kultivierung wird Standardmedium mit 100 µg/ml Ascorbinsäure verwendet. Die Zellkultur beträgt 8 und die Gewebskultur 4 Wochen.

In der ersten Gruppe (ohne Insulin) zeigt sich in der anschließenden Gewebskultur, dass 16 von 40 Stichproben eine Integration aufweisen, diese jedoch einen Median von 0 kPa im Scherbruchversuch ergeben. In der zweiten Gruppe kommen 37 der 40 mit Insulin gezüchteten Stichproben zur Integration mit einem Median von 12,8 kPa. Der p-Wert der beiden Gruppen ist signifikant mit  $p < 0,002$ .

### 5.2.2 Einfluss von Insulin in der Gewebekultur (TE-Knorpel-Knorpelblockpaare)

Es soll der Einfluss von Insulin nach der Zellkulturphase nun auch in der Gewebskultur untersucht werden. Es werden die Insulinkonzentrationen 0 µg/ml, 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml verwendet, mit denen die Arbeitsgruppe der Pharmazeutischen Technologie die Zellkulturredersuchungen durchführt.



**Abbildung 20: Einfluss von Insulin in der Gewebskultur (TE-Knorpel-Knorpelblock) auf die mechanische Integration**

Durch die Addition von Insulin ins Standardmedium zeigt sich ein signifikanter Anstieg der mechanisch messbaren Integration von TE-Knorpelblöcken zu Knorpelblöcken. Beide Insulinkonzentrationen sind signifikant steigernd zur Kontrollgruppe.

Dieser Versuch hat einen Stichprobenumfang von 97 und ist unterteilt in 3 unabhängige Teilversuche.

Bei der Kontrollgruppe integrieren 20 der 30 Proben mit einem Median von 8,44 kPa. In der zweiten Gruppe (0,25 µg/ml Insulin) integrieren 26 der 33 Stichproben mit einem Median von 15,01 kPa und ist somit signifikant besser im Vergleich zur ersten Gruppe. Die dritte Gruppe (2,5 µg/ml Insulin) weist einen Median von 18,81 kPa in der mechanischen Integrationsuntersuchung auf. 27 der 34 Stichproben sind zusammengewachsen, dies zeigt eine tendenzielle Verbesserung zur Gruppe 2, ist aber nur zur Kontrollegruppe signifikant erhöht.

### 5.2.3 Einfluss von Insulin in der Gewebskultur auf die Zellzahl der TE-Knorpelblöcke

Der DNA-Gehalt der TE-Knorpelblöcke liegt bei der Kontrollgruppe bei 8,08 µg/ml. Durch Zugabe von 0,25 µg/ml Insulin in der Gewebskultur erhöht sich der DNA-Gehalt der TE-Knorpelblöcke im Median auf 9,07 µg/ml. In der dritten Gruppe (2,5 µg/ml Insulin) fällt der Median auf 6,71 µg/ml. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

### 5.2.4 Einfluss von Insulin während der Gewebskultur auf die Extrazellulärmatrrix (Proteoglykan) der TE-Knorpelblöcke

In diesem Folgeversuch soll durch die Bestimmung des GAG-Gehaltes der TE-Knorpelblöcke der Einfluss durch die Insulinstimulation untersucht werden.

Für die erste Gruppe (0 µg/ml Insulin) ergibt sich ein Median von 277,95 µg/ml GAG-Gehalt. Bei der zweiten Gruppe (0,25 µg/ml Insulin) ist der Median 448,96 µg/ml, die dritte Gruppe (2,5 µg/ml Insulin) ergibt einen Median von 547,82 µg/ml GAG-Gehalt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind signifikant.

Dieser Teilversuch zeigt, dass Insulin die Produktion der ECM beim TE-Knorpel positiv beeinflusst.

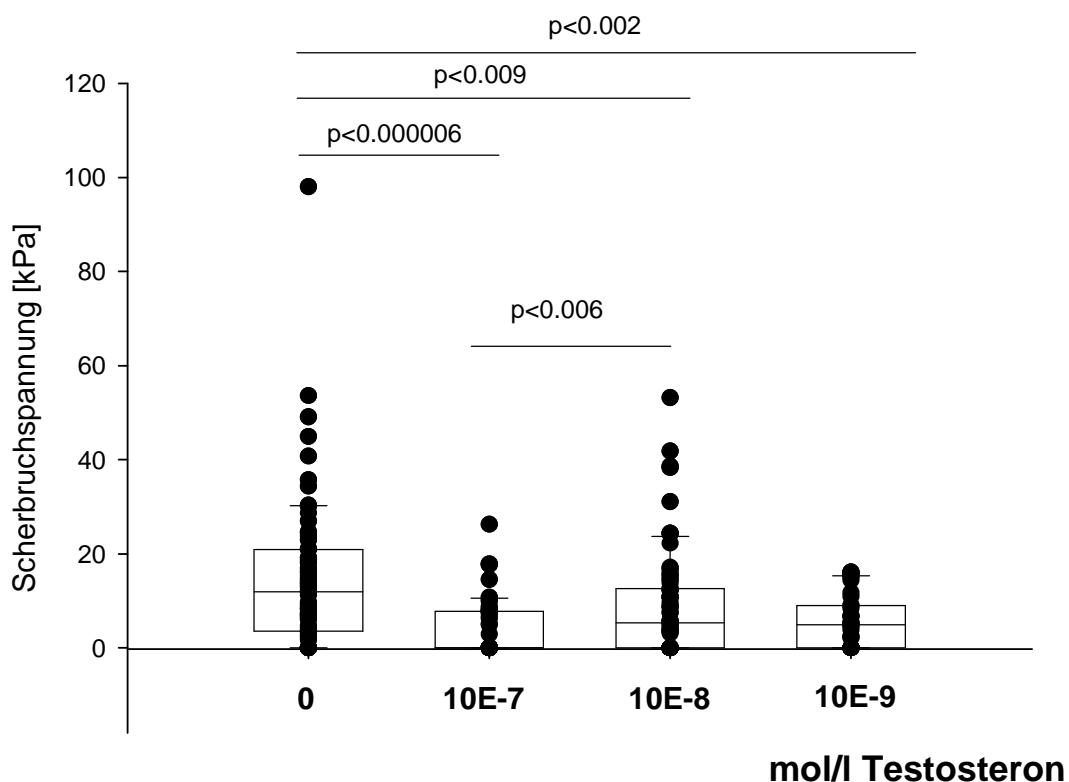
## 5.3 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf die Integration von TE-Knorpel-Knorpelblöcken

In den Vorversuchen mit 2 Gelenkknorpelblöcken hat sich das Hormon Testosteron als dosisabhängig positiv auf die Integration herausgestellt. Die beste integrationssteigerende Wirkung ist bei  $10^{-8}$  mol/l Testosteron als Zusatz im Standardmedium für den Gelenkknorpel gefunden worden. Im nächsten Teilversuch soll geprüft werden, ob dieser Effekt sich auf die TE-Knorpelintegration übertragen lässt.

Dieser Versuch (Abbildung 21) besteht aus 167 Stichproben, die 4 Wochen lang im Standardmedium mit 100 µg/ml Ascorbinsäure und den variablen Testosteronkonzentrationen zur Integration gebracht werden.

In der ersten Gruppe (0 mol/l Testosteron) ist der Median 11,97 kPa. Es integrierten 68 von 83 Stichproben. Bei der zweiten Gruppe ( $10^{-7}$  mol/l Testosteron) sind 21 von 52 Stichproben integriert mit einem Median von 0 kPa. In der dritten Gruppe ( $10^{-8}$  mol/l Testosteron) ist der Median 5,34 kPa. Bei der vierten Gruppe ( $10^{-9}$  mol/l Testosteron) ist der Median 4,94 kPa mit 22 von 32 integrierten Stichproben.

Der Unterschied von der Kontrollgruppe zu den testosteronstimulierten Gruppen ist signifikant.



**Abbildung 21: Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur (TE-Knorpel-Knorpelblock) auf die mechanische Integration**

Durch die Addition von Testosteron zum Standardmedium zeigt sich eine signifikante Verringerung der mechanisch messbaren Integration von TE-Knorpelblöcken zu Knorpelblöcken. In den Gruppen sind die Konzentrationen  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  signifikant katabol wirkend.

### 5.3.1 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf die Zellzahl der TE-Knorpelblöcke

In diesem abhängigen Teilversuch soll der Einfluss von Testosteron auf die Zellzahl der TE-Knorpelblöcke untersucht werden.

Die Auswertung der TE-Knorpelblöcke ergibt für die Kontrollgruppe einen Median von  $8,08 \mu\text{g}/\text{ml}$ . In der Gruppe 1 ( $10^{-7} \text{ mol/l}$  Testosteron) ergibt sich im Median ein DNA-Gehalt von  $8,70 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Gruppe 2 ( $10^{-8} \text{ mol/l}$  Testosteron) im Median von  $10,41 \mu\text{g}/\text{ml}$  und in der Gruppe 3 ( $10^{-9} \text{ mol/l}$  Testosteron) ein Median von  $7,80 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

Die Zugabe von Testosteron während der Integrationsperiode führt zu keiner wesentlichen Veränderung der Zellzahl der TE-Knorpelblöcke.

### **5.3.2 Einfluss von Testosteron in der Gewebskultur auf den Extrazellularmatrixanteil Proteoglykan der TE-Knorpelblöcke**

Die TE-Knorpelblöcke werden nach dem Zugversuch aufgeteilt und einer weiteren histologischen und biochemischen Analytik zugeführt.

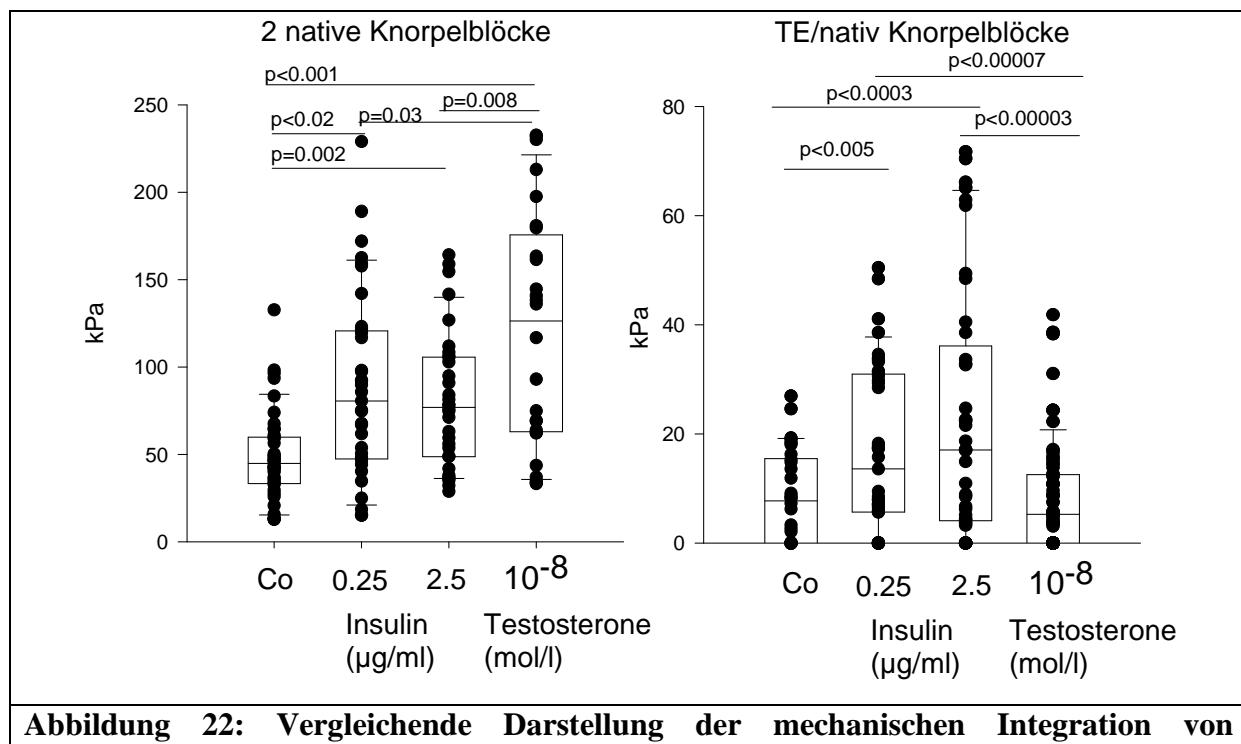
Die Kontrollgruppe weist im Median 277,95 µg/ml Glycosaminoglycangehalt auf. Die Gruppe 10<sup>-7</sup> mol/l Testosteron weist einen Median von 324,55 µg/ml auf, welcher nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ist. Die Gruppe mit 10<sup>-8</sup> mol/l Testosteron weist einen Median von 275,63 µg/ml Glycosaminoglycangehalt auf. Die Gruppe mit 10<sup>-9</sup> mol/l Testosteron weist einen GAG-Gehalt von 356,01 µg/ml auf.

Zusammenfassend ist tendenziell der dosisabhängige Einfluss von Testosteron auf die TE-Knorpelblöcke und auf deren extrazelluläre Matrixsynthese durch die Chondrozyten erkennbar. Die Gruppe mit 10<sup>-8</sup> mol/l Testosteron weist die geringste Glycosaminoglycansynthese auf. Die beiden anderen Gruppen haben im Vergleich zu den sehr schlechten Integrationswerten erhöhte Glycosaminoglycanwerte nach der Gewebskultur.

### **5.4 Vergleich der oben aufgeführten Daten der Gelenkknorpel-integration und der Integration des TE-Knorpelstückes mit nativem Gelenkknorpel (in Zusammenarbeit mit A. Benditz)**

Dargestellt ist die Scherbruchspannung als Maß für die Integration von Gelenkknorpelblöcken in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin oder Testosteron (Abbildung 22, linkes Diagramm). Insulin wird in den Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml verwendet, Testosteron mit 10<sup>-8</sup> mol/l. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Stimulation mit 0,25 µg/ml Insulin eine signifikante Integrationssteigerung p<0,02 von 48,9 kPa auf 77,8 kPa erreicht. Mit einem p-Wert < 0,002 ist die Integrationssteigerung mit 2,5 µg/ml Insulin ebenfalls signifikant.

Den maximalen Wert erreicht die Gruppe mit 10<sup>-8</sup> mol/l Testosteron, welcher mit 127 kPa signifikant sowohl gegenüber der Kontrollgruppe p<0,001 wie auch gegenüber der Insulinkonzentrationen 0,25 µg/ml p<0,03 und 2,5 µg/ml p<0,008 erhöht ist.



**Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der mechanischen Integration von Gelenkknorpel- und TE-Knorpelblöcken**

Auf der linken Seite ist die Integration von zwei Gelenkknorpelblöcken im Scherbruchversuch dargestellt. Die gleiche Untersuchung ist rechts mit TE-Knorpelblöcken und nativen Knorpelblöcken dargestellt. Im Gegensatz zum stimulierenden Effekt von Testosteron auf Gelenkknorpel wirkt das Hormon katabol auf die TE-Knorpelblöcke. Das Hormon Insulin wirkt sowohl auf Gelenkknorpel- als auch auf TE-Knorpelblöcke inotroph im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Vergleichend dazu ist die Integration von TE-Knorpelblöcken mit Gelenkknorpelblöcken im selben Testaufbau mit denselben Kulturmedien und Botenstoffstimulationen dargestellt (Abbildung 22, rechtes Diagramm). Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium ist durch die Stimulation mit 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml Insulin eine deutliche Integrationssteigerung zu erkennen, welche mit einem p-Wert von 0,005 bei 0,25 µg/ml Insulin und einem p-Wert von 0,0003 bei 2,5 µg/ml signifikant war. In der Versuchsreihe mit Testosteron 10<sup>-8</sup> mol/l kam es zu einer signifikanten Abnahme der Integrationsleistung gegenüber beider Insulinkonzentrationen.

In Abbildung 23 ist die gesamte Glykosaminoglykan-Konzentration eines jeweiligen Probenpaars im Vergleich zwischen Knorpelregenerat und *nativem* Gelenkknorpel dargestellt. Beide Hauptversuchsgruppen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils mit Insulin 0,25 µg/ml, Insulin 2,5 µg/ml und Testosteron 10<sup>-8</sup> mol/l stimuliert.

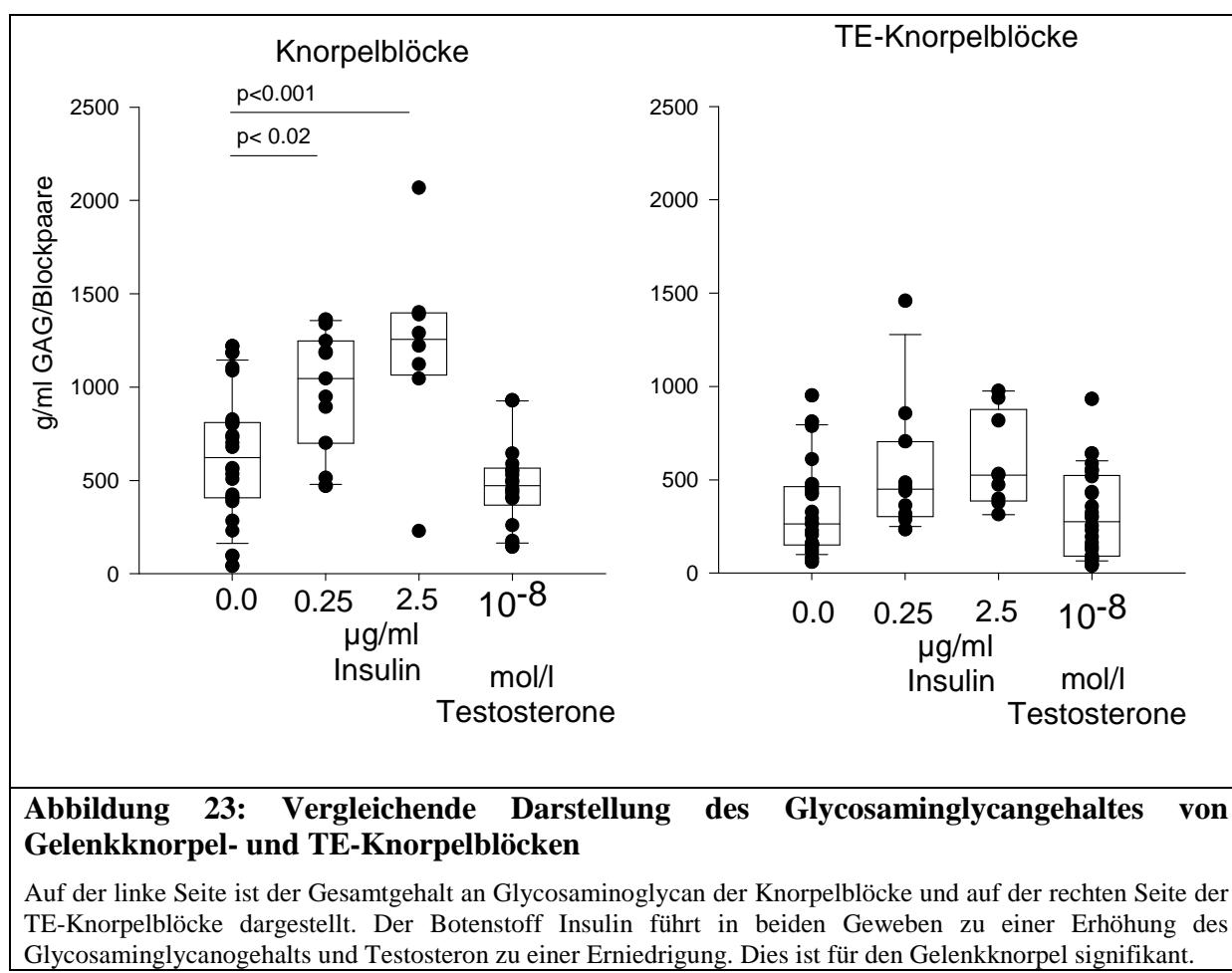
Wie schon beschrieben, ist in den Versuchreihen mit Gelenkknorpelblöcken eine ähnliche Tendenz zu beobachten. Die beiden mit Insulin 0,25 µg/ml und Insulin 2,5 µg/ml stimulierten Versuchsreihen zeigen eine vermehrte Glykosaminoglykan-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dabei ist die Steigerung der Konzentration bei der Stimulation mit Insulin 0,25 µg/ml auf einen Median von 1114 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe, die einen Median von 717 µg/ml erreicht mit einem  $p<0,02$ , signifikant. Auch bei der Stimulation mit Insulin 2,5 µg/ml zeigt sich eine signifikante  $p<0,001$  Steigerung des Glycosaminglycangehalts auf einen Median von 1220 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe.

In der Gruppe mit Testosteron  $10^{-8}$  mol/l stimulierten TE-Knorpelblöcke kommt es zu einer nicht signifikanten Verminderung des Medians gegenüber der Kontrollgruppe. Die Glykosaminoglykankonzentrationen innerhalb beider Insulinkonzentrationen unterscheiden sich kaum.

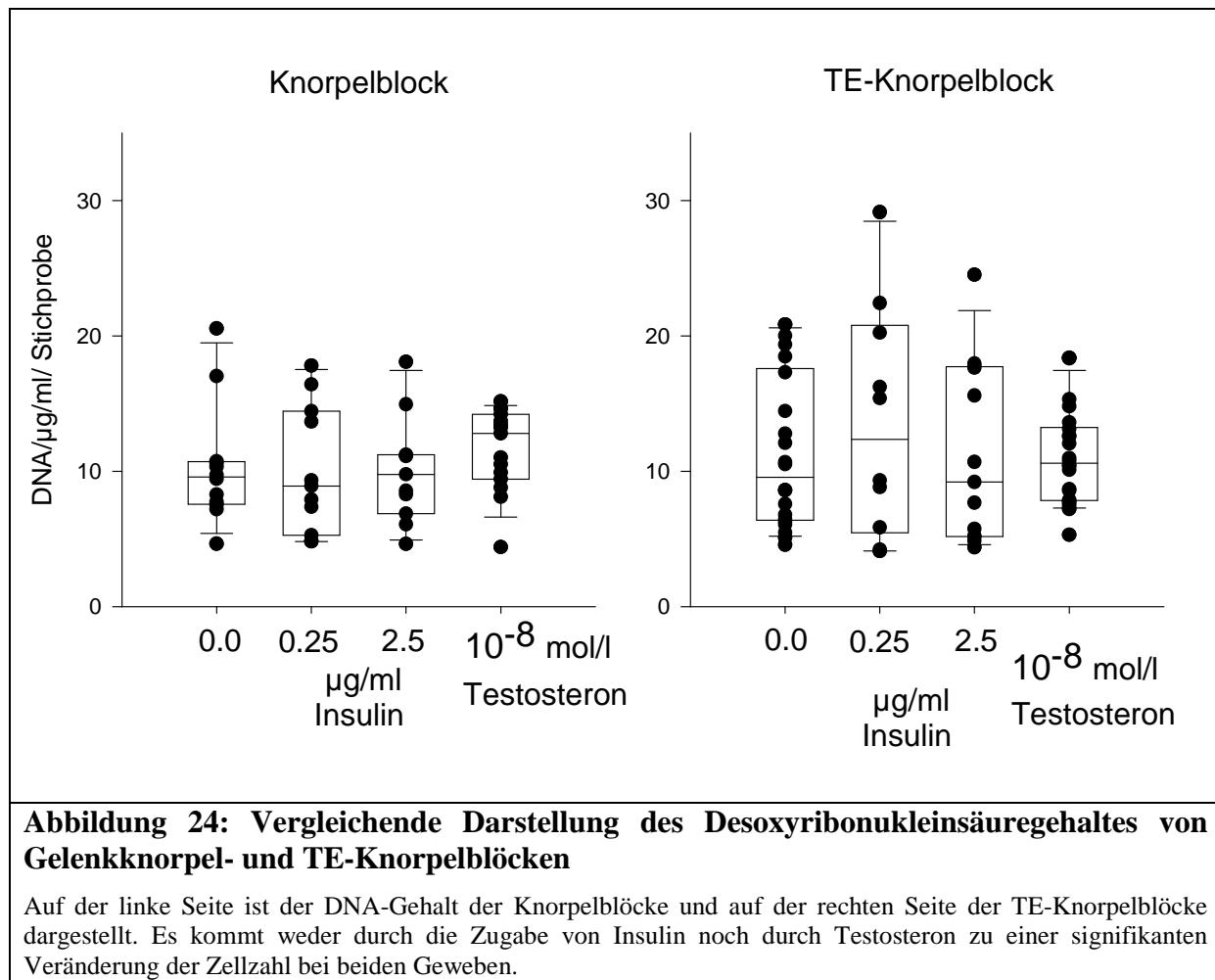
Innerhalb der Versuchreihen mit TE-Knorpelblöcken zeigt sich bei der Stimulation mit Insulin ein Anstieg des Medians der Glykosaminoglykankonzentration gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Stimulation mit Testosteron  $10^{-8}$  mol/l dagegen führt bei den Versuchen mit einem TE-Knorpelblock zu kaum einer Veränderung der Glykosaminoglykankonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium.



In der nächsten Abbildung ist die gesamte DNA-Konzentration eines jeweiligen Probenpaares im Vergleich zwischen Gelenkknorpel und TE-Knorpelblock dargestellt.

Zur Kontrolle mit Standardmedium sind die Gruppen Insulin 0,25 µg/ml, Insulin 2,5 µg/ml und Testosteron  $10^{-8}$  mol/l untersucht.



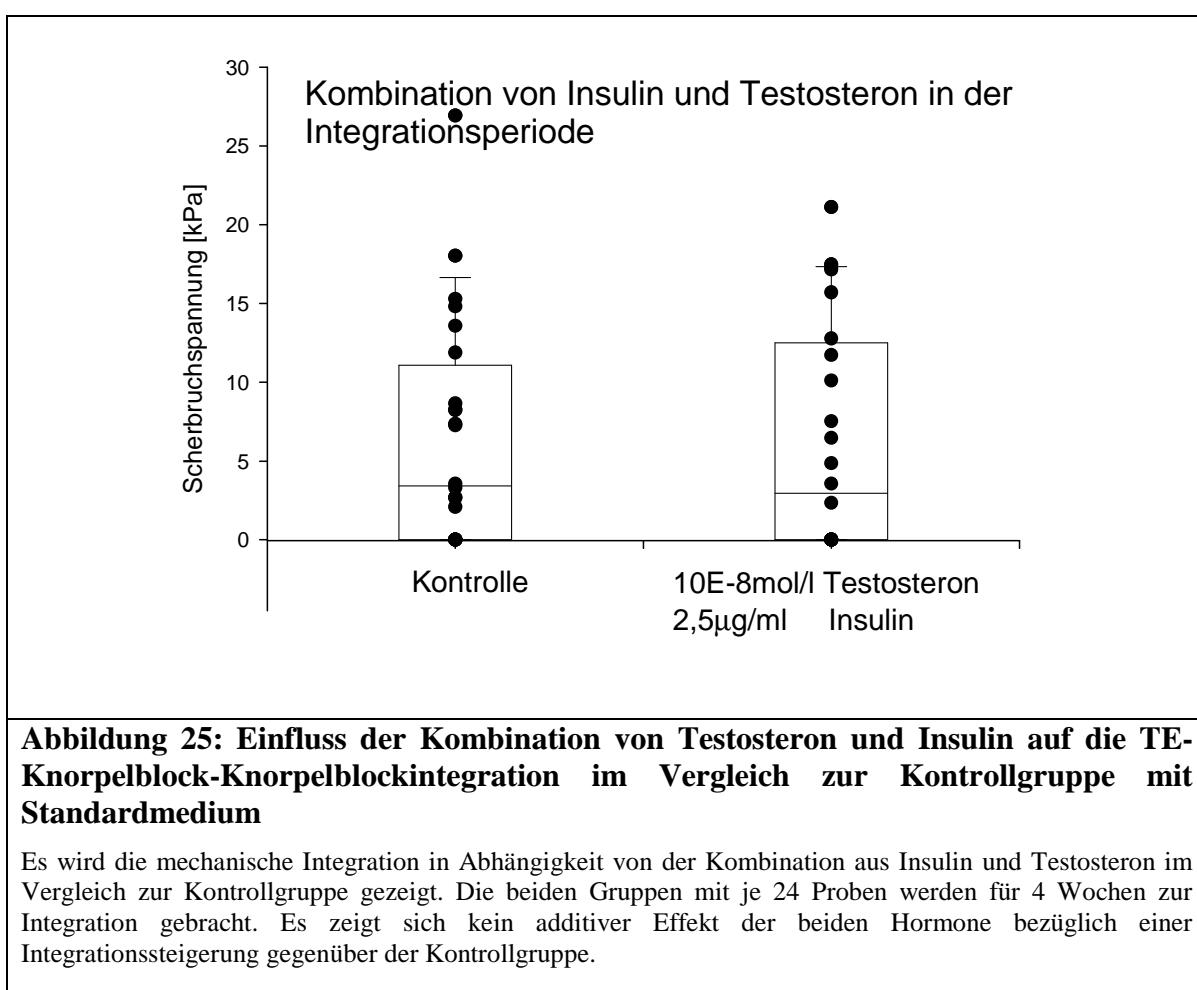
Wie in vorangegangenen Kapiteln beschrieben, zeigt sich in der Gruppe mit Gelenkknorpelblöcken bei der Stimulation mit Insulin kaum eine Änderung der DNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Testosteron  $10^{-8}$  mol/l dagegen weist einen geringen Anstieg der DNA-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe auf. In den Versuchsreihen mit TE-Knorpelblöcken zeigen sich keine signifikanten Veränderungen zur Kontrollgruppe.

## 5.5 Einfluss der Kombination von Insulin und Testosteron auf die Integration von TE-Knorpelblöcken

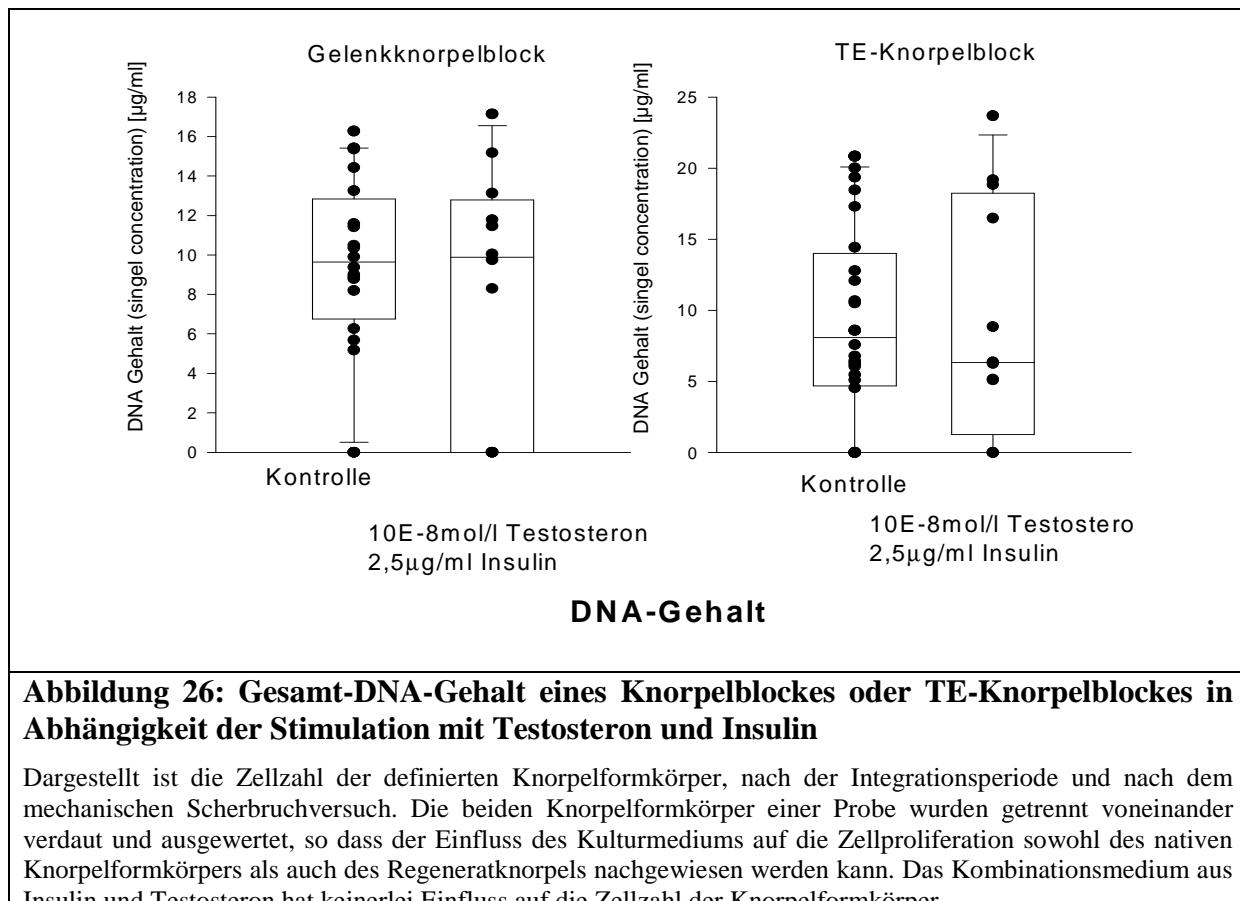
Da sich in den bisherigen Versuchen mit Insulin und Testosteron ganz unterschiedliche Tendenzen bezüglich der Beeinflussung der Knorpelblockintegration zeigen, werden Insulin und Testosteron gemeinsam eingesetzt, um zu erkennen, ob sich die integrationssteigernden Effekte der beiden Hormone addieren.

Hierzu werden im ersten Teilversuch die jeweils besten Hormonkonzentrationen, Testosteron  $10^{-8}$  mol/l und Insulin 2,5 µg/ml mit Standardmedium kombiniert. Es werden 8 Wochen kultivierte TE-Knorpelstücke verwendet. Die Integrationsversuche erfolgen mit frisch präparierten Knorpelblöcken mit einer Gewebekulturdauer von 4 Wochen.

In der Kontrollgruppe integrieren 16 der 24 Proben mit einem Median von 3,43 kPa. Die zweite Gruppe mit der Kombination aus beiden Hormonen weist einen Median von 2,95 kPa auf und es integrieren 13 der 24 Proben. Es besteht zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.



In der weiteren Analyse des Einflusses der Botenstoffe wird der DNA-Gehalt der Knorpelblockpaare nach der Gewebekultur gemessen.



**Abbildung 26: Gesamt-DNA-Gehalt eines Knorpelblockes oder TE-Knorpelblockes in Abhängigkeit der Stimulation mit Testosteron und Insulin**

Dargestellt ist die Zellzahl der definierten Knorpelkörper, nach der Integrationsperiode und nach dem mechanischen Scherbruchversuch. Die beiden Knorpelkörper einer Probe wurden getrennt voneinander verdaut und ausgewertet, so dass der Einfluss des Kulturmediums auf die Zellproliferation sowohl des nativen Knorpelkörpers als auch des Regeneratknorpels nachgewiesen werden kann. Das Kombinationsmedium aus Insulin und Testosteron hat keinerlei Einfluss auf die Zellzahl der Knorpelkörper.

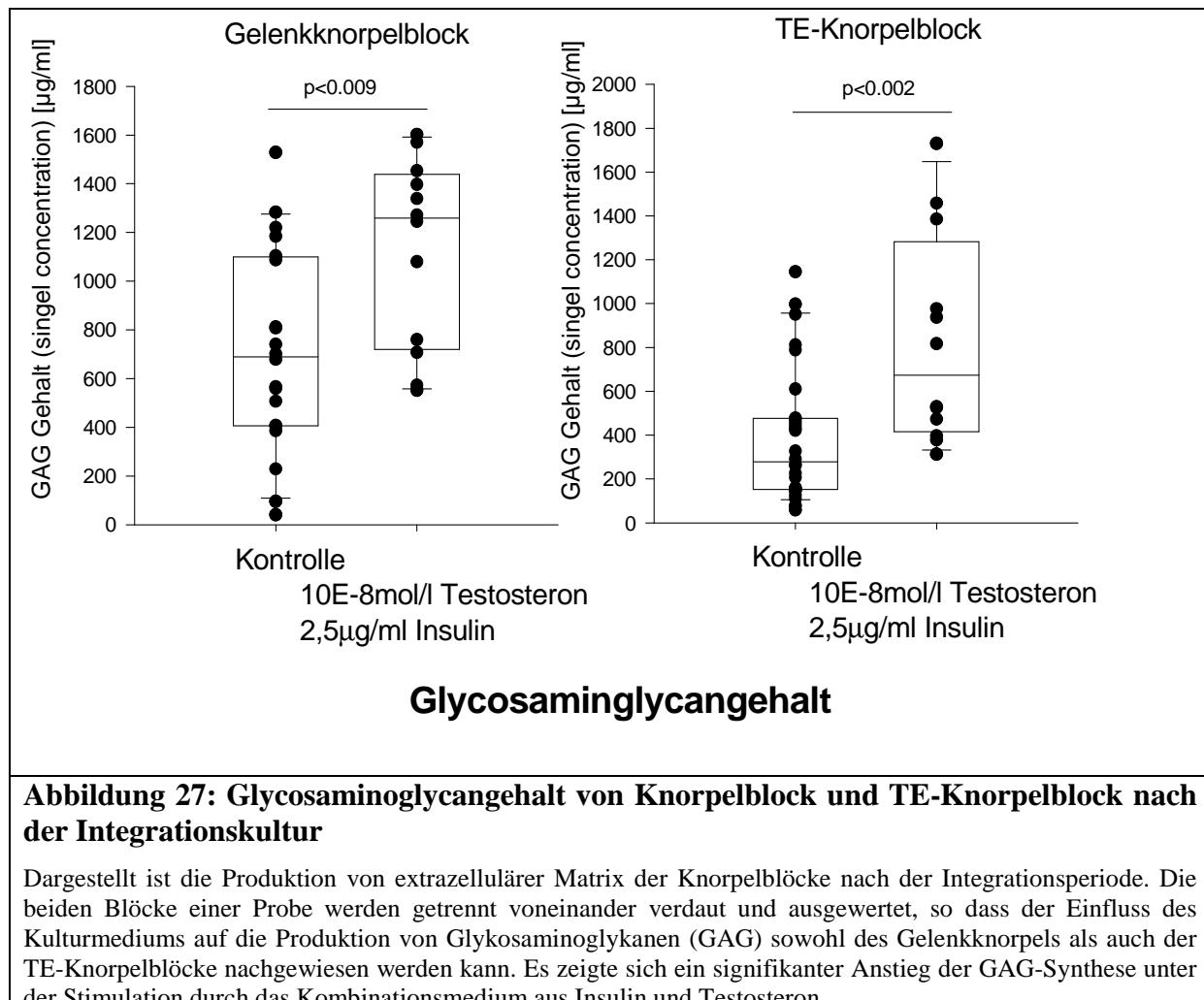
Für die Kontrollgruppe der Knorpelblöcke ergibt sich ein DNA-Gehalt von 9,63 μg/ml im Median und für die Hormonkombinationsgruppe ein Wert von 9,89 μg/ml.

Bei den TE-Knorpelblöcken zeigt sich für die Kontrollgruppe ein Wert von 8,08 μg/ml und bei der Hormonkombinationsgruppe ein Median von 6,32 μg/ml. Die Unterschiede der beiden Gruppen sind nicht signifikant.

In einem weiteren Versuch soll nun noch der Einfluss des Kombinationsmediums während der Integrationsperiode auf die Synthese der ECM untersucht werden.

Bei der Kontrollgruppe ergibt sich für die Knorpelblöcke ein Gehalt an Glycosaminoglycan von 689,53 μg/ml im Median. Die Hormon stimulierte Gruppe erreicht einen Median von 1258,60 μg/ml.

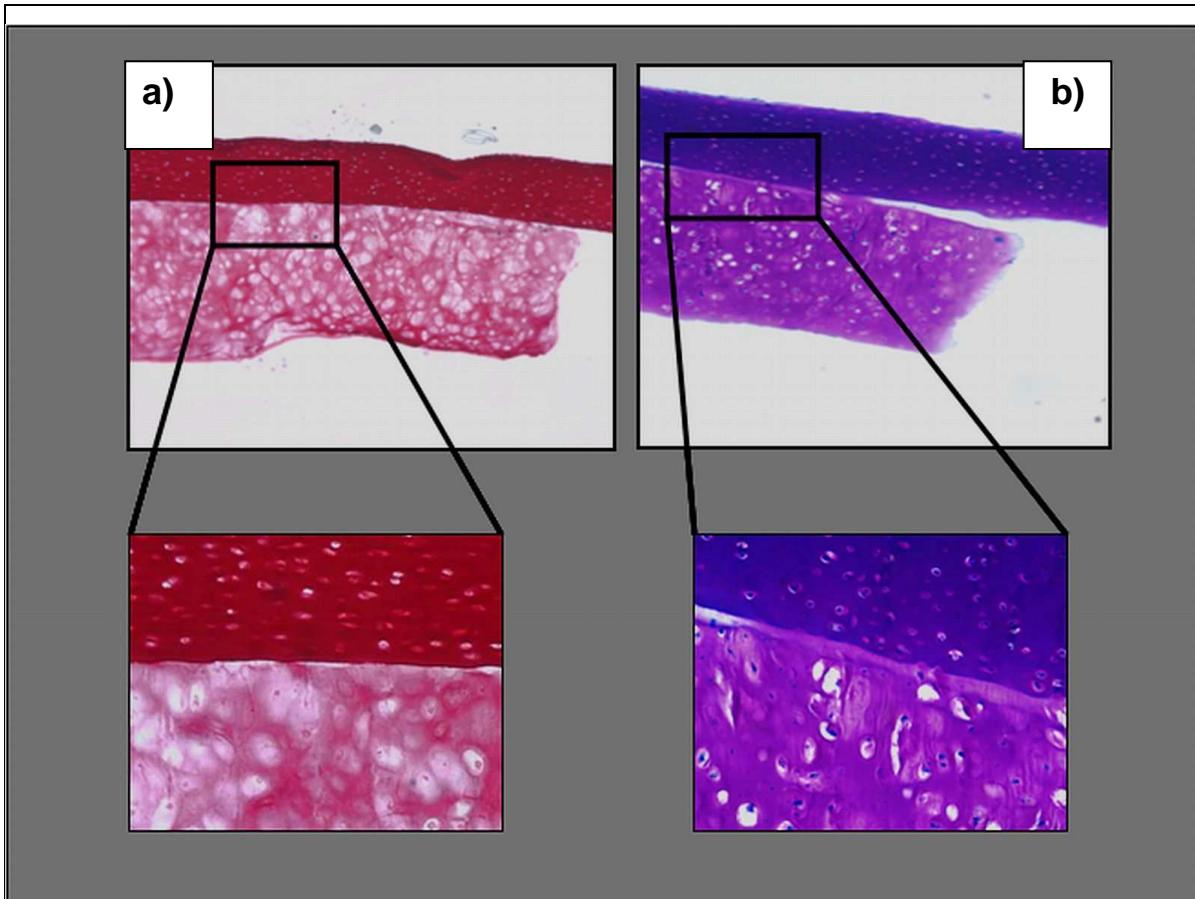
Der gleiche Effekt zeigt sich auch für die TE-Knorpelblöcke. Die Kontrollgruppe erreicht einen Median von 277,95 μg/ml und unter der Stimulation des Kombinationsmediums steigt die Glycosaminoglycansynthese auf 672,84 μg/ml an. Die Unterschiede sind für beide Integrationsgruppen signifikant.



Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass zwar die Glykosaminoglykane durch die Hormone sehr gut zu beeinflussen sind, die Kollagenquervernetzung aber davon unbeeinflusst bleibt.

## 5.6 Histologie und Rasterelektronenmikroskopie der Integrationszone zweier Knorpelblöcke

Zur Untersuchung der Überlappungs- und damit der Integrationszone zwischen den beiden Knorpelblöcken werden verschiedene Färbungen angefertigt.

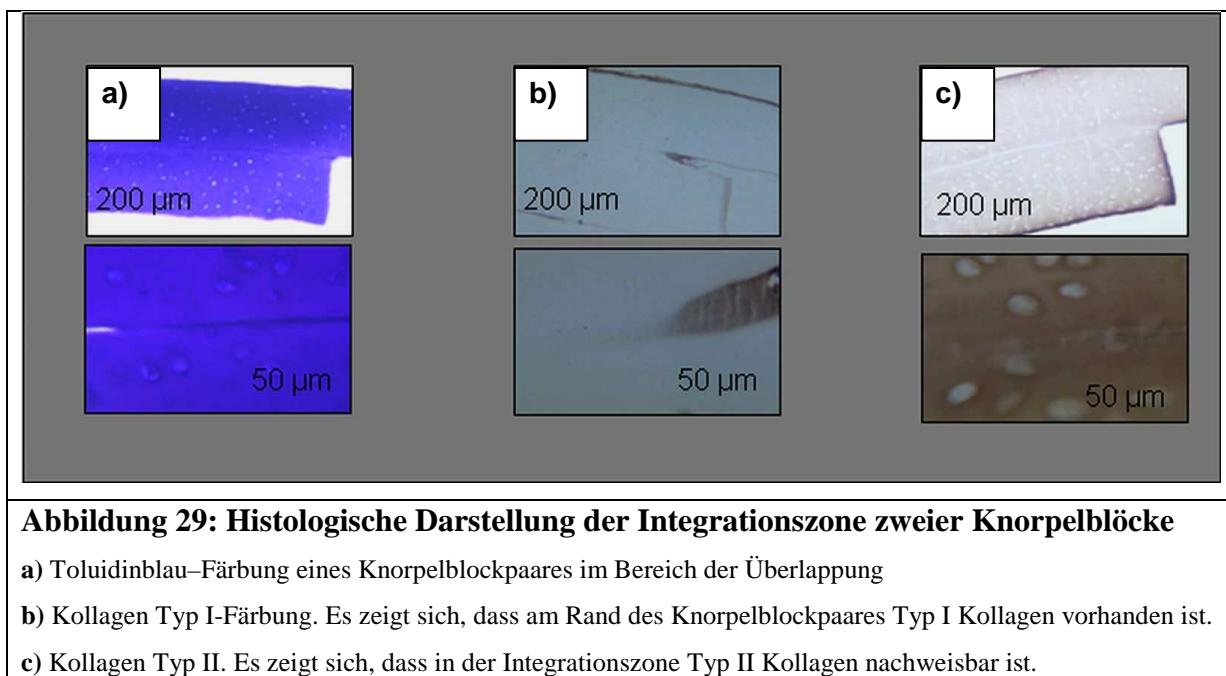


**Abbildung 28: Histologie der Integrationszone eines Knorpelblockes zu einem TE-Knorpelblock**

a) Safranin-O Färbung mit einem Ausschnitt der Integrationszone Knorpelblock oben zu TE-Knorpelblock unten

b) Toluidinblau-Färbung mit einem Ausschnitt der Integrationszone Knorpelblock oben zu TE-Knorpelblock unten

In Abbildung 28 sind zwei überlappende/integrierte Knorpelblöcke in verschiedenen Färbungen dargestellt. Die linken Bilder (a) zeigen eine Safranin-O Färbung, die rechten (b) eine Toluidinblau-Färbung des Knorpelblockpaars, um die Verteilung der Glykosaminoglykane über die Integrationszone darzustellen. Im oberen Bild mit 10-facher Vergrößerung erkennt man die gleichmäßige Verteilung von Glykosaminoglykanen über den gesamten Knorpel. In der 25-fachen Vergrößerung (Ausschnitt) ist die Integrationszone nochmals genauer dargestellt.



Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 29) wird eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I (mittleres Bild) und Kollagen Typ II (rechtes Bild) angefertigt. Bei der 10-fachen Vergrößerung kann man sehr gut erkennen, dass sich Kollagen Typ I nur an den Rändern der Knorpelblöcke nachweisen lässt.

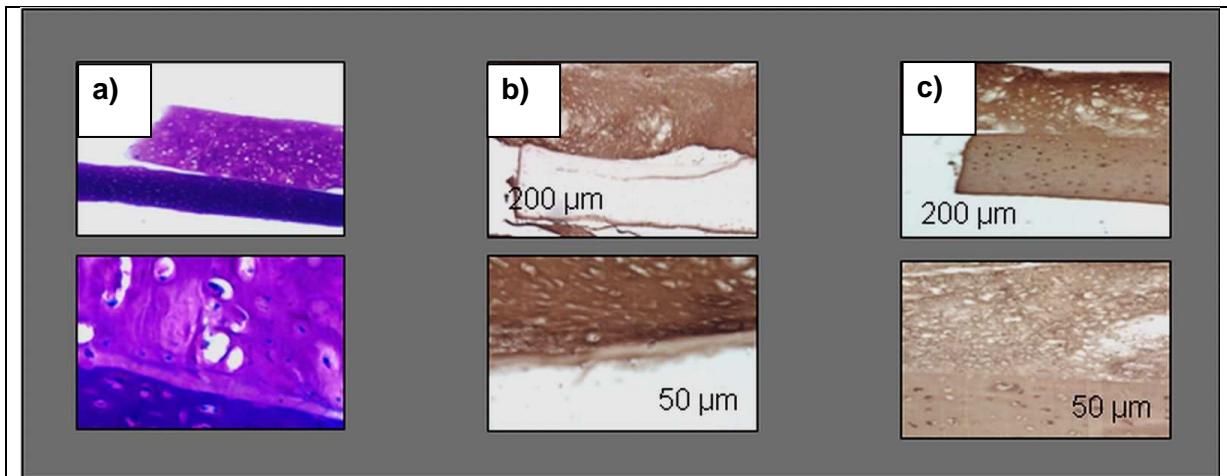
Bei der 25-fachen Vergrößerung lässt sich in der Integrationszone kein Kollagen Typ I nachweisen.

Das Bild c mit dem Ausschnitt zeigt in 10-facher Vergrößerung eine Anfärbung von Kollagen Typ II in beiden Knorpelblöcken und in der Integrationszone. Dies bestätigt sich auch in der 25-fachen Vergrößerung.

In der Abbildung 30 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen von den TE-Konstrukten mit den nativen Knorpelscheiben dargestellt. Es zeigt sich bei der Färbung mit Toluidinblau eine homogene Verteilung der Glykosaminoglykane in den Knorpelblöcken und in den TE-Knorpelblöcken. Eine Anfärbung lässt sich auch in der Integrationszone erkennen. Es fällt aber auf, dass die Intensität der Färbung unterschiedlich ist, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um gleiche Gewebe handelt. Die 25-fache Vergrößerung stellt die Integrationszone noch genauer dar.

Die immunhistochemische Färbung auf Kollagen Typ I (b) und Kollagen Typ II (c) weist eine diffuse Anfärbung für beide Kollagentypen in den TE-Blöcken und in der Integrationszone auf. Dagegen ist in den Gelenkknorpelblöcken kein Kollagentyp I mit Ausnahme vom äußersten Rand erkennbar.

Das lässt darauf schließen, dass in den TE-Knorpelblöcken eine Kollagen Typ I und II Expression auf gleichem Niveau vorliegt und beide Kollagentypen auch in der Integrationszone zu finden sind.



**Abbildung 30: Histologische Darstellung der Integrationszone von TE-Knorpel-Knorpelblockpaaren**

a) Die Toluidinblau-Färbung illustriert den unterschiedlichen Gehalt an Glycosaminoglycanen des oben liegenden TE-Knorpelblockes und des unten liegenden Gelenkknorpelblockes. Die Blöcke sind in der Überlappungszone nicht kontinuierlich verbunden.

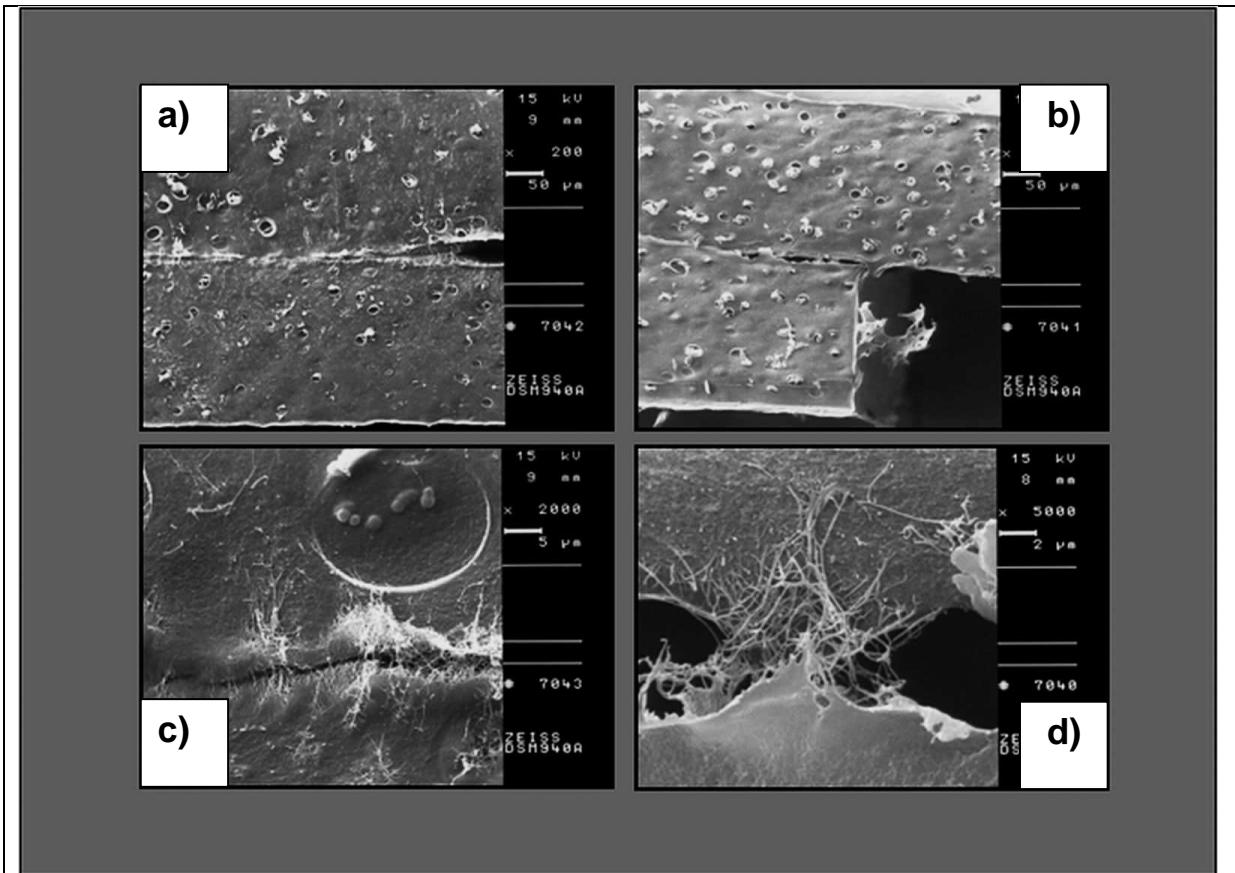
b) Die Kollagen Typ I Immunhistochemie weist eine starke Anfärbung für den oben liegenden TE-Knorpelblock, jedoch nur den am Rand angefärbten Gelenkknorpelblock auf. Die Integrationszone ist mit angefärbt.

c) Die Kollagen Typ II Immunhistochemie weist eine durchgehende Anfärbung über beide Blöcke und die Integrationszone auf.

In der Abbildung 31 sind 2 Gelenkknorpelblöcke nach Gewebskultur für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitet.

Bei den oberen zwei Bildern (a.b) mit 200-facher Vergrößerung erkennt man die beiden Knorpelblöcke mit der Überlappungszone. Schon bei dieser Vergrößerung sieht man im Bereich der Überlappungszone die Ausbildung fibrillärer Strukturen, die zwischen den beiden Knorpelblöcken gewachsen sind.

In der 2000-fachen Vergrößerung (c) sind einzelne Fasern zu erkennen, die in der 5000-fachen Vergrößerung (d) typische Kollagenfaserbündelstrukturen aufweisen.



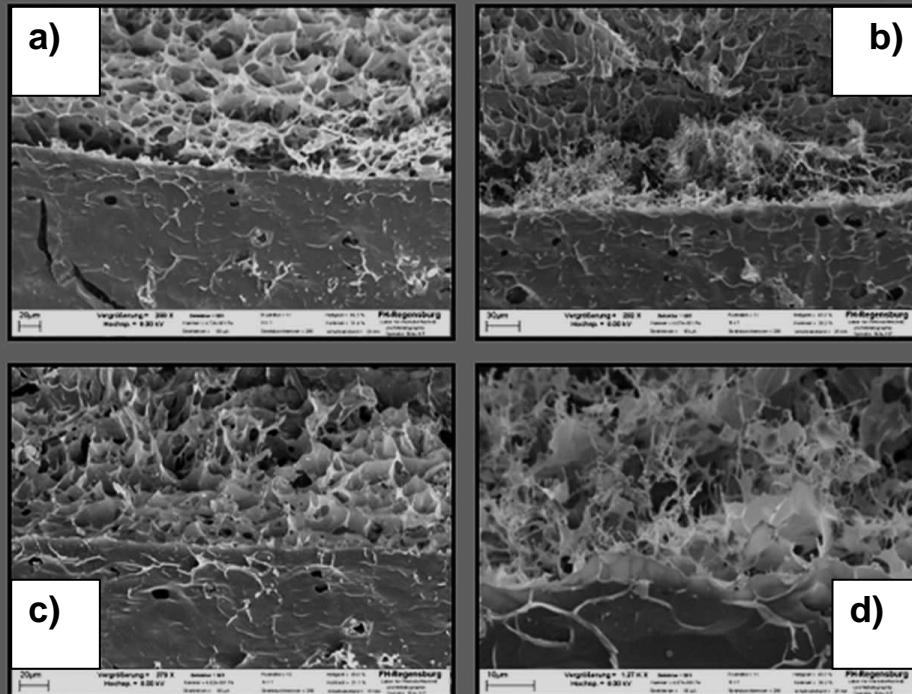
**Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Integrationszone eines Gelenkknorpelblockpaars**

- a-b) Integrationszone zwischen zwei Gelenkknorpelblöcken
- c) Vergrößerung der Integrationszone mit ineinander verschlungenen Faserstrukturen.
- d) Die Fasern in der Integrationszone haben die typische Struktur der angrenzenden Kollagenfaserbündel aus den Knorpelblöcken und sind mit diesen verbunden.

In der Abbildung 32 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von der Integrationszone zwischen dem TE-Konstrukt und dem nativen Knorpel gezeigt.

Die beiden oberen Bilder sind mit 200-facher Vergrößerung (a,b) dargestellt, wobei sich der TE-Knorpelblock oben und der Gelenkknorpelblock unten im Bild befinden. Beide Gewebe liegen im Bereich der Integrationszone eng zusammen und weisen eine Verbindung auf. Es lassen sich auch bei diesen Aufnahmen fibrilläre Strukturen zwischen den beiden Knorpelblöcken im Bereich der Integrationszone erkennen.

Im Vergleich zu den Gelenkknorpelblockpaaren weist der TE-Knorpelblock eine viel aufgelockertere und nicht so kompakte Gewebestruktur auf.



**Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Integrationszone eines TE-Knorpel-Gelenkknorpelblockes**

- a) Integrationszone zwischen TE-Knorpelblock (oben) und nativem Knorpelblock (unten)
- b) Integrationszone zwischen TE-Knorpelblock (oben) und nativem Knorpelblock (unten)
- c) Vergrößerung der Integrationszone mit ineinander verwachsenden Bindegewebsstrukturen
- d) Nochmalige Vergrößerung des Ausschnitt C

Bei dem Bild (c) erkennt man bei einer 1000-fachen Vergrößerung, dass beide Knorpelblöcke in der Integrationszone eng aneinander liegen und sich ein heller Saum in diesem Bereich gebildet hat.

In der 2000-fachen Vergrößerung kann man bei der Integrationszone zwischen dem TE-Block und dem Gelenkknorpelblock fibrilläre Strukturen erkennen. Diese Fasern sind anders konfiguriert als die Strukturen, die man zwischen den beiden Gelenkknorpelblöcken erkennen kann.

## 6 Diskussion

Die pathophysiologischen Mechanismen der Gelenkknorpeldegeneration (Arthrose) wurden ausführlich *in-vivo* für chondrale [94] [52,70] und osteochondrale Defekte [69,78] untersucht. *In-vivo* Versuche zeigen häufig eine unvollständige Integration von gegenüberliegenden gebrochenen Knorpeloberflächen, im Gegensatz zur vollständigen Heilung von Knochenbrüchen. Aus diesem Grund wurde in vielen *in-vitro* Experimenten versucht, die Mechanismen der Gelenkknorpelintegration zu analysieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Integration von Gelenkknorpel unter *in-vitro* Bedingungen, abhängig von der Zellvitalität, der Kollagenausrichtung und deren Quervernetzung möglich ist [27,28,86]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der Synovialflüssigkeit (z.B. Proteoglykan 4) sich an die Knorpeloberfläche binden, die Kollagen-Quervernetzung und damit die Gelenkknorpelintegration hemmen [34].

Auch die Biomechanik hat einen Einfluss auf die Knorpelregeneration, wenn zum Beispiel Synovialflüssigkeit in den Knorpelbruchspalt gedrückt wird. Wir konnten zeigen, dass verschiedene Steroidhormone einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Integration von Gelenkknorpel haben [31].

Um Gelenkknorpeldefekte zu behandeln, wurden verschiedene Techniken der Gewebezüchtung, das Tissue Engineering (TE), entwickelt. Jedoch schien die Integration des künstlich gezüchteten Knorpels mit dem nativen Gelenkknorpel wesentlich schwerer erreichbar zu sein, als die Integration zwischen zwei nativen Knorpelblöcken. Nur wenige *in-vitro* Studien haben die mechanische Integration zwischen künstlich gezüchtetem Knorpelgewebe und nativem Gelenkknorpel untersucht. Obwohl die Möglichkeit einer Integration von TE-Knorpelkonstrukten mit natürlichem Gelenkknorpel bewiesen werden konnte, gibt es keine *in-vitro* Versuche zur Analyse der Einflüsse von Wachstumsfaktoren und Steroidhormonen auf die Integration. In dieser Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Ascorbinsäure, Insulin und Testosteron auf die mechanische Quervernetzung, die Zellzahl und die Produktion extrazellulärer Matrix bei der Integration eines TE-Knorpelblockes mit natürlichem Knorpel, vergleichend mit zwei nativen Knorpelblöcken, untersucht.

## 6.1 Vorversuche

Da es sich bei dem TE-Konstrukt um ein künstlich gezüchtetes Knorpelgewebe handelt, von dessen Eigenschaften noch wenig bekannt war, mussten erst in verschiedenen Vorversuchen die optimalen Kulturbedingungen herausgefunden und an das Modell nach Reindel [86] angepasst werden.

Die Präparation des nativen Knorpelblockes wurde genau wie in den Vorversuchen durchgeführt und ist in Absatz 4.3 und 4.4 ausführlich erklärt.

Die erste Aufgabenstellung bei dem neuen *in-vitro* gezüchteten Knorpelgewebe war die Herstellung von definierten TE-Knorpelblöcken für die Integrationskammer. Das TE-Konstrukt wurde von der Pharmazeutischen Technologie der Universität Regensburg unter Leitung von Dr. rer. nat. Torsten Blunk, wie in Absatz 4.2 und in Abbildung 1 (5-9) beschrieben, gezüchtet. Die auf einem „PGA Scaffold“ gezüchteten TE-Konstrukte hatten Abmessungen von ca. 20 mm Länge, 15 mm Breite und 10 mm Höhe. Das erste zu lösende Problem war nun die Herstellung von 300 µm dicken Knorpelscheiben. Die nativen Knorpelscheiben wurden aus einem Knorpel-Knochenzylinder herausgeschnitten, wobei der Knochenanteil in das Schlittenmikrotom eingespannt werden konnte. Dies war bei dem TE-Knorpelstück nicht möglich.

Bei dem **ersten Versuch** wurde ein Metallquader mit einer Lochplatte entwickelt, auf der das TE-Knorpelstück platziert und mit Vakuum fixiert werden konnte (Abbildung 6).

Durch das Vakuum wurde dem Knorpel viel Wasser entzogen. Somit verringerte sich dessen Höhe, was in Kombination mit der schlechten mechanischen Stabilität das Schneiden einer glatten Oberfläche wesentlich erschwerte. Durch die Geometrie des Schneideinstrumentes mit einem Stoßrand zur weiteren Fixierung konnte der untere Teil des Konstruktes nicht geschnitten werden. Wir konnten mit dieser Methode Knorpelblöcke mit einer Schichtdicke von 800 µm und einer unebenen Oberfläche schneiden (siehe Abbildung 6 d). Trotz der ungenauen Präparation der Knorpelscheiben, wurden bei diesem Vorversuch 4 von 20 Proben zu einer Integration gebracht.

Der Metallquader wurde im **zweiten Versuch** dahingehend modifiziert, dass ein Metallplättchen auf der Oberfläche mit einer Schraube verschoben und fixiert werden konnte. Dadurch sollte das TE-Konstrukt zusätzlich fixiert werden, sodass der Sog auf die Lochplatte verringert und damit dem Knorpel weniger Wasser entzogen wurde (siehe Abbildung 6 a,b). Auch mit dieser Änderung konnte der Knorpel nicht vollständig fixiert und somit auch die Schnittqualität nicht entscheidend verbessert werden.

Im **dritten Versuch** wurde dann ein vollständig neues Schneidetool, genau beschrieben in Absatz 5.1.1, entwickelt (siehe Abbildung 7). Bei diesem Modell wurden zwei Metallquader mit Schrauben so zusammengesetzt, dass innen eine Kammer entstand, in die das gezüchtete TE-Knorpelstück eingelegt und mit einer Mikrotomklinge geschnitten werden konnte.

Jetzt konnten Knorpelscheiben mit glatter Oberfläche und definierter Dicke geschnitten werden. Das Problem der Fixierung und des Flüssigkeitsverlustes des TE-Knorpelstückes war somit gelöst, was sich in deutlich besseren Integrationswerten und einer größeren Anzahl an integrierten Proben zeigte.

Die Verbesserung ist sowohl auf die glatte Oberfläche und den somit besseren Kontakt im Bereich der Integrationszone als auch auf den geringeren Wasserverlust während der Präparation zurückzuführen.

Es war jedoch nicht möglich die Schichtdicke der Knorpelscheiben zu regulieren, so dass Schichtdicken zwischen 400 µm und 600 µm entstanden (siehe Abbildung 7d).

Im **vierten Versuch** wurde deshalb das bewährte Schneideinstrument nochmals modifiziert (siehe Absatz 5.1.1 und Abbildung 8). Von den zwei Metallquadern wurde bei einem im Bereich der Schnittkammer ein Zylinder herausgefräst, in den ein Stempel mit skaliert Rändelschraube eingebracht werden konnte. Die Schichtdicke der geschnittenen Knorpelscheiben war so genau einstellbar. Mit diesem Versuchsaufbau gelang es, Schichtdicken bis zu 200 µm mit glatter Oberfläche und unter ständiger Befeuchtung mit PBS zu schneiden. Es war dadurch eine Präparation des TE-Knorpelblockes in ausreichender Qualität möglich, um in der Kulturmutter repräsentative Integrationswerte zu erzielen.

## 6.2 Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration auf die Integration

Der Einsatz von Ascorbinsäure und deren Isoformen ist in der Zell- und Gewebekultur standardisiert. Ascorbat ist ein Kofaktor in der Kollagensynthese und beteiligt an der Hydroxylierung von Prolin [80]. Es wirkt aber auch unabhängig von der Hydroxylierungsreaktion des Prolins auf die Kollagenexpression (COL2A1) [42,90]. Diätetische Untersuchungen wiesen ebenfalls eine zellassoziierte Matrixproduktion und den Einfluß auf die Osteoarthritis nach [56]. Ascorbat induziert bei hohen Konzentrationen Apoptose [66]. Aus diesen Untersuchungen ist zu vermuten, dass Ascorbinsäure einen großen Einfluss auf die Gelenkknorpelintegration hat, da diese wesentlich von der Bindegewebssynthese abhängig ist.

In unseren Untersuchungen zeigte sich bei Abwesenheit von Ascorbinsäure während der Gewebskultur keinerlei Integration (negative Kontrolle Abbildung 13). Mit steigender Konzentration findet sich ein Optimum für die Integration bei 100 µg/ml für Ascorbat als auch für dessen Isoform Ascorbat-2-Phosphat. Bei einer weiteren Steigerung der Konzentration von Ascorbat nimmt die Integration wieder ab, was sich nicht bei seiner Isoform Ascorbin-2-Phosphat zeigt. Durch eine hohe Dosierung des Ascorbats (über 150 µg/ml) wird wahrscheinlich eine Apoptose ausgelöst [66]. Dies bestätigte sich allerdings in der Zellzahluntersuchung in unseren Versuchen nicht (Abbildung 15).

Andererseits kann es aber auch durch eine Verschiebung des pH-Werts zu ungünstigen Gewebskulturbedingungen kommen, weshalb die Syntheseleistung der Chondrocyten eher behindert als gefördert wird.

Dagegen spricht, dass die GAG-Synthese bei hoher Ascorbinsäurekonzentration (200 µg/ml) signifikant erhöht ist im Vergleich zur Negativkontrolle und zur 100 µg/ml Ascorbinsäuregruppe, die mechanisch am besten integrierte (Abbildung 16). Deshalb ist eher anzunehmen, dass es zu einer Verschiebung der Stoffwechselaktivität der Chondrocyten durch die Ascorbinsäurekonzentration von der faserartigen Extrazellulärmatrix hin zur gallertigen Extrazellulärmatrix kommt. Interessanterweise verhalten sich TE-Knorpelblöcke und Gelenkknorpelblöcke auf die konzentrationsabhängige Stimulation mit Ascorbinsäure und dessen Isoform ähnlich.

Da es einen Speicherungseffekt der Ascorbinsäure gibt und zu hohe Konzentrationen an Ascorbinsäure zum Ausfällen von Kristallen im Urin führt, sollten für therapeutische Ansätze mit Ascorbat [101], die ernährungsbedingten Serumkonzentrationsschwankungen [56] berücksichtigt und eine Überdosierung verhindert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Ascorbinsäure einen ganz entscheidenden Einfluss sowohl auf die Produktion der gallertigen als auch der bindegewebigen Extrazellulärmatrix des Gelenkknorpels- und des TE-Knorpels und auf deren Integration hat.

### 6.3 Gewebekulturdauer und Integration

Bei der *in-vitro* Gewebezüchtung hat die Kultivierungsdauer einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Größe, die Zusammensetzung der ECM und die mechanische Beschaffenheit des TE-Konstruktes [23,75]. Das in unserer Arbeit verwendete Knorpelkonstrukt wurde zuerst 4, dann 8 Wochen lang gezüchtet, nachdem sich in den Versuchen von K. Kellner bei einer Kulturdauer von 1 bis 7 Wochen eine deutliche Verbesserung des Gewebes gezeigt hatte [51].

Die 8 Wochen lang gezüchteten TE-Knorpelstücke waren wesentlich größer und hatten bessere mechanische Eigenschaften im Vergleich zu den 4 Wochen lang gezüchteten TE-Knorpelstücken, erreichten aber keine besseren Integrationswerte in der Integrationskultur, die für beide Gruppen 2 Wochen durchgeführt wurde (Abbildung 17). Obradovic züchtete ebenfalls TE-Konstrukte 5 Tage und 5 Wochen lang, wobei das Gewebe nach 5 Wochen wesentlich bessere mechanische Eigenschaften aufwies [77].

Die Kulturdauer verbesserte die mechanischen Eigenschaften des TE-Knorpelstückes und die Verlängerung der Integrationskulturdauer von 2 auf 4 Wochen war signifikant steigernd auf die mechanische Integration in der dargestellten Arbeit (Abbildung 17). Dieser Befund steht teilweise im Einklang mit Voruntersuchungen, die in einem Disc-Ring Modell durchgeführt wurden [108]. Auf der anderen Seite wurde durch eine andere Arbeitsgruppe im selben Modell zwar die Zunahme des Gewebsvolumens durch die Gewebskulturdauer bewiesen, die mechanisch messbare Integration verschlechtere sich jedoch [77]. Eine weitere Arbeitsgruppe um Hunter zeigte mit einer Gewebskulturdauer von 20 und 40 Tagen dagegen wieder, wie in den hier dargestellten Ergebnissen, eine Steigerung der Integration durch eine verlängerte Integrationskulturdauer im Disc-Ring Modell [44].

Reindel verwendete schon 1995 ein Scherbruchmodell, bei dem 2 Knorpelblöcke mit einer bestimmten Überlappungszone zur Integration gebracht werden und konnte zeigen, dass sich mit einer längeren Gewebskulturdauer auch die Integration verbessert [86]. In dieser Arbeit können diese Ergebnisse auf die Integration von TE-Knorpelblöcken zu Knorpelblöcken im Scherbruchtest bestätigt werden (Abbildung 17). Dieser Effekt ließ sich auch bei der Integration von zwei nativen Knorpelblöcken nachweisen (Abbildung 18). Die Verdoppelung der Zellkulturdauer zur Züchtung des TE-Konstruktions hingegen änderte nichts an der Integration, die Größe und die mechanischen Eigenschaften hingegen verbesserten sich deutlich (Abbildung 17).

## 6.4 Einfluss von Insulin auf die Integration von TE-Knorpelblöcken

Es gibt verschiedene Ansätze um die Synthese der Extrazellulärmatrix bei *in-vitro* gezüchtetem Knorpelgewebe zu steigern. Chondrozyten können mechanisch [98] oder durch bioaktive Substanzen [113] stimuliert werden. Es ist bekannt, dass IGF-1 (Insulin like growth factor) bei Knorpelgewebe zu einer Stimulation der Extrazellulärmatrixsynthese führt [8,63] und darüber hinaus vor einem Gewebeabbau durch Metalloproteininasen schützt [97].

Diese Effekte von Insulin und IGF-1 sind auch für Knorpelgewebskulturen [26] und TE-Knorpelkonstrukte beschrieben [10,29].

Insulin ist dem IGF-1 in der molekularen Struktur sehr ähnlich. Beide Moleküle binden an den IGF-1 Rezeptor von Chondrozyten [51]. Die Wirkung von Insulin wird durch einen indirekten Mechanismus verstärkt. Bei der Bindung von Insulin an den IGF-1 Rezeptor wird ein heterodimerer Hybridrezeptor geformt. An diesen kann IGF-1 viel stärker binden als an den normalen IGF-1 Rezeptor [79]. Aus den Arbeiten von Kellner geht hervor, dass durch Insulin und IGF-1 das Knorpelwachstum dosisabhängig gesteigert wird [51].

In dieser Arbeit wurde dasselbe Modell zur Kultivierung von TE-Knorpelkonstrukten verwendet, wie in den Vorarbeiten von Kellner und Blunk. Die TE-Konstrukte wurden wie beschrieben weiterverarbeitet und mit nativen Knorpelblöcken in einer *in vitro* Kultur zur Integration gebracht. Dabei erfolgte die Stimulierung des Gewebes durch Insulin und Testosteron.

Zunächst wurde die Qualität der in der Gewebekultur erzeugten TE-Konstrukte mit und ohne Stimulation durch Insulin auf die nachfolgende Integrationskultur untersucht. Die Insulinstimulation in der Gewebekultur hatte einen signifikanten Effekt auf die nachfolgende Integrationskultur in den Parametern Größe, mechanische Eigenschaften und Integration (siehe Abbildung 19). Wird die Insulinstimulation auch in der Integrationskultur fortgesetzt, so wirkt diese weiter signifikant steigernd im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (siehe Abbildung 20). Auf die Zellzahl der Knorpelblöcke hatte die Zugabe von Insulin in der Integrationskultur keinen Einfluss. Ganz anders hingegen zeigte sich sowohl bei dem TE- als auch bei dem nativen Knorpelblock bei Steigerung der Insulinkonzentration ein Anstieg des Extrazellularmatrixgehaltes (Abbildung 23). Dieser Effekt ist in der Literatur schon mehrfach beschrieben und kann auch die Erklärung für die signifikante Integrationssteigerung, gemessen in kPa, sein. Zusammenfassend zeigt sich für die Wirkung von Insulin, dass es konzentrationsabhängig die Extrazellularmatrixsynthese und Integration von TE- und Knorpelblöcken genauso steigert, wie zwischen zwei nativen Knorpelblöcken. Auch wenn die Integrationswerte bei der nativen Knorpelintegration wesentlich höher waren, so reagieren doch beide Gewebe gleichförmig auf die Stimulation von Insulin.

## 6.5 Einfluss von Testosteron auf die Integration des TE-Knorpelstückes

Es ist bekannt, dass Steroidhormone wie Dihydroepiandrosterone (DHEA) das Ungleichgewicht des katabolen Chondrozytenstoffwechsels ausbalancieren und so vor Knorpelverlust schützen können [50].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Steroidhormone den entzündungsfördernden Effekten von katabolen Cytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF und IL-6 entgegenwirken können [104].

*In vitro* Experimente haben gezeigt, dass einige Faktoren für eine Knorpelintegration sehr wichtig sind, wie zum Beispiel die Zellvitalität, die Kollagenbildung und Kollagenausrichtung an der Integrationszone [28,86]. Es gibt allerdings wenig *in vitro* Versuche zur Wirkung von Steroidhormonen auf die Integrationseigenschaften von Gelenkknorpel. Englert untersuchte die Effekte von Testosteron, anderen Steroidhormonen und von Interleukinen und deren Kombination auf die Gelenkknorpelintegration. Er konnte zeigen, dass durch die Zugabe von Testosteron mit einem Konzentrationsoptimum von  $10^{-8}$  mol/l zum Kulturmedium die Integration von nativem Gelenkknorpel und dessen Produktion von ECM signifikant gesteigert werden kann [31]. In weiteren Versuchen verglich Englert die Knorpelintegration durch Testosteron mit einer chemischen Quervernetzung und einer mechanischen Naht bezüglich der Scherbruchspannung. Auch bei diesem Vergleich erreichte die Integration unter der Stimulation mit Testosteron die größte Stabilität bei nativem Gelenkknorpel [33].

Bei unserer Arbeit sollte unter Anderem untersucht werden, ob diese Effekte von Testosteron auch auf die Integration von TE- zu Knorpelblöcken übertragbar sind.

Es wurden dieselben Konzentrationen an Testosteron zur Stimulierung in der Integrationskultur verwendet, wie in den vorbeschriebenen Versuchen zur Knorpelblockintegration von Englert. Es zeigte sich, dass Testosteron in den gewählten Konzentrationen zu einem signifikanten Niedergang der mechanisch messbaren Integration führt (Abbildung 21). Dieser Einfluss war so nicht erwartet, aber bestätigte sich in mehrfachen Kontrolluntersuchungen. Der Mechanismus, warum es zu einer erhöhten Integration bei Stimulation von Knorpelblöcken und zu einer verminderten Integration von TE-Knorpelblöcken durch Testosteron in den gewählten Konzentrationen kommt, könnte eine unterschiedliche Aktivität der Testosteron konvertierenden Aromatase sein [96]. Sollte die Aktivität der Aromatase im TE-Knorpelblock erhöht sein, so würde dies zu einer Deaktivierung des Testosterons führen. Das Testosteron könnte aber auch in die aktiver Form Dihydrotestosteron metabolisiert werden und zu einer Überstimulation führen [105]. Der Mechanismus, der zur Wirkung des Testosterons führt, muss im Weiteren aufgeklärt werden.

## **6.6 Vergleich der oben aufgeführten Daten der Gelenkknorpelintegration und der Integration des TE-Knorpelstückes mit nativem Gelenkknorpel (in Zusammenarbeit mit A. Benditz)**

Im Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten der Integration von TE-Knorpel mit natürlichem Gelenkknorpel wurde von Herrn Benditz in einer weiteren Dissertation die Integration von 2 nativen Knorpelscheiben untersucht.

Bei Stimulation des TE-Knorpelkonstruktes mit Insulin in den gleichen Konzentrationen wie bei Versuchen mit *nativem* Knorpel (0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml) kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium wurde durch Stimulation mit Insulin eine Integrationssteigerung erreicht (Abbildung 22). Bezuglich der DNA-Konzentration bei Zugabe von Insulin blieb auch diese, ähnlich dem *nativen* Knorpelgewebe, nahezu unverändert, eher leicht vermindert (Abbildung 24).

Bezuglich der Glykosaminoglykan-Konzentration bei Stimulation mit Insulin gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium zeigte sich auch hier wie bei *nativem* Gelenkknorpel eine Steigerung, die mit einer Vermehrung der extrazellulären Matrix einhergeht (Abbildung 23).

Zu beachten ist, dass die beiden Gewebearten zwar gleichförmig auf die Stimulation reagieren, jedoch auf einem unterschiedlichen Niveau. Die Integrationsleistungen des nativen Gewebes sind um den Faktor 5-10 höher.

Dennoch zeigt sich, dass sich die schon beschriebenen positiven Effekte von Insulin auf die TE-Züchtung auch auf die Integration übertragen lassen. Anscheinend ist die Ausprägung von Insulin-sensitiven Rezeptoren und deren Ansprechen mit anschließender Effektkaskade in beiden Gewebearten ähnlich vorhanden. Dies bedeutet, dass bei weiteren Versuchen oder eventuellen *in vivo* Studien TE-Konstrukte und *nativer* Knorpel hinsichtlich des Einsatzes von Insulin gleich zu behandeln sind.

Ganz anders verhält es sich dagegen beim Vergleich der Stimulation der beiden Gewebearten mit Testosteron. Wie schon oben dargestellt, konnte bei der Gelenkknorpelintegration die absolut höchste Integrationssteigerung gegenüber der Kontrollgruppe durch Stimulation mit Testosteron in einer Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l erreicht werden (Abbildung 22). Der Gehalt an Glykosaminoglykanen der Proben hat sich gegenüber der Kontrollgruppe genau wie der DNA-Gehalt der Proben nicht wesentlich verändert. Bei Stimulation der TE-Integration mit Testosteron kommt es dagegen zu einer signifikanten Abnahme der Integration sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch im Vergleich mit Insulin.

## 6.7 Einfluss der Kombination von Insulin und Testosteron auf die Integration von TE-Knorpelblöcken

Insulin wirkt in TE- und Knorpelblöcken gleich, im Gegensatz zu Testosteron, welches nur im Knorpelblock stimulierend wirkt. In diesem Versuch sollte die gemeinsame Anwendung von Insulin und Testosteron untersucht werden (Abbildung 25).

Der erwartete stimulierende Effekt auf die Integration durch die Kombination der beiden Hormone konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich viel mehr eher der für die Integration katabole Effekt des Testosterons mit tendenziell verminderten Werten zur Kontrollgruppe. Dies könnte an einer blockierenden Rezeptoraffinität von Testosteron an den IGF-1 Rezeptor liegen [30,49], so dass es zu keiner erhöhten Extrazellularmatrixsynthese durch Insulin kommt. Dies konnte aber nicht durch unsere Versuche bestätigt werden, da zwar die Zellzahl unverändert zur Kontrollgruppe blieb (Abbildung 26), aber der Gehalt an Extrazellularmatrix für Glykosaminoglykane zunahm (Abbildung 27).

Welcher Mechanismus nun hinter der tendenziell verschlechterten Integration bei gleichzeitig gesteigerter Glykosaminoglykansynthese steht ist offen. Da die Integration von der Kollagensynthese und der Quervernetzung des Kollagens abhängt, ist zu erwarten, dass die Kollagensynthese durch Testosteron maßgeblich beeinflusst wird.

## 6.8 Histologie und REM

Für die weitere Untersuchung der Integrationszone und die Zusammensetzung der beiden integrierenden Knorpelblöcke wurden histologische Schnitte angefertigt und unterschiedlich gefärbt.

In Abbildung 28 sind die ersten zwei Färbungen, links Safranin-O und rechts Toluidinblau zum qualitativen Nachweis von Glykosaminoglykanen (siehe 4.8).

Der TE-Knorpelblock lässt eine wesentlich lockere Struktur erkennen als der Knorpelblock. Bei beiden Geweben zeigt sich aber eine flächige und gleichmäßige Verteilung der Glykosaminoglykane über den gesamten Block. Bei der Toluidinblau-Färbung erkennt man einen schmalen Saum zwischen den integrierten Knorpelblöcken, der auf die Bildung von Glykosaminoglykanen hindeutet.

Durch eine immunhistochemische Färbung sollte die Qualität der Kollagene und deren Verteilung über den Gewebeblock dargestellt werden. In Abbildung 29 sind 2 Knorpelblöcke in a) mit Toluidinblau-Färbung, in b) mit Kollagen Typ I Färbung und in c) mit Kollagen Typ II Färbung dargestellt.

Kollagen Typ I (b) ist überwiegend nur an den Rändern erkennbar, in der Integrationszone hingegen ist nur wenig Kollagen Typ I zu erkennen. Kollagen Typ II (c) ist flächig über den ganzen Knorpel verteilt und es zeigt sich eine Intensitätszunahme im Bereich der Integrationszone.

In Abbildung 30 sind die gleichen Färbungen mit TE-Knorpelblöcken nach der Integration mit Knorpelblöcken dargestellt. Bei der Toluidinblau Färbung (a) erkennt man eine homogene Verteilung der Glykosaminoglykane über beide Blöcke. Es fällt aber die unterschiedliche Intensität der Färbungen auf. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Gewebestruktur erklären.

Die Kollagen Typ II Färbung (c) lässt eine fleckige Färbung im Bereich des TE-Knorpelblockes und eine flächige, homogene Verteilung im Knorpelblock erkennen. Im Bereich der Integrationszone ist eine homogene Anfärbung mit einem dunklen Saum, der mit einer vermehrten Bildung von Kollagen Typ II gedeutet werden kann, erkennbar.

Zur besseren Beurteilbarkeit der Integrationszone wurden sowohl von den Knorpelblockpaaren als auch von den TE-Knorpelblock/Knorpelblockpaaren rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 31,32).

In Abbildung 31 sind zwei Knorpelblöcke dargestellt, die im Bereich der Überlappungszone die Ausbildung fibrillärer Strukturen aufweisen. Diese fibrillären Strukturen überbrücken den Spalt zwischen den beiden Knorpelblöcken.

In Abbildung 32 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von TE-Knorpelblock/Knorpelblockpaaren dargestellt.

Im Vergleich zum Knorpelblock weist der TE-Knorpelblock eine viel aufgelockertere und nicht so kompakte Gewebestruktur auf. Es finden sich wabenförmige Strukturen, die als Kollagen interpretiert werden können.

## 6.9 Vergleich zu anderen Modellen

Als erster hat Obradovic TE-Knorpelkonstrukte aus juvenilen bovinen Chondrozyten in einem Gelenkknorpelring zur Integration gebracht und die Qualität der mechanischen Quervernetzung durch einen „Push-out“ Test gemessen [77]. Es konnte gezeigt werden, dass Gewebekonstrukte aus juvenilen Zellen im Vergleich zu Konstrukten aus adulten Zellen eine bessere Integration aufwiesen.

Hunter und Levenston verwendeten ein ähnliches Modell wie Obradovic und konnten darstellen, dass das Wachstum von TE-Konstrukten durch das gegenüberliegende native Gewebe beeinflusst wurde. Die mechanische Integration der TE-Konstrukte mit dem nativen Gewebe war erheblich geringer als zwischen zwei nativen Geweben [44].

Tognana zeigte, dass sich mit steigender Integrationszeit auch die Integrationsstärke von aus juvenilen bovinen Chondrozyten gezüchteten TE-Konstrukten mit dem nativen Gewebering verbesserte [108]. Zang konnte mit einem vergleichbaren Modell beweisen, dass die Zellvitalität an der Bruchstelle ein wesentlicher Faktor für die Qualität der Integration ist [119]. Moretti analysierte das vielfach verwendete Disc-Ring Modell und kam zu dem Ergebnis, dass ein Gewebewachstum auf beiden Seiten des Modells zu einer Überschätzung der mechanischen Integration führt [73].

Bei den erwähnten Arbeiten wurde ausschließlich nur das Disc-Ring-Modell zur Analyse der mechanischen Integration verwendet. Obwohl alle diese Versuche wertvolle Erkenntnisse zum Verständnis der Knorpelintegration liefern, hat das verwendete Modell doch einen entscheidenden Nachteil: Es kommt zu unerwünschten „press-fit“ Effekten, da der Knorpelzylinder durch sein Wachstum mechanisch im Knorpelring stecken bleibt und dies nicht von der eigentlichen Integration unterschieden werden kann. Ein weiterer Nachteil ist der von Moretti beschriebene Effekt des Gewebewachstums über die Integrationszone hinaus, was ebenfalls zu einer Überschätzung der Integrationswerte führt.

Deshalb ist der Scherbruchversuch eine alternative Technik, die von den oben beschriebenen Effekten nicht beeinflusst wird und bezüglich der physiologischen Roll-Gleit-Bewegung der Gelenke für die klinische Anwendung aussagekräftige Daten liefert.

Dieses Modell wurde vor Jahren entwickelt, schon in unserer Forschergruppe angewandt [31] und es wird auch in dieser Arbeit verwendet.

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines standardisierten *in vitro* Integrationsmodells für Regeneratknorpelgewebe (tissue engineered cartilage, im weiteren als TE-Knorpelblock bezeichnet). Ein TE-Knorpelblock soll in einer Gewebekultur mit einem Gelenkknorpelblock überlappend kultiviert und im Anschluss ein mögliches Zusammenwachsen beider Blöcke mechanisch untersucht werden.

Nach mehreren Vorversuchen zum Schneiden des TE-Knorpels, ist ein spezielles Schneideinstrument entwickelt worden, mit dem Schnittdicke und Oberflächenqualität wesentlich verbessert werden konnten.

TE-Knorpelblöcke mit einer Schichtdicke von 300 µm lieferten in diesem Integrationsmodell die besten Quervernetzungsergebnisse, was auf den höheren Anpressdruck zurückzuführen ist. Dieser wird auch durch die Lage der Integrationspartner in der Kulturkammer beeinflusst, wenn der mechanisch festere native Knorpel den Stempeldruck aufnimmt. Die Quervernetzung der Knorpelpaare kann auch durch eine konstante Bewegung zur erhöhten Mediumdiffusion in der Integrationsperiode nicht verbessert werden.

Die Zugabe von Ascorbinsäure zum Medium ist für eine Integration von Gelenkknorpel essentiell. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Effekt konzentrationsabhängig ist. Die besten Integrationswerte in Kombination mit der geringsten ECM-Produktion wurden bei einer Konzentration von 100 µg/ml Ascorbinsäure im Medium erzielt.

Auch die Zeit ist ein wesentlicher Faktor für die Integration. Es zeigte sich, dass eine Verdoppelung der Züchtungsperiode zwar die Eigenschaften des TE-Knorpels verbessert, sich aber nur indirekt auf die Integration auswirkt. Ganz anders hingegen ist der Effekt einer Verdoppelung der Integrationsperiode, wodurch die Integrationswerte sowohl bei nativ-TE als auch bei nativ-nativ Probenpaaren entscheidend gesteigert werden können.

Da auch für die Züchtung des TE-Knorpelstückes Insulin mit sehr großem Erfolg verwendet wurde, kamen in den Integrationsversuchen die gleichen Konzentrationen zur Anwendung.

TE-Knorpelstücke die durch Insulin im Wachstum stimuliert wurden, zeigten neben der Größe bessere mechanische Eigenschaften und erreichten dadurch höhere Integrationswerte. Durch die Zugabe von Insulin zum Medium in der Integrationsperiode konnte ebenfalls ein stimulierender Effekt auf die Quervernetzung bewiesen werden. Die Zellzahl der Knorpelblöcke bleibt durch Insulin unbeeinflusst, die Produktion der ECM hingegen wird durch Insulin konzentrationsabhängig stimuliert.

Als zweites Hormon wurde Testosteron für die Stimulation der Knorpelintegration untersucht. Bei den Versuchen mit zwei nativen Knorpelscheiben konnte durch Testosteron die Integration im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich gesteigert werden.

Bei den nativ-TE Probenpaaren kam es durch Zugabe von Testosteron zu einer Verringerung der Integrationswerte. Die Zellzahl beider Gewebe verändert sich durch Testosteron nicht, die extrazelluläre Matrixsynthese wird aber konzentrationsabhängig beeinflusst.

Vergleicht man die Integrationsdaten der nativ-TE mit denen der nativ-nativ Versuche, so zeigt sich für die Insulinzugabe ein ähnlich stimulierender Effekt. Durch die Zugabe von Testosteron kann man bei nativ-nativ ebenfalls einen positiven Effekt erkennen, bei nativ-TE Probenpaaren hingegen führt Testosteron zu einer Verringerung der Integrationswerte.

Da sich Insulin bei dem TE-Knorpelblock und Testosteron beim Knorpelblock als potenter Stimulator der Quervernetzung erwiesen hat, sollte nun abschließend untersucht werden, ob sich diese Effekte addieren würden.

Es zeigte sich aber im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Verbesserung der Integrationswerte. Es ist somit anzunehmen, dass sich die Effekte der beiden Hormone gegenseitig aufheben, oder sich die Hormone in ihrer Wirkung gegenseitig stören. Die Proteoglykanproduktion bei beiden Geweben wurde durch die Hormonkombination signifikant gesteigert.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Integration von einem *in vitro* gezüchteten TE-Knorpelblock mit einem nativen Knorpelblock unter standardisierten Kulturbedingungen möglich ist. Die Integration der beiden Knorpelblöcke ist von Ascorbinsäure abhängig und kann durch Hormone stimuliert, respektive behindert werden.

## 8 Literaturverzeichnis

### References

- [1] Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, et al. Integrative cartilage repair: inhibition by beta-aminopropionitrile. *J Orthop Res* 1999; 17 850-7
- [2] Ahsan T, Sah RL. Biomechanics of integrative cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7 29-40
- [3] Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med* 2005; 33 443-60
- [4] Angele P, Abke J, Kujat R, et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 2004; 25 2831-41
- [5] Appel B, Maschke A, Weiser B, et al. Lipidic implants for controlled release of bioactive insulin: effects on cartilage engineered in vitro. *Int J Pharm* 2006; 314 170-8
- [6] Arokoski JP, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10 186-98
- [7] Bader DL, Kempson GE. The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. *Biomed Mater Eng* 1994; 4 245-56
- [8] Barone-Varelas J, Schnitzer TJ, Meng Q, et al. Age-related differences in the metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants maintained in the presence of insulin-like growth factor I. *Connect Tissue Res* 1991; 26 101-20
- [9] Billinghurst RC, Wu W, Ionescu M, et al. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum* 2000; 43 664-72
- [10] Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, et al. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2002; 8 73-84
- [11] Bobic V. [Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]. *Orthopade* 1999; 28 19-25
- [12] Bos PK, Kops N, Verhaar JA, van Osch GJ. Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;
- [13] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331 889-95
- [14] Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, et al. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996; 270-83

- [15] Broom ND. The altered biomechanical state of human femoral head osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1984; 27 1028-39
- [16] Buckwalter JA. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43 13-5
- [17] Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998; 28 192-202
- [18] Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 21-37
- [19] Buckwalter JA, Mankin HJ. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions\*{ {dagger} }. *J Bone Joint Surg* 1997; 79 600-11
- [20] Buckwalter JA, Mankin HJ. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation\*{ {dagger} }. *J Bone Joint Surg* 1997; 79 612-32
- [21] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998; 47 477-86
- [22] Burkart A, Schoettle PB, Imhoff AB. Operative Therapiemöglichkeiten des Knorpelschadens. *Unfallchirurg* 2001; 104 798-807
- [23] Chowdhury TT, Bader DL, Shelton JC, Lee DA. Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417 105-11
- [24] Cortial D, Gouttenoire J, Rousseau CF, et al. Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14 631-40
- [25] Da Silva JA, Colville-Nash P, Spector TD, et al. Inflammation-induced cartilage degradation in female rodents. Protective role of sex hormones. *Arthritis Rheum* 1993; 36 1007-13
- [26] Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, et al. The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 2008; 14 1251-61
- [27] DiMicco MA, Sah RL. Integrative cartilage repair: adhesive strength is correlated with collagen deposition. *J Orthop Res* 2001; 19 1105-12
- [28] DiMicco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10 218-25
- [29] Elder BD, Athanasiou KA. Systematic assessment of growth factor treatment on biochemical and biomechanical properties of engineered articular cartilage constructs. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17 114-23

- [30] Elliott JL, Oldham JM, Asher GW, et al. Effect of testosterone on binding of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II in growing antlers of fallow deer (*Dama dama*). *Growth Regul* 1996; 6 214-21
- [31] Englert C, Blunk T, Fierlbeck J, et al. Steroid hormones strongly support bovine articular cartilage integration in the absence of interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2006; 54 3890-7
- [32] Englert C, Blunk T, Kaiser J, et al. Steroid hormon modulation of articular cartilage integration. *Arthritis & Rheumatism* 2006; in preparation
- [33] Englert C, Blunk T, Muller R, et al. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 R47
- [34] Englert C, McGowan KB, Klein TJ, et al. Inhibition of integrative cartilage repair by proteoglycan 4 in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2005; 52 1091-9
- [35] Fierlbeck J, Hammer J, Englert C, Reuben RL. Biomechanical properties of articular cartilage as a standard for biologically integrated interfaces. *Technol Health Care* 2006; 14 541-7
- [36] Freed LE, Marquis JC, Nohria A, et al. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993; 27 11-23
- [37] Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, et al. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100 2448-53
- [38] Galois L, Freyria AM, Herbage D, Mainard D. [Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53 590-8
- [39] Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; S27-S36
- [40] Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989; 7 208-18
- [41] Herberhold C, Faber S, Stammberger T, et al. In situ measurement of articular cartilage deformation in intact femoropatellar joints under static loading. *J Biomech* 1999; 32 1287-95
- [42] Hering TM, Kollar J, Huynh TD, et al. Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys* 1994; 314 90-8
- [43] Hills BA, Thomas K. Joint stiffness and 'articular gelling': inhibition of the fusion of articular surfaces by surfactant. *Br J Rheumatol* 1998; 37 532-8
- [44] Hunter CJ, Levenston ME. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng* 2004; 10 736-46

- [45] Hunter CJ, Levenston ME. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng* 2004; 10 736-46
- [46] Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7 15-28
- [47] Hunziker EB, Driesang IM, Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Clin Orthop* 2001; S171-S181
- [48] Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78 721-33
- [49] Itagane Y, Inada H, Fujita K, Isshiki G. Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes. *Endocrinology* 1991; 128 1419-24
- [50] Jo H, Park JS, Kim EM, et al. The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11 585-94
- [51] Kellner K, Schulz MB, Gopferich A, Blunk T. Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application. *J Drug Target* 2001; 9 439-48
- [52] Kerker JT, Leo AJ, Sgaglione NA. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16 208-16
- [53] Kish G, Modis L, Hangody L. Osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral lesions of the knee and talus in the athlete. Rationale, indications, techniques, and results. *Clin Sports Med* 1999; 18 45-66, vi
- [54] Kleemann RU, Schell H, Thompson M, et al. Mechanical behavior of articular cartilage after osteochondral autograft transfer in an ovine model. *Am J Sports Med* 2007; 35 555-63
- [55] Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A 455-64
- [56] Kraus VB, Huebner JL, Stabler T, et al. Ascorbic acid increases the severity of spontaneous knee osteoarthritis in a guinea pig model. *Arthritis Rheum* 2004; 50 1822-31
- [57] Kubo T. [Ultrastructural studies of healing process of injured articular cartilage]. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1983; 57 167-85
- [58] Lane JG, Tontz WL, Jr., Ball ST, et al. A morphologic, biochemical, and biomechanical assessment of short-term effects of osteochondral autograft plug transfer in an animal model. *Arthroscopy* 2001; 17 856-63
- [59] LeRoux MA, Arokoski J, Vail TP, et al. Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop Res* 2000; 18 383-92

- [60] Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, et al. Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for a cryptic glycosaminoglycan- binding domain. *J Cell Biol* 1987; 105 1443-54
- [61] Lillie RD, Fullmer HM. Histopathologic techniques and practical histochemistry. New York: McGraw Hill 1976
- [62] Loening AM, James IE, Levenston ME, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2000; 381 205-12
- [63] Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2005; 52 3910-7
- [64] Madry H, Weimer A, Kohn D, Cucchiari M. [Tissue engineering for articular cartilage repair improved by gene transfer. Current concepts]. *Orthopade* 2007; 36 236-47
- [65] Magnuson PB. The classic: Joint debridement: surgical treatment of degenerative arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 1974; 4-12
- [66] Malicev E, Woyniak G, Knezevic M, et al. Vitamin C induced apoptosis in human articular chondrocytes. *Pflugers Arch* 2000; 440 R46-R48
- [67] Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64 460-6
- [68] Mankin HJ, Lippiello L. The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *J Clin Invest* 1971; 50 1712-9
- [69] Marshall KW, Marshall DL, Busch MT, Williams JP. Osteochondral lesions of the humeral trochlea in the young athlete. *Skeletal Radiol* 2009;
- [70] McNickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of existing cartilage repair technology. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16 196-201
- [71] Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1997; 20 525-38
- [72] Moretti M, Wendt D, Dickinson SC, et al. Effects of in vitro preculture on in vivo development of human engineered cartilage in an ectopic model. *Tissue Eng* 2005; 11 1421-8
- [73] Moretti M, Wendt D, Schaefer D, et al. Structural characterization and reliable biomechanical assessment of integrative cartilage repair. *J Biomech* 2005; 38 1846-54
- [74] Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2002; 347 81-8
- [75] Ng KW, Saliman JD, Lin EY, et al. Culture duration modulates collagen hydrolysate-induced tissue remodeling in chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2007; 35 1914-23

- [76] Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 2008; 36 2091-9
- [77] Obradovic B, Martin I, Padera RF, et al. Integration of engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 2001; 19 1089-97
- [78] Ozsoy MH, Aydogdu S, Taskiran D, et al. The effects of early or late treatment of osteochondral defects on joint homoeostasis: an experimental study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;
- [79] Pandini G, Frasca F, Mineo R, et al. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 2002; 277 39684-95
- [80] Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54 1135S-40S
- [81] Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, et al. Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med* 2007;
- [82] Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, et al. Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19 2029-38
- [83] Peterson L. Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthop Belg* 1996; 62 Suppl 1 196-200
- [84] Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000; 212-34
- [85] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284 143-7
- [86] Reindel ES, Ayrosa AM, Chen AC, et al. Integrative repair of articular cartilage in vitro: adhesive strength of the interface region. *J Orthop Res* 1995; 13 751-60
- [87] Reines BP. Is rheumatoid arthritis premature osteoarthritis with fetal-like healing? *Autoimmun Rev* 2004; 3 305-11
- [88] Resinger C, Vecsei V, Marlovits S. [Therapeutic options in the treatment of cartilage defects. Techniques and indications]. *Radiologe* 2004; 44 756-62
- [89] Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002; 89 338-51
- [90] Ronziere MC, Farjanel J, Freyria AM, et al. Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5 205-14

- [91] Rosenberg L, Hunziker EB. Cartilage Repair in Osteoarthritis: The Role of Dermatan Sulfate Proteoglycans. In: K Kuettner, V Goldberg. *Osteoarthritis and Disorders*. American Academy of Orthopaedic Surgeons 1995
- [92] Rotter N, Ung F, Roy AK, et al. Role for interleukin 1alpha in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-polylactic acid scaffolds. *Tissue Eng* 2005; 11 192-200
- [93] Rudert M, Wirth CJ. [Cartilage regeneration and substitution]. *Orthopade* 1998; 27 W309-W321
- [94] Sah RL, Yang AS, Chen AC, et al. Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 1997; 15 197-203
- [95] Schmidt M, Weidler C, Naumann H, et al. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 R938-R948
- [96] Schmidt M, Weidler C, Naumann H, et al. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 R938-R948
- [97] Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14 403-12
- [98] Schumann D, Kujat R, Nerlich M, Angele P. Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2006; 16 S37-S52
- [99] Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75 532-53
- [100] Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15 411-8
- [101] Stabler TV, Kraus VB. Ascorbic acid accumulates in cartilage in vivo. *Clin Chim Acta* 2003; 334 157-62
- [102] Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 1999; 28 26-32
- [103] Straub RH, Gunzler C, Miller LE, et al. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002; 16 993-1000
- [104] Straub RH, Konecna L, Hrach S, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 2012-7

- [105] Takahashi Y, Corvol MT, Tsagris L, et al. Testosterone metabolism in prepubertal rabbit cartilage. *Mol Cell Endocrinol* 1984; 35 15-24
- [106] Temple MM, Bae WC, Chen MQ, et al. Age- and site-associated biomechanical weakening of human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15 1042-52
- [107] Temple MM, Xue Y, Chen MQ, Sah RL. Interleukin-1alpha induction of tensile weakening associated with collagen degradation in bovine articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2006; 54 3267-76
- [108] Tognana E, Chen F, Padera RF, et al. Adjacent tissues (cartilage, bone) affect the functional integration of engineered calf cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13 129-38
- [109] Trattnig S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, et al. Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2005; 23 779-87
- [110] Trickey TR, Lee M, Guilak T. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Orthop Res* 2000; 18 891-8
- [111] Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 235-8
- [112] Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003; 11 421-30
- [113] Verschure PJ, Marle JV, Joosten LA, et al. Localization of insulin-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan synthesis and content. *Br J Rheumatol* 1996; 35 1044-55
- [114] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10 199-206
- [115] Wang J, Elewaut D, Hoffman I, et al. Physiological levels of hydrocortisone maintain an optimal chondrocyte extracellular matrix metabolism. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 61-6
- [116] Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25 254-72
- [117] Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E. Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res* 1996; 14 424-32
- [118] Yoshioka M, Kubo T, Coutts RD, Hirasawa Y. Differences in the repair process of longitudinal and transverse injuries of cartilage in the rat knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6 66-75
- [119] Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro. *J Orthop Res* 2005; 23 433-9

## 9 Lebenslauf

### C U R R I C U L U M V I T A E

PERSÖNLICHE DATEN: Wolfgang Stosiek  
Brunhuberstr. 4b  
93053 Regensburg  
e-mail w.stosiek@gmx.de  
Geboren 30.05.1980 in Amberg  
Konfession Römisch-katholisch  
Familienstand ledig  
Nationalität Deutsch

---

#### BERUFLICHER

##### WERDEGANG:

Seit 01/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie, Orthopädie und Sportmedizin im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg  
04/2008 - 12/2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg

##### HOCHSCHULSTUDIUM:

10.12.2007 Approbation als Arzt  
27.02.2006 - 28.01.2007 Praktisches Jahr an der Universität Regensburg  
27.02.2006 - 18.06.2006 Innere Medizin am Klinikum Passau  
19.06.2006 - 08.10.2006 Chirurgie am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg  
09.10.2006 - 28.01.2007 Orthopädie am Universitätsklinikum Regensburg  
07.04.2003 – 04.12.2007 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
15.10.2007 – 04.12.2007 Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)

01.10.2000 - 07.02.2003 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der  
Universität Regensburg  
02.04.2003 Ärztliche Vorprüfung

**SCHULBILDUNG:**

1990-1999 Werner-von-Siemens Gymnasium in Regensburg  
(Abitur 1999)  
1986-1990 Grundschule am Sallerner Berg, Regensburg

**ZIVILDIENST**

1999 - 2000 Zivildienst im Zentral-OP im Krankenhaus der Barmherzigen  
Brüder Regensburg

---

**DISSERTATION:**

Publikation: Englert C, Blunk T, Fierlbeck J, Kaiser J, Stosiek W, Angele P, Hammer J, Straub RH: “*Steroid hormones strongly support bovine articular cartilage integration in the absence of interleukin-1beta.*” Arthritis and Rheum. 2006 Dec; 54(12):3890-7

Vortrag: „*Einfluss der Kultivierungsdauer und Ascorbinsäurekonzentration auf die Integration von geziichtetem und nativem Gelenkknorpel*“ (Experimentelles Forum – Tissue Engineering) Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie DGU 02.10. – 06.10.2006 Berlin

---

**BERUFSBEZOGENE PRAKTIKA UND AUSLANDSPRAKTIKA:**

28.07.2003 – 22.08.2003 Famulatur *Anästhesie und Notfallmedizin* Evangelisches  
Krankenhaus Regensburg  
15.09.2003 – 19.10.2003 Praxis Famulatur *Orthopädie* Gemeinschaftspraxis  
Ascher/Ertelt Regensburg

16.08.2004 – 12.09.2004	Medical clerkship <i>Cardiothoracic surgery</i> Royal Prince Alfred Hospital / University of Sydney / Australia
14.02.2005 – 06.03.2005	Famulatur <i>Radiologie</i> am Universitätsklinikum Regensburg
07.03.2005 – 06.04.2005	Famulatur <i>Unfallchirurgie</i> am Universitätsklinikum Regensburg
29.08.2005 – 18.09.2005	Praxis Famulatur <i>Kardiologie</i> bei Dr. med. Rohde (Internist) Regensburg

---

***SONSTIGE UNIVERSITÄTSPRAKTIKA:***

10.04.2003-10.07.2003	Sportmedizin I, Universität Regensburg
23.10.2003-12.02.2003	Sportmedizin II, Universität Regensburg
01.04.2005-30.09.2005	Propädeutik der Akupunktur Teil 1, Universität Regensburg
01.10.2005-31.03.2005	Propädeutik der Akupunktur Teil 2, Universität Regensburg

---

***VORTRÄGE:***

2005 - 2007	Semestervortag Sportmedizinkurs: „ <i>Leistungsdiagnostik und Laktatmessung</i> “
06.2006	Abteilungsinterne Weiterbildung Abteilung für Unfallchirurgie Barmherzige Brüder Regensburg (PJ): „ <i>Die Biomechanik des proximalen Femur</i> “
07.09.2007	Sportmedizinisches Herbstseminar Bad Abbach „ <i>Leistungsdiagnostik und Trainingssteuerung im Breitensport</i> “

## 10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Nerlich für die Bereitstellung und großzügige finanzielle Unterstützung unserer Forschungsarbeiten in seiner Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. Die Teilnahme an den Unfallchirurgischen Forschungwochenenden aufgrund seiner Einladungen waren für mich wissenschaftlich aber auch für meinen weiteren beruflichen Werdegang formend. Über das Promotionsthema hinaus ging meine Arbeit als studentischer Koordinator der Sportmedizin Vorlesung, die ich unter seiner Leitung mit Kommilitonen 5 Semester lang mitorganisieren durfte. Diese Arbeit und die Vertiefung in die Leistungsdiagnostik mit dem Vortrag auf dem Sportmedizinischen Symposium der Unfallchirurgie haben mich für meinen weiteren beruflichen Werdegang inspiriert und werden mich auch im Weiteren motivieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn PD Dr. med. C. Englert für die Überlassung des Themas der Promotion, die umfassende Unterstützung und Betreuung in den letzten Jahren während der erfolgreichen Umsetzung der Arbeit und der Autorenschaft auf mehreren Publikationen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei ihm für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Promotion auf dem Deutschen Unfallchirurgen- und Orthopädenkongress vorstellen durfte, wobei er mich weit über die Aufgaben eines Betreuers hinaus unterstützt hat. Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. med. Englert dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Laktatmessung für den Sportmedizinkurs der Universität Regensburg durchzuführen, einen Vortrag auf einem Sportmedizinkongress zu halten und mein Wissen auf diesem Gebiet zu erweitern. Zuletzt möchte ich mich noch für die Freundschaft bedanken, die in den Jahren der Zusammenarbeit entstanden ist und für die gemeinsamen sportlichen Aktivitäten, für die er trotz der vielfältigen Aufgaben eines universitären unfallchirurgischen Oberarztes und Familienvaters Zeit fand.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Torsten Blunk von der Abteilung für Pharmazeutische Technologie an der Universität Regensburg für die Züchtung der TE-Konstrukte und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz entscheidender Teil meiner Arbeit war die mechanische Auswertung der Integrationsproben, die von der Abteilung für Biomechanik an der Fachhochschule Regensburg von Dipl. Ing. Johann Fierlbeck unter der Leitung von Prof. Joachim Hammer organisiert wurde. Die Vermessung der Integrationsfläche und die Fluoreszenzmikroskopie zur Vitalitätstestung der Knorpelproben wurde ebenfalls dort durchgeführt. Vielen Dank an das ganze Team und an Herrn Fierlbeck für die technische Unterstützung und die umfangreiche Hilfe bei der Auswertung der Daten.

Zudem danke ich dem Laborleiter Dr. rer. nat. R. Kujat und seinen MTAs (Daniela, Tanja, Tom, Ulrike), sowie den Doktoranden (Julia, Sabine, Sabine, Philipp) für die gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem Mitstreiter Achim Benditz bedanken, mit dem die vielen gemeinsamen Stunden im Labor erträglicher waren, für die gegenseitige Unterstützung und für die gute Freundschaft.

Mein Dank gilt auch Birgit Weber für die moralische und technische Unterstützung beim Formatieren der Promotion.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich das ganze Studium lang unterstützten, mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und somit diese Dissertation erst ermöglichten.