**Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe –
Mechanische Stimulation in der In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sven Nebelung

aus

Schönebeck

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Ralf Müller-Rath

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Hans Clusmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1) Einleitung: Hintergrund	1
2) Grundlagen	2
2.1) Hyaliner Knorpel - Anatomie, Physiologie und Funktion	2
2.2) Klassifikation von Knorpeldefekten	4
2.3) Ätiologie und Epidemiologie von Knorpeldefekten	5
2.4) Pathogenese von Knorpeldefekten	6
2.5) Therapie von Knorpeldefekten	8
2.5.1) Konservative Behandlung	8
2.5.2) Operative Behandlung	10
2.5.2.1) Nicht-regenerative Verfahren	10
2.5.2.2) Regenerative Verfahren	11
2.5.2.3) Gewebeersatzverfahren: Osteochondraler Autograft	13
2.5.3) Verfahren des Tissue Engineering	15
2.5.3.1.1) Tissue Engineering - Definition	15
2.5.3.1.2) Tissue Engineering von Knorpelgewebe - Allgemeines	15
2.5.3.2) Tissue Engineering zur Knorpeldefektdeckung:	16
ACT (Autologe Chondrozytentransplantation)	16
2.5.3.3) Tissue Engineering zur Knorpeldefektdeckung:	19
MACT (Matrix-gekoppelte Autologe Chondrozytentransplantation)	19
2.6) Mechanische Stimulation in der In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten	28
2.6.1) Allgemeine Aspekte der Stimulation von Knorpelersatzgewebe	28
2.6.2) Bioreaktorsysteme im Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe	29
2.6.2.1) Bioreaktorsysteme zur Applikation von Scherkräften	30
2.6.2.2) Bioreaktorsysteme zur Perfusion von Knorpelregeneratgewebe	31
2.6.2.3) Bioreaktorsysteme zur Applikation von hydrostatischem Druck	33
2.6.2.4) Kompressionsbioreaktorsysteme	35
3) Ziele und Fragestellungen	45
4) Material und Methoden	48
4.1) Patientengut	48
4.2) Gewinnung der humanen Chondrozyten	48
4.3) Herstellung des zellbesiedelten Kollagen-Gels	49
4.4) Vorstellung des neuen Kompressionsbioreaktorsystems	51
4.5) Kultivierung der Zell-besiedelten Kollagen-Matrizes im Bioreaktor	53
4.6) Aufarbeitung der Proben	55
4.6.1) Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	55
4.6.2) Molekularbiologische Untersuchungen	58
4.6.3) Biomechanische Untersuchungen	59
4.6.4) Statistische Untersuchungen	61
5) Ergebnisse	63
5.1) Histologisch-immunhistochemische Eigenschaften des Knorpelersatzgewebes	63
5.1.1) Typ-II-Kollagen	63
5.1.2) Typ-I-Kollagen	67

	II
5.1.3) Apoptose und Proliferation	68
5.1.4) Hämalan und Safranin O	69
5.2) Zelluläre Genexpression in Knorpelersatzgewebe	72
5.2.1) Typ-II-Kollagen-Genexpression	72
5.2.2) Typ-I-Kollagen-Genexpression	74
5.2.3) Col-II/Col-I-Quotient	75
5.2.4) Aggrecan-Genexpression	77
5.2.5) MMP-13-Genexpression	78
5.2.6) Weitere Untersuchung des Genexpressionsniveaus	80
5.3) Auswirkungen von zyklischer mechanischer Kompression auf biomechanische Eigenschaften von in-vitro-generiertem Knorpelersatzgewebe	82
6) Diskussion	84
6.1) Mechanostimulation als stimulatorischer Mechanismus	84
6.1.1) Uneinheitlichkeit der zellulären Antwort	85
6.1.2) Typ-II-Kollagen	86
6.1.3) Aggrecan	87
6.1.4) Typ-I-Kollagen	88
6.1.5) MMP-13	90
6.1.6) Biomechanik	91
6.1.7) Weitere zelluläre Funktionen: Apoptose, Proliferation und Zellmorphologie	93
6.2) Typ-I-Kollagen-Hydrogel als zelltragende Matrix	94
6.2.1) Allgemeine Aspekte von Matrices in der Knorpelregeneration	94
6.2.2) Typ-I-Kollagenmatrices in der Knorpelregeneration	95
6.3) Vorgeschiedigter Knorpel als Zellquelle	98
6.4) Kultivierungs- und Stimulationsprotokoll	99
6.4.1) Einsiedlungsdichte	99
6.4.2) Sauerstoff-Gehalt	100
6.4.3) Zeitdauer	100
6.4.4) Untersuchung der zellulären Syntheseleistung	101
6.4.5) Stimulationsparameter	101
6.5) Fazit	102
7) Zusammenfassung	104
8) Abstract	105
9) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	106
10) Literaturverzeichnis	108
11) Danksagung	125
12) Erklärung zur Datenaufbewahrung	126
13) Lebenslauf	127

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AGC	Aggrecan
AK	Antikörper
cDNA	copy-DNA
Col-I, Col-II	Typ-I-Kollagen, Typ-II-Kollagen
CO ₂	Kohlendioxid
Δ („delta“)	relative Änderung
d	„day“, Tag
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribunucleinsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glykosaminoglykan
h	„hour“, Stunde
HA	Hyaluronsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HS	Humanserum
Hz	Hertz, SI-Einheit der Frequenz, 1 Hz = 1/s
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
M	molar, mol/l
MACT	Matrix-gekoppelte autologe Chondrozytentransplantation
min	„minute“, Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-RNA („Boten-RNA“)
N	Newton, SI-Einheit der Kraft
O ₂	Sauerstoff
OD	Osteochondritis dissecans
P	Patientennummer
p	p-Wert, „probability“, statistische Wahrscheinlichkeit
Pa	Pascal, SI-Einheit des Drucks, 1 Pa = 1 N/m ²

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	„pre-cultivation“, Ausgangswert
PCS	„post-cultivation stimulated“, Wert in Stimulationsgruppe
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCU	„post-cultivation unstimulated“, Wert in Kontrollgruppe
PG	Proteoglykan
PLA	„polylactic acid“, Polylactide
PGA	„polyglycolic acid“, Polyglycolide
q	Quotient der relativen Änderungen
rtPCR	Real-Time-Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
Spannung (Mechanik)	Kraft pro Flächeneinheit (z. B. N/mm ²)
TEP	Totalendoprothese
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	Units
VKB	Vorderes Kreuzband
w	„week“, Woche
x	x-fache Objektivvergrößerung

Präfixe

M	mega (Präfix für Maßeinheit mit Faktor 10 ⁶)
k	kilo (Präfix für Maßeinheit mit Faktor 10 ³)
m	milli (Präfix für Maßeinheit mit Faktor 10 ⁻³)
μ	micro (Präfix für Maßeinheit mit Faktor 10 ⁻⁶)

1) Einleitung: Hintergrund

Artikulärer Knorpel ist ein komplexes Konstrukt, dessen biomechanische Eigenschaften von Struktur und Aufbau des Gewebes abhängen. Der Umstand, dass Knorpelläsionen weder spontan noch effizient regenerieren und zudem häufig sind, macht eine spezifische Therapie, gegebenenfalls auch chirurgisch, notwendig. Verschiedene Techniken der Knorpelregeneration sind ersonnen, erprobt, verworfen oder etabliert worden, sodass gegenwärtig einige etablierte Therapiemodalitäten zur Behandlung von chondralen oder osteochondralen Läsionen zur Verfügung stehen. Dieses Spektrum ist durch Techniken des Tissue Engineering in den vergangenen zwei Dekaden um neue Perspektiven und Ansätze bereichert worden, die sich Verbesserungen sowohl hinsichtlich der Gewebemorphologie als auch der biochemischen und biomechanischen Eigenschaften des Knorpelregenerates zum Ziel gesetzt haben. Das Grundprinzip des Tissue Engineering, Gewebe in seinen strukturellen und morphologischen Eigenschaften durch zelluläre Matrixsynthese zu rekonstituieren, ließ sich ebenfalls auf die Regeneration von hyalinem Knorpel übertragen. Für die klinische Anwendung wurde somit das Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) entwickelt, das mittlerweile mehrfach modifiziert worden ist. Eine entscheidende Weiterentwicklung ist hierbei die MACT (Matrix-gekoppelte Autologe Chondrozytentransplantation), bei der Zell-besiedelte Matrices der Knorpeldefektdeckung dienen.

Schwächen auch der aktuellen MACT-Generation, z.B. die nicht gegebene initiale mechanische Belastbarkeit des Implantates und die Entstehung eines mechanisch und biologisch nicht vollwertigen funktionellen Knorpelregenerates, verdeutlichen den Optimierungsbedarf dieses viel versprechenden Verfahrens.

Ein Ansatz ist dabei, die verwendeten Zell-besiedelten Biomaterialien durch mechanische Stimulation in ihren Regenerateigenschaften zu verbessern. Mechanostimulation in Form von zyklischer kompressiver Belastung hat sich dabei als potente Methode der Modulation von zellulären Prozessen erwiesen und bildet daher das Fundament dieser Arbeit.

2) Grundlagen

2.1) Hyaliner Knorpel - Anatomie, Physiologie und Funktion

Hyaliner Knorpel ist ein bradytrophes Gewebe, das sich durch die Eigenschaften Hypozellularität, Avaskularität, Aneuralität und Alymphatizität auszeichnet (Buckwalter et al., 1998; Buckwalter et al., 1998). Makroskopisch erscheint Knorpel im nativ-unfixierten Zustand als weißlich-transparentes, druckresistentes Gewebe mit glatter Oberfläche und homogen-glasiger Schnittfläche. Mikroskopisch kommen neben der Knorpelgrundsubstanz (Extrazellulärmatrix, EZM) vereinzelte Knorpelzellen (Chondrozyten) zur Darstellung. Diese nehmen ca. 5 bis 10 % des Gewebevolumens ein (Bruckner et al., 1994; Archer et al., 2003; Hall et al., 2003), sind reich an Zellorganellen und synthetisieren die Makromoleküle der sie umgebenden Matrix. In Ermangelung direkter Kontakte oder Verbindungen der Chondrozyten untereinander (Kuettner et al., 1982) erfolgt die interzelluläre Kommunikation ausschließlich über die Extrazellulärmatrix (Kuettner, 1992).

Die Extrazellulärmatrix besteht hauptsächlich aus Wasser mit Elektrolyten, Kollagenen und Proteoglykanen, deren Verhältnis und Interaktion maßgeblich die viskoelastischen Eigenschaften und damit die Druck- und Biegungselastizität des Knorpelgewebes bestimmen (Harris et al., 1972; Mauck et al., 2003). Die Kollagenfibrillen setzen sich vor allem aus Typ-II-Kollagen zusammen, in geringen Mengen kommen aber auch die Typen VI, IX, X und XI vor (Buckwalter et al., 1998). Durch Bildung eines faserartigen Netzes werden erstens die Chondrozyten mechanisch fixiert und geschützt, zweitens die Makromoleküle des Knorpels gebunden und drittens die Verankerung des Knorpels an der subchondralen Knochenlamelle gewährleistet (Kuettner, 1992; Dijkgraaf et al., 1995).

Das dominierende Proteoglykan (PG) des Knorpels ist Aggrekan (AGC), das aus einem Proteinfaden mit zahlreichen kovalent gebundenen Glykosaminoglykanketten (GAG), primär Chondroitin- und Keratansulphaten, besteht und mithilfe von Hyaluronsäure (HA) zu großen Proteoglykan-Aggregaten zusammengesetzt ist (siehe Abb. 1).

Unter funktionellen Gesichtspunkten bedingt die Vernetzung der Kollagenfibrillen mit den Proteoglykanen ein hydrodynamisches Dämpfungssystem, das die bei Belastung auftretenden Kompressionskräfte absorbiert, verteilt und an den Knochen fortleitet.

Die Glykosaminoglykane binden durch ihre negative Ladung v.a. Natrium-Kationen und besitzen somit eine hohe Wasserbindungskraft. Das Wasser ist unter einem Quelldruck von ca. 0,3 MPa im Kollagennetzwerk eingeschlossen (Maroudas, 1976). Bei mechanischer Kompression wird das gebundene Wasser in weniger komprimierte Extrazellulärmatrix-Anteile und den Gelenkraum ausgepresst. Bei Dekompression kommt es durch negative GAG-Ladungen und hohen osmotischen Druck zu einem Flüssigkeitsrückstrom, der den hyalinen Knorpel in seine ursprüngliche Form zurückversetzt (Lu et al., 2008).

Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von hyalinem Knorpel, aus (Lu et al., 2008)

Der Aufbau der Extrazellulärmatrix lässt sich in vier Zonen unterteilen, die durch morphologische und biochemische Besonderheiten charakterisiert sind (siehe Abb. 2) (Rudert et al., 1998):

1. Superficial-/Tangentialzone (Zone I): Diese Zone weist den höchsten Kollagengehalt in Form von tangential zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen auf, die auftretenden Zugkräften entgegenwirken, trägt zur Gelenklubrikation bei und enthält spindelförmige Chondrozyten.
2. Übergangszone (Zone II): In dieser Zone zeigt sich ein zunehmender Gehalt an Proteoglykanen, zudem runden sich die Chondrozyten zunehmend ab.
3. Radiärzone (Zone III): Als breiteste Zone des hyalinen Knorpels verfügt die Radiärzone über eine säulenartige Anordnung der Chondrozyten, die höchste Proteoglykankonzentration und den niedrigsten Wassergehalt aller Zonen.

4. Zone des mineralisierten Knorpels (Zone IV): Diese Zone dient der Verankerung der Kollagenfibrillen, außerdem sind Kalziumkristalle in die Extrazellulärmatrix eingelagert, die eine Verzahnung mit dem darunter folgenden subchondralen Knochen gewährleisten.

Zwischen Zone III und IV ist eine basophile Grenzlinie (Tidemark) erkennbar.

Abb. 2: Zonen des Gelenkknorpels, aus (Rudert et al., 1998)

Aufgaben des Gelenkknorpels sind die dynamische Anpassung der artikulierenden Gelenkflächen an Druckbelastungen durch Verformung. Knorpelgewebe kann enormen Kompressions- und Scherbelastungen, bis zu einem Vielfachen des Körpergewichts, widerstehen (Seireg et al., 1975).

2.2) Klassifikation von Knorpeldefekten

Knorpelverletzungen lassen sich nach der Ausdehnungstiefe klassifizieren. *Chondrale Knorpeldefekte* sind auf das Knorpelgewebe beschränkt und involvieren, bei ansonsten erhaltener Defektumgebung, die Tidemark und den subchondralen Knochen nicht. Chondrale Defekte werden wiederum in teilschichtige (partial thickness) und vollschichtige (full thickness) Defekte eingeteilt, wobei erstere allein oberflächlich be-

grenzt sind, weitere hingegen bis an die subchondrale Lamelle reichen können. Im Gegensatz dazu penetrieren *osteochondrale Defekte* die subchondrale Knochenlamelle.

Diese grundsätzliche Einteilung hat sich im klinischen Alltag bewährt (Noyes et al., 1989; Brittberg et al., 2003), wird aber immer noch ergänzt durch die morphologische Einteilung der Defekttiefe nach Outerbridge (Outerbridge, 1961).

2.3) Ätiologie und Epidemiologie von Knorpeldefekten

In der Pathogenese von Knorpeldefekten sind Traumata, Achsfehlstellungen, Meniskusschäden, Instabilitäten, Osteochondrosis dissecans, Entzündungen, genetische Faktoren, Übergewicht, Knorpeltumoren und Mikrotraumata ätiologisch gesichert (Erggelet, 2008).

Isolierte traumatische Knorpelschädigungen sind selten, aber ein wichtiger Risikofaktor für den langfristigen Knorpelverschleiß: Eine prospektive Studie über 36 Jahre konnte nachweisen, dass erlittene Kniebinnentraumata mit Knorpeldefekten das relative Risiko einer Gonarthrose im Verlauf um den Faktor 5,17 erhöhen (Gelber et al., 2000). Eine andere prospektive Studie bei jungen Sportlern konnte zeigen, dass unbehandelte isolierte Knorpelläsionen im 14-Jahres-Follow-up zu 40 % radiologische Zeichen der Arthrose aufwiesen (Messner et al., 1996).

Nicht-traumatisch bedingte Knorpeldefekte, z.B. durch Achsfehlstellungen, Meniskusschäden, Übergewicht oder ligamentäre Instabilitäten, können zu lokaler mechanischer Überlastung eines Gelenkbereichs oder -kompartimentes führen und somit den vorzeitigen Knorpelverschleiß bedingen (Dougados et al., 1992; Felson et al., 1997; Nebelung et al., 2005; Goldring et al., 2007). Die avaskuläre Knochennekrose des subchondralen Knochens (Osteochondritis dissecans - OD) prädisponiert ebenfalls zum vorzeitigen Knorpelverschleiß: Im unbehandelten Krankheitsverlauf einer OD des Femurkondylus konnte bei Erwachsenen im mittelfristigen Follow-up die signifikant häufigere Ausprägung einer Osteoarthrose klinisch und radiologisch detektiert werden (Prakash et al., 2002). Nicht zuletzt sind entzündliche Gelenkveränderungen, z.B. im Rahmen von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, durch progressive Knochen- und Knorpelerosion und -zerstörung gekennzeichnet (Shiozawa et al., 2011).

Allen genannten Einflussfaktoren ist gemein, dass die durch sie induzierten oder begünstigten pathologischen Knorpelveränderungen zur Ausbildung eines vorzeitigen osteoarthrotischen Gelenkverschleißes prädisponieren. Trotz der multifaktoriellen Ätiologie der Arthrose ist der progrediente Knorpelverlust das zentrale pathogenetische Merkmal der Erkrankung, der schlussendlich das gesamte Gelenk betrifft (Felson et al., 2004).

Knorpelschäden sind häufig und stellen ein beträchtliches volkswirtschaftliches Problem dar. Curl et al. konnten zeigen, dass die häufigsten Lokalisationen solcher Defekte retropatellar und im Bereich des medialen Femurkondylus anzutreffen sind. 63 % der von ihnen arthroskopierten 31.516 Kniegelenke wiesen durchschnittlich 2,7 Knorpeldefekte auf (Curl et al., 1997). Bei 680.000 im Jahre 1995 in den USA durchgeführten Kniearthroskopien ergäbe dies -Behandlungsbedürftigkeit vorausgesetzt- 427.800 zu versorgende Knorpeldefekte mit einem finanziellen Gesamtvolumen von bis zu einer Milliarde US-Dollar (Brittberg et al., 2001).

2.4) Pathogenese von Knorpeldefekten

Bereits 1743 formulierte Hunter, dass Schäden des adulten hyalinen Knorpels nicht selbstständig heilen (Hunter, 1743). Rein chondrale Defekte der Knorpeloberfläche zeichnen sich durch eine Abrundung der Kanten im Verlauf aus und können durch einwandernde Synoviozyten temporär gefüllt werden (Hunziker et al., 1996; Hunziker, 2002), wobei diese kurzzeitig nachweisbare Defektdeckung durch Faserknorpel nach Jahren wieder abgetragen ist (Mankin, 1982). Selbst bei jungen Kaninchen mit hoher Regenerationskompetenz führt eine oberflächliche Knorpelläsion nicht zu adäquater Defektfüllung (Fuller et al., 1972). Klinisch sind chondrale Defekte häufig asymptomatisch, sofern die Defektumgebung noch nicht in Mitleidenschaft gezogen ist (Mankin, 1982).

Bei Verletzung der subchondralen Knochenlamelle im Rahmen eines osteochondralen Defektes bildet sich ein Blutgerinnsel in situ, wodurch pluripotenten mesenchymalen Stammzellen der Zugang zum Defekt und die nachfolgende Bildung eines osteokartilaginären Reparaturgewebes ermöglicht wird (Furukawa et al., 1980; Shapiro et al., 1993; Jackson et al., 2001). In dem entstehenden Granulationsgewebe wandeln sich Fibroblasten oder -zyten in Chondrozyten um und bilden fibröses, fibrokartilaginäres

oder hyalin-artiges Narbengewebe. Dieses Regeneratgewebe ist allerdings biochemisch und -mechanisch minderwertig, sodass sich nach sechs Monaten bereits deutliche Fibrillierungen, Fissurierungen und degenerative Veränderungen in der Hälfte aller Heilungsverläufe zeigen (Coletti et al., 1972; Furukawa et al., 1980). Das Regeneratgewebe kann den gelenktypischen mechanischen Belastungen demgemäß nicht standhalten und eine Defektausbreitung in angrenzende Gelenkareale nicht verhindern (Buckwalter, 2002). Oberflächliche Knorpelschäden verlaufen häufig progredient, da minderfunktionelles Knorpelgewebe vermehrt Kraft auf den subchondralen Knochen überleitet, dieser sekundär versteift und die weitere Schädigung des hyalinen Knorpels forciert (Repo et al., 1977; Venn et al., 1977; Torzilli et al., 1999; Ewers et al., 2001; Chen et al., 2003; Kerin et al., 2003). Neben der schädigungsnahen Lage des hyalinen Knorpelgewebes sind der avaskuläre Zustand, die Ernährung über eine lange, störungsanfällige Diffusionsstrecke und der permanente zytobiologische Ruhezustand der Chondrozyten weitere Ursachen für die ausbleibende Regeneration von Knorpelgewebe nach Schädigung (Rischke et al., 2003). Viele Autoren konnten demgemäß nachweisen, dass unbehandelte Knorpeldefekte häufig in eine sekundäre Arthrose münden (Jensen et al., 1999; Lau et al., 2000; Hunter et al., 2002).

Histopathologisch ist diese Entwicklung durch eine Störung der Extrazellulärmatrix-Integrität, zunehmende Knorpelfissurierung und Zelltod gekennzeichnet. Das gestörte Kollagenfasernetz bedingt sowohl biomechanische als auch biochemische Beeinträchtigungen der funktionellen Eigenschaften des Knorpelgewebes. Dieses weist eine veränderte biomechanische Kompressions- und Schersteifigkeit auf, einen verminderten Proteoglykan-Gehalt mit daraus resultierender erhöhter Permeabilität und generell verringerte Syntheseleistungen der verbliebenen Chondrozyten. Zudem reagiert das verbliebene Knorpelgewebe auf die mechanische Überlastung mit Veränderungen der Stoffwechselleistungen. Durch Sekretion von degradierenden Enzymen (u.a. MMPs und Hydrolasen), Polypeptiden (u.a. IL-1 und TNF- α), EZM-Adhäsionsproteinen (u.a. Proteoglykane und Integrine), Eikosanoiden (Prostaglandine, Leukotriene), Steroidhormone (Vitamin D₃), Gerinnungsfaktoren, Tripeptiden und Superoxiden wird ein Entzündungsprozess initiiert, der zur Störung der Gelenkbiologie führt (Amin et al., 1999; Tetlow et al., 1999; Attur et al., 2000; Tiku et al., 2000; Sandell et al., 2001).

Des Weiteren kommt es zu Veränderungen auf zellulärer Ebene, wobei Chondrozyten entweder in Proliferation im Sinne einer Cluster-Bildung oder Zelltod im Sinne von

Apoptose bzw. Nekrose übergehen (Martin et al., 2002). Im Gegensatz zum nicht-arthrotischen Knorpelstoffwechsel, der sich vornehmlich durch Kontrolle des Proteoglykanumsatzes auszeichnet, wird in arthrotischem Gewebe eine Reparatur des Gewebeschadens durch Steigerung der Typ-II-Kollagen- und Aggrecan-Synthese versucht (Aigner et al., 1992). Durch Kollagenfragmente scheint der Destruktionsprozess aufrechterhalten zu werden (Jennings et al., 2001). Im weiteren Verlauf sistiert die Typ-II-Kollagen- und Aggrecan-Synthese infolge der Dedifferenzierung der Chondrozyten (Rolaufts et al., 2004).

Zum anderen führt der Entzündungsprozess über den Abbau der interterritorialen Matrix zu bedeutenden EZM-Veränderungen. Neben den zu Beginn des Arthroseprozesses dominierenden Matrix-Proteoglykan- und -Aggrecan-Verlusten kommt es sukzessive zur Degeneration des Kollagennetzwerkes (Bank et al., 1997) und damit zur makroskopisch erkennbaren Schwellung und Weichheit des Knorpels. Auf biochemischer Ebene lassen sich in arthrotischem Knorpel neben atypischen Molekülen wie Tenascin und Typ-IIa- und Typ-III-Kollagen (Aigner et al., 1993) auch veränderte Kollagenexpressionsmuster nachweisen (Ronziere et al., 1990).

Mit dem Verlust von Proteoglykanen, Kollagenen und daraus resultierender Einschränkung des Wasserbindungsvermögens geht eine Veränderung der Knorpeloberfläche und -struktur einher.

Die Gelenkdegeneration schreitet in der Folge progredient bis zum subchondralen Knochen fort. Im Zuge der Manifestation der Osteoarthrose, die sich klinisch über Schmerzen, Schwellungsneigung, Ergussbildung, Blockierungen und Bewegungseinschränkungen darstellt, kommt es mit dem Verlust von hyalinem Knorpel zu einem Verlust der Funktion des betroffenen Gelenkes. Angesichts dieser Studienlage scheint eine frühzeitige therapeutische Intervention im Umgang mit Knorpeldefekten angeraten.

2.5) Therapie von Knorpeldefekten

2.5.1) Konservative Behandlung

Konservative Verfahren dienen einerseits der Reduktion des Schmerzniveaus, andererseits aber auch der Verhinderung der Defektgrößen- und -tiefenprogredienz. Zu den validierten nicht-medikamentösen Therapieansätzen zählen Gewichtsreduktion mit

Bewegungstraining, Kryo-/Wärmetherapie und Physiotherapie (Janssen, 2003). Wie aus der ätiologischen Relevanz der Adipositas für die Gonarthrose ersichtlich, reduziert eine Gewichtsabnahme einerseits das Gonarthrose-Risiko signifikant und andererseits die Beschwerdesymptomatik (Janssen, 2003). Physikalische Maßnahmen erreichen ebenfalls eine Besserung des Schmerzniveaus durch Anhebung der Triggerschwelle und Reduktion der peripheren Erregbarkeit (Janssen, 2003). Physiotherapeutische Verfahren zielen einerseits auf eine Verbesserung von Gelenkfunktion und Mobilität, andererseits auf eine Reduktion von Schmerz und Schwellung. Durch Kräftigung der gelenkübergreifenden Muskulatur wird die Gelenkbeweglichkeit und -stabilität verbessert (Deyle et al., 2000; Roddy et al., 2005).

Im Rahmen der medikamentösen Therapien finden unterschiedliche Analgetika Anwendung zur Kontrolle der Schmerzsymptomatik (Janssen, 2003; Madry et al., 2004), u.a. Nicht-steroidale Antiphlogistika, Paracetamol und Metamizol. Nach wie vor hat die intraartikuläre Steroidinjektion einen hohen praktischen Stellenwert, da vielfach -insbesondere bei aktivierten Arthrosezuständen- eine Besserung der Symptomatik zu erzielen ist (Rehart et al., 2007). Die intraartikuläre Applikation von Hyaluronsäure zur temporären Schmerzlinderung bei moderater Gonarthrose ist gut validiert (Wang et al., 2004), insbesondere hinsichtlich Beschwerdesymptomatik und Gelenkfunktion (Petrella et al., 2002). Dennoch ist ungeklärt, inwieweit sich der Langzeitverlauf der Arthrose durch Hyaluronsäure beeinflussen lässt (Rehart et al., 2007). Andere sogenannte chondroprotektive Substanzen wie Glukosamin und Chondroitinsulfat sind in ihrer Wertigkeit nicht eindeutig gesichert, dienen aber zumindest einer subjektiven Beschwerdebesserung (Madry et al., 2004).

Nicht-medikamentöse und nicht-operative Maßnahmen sind flankierend in allen Arthrosestadien hilfreich. Orthopädietechnische Hilfen wie Einlagen, Orthesen, Bandagen oder Stützen können wie Physio-, Strom-, Manual- und Balneotherapie bzw. Gelenkschonung und -entlastung beschwerdelindernd wirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die allein konservative Therapie zwar Schmerzsymptomatik und sekundäre Entzündung beseitigen oder zumindest reduzieren kann, allerdings die Gelenkfunktion nicht dauerhaft verbessern bzw. die Defektprogression verzögern kann, sodass insbesondere beim jungen Menschen häufig die Indikation zur operativen Intervention gegeben ist (Rolaufts et al., 2009).

2.5.2) Operative Behandlung

In der Folge gilt es zwischen nicht-regenerativen, regenerativen, Gewebeersatz- und Tissue-Engineering-Verfahren zu unterscheiden, die in Bezug auf die gesamte Knorpelchirurgie dargestellt werden.

2.5.2.1) Nicht-regenerative Verfahren

Die arthroskopische Lavage (Gelenkspülung) kann allein oder in Kombination mit einem arthroskopischen Debridement (mechanische Knorpelglättung, siehe Abb. 3) geschädigten Knorpels geschehen. Die alleinige Lavage führt bei 50 - 70 % der Betroffenen zu einer vorübergehenden Besserung der Symptomatik (Baumgaertner et al., 1990). Bessere und längerfristige Ergebnisse, z. T. mit 5-jähriger Schmerzfreiheit bei Arthrose, zeigte die Kombination Lavage und Debridement (Hubbard, 1996). Allerdings scheint der Therapie neben einer symptomatischen auch eine ausgeprägte psychologische Komponente innezuwohnen, denn der Erfolg eines arthroskopischen Debridements oder einer Lavage entspricht dem eines Placeboeingriffs mit Hautinzisionen, wie eine prospektiv-randomisierte Studie nachweisen konnte (Moseley et al., 2002).

Abb. 3: Debridement des geschädigten Knorpels, aus (McAdams et al., 2010)

2.5.2.2) Regenerative Verfahren

Die endogene Bildung eines fibrösen Regeneratgewebes ist Ziel dieser therapeutischen Strategien. Durch iatrogene Verletzung des subchondralen Knochens wird der Markraum eröffnet, wodurch pluripotenten Zellen der Zutritt zum Defektareal ermöglicht und die Bildung eines Regeneratgewebes initiiert werden soll.

Pridie erzeugte durch das Anbohren von denudierten Knorpelarealen (siehe Abb. 4) eine faserknorpelige Ausfüllung des Knorpeldefektes (Pridie, 1959). Am Kaninchen konnte nachgewiesen werden, dass der durch Pridie-Bohrung erzeugte hyalinartige Knorpel bereits nach einem Jahr in Bindegewebe umgewandelt war und erste degenerative Veränderungen aufwies (Mitchell et al., 1976).

Abb. 4: Pridie-Bohrung zur punktuellen Eröffnung des Markraums, aus (Rudert et al., 1998)

Die Abrasionsarthroplastik beschreibt die komplette Entfernung des degenerativ veränderten Gelenkknorpels mit Anfräsung des darunter liegenden Knochens in einer Tiefe von 1 bis 3 mm. Die zunächst offen durchgeführte Technik brachte bei 70 % der Patienten gute bis sehr gute Resultate, allerdings war eine postoperative Mobilisierung in Narkose über 3 Wochen notwendig (Magnusson, 1941). Arthroskopische Techniken erbrachten eine klare Verbesserung der Ergebnisse (Johnson, 1986). Auch im Vergleich mit dem Debridement führte die Abrasionsarthroplastik zu besseren Ergebnissen, sowohl im experimentellen Follow-up nach 12 Wochen (Kim et al., 1991) als auch im klinischen Follow-up nach 12 Monaten (Friedman et al., 1984).

Die Technik der Abrasionsarthroplastik wurde zur heute üblichen Mikrofrakturierung weiterentwickelt (Steadman et al., 1999) (siehe Abb. 5). Vor dem Hintergrund des bei der konventionellen Abrasion gegebenen Risikos der thermischen Zellnekrose und der relativ unpräzisen Perforation des subchondralen Knochens bietet der Einsatz eines Pfriems ein gutes Verfahren zur Mobilisation multipotenter Knochenmarkstammzellen ohne Entfernung von Knochenanteilen. Die Mikrofrakturierung ist mittlerweile ein Standardverfahren mit klar definierten Indikationen.

Abb. 5: Mikrofrakturierung zur Eröffnung des subchondralen Markraums, aus (Rudert et al., 1998)

Die genannten Techniken der Pridie-Bohrung, Abrasionsarthroplastik und Mikrofrakturierung basieren auf der operativen Eröffnung des subchondralen Markraums, der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und der Ausbildung von Faserknorpel, der durch eine Mischung aus Typ-I- und -II-Kollagen gekennzeichnet ist (siehe Abb. 6).

Abb. 6: Fibröses Ersatzgewebe nach Anbohrung des subchondralen Knochens (Pridie-Bohrung), aus (Steinhagen et al., 2005)

Der entstehende Faserknorpel zeigt minderwertige biomechanische und biochemische Eigenschaften, die wiederum Verschleißerscheinungen und keine langfristige Wiederherstellung der Gelenkfunktion bedingen (Buckwalter et al., 1994; Nehrer et al., 1999). Nichtsdestotrotz konnten Steadman et al. die klinische Bedeutung dieser Verfahren untermauern, da sich im 11-Jahres-Follow-up nach Mikrofrakturierung signifikant verbesserte Kniefunktionsscores (Tegner-, WOMAC-, Lysholm- und SF-36-Score) ergaben (Steadman et al., 2003).

Trotzdem ist keines der Verfahren befähigt, dauerhaft ein Gewebe zu induzieren, das den spezifischen funktionellen und biomechanischen Anforderungen eines Gelenks gerecht wird (Brittberg et al., 2001).

2.5.2.3) Gewebeersatzverfahren: Osteochondraler Autograft

Die Transplantation autogenen Knorpels zur Defektdeckung von Gelenkoberflächen ist ein altbekanntes Verfahren. Bereits 1972 stellte Wagner die orthotope Knorpel-Knochen-Transplantation durch Verpflanzung eines im hinteren Bereich des Femurkondylus gewonnenen Autografts in einen Knorpeldefekt des vorderen Femurkondylenbereichs vor (Wagner, 1972).

Die Mosaikplastik als Form der Knorpel-Knochen-Transplantation mit mosaikförmiger Einstanzung osteochondraler Zylinder kleinen Durchmessers wurde konventionell offen erstmals 1985 (Yamashita et al., 1985), arthroskopisch erstmals 1993 (Matsusue et al., 1993) durchgeführt. Die Gewebezylinder aus hyalinem Knorpel und subchondralem Knochen werden aus intakten, nicht-belasteten Gelenkarealen gewonnen und mittels Press-fit-Technik (implantatfreie Presseinpassung) anschließend in Löcher gleichen Durchmessers eingebracht, die zur Entfernung des erkrankten Knorpels gestanzt wurden (siehe Abb. 7 und 8).

Abb. 7: Mosaikplastik als Form der Knorpel-Knochen-Transplantation, aus (Rudert et al., 1998)

Nachteile der Methodik sind die notwendigen Entnahmedefekte, die begrenzte Anzahl der transplantablen osteochondralen Zylinder und die operationstechnisch anspruchsvolle Schaffung einer Kongruenz der Knorpeloberfläche.

Demgegenüber stehen einige Vorteile: Durch Transplantation von Knorpelzylindern mit kleinem Durchmesser kann die Inkongruenz vermindert und die hyaline Gelenkkontur sofort wiederhergestellt werden. Zudem ist das Verfahren einzeitig, arthroskopisch und autolog, d.h. ohne Gefahr potentieller Krankheitsübertragung, durchführbar.

Allerdings stellt die Mosaikplastik erhebliche technische Anforderungen an den Operateur, denn die Zylinder müssen passgenau in Höhe und Profil eingesetzt werden, da bereits ein Überstehen von 2 mm zu Mikrobewegungen und mikroskopischer Schädigung führt (Pearce et al., 2001). In Bezug auf die Wahl der Spenderstelle hat sich gezeigt, dass der hyaline Knorpel der Gewicht tragenden Kondylenareale am ehesten dem des medialen und lateralen Patellagleitlagers entspricht (Bartz et al., 2001).

Abb. 8: Osteochondrale Autograft-Mosaikplastik: a) Darstellung des osteochondralen Defektes am medialen Femurkondylus, b) Entnahme osteochondraler Zylinder mit einem Spezialinstrumentarium, c) Fertige Mosaikplastik, aus (Rudert et al., 1998)

Die Ergebnisse sind auch im Langzeitverlauf viel versprechend, denn im 10-Jahres-Follow-up zeigen sich in über 90 % gute bis exzellente Resultate und lediglich in 3 % relevante Donor-Site-Komorbiditäten (Hangody et al., 2003).

2.5.3) Verfahren des Tissue Engineering

2.5.3.1.1) Tissue Engineering - Definition

„Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Neuschaffung autologen Gewebes zum Ersatz oder zur Unterstützung von vorhandenen Geweben und Organen“ (Langer et al., 1993).

2.5.3.1.2) Tissue Engineering von Knorpelgewebe - Allgemeines

Hyaliner Knorpel ist ein avaskuläres und mechanokompetentes Gewebe und funktioniert daher autark. Daher wird die Qualität des im Rahmen von Tissue-Engineering-Verfahren generierten Regeneratgewebes durch externe In-vitro-Stimuli wie O₂-Partialdruck (Koay et al., 2008), biochemische Signale (Grimaud et al., 2002; Chubinskaya et al., 2007; Davies et al., 2008) und nicht zuletzt mechanische Stimulation (Kisiday et al., 2004) bestimmt.

Da Nativknorpel über vorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich des Tissue Engineering verfügt (siehe Tab. 1), setzte in den frühen 1990er Jahren eine tiefgehende wissenschaftliche Aufarbeitung ein, die in einer Vielzahl verschiedener Ansätze mündete, mittels derer die Generierung und Kultivierung funktionellen Knorpelersatzes erreicht werden sollte.

Tab. 1: Eigenschaften von Knorpel, die günstige Voraussetzungen für das Tissue Engineering von Knorpelregeneratgewebe darstellen

Knorpelgewebe hat einen klar definierten und konstanten Aufbau.
Knorpelgewebe ist avaskulär und aneural, so dass keine Notwendigkeit besteht, Blutgefäße oder Nervenstrukturen in das Regeneratgewebe einzufassen.
Knorpelgewebe besteht aus einer einzigen Zellart, die alle Syntheseleistungen auf sich bündelt.
Knorpelgewebe wird ausschließlich durch Diffusion ernährt.
Knorpelgewebe und dessen Pathologien sind ein bedeutendes klinisches Problem mit entsprechend großem wirtschaftlichem Hintergrund.

2.5.3.2) Tissue Engineering zur Knorpeldefektdeckung:

ACT (Autologe Chondrozytentransplantation)

Die ACT (Autologe Chondrozytentransplantation) ist ein gegenwärtig in spezialisierten Zentren routinemäßig durchgeführtes Verfahren, das erstmals 1994 von Brittberg et al. beschrieben wurde (Brittberg et al., 1994). Abbildung 9 stellt das ACT-Verfahren schematisch dar, Abbildung 10 die korrespondierenden intraoperativen Bilder.

In einer ersten Operation wird arthroskopisch ein kleines Knorpelstück aus einer für die Funktion nicht entscheidenden Stelle des Gelenks entnommen, entsprechende Lokalisationen stellen dabei das mediale und laterale Femoropatellargelenk und die Notch dar.

Aus dem gewonnen Knorpel werden die Chondrozyten mittels Proteasen und Kollagenasen isoliert und in Monolayerkulturen über zwei bis sechs Wochen vermehrt.

Der zweite Schritt der konventionellen ACT nach Brittberg erfordert die Arthrotomie des Gelenks. Nach Präparation des Knorpeldefektes durch Begradigung der Defektränder wird das Defektareal durch einen Periostlappen (aus der proximalen Tibia) be-

deckt (Brittberg et al., 1994). Durch Fibrinkleber wird der Periostlappen randständig abgedichtet und bildet einen abgeschlossenen Raum, in den die Chondrozytensuspension eingegeben wird.

Abb. 9: Verfahren der ACT nach Brittberg-Schema, aus (Brittberg et al., 1994)

Abb. 10: OP-Bilder zur ACT: Fokaler chondraler Defekt des medialen Femurkondylus rechts vor (A) und nach Präparation (B), Zustand nach Periostdeckung, Zellimplantation und Fibrinkleberversiegelung (C), aus (Alford et al., 2005)

Die konventionelle ACT nach Brittberg führt zur Ausbildung von hyalinartigem Knorpelgewebe im Defektareal (Buckwalter, 1998; Peterson et al., 2000). Hyalinartiger Knorpel ist in diesem Zusammenhang definiert als positiver Typ-II-Kollagen- und negativer Faserknorpelnachweis im Neoknorpelgewebe (Peterson et al., 2000). Allerdings konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass das Regeneratgewebe, das sich nach konventioneller ACT-Behandlung bildet, Faserknorpel ähnlicher ist als hyalinem Gelenkknorpel (Brittberg, 1999; Horas et al., 2003; Roberts et al., 2003; Grigolo et al., 2005; Tins et al., 2005).

Knutsen et al. konnten grundlegende Erkenntnisse zur klinischen Wertigkeit der ACT in einer randomisierten Studie mit 5-Jahres-Follow-up gewinnen (Knutsen et al., 2007): Erstens entspricht der erhaltene hyalinartige Knorpel nach ACT weder klinisch noch histologisch hyalinem Knorpel. Zweitens weisen Patienten, deren Defektareal zwei Jahre postoperativ hauptsächlich hyalinartig gedeckt war, auch nach fünf Jahren kein Therapieversagen auf. Drittens zeigen die Patienten, deren Defektareal wenig hyalin gedeckt war, nach fünf Jahren signifikant häufiger erhebliche radiologische Arthrose-Zeichen.

Der hyalinartige Knorpel nach ACT bleibt in Bezug auf biomechanische Eigenschaften hinter hyalinem Nativknorpel zurück (Vasara et al., 2005). Eine weitere arthrotische Degeneration wird zumindest bei einem Teil der Patienten mehr aufgeschoben denn aufgehoben, was auch die Ergebnisse Knutsens, der bei einem Drittel der ACT-Patienten im 5-Jahres-Verlauf Arthrosezeichen beobachtete, erklären würde.

Im Vergleich zu den bereits vorgestellten Methoden konnten Bentley et al. in einer prospektiv-randomisierten Studie nachweisen, dass die ACT hinsichtlich eines besseren Outcomes der Mosaikplastik überlegen ist (Bentley et al., 2003). Immer noch Gegenstand kontroverser Diskussion ist die Frage, ob der hyalinartige Knorpel nach ACT dem Faserknorpel nach Mikrofrakturierung überlegen ist (Breinan et al., 2000; Knutsen et al., 2007; Richter, 2007; Brittberg, 2008; LaPrade et al., 2008; Saris et al., 2008).

Weitestgehende wissenschaftliche Einigkeit herrscht aber über die Indikationsstellung: Junge Patienten mit fokal-umschriebenem, vollschichtigem Defektareal, intaktem Knorpel in der Umgebung des Defektes und an der korrespondierenden Gelenkfläche stellen nach momentanem Kenntnisstand die optimale Indikation für die konventionelle ACT dar. Dabei stellt die Femurkondyle die Lokalisation dar, die die besten Resultate in der ACT-Therapie zeigt (Niemeyer et al., 2007).

Gleichwohl weist die konventionelle ACT einige Probleme auf, die gegenwärtig noch nicht gelöst sind (Behrens et al., 2004): Zum einen bedarf es einer langstreckigen Arthrotomie, die im Vergleich zu arthroskopischen Verfahren mit einer höheren intra- und postoperativen Morbidität assoziiert ist. Durch den offenen Eingriff und die zeitliche Dauer des Aufnähens des Periostlappens droht der gesunde Knorpel auszutrocknen und Schaden zu nehmen. Zudem kann der aufgenähte Periostlappen hypertrophieren (Henderson et al., 2006; Kreuz et al., 2007). Die chirurgische Präparation des Defektes bedingt einen Zellverlust im Defektrandbereich (Hunziker et al., 2003), der wiederum das Einwachsen des Neoknorpels in den Defektrand erschwert. Weitere Probleme sind neben Periosthypertrophie auch Periostdelaminierung, die Notwendigkeit einer Revisionsarthroskopie in 4,8 bis 60 % der Fälle, die Begrenzung der zu versorgenden Defektgröße und die Morbidität an der Periostentnahmestelle (Nehrer et al., 1999).

Trotz der angesprochenen Probleme bleibt die ACT das momentan einzige biologische Verfahren mit befriedigenden Ergebnissen in 77 % der Patienten im 5-Jahres-Follow-up (Knutsen et al., 2007).

2.5.3.3) Tissue Engineering zur Knorpeldefektdeckung:

MACT (Matrix-gekoppelte Autologe Chondrozytentransplantation)

2.5.3.3.1) Rationale für MACT-Verfahren

Die modernen Methoden des Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe stellen eine Weiterentwicklung der ACT dar.

Da Chondrozyten in ihrer physiologischen Umgebung von einer dreidimensionalen Kollagen-Proteoglykan-Matrix umgeben sind, wird die Beobachtung, dass zweidimensionale Kultur wie bei klassischer ACT zu zellmorphologischer und -funktioneller Dedifferenzierung und vermehrter Typ-I-Kollagen-Synthese führt (Schnabel et al., 2002), erklärbar. Werden die gewonnenen Chondrozyten allerdings in eine dreidimensionale Matrix eingebracht, so verlangsamt sich der Dedifferenzierungsprozess und eine vorhandene Dedifferenzierung wird teilweise rückgängig gemacht (Domm et al., 2002). Aktuelle Techniken der Behandlung von Knorpeldefekten basieren deshalb auf der Implantation zellbesiedelter dreidimensionaler Matrices. Idee ist demnach die Knorpel-

defektdeckung durch Implantation eines Konstruktes aus vitalen Chondrozyten und avitaler Matrix, deshalb die Bezeichnung „Matrix-gestützte autologe Chondrozytentransplantation“ (MACT). MACT-Verfahren sind im Vergleich zu den vorgenannten Verfahren durch einige Vorteile gekennzeichnet. Zum einen schließt die Transplantation autologer Zellen eventuelle Krankheitsübertragungen aus, zum anderen ist die exakte intraoperative Anmodellierung des Zell-besiedelten Konstruktes in das Defektareal möglich (Jacobi et al., 2011). Insbesondere Hydrogele erzielen zudem eine homogene Zelldurchmischung und ermöglichen die Herstellung eines primärstabilen Transplantates jeder gewünschten Dicke und Größe (Andereya et al., 2006). Vorteilhaft ist außerdem die reduzierte zelluläre Dedifferenzierung durch Einbettung der Chondrozyten in eine Trägermatrix (Benya et al., 1982). In Bezug auf chirurgische Anwenderaspekte ist die nicht notwendige Annahme einer maßgeblichen operativen Vereinfachung. In Bezug auf die Chondrozytenzellzahl lässt sich dennoch durch In-vitro-Kultivierung die optimale Zellzahl generieren (Muller-Rath et al., 2007). Nicht zuletzt ermöglichen MACT-Verfahren eine Zwischenstimulation wie beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Studie.

2.5.3.3.2) Praktische Aspekte der MACT-Verfahren

Bei der MACT werden analog zur ACT in einem ersten operativen Schritt Knorpelproben an einem mechanisch weniger belasteten Areal des Gelenkes entnommen. Die autologen Chondrozyten werden anschließend wiederum aus der Extrazellulärmatrix des originären Knorpels enzymatisch herausgelöst und entweder ohne weitere Prozessierung in die dreidimensionale Matrix eingebettet oder zuerst in vitro kultiviert, eventuell anderweitig vorbehandelt und erst dann in eine Trägermatrix eingesiedelt. Entweder in der gleichen Sitzung oder in einem zweiten operativen Schritt wird die Chondrozyten-besiedelte Trägermatrix in das Defektareal eingebracht (siehe Abb. 11).

Abb. 11: Intraoperative Bilder zur Veranschaulichung des MACT-Verfahrens, bei dem zunächst ein Debridement des Knorpeldefektes vorgenommen wird (a), anschließend werden Fibrinkleber (b) und die Zell-besiedelte Matrix (c) in das Defektbett eingebracht, aus (Schulz et al., 2007)

2.5.3.3.3) Rolle der Matrix bei MACT-Verfahren

2.5.3.3.3.1) Allgemeine Aspekte

Gegenstand der wissenschaftlichen Auseinandersetzung ist nach wie vor das durch Zellen zu besiedelnde Trägermaterial, das die vielfältigen Funktionen der Extrazellulärmatrix übernehmen soll. Die Extrazellulärmatrix macht hyalinen Knorpel zu einem autark funktionierenden Gewebe und hat neben der mechanischen Funktion eine hohe Bedeutung für den Stoffwechsel chondrogener Zellen: Die Extrazellulärmatrix beeinflusst das Differenzierungsverhalten der Chondrozyten, verändert durch spezielle Matrixmoleküle und -interaktionen die zelluläre Genexpression und beinhaltet eine Vielzahl an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Gaissmaier et al., 2003). Die Matrix-Trägermaterialien können entweder aus synthetischen oder natürlichen Materialien bestehen und als Hydrogel eher flüssig-viskösen bzw. als Scaffold eher fest-porösen Charakter haben. Die unterschiedlichen Materialien bzw. Matrices werden im Folgenden kurz vorgestellt.

2.5.3.3.3.2) Synthetische Matrices

Zur Gruppe der synthetisch hergestellten Biomaterialien gehören z.B. PLA/PGA-Polymere. Diese einzeln oder in Kombination benutzten Polymere sind Verbindungen auf Basis von Milch- (polylactic acid, PLA) oder Glykolsäure (polyglycolic acid, PGA). Vorteile dieser Materialien sind die durch den Fertigungsprozess beliebig variierbare Festigkeit und Materialarchitektur. Dem gegenüber stehen einige Probleme, denn es kommt zu einer raschen Dedifferenzierung der Chondrozyten, zu einer geringen Zell-

adhäsion auf den Polymerfasern und zu einem durch verminderte Retentionsfähigkeit bedingten Diffusionsverlust von de novo synthetisierten Matrixmolekülen in das Kulturmedium. Dazu entstehen bei der Resorption von PLA/PGA Degradationsprodukte, die sowohl den lokalen pH-Wert herabsetzen als auch zytotoxisch und pro-inflammatorisch wirken (Gaissmaier et al., 2003). Vor dem Hintergrund der geringen Biokompatibilität werden die PLA/PGA-Matrizes von einigen Autoren trotz guter In-vitro-Ergebnisse als Trägermaterial für die biologische Knorpelrekonstruktion nicht empfohlen (Hunziker, 2002; Aicher et al., 2003).

2.5.3.3.3) Natürliche Matrizes

2.5.3.3.3.1) Polysaccharidbasierte Matrizes

Die Gruppe der Polysaccharidbasierten Biomaterialien umfasst Hyaluronsäure-, Alginat-/Agarose- und Fibrinmatrizes.

Hyaluronsäure ist ein physiologischer Bestandteil der Knorpelextrazellulärmatrix, der Makromoleküle mit hohem Molekulargewicht ausbilden kann. Daher ist Hyaluronsäure in hohem Maße biokompatibel (Goa et al., 1994). Allerdings weisen Hyaluronsäurebasierte Trägermatrizes chirurgisch nicht ausreichende Primärstabilität auf. Erst die Querveresterung mit Alkoholen macht Hyaluronsäure zu einem Trägermaterial mit geeigneten strukturellen und physikalischen Eigenschaften, allerdings auf Kosten der Biokompatibilität (Barbucci et al., 2000). Veresterte Hyaluronsäurematrizes als MACT-Trägermaterial konnten sowohl in der tierexperimentellen als auch in der humanen Anwendung die Regeneration von hyalinartigem Knorpel erreichen (Grigolo et al., 2001; Pavesio et al., 2003), wobei Matrixabbauprodukte nachgewiesenermaßen zu Unverträglichkeitsreaktionen und Chondrolysen geführt haben (Knudson et al., 2000). Alginat und Agarose sind ebenfalls Polysaccharide in der klinischen Anwendung. Alginat entstammt der Braunalge und ist ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure, das durch Zugabe von Kalzium bzw. Kalziumchelatoren beliebig geliert bzw. wieder verflüssigt werden kann (Gaissmaier et al., 2003) und sich demnach sehr gut als Gelträgersystem eignet. Beide Gele sind in der Lage, Chondrozyten phänotypisch zu stabilisieren, dedifferenzierte Chondrozyten wieder zu redifferenzieren (Benya et al., 1982; Bonaventure et al., 1994) und Chondrozyten zur Bildung einer Extrazellulärmatrix anzuregen, die nativer Knorpelmatrix sehr ähnlich ist (Hauselmann et al., 1996).

Diese Fähigkeit ist wahrscheinlich durch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Alginat/Agarose und knorpeltypischen Proteoglykanen bedingt (Gaissmaier et al., 2003). Durch allerdings erhebliche Immun- und Fremdkörperreaktionen im Tierexperiment (Hunziker, 2002) haben die enttäuschenden in-vivo-Resultate eine Anwendung beim Menschen verhindert.

Im Rahmen der Gerinnungskaskade, die auch bei subchondralen Knorpelläsionen in Gang gesetzt wird, wird Fibrinogen in seine polymerisierte Form, Fibrin, umgewandelt. Dabei bildet polymerisiertes Fibrin ein matrixartiges Netzwerk aus, das die Blutung stillen hilft, zelluläre Bestandteile und Wachstumsfaktoren aus aktivierten Thrombozyten und subchondralem Knochen im Defektareal retiniert und dadurch die mesenchymale Zellpopulation induziert (Reddi, 1998). Vor diesem Hintergrund sind die diversen ACT-assoziierten Anwendungen von Fibrin oder seiner Derivate zu verstehen: Zum einen wurde Fibrin als MACT-Trägermatrix verwendet (Hendrickson et al., 1994), erwies sich dabei aber als zu instabil und potentiell zytotoxisch (Homminga et al., 1993). Das gleiche Problem verhinderte die Anwendung kommerziell erhältlichen Fibrinklebers als Trägermaterial (van Susante et al., 1999). Zum anderen werden MACT-Matrizes durch Fibrinkleber im Defektareal befestigt (Aicher et al., 2003) und Biomaterialien zwecks Verbesserung der Adhäsion mit Fibrin beschichtet (Jager et al., 2002).

2.5.3.3.3.2) Proteinbasierte Matrizes

Proteinbasierte Biomaterialien beruhen auf Typ-I- und -III-Kollagen und befinden sich schon seit vielen Jahren in unterschiedlichen Bereichen der Medizin im klinischen Einsatz. Als hochkonservierte Proteine mit hoher Identität zwischen den Spezies ist prinzipiell der Einsatz xenogener Kollagene möglich. Im Vergleich zu Agarose oder Alginat ist die Biokompatibilität der Kollagene deutlich größer, denn die durch enzymatischen Abbau entstehenden Degradationsprodukte sind physiologisch und dadurch nicht toxisch (Hunziker, 2002). Kollagene befinden sich in Form von Membranen, Vliesen und Gelen im klinischen Einsatz. Allerdings kann in Membranen und Vliesen eine lediglich oberflächliche Zellbesiedlung erreicht werden, wohingegen Gel- oder Hydrogelsysteme eine homogene Zellverteilung und gute Anmodellierbarkeit an die Defektgeometrie ermöglichen (Andereya et al., 2006; Muller-Rath et al., 2007). Dabei werden Chondrozyten in einer Kollagenlösung suspendiert und anschließend geliert. Mittlerweile wird

eine Vielzahl solcher Systeme durch verschiedene Anbieter in den klinischen Alltag integriert.

2.5.3.3.4) Scaffolds als Zellträger

Scaffolds sind feste, poröse, dreidimensionale Strukturen, die durch höhergradige mechanische Stabilität in Verbindung mit vorteilhafter chirurgischer Handhabbarkeit und langfristig günstigen lasttragenden Eigenschaften gekennzeichnet sind (Munirah et al., 2008). Da die Eigenschaften dieser Biomaterialien maßgeblich die Funktionen der eingesiedelten Zellen beeinflussen (O'Brien et al., 2005), ist es möglich, die mikrostrukturellen und physikochemischen Eigenschaften so zu modifizieren, dass eine hinsichtlich Abbaukinetik und struktureller bzw. mechanischer Eigenschaften der physiologischen extrazellulären Matrix möglichst analoge Oberfläche zur Zelladhäsion, -migration, -vermehrung und -regulation geschaffen wird. In Bezug auf die mikrostrukturellen Eigenschaften sind Porengröße, Hohlraumgehalt und Verbindungscharakteristika maßgeblich für die zelluläre Funktion.

Die am häufigsten Verwendung findenden Scaffoldmaterialien sind Poly- α -hydroxyester wie PLA oder PGA, denn diese Materialien sind nachweislich biodegradierbar und durch die FDA (US Food and Drug Administration) für die klinische Anwendung zugelassen (Yoon et al., 2006).

Nachteile der festen Scaffolds sind, dass einerseits die Erhaltung des chondrozytären Phänotyps beeinträchtigt ist und dadurch die extrazelluläre Matrix minderwertige Eigenschaften aufweist (Chen et al., 2003). Andererseits ist die Gewährleistung einer gleichmäßigen Zellverteilung und Besiedlungsdichte nach wie vor schwierig, da die initiale Besiedlung des Scaffolds inhomogen ist und eine zelluläre Penetration des Materials erfolgen muss.

2.5.3.3.5) Hydrogele als Zellträger

Hydrogele sind flüssige Zubereitungen von natürlichen Polymeren wie z.B. Fibrin, Agarose, Hyaluron oder Kollagen. Für das Tissue engineering von Knorpelersatzgewebe sind sie besonders geeignet, da nativer Knorpel und Hydrogele gleichermaßen wasserreich sind. Durch Einsiedlung und allseitige Umfassung der Zellen wird der chondroid-

rundliche Phänotyp erhalten und Dedifferenzierung verhindert (Kock et al., 2011). Im Zuge der Reifung von insbesondere natürlichen Hydrogelen konnten diverse Autoren das Remodelling der extrazellulären Matrix demonstrieren, denn parallel zur Degradation des Trägermaterials konnte der Aufbau neoknorpeliger Gewebestrukturen nachgewiesen werden (Li et al., 2005; Chung et al., 2006; Welsch et al., 2010).

2.5.3.3.4) Erfolgslimitationen und Ergebnisse der MACT

Etliche Outcome-relevante Probleme der MACT-Verfahren sind biochemischer, biomechanischer bzw. chirurgischer Natur und trotz umfassender jahrelanger grundlagen- und klinisch-wissenschaftlicher Anstrengungen noch immer ungelöst.

Folgende Faktoren bestimmen die biochemische MACT-Regeneratqualität: Durch die Notwendigkeit einer vorhergehenden Biopsie bedingt ist die Zahl der zur Verfügung stehenden autologen Chondrozyten analog zur konventionellen ACT entweder eingeschränkt (bei Implantation ohne vorherige In-vitro-Vermehrung) oder es muss auf teilweise dedifferenzierte Chondrozyten zurückgegriffen werden (bei Implantation mit vorheriger In-vitro-Vermehrung). Aus einer 100 mg-Knorpelbiopsie eines mittelalten Patienten werden durchschnittlich $4,5 \cdot 10^5$ Chondrozyten gewonnen (Barbero et al., 2002). Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Zellzahl von mindestens $10\text{--}20 \cdot 10^6$ Chondrozyten für den Erfolg des ACT-Verfahrens notwendig ist (Barbero et al., 2002); ähnlich hohe Zellzahlen werden für MACT-Verfahren verwendet (Behrens et al., 2006). Im Rahmen dieser Verfahren ist somit die In-vitro-Vermehrung dieser Chondrozyten, einhergehend mit morphologischer und biochemischer Dedifferenzierung, unumgänglich. Im Gegensatz dazu ist die zelluläre Redifferenzierung nur möglich nach niedriger Passagenzahl und kurzer Monolayer-Kultivierungsdauer (Benya et al., 1982; Giannoni et al., 2005). Benya et al. beobachteten des Weiteren, dass ein kleiner Prozentsatz der dedifferenzierten Zellen durch 3D-Kultivierung nicht zu redifferenzieren ist (Benya et al., 1982). Dieses Phänomen ist im Rahmen von MACT-Verfahren bedeutsam, da die Anzahl dedifferenzierter Zellen mit einem schlechten klinischen Outcome korreliert ist (Pietschmann et al., 2009). Gleichermaßen konnten auch andere Autoren ungünstige Auswirkungen der In-vitro-Vermehrung auf zelluläre Funktionen feststellen, denn Chondrozyten altern im Rahmen der forcierten 2D-Expansion um circa 30 Jahre, gemessen an ihrer Telomerenlänge (Barbero et al., 2002; Martin et al., 2002; Parsch et

al., 2002). Dieses als „replikative Seneszenz“ bezeichnete Phänomen ist insofern relevant, als dass seneszente Chondrozyten eine reduzierte Syntheseleistung aufweisen und konstitutiv Metalloproteasen exprimieren können, wodurch ein pro-inflammatorisches und -kataboles Milieu induziert wird (Martin et al., 2002; Martin et al., 2002). Vor diesem Hintergrund ist der klinisch-prognostische Benefit der In-vitro-Vermehrung nach wie vor ungeklärt.

Zudem kann sich an der Biopsatstelle eine Donor Site Morbidität ausbilden, die möglicherweise das Gelenk im weiteren Verlauf progredient schädigen und langfristig zu Schmerz und arthrotischen Veränderungen prädisponieren kann (Messner et al., 1996; Hjelle et al., 2002; Hunziker, 2002).

Bis dato ist trotz aller Bemühungen eine vollständige Defektreparatur durch hyalinen Gelenkknorpel mittels MACT nicht zu erzielen (Anders et al., 2008). Die nach wie vor auch im Verlauf lediglich „hyalin-artige“ Defektdeckung liegt wohl in einer Vielzahl Einflüsse begründet, denn zum einen gehen bei oder nach der Transplantation regenerationsfähige Zellen verloren oder werden durch in- und extrinsische Einflüsse dedifferenziert (Vinatier et al., 2009). Wie oben ausgeführt läuft trotz dreidimensionaler Kultivierung die phänotypisch-funktionelle Redifferenzierung nicht komplett und nicht in jeder Zelle ab (Benya et al., 1982). Des Weiteren wird die laterale und vertikale Integration des neokartilaginären Transplantates durch diverse Faktoren behindert (Khan et al., 2008), zum einen durch die verminderte Chondrozytenvitalität an den Defekträndern (Hunziker et al., 2003), zum anderen durch die oben erwähnte eingeschränkte zelluläre Redifferenzierung mit negativen Folgen für die Qualität der Regeneratintegration (Yan et al., 2007).

Biomechanisch relevant ist, dass xenogene Fremdmatrices mit enthaltenem Kulturmedium in das Gelenk eingebracht werden, die initial schlecht belastbar sind und dementsprechend stringente Rehabilitationsmaßnahmen erfordern (Anders et al., 2008). Da die initiale Zellqualität und Steifigkeit dieser Zell-besiedelten Matrices nicht hyalinem Knorpel entspricht, werden die biomechanischen Regenerateigenschaften erst im längerfristigen Kultivierungsverlauf mehr durch den chondrozytären Metabolismus als durch die Eigenschaften des Trägermaterials bestimmt (Mauck et al., 2002; Kisiday et al., 2004; Waldman et al., 2004; Mauck et al., 2007; Nebelung et al., 2011).

In Bezug auf chirurgische Anwenderaspekte bleiben mangelhafte initiale Konstruktstabilität und inhärente Schrumpfungsnegung im Zuge der zellulären Besiedlung (Galois et al., 2006) noch zu lösende Herausforderungen.

Nichtsdestotrotz zeigen Matrix- und Bioträgergekoppelte Transplantationsverfahren sowohl tierexperimentell als auch im kurz- bis mittelfristigen Verlauf beim Menschen positive Ergebnisse (Bentley et al., 2003; Lee et al., 2003; Andereya et al., 2006; Andereya et al., 2007; Ochs et al., 2007; Ossendorf et al., 2007; Anders et al., 2008; Maus et al., 2008). Langzeitergebnisse liegen aber noch nicht vor.

2.6) Mechanische Stimulation in der In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten

2.6.1) Allgemeine Aspekte der Stimulation von Knorpelersatzgewebe

Durch die der Implantation vorgeschaltete und damit ohnehin notwendige Präkultivierungsphase, in der die Zellen bzw. Zell-Matrix-Konstrukte die in vitro-Vermehrung bzw. -Reifung durchlaufen, ergibt sich ein Fenster zur zusätzlichen Applikation biochemischer oder biomechanischer Differenzierungsstimuli. Angesichts der bereits ausgeführten Erfolgslimitationen der MACT gilt es, die biochemische und biomechanische Qualität des Zell-besiedelten Konstruktes vor Implantation zu erhöhen. Die biomechanische Präkonditionierung des Knorpelregenerates vor Implantation stellt dabei eine vielversprechende Weiterentwicklung bestehender MACT-Verfahren dar, wie im Folgenden weiter ausgeführt. Vorteilhaft ist insbesondere die Kultivierung des Regenerates unter für dessen histologische, zelluläre und biomechanische Qualität optimalen Kultivierungsbedingungen. Insbesondere der Erhalt des chondrozytären Phänotyps und die Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Regenerates sind klinisch bedeutsam.

Die in vitro-Mechanostimulation von Knorpelersatzgewebe folgt der Rationale, dass Nativknorpelgewebe in vivo verschiedenen mechanischen Belastungen wie Kompression, Scherung und hydrostatischem Druck ausgesetzt ist. Diese Prozesse modifizieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Metabolismus, Syntheseleistung und letztlich auch die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix. Bioreaktorsysteme im Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe bilden mechanische Belastungen nach, um für Wachstum und Qualität des Knorpelregeneratgewebes optimale Kulturbedingungen zu generieren. Trotz der Vielzahl verschiedener, individuell gefertigter Bioreaktorsysteme, mittels derer die Kultivierung funktionellen Knorpelersatzes erreicht werden sollte, bildet in-vitro-generiertes Knorpelregeneratgewebe noch immer nicht die mechanischen und biologischen Eigenschaften von Nativknorpel ab (Darling et al., 2003).

Die Kultivierung biologischer Proben in einem Bioreaktorsystem erfordert zum einen Asepsis, zum anderen die Nachbildung von Körper-ähnlichen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5 % CO₂, feuchte Atmosphäre). Daher muss die Kulturkammer mitsamt der in ihr enthaltenen Proben entweder in einem Zellkultur-Inkubator kultiviert oder durch externe Mechanismen (Wärme-, Gas-, Medientauscher) in Bezug auf die Kulti-

vierungsbedingungen konstant gehalten werden. Letzteres ist aufwändiger und lediglich in einzelnen Systemen realisiert (Sah et al., 1989).

2.6.2) Bioreaktorsysteme im Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe

Bioreaktoren im funktionellen Knorpel-Tissue-Engineering lassen sich grundsätzlich in vier Typen physikalischer Stimulation einordnen: Scher-, Perfusions-, hydrostatische Druck- und Kompressionssysteme (siehe Abb. 12).

Gemeinsam ist allen Systemen, dass sie die Nährstoff- und Gasversorgung in den Zell-besiedelten 3D-Matrizes verbessern und somit die Kultivierung auch größerer, dichter besiedelter Konstrukte ermöglichen. Insgesamt zeigt die Kultivierung in Bioreaktoren, die das Regeneratgewebe mechanisch belasten, tendenziell bessere Ergebnisse als statische Kultur, wobei periodische mechanische Belastung zu besseren Resultaten führt als statische mechanische Belastung (Darling et al., 2003).

Es werden im Folgenden Grundprinzipien der einzelnen Bioreaktorsysteme und deren biologische Effekte betrachtet, für detaillierte ingenieurstechnische Ausführungen sei auf die einschlägige Literatur verwiesen (Schulz et al., 2007).

Abb. 12: Einteilung bestehender Bioreaktorsysteme zur In-vitro-Generierung von Knorpelersatzgewebe

2.6.2.1) Bioreaktorsysteme zur Applikation von Scherkräften

2.6.2.1.1) Grundlagen

Knorpelgewebe wird unter physiologischen Bedingungen auch durch Scherung belastet (Eckstein et al., 2005). Beispielsweise erlaubt das Kniegelenk als Drehscharniergelenk Flexion und Extension, Innen- und Außenrotation sowie antero-posteriore Translation und setzt den Gelenkknorpel somit einer komplexen, Scherkräfte enthaltenden Belastung aus.

Die einfachste Methode, Flüssigkeitsfluss und damit Scherkräfte und Konvektion zu generieren, sind sogenannte hydrodynamische Bioreaktoren wie „Spinner flasks“ und rotierende Bioreaktoren. Neben der physikalischen Stimulation durch Fluss-induzierte Scherung bedingt der ebenfalls verbesserte Nährstoff- und Gasaustausch die unten dargestellten zellulären Veränderungen.

2.6.2.1.2) Spinner-Flask-Kulturen

Die „Spinner flask“-Kultur ermöglicht die Kultivierung von Zell-Matrix-Konstrukten in 3D-Kultur, denn die Zell-besiedelten Konstrukte werden in einem Mischgefäß suspendiert und unter ständigem Rühren des Nährmediums kultiviert (siehe Abb. 13a). Diese Methode zeigt in Bezug auf Zellproliferation und Glykosaminoglykan- und Kollagen-Gehalt signifikant bessere Ergebnisse als statische Kultur, wahrscheinlich durch eine Kombination von verbessertem Stofftransport zwischen Medium und Zellen und mechanischer Stimulation der Konstrukte (Vunjak-Novakovic et al., 1996). Allerdings kann es zu physikalischen Zellschäden durch turbulente Flussverhältnisse, zur Bildung einer fibrösen Kapsel an der Konstruktoberfläche sowie zu mechanischer Minderwertigkeit der Konstrukte kommen, nicht zuletzt durch die ungleichmäßige Verteilung der Scherkraft innerhalb des Kulturgefäßes (Vunjak-Novakovic et al., 1999).

2.6.2.1.3) Rotierende Bioreaktoren

Eine technische Weiterentwicklung ist der rotierende Bioreaktor. Das Zell-besiedelte Konstrukt ist innerhalb des mediumgefüllten Kulturraumes frei beweglich und wird durch Rotation des Bioreaktors durchgehend im freien Fall gehalten (siehe Abb. 13b). Es entsteht ein laminarer Fluss mit definierter Scherkraft an der Konstrukt-Oberfläche

(Raimondi et al., 2002), der eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen in der Trägermatrix und verbesserte mechanische und biochemische Eigenschaften bedingt (Vunjak-Novakovic et al., 1999). Solche Niedrig-Scherkraft-Bioreaktoren werden von einigen Autoren als viel versprechende Methode der Mechanostimulation angesehen (Darling et al., 2003), da das Level an Scherkraft ausreicht, um in Chondrozyten eine erhöhte Extrazellulärmatrix-Synthese zu induzieren, aber die für andere Scherkraft-Systeme wie Kegel-Platte-Viskosimeter typische entzündliche Reaktion vermeidet (Smith et al., 1995).

2.6.2.1.4) Direkte Schersysteme

Auch Systeme mit direkter, nicht durch Flüssigkeitsfluss bedingter Scherung von Knorpelregeneratgewebe wurden erfolgreich entwickelt. Waldman et al. kultivierten Chondrozyten über 4 Wochen in einer Kalzium-Phosphat-Matrix und konnten durch tägliche kurzzeitige zyklische Scherungen die Kollagen- und Proteoglykan-Synthese in einem Maße steigern, dass auch biomechanische Untersuchungen (z.B. Prüfung des Elastizitätsmoduls [E-Modul]) deutliche Unterschiede zeigten (Waldman et al., 2003). Die so erzielte Verbesserung der Regenerateigenschaften war anderen Stimulationsformen gleichwertig (Waldman et al., 2004).

2.6.2.2) Bioreaktorsysteme zur Perfusion von Knorpelregeneratgewebe

2.6.2.2.1) Grundlagen

Perfusionskultursysteme sind ein weiterer Versuch, die Kultivierungsbedingungen für Knorpelregenerate zu optimieren. Von Chondrozyten besiedelte Trägermaterialien werden in eine kontinuierlich von Medium durchströmte Kulturkammer eingebracht (siehe Abb. 13c). Die Zellen innerhalb des Konstruktes sind dabei Scherbelastungen ausgesetzt, die durch den Fluss des Mediums durch die Poren der Matrix generiert werden. Diese mechanischen und hydrodynamischen Kräfte beeinflussen sowohl Syntheseleistung als auch Phänotyp der Chondrozyten (Pazzano et al., 2000).

Analog zu Schersystemen beruhen die durch Perfusionskultursysteme bedingten Effekte auf der direkten Stimulation durch Flüssigkeitsfluss und verbesserten Nährstoff- und Gasaustausch.

2.6.2.2) Ergebnisse, Chancen und Probleme

Widersprüchliche Ergebnisse finden sich für die Vielzahl unterschiedlicher Perfusionsbioreaktorsysteme: Einige Autoren berichten von positiven Ergebnissen unter perfundierten Kultivierungsbedingungen mit gesteigerter Matrix- und Kollagensynthese (Sittinger et al., 1994; Davisson et al., 2002), andere fanden deutliche negative Auswirkungen auf die Matrixsynthese (Mizuno et al., 2001). Zwar sind die Auswirkungen von Perfusion auf Chondrozyten noch nicht abschließend bewertet, jedoch trifft die Perfusionskultur auf einige Probleme, die noch nicht zufriedenstellend gelöst sind. Perfusionsbioreaktoren müssen die Gratwanderung zwischen angestrebter kompletter Perfusion der Probe einerseits und niedrig zu haltender Scherbelastung andererseits ausbalancieren. Eine wirksame Perfusion des Zell-besiedelten Konstruktes birgt möglicherweise die Gefahr von zu hohen zellulären Scherbelastungen mit nachfolgender einseitiger größerer mechanischer Beanspruchung, Zellschädigung, Kapselbildung und asymmetrischer Matrixformation. Bereits eine geringe Senkung der Perfusion im Sinne einer niedrigeren Flussrate würde unter Umständen die mechanische Stimulation kompromittieren und somit die Effektivität des Systems herabsetzen.

Abb. 13: Scherbelastungs- und Perfusionssysteme zur Kultivierung von Knorpelregeneraten. Die Zell-besiedelten Trägermaterialien (2) sind dabei stets von Nährmedium (1) umgeben: a) Spinner flask, b) rotierender Bioreaktor, c) Perfusionsbioreaktor

2.6.2.3) Bioreaktorsysteme zur Applikation von hydrostatischem Druck

2.6.2.3.1) Grundlagen

Bei Belastung von Knorpel entsteht kurzzeitig hydrostatischer Druck innerhalb des Gewebes, da dem Druck-induzierten Flüssigkeitsfluss in weniger komprimierte Anteile der Extrazellulärmatrix und in die Synovialflüssigkeit ein Widerstand entgegengesetzt wird. Chondrozyten sind also Phasen hydrostatischer Druckbelastung während des Laufens ausgesetzt, die beim Gehen, Laufen und Stehen ungefähr 7-10 MPa beträgt (Hall et al., 1996).

2.6.2.3.2) Statischer hydrostatischer Druck

Trotz der Einfachheit der Stimulation und grundsätzlich vergleichbaren Systemen (beispielhaft siehe Abb. 14) sind widersprüchliche Auswirkungen auf Chondrozyten beschrieben. Statischer hydrostatischer Druck von 5 MPa auf in Agarose-Gel eingebettete Chondrozyten steigerte die Aggrecan- und Typ-II-Kollagen-mRNA-Expression genauso deutlich wie die Proteoglykan-Synthese (Toyoda et al., 2003; Toyoda et al., 2003). Ein vergleichbares Level hydrostatischen Druckes schien auf Knorpelimplantate negative Auswirkungen zu haben und suppressierte die Proteoglykan-Synthese (Hall et al., 1991). Konstanter hydrostatischer Druck in physiologischem Bereich kann die Glykosaminoglykan-Synthese erhöhen (Smith et al., 1996), allerdings wurden auch negative Auswirkungen beobachtet (Lammi et al., 1994); oberhalb des physiologischen Bereiches überwiegen die negativen Folgen für die Zelle, denn neben einer verminderten Matrix-Synthese manifestiert sich eine erhöhte Expression von Arthrosemarkern (IL 6, TNF- α) (Takahashi et al., 1998).

2.6.2.3.3) Dynamischer hydrostatischer Druck

Ebenso wenig eindeutig sind die Ergebnisse bei Kultivierung unter intermittierendem hydrostatischem Druck. In Knorpelregeneraten und Monolayer-Kulturen (Smith et al., 2000; Ikenoue et al., 2003) ist eine gesteigerte Proteoglykan-Synthese unter zyklischer hydrostatischer Belastung beobachtet worden. Andere Autoren hingegen stellten negative Auswirkungen auf die Proteoglykan-Synthese in boviner Monolayer-Kultur fest (Parkkinen et al., 1993) und ermittelten weniger Glykosaminoglykane als in Kontrollen

bei Kultivierung von bovinen Chondrozyten über 7 Wochen (Heath et al., 1996). Einer Vielzahl von Parametern kommt hinsichtlich der Kultivierung Bedeutung zu, denn neben der Zeitdauer der Kultivierung beeinflussen vor allem die untersuchte Tierart und die Lokalisation der Chondrozytenbiopsie die Ergebnisse. So erhöhte 20-stündige hydrostatische Belastung (5 MPa, 0,5 Hz) die $^{35}\text{SO}_4$ -Sulfat-Inkorporation in Knorpelgewebe als Ausdruck der Proteoglykan-Synthese, wohingegen 1,5-stündige hydrostatische Belastung unter ansonsten gleichen Bedingungen die $^{35}\text{SO}_4$ -Sulfat-Inkorporation reduzierte (Parkkinen et al., 1993). Selbst innerhalb einer Studie trat eine große intra- und interindividuelle Streuung der Marker-Inkorporation auf (Hall et al., 1991).

Im Rahmen des Tissue Engineering von hyalinem Knorpel sind auch in einer 3-D-Matrix kultivierte Chondrozyten intermittierendem hydrostatischem Druck in z. T. sehr differenzierten Protokollen unterworfen worden. Bei der Kultivierung equiner Chondrozyten nach einem derartigen Protokoll (3,44 - 6,87 MPa, 5 s Be-/15 s Entlastung, 20 min alle 4 h über 5 w) zeigte sich bei 3,44 MPa eine deutliche Erhöhung der Glykosaminoglykan-Synthese, bei 6,87 MPa auch der Kollagen-Synthese (Carver et al., 1999). Auch bei in eine Kollagen-Matrix eingesiedelten Chondrozyten konnte zyklischer hydrostatischer Druck (2,8 MPa, 0,015 Hz, 15 d) die Proteoglykan-Synthese steigern (Mizuno et al., 2002).

2.6.2.3.4) Wirkungen von hydrostatischem Druck

Hydrostatischer Druck bedingt keine makroskopische Verformung des Knorpels, da die Extrazellulärmatrix relativ inkompressibel ist und lediglich Zellbewegungen im μm -Bereich zulässt (Tanck et al., 1999). Wahrscheinlich hat hydrostatischer Druck direkte Auswirkungen auf die Ionenkanäle der Zellmembran, so dass sich bei konstanter Gewebeerformung ein neues steady state-Gleichgewicht ausbildet (Elder et al., 2009); die veränderten intrazellulären Ionen-Konzentrationen können nachfolgend die zelluläre Genexpression und Proteinsynthese modifizieren (Horowitz et al., 1988).

Die Applikation hydrostatischen Druckes ist zweifelsohne eine wichtige Form der Mechanostimulation von Knorpelregeneratgewebe, die allerdings vor dem Hintergrund der recht inhomogenen Datenlage weiterer wissenschaftlicher Aufarbeitung, v. a. in Bezug auf optimale Stimulationsparameter, bedarf. Zudem konnten zwar viele Studien Veränderungen von Kollagen- und Proteoglykan-Synthese und -Gehalt nachweisen,

biomechanisch zufrieden stellende Ergebnisse sind allerdings kaum berichtet (Elder et al., 2008).

Abb. 14: Hydrostatische Drucksysteme zur Kultivierung von Knorpelregeneraten. a) Schema eines hydrostatischen Versuchsaufbaus. Aus dem Mediumvorrat (1) wird Medium über eine Pumpe (2) in die Kulturkammer (3) gepresst, über das Druckkontrollmodul (4) werden die Druckverhältnisse reguliert und über den Druckmonitor dargestellt und aufgezeichnet (5), *adaptiert nach (Mizuno et al., 2002)*, b) beispielhafte Darstellung einer hydrostatischen Kulturkammer, in der Proben in Röhrcen von Medium umgeben sind und durch flexible Septen in dem durch die Steuerungseinheit vorgegebenen Druckniveau kultiviert werden, *adaptiert nach (Angele et al., 2003)*

2.6.2.4) Kompressionsbioreaktorsysteme

2.6.2.4.1) Grundlagen

Knorpel wird im Gelenk primär durch Kompressionen belastet, zum Beispiel erfährt die Hüfte definierte Belastungen in bestimmten Situationen: 1 MPa beim Stehen, 0,1 - 4 MPa beim Laufen und bis zu 20 MPa beim Aufstehen aus einem Stuhl oder Springen (Gooch et al., 1997). Mechanische Kompression beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlicher auf die Zelle einwirkender Prozesse: Verformung von Extrazellulärmatrix und Zelle, Flüssigkeitsfluss in weniger komprimierte Bereiche der Extrazellulärmatrix und in

die Synovialflüssigkeit, wechselnde hydrostatische und osmotische Druckverhältnisse und damit einhergehende Nährstoff- und Ionenkonzentrationsgradienten (Guilak et al., 1995). Diese Art von Belastung moduliert verschiedene physikalische, biochemische und elektrische Prozesse innerhalb der Zelle und ist daher notwendig für die Gesundheit des Knorpelgewebes.

Im Unterschied zu hydrostatischen Drucksystemen besteht bei Kompressionsbioreaktoren direkter Kontakt zwischen Gewebe und Stimulationseinheit, wodurch die physiologischen Verhältnisse im Sinne der Kompression des Knorpels durch gegenüberliegenden Knorpel nachgebildet werden können.

2.6.2.4.2.1) Auswirkungen von Kompression auf Knorpelimplantate

2.6.2.4.2.1.1) Statische Kompression

Direkte statische Kompression wurde in ihren Auswirkungen auf Knorpel untersucht. Zahlreiche Autoren stellten fest, dass statische Belastung einen negativen Einfluss auf Chondrozyten hat. Es ließ sich eine reduzierte Matrix-Synthese und -Sekretion beobachten, wobei diese Abnahme durch forcierte Diffusion aus der Matrix und nicht zwangsläufig durch reduzierte zelluläre Proteoglykan-Synthese bedingt sein kann (Buschmann et al., 1995). Diese Ergebnisse konnten auch andere Gruppen bestätigen und dabei sowohl die Limitierung von Diffusion und Stoffwechsel als auch Veränderungen von Zell- und Kernmorphologie durch physikalische Kompression bei uniaxialer statischer Belastung als verantwortliche Mechanismen herausarbeiten (Guilak, 1995).

2.6.2.4.2.1.2) Dynamische Kompression

Im Gegensatz dazu zeigt zyklische kompressive Belastung eine große Variabilität in ihren Auswirkungen auf zelluläre Prozesse. Frequenz, Kraft, Dauer und Kompressions-tiefe der Belastung sind für die Definition der Kompression die wichtigsten Parameter, trotz der zum Teil deutlichen Unterschiede in angewandten Methoden und Geräten. Die wissenschaftlich angewandten Bereiche der kompressiven Mechanostimulation sind: Frequenz 0,0001 - 3 Hz, Kraft 0,1 - 24 MPa, Dauer h bis w, Kompressionsgrad 0,1 - 25 % (Darling et al., 2003).

Als gesichert gilt, dass zyklische Kompression von Nativ-Knorpelexplantaten verschiedene Zell-Prozesse moduliert, wobei die biologische Antwort der Chondrozyten insbesondere in Bezug auf die Syntheseleistung sehr divergent ausfällt (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Auswirkungen von zyklischer Kompression auf Nativknorpelexplantate

Zellulärer Prozess:	Beeinflussung durch Kompression:
Chondrozyten-Vitalität	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger vitale Chondrozyten in oberflächlicher Zone, Chondrozyten der Übergangs- und tiefen Zone ungemindert vital (Fehrenbacher et al., 2003) • Belastung über 1 bis 3 Tage ohne negative Auswirkungen, Vitalität bei 6-tägiger Kultivierung vermindert (Steinmeyer et al., 1997)
Genexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Suppression der Kollagen-I- und -II-Genexpression (Fehrenbacher et al., 2003) • Anstieg der Aggrecan- und Typ-II-Kollagen-Genexpression nach 24 h (Fitzgerald et al., 2006), nach 4 h ähnlich Kontrollniveau und nach 76 h unter Kontrollniveau (Aufderheide et al., 2006) • Anstieg der Genexpression OA-typischer Matrixmoleküle (Fibronektin, COMP [cartilage oligomeric matrix protein]) (Wong et al., 1999) und anabolischer Enzyme (u.a. MMP-3, ADAMTS5 (Fitzgerald et al., 2006))
Synthese von EZM-Molekülen	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der generellen biosynthetischen Aktivität, insbesondere der Proteoglykan-Synthese (Parkkinen et al., 1992) • Veränderung der Proteoglykan-Synthese abhängig v. a. von: <ol style="list-style-type: none"> 1. Belastungsprotokoll (Palmoski et al., 1984): geringere Frequenzen mit negativem Effekt auf Proteoglykan-Synthese, höhere Frequenzen stimulieren Kollagen- und Proteoglykan-Synthese (Sah et al., 1989), 2. Belastungsdauer und -intensität: deutliche Erhöhung reduziert Proteoglykan-Synthese (Steinmeyer et al., 1997; Torzilli et al., 1997), kann aber auch Kollagensynthese erhöhen (Wong et al., 1999), bei moderater Kompression fast identische Steigerung der Proteoglykan- und Kollagen-Synthese (Sah et al., 1989)

	<p>3. Erhöhung der Proteoglykansynthese v.a. in der Explantatperipherie (Frank et al., 1987)</p> <p>4. deutliche Steigerung der Proteoglykan- und Kollagen-Synthese unter IGF-I-Zusatz (Bonassar et al., 2001)</p>
--	--

2.6.2.4.2.2) Auswirkungen von Kompression auf Knorpelregeneratgewebe

Sowohl das Wissen um die Auswirkungen zyklischer Kompressionen auf Nativknorpel als auch die Erkenntnis, dass die Extrazellulärmatrix von Knorpelgewebe je nach funktionellem Anspruch remodelliert wird, haben Eingang gefunden in zahlreiche Tissue Engineering-Systeme. Mittels vielfältiger Stimulationsprotokolle auf der Grundlage zyklischer mechanischer Kompression wurde in diversen Matrix- und Hydrogel-Systemen untersucht, wie sich Chondrozyten verschiedener Differenzierungsstadien in Bezug auf Differenzierung, Proliferation, metabolische Aktivität und Ausbildung einer funktionellen Extrazellulärmatrix verhalten.

Einige Autoren konnten nachweisen, dass die durch zyklische Kompression hervorgerufene biosynthetische Antwort der Chondrozyten grundsätzlich in Nativ- und Matrixumgebung ähnlich ist (Buschmann et al., 1995; Lee et al., 2003).

2.6.2.4.2.2.1) Ergebnisse bei kurzfristiger Kultivierung

Zahlreiche Studien konnten eine durch zyklische Kompression induzierte Veränderung der chondrozytären Syntheseleistung und eine daraus folgende veränderte Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix nachweisen. Agarose-Hydrogel ist ein im experimentellen Tissue Engineering von Knorpelregeneratgewebe häufig verwendetes Matrixsystem. In eine Agarose-Matrix eingebrachte Chondrozyten zeigten schon nach kurzer Kultivierungszeit über einige Tage unter zyklischer Kompression (Kompressionsgrad 3 %, Frequenz 0,01-1 Hz) eine deutliche Erhöhung sowohl der Proteoglykan-Synthese um 15-25 % als auch der Kollagen-Synthese um 10-35 % (Buschmann et al., 1995; Lee et al., 1997). Diese schnell nach Kultivierungsbeginn eintretende Veränderung der biochemischen Eigenschaften ließ sich auch biomechanisch nachweisen, denn ein vergleichbarer Anstieg von Glykosaminoglykanen und Kollagenen unter zyklischer Kompression (Kompressionsgrad 10 %, 1 Hz, 1 h Be-/1 h Entlastung, 3 h/d, 5 d/w) bewirkte

eine Erhöhung des *aggregate modulus*-Wertes auf 100 kPa nach 28-tägiger Kultivierungsdauer (Mauck et al., 2000). Dieser Anstieg entsprach einer 6-fachen Erhöhung gegenüber dem Wert der Kontrolle (15 kPa) und bedingt relative biomechanische Knorpelähnlichkeit, denn Knorpelgewebe weist einen *aggregate modulus*-Wert von 500-900 kPa auf (Mansour, 2004). Sowohl E-Modul als auch *aggregate modulus* sind Maße für die Steifigkeit von Gewebe: Je höher der Wert des Moduls, desto geringer die Gewebeverformung unter Krafteinwirkung.

Die Auswirkungen der zyklischen Kompression hängen von der Chondrozyten-Subpopulation in verschiedenen Gewebetiefen ab. Chondrozyten aus der oberflächlichen Zone zeigten unter zyklischer Belastung (Kompressionsgrad 15 %, 1 Hz) eine gesteigerte Proliferationsrate, wohingegen Chondrozyten aus der tiefen Knorpelzone einen Anstieg der Proteoglykan-Synthese aufwiesen (Lee et al., 2000). Auch in Chondrozyten-besiedelten Peptid-Hydrogelen (Kisiday et al., 2004), PGA (poly-glycolic acid)-Matrices (Davisson et al., 2002), Polyurethan-Matrices (Wang et al., 2009) und Typ-I- und -II-Kollagen-Matrizes (Hunter et al., 2002; Lee et al., 2003) ließen sich ähnliche durch zyklische Kompression bedingte Biosynthesesteigerungen in Bezug auf die Kollagen- und/oder Proteoglykan-Synthese nachweisen.

2.6.2.4.2.2) Bedeutung des Kompressionsprotokolls

Obwohl zahlreiche Studien belegen, dass zyklische Kompression die Genexpression von Zellen in Tissue Engineering-Systemen moduliert (Mauck et al., 2007; Wang et al., 2009), zeigten einige Kompressionsprotokolle keinen Anstieg der Genexpression unter Bedingungen, die die Protein-Biosynthese stimulierten. Zyklische Kompression stimulierte die Proteoglykan-Synthese von in ein 3D-Schaum-System eingebrachten Chondrozyten, bewirkte aber keine Veränderung der Genexpression von Typ-I-Kollagen, Typ-II-Kollagen, Aggrekan und spezifischen Transkriptionsfaktoren wie SOX-9 (Demartean et al., 2003). Auch bei Kultivierung von Chondrozyten in einem Typ-I-Kollagen-Gel unter zyklischer Kompression stellten Hunter et al. eine unveränderte Typ-I-Kollagen-, Typ-II-Kollagen- und Aggrekan-mRNA-Expression fest (Hunter et al., 2002), allerdings fand die Stimulation nur über 24 h statt. Die beobachtete Unabhängigkeit der Genexpression von kurzfristigen Schwankungen der mechanischen Umgebung erklärt sich daraus, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren auf post-

transkriptioneller Ebene geschieht und dadurch das Knorpelgewebe in seiner Transkriptionsaktivität stabilisiert wird (Lee et al., 2006).

2.6.2.4.2.2.3) Differenzierungswirkung

Zyklische Kompression moduliert auch Zell-Aktivitäten von un- und dedifferenzierten Chondrozyten im Sinne einer chondrogenen Redifferenzierung. Die Glykosaminoglykan-Synthese von in Monolayer-Kultur expandierten und dadurch dedifferenzierten humanen Chondrozyten steigt nach Einbringen in eine 3D-Matrix und Kultivierung unter zyklischer Kompression (Demarteau et al., 2003). Ähnliches ist auch für dedifferenzierte kanine Chondrozyten nach Einbettung in eine Typ-II-Kollagen-Matrix beschrieben (Lee et al., 2003). Außerdem ist die durch zyklische Kompression induzierte chondrogene Differenzierung von in Agarose eingebetteten mesenchymalen Stammzellen einer biochemisch durch TGF- β gesteuerten Induktion gleichwertig (Huang et al., 2004) und geeignet, in der Extremitätenknospe des Huhns Knorpel-typische Entwicklungsprozesse zu initiieren (Elder et al., 2000).

2.6.2.4.2.2.4) Ergebnisse bei langfristiger Kultivierung

Bei langfristiger Kultivierung unter zyklischer Kompression reichen mitunter diskontinuierliche, punktuelle Stimulationsepisoden aus, um deutliche biochemische und biomechanische Veränderungen durch die Entwicklung einer funktionellen Extrazellulärmatrix zu initiieren. Bei langfristiger Kultivierung einer Zell-besiedelten Kalziumsphosphat-Matrix unter zyklischer Kompression (Kompressionsgrad 5 %, Frequenz 1 Hz) über nur 6 min an jedem 2. Tag (entsprechend 400 Zyklen) ergab sich eine deutliche Steigerung sowohl des Kollagen- und Proteoglykan-Gehaltes als auch des E-Moduls (Waldman et al., 2004). Vergleichbaren langfristigen Veränderungen unterlagen auch Zell-besiedelte Peptid-Hydrogele, die an jedem 2. Tag für jeweils 45 min zyklisch be- (Kompressionsgrad 2,5 %, Frequenz 1 Hz) und anschließend über 5,25 h entlastet wurden (Kisiday et al., 2004).

2.6.2.4.2.5) Probleme

Trotz der durch moderate zyklische Kompression in physiologischem Bereich induzierbaren biochemischen und biomechanischen Veränderungen der Extrazellulärmatrix gibt es auf dem Weg zu künstlichem Knorpelregeneratgewebe noch einige Problemfelder. Zum einen ist beschrieben, dass zyklische Kompression zu einer erhöhten Freisetzung von Proteoglykanen und anderen Matrixmolekülen führte, die im umgebenden Medium nachzuweisen waren (Davisson et al., 2002; Lee et al., 2003), zum anderen können einige Kompressionsprotokolle mit ausgedehnter, ununterbrochener Belastung den biomechanischen und biochemischen Eigenschaften des Knorpelregeneratgewebes abträglich sein, so zum Beispiel in Agarose-Matrices (Kisiday et al., 2004).

2.6.2.4.2.3) Kompressionsbioreaktorsysteme im Tissue Engineering von Knorpelregeneratgewebe

2.6.2.4.2.3.1) Bestehende Bioreaktorsysteme

Zahlreiche individuell gefertigte Bioreaktoren dienen der zyklischen Kompression von Knorpelimplantaten oder Knorpelregeneraten (siehe Abb. 15).

Es lassen sich direkte und indirekte Kompressionsbioreaktorsysteme unterscheiden:

Abb. 15: Klassifikation von Kompressionsbioreaktorsystemen, nach (Schulz et al., 2007)

2.6.2.4.2.3.1.1) Indirekte Kompressionsbioreaktorsysteme

Ein in die klinische Anwendung zu implementierendes Bioreaktorsystem muss vor dem Hintergrund des Umgangs mit Patienten-spezifischem Zellmaterial strenge Auflagen bei der Zulassung gemäß GMP (Good manufacturing practice)-Richtlinien erfüllen. Um die GMP-Regeln ein- und das Gesamtsystem steril zu halten, sind indirekte, durch rotierende Magnetsysteme angetriebene Bioreaktorsysteme entwickelt worden, die das Zell-besiedelte Konstrukt neben zyklischer Kompression auch durch direkte Perfusion stimulieren (Schulz et al., 2008), allerdings stehen umfassende experimentelle Daten noch aus.

2.6.2.4.2.3.1.2) Direkte Kompressionsbioreaktorsysteme

Kompressionsbioreaktorsysteme, die direkten Kontakt zwischen Kraftüberträger und Probe vermitteln, können statisch oder zyklisch stimulieren. In diesem Zusammenhang kann die Belastung unbegrenzt (engl. *unconfined*, siehe Abb.16a') oder begrenzt (engl. *confined*, siehe Abb. 16 a'') sein. „Begrenzte“ Belastung liegt vor, wenn die Probe von einer Einfassung umgeben und dadurch peripher gestützt wird. Sie bildet zwar die tatsächliche Gelenkflächensituation besser ab, beinhaltet aber die Gefahr, unter Belastung den Stoffwechsel mechanisch zu behindern.

Abb. 16: Grundprinzip der zyklischen Stimulation durch unbegrenzte („unconfined“; a') und begrenzte („confined“; a'') Belastung

Bioreaktoren, die primär zur statischen Kompression von Knorpelimplantaten genutzt wurden, gehen auf Systeme zurück, in denen die uniaxiale statische Belastung entweder durch manuell zu applizierende Gewichte (Burton-Wurster et al., 1993) oder durch servohydraulischen Antrieb (Frank et al., 1987) gesteuert wurde. Auf ähnliche Weise

wurde die statische Kompression von Knorpelregeneratgewebe vorgenommen (Takahashi et al., 1998).

Die Generierung zyklischer Kompressionen hingegen bedarf eines komplexeren Systems. Der grundsätzliche Aufbau solcher Bioreaktoren ist prinzipiell vergleichbar, allerdings diente die Kultivierung von Knorpelimplantaten klassischerweise Fragestellungen der Arthroseinduktion, wohingegen die Kultivierung von Knorpelregeneraten primär auf Fragestellungen des Tissue Engineering abzielte.

Kompressionsbioreaktorsysteme, die primär der Kultivierung von Knorpelimplantaten dienen unter der Fragestellung, ob und wie sich arthrotische Veränderungen durch zyklische Kompression induzieren lassen, bestehen häufig aus elektropneumatisch betriebenen Druckkammern, da eine pro-arthrotische Gewebedeformation hoher Kräfte bedarf. Solche Systeme sind allerdings für die Langzeit-Kultivierung nicht geeignet, da nur eine einmalige Beschickung möglich ist. Ein beispielhaftes System, das auf Steinmeyer et al. zurückgeht, ist in Abbildung 17 dargestellt (Steinmeyer et al., 1997; Sauerland et al., 2003).

Abb. 17: Bioreaktorsystem zur zyklischen Kompression von Knorpelimplantaten, adaptiert nach (Steinmeyer, 1997)

Im Gegensatz dazu sind Kompressionsbioreaktorsysteme zur Kultivierung von Knorpelregeneraten für die längerfristige und anhaltend sterile Kultivierung von Zellbesiedelten Matrices unter zyklischer mechanischer Kompression geeignet. Dabei fußen fast alle gängigen Systeme auf dem Grundprinzip der Kompressionsstempelplatte

(siehe Abb. 18b). Parallel werden viele Konstrukte in einem Kulturraum uniaxialen zyklischen Belastungen unterzogen. Klassischweise werden über einen Antrieb periodische Vertikalbewegungen des angeschlossenen Druckstempels und somit zyklische Kompressionen auf eine mit Zell-besiedelten Matrices beschickte Kulturplatte gebracht (siehe Abb. 18a). Die Stimulation der Regenerate kann dabei Kraft- bzw. Weg-gesteuert erfolgen.

Abb. 18: Bioreaktorsystem zur zyklischen Kompression von Knorpelregeneraten (a) und dessen Grundprinzip (b), adaptiert nach (Lee et al., 1997)

3) Ziele und Fragestellungen

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitergehende Verbesserung bestehender MACT-Verfahren durch zyklische mechanische Kompression eines Zell-besiedelten Matrixkonstruktes in einem eigens zu diesem Zweck entwickelten neuartigen Kompressionsbioreaktorsystem. Praktisch wurden Chondrozyten aus Nativknorpelgewebe isoliert, in eine 3D-Kollagenmatrix eingesiedelt und nachfolgend über die Dauer von zwei Wochen zyklisch mechanisch stimuliert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, in Klinik und Forschung gebräuchliche aktuelle Verfahren der Knorpelregeneration und Mechanostimulation zu besprechen und zu bewerten, um eine Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu ermöglichen.

Da sich diese Arbeit in der Hauptsache mit den Auswirkungen mittelfristiger zyklischer mechanischer Belastung auf Chondrozyten in einem 3D-Kollagen-Hydrogel und der zeitlichen Entwicklung von zellulären Synthese-, Differenzierungs- und Degenerationsmarkern befasst, war darüber hinaus eine Zielsetzung, die folgenden Fragestellungen abzuarbeiten:

Ist die mechanische Kompression von Zell-besiedelten Typ-I-Kollagen-Matrices ...

- a) ... ein generell geeignetes Verfahren hinsichtlich der Parameter Zellvitalität, -proliferation, -morphologie und -funktion?
- b) ... zweckmäßig in der Retention eines differenzierten chondrozytären Phänotyps und Chondrozyten-spezifischer Syntheseleistungen einerseits und in der Verhinderung von katabol-degenerativen Prozessen andererseits?
- c) ... in ihren unter a) und b) beobachteten Auswirkungen unterschiedlich von Kultivierungsbedingungen ohne mechanische Stimulation?
- d) ... durch die im Zuge der Auswertung erhaltene Verlaufsdarstellung der unter a) und b) erhobenen Parameter wertvoll hinsichtlich eines besseren Verständnisses der grundlegenden Interaktionen zwischen mechanischer Stimulation und zellulären Prozessen?
- e) ... mit dem Abschluss dieser Arbeit einen weiteren Schritt in Richtung einer In-vivo-Applikation zur Therapie von Knorpelschäden gegangen?

In der Zusammenschau der obigen Ausführungen bieten MACT-Verfahren beträchtlichen Optimierungsbedarf hinsichtlich der Zellen, Matrices und Stimulations- bzw. Kultivierungsprotokolle, die in solchen Verfahren Verwendung finden. Nicht zuletzt die Vielzahl unterschiedlicher Ansätze in der Kultivierung von in vitro-generiertem Knorpelersatzgewebe verdeutlicht, dass bestehende MACT-Verfahren derzeit als nicht vollkommen ausgereift zu betrachten sind.

Nach Würdigung der in der Literatur beschriebenen mechanostimulatorischen Verfahren und deren biochemischer und biomechanischer Ergebnisse ergeben sich folgende konkrete Verbesserungsansätze, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellen.

In Bezug auf die Zellart lässt sich feststellen, dass bis dato nur vereinzelte Untersuchungen mit humanen Chondrozyten in einem Klinik-nahen, MACT-analogen Versuchsssetup vorgenommen worden sind. Der Einfluss von mittel- bis langfristiger biomechanischer Präkonditionierung auf Zell- und Gewebeparameter ist primär anhand von gesunden tierischen Chondrozyten untersucht worden (Mauck et al., 2003; Waldman et al., 2004). Humane Chondrozyten weisen distinkte Unterschiede gegenüber tierischen Chondrozyten auf, z.B. hinsichtlich der post-expansiven Redifferenzierungsneigung und metabolischen Kompetenz (Jakob et al., 2001), sodass solcherlei tierische Studien nur eingeschränkte Aussagekraft für die klinische Anwendung bereithalten. Zudem wird die Indikation für ein ACT- bzw. MACT-Verfahren in letzter Zeit großzügiger gestellt, sodass fokale Knorpelschäden zunehmend auch bei älteren Patienten bis zu 60 Jahre mittels ACT- bzw. MACT-Verfahren behandelt werden (Mandelbaum et al., 2010). Vor diesem Hintergrund haben humane Chondrozyten aus makroskopisch intakten Gelenkarealen von durch Prothesen ersetzttem Knorpelgewebe im Rahmen der vorliegenden Studie Verwendung gefunden.

Im Hinblick auf die oben ausgeführten Daten zu den Auswirkungen von zellulärer in vitro-Vermehrung war es ein Ziel dieser Studie, primäre artikuläre Chondrozyten ohne vorherige Vermehrung und damit einhergehende Dedifferenzierung zur Einsiedlung in ein Typ-I-Kollagen-Hydrogel zu verwenden. Die daraus zwangsläufig resultierende niedrigere Zellzahl ist in verschiedenen In-vitro- und -vivo-Anwendungen als nicht nachteilig befunden worden (Andereya et al., 2007; Gave-

nis et al., 2007; Mueller-Rath et al., 2007; Muller-Rath et al., 2007; Schneider et al., 2011).

Unter den zahlreichen aktuell verfügbaren Hydrogelsystemen sind Kollagenhydrogele von besonderem Interesse, da sie die zelluläre Proliferation unter Retention des chondrozytären Phänotyps fördern (Iwasa et al., 2003), eine homogene Zelleinsiedlung erlauben (Andereya et al., 2006), eine biokompatible Degradation ohne Induktion von inflammatorischen Prozessen unterlaufen (Hunziker, 2002) und Chondrozyten nachweislich zu einer zellulären Antwort auf Mechanostimulation hin befähigen (Hunter et al., 2002). Hinsichtlich des verwandten Matrixsystems fiel die Wahl auf ein Typ-I-Kollagen-Hydrogel, das klinisch bereits in Verwendung ist (Andereya et al., 2006; Andereya et al., 2007; Maus et al., 2008).

Dennoch ist dieses Hydrogel auch nach Zelleinsiedlung und Gelierung weich, sodass zum einen das intraoperative Handling des Konstruktes erschwert ist, zum anderen die Gefahr einer Beschädigung des Konstruktes durchaus gegeben ist. Die zu diesem Zweck erfolgte Verdichtung des gelierten Zell-Matrix-Gemisches ist in Vorarbeiten validiert und als biochemisch und biomechanisch vorteilhaft angesehen worden (Mueller-Rath et al., 2011).

Wie bereits ausgeführt hat sich die mechanische Stimulation von Zell-besiedelten Matrices als vorteilhaft erwiesen, um deren biochemische und biomechanische Qualität zu verbessern (Nebelung et al., 2011). Die Stimulation in Form von kontinuierlich-zyklischer Kompression bildet dabei die Verhältnisse im Gelenk am besten nach, zeigte in der Langzeitkultivierung von Knorpelersatzgewebe viel versprechende Ergebnisse (Mauck et al., 2003; Waldman et al., 2004) und wurde daher im Rahmen dieser Studie genutzt.

Konkrete Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von mittelfristiger kontinuierlich-zyklischer kompressiver Belastung auf die Zell- und Gewebeparameter eines mit humanen Chondrozyten besiedelten Kollagenhydrogels. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zudem, die Rolle der mechanischen Präkonditionierung als eine eventuelle Modifikation bestehender konventioneller MACT-Verfahren in einem Klinik-nahen in vitro-Setup zu evaluieren.

Die zentrale Hypothese war demgemäß, dass mittelfristige zyklische mechanische Belastung die biochemischen und biomechanischen Eigenschaften eines Zell-besiedelten Kollagenhydrogels bedeutend verbessert.

4) Material und Methoden

4.1) Patientengut

Hyaliner Knorpel wurde von Patienten gewonnen, die sich im Rahmen der Behandlung einer schweren Gonarthrose der Implantation einer Knie-Totalendoprothese im Uniklinikum Aachen unterzogen. Das schriftliche Einverständnis bezüglich der Verwendung des resezierten Knorpelgewebes für wissenschaftliche Zwecke wurde vor der Operation eingeholt. Es wurden insgesamt 11 Patienten in die Studie einbezogen, da aber zu 2 Patientenproben keine Informationen vorlagen, beschränkt sich die folgende statistische Beschreibung auf die verbliebenen 9 Patienten. Es wurden Knorpelbiopsien von 6 Männern und 3 Frauen in die Studie einbezogen, die zum OP-Datum bei einem Altersdurchschnitt von 67 Jahren zwischen 50 und 82 Jahre alt waren.

4.2) Gewinnung der humanen Chondrozyten

Die Knorpel-Knochen-Proben wurden aus makroskopisch nicht degenerativ veränderten Bereichen des Femurkondylus unter sterilen Bedingungen in Chondrozyten-Kulturmedium (DMEM-Medium, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) überführt, dem 10 % Humanserum (HS, Arthro Kinetics, Krems, Österreich), 100 U/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 100 µg/ml Gentamycin (Gibco) und 1,25 U/ml Fungizon (Amphotericin B, Gibco) zugesetzt waren. Diese Form der Zusätze findet sich auch in der Literatur wieder (Kawasaki et al., 1999) und stellt die fortdauernde Sterilität der Proben sicher. Anschließend wurden unter aseptischen Bedingungen im Labor der Orthopädischen Klinik des Uniklinikums Aachen die Knorpelproben vom Knochen separiert und in 1-2 mm³ große Stücke zerkleinert. Durch enzymatischen Verdau unter Zugabe des Enzyms Liberase (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) in der Menge von 200 µl zu je 0,4 g Knorpelgewebe und 10 ml DMEM (Gibco) wurden die Chondrozyten aus ihrer Matrix herausgelöst. Hierzu erfolgte die Inkubation unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) und ständigem Durchmischen. Nach Ablauf der 24 h-Inkubationsphase wurden nicht verdaute Knorpelreste durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) abgetrennt. Hinterher wurden die Zellsuspension pelletiert (durch 10-minütige Zentrifugation bei 1400 rpm), der Liberase-haltige Überstand abgesaugt, das

Zellpellet in 10 ml PBS-Lösung resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Insgesamt wurde die Resuspension in PBS-Lösung dreimal durchgeführt. Im Anschluß erfolgte die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einem CASY-Zellcounter (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland).

4.3) Herstellung des zellbesiedelten Kollagen-Gels

Die aufgereinigten Chondrozyten wurden nun in ein Typ-I-Kollagen-Gel eingebracht. Das im Rahmen der Versuche verwendete Typ-I-Kollagen-Gel war aus Schwänzen von Inzucht-Ratten gewonnen worden und kommerziell erhältlich (Fa. Amedrix, Esslingen, Deutschland). Dieses Typ-I-Kollagen-Gel lag in einer Konzentration von 6 mg/ml als wässrige Lösung in 0,1% Essigsäure vor und war bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) viskös und gelierte alsbald nach Erwärmung.

Im Anschluss wurden Knorpelzellen in der Konzentration von 2×10^5 /ml in Chondrozyten-Medium aufgenommen, mit 75 ml Typ-I-Kollagengel, 10,5 ml HEPES-Puffer (Gibco) und 64,5 ml DMEM-Medium versetzt und steril gemischt.

Die Herstellung des Kollagenimplantates erforderte eine mechanische Beständigkeit, die erst durch 20-fache Kompression der Ausgangssuspension zustande kam. Hierbei kam eine quadratische Plexiglas-Gießvorrichtung zum Einsatz (siehe Abb. 19), die über eine Grundfläche von $5 \times 5 \text{ cm}$ ($= 25 \text{ cm}^2$) verfügt. Dieses komprimierte Kollagengel entspricht nicht dem Verfahren der klinischen Anwendung (CaReS®), die Kompression ist aber notwendig, um die für die Untersuchungen im Bioreaktor notwendige Primärstabilität des Kollagenhydrogels zu erreichen.

Abb. 19: Kompressionseinheit zur Herstellung des komprimierten Zell-besiedelten Kollagengels, die austretende rote Flüssigkeit ist Medium, die zwischen Stempel und Boden verbliebene helle Schicht ist komprimiertes Zell-besiedeltes Kollagengel

Nach Befüllen dieser Kompressionseinheit mit dem erhaltenen Volumen von 150 ml gelierte das Gemisch aus Kollagengel, Zellen, Medium und Pufferlösung über den Zeitraum von 1 h bei Zimmertemperatur. Erst im Anschluss an das Gelieren und nach Überprüfung der Dichtigkeit des Systems wurde mit der Kompression begonnen, wobei die Kraftsteuerung durch das Auflegen von Gewichten auf den Stempel erfolgte. Nach Kompression über Nacht und Erreichen einer Implantathöhe von 3 mm wurde die Kompressionseinheit unter sterilen Bedingungen abgebaut. 3 mm Implantathöhe entsprachen dabei dem Kompressionsfaktor 20, denn das angesetzte, unkomprimierte Ausgangsvolumen von 150 ml wurde auf 7,5 ml verdichtet (bei 25 cm² Volumengrundfläche und 3 mm Volumenhöhe).

Das komprimierte Gelquadrat wurde steril mittels einer speziellen Stanzvorrichtung in 16 runde Stanzen geschnitten, die im Durchmesser 1 cm groß waren (siehe Abb. 20). Diese Einzelstanzen wurden entweder zur Dokumentation des Ausgangswertes der

histologischen, molekularbiologischen und biomechanischen Aufarbeitung zugeführt oder im weiteren Verlauf mit bzw. ohne zyklische mechanische Kompression kultiviert.

Abb. 20: Stanzung des komprimierten Zell-besiedelten Kollagengels in Stanzen mit 1 cm Durchmesser

4.4) Vorstellung des neuen Kompressionsbioreaktorsystems

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte ein Kompressionsbioreaktorsystem entwickelt und validiert werden, das erlaubt, definierte Parameter der zyklischen Kompression (Kompressionsgrad, Weg, Frequenz, Kultivierungsdauer) vorzugeben (Stoffel et al., 2009; Stoffel et al., 2009; Stoffel et al., 2011). Es ermöglicht, die bei der zyklischen mechanischen Stimulation auf das Knorpelersatzmaterial einwirkenden Kräfte zu bestimmen und aufzuzeichnen. Dabei erfolgt die zyklische Kraftübertragung auf die Proben durch eine Exzenter Scheibe, die durch eine Welle angetrieben wird und auf einen Stempel einwirkt. Der Stempel befindet sich in einer Kulturkammer und wirkt mit definierter Frequenz, Hubhöhe und Kraft auf die Proben ein. Über die Einfüllschraube ist ein Medienwechsel zu beliebigen Zeiten und bei ununterbrochen fort-dauernder Stimulation durchführbar (siehe Abb. 21). Unterhalb des Kulturraumes befindet sich eine Kraftmessdose, die das auf die Proben real einwirkende Kraftprofil im Verlauf aufzeichnet (siehe Abb. 22).

Motor mit Exzentrerscheibe und Gabellichtschranke

gefilterter passiver Gasaustauscher

Druckstempel in Kulturkammer

Einfüllschraube

Zell-besiedelte Matrix, umgeben von Nährmedium

Kraftmessdose

Abb. 21: Bioreaktor zur zyklischen mechanischen Stimulation von Knorpelregeneratgewebe

Abb. 22: Kontinuierliches Monitoring des Verlaufes der Bioreaktorkultivierung in vier parallel betriebenen Bioreaktoren, dargestellt sind die zyklische Rotation der Exzentrerscheibe durch die Lichtschranke („Lichtschranke 1 - 4“) und das unterhalb der Proben gemessene Kraftprofil („Kraftmessdose 1 - 4“)

Dieses neuartige Bioreaktorsystem wurde vor Inbetriebnahme geeicht, in seiner Gesamtheit sterilisiert und konnte aufgrund seiner geringen Abmessungen unter standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, feuchte Atmosphäre) in einer Inkubations-

einheit unter anhaltender Sterilität in mehrwöchigen Kultivierungsperioden betrieben werden, wobei ein Gasaustausch über angeschlossene Sterilfilter vermittelt wurde.

4.5) Kultivierung der Zell-besiedelten Kollagen-Matrizes im Bioreaktor

Die Beschickung des Bioreaktors erfolgte unter der sterilen Arbeitsbank. Nach Abschrauben des Stempels wurden vier der komprimierten Kollagengel-Stanzen in die Kompressionsplätze, die durch runde, 1 cm im Durchmesser und 1 mm in der Tiefe messende leichte Absenkungen in der Grundplatte der Kulturkammer angelegt sind, eingebracht (siehe Abb. 23).

Abb. 23: Beschickung des Bioreaktors mit vier Zell-besiedelten Kollagengel-Stanzen unter sterilen Bedingungen

Anschließend wurde der Stempel wieder auf die Kulturkammer aufgeschraubt und in Höhe und damit Kompressionstiefe adjustiert. Die Stempelhöhe wurde so eingestellt, dass alle Stanzen physikalischen Kontakt mit dem Stempel hatten und somit eine Vorspannung im Sinne einer statischen Druckkomponente erreicht wurde. Über die unterhalb der Probe angeschlossene Kraftmessdose konnte vor Beginn der Kultivierung die statische Vorspannung bestimmt und gegebenenfalls durch Veränderung der Höhe von

Motor und Stempel nachjustiert werden. Dennoch ist zu betonen, dass die Kultivierung der Zell-besiedelten Stanzen Weg-gesteuert erfolgte.

Im Anschluss erfolgte die Bioreaktor-Kultivierung unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) (siehe Abb. 24). Um die Vergleichbarkeit mit den Literaturdaten zu erreichen, wurden dabei folgende Parameter gewählt:

- Frequenz der zyklischen Kompression: 0,3 Hz
- Amplitude des Stempels: 0,3 mm
- Kompressionsgrad der Proben: 10 %
- Zeitdauer der Kultivierung: 14 Tage (entsprechend ca. 360.000 Zyklen).

Abb. 24: Betrieb der beschickten Bioreaktoren in einer Inkubationseinheit

Die tatsächlich auf die Proben einwirkenden Kräfte wurden über die gesamte Kultivierungszeit dargestellt, so dass ein genaues Profil der mechanischen Transduktion der von außen einwirkenden Kräfte innerhalb des Zell-besiedelten Kollagengels im Kultivierungsverlauf erstellt werden konnte.

Die Kontrollgruppe wurde ohne zyklische mechanische Kompression zu ansonsten gleichen Bedingungen in derselben Inkubationseinheit kultiviert (siehe Abb. 25).

Abb. 25: Kultivierung der Kontrollen

Nach Ablauf der Kultivierungsdauer erfolgte die Rückgewinnung der Kollagengel-Proben beider Ansätze unter sterilen Bedingungen. Dabei wurde jeweils eine Stanze der histologischen und molekularbiologischen Aufarbeitung, die verbleibenden zwei Stanzen der biomechanischen Testung zugeführt.

4.6) Aufarbeitung der Proben

4.6.1) Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die Kollagengel-Proben wurden über Nacht in 4 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert, durch eine ansteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Es wurden in der Folge Schnitte von je 5 µm Dicke angefertigt.

Zur Sicherstellung der Spezifität wurden bei allen immunhistochemischen Färbungen Kontrollen mitgeführt, zum einen durch Weglassen des primären Antikörpers, zum anderen durch Färbung zellfreier Matrices.

Eine Färbung mit Hämalun und Safranin O fand nach standardisierten Protokollen statt: Die Einwirkzeit von Hämalun nach Mayer betrug 5 min, auf die Eosin-Gegenfärbung des Zytoplasmas wurde verzichtet. Die Safranin O-Färbung wurde mit einer 0,6 %-igen Lösung über Nacht durchgeführt.

Zur Färbung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen wurden die Schnitte entparaffiniert, mit 0,1% Triton X-100 behandelt (5 min), anschließend mit 10 µg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur inkubiert (10 min) und mit 0,3% Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt (10 min). Durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 1% Normal Goat Se-

rum in PBS erfolgte ein Blocken unspezifischer Bindungen, sodass im Anschluss der spezifische polyklonale Primärantikörper (α -Kollagen I- bzw. α -Kollagen II-Antikörper, Biotrend, Köln, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:750 in Blocklösung aufgetragen und bei 4°C inkubiert werden konnte (über Nacht). Im Anschluss erfolgte die Detektion mit einem Peroxidase-Sekundärantikörper (Histofine, Nichirei Biosciences Inc., Japan) (30 min), gefolgt von der visualisierenden immunhistochemischen Färbung mit Diaminobenzidin (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) (20 min), sodass sich immunpositive Strukturen braun darstellten.

Die Quantifizierung des Typ-II-Kollagen-Gehaltes erfolgte über histomorphometrische Methoden. Histomorphometrie bedeutet, dass lichtmikroskopische morphologische Eigenschaften einer histologischen Probe quantitativ erfasst werden.

Bei 20-facher Vergrößerung wurden jeweils mindestens 10 Zellen, die die vorherrschende Zellmorphologie des Schnittes repräsentativ abbildeten, mit einem Leica-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) in 63-facher Vergrößerung fotografiert. Unter Verwendung der Software Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, USA) wurden die angefärbten zellulären und perizellulären Areale histogrammisch erfasst: Zunächst wurde derjenige Schwellenwert für die Färbung festgelegt, bei dem die angefärbten Areale maximal schwarz und das umgebende Gewebe maximal weiß gepixelt waren (Typ-II-Kollagen-Färbung: Schwellenwert 203). Infolgedessen waren sämtliche Bildpunkte des initial markierten perizellulären Bildfensters (1,5 cm * 1,5 cm) in schwarze (Typ-II-Kollagen-positive) und weiße (Typ-II-Kollagen-negative) Pixel aufgeteilt und es konnte die Quantifizierung der schwarzen in Relation zu den weißen Bildpixeln erfolgen (siehe Abb. 26).

Abb. 26: Beispielhafte Darstellung der histomorphometrischen Quantifizierung mehrerer gefärbter Schnitte (Typ-II-Kollagen-Färbung, Patient 1 [a, b: Stimulation], Patient 3 [c, d: Kontrolle]) vor (a, c) und nach (b, d) Definition des Schwellenwertes, 63-fache Vergrößerung

Proliferierende Zellen wurden über einen polyklonalen rabbit-Ki-67-Antikörper (NeoMarkers, Fremont, USA) indirekt immunhistochemisch dargestellt. Die Schnitte wurden in 10 mM-Zitratpuffer gekocht (15 min), zur Hemmung der endogenen Peroxidase in 0,3 %-Wasserstoffperoxid aufgenommen (10 min) und zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 1 %-Normal Goat Serum in PBS bei Raumtemperatur (1 h) versetzt. Im Anschluss wurde ebenfalls bei Raumtemperatur mit 1:100-verdünntem Ki-67-Antikörper (30 min) und mit 1:200-verdünntem, biotinyliertem goat-anti-rabbit-Sekundärantikörper (1h) inkubiert. Die Visualisierung der Schnitte erfolgte nach der Streptavidin/Biotin-Methode (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und Diaminobenzidin-Färbung (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Proliferierende immunpositive Zellkerne zeigten sich wiederum

braun und waren nach Gegenfärbung mit Methylgrün von nicht-immunpositiven Zellkernen zu unterscheiden.

Der Apoptosegrad der Zellen wurde durch die TUNEL-Färbung bestimmt. Durch Färbung fragmentierter DNA-Abschnitte nach Herstellerangaben (Dead End Colorimetric TUNEL System, Promega, Madison, USA) konnten apoptotische Zellen von nicht-apoptotischen Zellen differenziert werden. Eine Gegenfärbung mit Methylgrün zur bläulich-grünen Darstellung aller Zellkerne wurde angeschlossen.

Alle dargestellten Bilder wurden mit dem oben genannten Leica Mikroskop unter Verwendung der Discus-Software von Leica produziert.

4.6.2) Molekularbiologische Untersuchungen

Die Analyse der mRNA-Expression der Typ-I-Kollagen-, Typ-II-Kollagen-, Aggrecan- und MMP-13-Gene erfolgte in einem mehrschrittigen Verfahren. Nach enzymatischem Verdau der Zell-besiedelten Kollagengel-Stanzen und mehrfacher Zentrifugation und Waschung erfolgte die Isolierung der mRNA mit dem Oligotex Direct mRNA Kit gemäß Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, Deutschland). Aus der isolierten mRNA wurde die komplementäre cDNA durch das SuperScript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA) generiert, sodass nachfolgend die Genexpression über die Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) mit dem LightCycler-System (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) quantifiziert werden konnte. Als interner Standard in Form eines Housekeeping-Gens wurde β -Actin verwendet und die mRNA-Synthese des jeweiligen Gens in Relation zur β -Actin-mRNA-Synthese gesetzt. Die Primer-Sequenzen waren die folgenden: *Typ-II-Kollagen*: 5'-Primer: CTGGTCCTTCTGGCCCTAGAG, 3'-Primer: AAAGGCGGACATGTCTGATG; *Typ-I-Kollagen*: 5'-Primer: GAGGGCCAAGACGAA-GACATCC, 3'-Primer: CACAGAGGGAACCCAGGGAGC; *Aggrecan*: 5'-Primer: ATGCCCAA-GACTACCAGTGG, 3'-Primer: TCCTGGAAGCTCTTCTCAGT; *MMP-13* (Human MMP Primer Kit, Maxim Biotech, USA).

Neben der Analyse der eigentlichen Typ-I-, Typ-II-Kollagen-, Aggrecan- und MMP-13-Genexpression wurde der Quotient aus der Typ-II- und Typ-I-Kollagen-Genexpression (*Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*) bestimmt. Dieser Quotient wird zur Charakterisierung des zellulären Differenzierungsgrades von Chondrozyten herangezogen und dient der Überprüfung der Retention des chondrozytären Phänotyps im Kultivierungsverlauf

(Marlovits et al., 2004; Galois et al., 2006). Steigende *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten sprechen dabei für eine knorpelspezifischere Syntheseaktivität und damit eine Differenzierung in Richtung des chondrozytären Phänotyps, da sich ausdifferenzierte Chondrozyten durch eine hohe Typ-II- und niedrige Typ-I-Kollagen-Synthese auszeichnen. Fallende Quotienten-Zahlenwerte bedeuten einen Verlust des chondrozytären Phänotyps und damit einhergehende Dedifferenzierung.

4.6.3) Biomechanische Untersuchungen

Die biomechanischen Testungen erfolgten am Institut für Allgemeine Mechanik (IAM) der RWTH Aachen. Das Steifigkeits- und Relaxationsverhalten wurde durch unbegrenzte Kompressionsversuche („unconfined compression“) mittels einer hydraulischen MTS-Materialprüfmaschine ermittelt (siehe Abb. 27). Während der Druckversuche wurden sowohl Kräfte als auch entstehende Verschiebungen gemessen.

Abb. 27: Verwendeter Druckprüfstand zur Kompressionsprüfung der Zell-besiedelten Kollagengel-Stanzen, a) Aufbau, b) Darstellung des Kompressionsversuches in Vergrößerung

Zur biomechanischen Untersuchung der verschiedenen Proben eines Patienten (Ausgang, Stimulation, Kontrolle) wurden jeweils Kraft-Zeit-, Weg-Zeit- und Kraft-Dehnungs-Kurven aufgenommen (siehe Abb. 28 und 29). Die mechanische Spannung (σ) ist definiert als Kraft (F) pro Querschnittsfläche (A) und wird in $[\text{N}/\text{mm}^2]$ angegeben.

Die Dehnung (ε) ist definiert als Verminderung der Probenhöhe unter Kompression und kann mit der Formel $\varepsilon = (L - L_0) / L_0$ berechnet werden. Dabei beschreibt L_0 die gemessene Probenausgangshöhe und L die Probenhöhe nach Einwirken der Kraft. Die Dehnung wird in [%] angegeben.

Im Druckversuch wurde die Probe zunächst durch den Stempel um $\frac{1}{3}$ der Probendicke linear gestaucht ($v = 0,5 \text{ mm/s}$), in dieser Position für 20 Sekunden gehalten und anschließend linear entlastet (grüner Graph in Abb. 28, „gemessene Eindringtiefe“). Der Belastung entsprechend nahmen die Kraft und mechanische Spannung der Probe bis zum Maximalwert zu (roter Graph in Abb. 28, „gemessene Kraft“). Bei Relaxation nahmen Kraft und mechanische Spannung annähernd kontinuierlich ab, bis die vollständige Entlastung die Kurve beschloss.

Abb. 28: Beispielhafte Darstellung der Auswertung eines Kompressionsversuchs (Verfahrensgeschwindigkeit $v = 0,5 \text{ mm/s}$, Eindringtiefe $d = 1/3$ der Probendicke)

Um die elastische Steifigkeit der Proben (Ausgang, Stimulation, Kontrolle) durch den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung vergleichend beurteilen zu können, wurde das Ende der Belastungsphase betrachtet. Durch Anlage einer tangential verlaufenden Ausgleichsgerade an die Spannungs-Dehnungs-Kurve in der Endphase der Belastung wurde die elastische Steifigkeit E_s ermittelt (siehe Abb. 29). Dabei war die ermittelte elastische Steifigkeit E_s durch die Funktion $f(x) = s * x + b$ definiert, wobei die Steigung der linearen Funktion die elastische Steifigkeit der Probe angab und in der

Einheit $[N/mm^2]$ angegeben wurde. Zu Beginn der Kompression wurde Flüssigkeit aus der Probe gedrückt, weshalb die Bestimmung der Steifigkeit im Bereich der maximalen Spannung bei Dehnung = 0,33 $[mm/mm]$ erfolgte. Die Messung der elastischen Steifigkeit wurde in Vorarbeiten validiert (Stoffel et al., 2009; Stoffel et al., 2011).

Abb. 29: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der elastischen Steifigkeit (Patient 6, „P552“) unter Be- und Entlastung, a) Kraft(Spannung)-Zeit-Diagramm, b) Spannung-Dehnung-Diagramm. Die ermittelten elastischen Steifigkeitswerte des Patienten betragen $0,15044 N/mm^2$ (Ausgangswert), $0,15800 N/mm^2$ (Bioreaktor) und $0,06473 N/mm^2$ (Kontrolle)

4.6.4) Statistische Untersuchungen

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Statistik der RWTH Aachen. Die ermittelten histologischen, molekularbiologischen und biomechanischen Ergebnisse Werte wurden in Excel-Tabellen (Microsoft® Excel 2002) aufgenommen und mithilfe der statistischen Analysefunktionen des Programmes Graphpad Prism 5 (GraphPad® Software) ausgewertet. Da wegen des geringen Stichprobenumfangs ($n=11$) keine Normalverteilung zu erwarten war, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur statistischen Auswertung durchgeführt. Dieser Test ist ein nichtparametrischer statistischer Test, der u.a. dem Vergleich wiederholter Messungen einer Zellpopulation dient (Wilcoxon, 1945).

Bei den statistischen Untersuchungen wurde ein explorativer Ansatz gewählt. Das Signifikanzniveau wurde für alle durchgeführten statistischen Vergleiche mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Der p-Wert beschreibt, wie glaubhaft H_0 (Annahme, dass kein Unterschied besteht) bei Erhalt dieses Stichprobenergebnisses ist. p-Werte $< 0,05$ sind Anlass, H_0 abzulehnen. Damit wäre der gemessene Unterschied zwischen beiden miteinander verglichenen Stichproben statistisch signifikant, wenn der ermittelte p-Wert unter dem

Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ liegt. Ein statistischer Zusammenhang lässt sich dann zwischen den untersuchten Proben vermuten, bewiesen ist er aber nicht. Über inhaltliche Zusammenhänge gibt die statistische Untersuchung keine Auskunft.

Als weiterer Parameter wurde die relative Änderung Δ der jeweiligen Größe nach 2-wöchiger Kultivierung unter Stimulations- bzw. Kontrollbedingungen in Relation zum Ausgangswert (siehe *Formel 1*) bestimmt:

(<i>Formel 1</i>)	relative Änderung: $\Delta(x) = \frac{X_{2 \text{ Wochen}}}{X_{\text{Ausgang}}}$
---------------------	--

In Bezug auf die relative Änderung der jeweiligen Größe gegenüber dem Ausgangswert bedeutet ein Wert $\Delta > 1$ ($\Delta < 1$) eine Steigerung (Abnahme) der Größe gegenüber dem Ausgangswert.

5) Ergebnisse

5.1) Histologisch-immunhistochemische Eigenschaften des Knorpelersatzgewebes

5.1.1) Typ-II-Kollagen

Die histomorphometrisch erfasste Typ-II-Kollagen-Syntheseleistung der Chondrozyten in der Typ-I-Kollagenmatrix veränderte sich in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Von den 11 untersuchten Patienten konnten 2 Kontrollproben (P 5 und 8) nicht in die Ergebnisfindung miteinbezogen werden, da die Kollagengel-Stanzen am Ende der In-vitro-Kultivierungsphase aufgrund ihrer Konsistenz nicht in die PFA-Fixierung überführt werden konnten.

Im Ganzen wurden mindestens 10 Zellen pro Schnitt histomorphometrisch quantifiziert (Durchschnitt: 11,48 Zellen). Die folgenden Resultate geben das Verhältnis zwischen Typ-II-Kollagen-positiven Pixeln zur Gesamtpixelzahl in dem markierten perizellulären Fenster wieder (siehe Kapitel 4.6.1).

Insgesamt ließ sich eine leichte, allerdings nicht signifikante Steigerung des Typ-II-Kollagen-Gehaltes in der Stimulationsgruppe (PCS [post-cultivation stimulated]: $2,16 \pm 0,80$ % Typ-II-Kollagen-positiver Pixel an Gesamtpixelzahl) gegenüber dem Ausgangswert (PC [pre-cultivation]: $1,82 \pm 0,79$ %) und der Kontrollgruppe (PCU [post-cultivation unstimulated]: $1,81 \pm 0,97$ %) nachweisen (siehe Abb. 30). In den beiden hinsichtlich histologischer Parameter nur begrenzt auszuwertenden Patienten nahm der Typ-II-Kollagen-Gehalt mäßig ab (Pat. 5: 1,92 % [Ausgang]; 1,54 % [Stimulation] bzw. leicht zu (Pat. 8: 2,73 % [Ausgang]; 2,81 % [Stimulation]).

Abb. 30: Typ-II-Kollagen-Gehalt in %, entspricht dem Anteil Typ-II-Kollagen-positiver Pixel an der Gesamtpixelzahl in einem perizellulären Quadrat von 2,25 cm² bei 20-facher Vergrößerung; PC: n = 11, PCU: n = 9, PCS: n = 11

Der Typ-II-Kollagen-Gehalt nahm in Bezug auf die relative Änderung tendenziell in beiden Gruppen zu. Trotz der nicht deutlich unterschiedlichen Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten (Mittelwert der relativen Änderung in der Kontrollgruppe [$\Delta = 1,16 \pm 0,67$] und Stimulationsgruppe [$\Delta = 1,42 \pm 0,79$]) ist ersichtlich, dass die Stimulation mehrheitlich zu einer Zunahme des Typ-II-Kollagen-Gehaltes geführt hat (7/11 Patienten, 64 %), wohingegen unter Kontrollbedingungen lediglich in 44 % (4/9 Patienten) eine Zunahme des Typ-II-Kollagen-Gehaltes zu beobachten war (siehe Abb. 31).

Abb. 31: Relative Änderung des histomorphometrisch bestimmten Typ-II-Kollagen-Gehaltes, $\Delta > 1$ ($\Delta < 1$) bedeutet eine Steigerung (Abnahme) der Größe gegenüber dem Ausgangswert

Abbildung 32 zeigt beispielhaft Bilder immunhistochemisch gefärbter Schnitte eines Patienten. Erkennbar sind vereinzelt in eine schwach gefärbte Matrix eingesiedelte Chondrozyten mit einem perizellulären Nachweis von Typ-II-Kollagen.

Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen, v.a. perizellulär (Pfeile);
 a) Ausgang (PC), b) Kontrolle nach 2 Wochen (PCU), c) Stimulation nach 2 Wochen (PCS) (Vergrößerung x20, Typ-II-Kollagenfärbung)

Im Rahmen der histologischen Auswertung fiel zudem eine Zonierung der Zellbesiedelten Matrices hinsichtlich des Typ-II-Kollagen-Gehaltes auf. Generell war erkennbar, dass unter Stimulationsbedingungen kultivierte Proben einen deutlicheren positiven Typ-II-Kollagen-Nachweis an der durch den Stempel zyklisch komprimierten Oberseite aufwiesen als unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 33).

Abb. 33 a

oben

mittig

unten

Abb. 33 b

Abb. 33: a) Schematische Darstellung der Probenzonierung hinsichtlich des Typ-II-Kollagen-Nachweises, b und c) Histologische Bilder zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Probenzonierung in Kontroll- (b) und Stimulationsproben (c) (Vorversuch unter Studien-analogen Kultivierungsbedingungen, 5-fache Vergrößerung, Col-II-Färbung)

5.1.2) Typ-I-Kollagen

In Bezug auf den Typ-I-Kollagen-Gehalt konnten von den 11 untersuchten Patienten 2 Kontrollproben (P 5 und 8) -aus den gleichen Gründen, die auch eine Typ-II-Kollagen-Färbung verhinderten (siehe oben)- nicht ausgewertet werden. Beispielhaft stellt Abbildung 34 die histologischen Ergebnisse nach Typ-I-Kollagen-Färbung dar. Methodisch bedingt erschwert die Hintergrundfärbung des Typ-I-Kollagengels eine Differenzierung von Typ-I-Kollagen-positiv gefärbten Strukturen, die akzentuiert und primär perizellulär beobachtet werden konnte.

Abb. 34: Beispielhafte Darstellung der Typ-I-Kollagen-Färbung, Patient 4, PCS, 5-fache Vergrößerung

5.1.3) Apoptose und Proliferation

Die immunhistochemisch bestimmte Vitalität der Chondrozyten wurde qualitativ erfasst. Das zelluläre Apoptose- und Proliferationsverhalten war in etwa vergleichbar in allen Gruppen. Abbildungen 35 und 36 zeigen beispielhaft die histologischen Ergebnisse der Apoptose- (siehe Abb. 35) und Proliferationsfärbung (siehe Abb. 36).

Abb. 35: Beispielhafte Darstellung der TUNEL-Färbung, dargestellt sind vitale (1) und apoptotische (2) Zellen, Patient 3, Kontrolle, 20-fache Vergrößerung

Abb. 36: Beispielhafte Darstellung der Ki67-Färbung, dargestellt sind proliferativ inaktive (1) und proliferierende Zellen (2), Patient 3, a) Kontrolle, b) Stimulation, 20-fache Vergrößerung

5.1.4) Hämalan und Safranin O

Die Hämalan-Färbung dient als Übersichtsfärbung und stellt alle basophilen Strukturen blau dar, wohingegen Safranin O das nukleäre Chromatin und Proteoglykane der EZM hellrot anfärbt. Die Proteoglykansynthese war in etwa ähnlich zwischen Kontroll- und Stimulationsbedingungen, wobei eine tendenziell kräftigere und homogenere Proteoglykandeposition in stimulierten Proben erkennbar war (siehe Abb. 37).

Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung der Safraninfärbung zur Beurteilung der Proteoglykandeposition im Knorpelregeneratgewebe, a) Kontrollprobe (PCU), b) Stimulationsprobe (PCS). Patient 3, 20 x Vergrößerung.

Anhand der Hämalaun- und Safranin O-Färbung konnte die Zell- und Zellkernmorphologie im Kultivierungsverlauf evaluiert werden. In Bezug auf die Zellmorphologie war in Ausgangsproben fast durchgängig der typische rundlich-ovaläre Morphotyp der einzeln liegenden Chondrozyten erkennbar (siehe Abb. 38a, 39a). In Kontrollen kam dieser Morphotyp ebenfalls häufig zur Darstellung, allerdings gab es einige Chondrozyten, die einen elongiert-fibroblastoiden Morphotyp aufwiesen (siehe Abb. 38b, 39b). Stimulationsproben wiesen seltener fibroblastoide Zellen auf, gleichwohl kamen wiederholt in Größe oder Form abnorme ovaloide Chondrozyten vor (siehe Abb 38c, 39c).

Abb. 38: Veränderung der Zellkernmorphologie: a) PC, b) PCU, c) PCS. Safranin O-Färbung, Patient 4, 20x Vergrößerung.

Abb. 39: Beispielhafte Darstellung der Hämalaun-Färbung im Kultivierungsverlauf, a) PC, b) PCU, c) PCS, Patient 2, 20-fache Vergrößerung

5.2) Zelluläre Genexpression in Knorpelersatzgewebe

5.2.1) Typ-II-Kollagen-Genexpression

Die gemittelte zelluläre Typ-II-Kollagen-Genexpression war interindividuell hochgradig variabel. In den Ausgangsproben schwankte die mittlere Typ-II-Kollagen-Genexpression um den Faktor 284, diese Schwankungen setzten sich unter Kontroll- (Faktor 294) und Stimulationsbedingungen (Faktor 601) fort (siehe Kapitel 5.2.6). Die in Bezug auf den immunhistochemisch bestimmten Typ-II-Kollagen-Gehalt ermittelte Steigerung im Verlauf der Kultivierung ließ sich in der Typ-II-Kollagen-Genexpression ebenfalls nachweisen. Gegenüber den Ausgangswerten ($12,78 \pm 28,34$ ng/ng β -Actin) stiegen die Mittelwerte der Typ-II-Kollagen-Genexpressionsraten in der Kontroll- ($39,66 \pm 80,00$ ng/ng β -Actin) und Stimulationsgruppe ($58,81 \pm 93,03$ ng/ng β -Actin) (siehe Abb. 40), in ersterer statistisch signifikant ($p = 0,042$), in zweiterer nicht statistisch signifikant ($p = 0,0537$).

Abb. 40: Typ-II-Kollagen-Genexpression in allen Gruppen [ng/ng β -Actin], $n = 11$

Hinsichtlich der relativen Änderung der Typ-II-Kollagen-Synthese ist eine Zunahme unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen zu erkennen. Die Mittelwerte der relativen

Änderungen liegen im positiven Bereich ($\Delta = 6,97 \pm 5,96$ [Kontrolle]; $\Delta = 19,48 \pm 24,26$ [Stimulation]). Abbildung 41 veranschaulicht zudem, dass beide Behandlungsmodalitäten die Typ-II-Kollagen-Synthese in bedeutendem Maße steigern konnten, denn eine mehr als Verfünffachung derselbigen gegenüber dem Ausgangswert hat in 55 % (Kontrollen, 6/11 Patienten) bzw. 73 % (Stimulation, 8/11 Patienten) stattgefunden, eine mehr als Verzehnfachung in 27 % (Kontrollen, 3/11 Patienten) bzw. 55 % (Stimulation, 6/11 Patienten).

Abb. 41: Relative Änderung der Typ-II-Kollagen-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

5.2.2) Typ-I-Kollagen-Genexpression

Die nachgewiesene Menge an Typ-I-Kollagen-mRNA ist -wie die Typ-II-Kollagen-Genexpression- interindividuell stark unterschiedlich. Die mittlere Menge synthetisierter Typ-I-Kollagen-mRNA schwankte beträchtlich, in den Ausgangsproben um den Faktor 3754, in den Kontrollproben um den Faktor 66 und in den Stimulationsproben um den Faktor 1132 (siehe Kapitel 5.2.6).

Gegenüber dem Ausgangswert ($126,40 \pm 250,23$ ng/ng β -Actin) stiegen die Typ-I-Kollagen-Genexpressionsraten im Mittel sowohl in der Kontroll- ($454,59 \pm 892,63$ ng/ng β -Actin) als auch in der Stimulationsgruppe ($655,69 \pm 1190,96$ ng/ng β -Actin) (siehe Abb.42). Der Unterschied zwischen Ausgangs- und Kontrollgruppe ist statistisch signifikant ($p = 0,0420$).

Abb. 42: Typ-I-Kollagen-Genexpression in allen Gruppen [ng/ng β -Actin], $n = 11$

Dementsprechend sind die Werte der relativen Änderungen der Typ-I-Kollagen-Synthese unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen positiv. Kein deutlicher Unterschied ergibt sich in Bezug auf die Mittelwerte der relativen Änderungen (Kontrolle: $\Delta = 16,31 \pm 29,87$; Stimulation: $\Delta = 19,57 \pm 25,52$) (Abb. 43). Dieser Anstieg entspricht auch dem Trend in der gesamten Kohorte, denn lediglich ein Patient (P 5) zeigte unter beiden Kultivierungsbedingungen eine Abnahme der Typ-I-Kollagen-Synthese ($\Delta < 1$).

Abb. 43: Relative Änderung der Typ-I-Kollagen-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

5.2.3) Col-II/Col-I-Quotient

Von vorherrschenden Kultivierungsbedingungen unabhängig verloren die eingebrachten Chondrozyten im Verlauf der Kultivierung teilweise ihren Phänotypen (siehe Abb. 44): Die Zellen der Ausgangsproben wiesen im Mittel einen deutlich höheren *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten auf ($0,227 \pm 0,425$) als Kontroll- ($0,097 \pm 0,046$) und Stimulationsproben ($0,128 \pm 0,038$). Unter Stimulationsbedingungen war der *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotient dennoch signifikant höher als unter Kontrollbedingungen ($p = 0,0186$).

Abb. 44: *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten in Ausgangs-, Kontroll- und Stimulationsproben, n=11

Bei eingehender Verlaufsuntersuchung des *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen ist erkennbar, dass zyklische mechanische Kompression in 82 % der Patienten (9/11 Patienten) den Kontrollbedingungen ohne Mechanostimulation in Bezug auf die Retention des chondrozytären Phänotyps überlegen ist (siehe Abb. 45).

Abb. 45: Verlauf des *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten in der Betrachtung des einzelnen Patienten im Vergleich zwischen Kultivierung unter Kontroll- (links) und Stimulationsbedingungen (rechts)

5.2.4) Aggrecan-Genexpression

Die Quantifizierung der Aggrecan-mRNA-Expression konnte nicht in allen Proben erfolgen (Ausgangsprobe: Patienten 5, 7 und 8; Stimulation: Patienten 4 und 8). Dennoch war ein Trend erkennbar: Beide Behandlungsmodalitäten haben im Mittel zu gesteigerter zellulärer Aggrecan-Synthese (Kontrolle: $1,78 \pm 4,44$ ng/ng β -Actin, Stimulation: $1,11 \pm 2,10$ ng/ng β -Actin) gegenüber dem Ausgangswert ($0,97 \pm 1,66$ ng/ng β -Actin) geführt (siehe Abb. 46), allerdings in keiner Beziehung statistisch signifikant.

Abb. 46: Aggrecan-Genexpression [ng/ng β -Actin], $n_{PC} = 8$, $n_{PCU} = 11$, $n_{PCS} = 9$

Die Mittelwerte der relativen Änderungen der Aggrecan-Synthese sind infolgedessen positiv (Kontrolle: $\Delta = 16,97 \pm 39,18$, Stimulation: $\Delta = 48,98 \pm 116,42$) (siehe Abb. 47). Allerdings zeigten zwei Patienten (P 2 und 11) unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen eine Abnahme der Aggrecan-Synthese.

Abb. 47: Relative Änderung der Aggrecan-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

5.2.5) MMP-13-Genexpression

Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13) ist eine Kollagenase, die am Umsatz der Extrazellulärmatrix beteiligt ist und deren Expression als Indikator der Arthroseprogredienz von Knorpelgewebe dient. In der vorliegenden Studie diente MMP-13 als Maß der katabolen Stoffwechselvorgänge. Die Bestimmung der MMP-13-Genexpression erfolgte vor dem Hintergrund der Frage, ob die Kultivierungsmodalität (Kontroll-, Stimulationsbedingungen) die katabole Aktivität der eingesiedelten, zumindest partiell arthrotisch vorgeschädigten Zellen und damit die Qualität des Knorpelregeneratgewebes beeinflusst.

Die Quantifizierung der MMP-13-mRNA-Expression im Verlauf zeigte im Mittel eine statistisch nicht signifikant gesteigerte zelluläre MMP-13-Synthese (Kontrolle: $0,49 \pm 1,34$ ng/ng β -Actin, Stimulation: $0,83 \pm 1,61$ ng/ng β -Actin) gegenüber dem Ausgangswert ($0,15 \pm 0,31$ ng/ng β -Actin) (siehe Abb. 48).

Abb. 48: MMP-13-Genexpression in Ausgangs-, Kontroll- und Stimulationsproben; n = 11

Demgemäß sind die relativen Änderungen der MMP-13-Synthese unter beiden Behandlungsmodalitäten positiv und deutlich unterschiedlich; es ergaben sich folgende Mittelwerte der relativen Änderungen: Kontrollgruppe [$\Delta = 4,68 \pm 9,48$]; Stimulationsgruppe [$\Delta = 15,65 \pm 21,43$] (siehe Abb. 49).

Eine Konstanz der MMP-13-Genexpression, definiert als relative Änderung ± 20 % gegenüber dem Ausgangswert [$\Delta(x) = 0,8 < x < 1,2$], war unter Kontrollbedingungen bei 27 % (3/11 Patienten), unter Stimulationsbedingungen bei keinem Patienten zu beobachten. In 36 % (Kontrollen, 4/11 Patienten) bzw. 45 % (Stimulation, 5/11 Patienten) nahm die MMP-13-Genexpression ab, wohingegen in 36 % (Kontrollen, 4/11 Patienten) bzw. 55 % (Stimulation, 6/11 Patienten) eine Zunahme nachweisbar war (siehe Abb. 49).

Abb. 49: Relative Änderung der MMP-13-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

5.2.6) Weitere Untersuchung des Genexpressionsniveaus

Zur weitergehenden Analyse der zellulären Syntheseleistung in Bezug auf die untersuchten Gene, Zeitpunkte und Behandlungsmodalitäten wurde die Range der Expressionswerte in der jeweiligen Gruppe und daraus abgeleitet der maximale Faktor bestimmt, um den diese Expressionswerte schwanken. Der Wert 284 (Ausgang, Col II) bedeutet demnach, dass zwischen höchstem (Patient 5; 96,62 ng Col II/ng β -Actin) und niedrigstem Genexpressionswert (Patient 11; 0,34 ng Col II/ng β -Actin) ein maximaler Faktor von 284 besteht, der den Unterschied im Genexpressionsniveau in den Ausgangsproben in Bezug auf Typ-II-Kollagen beschreibt.

Diese maximalen Faktoren hinsichtlich des Genexpressionsniveaus sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Maximaler absoluter Faktor, um den sich das Genexpressionsniveau der einzelnen Patienten in der respektiven Gruppe unterscheidet

Gen	Ausgang (PC)	Kontrolle (PCU)	Stimulation (PCS)
Col II	284	294	603
Col I	3755	66	1132
AGC	219	1492	179
MMP-13	486	1343715	451136

5.3) Auswirkungen von zyklischer mechanischer Kompression auf biomechanische Eigenschaften von in-vitro-generiertem Knorpelersatzgewebe

Von den 11 untersuchten Patienten konnte ein Patient nicht (P 8) und ein zweiter Patient nur mit Ausgangs- und Stimulationsprobe (P 7) in die biomechanische Auswertung einbezogen werden, da die Qualität der Proben einen *unconfined compression*-Test nicht ermöglichte.

Die 14-tägige Kultivierung beeinflusste die elastische Steifigkeit des in-vitro-generierten Knorpelersatzgewebes. Die elastischen Steifigkeiten der Ausgangsproben ($0,214 \pm 0,135 \text{ N/mm}^2$) waren höher als die elastischen Steifigkeiten der Kontroll- ($0,102 \pm 0,115 \text{ N/mm}^2$) und Stimulationsproben ($0,092 \pm 0,071 \text{ N/mm}^2$), in Bezug auf letztere sogar statistisch signifikant ($p = 0,0273$) (siehe Abb. 50).

Abb. 50: Mittelwerte und Standardabweichungen der elastischen Steifigkeiten; PC: n = 10, PCU: n = 9, PCS: n = 10.

Mehrheitlich nimmt die elastische Steifigkeit in beiden Gruppen ab, lediglich in 2 Patienten (Kontrollgruppe: P 2 und 9) bzw. 3 Patienten (Stimulationsgruppe: P 4, 6 und 11) nimmt die elastische Steifigkeit zu (siehe Abb. 51).

Im Mittel sind eindeutige relative Änderungen der Steifigkeit in der Kontroll- ($\Delta = 0,526 \pm 0,456$) bzw. Stimulationsgruppe ($\Delta = 0,655 \pm 0,641$) zu verzeichnen. Diese Abnahme erfolgte in 45,5 % (Kontrolle, 5/11 Patienten) bzw. 54,5 % (Stimulation, 6/11 Patienten) auf weniger als 50 % der Ausgangssteifigkeit ($\Delta < 0,5$).

Abb. 51: Relative Änderung der Steifigkeit gegenüber Ausgangswerten, Werte > 1 (< 1) bedeuten Zunahme (Abnahme) der Steifigkeit gegenüber Ausgangsproben

Bei allen untersuchten Patienten konnten die auf die Probe tatsächlich einwirkenden Kräfte über die angeschlossene Kraftmessdose gemessen und in Echtzeit dargestellt werden. Über das dargestellte Kraftprofil konnte die auf die Proben einwirkende Kraft über den gesamten Kultivierungsverlauf etwa gleich gehalten werden; im Mittel wirkten etwa 1 N auf die Proben ein. Da die Kraftmessung unterhalb der Proben erfolgte, konnte hierdurch sichergestellt werden, dass die applizierte mechanische Belastung auf die gesamte Probe Einfluss hatte. Dennoch muss an dieser Stelle betont werden, dass die Stimulation der Proben dennoch exakt Weg-gesteuert erfolgte (0,3 mm Kompressionsweg bei 3 mm Probenursprungshöhe).

6) Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind Chondrozyten in eine Typ-I-Kollagen-Matrix eingebracht, unter zyklischer Kompression über zwei Wochen kultiviert und anschließend hinsichtlich der spezifischen Zellfunktionen Syntheseleistung, Matrix-Umsatz, Proliferation und Apoptose untersucht worden. Es konnte nachgewiesen werden, dass zyklische mechanische Kompression das Remodelling des Knorpelregeneratgewebes in einem Kultivierungszeitraum von 14 Tagen im Hinblick auf die zellulären Syntheseleistungen und Funktionszustände modifiziert. Die Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps konnte sowohl im Hinblick auf das histologische Erscheinungsbild als auch auf das zelluläre Genexpressionsniveau festgestellt werden. Allerdings nahm die elastische Steifigkeit der Zell-besiedelten Regenerate im Kultivierungsverlauf deutlich ab. Ursächlich für die beobachteten Effekte kann eine Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren sein, die entweder einzeln oder im Zusammenspiel ihre Wirksamkeit entfaltet haben. So gilt es im Folgenden, die Rolle des stimulatorischen Mechanismus in Form von zyklischer mechanischer Kompression, des Typ-I-Kollagen-Hydrogels als Trägersubstanz und dessen physikochemische Eigenschaften, des degenerativ-arthrotisch vorgeschädigten Knorpelgewebes als Zellquelle und des verwendeten Kultivierungs- und Stimulationsprotokolls in dieser Hinsicht zu beleuchten.

6.1) Mechanostimulation als stimulatorischer Mechanismus

Mechanische Belastungen unterschiedlicher Art beeinflussen den Metabolismus von Chondrozyten, so dass sich Knorpelgewebe in Struktur, Zusammensetzung und Biomechanik an die funktionellen Anforderungen anpasst. Direkte Krafteinleitung im Sinne einer Kompression bedingt die makroskopische Deformierung des Zell-Matrix-Konstruktes, übersetzt sich in differenzierte mechanische Stimuli auf zellulärer Ebene und beeinflusst zelluläre Funktionen. Dieser Effekt konnte durch zahlreiche In-vivo-Studien belegt werden, u. a. wird ein erhöhter Proteoglykan-Gehalt des Knorpelgewebes durch moderate Belastung induziert (Kiviranta et al., 1988). Im Umkehrschluss führt eine verminderte Mobilisierung von Gelenken zu einer Atrophie des Knorpels, die sich in einem Verlust der Proteoglykane äußert (Palmoski et al., 1979).

In vitro-Studien konnten nachweisen, dass statische Belastung von Knorpelimplantaten zu einer verminderten Matrix-Synthese führt, wohingegen zyklische Belastungen sowohl die Proteoglykan- als auch die Kollagen-Synthese in Abhängigkeit von Belastungsparametern wie Frequenz, Amplitude, Kraft und Kultivierungsdauer steigern können (Sah et al., 1989). Der einschlägigen Literatur zum Thema ist zu entnehmen, dass zyklische mechanische Kompression von Knorpelregeneratgewebe ähnliche Auswirkungen auf zelluläre Vorgänge hat wie zyklische mechanische Kompression von Nativknorpelimplantaten (Buschmann et al., 1995; Lee et al., 2003), sodass die Erkenntnisse zu den ursächlichen zellulären Antworten auf mechanische Einwirkung vergleichbar sind und das entwickelte und vorgestellte Kompressionsbioreaktorsystem folglich in Fragen der Grundlagen- und klinischen Forschung Anwendung finden kann. Der Umstand, dass die Kultivierung von Chondrozyten hinsichtlich der Syntheseleistung nahezu gleichwertig in einer artifiziellen Matrix geschehen kann, wird damit erklärt, dass Chondrozyten in einer EZM-ähnlichen Struktur ihre spezifische Morphologie erhalten und der differenzierte Phänotyp nicht verloren geht (Benya et al., 1982).

Welche weiterführenden Erkenntnisse erbringt die vorliegende Arbeit?

6.1.1) Uneinheitlichkeit der zellulären Antwort

Auffallend ist das generell variable Ansprechen der Chondrozyten einzelner Patienten auf mechanische Stimulation in Bezug auf die Expression spezifischer Gene. Mechanische Stimulation hat lediglich in einer Minderheit der Patienten zu gesteigerter Typ-II-Kollagen-Genexpression gegenüber Kontrollbedingungen geführt, ähnlich uneinheitlich stellt sich die Stimulierbarkeit der Aggrecan- und MMP-13-Synthese dar. Andererseits hat mechanische Stimulation in einer Mehrheit der Patienten zu einer geringeren Steigerung der Typ-I-Kollagen-Synthese geführt als in unstimulierten Kontrollen. Ein weiterer Parameter verdeutlicht die Uneinheitlichkeit der zellulären Antwort auf mechanische Stimulation. Unter Stimulationsbedingungen weist das Typ-I- und -II-Kollagen-Genexpressionsniveau große Schwankungen hinsichtlich der Mechanoresponsivität auf, ablesbar anhand des maximalen Faktors, um den sich das Genexpressionsniveau unterscheidet.

Diese interindividuelle Variabilität im Umgang mit humanen Chondrozyten unter mechanostimulatorischen Einflüssen ist vorbeschrieben (Barbero et al., 2002; Demartean

et al., 2003) und ein Hauptproblem, das es zu lösen gilt auf dem Weg zu reproduzierbaren und standardisierten Tissue Engineering-Verfahren.

6.1.2) Typ-II-Kollagen

Obwohl Typ-II-Kollagen das zentrale und sich für die charakteristischen mechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe verantwortlich zeichnende Extrazellulärmatrix-Protein ist, scheint die chondrozytäre Genexpression durch das im Rahmen dieser Studie verwendete Stimulationsprotokoll nicht durchweg stimulierbar. In dem vorliegenden Versuch war zwar der Mittelwert der Typ-II-Kollagen-Genexpression unter zyklischer Stimulation deutlich erhöht gegenüber unstimulierten Kontrollen, allerdings nicht statistisch signifikant und lediglich in 5 von 11 Patienten. Diese Beobachtung reiht sich ein in die Reihe insgesamt widersprüchlicher Ergebnisse: Mauck et al. konnten in einem Agarose-Hydrogel-System nachweisen, dass durch zyklische Kompression die Promotor-Aktivität des Typ-II-Kollagen-Gens im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen herabgesetzt war (Mauck et al., 2007). Eine verminderte Typ-II-Kollagen-Genexpression beobachteten auch andere Autoren, sowohl in einer Typ-I-Kollagen-Gel-Matrix (Hunter et al., 2002) als auch in einer Polyurethan-Matrix (Wang et al., 2009). Wiederum andere Autoren hingegen beobachteten eine erhöhte Aktivität des Typ-II-Kollagen-Promotors unter zyklischer Kompression (Fitzgerald et al., 2006; Xie et al., 2006). Die Uneinheitlichkeit der zellulären Antwort auf zyklische Belastung liegt darin begründet, dass zum Teil deutliche Unterschiede in Bezug auf die verwendeten Matrices, Chondrozytenpopulationen und Belastungsprotokolle bestanden. Es ist bekannt, dass die chondrozytäre Syntheseleistung maßgeblich durch die biochemische und -mechanische Umgebung modifiziert wird, wodurch die Verschiedenheit der beobachteten mechanostimulatorischen Effekte erklärbar wird. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um das in Bezug auf die Typ-II-Kollagen-Syntheseleistung optimale Kompressionsprotokoll zu etablieren.

Da die zelluläre Genexpressionsrate lediglich ein Maß für die gepoolte Syntheseleistung aller Chondrozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt ist, wurde zusätzlich eine histomorphometrische Quantifizierung des Typ-II-Kollagen-Gehaltes vorgenommen zur Abschätzung der kumulativen Typ-II-Kollagen-Syntheseleistung der einzelnen Zelle. Der Typ-II-Kollagen-Gehalt war unter zyklischer Kompression im Mittel leicht gesteigert,

allerdings nicht statistisch signifikant. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die 14-tägige Bio-reaktorkultivierung unter zyklischer Kompression nicht nur transiente Remodellingvorgänge in Gang setzt.

Weder die Typ-II-Kollagen-Genexpression noch die quantifizierte Typ-II-Kollagenfaser-synthese war unter Stimulationsbedingungen statistisch signifikant verändert im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Diese Unabhängigkeit der chondrozytären Genexpression von Schwankungen der mechanischen Umgebung beruht auf der Stabilisierung der Genproduktsynthese durch post-transkriptionelle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Lee et al., 2006). Weder Hunter et al. noch Wang et al. konnten nach 24 h einen Unterschied in Bezug auf die Typ-II-Kollagen-Genexpression gegenüber Kontrollen beobachten (Hunter et al., 2002; Wang et al., 2009). Bei längerer Kultivierungsdauer wurde festgestellt, dass das Gewebe mechanoresponsiv und die Typ-II-Kollagen-Genexpression wiederum ansteigend war (Mauck et al., 2007). Andere Autoren konnten keine Unterschiede in der Genexpression zwischen mechanischer Stimulation und Kontrollen innerhalb der ersten 7 Tage feststellen (Nicodemus et al., 2008). In Bezug auf den Kollagengehalt hingegen konnten Waldman et al. einen deutlichen Anstieg um 37 % nach 1-wöchiger bzw. um 40 % nach 4-wöchiger Kultivierungsdauer nachweisen, wobei das verwendete intermittierende Stimulationsprotokoll lediglich 400 Kompressionszyklen an jedem 2. Tag vorsah. Ähnliche Ergebnisse erhielt auch Mauck (Mauck et al., 2000). In der Zusammenschau scheint sich die Kinetik der Typ-II-Kollagen-Genexpression erst im fortgeschrittenen Kultivierungsverlauf zu verändern. Die in der vorliegenden Studie vorgenommene 14-tägige Kultivierung unter Stimulationsbedingungen ergab demnach Veränderungen, die allerdings tendenzieller Natur sind. Weiteren Studien bleibt daher vorbehalten, Genexpressionsprofile unter längerfristiger Kultivierung zu erstellen und damit weitere Erkenntnisse zu Mechanostimulation und -responsivität, insbesondere in Bezug auf die Typ-II-Kollagen-Genexpression, zu erhalten.

6.1.3) Aggrecan

Aggrecan, neben Typ-II-Kollagen ein weiteres wesentliches Strukturprotein hyalinen Knorpels, bildet durch Bindung an Hyaluronsäure große Knorpel-spezifische Proteogly-

kanaggregate und bedingt die osmotischen Eigenschaften und außergewöhnliche Belastbarkeit dieses Gewebes (Mankin et al., 2007).

Die von uns vorgenommene Kultivierung von Chondrozyten in einer Typ-I-Kollagen-Matrix zeigte, dass die Aggrecan-Genexpression unter Stimulationsbedingungen zwar gesteigert war, allerdings weder im Vergleich zu den Ausgangs- noch zu den Kontrollproben statistisch signifikant.

In Bezug auf den Einfluss von Mechanostimulation auf die Aggrecan-Synthese sind die Literaturdaten heterogen, denn in einem vergleichbaren Setup konnten Hunter et al. keine signifikante Veränderung der Aggrecan-Genexpression feststellen, jedoch nur über einen untersuchten Zeitraum von maximal 24 h und im nicht-arthrotischen bovinen System (Hunter et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Bioreaktorkultivierung von Chondrozyten, die zuerst in ein Kollagengel eingekapselt und anschließend in eine Polyurethan-Matrix eingebracht worden sind, dass die Einkapselung in ein Kollagengel den Anstieg der zellulären Aggrecan-Genexpression erheblich verzögerte, nichtsdestotrotz durch mechanische Stimulation eine statistisch signifikante Steigerung der Aggrecan-Genexpression zu induzieren war (Wang et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Arbeitsgruppen (Mauck et al., 2007). Die gesteigerte Genexpression war nur für die Dauer der Belastung aufrechtzuerhalten, nach dem Ende der Belastung verschwand der stimulatorische Effekt (Wang et al., 2009). Des Weiteren wird der Aggrecan-Promotor durch zyklische Kompression direkt aktiviert (Mauck et al., 2007).

Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, die Proteoglykansynthese unter differenzierten Stimulationsprotokollen weiter aufzuklären.

6.1.4) Typ-I-Kollagen

Typ-I-Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil von geschädigtem und Faserknorpel. Erhöhte Typ-I-Kollagen-Genexpression von in vitro-kultivierten Chondrozyten ist ein Zeichen der zellulären Dedifferenzierung.

Vor diesem Hintergrund war ein Ziel der vorliegenden Studie, durch Kultivierung unter zyklischer Kompression die Retention des chondrozytären Phänotyps zu unterstützen. Diesem Anspruch an die pro-differenzierende Wirksamkeit des Bioreaktors wurde das System insofern nicht gerecht, als dass bei nur einem Patienten eine Reduktion der

Typ-I-Kollagensynthese zu beobachten war. Dem entspricht der recht deutliche Anstieg der Typ-I-Kollagen-Genexpression unter beiden Behandlungsmodalitäten, wobei der Unterschied zwischen der mittleren Ausgangs- und Kontroll-Typ-I-Kollagensynthese ein statistisch signifikanter war. Trotzdem fiel mehrheitlich die Steigerung unter Stimulations- schwächer aus als unter Kontrollbedingungen.

Die Bestimmung des *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten dient zur feineren Erfassung des zellulären Differenzierungsstatus (Marlovits et al., 2004; Galois et al., 2006). Eine moderate Dedifferenzierungsneigung, angezeigt durch niedrigere *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotienten, war sowohl in der Stimulations- als auch in der Kontrollgruppe zu beobachten. Nichtsdestotrotz wirkt zyklische mechanische Kompression einer zellulär-funktionellen Dedifferenzierung entgegen, denn zum einen ist der *Col-II-Synthese/Col-I-Synthese*-Quotient in der Stimulationsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe und zum anderen sind Stimulationsbedingungen gegenüber Kontrollbedingungen hinsichtlich der Retention des chondrozytären Phänotyps in Bezug auf die relative Änderung und die absoluten Patientenzahlen überlegen.

Die Differenzierungswirkung von Mechanostimulation ist gut belegt, vor allem im Sinne einer chondrogenen Redifferenzierung von un- und dedifferenzierten Chondrozyten. In Bezug auf adulte Chondrozyten hat die Kultivierung einer dedifferenzierten Chondrozytenpopulation unter zyklischer Kompression redifferenzierende Auswirkungen, sowohl im kaninen (Lee et al., 2003) als auch im humanen System (Demartea et al., 2003). Dennoch gilt zu berücksichtigen, dass adulte humane Chondrozyten nach forcierter in vitro-Kultivierung eingeschränkt sind in Bezug auf die Redifferenzierungskapazität und die Fähigkeit, chondrales Gewebe zu generieren (Jakob et al., 2001; Verzijl et al., 2001).

Wie kommt es dennoch zu der moderaten zellulären Dedifferenzierung und der Faserknorpel-typischen Typ-I-Kollagen-Synthese? Zum einen bedingt der Transfer der artikulären Chondrozyten aus der nativ-physiologischen Extrazellulärmatrix in die künstliche Typ-I-Kollagen-Matrix eine nicht unerhebliche Dedifferenzierung. Dies wird durch Beobachtungen aus der Literatur unterstützt, denn über den gleichen Zeitraum wie in der vorliegenden Studie (14 Tage) in einer Typ-I-Kollagen-Matrix präkultivierte bovine Chondrozyten zeigten deutliche Veränderungen im Sinne einer zellulären Dedifferenzierung: Abnahme der Typ-II-Kollagen- und Aggrecan-Genexpression bei Zunahme der Typ-I-Kollagen-Genexpression (Hunter et al., 2002). Außerdem wurde beobachtet, dass

Chondrozyten eine gesteigerte Typ-I-Kollagen-Genexpressionsrate in einem Typ-I-Kollagen-Hydrogel-System aufwiesen (Galois et al., 2006; Malicev et al., 2007). Direkte Kollagengel-Umkapselung von Chondrozyten verstärkte die zelluläre Dedifferenzierung, auch unter zyklischer Stimulation (Wang et al., 2009). Es findet sich somit verdichtete Evidenz, dass eine Typ-I-Kollagen-haltige Matrix-Umgebung die zelluläre Typ-I-Kollagen-Genexpression induziert. Des Weiteren bedingt nicht zuletzt eine Gel-ähnliche Konsistenz der Trägersubstanz eine per se gesteigerte Typ-I-Kollagen-Synthese unter Stimulationsbedingungen (Lee et al., 2005). Weitere Aspekte der Matrix und ihrer Charakteristika werden im Folgenden erörtert.

Weitere ursächliche Faktoren werden in den folgenden Kapiteln erörtert, denn neben der Typ-I-Kollagen-Matrix können sowohl der zumindest teilweise arthrotisch vorgeschädigte Knorpel als auch das verwendete Stimulations- und Kultivierungsprotokoll dedifferenzierend wirken.

6.1.5) MMP-13

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Enzyme, die Bestandteile der Extrazellulärmatrix abbauen und somit in den Matrix-Turnover von Knorpelgewebe involviert sind. Sowohl MMP-13-Genexpression als auch -Gehalt sind in arthrotischen Knorpel nachweislich gesteigert, so dass MMP-13 eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Arthrose spielt (Mitchell et al., 1996). Die MMP-13-Expression ist bei hochgradiger Arthrose signifikant erhöht gegenüber niedriggradiger Arthrose und Knorpelgesunden (Bau et al., 2002). Außerdem konnten Arthrose-ähnliche degenerative Veränderungen in transgenen Mäusen, die MMP-13 überexprimierten, induziert werden (Neuhold et al., 2001). MMP-13 ist damit als Marker des Matrix-Turnovers und der Arthroseprogredienz anzusehen.

In der vorliegenden Studie war die MMP-13-Genexpression unter Bioreaktor-Kultivierung gesteigert gegenüber Kontrollbedingungen, zum Teil sogar sehr deutlich. Zu der Fragestellung, wie sich die chondrozytäre MMP-13-Syntheseleistung unter mechanischer Belastung verhält, liegen einige Beobachtungen vor. Isolierte Chondrozyten reagieren auf mechanische Belastung mit einer gesteigerten Metalloproteinase-Genexpression (Mow et al., 1999), wohingegen die MMP-13-Genexpression von Chondrozyten in Nativknorpelimplantaten von mechanischer Belastung unbeeinflusst

bleibt (Fehrenbacher et al., 2003). Bovine, nicht-arthrotische Chondrozyten zeigen bei unstimulierter Kultivierung in Monolayer- und Typ-I-Kollagen-Matrices im kurz- und mittelfristigen Verlauf über 12 Tage eine sehr niedrige MMP-13-Genexpression (Galois et al., 2006), demzufolge kann die Induktion der MMP-13-Genexpression durch die Matrix ausgeschlossen werden.

Im humanen System ist MMP-13 in Chondrozyten-besiedelten Matrices unter mechanischer Stimulation noch nicht systematisch erfasst worden. Bis jetzt durchgeführte Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen von Mechanostimulation waren auf gesundes bovines oder porcines Knorpelgewebe fokussiert (Buschmann et al., 1995; Hunter et al., 2002; Waldman et al., 2004), weshalb auf die Erfassung von Arthrose-, Katabolismus- und Entzündungsmarkern verzichtet wurde.

In Anbetracht des zum Teil millionenfach erhöhten maximalen Faktors, um den sich das MMP-13-Genexpressionsniveau sowohl unter Kontroll- als auch unter Stimulationsbedingungen unterscheidet, wird deutlich, dass die Zellantwort auf Mechanostimulation sehr heterogen ist. Mechanostimulation kann demnach die MMP-13-Synthese sehr deutlich stimulieren bzw. inhibieren.

In der Zusammenschau ist die vorliegende Studie die erste ihrer Art, die zusammenhängend die MMP 13-Genexpression humaner Chondrozyten in einem modifizierten MACT-Verfahren unter zyklischer mechanischer Belastung untersucht hat. Allerdings beschränkt sich das Fazit auf tendenzielle Feststellungen, da angesichts des uneinheitlichen Bildes mit zum Teil erheblichen Schwankungen der zellulären Antworten, die sich teilweise in Standardabweichungen größer als der jeweilige Mittelwert manifestieren, klare Aussagen nicht zu treffen sind. Nichtsdestotrotz ist die Tendenz erkennbar, dass Mechanostimulation eher Katabolismus- und Arthroseprogredienz denn -inhibition begünstigt, zumindest in teilweise degenerativ verändertem Knieknorpel. Dennoch besteht weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der Fragestellung, ob zyklische mechanische Belastung von Chondrozyten in einer artifiziellen Matrix prokatabole und -arthrotische Auswirkungen hat.

6.1.6) Biomechanik

Eine deutliche Abnahme der elastischen Steifigkeiten ist im 14-tägigen Kultivierungsverlauf unter Stimulations- und Kontrollbedingungen zu beobachten. So fällt die elasti-

sche Steifigkeit des in-vitro-generierten Knorpelersatzgewebes unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen. Der Unterschied zwischen Ausgangs- und Stimulationsproben ist statistisch signifikant im Gegensatz zu dem zwischen Kontroll- und Stimulationsproben.

Diese Daten werden unterstützt durch die Tatsache, dass eine Abnahme auf weniger als 50 % der Ausgangssteifigkeit in vielen Patienten zu beobachten war, wohingegen lediglich in einer Minderheit der Patienten eine Zunahme der elastischen Steifigkeit erkennbar war.

Typ-II-Kollagen ist dasjenige Protein, das neben der vom Proteoglykangehalt abhängigen Wasserbindungsfähigkeit des Knorpelgewebes als maßgebliche Strukturkomponente die biomechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe bestimmt (Jeffery et al., 1991). Zugfestigkeit und Stabilität gegenüber Scherkräften wird ebenfalls durch die feinen Typ-II-Kollagenfibrillen vermittelt (Gelse et al., 2003). Es stellt sich also die Frage, ob sich die durch Stimulation bedingte Veränderung des Typ-II-Kollagen-Gehaltes hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften des Knorpelregeneratgewebes manifestiert. Der statistische Zusammenhang zwischen dem im Mittel tendenziell gesteigerten Typ-II-Kollagen-Gehalt und der im Mittel signifikant reduzierten elastischen Steifigkeit deutet darauf hin, dass die elastische Steifigkeit des Regenerates nicht primär durch die Typ-II-Kollagen-Fasern bestimmt wird, sondern durch das kompressive Verhalten der Trägermatrix. Dies erscheint vor dem Hintergrund der v.a. perizellulär betonten und sich eben nicht durch das gesamte Regeneratgewebe erstreckenden Kollagenfasersekretion plausibel. Es lässt sich also davon ausgehen, dass das nach 14-tägiger Kultivierung beginnende histologische Remodelling biomechanisch (noch) nicht relevant ist.

Weiteren Versuchen bleibt die Feststellung vorbehalten, mit welcher Kultivierungsdauer die Remodellingprozesse biomechanisch relevant werden.

Durch Vergleich der Steifigkeiten unter Kontroll- (Mittelwert: $0,1023 \text{ N/mm}^2$) und Stimulationsbedingungen (Mittelwert: $0,0922 \text{ N/mm}^2$) mit der Steifigkeit von Nativknorpel (je nach Lokalisation im menschlichen Knie: $0,5 - 0,9 \text{ N/mm}^2$) (Mansour, 2004) wird deutlich, dass die kultivierten Regenerate die elastische Steifigkeit von Nativknorpel nicht erreichen.

Da die Typ-II-Kollagensynthese unter biomechanischen Gesichtspunkten weitestgehend irrelevant ist, ist anzunehmen, dass erstens die Kultivierungsbedingungen und

zweitens deren Auswirkungen auf die physikochemischen Eigenschaften der artifizellen Typ-I-Kollagenmatrix ursächlich für den fast identischen Verlust der Steifigkeit unter beiden Behandlungsmodalitäten gewesen sind.

In Vorversuchen zeigte sich bei Kultivierung zellfreier Typ-I-Kollagen-Matrizes unter Versuchs-analogen Bedingungen eine Konstanz der Steifigkeit unter Stimulations- und Kontrollbedingungen im Vergleich zur Ausgangssteifigkeit. Diese Beobachtung legt wiederum nahe, dass die Besiedlung durch Chondrozyten entscheidenden Einfluss auf die langfristigen Eigenschaften der Trägermatrix hat. Möglicherweise hat das prokatabole Milieu, beispielhaft nachgewiesen anhand der unter beiden Behandlungsmodalitäten gesteigerten zellulären MMP-13-Genexpression, einen negativen Einfluss auf die langfristige Stabilität der Typ-I-Kollagen-Matrix.

Trotz zum Teil anders lautender Literaturdaten, die verbesserte Kompressionseigenschaften unter langfristiger Kultivierung nachweisen konnten (Buschmann et al., 1995; Mauck et al., 2002; Mauck et al., 2003; Waldman et al., 2004), fügen sich die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten insofern in die Literatur ein, als dass in den genannten Studien nach 14-tägiger Kultivierung ebenfalls lediglich tendenzielle und keinesfalls signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Stimulationsbedingungen beobachtet worden sind.

6.1.7) Weitere zelluläre Funktionen: Apoptose, Proliferation und Zellmorphologie

In Bezug auf die Chondrozytenvitalität, -proliferation und -morphologie hat die vorliegende Arbeit lediglich qualitative Erkenntnisse erbracht.

Die beobachtete leicht erhöhte Apoptoserate unter zyklischer kompressiver Belastung findet sich auch in der Literatur wieder. Bei der Untersuchung der Auswirkungen von Mechanostimulation auf Nativknorpelimplantate ist -auch bei moderaten Belastungsprotokollen- eine verminderte Chondrozytenvitalität insbesondere in der oberflächlichen Zone und bei mittel- bis langfristiger Kultivierung zu beobachten (Steinmeyer et al., 1997; Fehrenbacher et al., 2003). Ebenfalls durch Literaturdaten bestätigt wird der Eindruck einer unter zyklischer Kompression moderat gesteigerten chondrozytären Proliferationstätigkeit (Lee et al., 1997), die aber sicherlich auch im Sinne einer Erholung des Regenerates nach Verdichtung der gelierten Zell-Matrix-Suspension zu werten ist.

Hinsichtlich der zellulären Morphologie sind distinkte Unterschiede zwischen beiden Behandlungsmodalitäten erkennbar, denn unter Kontrollbedingungen wiesen Chondrozyten eher einen fibroblastoiden, unter Stimulationsbedingungen hingegen einen eher ovaloiden Morphotyp auf.

Da diesbezüglich wenige Daten publiziert sind, fällt eine Einordnung dieser Beobachtungen in die Literatur schwer. Dennoch ist beschreiben, dass langfristige Matrix-Kultivierung von Chondrozyten ohne mechanische Stimulation kaum Auswirkungen auf die Zellmorphologie hat (Ma et al., 1999). Im Gegensatz dazu hat uniaxiale statische Belastung von Nativknorpelimplantaten zelluläre Deformierung und eine Verminderung von Zellhöhe und -volumen zur Folge, dies wiederum mit erheblichem Einfluss auf die chondrozytäre Syntheseleistung (Guilak, 1995). Die nahe liegende systematische Untersuchung des Zusammenhangs zwischen funktioneller und morphologischer Differenzierung von Chondrozyten unter stimulatorischen Einflüssen ist -zum besten Wissen des Autors- bis heute nicht geschehen.

6.2) Typ-I-Kollagen-Hydrogel als zelltragende Matrix

6.2.1) Allgemeine Aspekte von Matrices in der Knorpelregeneration

Die Auswirkungen mechanischer Belastungen auf das Aktivitätsniveau von Chondrozyten werden durch die Extrazellulärmatrix moduliert. An dieser Modulation sind verschiedene Mechanismen beteiligt, u. a. Zell-Protein-Wechselwirkungen (Knudson et al., 2002), Flüssigkeitsfluss (Guilak et al., 2000), Strömungspotentiale (Kim et al., 1995) und Zell-Deformierungen (Guilak, 1995).

Sowohl mechanische als auch biochemische Stimuli modulieren die zellulären Funktionen und Syntheseleistungen von Chondrozyten. Die durch Mechanostimulation induzierten peri- und intrazellulär ablaufenden Mechanismen sind bis jetzt nicht umfassend geklärt, es ist aber anzunehmen, dass mechanische, elektrische, biochemische und Flüssigkeitsdynamische Signale die Wechselwirkungen zwischen Extrazellulärmatrix und Chondrozyten beeinflussen und somit Auswirkungen auf den chondrozytären Metabolismus haben (Grodzinsky et al., 2000).

Zahlreiche Zellträgersysteme zur optimierten Knorpelregeneration waren in jüngerer Vergangenheit im Fokus von Wissenschaft und Industrie. Ein Konzept, das sich etablieren konnte, ist die Verwendung von Zell-besiedelten Hydrogelsystemen, entweder mit

oder ohne Präkultivierungsphase des Zellmaterials (Lee et al., 1997; Mauck et al., 2007). Solche Hydrogelmatrixes (engl. *hydrogels*) haben, genauso wie die festeren Gerüstmatrixes (engl. *scaffolds*), Anwendung gefunden in der Grundlagen- und klinischen Forschung, z.B. bei Fragestellungen nach der Zellantwort auf verschiedene Stimuli bzw. nach der klinischen Anwendung und Optimierung der erhaltenen Ergebnisse.

Wie bereits ausgeführt sind Hydrogele in dieser Anwendung vorteilhaft, da sie eine dreidimensionale Kultivierungsumgebung darstellen und sowohl eine angereicherte Zelleinsaat als auch eine gleichmäßige Zellverteilung innerhalb des Gels ermöglichen. Demgegenüber stehen relativ ungünstige mechanische Eigenschaften im unkomprimierten Zustand, die Protokolle mit zyklischen Kompressionen unter hoher Belastungsintensität oder -dauer erschweren und einige Besonderheiten im Umgang mit Hydrogelen nach sich ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Problem der schlechten initialen Stabilität durch Kompression der Zell-besiedelten Hydrogelmatrix um den Faktor 20 gelöst, wobei anzuerkennen ist, dass die Auswirkungen dieser Initialkompression auf Zellen, Hydrogel und deren Interaktion ungeklärt bleibt, da Kontrollproben in nicht komprimierten Hydrogel nicht stimuliert werden konnten. Andere Arbeitsgruppen sahen modifizierte Stimulationsprotokolle vor mit geringeren Kompressionsgraden zwischen 3 und 10 % (Buschmann et al., 1995; Mauck et al., 2003). Einige Autoren äußern die Kritik, dass diese „angepassten“ In-vitro-Kompressionen der mechanischen Belastungssituation im Gelenk nicht entsprechen (Wang et al., 2009).

Mehr als die Nachbildung „physiologischer“ Belastungen war vielmehr Gegenstand dieser Studie, Zell-besiedelte Matrixes einer Material-verträglichen mechanischen Stimulation zu unterziehen, die über angeschlossene Kraftmessdosen objektivierbar nachvollzogen werden konnte.

6.2.2) Typ-I-Kollagenmatrixes in der Knorpelregeneration

Die verwendete dreidimensionale Typ-I-Kollagenmatrix wird aus Schwänzen von in- zuchtratten gewonnen und ist seit einiger Zeit als Grundkomponente eines MACT- Verfahrens erfolgreich in der klinischen Anwendung. Typ-I-Kollagen wird als Träger- matrix in Form von Schwämmen oder Gelen eingesetzt (Hunziker, 2002), da es bio- kompatibel und durch Zell-endogene Kollagenasen ohne Entzündungsreaktion abbau-

bar ist. Eine Vielzahl verschiedener Zell-besiedelter Kollagenmatrizes diente der Deckung von Knorpeldefekten mit generell positiven Ergebnissen (Frenkel et al., 1997; Nehrer et al., 1998; Fuss et al., 2000; Katsube et al., 2000; Itoh et al., 2001; Ochi et al., 2002; Wakitani et al., 2002). Auch als dreidimensionales Kultivierungssystem haben Kollagenmatrizes im Rahmen von MACT-Verfahren einen klinischen Stellenwert (Andereya et al., 2006; Andereya et al., 2007). Kollagengelmatrizes stimulieren die zelluläre Proliferation und Syntheseleistung in vitro (Schuman et al., 1995; Uchio et al., 2000) und stellen damit zumindest in vielerlei Hinsicht eine funktionelle Extrazellulär-matrix-Umgebung dar, die hyalinem Knorpel ähnlich ist (Schneider et al., 2003) und Chondrozyten zur Extrazellulärmatrix-Synthese und mechanostimulatorischen Antwort befähigt (Hunter et al., 2002).

In Anbetracht der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bleibt dennoch abzuwarten, ob die reine Typ-I-Kollagenmatrix in Zusammenwirkung mit kontinuierlicher zyklischer kompressiver Belastung tatsächlich die optimale mikrostrukturelle Umgebung für die Generierung funktionellen Knorpelersatzes bietet, v.a. hinsichtlich der Parameter Flüssigkeitsgehalt, Steifigkeit und Permeabilität.

Zudem sind Chondrozyten unter nativ-physiologischen Bedingungen von einer Matrix aus Typ-II-Kollagen und Proteoglykanen umgeben, wohingegen Typ-I-Kollagen als Bestandteil von Faser- und Narbenknorpel primär in pathologisch verändertem Knorpel vorkommt. Eine solche Matrix wirkt somit als moderat dedifferenzierender Stimulus, insbesondere im mittelfristigen Verlauf und bei geringer initialer Zell-Einsiedlungsdichte (Galois et al., 2006). Dies steht im Widerspruch zu den vorbeschriebenen Eigenschaften, wonach in Kollagengel eingesiedelte Chondrozyten nicht dedifferenzieren oder mitunter sogar redifferenzieren (Muller-Rath et al., 2007).

Es ist anzunehmen, dass die supramolekulare Organisationsstruktur der verwendeten Typ-I-Kollagenmatrix hinsichtlich der Zusammensetzung, der Dichte, der Größe des Extrazellulär-raums und des Verhältnisses Extrazellulär-raum - Kollagenfasern - zelluläre Syntheseleistung sowohl die Kultivierung von als auch die mechanostimulatorischen Effekte auf Chondrozyten beeinflusst hat. Im Gegensatz zu anderen im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpel Anwendung findenden Systemen, deren Porengröße zum Teil recht gut definiert ist (Wendt et al., 2003; Chang et al., 2004), liegen bezüglich der Matrix-Organisationsstruktur des Typ-I-Kollagen-Gels weder in unkomprimiertem

noch in 20-fach komprimiertem Zustand Daten vor. Lediglich die Dichte von 6 mg/ml in unkomprimiertem Zustand ist gesichert.

Da Chondrozyten nach enzymatischer Freisetzung zur Besiedlung der Typ-I-Kollagen-Konstrukte benutzt worden sind, sind die Zell- und Kollagenfaser-Zwischenräume zu Beginn der Kultivierung noch nicht mit synthetisierter Extrazellulärmatrix gefüllt, erst im Laufe der Kultivierung geschieht -ausgehend vom Perizellulärraum- das histologisch nachvollziehbare Remodelling der Matrix.

Somit ist trotz der 20-fachen Verdichtung der Typ-I-Kollagen-Matrix anzuzweifeln, dass der interfibrilläre Raum innerhalb der Matrix tatsächlich eine adäquate Mechano-transduktion auf die eingebrachten Chondrozyten und relevante peri- und zelluläre Deformierung durch 10 %-igen Kompressionsgrad ermöglicht hat. Vor diesem Hintergrund besteht die Möglichkeit, dass die Applikation von zyklischer Kompression nicht primär über die oben beschriebenen Extrazellulärmatrix-Prozesse, sondern vielmehr über Flüssigkeitsfluss-induzierte Zug- und Scherbelastungen die chondrogene Differenzierung moduliert hat. Durch zyklische mechanische Kompression generierter interstitieller Flüssigkeitsfluss kann die zelluläre Syntheseleistung maßgeblich beeinflussen, da Zug- und Scherbelastungen die Entstehung von Faser- und degenerativ verändertem Knorpel forcieren (Mohtai et al., 1996; Lane Smith et al., 2000) und demzufolge der Qualität des in-vitro-generierten Knorpelregeneratgewebes abträglich sind. Flüssigkeitsfluss generiert Scherkräfte, die wiederum spezifische physikochemische Veränderungen verursachen, z.B. Gradienten in Bezug auf die Ionenkonzentrationen, osmotischen Druckverhältnisse und Strömungspotenziale (Grodzinsky et al., 2000).

Buschmann et al. konnten nachweisen, dass in zyklisch komprimierten Knorpel-explantaten die Stimulation der Aggrecan-Synthese in den Gewebeanteilen mit höchstem interstitiellen Flüssigkeitsfluss am deutlichsten ausgeprägt war (Buschmann et al., 1999). Der in der vorliegenden Studie nicht gemessene interstitielle Flüssigkeitsfluss spielt demnach eine wesentliche Rolle in der Modulation der zellulären Aktivitäten. Es besteht diesbezüglich weiterer Forschungsbedarf, insbesondere in Bezug auf interstitiellen Flüssigkeitsfluss in Knorpelersatzgeweben.

Ein großer Vorteil des im Rahmen dieser Studie verwendeten Typ-I-Kollagengels ist dessen klinische Zulassung, sodass die Resultate der vorliegenden Studie tatsächlich klinisch relevant sind. Da die Mehrzahl der bisher zum Thema Mechanostimulation im Knorpel-Tissue Engineering durchgeführten Studien nicht in klinisch einsatzfähigen

Zellträgermaterialien durchgeführt worden sind, scheint deren klinische Aussagekraft begrenzt. Beispielsweise ist Agarose ein in der Grundlagenforschung häufig genutztes und als vorteilhaft befundenes Hydrogel (Buschmann et al., 1995; Mauck et al., 2002; Mauck et al., 2003), das allerdings klinisch nicht zu verwerten ist wegen ausgeprägter Bioinkompatibilität (Hunziker, 2002). Andere Zell-besiedelte Biomaterialien wie poröse Keramiken und biphasische Konstrukte, die aktuell in experimentellen In-vitro- und In-vivo-Studien Verwendung finden (Waldman et al., 2004; Kandel et al., 2006), haben bisher keinen Eingang in die Klinik gefunden.

6.3) Vorgeschädigter Knorpel als Zellquelle

Da es ein Ziel dieser Studie war, das experimentelle Setup möglichst nahe an der klinischen Anwendung zu halten, fanden humane Chondrozyten aus im Rahmen von TEP-Operationen gewonnenen Kniegelenken Verwendung.

Trotz der Bemühungen des Autors dieser Studie, makroskopisch unauffälliges und vermeintlich „gesundes“ Knorpelgewebe in die Kultivierung einzuschließen, legt die in den Ausgangs-, Kontroll- und Stimulationsproben zu beobachtende Streuung in Bezug auf die untersuchten Werte und deren Standardabweichungen nahe, dass die verwendeten Chondrozyten insgesamt in unterschiedlichem Maße verändert und durch mechanische Kompression nicht einheitlich zu stimulieren waren.

Ein unterschiedliches initiales Expressionsniveau findet sich bei allen untersuchten Genen (Col-II, Col-I, AGC, MMP-13), zu allen Untersuchungszeitpunkten (Ausgangs- und Kontroll-/Stimulationsproben) und unter allen Kultivierungsbedingungen (Kontrollen und Stimulation). Wie bereits dargestellt ist das Genexpressionsniveau der Ausgangsproben in Bezug auf die vier untersuchten Gene sehr heterogen, was sich auch unter Kultivierung -zum Teil deutlich verstärkt- fortsetzt.

Diese Beobachtung findet sich ebenfalls in der Literatur wieder, denn arthrotisch geschädigte Zellen weisen ein verändertes Genexpressionsmuster gegenüber gesundem Knorpelgewebe auf (Martin et al., 2001; Aigner et al., 2006) und sind phänotypisch instabiler (Girkontaite et al., 1996). Das in der Pathogenese der Arthrose begründete Entzündungsgeschehen spiegelt sich auch auf zellulärer Ebene wider, da arthrotische Chondrozyten ein deutlich pro-inflammatorisch verändertes Genexpressionsmuster aufweisen (Fan et al., 2005). Wenn sich daraus folglich -wie die unter Kultivierungsbe-

dingungen gesteigerte MMP-13-Genexpression nahelegt- ein inflammatorisches Milieu ausgebildet hat, mag auch das als Erklärung dienen für die in dieser Studie beobachteten insgesamt geringen Effekte von Mechanostimulation auf die Qualität des Knorpelregenerates, denn katabol-inflammatorische Mediatoren sind potente Inhibitoren, u.a. der Typ-II-Kollagen-Synthese (Goldring et al., 1994).

In Bezug auf das Verhalten humaner, arthrotisch veränderter Chondrozyten unter mechanostimulierten Kultivierungsbedingungen sind bis jetzt keine Erkenntnisse gewonnen worden. Überhaupt haben bis dato lediglich einige wenige Studien Mechanostimulation und deren Auswirkungen auf Chondrozyten im humanen System untersucht (Demarteau et al., 2003).

Neben den Unterschieden in Bezug auf Arthrosegrad und -aktivität des einzelnen Patienten liegen die beobachteten Schwankungen der zellulären Funktionen wahrscheinlich auch darin begründet, dass aus Bioreaktor-Kapazitätsgründen eine simultane Verarbeitung der Proben nicht möglich und somit die Vorkultivierungsdauer der Proben in der Inkubationseinheit vor Eintritt in die Experimentalphase unterschiedlich war.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob im Rahmen einer ipsilateralen Biopsie gewonnene Chondrozyten tatsächlich die optimale Zellquelle für traumatisch oder degenerativ bedingte Knorpelläsionen darstellen. Alternative Konzepte, insbesondere die Zellquelle in Form von mesenchymalen Stammzellen betreffend, sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

6.4) Kultivierungs- und Stimulationsprotokoll

Sowohl das Kultivierungs- als auch das Stimulationsprotokoll haben die Ergebnisse dieser Studie maßgeblich beeinflusst.

Unter folgenden Gesichtspunkten ist die Wahl der Kultivierungs- und Stimulationsparameter, wie sie in der vorliegenden Studie erfolgt ist, verbesserungsfähig:

6.4.1) Einsiedlungsdichte

Es findet sich eindeutige Evidenz in der Literatur, dass die Zellzahl, mit der das Biomaterial besiedelt und anschließend mechanostimuliert wird, die Eigenschaften des Konstruktes deutlich beeinflusst. Unter Mechanostimulation kultivierten Mauck et al.

Agarose-Hydrogele mit niedriger ($10 \cdot 10^6$ Zellen/ml Gel) und hoher zellulärer Einsiedlungsdichte ($60 \cdot 10^6$ Zellen/ml Gel). Bei entsprechender Anpassung der Mediensupplementation wiesen Proben mit höherer Einsiedlungsdichte verbesserte biomechanische und biochemische Eigenschaften auf (Mauck et al., 2003). Auch andere Autoren haben mit Erfolg höhere Einsiedlungsdichten in ihren Stimulationsstudien gewählt (Hunter et al., 2002; Demarteau et al., 2003; Kisiday et al., 2004; Waldman et al., 2004; Wang et al., 2009).

Die gewählte Zelldichte der vorliegenden Studie betrug $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml Gel. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass eine vermehrte zelluläre Dedifferenzierung durch vorherige In-vitro-Vermehrung vermieden werden sollte. Wie bereits ausgeführt, hat sich dieses Nierigzellzahl-System dennoch als vorteilhaft in der Kultivierung von humanen Chondrozyten erwiesen (Muller-Rath et al., 2007).

6.4.2) Sauerstoff-Gehalt

Ebenso deutliche Evidenz findet sich für die Kultivierung von Chondrozyten unter reduziertem Sauerstoff-Gehalt. Vor allem auf dedifferenzierte Chondrozyten hat ein niedriger, den physiologischen Gelenkverhältnissen entsprechender Sauerstoff-Gehalt differenzierende Wirkung im Sinne einer gesteigerten Typ-II-Kollagen-Synthese und Biosyntheseaktivität (Domm et al., 2002). Auch eine geringere Typ-I-Kollagen-Synthese konnte für die Kultivierung unter Hypoxie- und Stimulationsbedingungen nachgewiesen werden (Wernike et al., 2008). Die Kultivierung der Chondrozyten in der vorliegenden Studie fand unter Luftverhältnissen mit entsprechend 21 Vol-% Sauerstoff statt.

6.4.3) Zeitdauer

Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass Remodellingvorgänge einige Wochen Kultivierung voraussetzen. Für die Kultivierungsdauer von 14 Tagen ließen sich in Bezug auf einzelne Parameter tendenzielle Veränderungen feststellen: Mauck et al. fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede für das Elastizitätsmodul und den Glykosaminoglykan-Gehalt, aber einen statistisch signifikant höheren Kollagen-Gehalt unter Kontroll- als unter Stimulationsbedingungen (Mauck et al., 2003). Waldman et al. beobachteten nach zweiwöchiger Kultur unter Stimulationsbedingungen noch keinen Unterschied hinsichtlich des Proteoglykan- und Kollagen-Gehaltes der Konstrukte

(Waldman et al., 2004). Für die Feststellung deutlicherer Veränderungen innerhalb des Knorpelregeneratgewebes wäre daher eine längerfristige Kultivierung vorteilhaft gewesen.

6.4.4) Untersuchung der zellulären Syntheseleistung

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Genexpression als Maß der zellulären Syntheseleistung untersucht. Unklar und durch dieses Verfahren nicht erkannt ist der Stellenwert der posttranskriptionellen Proteinmodifikation. Wie bereits ausgeführt ist die chondrozytäre Genexpression weitestgehend unabhängig von kurzfristigen Schwankungen der mechanischen Umgebung, da Chondrozyten in ihrer Transkriptionsaktivität durch post-transkriptionelle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stabilisiert werden (Lee et al., 2006). Die direkte Proteinmessung, z.B. mittels Luminex®-Verfahren, wäre der faktische Goldstandard zur umfassenden Erfassung auch dieser posttranskriptionellen Vorgänge. Allerdings ermöglicht die Messung der Genexpression als etabliertere Methode einen Vergleich mit der Literatur (Mauck et al., 2007; Wang et al., 2009).

6.4.5) Stimulationsparameter

Im Rahmen dieser Arbeit fand die Stimulation der Proben mit dem folgenden Stimulationsprotokoll statt: Frequenz der zyklischen Kompressionen 0,3 Hz; Kompressionsgrad der Proben 10 %; Amplitude des Stempels 0,3 mm; Zeitdauer der Kultivierung 14 Tage (entsprechend 360.000 Zyklen).

Aufgrund der sich unter Kompression ändernden Steifigkeit des Gewebes wird die applizierte Stimulation in der Literatur üblicherweise über den Grad der Kompression und die dadurch bedingte Stauchung des Regenerates angegeben. Die effektive Stauchung ist dabei abhängig vom Zell-besiedelten Biomaterial, wobei festere Scaffolds eine höhere initiale Stabilität aufweisen als weichere Hydrogele. Vor diesem Hintergrund sind Hydrogele meist mit reduziertem Kompressionsgrad (< 10 %) stimuliert worden (Buschmann et al., 1995; Hunter et al., 2002). Mit einem Kompressionsgrad von 10 %, der auf die Zell-besiedelten Typ-I-Kollagengele einwirkte, wurde die vorliegende Arbeit diesen Erfahrungen gerecht.

Auch in der Zusammenschau mit dem in der Literatur angegebenen Bereich der angewandten Kompressionsprotokolle wird deutlich, dass das gewählte Kompressionsprotokoll in etwa dem Vorgehen anderer Arbeitsgruppen entspricht. Einige Autoren geben einen niedrigeren Kompressionsgrad an (Buschmann et al., 1995; Davisson et al., 2002; Demarteau et al., 2003), wohingegen andere Autoren mit zum Teil deutlich höheren Kompressionsgraden stimuliert haben (Lee et al., 1997; Nicodemus et al., 2008; Wang et al., 2009).

Nach Stimulation mit verschiedenen Kompressionsgraden hat eine Studie interessante feststellen können, dass 10 %-ige Kompression im Vergleich zu 5 %-iger Kompression eine geringere Typ-II-Kollagen-Synthese bedingt. Bei zunehmender Zykluszahl wird aber auch dieser Unterschied nivelliert (Waldman et al., 2004). Die Autoren schlossen daraus zum einen, dass phänotypisch günstige Stimulation mit einer niedrigen Kompressionsamplitude zusammenhängt und zum zweiten, dass punktuelle Stimulationsepisoden über 6 Minuten jeden zweiten Tag (5 % Kompressionsgrad, 1 Hz, 400 Zyklen) zumindest gleichwertige Resultate zeigt wie Dauerstimulation. Diese Beobachtungen werden durch andere Autoren gestützt (Mauck et al., 2000).

In Bezug auf die Frequenz der Kompressionen fußt das gewählte Stimulationsprotokoll ebenfalls auf Literaturdaten, da Stimulationsfrequenzen zwischen 0,01 Hz und 1 Hz nachweislich die Matrixsynthese stimulieren (Palmoski et al., 1984; Buschmann et al., 1995; Lee et al., 1997; Bonassar et al., 2001), wohingegen geringere Frequenzen die Matrixsynthese supprimieren (Palmoski et al., 1984; Lee et al., 1997).

6.5) Fazit

Die vorliegende Studie untersuchte die biologischen und biomechanischen Auswirkungen von mechanischer Stimulation auf humane Chondrozyten, die in ein Typ-I-Kollagen-Hydrogel eingesiedelt und nachfolgend unter kontinuierlich-zyklischer Kompression [Frequenz 0,3 Hz; Kompressionsgrad 10 %] kultiviert worden waren. Unter Stimulationsbedingungen konnte die Retention des chondrozytären Phänotyps und die Zunahme Chondrozyten-spezifischer Zellfunktionen beobachtet werden. Zudem konnte weitergehend evaluiert werden, wie mechanische Stimulation mit dem resultierenden biologischen Remodelling und biomechanischen Steifigkeitsänderungen korreliert ist. Obwohl die beobachteten Effekte nach 14-tägiger Stimulationskultivierung mitun-

ter begrenzt waren, hat sich das Konzept des *biomechanical preconditioning* als viel versprechend und klinisch relevant in der weitergehenden Optimierung von Knorpel-regenerationsverfahren erwiesen. Zukünftigen Arbeiten bleibt der Weg zur „biologischen Prothese“ über noch effizientere Tissue Engineering-Verfahren und zelluläre Stimulationsformen vorbehalten.

7) Zusammenfassung

Die Behandlung von Knorpeldefekten stellt noch immer ein großes Problem in der Orthopädie dar. Eine viel versprechende Alternative zu konventionellen Methoden ist die Reimplantierung von in-vitro-vorkultivierten Chondrozyten im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Die bei diesen Verfahren verwendeten Zell-besiedelten Biomaterialien können durch mechanische Stimulation in ihren Regenerateigenschaften verbessert werden. Eine Modulation der Chondrozytenfunktion und dadurch der biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knorpelregenerates lässt sich durch Scher-, Perfusions-, hydrostatische Druck- und Kompressionssysteme erzielen, die beispielhaft und primär in ihren biologischen Auswirkungen vorgestellt und diskutiert werden. Außerdem wird ein neuartiges Bioreaktorsystem zur kontinuierlichen zyklischen mechanischen Kompression vorgestellt, das die kontinuierliche Aufzeichnung der im Knorpelregenerat einwirkenden Kräfte erlaubt. Im experimentellen Setup sind humane Chondrozyten in eine Kollagen-Matrix eingesiedelt und über zwei Wochen in diesem Bioreaktorsystem mechanisch stimuliert worden. Weitergehende histologische, molekularbiologische und biomechanische Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf die chondrogene Differenzierung durch Mechanostimulation. Sowohl das histologische Erscheinungsbild als auch das zelluläre Genexpressionsniveau (Typ-I- und -II-Kollagen, Aggrecan und MMP-13) sind unter Stimulationsbedingungen im Sinne der Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps modifiziert. Die elastische Steifigkeit des Regenerates nimmt im Kultivierungsverlauf ab. Diskutiert werden, wie Mechanostimulation als stimulatorischer Mechanismus, die Typ-I-Kollagen-Matrix als Zellträger, der arthrotisch vorgeschädigte Knorpel als Zellquelle und das angewandte Kultivierungs- und Stimulationsprotokoll zu den beobachteten Ergebnissen beigetragen haben. Vor dem Hintergrund der trotz günstiger Voraussetzungen und aussichtsreicher Ansätze bisher noch nicht gelungenen In-vitro-Kultivierung von mechanisch und biologisch vollwertigem funktionellen Knorpelersatz sind wertvolle Informationen hinsichtlich der Korrelation zwischen aufgebrachter mechanischer Stimulation einerseits und biologischem Remodelling innerhalb des Regenerates andererseits gewonnen worden, die der weiteren Optimierung bestehender Matrix- assoziierter Knorpelersatz-Verfahren (z.B. MACT) dienen werden.

8) Abstract

The treatment of cartilage defects remains a major problem in orthopaedics. With regard to cartilage tissue engineering, the reimplantation of pre-cultivated chondrocytes in the form of a chondrocyte graft is a promising alternative to conventional methods. Clinical practice requires this MACT procedure (matrix-associated autologous chondrocyte transplantation) to produce a biocompatible replacement tissue with adequate mechanical properties. Mechanical stimulation has the capacity to improve the quality of these cell-seeded biomaterials. By altering chondrocytes' cellular activities, the biological and biomechanical properties of cartilage replacement tissue can be modulated. The different systems used for this purpose, e.g. shear, perfusion, hydrostatic pressure or compression are presented and assessed with regards to mechanisms, biological effects, chances and problems of the respective stimulation technique. Additionally, the newly developed bioreactor system used in the present work is presented in detail. This system allows continuous monitoring of forces during stimulation by means of cyclic compressive loading. The experimental setup used isolated human chondrocytes that were seeded into a collagen type-I hydrogel and cultivated in the afore-mentioned bioreactor system for a total of two weeks. Cyclic compressive loading and its role in chondrogenic differentiation were assessed by histology, gene expression analysis (collagen type-I and -II, aggrecan, matrix metalloprotease-13) and biomechanical testing. Overall, the chondrocyte phenotype was found to be stabilized under stimulatory conditions. Mean elastic stiffness of constructs was found to be reduced in the course of cultivation. The following variables are discussed in detail and with regards to their possible contribution to the results obtained: mechanostimulation as the stimulatory mechanism itself, collagen type-I as the cell carrier, osteoarthritic chondrocytes as the cell source and the cultivation and stimulation protocol used.

9) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von hyalinem Knorpel, aus (Lu et al., 2008)
- Abb. 2: Zonen des Gelenkknorpels, aus (Rudert et al., 1998)
- Abb. 3: Debridement des geschädigten Knorpels, aus (McAdams et al., 2010)
- Abb. 4: Pridie-Bohrung zur punktuellen Eröffnung des Markraums, aus (Rudert et al., 1998)
- Abb. 5: Mikrofrakturierung zur Eröffnung des subchondralen Markraums, aus (Rudert et al., 1998)
- Abb. 6: Fibröses Ersatzgewebe nach Anbohrung des subchondralen Knochens (Pridie-Bohrung), aus (Steinhagen et al., 2005)
- Abb. 7: Mosaikplastik als Form der Knorpel-Knochen-Transplantation, aus (Rudert et al., 1998)
- Abb. 8: Osteochondrale Autograft-Mosaikplastik: a) Darstellung des osteochondralen Defektes am medialen Femurkondylus, b) Entnahme osteochondraler Zylinder mit einem Spezialinstrumentarium, c) Fertige Mosaikplastik, aus (Rudert et al., 1998)
- Tab. 2: Eigenschaften von Knorpel, die günstige Voraussetzungen für das Tissue Engineering von Knorpelregeneratgewebe darstellen
- Abb. 9: Verfahren der ACT nach Brittberg-Schema, aus (Brittberg et al., 1994)
- Abb. 10: OP-Bilder zur ACT: Fokaler chondraler Defekt des medialen Femurkondylus rechts vor (A) und nach Präparation (B), Zustand nach Periostdeckung, Zellimplantation und Fibrinkleberversiegelung (C), aus (Alford et al., 2005)
- Abb. 11: Intraoperative Bilder zur Veranschaulichung des MACT-Verfahrens, bei dem zunächst ein Debridement desr Knorpeldefektes vorgenommen wird (a), anschließend werden Fibrinkleber (b) und die Zell-besiedelte Matrix (c) in das Defektbett eingebracht, aus (Schulz et al., 2007)
- Abb. 12: Einteilung bestehender Bioreaktorsysteme zur In-vitro-Generierung von Knorpelersatzgewebe
- Abb. 13: Scherbelastungs- und Perfusionssysteme zur Kultivierung von Knorpelregeneraten. Die Zell-besiedelten Trägermaterialien (2) sind dabei stets von Nährmedium (1) umgeben: a) Spinner flask, b) rotierender Bioreaktor, c) Perfusionsbioreaktor
- Abb. 14: Hydrostatische Drucksysteme zur Kultivierung von Knorpelregeneraten. a) Schema eines hydrostatischen Versuchsaufbaus. Aus dem Mediumvorrat (1) wird Medium über eine Pumpe (2) in die Kulturkammer (3) gepresst, über das Druckkontrollmodul (4) werden die Druckverhältnisse reguliert und über den Druckmonitor dargestellt und aufgezeichnet (5), adaptiert nach (Mizuno et al., 2002), b) beispielhafte Darstellung einer hydrostatischen Kulturkammer, in der Proben in Röhrchen von Medium umgeben sind und durch flexible Septen in dem durch die Steuerungseinheit vorgegebenen Druckniveau kultiviert werden, adaptiert nach (Angele et al., 2003)
- Tab. 2: Auswirkungen von zyklischer Kompression auf Nativknorpelimplantate
- Abb. 15: Klassifikation von Kompressionsbioreaktorsystemen, nach (Schulz et al., 2007)
- Abb. 16: Grundprinzip der zyklischen Stimulation durch unbegrenzte („unconfined“; a') und begrenzte („confined“; a'') Belastung
- Abb. 17: Bioreaktorsystem zur zyklischen Kompression von Knorpelimplantaten, adaptiert nach (Steinmeyer, 1997)
- Abb. 18: Bioreaktorsystem zur zyklischen Kompression von Knorpelregeneraten (a) und dessen Grundprinzip (b), adaptiert nach (Lee et al., 1997)
- Abb. 19: Kompressionseinheit zur Herstellung des komprimierten Zell-besiedelten Kollagengels, die austretende rote Flüssigkeit ist Medium, die zwischen Stempel und Boden verbliebene helle Schicht ist komprimiertes Zell-besiedeltes Kollagengel
- Abb. 20: Stanzung des komprimierten Zell-besiedelten Kollagengels in Stanzen mit 1 cm Durchmesser
- Abb. 21: Bioreaktor zur zyklischen mechanischen Stimulation von Knorpelregeneratgewebe
- Abb. 22: Kontinuierliches Monitoring des Verlaufes der Bioreaktorkultivierung in vier parallel betriebenen Bioreaktoren, dargestellt sind die zyklische Rotation der Exzentrerscheibe durch die Lichtschranke („Lichtschranke 1 - 4'') und das unterhalb der Proben gemessene Kraftprofil („Kraftmessdose 1 - 4'')
- Abb. 23: Beschickung des Bioreaktors mit vier Zell-besiedelten Kollagengel-Stanzen unter sterilen Bedingungen
- Abb. 24: Betrieb der beschickten Bioreaktoren in einer Inkubationseinheit

- Abb. 25: Kultivierung der Kontrollen
- Abb. 26: Beispielhafte Darstellung der histomorphometrischen Quantifizierung mehrerer gefärbter Schnitte (Typ-II-Kollagen-Färbung, Patient 1 [a, b: Stimulation], Patient 3 [c, d: Kontrolle]) vor (a, c) und nach (b, d) Definition des Schwellenwertes, 20-fache Vergrößerung
- Abb. 27: Verwendeter Druckprüfstand zur Kompressionsprüfung der Zell-besiedelten Kollagengel-Stanzen, a) Aufbau, b) Darstellung des Kompressionsversuches in Vergrößerung
- Abb. 28: Beispielhafte Darstellung der Auswertung eines Kompressionsversuchs (Verfahrerschwindigkeit $v = 0,5 \text{ mm/s}$, Eindringtiefe $d = 1/3$ der Probendicke)
- Abb. 29: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der elastischen Steifigkeit (Patient 6, „P552“) unter Be- und Entlastung, a) Kraft(Spannung)-Zeit-Diagramm, b) Spannung-Dehnung-Diagramm. Die ermittelten elastischen Steifigkeitswerte des Patienten betragen $0,15044 \text{ N/mm}^2$ (Ausgangswert), $0,15800 \text{ N/mm}^2$ (Bioreaktor) und $0,06473 \text{ N/mm}^2$ (Kontrolle)
- Abb. 30: Typ-II-Kollagen-Gehalt in %, entspricht dem Anteil Typ-II-Kollagen-positiver Pixel an der Gesamtpixelzahl in einem perizellulären Quadrat von $2,25 \text{ cm}^2$ bei 20-facher Vergrößerung; PC: $n = 11$, PCU: $n = 9$, PCS: $n = 11$
- Abb. 31: Relative Änderung des histomorphometrisch bestimmten Typ-II-Kollagen-Gehaltes, $\Delta > 1$ ($\Delta < 1$) bedeutet eine Steigerung (Abnahme) der Größe gegenüber dem Ausgangswert
- Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen, v.a. perizellulär (Pfeile); a) Ausgang (PC), b) Kontrolle nach 2 Wochen (PCU), c) Stimulation nach 2 Wochen (PCS) (Vergrößerung $\times 20$, Typ-II-Kollagenfärbung)
- Abb. 33: a) Schematische Darstellung der Probenzonierung hinsichtlich des Typ-II-Kollagen-Nachweises, b und c) Histologische Bilder zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Probenzonierung in Kontroll- (b) und Stimulationsproben (c) (Vorversuch unter Studien-analogen Kultivierungsbedingungen, 5-fache Vergrößerung, Col-II-Färbung)
- Abb. 34: Beispielhafte Darstellung der Typ-I-Kollagen-Färbung, Patient 4, PCS, 5-fache Vergrößerung
- Abb. 35: Beispielhafte Darstellung der TUNEL-Färbung, dargestellt sind vitale (1) und apoptotische (2) Zellen, Patient 3, Kontrolle, 20-fache Vergrößerung
- Abb. 36: Beispielhafte Darstellung der Ki67-Färbung, dargestellt sind proliferativ inaktive (1) und proliferierende Zellen (2), Patient 3, a) Kontrolle, b) Stimulation, 20-fache Vergrößerung
- Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung der Safraninfärbung zur Beurteilung der Proteoglykandeposition im Knorpelregeneratgewebe, a) Kontrollprobe (PCU), b) Stimulationsprobe (PCS). Patient 3, 20 x Vergrößerung.
- Abb. 38: Veränderung der Zellkernmorphologie: a) PC, b) PCU, c) PCS. Safranin O-Färbung, Patient 4, 20x Vergrößerung.
- Abb. 39: Beispielhafte Darstellung der Hämalan-Färbung im Kultivierungsverlauf, a) PC, b) PCU, c) PCS, Patient 2, 20-fache Vergrößerung
- Abb.40: Typ-II-Kollagen-Genexpression in allen Gruppen [ng/ng β -Actin], $n = 11$
- Abb. 41: Relative Änderung der Typ-II-Kollagen-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen
- Abb. 42: Typ-I-Kollagen-Genexpression in allen Gruppen [ng/ng β -Actin], $n = 11$
- Abb. 43: Relative Änderung der Typ-I-Kollagen-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen
- Abb. 44: Col-II-Synthese/Col-I-Synthese-Quotienten in Ausgangs-, Kontroll- und Stimulationsproben, $n=11$
- Abb. 45: Verlauf des Col-II-Synthese/Col-I-Synthese-Quotienten in der Betrachtung des einzelnen Patienten zwischen Kultivierung unter Kontroll- (links) und Stimulationsbedingungen (rechts)
- Abb. 46: Aggrecan-Genexpression [ng/ng β -Actin], $n_{PC} = 8$, $n_{PCU} = 11$, $n_{PCS} = 9$
- Abb. 47: Relative Änderung der Aggrecan-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen
- Abb. 48: MMP-13-Genexpression in Ausgangs-, Kontroll- und Stimulationsproben; $n = 11$
- Abb. 49: Relative Änderung der MMP-13-Genexpression unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen
- Tab. 3: Maximaler absoluter Faktor, um den sich das Genexpressionsniveau der einzelnen Patienten in der respektiven Gruppe unterscheidet
- Abb. 50: Mittelwerte und Standardabweichungen der elastischen Steifigkeiten
- Abb. 51: Relative Änderung der Steifigkeit gegenüber Ausgangswerten, Werte > 1 (< 1) bedeuten Zunahme (Abnahme) der Steifigkeit gegenüber Ausgangsproben

10) Literaturverzeichnis

- Aicher, W. K. and C. Gaissmaier (2003). *Ausblicke und Zukunftsperspektiven für die Autologe Chondrocytentransplantation (ACT). Praxisleitfaden der Knorpelreparatur.* J. Fritz, W. K. Aicher and H. J. Eichhorn. Heidelberg, Springer Verlag: 143 - 148.
- Aigner, T., W. Bertling, et al. (1993). "Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage." *J Clin Invest* 91(3): 829-37.
- Aigner, T., K. Fundel, et al. (2006). "Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 54(11): 3533-44.
- Aigner, T., H. Stoss, et al. (1992). "Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62(6): 337-45.
- Alford, J. W. and B. J. Cole (2005). "Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions." *Am J Sports Med* 33(3): 443-60.
- Amin, A. R., M. G. Attur, et al. (1999). Regulation of nitric oxide and inflammatory mediators in human osteoarthritis-affected cartilage: implication for pharmacological intervention. *The Pathophysiology & Clinical Applications of Nitric Oxide.* G. M. Rubanyi. Richmond, Harwood Academic Publishers: 397 - 412.
- Andereya, S., U. Maus, et al. (2007). "[Treatment of patellofemoral cartilage defects utilizing a 3D collagen gel: two-year clinical results]." *Z Orthop Unfall* 145(2): 139-45.
- Andereya, S., U. Maus, et al. (2006). "[First clinical experiences with a novel 3D-collagen gel (CaReS) for the treatment of focal cartilage defects in the knee]." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 144(3): 272-80.
- Anders, S., J. Schaumburger, et al. (2008). "[Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT). Minimally invasive technique in the knee]." *Oper Orthop Traumatol* 20(3): 208-19.
- Angele, P., J. U. Yoo, et al. (2003). "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro." *J Orthop Res* 21(3): 451-7.
- Archer, C. W. and P. Francis-West (2003). "The chondrocyte." *Int J Biochem Cell Biol* 35(4): 401-4.
- Attur, M. G., M. Dave, et al. (2000). "Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention." *J Biol Chem* 275(51): 40307-15.
- Aufderheide, A. C. and K. A. Athanasiou (2006). "A direct compression stimulator for articular cartilage and meniscal explants." *Ann Biomed Eng* 34(9): 1463-74.
- Bank, R. A., M. Krikken, et al. (1997). "A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage." *Matrix Biol* 16(5): 233-43.
- Barbero, A., S. Grogan, et al. (2002). "Age-related changes in yield, proliferation, and tissue forming capacity of human articular chondrocytes." *Trans Eur Orthop Res Soc* 12(2002): 28.
- Barbucci, R., A. Magnani, et al. (2000). "Immobilisation of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility." *J Inorg Biochem* 79(1-4): 119-25.

- Bartz, R. L., E. Kamaric, et al. (2001). "Topographic matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the articular surface of the femoral condyles." Am J Sports Med 29(2): 207-12.
- Bau, B., P. M. Gebhard, et al. (2002). "Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro." Arthritis Rheum 46(10): 2648-57.
- Baumgaertner, M. R., W. D. Cannon, Jr., et al. (1990). "Arthroscopic debridement of the arthritic knee." Clin Orthop Relat Res(253): 197-202.
- Behrens, P., T. Bitter, et al. (2006). "Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up." Knee 13(3): 194-202.
- Behrens, P., U. Bosch, et al. (2004). "[Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)]." Z Orthop Ihre Grenzgeb 142(5): 529-39.
- Bentley, G., L. C. Biant, et al. (2003). "A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee." J Bone Joint Surg Br 85(2): 223-30.
- Benya, P. D. and J. D. Shaffer (1982). "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels." Cell 30(1): 215-24.
- Bonassar, L. J., A. J. Grodzinsky, et al. (2001). "The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I." J Orthop Res 19(1): 11-7.
- Bonaventure, J., N. Kadhon, et al. (1994). "Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads." Exp Cell Res 212(1): 97-104.
- Breinan, H. A., S. D. Martin, et al. (2000). "Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes." J Orthop Res 18(5): 781-9.
- Brittberg, M. (1999). "Autologous chondrocyte transplantation." Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S147-55.
- Brittberg, M. (2008). "Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up." Injury 39 Suppl 1: S40-9.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med 331(14): 889-95.
- Brittberg, M., T. Tallheden, et al. (2001). "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S337-48.
- Brittberg, M. and C. S. Winalski (2003). "Evaluation of cartilage injuries and repair." J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2: 58-69.
- Bruckner, P. and M. van der Rest (1994). "Structure and function of cartilage collagens." Microsc Res Tech 28(5): 378-84.
- Buckwalter, J. A. (1998). "Articular cartilage: injuries and potential for healing." J Orthop Sports Phys Ther 28(4): 192-202.
- Buckwalter, J. A. (2002). "Articular cartilage injuries." Clin Orthop Relat Res(402): 21-37.

- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation." *Instr Course Lect* 47: 487-504.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions." *Instr Course Lect* 47: 477-86.
- Buckwalter, J. A., V. C. Mow, et al. (1994). "Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage." *J Am Acad Orthop Surg* 2(4): 192-201.
- Burton-Wurster, N., M. Vernier-Singer, et al. (1993). "Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants." *J Orthop Res* 11(5): 717-29.
- Buschmann, M. D., Y. A. Gluzband, et al. (1995). "Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture." *J Cell Sci* 108 (Pt 4): 1497-508.
- Buschmann, M. D., Y. J. Kim, et al. (1999). "Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow." *Arch Biochem Biophys* 366(1): 1-7.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure." *Biotechnol Bioeng* 62(2): 166-74.
- Chang, C. H., F. H. Lin, et al. (2004). "Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71(2): 313-21.
- Chen, C. T., M. Bhargava, et al. (2003). "Time, stress, and location dependent chondrocyte death and collagen damage in cyclically loaded articular cartilage." *J Orthop Res* 21(5): 888-98.
- Chen, G., T. Sato, et al. (2003). "The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness." *J Biomed Mater Res A* 67(4): 1170-80.
- Chubinskaya, S., M. Hurtig, et al. (2007). "OP-1/BMP-7 in cartilage repair." *Int Orthop* 31(6): 773-81.
- Chung, C., J. Mesa, et al. (2006). "Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks." *J Biomed Mater Res A* 77(3): 518-25.
- Coletti, J. M., Jr., W. H. Akeson, et al. (1972). "A comparison of the physical behavior of normal articular cartilage and the arthroplasty surface." *J Bone Joint Surg Am* 54(1): 147-60.
- Curl, W. W., J. Krome, et al. (1997). "Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies." *Arthroscopy* 13(4): 456-60.
- Darling, E. M. and K. A. Athanasiou (2003). "Articular cartilage bioreactors and bioprocesses." *Tissue Eng* 9(1): 9-26.
- Davies, L. C., E. J. Blain, et al. (2008). "The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an in vitro study." *Tissue Eng Part A* 14(7): 1251-61.
- Davisson, T., S. Kunig, et al. (2002). "Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage." *J Orthop Res* 20(4): 842-8.
- Davisson, T., R. L. Sah, et al. (2002). "Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures." *Tissue Eng* 8(5): 807-16.

- Demarteau, O., D. Wendt, et al. (2003). "Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun 310(2): 580-8.
- Deyle, G. D., N. E. Henderson, et al. (2000). "Effectiveness of manual physical therapy and exercise in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial." Ann Intern Med 132(3): 173-81.
- Dijkgraaf, L. C., L. G. de Bont, et al. (1995). "Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature." J Oral Maxillofac Surg 53(8): 924-9.
- Domm, C., M. Schunke, et al. (2002). "Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension." Osteoarthritis Cartilage 10(1): 13-22.
- Dougados, M., A. Gueguen, et al. (1992). "Longitudinal radiologic evaluation of osteoarthritis of the knee." J Rheumatol 19(3): 378-84.
- Eckstein, F., B. Lemberger, et al. (2005). "In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status." Ann Rheum Dis 64(2): 291-5.
- Elder, B. D. and K. A. Athanasiou (2008). "Synergistic and additive effects of hydrostatic pressure and growth factors on tissue formation." PLoS One 3(6): e2341.
- Elder, B. D. and K. A. Athanasiou (2009). "Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration." Tissue Eng Part B Rev 15(1): 43-53.
- Elder, S. H., J. H. Kimura, et al. (2000). "Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells." J Orthop Res 18(1): 78-86.
- Erggelet, C. (2008). Etiology of Articular Cartilage Lesions. Principles of Cartilage Repair. C. Erggelet, B. R. Mandelbaum, E. H. Mrosek and J. M. Scopp. Darmstadt, Steinkopff Verlag.
- Ewers, B. J., D. Dvoracek-Driksna, et al. (2001). "The extent of matrix damage and chondrocyte death in mechanically traumatized articular cartilage explants depends on rate of loading." J Orthop Res 19(5): 779-84.
- Fan, Z., B. Bau, et al. (2005). "Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta." Arthritis Rheum 52(1): 136-43.
- Fehrenbacher, A., E. Steck, et al. (2003). "Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro." Arch Biochem Biophys 410(1): 39-47.
- Felson, D. T. and T. Neogi (2004). "Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone?" Arthritis Rheum 50(2): 341-4.
- Felson, D. T., Y. Zhang, et al. (1997). "Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study." Arthritis Rheum 40(4): 728-33.
- Fitzgerald, J. B., M. Jin, et al. (2006). "Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue." J Biol Chem 281(34): 24095-103.
- Frank, E. H., A. J. Grodzinsky, et al. (1987). "Streaming potentials: a sensitive index of enzymatic degradation in articular cartilage." J Orthop Res 5(4): 497-508.

- Frenkel, S. R., B. Toolan, et al. (1997). "Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair." *J Bone Joint Surg Br* 79(5): 831-6.
- Friedman, M. J., C. C. Berasi, et al. (1984). "Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee." *Clin Orthop Relat Res*(182): 200-5.
- Fuller, J. A. and F. N. Ghadially (1972). "Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage." *Clin Orthop Relat Res* 86: 193-205.
- Furukawa, T., D. R. Eyre, et al. (1980). "Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee." *J Bone Joint Surg Am* 62(1): 79-89.
- Fuss, M., E. M. Ehlers, et al. (2000). "Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study." *Ann Anat* 182(4): 303-10.
- Gaissmaier, C., J. Fritz, et al. (2003). "Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte." *SFA Arthroskopie Aktuell*(16): 4 - 14.
- Galois, L., S. Hutasse, et al. (2006). "Bovine chondrocyte behaviour in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression." *Biomaterials* 27(1): 79-90.
- Gavenis, K., A. Kremer, et al. (2007). "Effects of cyclic hydrostatic pressure on the metabolism of human osteoarthritic chondrocytes cultivated in a collagen gel." *Artif Organs* 31(2): 91-8.
- Gelber, A. C., M. C. Hochberg, et al. (2000). "Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis." *Ann Intern Med* 133(5): 321-8.
- Gelse, K., E. Poschl, et al. (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." *Adv Drug Deliv Rev* 55(12): 1531-46.
- Giannoni, P., A. Crovace, et al. (2005). "Species variability in the differentiation potential of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models." *Tissue Eng* 11(1-2): 237-48.
- Girkontaite, I., S. Frischholz, et al. (1996). "Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies." *Matrix Biol* 15(4): 231-8.
- Goa, K. L. and P. Benfield (1994). "Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing." *Drugs* 47(3): 536-66.
- Goldring, M. B., K. Fukuo, et al. (1994). "Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes." *J Cell Biochem* 54(1): 85-99.
- Goldring, M. B. and S. R. Goldring (2007). "Osteoarthritis." *J Cell Physiol* 213(3): 626-34.
- Gooch, K. J. and C. J. Tennant (1997). Chondrocytes. *Mechanical Forces: Their effects on cells and tissues*. K. J. Gooch and C. J. Tennant. Georgetown, TX, USA, Landes Bioscience: 79-100.
- Grigolo, B., L. Roseti, et al. (2005). "Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation." *J Bone Joint Surg Am* 87(1): 46-57.

- Grigolo, B., L. Roseti, et al. (2001). "Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits." Biomaterials 22(17): 2417-24.
- Grimaud, E., D. Heymann, et al. (2002). "Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders." Cytokine Growth Factor Rev 13(3): 241-57.
- Grodzinsky, A. J., M. E. Levenston, et al. (2000). "Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces." Annu Rev Biomed Eng 2: 691-713.
- Guilak, F. (1995). "Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus." J Biomech 28(12): 1529-41.
- Guilak, F. and V. C. Mow (2000). "The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage." J Biomech 33(12): 1663-73.
- Guilak, F., A. Ratcliffe, et al. (1995). "Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study." J Orthop Res 13(3): 410-21.
- Hall, A. C., P. G. Bush, et al. (2003). "Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box." Equine Vet J 35(5): 425-8.
- Hall, A. C., E. R. Horwitz, et al. (1996). "The cellular physiology of articular cartilage." Exp Physiol 81(3): 535-45.
- Hall, A. C., J. P. Urban, et al. (1991). "The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage." J Orthop Res 9(1): 1-10.
- Hangody, L. and P. Fules (2003). "Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience." J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2: 25-32.
- Harris, E. D., Jr., H. G. Parker, et al. (1972). "Effects of proteolytic enzymes on structural and mechanical properties of cartilage." Arthritis Rheum 15(5): 497-503.
- Hauselmann, H. J., K. Masuda, et al. (1996). "Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage." Am J Physiol 271(3 Pt 1): C742-52.
- Heath, C. A. and S. R. Magari (1996). "Mini-review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro." Biotechnol Bioeng 50(4): 430-7.
- Henderson, I., J. Gui, et al. (2006). "Autologous chondrocyte implantation: natural history of postimplantation periosteal hypertrophy and effects of repair-site debridement on outcome." Arthroscopy 22(12): 1318-1324 e1.
- Hendrickson, D. A., A. J. Nixon, et al. (1994). "Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects." J Orthop Res 12(4): 485-97.
- Hjelle, K., E. Solheim, et al. (2002). "Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies." Arthroscopy 18(7): 730-4.
- Homminga, G. N., P. Buma, et al. (1993). "Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro." Acta Orthop Scand 64(4): 441-5.
- Horas, U., D. Pelinkovic, et al. (2003). "Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial." J Bone Joint Surg Am 85-A(2): 185-92.
- Horowitz, S. B. and Y. T. Lau (1988). "A function that relates protein synthetic rates to potassium activity in vivo." J Cell Physiol 135(3): 425-34.

- Huang, C. Y., K. L. Hagar, et al. (2004). "Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells." Stem Cells 22(3): 313-23.
- Hubbard, M. J. (1996). "Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study." J Bone Joint Surg Br 78(2): 217-9.
- Hunter, C. J., S. M. Imler, et al. (2002). "Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels." Biomaterials 23(4): 1249-59.
- Hunter, D. J., L. March, et al. (2002). "Knee osteoarthritis: the influence of environmental factors." Clin Exp Rheumatol 20(1): 93-100.
- Hunter, W. (1743). "Of the structure and disease of articulating cartilages." Clin Orthop Relat Res 1995(317): 3 - 6.
- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage 10(6): 432-63.
- Hunziker, E. B. and T. M. Quinn (2003). "Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge." J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2: 85-92.
- Hunziker, E. B. and L. C. Rosenberg (1996). "Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane." J Bone Joint Surg Am 78(5): 721-33.
- Ikenoue, T., M. C. Trindade, et al. (2003). "Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro." J Orthop Res 21(1): 110-6.
- Itoh, H., Y. Aso, et al. (2001). "A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold." Artif Organs 25(3): 213-7.
- Iwasa, J., M. Ochi, et al. (2003). "Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel." Artif Organs 27(3): 249-55.
- Jackson, D. W., P. A. Lalor, et al. (2001). "Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study." J Bone Joint Surg Am 83-A(1): 53-64.
- Jacobi, M., V. Villa, et al. (2011). "MACI - a new era?" Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol 3(1): 10.
- Jager, M., A. Wild, et al. (2002). "[Advantages of biomatrices in chondrogenesis of pluripotent mesenchymal stem]." Z Orthop Ihre Grenzgeb 140(6): 681-9.
- Jakob, M., O. Demarteau, et al. (2001). "Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro." J Cell Biochem 81(2): 368-77.
- Janssen, P. (2003). *Konzepte der konservativen Therapie. Praxisleitfaden der Knorpelreparatur.* J. Fritz, W. K. Aicher and H. J. Eichhorn. Berlin, Springer-Verlag. 1. Auflage.
- Jeffery, A. K., G. W. Blunn, et al. (1991). "Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage." J Bone Joint Surg Br 73(5): 795-801.
- Jennings, L., L. Wu, et al. (2001). "The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes." Connect Tissue Res 42(1): 71-86.

- Jensen, C. H. and S. Rofail (1999). "Knee injury and obesity in patients undergoing total knee replacement: a retrospective study in 115 patients." J Orthop Sci 4(1): 5-7.
- Johnson, L. L. (1986). "Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status." Arthroscopy 2(1): 54-69.
- Kandel, R. A., M. Gryn timer, et al. (2006). "Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model." Biomaterials 27(22): 4120-31.
- Katsube, K., M. Ochi, et al. (2000). "Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension." Arch Orthop Trauma Surg 120(3-4): 121-7.
- Kawasaki, K., M. Ochi, et al. (1999). "Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels." J Cell Physiol 179(2): 142-8.
- Kerin, A. J., A. Coleman, et al. (2003). "Propagation of surface fissures in articular cartilage in response to cyclic loading in vitro." Clin Biomech (Bristol, Avon) 18(10): 960-8.
- Khan, I. M., S. J. Gilbert, et al. (2008). "Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review." Eur Cell Mater 16: 26-39.
- Kim, H. K., M. E. Moran, et al. (1991). "The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits." J Bone Joint Surg Am 73(9): 1301-15.
- Kim, Y. J., L. J. Bonassar, et al. (1995). "The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression." J Biomech 28(9): 1055-66.
- Kisiday, J. D., M. Jin, et al. (2004). "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds." J Biomech 37(5): 595-604.
- Kiviranta, I., M. Tammi, et al. (1988). "Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs." J Orthop Res 6(2): 188-95.
- Knudson, W., B. Casey, et al. (2000). "Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis." Arthritis Rheum 43(5): 1165-74.
- Knudson, W. and R. F. Loeser (2002). "CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis." Cell Mol Life Sci 59(1): 36-44.
- Knutsen, G., J. O. Drogset, et al. (2007). "A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years." J Bone Joint Surg Am 89(10): 2105-12.
- Koay, E. J. and K. A. Athanasiou (2008). "Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality." Osteoarthritis Cartilage 16(12): 1450-6.
- Kock, L., C. C. van Donkelaar, et al. (2011). "Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status." Cell Tissue Res.
- Kreuz, P. C., M. Steinwachs, et al. (2007). "Classification of graft hypertrophy after autologous chondrocyte implantation of full-thickness chondral defects in the knee." Osteoarthritis Cartilage 15(12): 1339-47.

- Kuettner, K. E. (1992). "Biochemistry of articular cartilage in health and disease." Clin Biochem 25(3): 155-63.
- Kuettner, K. E., B. U. Pauli, et al. (1982). "Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology." J Cell Biol 93(3): 743-50.
- Lammi, M. J., R. Inkinen, et al. (1994). "Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic pressure." Biochem J 304 (Pt 3): 723-30.
- Lane Smith, R., M. C. Trindade, et al. (2000). "Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism." Biorheology 37(1-2): 95-107.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science 260(5110): 920-6.
- LaPrade, R. F., L. S. Bursch, et al. (2008). "Histologic and immunohistochemical characteristics of failed articular cartilage resurfacing procedures for osteochondritis of the knee: a case series." Am J Sports Med 36(2): 360-8.
- Lau, E. C., C. Cooper, et al. (2000). "Factors associated with osteoarthritis of the hip and knee in Hong Kong Chinese: obesity, joint injury, and occupational activities." Am J Epidemiol 152(9): 855-62.
- Lee, C., S. Grad, et al. (2006). The influence of mechanical stimuli on articular cartilage tissue engineering. Topics in Tissue Engineering. N. Ashammakhi and R. L. Reis. 2: 1 - 32.
- Lee, C. R., S. Grad, et al. (2005). "Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis." Tissue Eng 11(9-10): 1562-73.
- Lee, C. R., A. J. Grodzinsky, et al. (2003). "Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model." J Orthop Res 21(2): 272-81.
- Lee, C. R., A. J. Grodzinsky, et al. (2003). "Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression." J Biomed Mater Res A 64(3): 560-9.
- Lee, D. A. and D. L. Bader (1997). "Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose." J Orthop Res 15(2): 181-8.
- Lee, D. A., T. Noguchi, et al. (2000). "The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs." Biorheology 37(1-2): 149-61.
- Li, W. J., R. Tuli, et al. (2005). "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells." Biomaterials 26(6): 599-609.
- Lu, X. L. and V. C. Mow (2008). "Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties." Med Sci Sports Exerc 40(2): 193-9.
- Ma, P. X. and R. Langer (1999). "Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage." J Biomed Mater Res 44(2): 217-21.
- Madry, H. and D. Kohn (2004). "Konservative Therapie der Kniegelenkarthrose." Unfallchirurg 107: 689-700.
- Magnusson, P. B. (1941). "Joint debridement: a surgical treatment of degenerative osteoarthritis." Surg Gynecol Obstet(73): 1 - 9.
- Malicev, E., D. Radosavljevic, et al. (2007). "Fibrin gel improved the spatial uniformity and phenotype of human chondrocytes seeded on collagen scaffolds." Bio-technol Bioeng 96(2): 364-70.

- Mandelbaum, B. R., J. Boyer, et al. (2010). *Cartilage Repair Treatment Flow Charts. Cartilage Repair: Current Concepts*. M. Brittberg, A. B. Imhoff, H. Madry and B. R. Mandelbaum. London, DJO Publications. 1: 71-82.
- Mankin, H. J. (1982). "The response of articular cartilage to mechanical injury." *J Bone Joint Surg Am* 64(3): 460-6.
- Mankin, H. J., A. J. Grodzinsky, et al. (2007). *Articular Cartilage and Osteoarthritis. Orthopaedic Basic Science - Foundations of Clinical Practice*. T. A. Einhorn, R. J. O'Keefe and J. A. Buckwalter. Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons: 161-174.
- Mansour, J. (2004). *Biomechanics of cartilage. Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*. C. A. Oatis, Baltimore, Lippincott Williams and Wilkins: 66 - 79.
- Marlovits, S., M. Hombauer, et al. (2004). "Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes." *J Bone Joint Surg Br* 86(2): 286-95.
- Maroudas, A. I. (1976). "Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage." *Nature* 260(5554): 808-9.
- Martin, I., M. Jakob, et al. (2001). "Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints." *Osteoarthritis Cartilage* 9(2): 112-8.
- Martin, J. A. and J. A. Buckwalter (2002). "Human chondrocyte senescence and osteoarthritis." *Biorheology* 39(1-2): 145-52.
- Martin, J. A., C. J. Mitchell, et al. (2002). "Effects of telomerase and viral oncogene expression on the in vitro growth of human chondrocytes." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57(2): B48-53.
- Matsusue, Y., T. Yamamuro, et al. (1993). "Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption." *Arthroscopy* 9(3): 318-21.
- Mauck, R. L., B. A. Byers, et al. (2007). "Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading." *Biomech Model Mechanobiol* 6(1-2): 113-25.
- Mauck, R. L., S. L. Seyhan, et al. (2002). "Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels." *Ann Biomed Eng* 30(8): 1046-56.
- Mauck, R. L., M. A. Soltz, et al. (2000). "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels." *J Biomech Eng* 122(3): 252-60.
- Mauck, R. L., C. C. Wang, et al. (2003). "The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading." *Osteoarthritis Cartilage* 11(12): 879-90.
- Maus, U., U. Schneider, et al. (2008). "[Clinical results after three years use of matrix-associated ACT for the treatment of osteochondral defects of the knee]." *Z Orthop Unfall* 146(1): 31-7.
- McAdams, T. R., K. Mithoefer, et al. (2010). "Articular Cartilage Injury in Athletes." *Cartilage* 1(3): 165-179.
- Messner, K. and W. Maletius (1996). "The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes." *Acta Orthop Scand* 67(2): 165-8.

- Mitchell, N. and N. Shepard (1976). "The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone." J Bone Joint Surg Am 58(2): 230-3.
- Mitchell, P. G., H. A. Magna, et al. (1996). "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage." J Clin Invest 97(3): 761-8.
- Mizuno, S., F. Allemann, et al. (2001). "Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges." J Biomed Mater Res 56(3): 368-75.
- Mizuno, S., T. Tateishi, et al. (2002). "Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture." J Cell Physiol 193(3): 319-27.
- Mohtai, M., M. K. Gupta, et al. (1996). "Expression of interleukin-6 in osteoarthritic chondrocytes and effects of fluid-induced shear on this expression in normal human chondrocytes in vitro." J Orthop Res 14(1): 67-73.
- Moseley, J. B., K. O'Malley, et al. (2002). "A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee." N Engl J Med 347(2): 81-8.
- Mow, V. C., C. C. Wang, et al. (1999). "The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage 7(1): 41-58.
- Mueller-Rath, R., K. Gavenis, et al. (2011). "Condensed cellular seeded collagen gel as an improved biomaterial for tissue engineering of articular cartilage." Biomed Mater Eng 20(6): 317-28.
- Mueller-Rath, R., K. Gavenis, et al. (2007). "In vivo cultivation of human articular chondrocytes in a nude mouse-based contained defect organ culture model." Biomed Mater Eng 17(6): 357-66.
- Muller-Rath, R., K. Gavenis, et al. (2007). "A novel rat tail collagen type-I gel for the cultivation of human articular chondrocytes in low cell density." Int J Artif Organs 30(12): 1057-67.
- Munirah, S., S. H. Kim, et al. (2008). "The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis." Eur Cell Mater 15: 41-52.
- Nebelung, S., A. Ladenburger, et al. (2011). "[Tissue engineering of cartilage replacement material - mechanical stimulation in the in-vitro cultivation of human chondrocytes]." Z Orthop Unfall 149(1): 52-60.
- Nebelung, W. and H. Wuschech (2005). "Thirty-five years of follow-up of anterior cruciate ligament-deficient knees in high-level athletes." Arthroscopy 21(6): 696-702.
- Nehrer, S., H. A. Breinan, et al. (1998). "Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model." Biomaterials 19(24): 2313-28.
- Nehrer, S., M. Spector, et al. (1999). "Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures." Clin Orthop Relat Res(365): 149-62.
- Neuhold, L. A., L. Killar, et al. (2001). "Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice." J Clin Invest 107(1): 35-44.
- Nicodemus, G. D. and S. J. Bryant (2008). "The role of hydrogel structure and dynamic loading on chondrocyte gene expression and matrix formation." J Biomech 41(7): 1528-36.

- Niemeyer, P., P. C. Kreuz, et al. (2007). "[Operative treatment of cartilage lesions in the knee joint]." Sportverletz Sportschaden 21(1): 41-50.
- Noyes, F. R. and C. L. Stabler (1989). "A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy." Am J Sports Med 17(4): 505-13.
- O'Brien, F. J., B. A. Harley, et al. (2005). "The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds." Biomaterials 26(4): 433-41.
- Ochi, M., Y. Uchio, et al. (2002). "Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee." J Bone Joint Surg Br 84(4): 571-8.
- Ochs, B. G., C. Muller-Horvat, et al. (2007). "[Treatment of osteochondritis dissecans of the knee: one-step procedure with bone grafting and matrix-supported autologous chondrocyte transplantation]." Z Orthop Unfall 145(2): 146-51.
- Ossendorf, C., C. Kaps, et al. (2007). "Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results." Arthritis Res Ther 9(2): R41.
- Outerbridge, R. E. (1961). "The etiology of chondromalacia patellae." J Bone Joint Surg Br 43-B: 752-7.
- Palmoski, M., E. Perricone, et al. (1979). "Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization." Arthritis Rheum 22(5): 508-17.
- Palmoski, M. J. and K. D. Brandt (1984). "Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro." Arthritis Rheum 27(6): 675-81.
- Parkkinen, J. J., J. Ikonen, et al. (1993). "Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants." Arch Biochem Biophys 300(1): 458-65.
- Parkkinen, J. J., M. J. Lammi, et al. (1992). "Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro." J Orthop Res 10(5): 610-20.
- Parsch, D., T. H. Brummendorf, et al. (2002). "Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion." Arthritis Rheum 46(11): 2911-6.
- Pavesio, A., G. Abatangelo, et al. (2003). "Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings." Novartis Found Symp 249: 203-17; discussion 229-33, 234-8, 239-41.
- Pazzano, D., K. A. Mercier, et al. (2000). "Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture." Biotechnol Prog 16(5): 893-6.
- Pearce, S. G., M. B. Hurtig, et al. (2001). "An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts." Arthroscopy 17(1): 50-5.
- Peterson, L., T. Minas, et al. (2000). "Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee." Clin Orthop Relat Res(374): 212-34.
- Petrella, R. J., M. D. DiSilvestro, et al. (2002). "Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." Arch Intern Med 162(3): 292-8.
- Pietschmann, M. F., A. Horng, et al. (2009). "Cell quality affects clinical outcome after MACI procedure for cartilage injury of the knee." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 17(11): 1305-11.
- Prakash, D. and D. Learmonth (2002). "Natural progression of osteo-chondral defect in the femoral condyle." Knee 9(1): 7-10.

- Pridie, K. H. (1959). "A method of resurfacing osteoarthritic knee joints." J Bone Joint Surg Br(41): 618 - 619.
- Raimondi, M. T., F. Boschetti, et al. (2002). "Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment." Biomech Model Mechanobiol 1(1): 69-82.
- Reddi, A. H. (1998). "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration." Nat Biotechnol 16(3): 247-52.
- Rehart, S. and M. Henniger (2007). "[Therapeutic concepts for osteoarthritis]." Dtsch Med Wochenschr 132(37): 1897-900.
- Repo, R. U. and J. B. Finlay (1977). "Survival of articular cartilage after controlled impact." J Bone Joint Surg Am 59(8): 1068-76.
- Richter, W. (2007). "Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis." Curr Opin Rheumatol 19(5): 451-6.
- Rischke, B. and N. Meenen (2003). Autologes Resurfacing mit Diamantfräsensystem bei unicondylären Arthrosen. Fortbildung Orthopädie und Traumatologie - Die ASG-Kurse der DGOOC. J. Jerosch, J. Heisel and A. Imhoff, Steinkopff, Darmstadt. Band 7, "Knorpelschaden": 3-7.
- Roberts, S., I. W. McCall, et al. (2003). "Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology." Arthritis Res Ther 5(1): R60-73.
- Roddy, E., W. Zhang, et al. (2005). "Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A systematic review." Ann Rheum Dis 64(4): 544-8.
- Rolauffs, B., W. K. Aicher, et al. (2009). "Regenerative Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden." Orthopädie und Unfallchirurgie up2date 4(5): 339-354.
- Rolauffs, B., J. A. Mollenhauer, et al. (2004). Knorpel und Arthrose. Münsteraner Streitgespräche: Arthrose - Neues über Genese und Therapie. S. Fuchs. Darmstadt, Steinkopff Verlag Darmstadt: 3 - 18.
- Ronziere, M. C., S. Ricard-Blum, et al. (1990). "Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen." Biochim Biophys Acta 1038(2): 222-30.
- Rudert, M. and C. J. Wirth (1998). "[Cartilage regeneration and substitution]." Orthopade 27(5): W309-21.
- Sah, R. L., Y. J. Kim, et al. (1989). "Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression." J Orthop Res 7(5): 619-36.
- Sandell, L. J. and T. Aigner (2001). "Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis." Arthritis Res 3(2): 107-13.
- Saris, D. B., J. Vanlauwe, et al. (2008). "Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture." Am J Sports Med 36(2): 235-46.
- Sauerland, K., R. X. Raiss, et al. (2003). "Proteoglycan metabolism and viability of articular cartilage explants as modulated by the frequency of intermittent loading." Osteoarthritis Cartilage 11(5): 343-50.
- Schnabel, M., S. Marlovits, et al. (2002). "Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture." Osteoarthritis Cartilage 10(1): 62-70.

- Schneider, U. and K. Gavenis (2003). *Chondrocytes and Collagen Gels. Cartilage Surgery and Future Perspectives*. C. Hendrich, U. Nöth and J. Eulert. Berlin, Springer. 1: 157-163.
- Schneider, U., B. Schmidt-Rohlfing, et al. (2011). "A comparative study of 3 different cartilage repair techniques." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*
- Schulz, R. M. and A. Bader (2007). "Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes." *Eur Biophys J* 36(4-5): 539-68.
- Schulz, R. M., N. Wustneck, et al. (2008). "Development and validation of a novel bioreactor system for load- and perfusion-controlled tissue engineering of chondrocyte-constructs." *Biotechnol Bioeng* 101(4): 714-28.
- Schuman, L., P. Buma, et al. (1995). "Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro." *Biomaterials* 16(10): 809-14.
- Seireg, A. and Arvikar (1975). "The prediction of muscular load sharing and joint forces in the lower extremities during walking." *J Biomech* 8(2): 89-102.
- Shapiro, F., S. Koide, et al. (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." *J Bone Joint Surg Am* 75(4): 532-53.
- Shiozawa, S., K. Tsumiyama, et al. (2011). "Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59(2): 89-95.
- Sittinger, M., J. Bujia, et al. (1994). "Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture." *Biomaterials* 15(6): 451-6.
- Smith, R. L., B. S. Donlon, et al. (1995). "Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro." *J Orthop Res* 13(6): 824-31.
- Smith, R. L., J. Lin, et al. (2000). "Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression." *J Rehabil Res Dev* 37(2): 153-61.
- Smith, R. L., S. F. Rusk, et al. (1996). "In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure." *J Orthop Res* 14(1): 53-60.
- Steadman, J. R., K. K. Briggs, et al. (2003). "Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up." *Arthroscopy* 19(5): 477-84.
- Steadman, J. R., W. G. Rodkey, et al. (1999). "[The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]." *Orthopade* 28(1): 26-32.
- Steinhagen, J., J. P. Petersen, et al. (2005). "[Surgical therapy for cartilage damage of the knee joint]." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 143(5): R83-95; quiz R96-9.
- Steinmeyer, J. (1997). "A computer-controlled mechanical culture system for biological testing of articular cartilage explants." *J Biomech* 30(8): 841-5.
- Steinmeyer, J. and S. Knue (1997). "The proteoglycan metabolism of mature bovine articular cartilage explants superimposed to continuously applied cyclic mechanical loading." *Biochem Biophys Res Commun* 240(1): 216-21.
- Stoffel, M., D. Weichert, et al. (2009). "A constitutive model for articular cartilage replacement materials." *BIOmaterialien* 10(3/4): 79-86.
- Stoffel, M., D. Weichert, et al. (2009). "A viscoelastic-diffusion model for cartilage replacement material." *Proc Appl Math Mech*(9): 141-142.
- Stoffel, M., J. H. Yi, et al. (2009). "A biomechanical model for cartilage replacement material." *BIOmaterialien*(10 (1/2)): 61-62.

- Stoffel, M., J. H. Yi, et al. (2011). "Bioreactor cultivation and remodelling simulation for cartilage replacement material." Med Eng Phys.
- Takahashi, I., G. H. Nuckolls, et al. (1998). "Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 β expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells." J Cell Sci 111 (Pt 14): 2067-76.
- Takahashi, K., T. Kubo, et al. (1998). "Hydrostatic pressure induces expression of interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha mRNAs in a chondrocyte-like cell line." Ann Rheum Dis 57(4): 231-6.
- Tanck, E., W. D. van Driel, et al. (1999). "Why does intermittent hydrostatic pressure enhance the mineralization process in fetal cartilage?" J Biomech 32(2): 153-61.
- Tetlow, L. C., S. J. Smith, et al. (1999). "Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes." Ann Rheum Dis 58(2): 118-21.
- Tiku, M. L., R. Shah, et al. (2000). "Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis." J Biol Chem 275(26): 20069-76.
- Tins, B. J., I. W. McCall, et al. (2005). "Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up." Radiology 234(2): 501-8.
- Torzilli, P. A., R. Grigienė, et al. (1999). "Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content." J Biomech Eng 121(5): 433-41.
- Torzilli, P. A., R. Grigienė, et al. (1997). "Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system." J Biomech 30(1): 1-9.
- Toyoda, T., B. B. Seedhom, et al. (2003). "Upregulation of aggrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure." Biorheology 40(1-3): 79-85.
- Toyoda, T., B. B. Seedhom, et al. (2003). "Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose." Arthritis Rheum 48(10): 2865-72.
- Uchio, Y., M. Ochi, et al. (2000). "Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel." J Biomed Mater Res 50(2): 138-43.
- van Susante, J. L., P. Buma, et al. (1999). "Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat." Biomaterials 20(13): 1167-75.
- Vasara, A. I., M. T. Nieminen, et al. (2005). "Indentation stiffness of repair tissue after autologous chondrocyte transplantation." Clin Orthop Relat Res(433): 233-42.
- Venn, M. and A. Maroudas (1977). "Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition." Ann Rheum Dis 36(2): 121-9.
- Verzijl, N., J. DeGroot, et al. (2001). "Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover." Matrix Biol 20(7): 409-17.

- Vinatier, C., D. Mrugala, et al. (2009). "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors." *Trends Biotechnol* 27(5): 307-14.
- Vunjak-Novakovic, G., L. E. Freed, et al. (1996). "Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage." *AIChE J*(42): 850 - 860.
- Vunjak-Novakovic, G., I. Martin, et al. (1999). "Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage." *J Orthop Res* 17(1): 130-8.
- Wagner, H. (1972). "[Possibilities and experiences with cartilage transplantation]." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 110(6): 705-8.
- Wakitani, S., K. Imoto, et al. (2002). "Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees." *Osteoarthritis Cartilage* 10(3): 199-206.
- Waldman, S. D., C. G. Spiteri, et al. (2003). "Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro." *J Orthop Res* 21(4): 590-6.
- Waldman, S. D., C. G. Spiteri, et al. (2004). "Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage." *Tissue Eng* 10(9-10): 1323-31.
- Wang, C. T., J. Lin, et al. (2004). "Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials." *J Bone Joint Surg Am* 86-A(3): 538-45.
- Wang, P. Y., H. H. Chow, et al. (2009). "Modulation of gene expression of rabbit chondrocytes by dynamic compression in polyurethane scaffolds with collagen gel encapsulation." *J Biomater Appl* 23(4): 347-66.
- Welsch, G. H., T. C. Marnett, et al. (2010). "Evaluation of cartilage repair tissue after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using a hyaluronic-based or a collagen-based scaffold with morphological MOCART scoring and biochemical T2 mapping: preliminary results." *Am J Sports Med* 38(5): 934-42.
- Wendt, D., A. Marsano, et al. (2003). "Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity." *Biotechnol Bioeng* 84(2): 205-14.
- Wernike, E., Z. Li, et al. (2008). "Effect of reduced oxygen tension and long-term mechanical stimulation on chondrocyte-polymer constructs." *Cell Tissue Res* 331(2): 473-83.
- Wilcoxon, F. (1945). "Individual comparisons by ranking methods." *Biometrics* 1: 80-83.
- Wong, M., M. Siegrist, et al. (1999). "Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins." *Matrix Biol* 18(4): 391-9.
- Xie, J., Z. Y. Han, et al. (2006). "Mechanical compressive loading stimulates the activity the activity of proximal region of human COL2A1 gene promoter in transfected chondrocytes." *Biochem Biophys Res Commun*(344(4)): 1192-1199.
- Yamashita, F., K. Sakakida, et al. (1985). "The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee." *Clin Orthop Relat Res*(201): 43-50.
- Yan, H. and C. Yu (2007). "Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model." *Arthroscopy* 23(2): 178-87.

Yoon, D. M. and J. P. Fisher (2006). "Chondrocyte signaling and artificial matrices for articular cartilage engineering." Adv Exp Med Biol 585: 67-86.

11) Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt den Herren PD Dr. med. Ralf Müller-Rath und Dr. rer. nat. Karsten Gavenis für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Zudem danke ich den Herren Univ.-Prof. Dr. med. Hans Clusmann und Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Marcus Stoffel und seinem Biomechanik-Team des Institutes für Allgemeine Mechanik der RWTH Aachen für die gute Zusammenarbeit danken.

Vielen Dank auch an Frau Sandra Steinebach aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde für die praktische Unterstützung, nicht nur diese Arbeit betreffend und an Frau Dipl.-Math. Sabine Ernst vom Institut für Medizinische Statistik für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Meinen Eltern, meiner Freundin und meiner ganzen Familie möchte ich dafür danken, dass mein Leben zum einen den Weg genommen hat, den es genommen hat und zum zweiten der Grundstein dafür gelegt ist, dass es den Weg gehen wird, den es gehen wird.

12) Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung nach § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung:

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zugrunde liegenden Originaldaten bei mir, **Sven Nebelung, Morinerweg 6, 52074 Aachen**, hinterlegt sind.

13) Lebenslauf

Zur Person:

Sven Nebelung, geboren am 12. Dezember 1986 in Schönebeck.

Ledig. Nationalität Deutsch.

Eltern: Wolfgang Nebelung, Arzt
Bianka Nebelung, Ärztin

Schulischer Werdegang

1993 - 1997	Grundschule <i>Am Elbdamm</i> (Magdeburg), Grundschule Osterweddingen
1997 - 2002	Ökumenisches Domgymnasium in Magdeburg
2002 - 2006	Erzbischöfliches Suitbertus-Gymnasium in Düsseldorf
Juni 2006	Abitur

Studium

WS 2006 - WS 2011/12	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
September 2009	1. Ärztliche Prüfung an der RWTH Aachen (<i>Ärztliche Basisprüfung</i>)
August 2011	Erlangung der PJ-Reife an der RWTH Aachen
Oktober 2012	2. Ärztliche Prüfung an der RWTH Aachen
November 2012	Approbation

Praktische Tätigkeiten im Rahmen der Ausbildung

März – Juli 2012	Praktisches Jahr, Chirurgie, Universitätsklinik, D-Aachen
Dezember 2011 - März 2012	Praktisches Jahr, Orthopädie, Schulthess-Klinik, CH-Zürich
August - Dezember 2011	Praktisches Jahr, Innere Medizin, Universitätsklinik, D-Aachen
Januar 2011 – März 2011	Famulatur im <i>Brisbane Orthopaedics and Sports Medicine Centre</i> , Brisbane, Australien
November 2010	Famulatur in der <i>Radiologischen Praxisgemeinschaft im Kapuzinerkarree</i> Aachen
März 2009	Famulatur in der Klinik für Neurologie des <i>Klinikum Duisburg</i>
Juli-September 2008	Famulatur in der Trauma Unit des <i>Hadassah Medical Center, Jerusalem</i>

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt vorveröffentlicht:

Originalarbeiten:

Nebelung S, Ladenburger A, Gavenis K, Stoffel M, Andereya S, Muller-Rath R. [Tissue engineering of cartilage replacement material - mechanical stimulation in the in-vitro cultivation of human chondrocytes]. Z Orthop Unfall. 2011; 149:52-60.

Nebelung S, Gavenis K, Rath B, Tingart M, Ladenburger A, Stoffel M, Zhou B, Mueller-Rath R. Continuous cyclic compressive loading modulates biological and mechanical properties of collagen hydrogels seeded with human chondrocytes. Biorheology. 2011; 48(5):247-61.

Nebelung S, Gavenis K, Luering C, Zhou B, Mueller-Rath R, Stoffel M, Tingart M, Rath B. Simultaneous anabolic and catabolic responses of human chondrocytes seeded in collagen hydrogels to long-term continuous dynamic compression. Ann Anat. 2012 Jul; 194(4):351-8.

Yi JH, Stoffel M, Weichert D, **Nebelung S**, Rath B. Experimental and numerical investigations on engineering tissue enhanced by mechanical stimulation. In: G. Brenn, G.A. Holzapfel, M. Schanz, O. Steinbach (eds) 82nd Annual Meeting of the International Association of Applied Mathematics and Mechanics (GAMM). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Graz (Austria), 2011: pp 91-92

Stoffel M, Yi JH, Weichert D, Zhou B, **Nebelung S**, Muller-Rath R, et al. Bioreactor cultivation and remodelling simulation for cartilage replacement material. Med Eng Phys. 2012 Jan; 34(1):56-63.

Aachen, 14. Dezember 2012