

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie,
Arbeitsbereich Orthopädie, Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Biokeramische Scaffolds für die *in vitro* und *in vivo* Chondrogenese von
mesenchymalen Stromazellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
David Lee
aus Seoul

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	5
2	Tabellenverzeichnis.....	7
3	Abstract	8
4	Zusammenfassung.....	9
5	Einleitung	11
5.1	Gelenkknorpeldefekte und Arthrose.....	11
5.2	Ätiologie und Pathophysiologie der Arthrose	11
5.3	Epidemiologie.....	12
5.3.1	Prävalenz der Arthrose in Deutschland.....	12
5.3.2	Risikofaktoren der Arthrose	12
5.4	Therapie von Knorpelläsionen.....	13
5.5	Tissue Engineering in der Therapie von Knorpeldefekten	14
5.6	Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)	14
5.7	Matrixassistierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT)	15
5.8	Zellquellen für die zellbasierte Knorpelgewebeheilung.....	16
5.8.1	Chondrozyten als Zellquelle für die Knorpelgewebeheilung:.....	16
5.8.2	Mesenchymale Stromazellen als Zellquelle für Knorpelheilung:	18
5.9	Zellträger für das Tissue Engineering	19
5.9.1	Anforderungen an resorbierbare Zellträger (Scaffolds)	19
5.9.2	Calcium-Zink (Ca-Zn)-Scaffolds	19
5.10	Chondrogenese im Nacktmausmodell	21
6	Zielstellung.....	22
7	Material und Methodik.....	23
7.1	Material.....	23
7.1.1	Verwendete Zellen	23
7.1.2	Verwendete Scaffolds	24
7.1.3	Verwendete Tiere	26
7.1.4	Verwendete Chemikalien	27
7.1.5	Verwendete Medien	27
7.1.6	Verwendete Antikörper	28
7.1.7	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
7.1.8	Geräte	29
7.1.9	Software	29
7.2	Methodik.....	30
7.2.1	Versuchsaufbau	30
7.2.2	Zellkultur.....	32

7.3	Besiedelung der Scaffolds mit PGC und MSC.....	34
7.4	Multipotenznachweis der MSC (Adipo- und Osteogenese).....	36
7.5	Bestimmung der Besiedelungseffizienz	36
7.6	Lebend-Tot-Färbung (Vitalitätsassay).....	37
7.7	Immunfluoreszenzfärbung und Zellmarkierung.....	38
7.8	Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung.....	38
7.9	Xenograft-Nacktmausmodell.....	40
7.10	Messung des Gewichts der Nacktmäuse.....	43
7.11	Histologische Analysen der Scaffolds	43
7.12	Histologische Analysen der Nacktmäuse.....	44
7.13	Statistik	46
7.14	Richtlinien.....	46
8	Ergebnisse	47
8.1	Isolierung der MSC und PGC.....	47
8.2	Besiedlungsversuche	47
8.2.1	Statische Kultur <i>versus</i> dynamische Rollerkultur	47
8.3	PGC <i>versus</i> chondrogen-differenzierte MSC	48
8.4	Lebend-tot-Färbungen	52
8.5	Immunhistologische Färbungen (Kollagen Typ I, II, DAPI, F-Aktin).....	54
8.6	<i>In vivo</i> - Nacktmausmodell.....	56
8.6.1	Makroskopische Beurteilung der Scaffolds	56
8.6.2	Gewichtsmessung der Nacktmäuse.....	57
8.6.3	Histologische Beurteilung der Scaffolds mittels HE-Färbung.....	58
8.6.4	Histologische Beurteilung der Nacktmausorgane mittels HE-Färbung.....	59
9	Diskussion.....	66
9.1	Zellkultur	67
9.2	Lebend- tot- Färbungen mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid.....	68
9.3	Immunhistologische Färbungen	69
9.4	<i>In vivo</i> Nacktmausmodell	71
9.5	Makroskopische Beurteilung der Scaffolds.....	71
9.6	Histologische Beurteilung der Scaffolds mittels HE-Färbung	71
9.7	Histologische Beurteilung der Nacktmausorgane mittels HE-Färbung	73
9.8	Gewichtsmessung und Allgemeinzustand der Nacktmäuse	74
10	Fazit und Ausblick	75
11	Abkürzungsverzeichnis	77
12	Literaturverzeichnis.....	78
13	Eidesstattliche Erklärung.....	82

14	Lebenslauf	83
15	Danksagung	85

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Matrix-assistierten Autologen Chondrozytentransplantation.....	16
Abbildung 2: Zonen des Gelenkknorpels.....	17
Abbildung 3: Verblindung	24
Abbildung 4: Trockenmasse.....	25
Abbildung 5: Feuchtmasse	26
Abbildung 6: Experimentelle <i>in vitro</i> als auch <i>in vivo</i> Vorgehensweise als Vliesdiagramm dargestellt	30
Abbildung 7: Homozygote, thymusaplastische Nacktmäuse.....	40
Abbildung 8: <i>In vivo</i> – Nacktmausmodell	41
Abbildung 9: Scaffold inklusive Rückenhaut nach Explantation.	42
Abbildung 10: Aufnahmen von isolierten PGC (Passage 3) nach 48 Stunden und MSC (Passage 2) nach 7 Tagen in Monolayerkultur.....	47
Abbildung 11: Repräsentative Hellfeldmikroskopische Aufnahmen	48
Abbildung 12: Invert-mikroskopische Aufnahmen von statischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit PGC nach drei, fünf und sieben Tagen	49
Abbildung 13: Invert-mikroskopische Aufnahmen von dynamischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit PGC nach drei, fünf und sieben Tagen	50
Abbildung 14: Invert-mikroskopische Aufnahmen von statischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit chondrogen differenzierten MSC nach drei, fünf und sieben Tagen.....	51
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Besiedlungseffizienz zwischen statischen PGC- und MSC-Besiedlungen und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm.	52
Abbildung 16: Lebend-tot-Färbung PGC-besiedelter Ca-Zn-Scaffolds an Tag 7.	53
Abbildung 17: Lebend-tot-Färbung MSC-besiedelter Ca-Zn-Scaffolds an Tag 7.....	53
Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Vitalität (statische Kultur) zwischen PGC und MSC und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm	54
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ I und II/DAPI/Aktin	55
Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von MSC nach 14 Tagen und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm.....	56
Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der Makroscorewerte zwischen mit MSC besiedelten und unbesiedelten Scaffolds.....	56
Abbildung 22: Gewicht der Nacktmäuse nach Tagen nach der Scaffoldimplantation.	57
Abbildung 23: HE- Färbung unbesiedelter Ca-Zn-Scaffolds.....	58

Abbildung 24: HE- Färbung besiedelter Ca-Zn-Scaffolds.....	58
Abbildung 25: Vergleichende Darstellung des Makroscores von mit MSC besiedelten und unbesiedelten Scaffolds mittels Balkendiagramm	59
Abbildung 26: HE-Färbung der Milz von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds	60
Abbildung 27: HE- Färbung der Milz von Tieren mit besiedelten Scaffolds.	60
Abbildung 28: HE- Färbung der Leber von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds	61
Abbildung 29: HE- Färbung der Leber von Tieren mit besiedelten Scaffolds.	61
Abbildung 30: HE- Färbung der Niere von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds.....	62
Abbildung 31: HE- Färbung der Niere von Tieren mit besiedelten Scaffolds.....	62
Abbildung 32: HE- Färbung der Lunge von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds.....	63
Abbildung 33: HE- Färbung der Lunge von Tieren mit besiedelten Scaffolds	64
Abbildung 34: HE- Färbung des Cerebellums	64
Abbildung 35: HE- Färbung des Cerebellums	65
Abbildung 36: HE- Färbung des Cerebrums.....	65
Abbildung 37: HE- Färbung des Cerebrums.....	66

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokine für die chondrogene Differenzierung von MSC	19
Tabelle 2: verwendete Zellart.....	23
Tabelle 3: MSC-Spender.....	23
Tabelle 4: Geometrie der Scaffolds.....	24
Tabelle 5: Trockenmasse (in mg) der Scaffolds (n=3).....	25
Tabelle 6: Feuchtmasse (in mg) der Scaffolds (n=3).....	25
Tabelle 7: Daten zu den Nacktmäusen.....	26
Tabelle 8: Daten zu den Kontrollmäusen.....	26
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.....	27
Tabelle 10: Verwendete Medien.....	27
Tabelle 11: Antikörper.....	28
Tabelle 12: Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
Tabelle 13: Geräte.....	29
Tabelle 14: Software.....	29
Tabelle 15: Spenderzellen und Kultivierung.....	31
Tabelle 16: Vorgehensweise im in vivo Nacktmausmodell.....	31
Tabelle 17: Scoresystem zur Bestimmung der Besiedlungseffizienz.....	36
Tabelle 18: Scoresystem zur Bewertung der Vitalität.....	37
Tabelle 19: Scoresystem zur Semiquantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung.....	39
Tabelle 20: makroskopische Beurteilung der Scaffolds mittels Punktevergabe.....	42
Tabelle 21: histologische Beurteilung der Scaffolds mittels Punktevergabe.....	43
Tabelle 22: histologische Beurteilung der Nacktmausorgane.....	45

3 Abstract

Introduction: Due to the hyporegenerative metabolism of cartilaginous tissue, which limits its capability to self-regenerate, degenerative diseases and traumatic injury associated with the cartilage could result in permanent cartilage defects. Moreover, cartilage engineering approaches are gaining more and more importance alongside pharmaceutical and common surgical methods. In the present work, cell adherence, chondrogenic potential, biocompatibility, etc. of four scaffolds (A-D) has been assessed *in vitro* and *in vivo*, in combination with porcine articular cells (PGC) and human mesenchymal stem cells (MSC) in a blinded experiment. The aim of the present work was to assess the influence of novel bioceramic scaffold variants on chondrogenesis of porcine articular chondrocytes and human mesenchymal stem cells.

Methods: The scaffolds (A-D) were seeded with PGC and MSC using dynamic and static culturing procedures. Cell adherence was measured in a semiquantitative manner between PGC and MSC using the brightfield microscope at specific dates. Vital staining was performed to detect living and dead cells. The chondrogenic commitment of the MSC was monitored by detecting the cartilage distinctive marker (collagen type II) using immunofluorescence labeling. The nude mice xenograft model was performed in order to assess the quality of tissue-engineered cartilage produced by differentiated MSC seeded on the scaffolds A-D *in vivo*. Scaffold associated inflammations and neoplastic alterations in certain organs such as the spleen, liver, kidney and brain of the nude mice should be revealed through HE-staining.

Results: The MSC attached significantly more to the scaffolds than the PGC. Vitality staining showed significantly higher numbers of vital cells in the MSC-group. Lower collagen type II expression was observed in contrast to collagen type I in all MSC-groups. No significant differences were detected between the scaffolds "A-D". Scaffold D achieved the highest overall score in the *in vivo* experiment.

Conclusion: Further exploration has to be made to recommend the use of the investigated scaffolds and the development of a novel medical device that could be beneficial for the treatment of cartilage defects and thus improving the efficiency of current therapeutic options.

4 Zusammenfassung

Einleitung: Aufgrund der physiologisch eingeschränkten Regeneration des bradytrophen hyalinen Gelenkknorpels, kann es durch Überforderung des Reparaturmechanismus zu dauerhaften Knorpeldefekten kommen. Verletzungen des artikulären hyalinen Knorpels verlangen von den ohnehin schon in geringer Zahl im Gelenkknorpel vorhandenen Chondrozyten eine außerordentlich hohe Syntheseleistung für die Wiederherstellung der Extrazellulärmatrix. Auch aus diesem Grund nimmt neben pharmakologischen Verfahren das Tissue engineering heute eine wichtige Position im Hinblick auf die Heilungsaussicht von Knorpeldefekten ein. In Hinblick auf eine mögliche Anwendung von Biomaterial-assoziierten dreidimensionalen (3D) Kultursystemen zur Behandlung osteochondraler Defekte wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von vier biokeramischen Ca-Zn-Scaffoldvarianten auf die Chondrogenese von porcinen artikulären Knorpelzellen und mesenchymalen Stromazellen (MSC) in einem geblindeten Versuch analysiert.

Methode: Die synthetischen 3D Matrices wurden mit porcinen Gelenkchondrozyten (PGC) und MSC besiedelt und kultiviert. Dabei erfolgte die Analyse und ein Vergleich der Besiedlungseffizienz zwischen den aufgeführten Zellarten, die mithilfe der invertmikroskopischen Aufnahme der beiden Besiedlungen an definierten Tagen registriert werden konnten. Zudem wurde ein Vitalitätsassay durchgeführt, um lebende und tote Zellen zu detektieren. Um eine stattgefundenene Chondrogenese der zu differenzierenden MSC zu untersuchen, wurde die Immunfluoreszenzfärbung des gelenkknorpelspezifischen Makromoleküles Kollagen Typ II, F-Aktin und des Dedifferenzierungsmarkers Kollagen Typ I durchgeführt. Um das Verhalten der Zell-Matrix-Konstrukte auch *in vivo* aufzuzeigen, wurden chondrogen differenzierte Besiedlungen und als Kontrolle unbesiedelte Scaffolds in Nacktmäuse implantiert und nach Explantation mithilfe makroskopischer und histologischer Scoresysteme bewertet. Das Nacktmausmodell diente auch zur Detektierung möglicherweise stattgefundenener systemischer Entzündungsreaktionen oder Neoplasiebildungen durch die besiedelten und unbesiedelten Scaffolds.

Ergebnis: Die Hellfeldaufnahmen der chondrogen differenzierten MSC-Besiedlungen zeigten eine signifikant bessere Adhärenz als die PGC-Besiedlungen, jedoch waren hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Scaffoldvarianten zu registrieren. Im Vitalitätsassay konnte in den PGC-Besiedlungen wenig bis kaum grün gefärbtes Zytoplasma von vitalen Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in den chondrogen differenzierten Besiedlungen viele lebende und nur wenig tote Zellen in allen Scaffoldvarianten

beobachtet. Immunhistochemisch wurde eine geringe Kollagen Typ II Expression in den MSC-Besiedlungen nachgewiesen. Im *in vivo* Nacktmausmodell wurde anhand des histologischen Scoresystems die höchste Punktzahl für Scaffold D sowohl in der besiedelten als auch unbesiedelten Gruppe ermittelt.

Schlussfolgerung: Letztlich reichten die gewonnenen Daten nicht aus, um eine abschließende Bewertung, welche von den vier Scaffoldvarianten die besseren Eigenschaften hinsichtlich der Zellkultivierung, Produktion von knorpelspezifischen Markern und Biokompatibilität aufwies, vorzunehmen. Um eine eindeutige Aussage zur Eignung der Scaffolds im Bereich des Tissue engineering zu machen, müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

5 Einleitung

5.1 Gelenknorpeldefekte und Arthrose

Die degenerativen (meist altersassoziierten) Knorpelerkrankungen stellen ein weltweit großes gesundheitliches Problem dar. Heutzutage gilt die Arthrose als die häufigste Gelenkerkrankung des Erwachsenen. Aufgrund ihrer Häufigkeit und der medizinischen Erkenntnis, dass das Potenzial zur Regeneration im beschädigten Gelenknorpel gering ist, gewinnt sie immer mehr an sowohl therapeutischer als auch ökonomischer Bedeutung, denn die mit ihr verbundenen hohen direkten und indirekten Gesundheitskosten sind beträchtlich.

Die Arthrose ist eine Krankheit, die durch den degenerativen Abbau des Gelenknorpels und dessen angrenzenden Strukturen wie Knochen und Bänder charakterisiert ist und insbesondere an den gewichtstragenden Gelenken vorkommt. Meistens tritt die Arthrose im höheren Lebensalter auf (siehe Prävalenz der Arthrose, 1.3) [1]. Insbesondere aber auch jüngere Menschen (bis zum Alter von 35 Jahren) leiden immer häufiger an Gelenkbeschwerden, hervorgerufen z.B. durch vorangegangene traumatische Verletzungen des Knorpels, angeborene Achsenfehlstellungen in der Frontalebene und die Zunahme von übergewichtigen Kindern in den Industrieländern. Die Symptome, die aufgrund der genannten pathologischen Veränderung auftreten, können sich z.B. durch Schmerzen oder Bewegungseinschränkungen äußern. Letztlich kann die Arthrose zu Gelenksteifigkeit führen und damit einhergehend zur Unbeweglichkeit der Betroffenen. Hierbei wirkt sich diese Problematik folglich nicht nur persönlich aus (starke Lebensqualitätsminderung durch Einschränkung der Ausübung der alltäglichen Aktivitäten), sondern betrifft zudem auch die Volkswirtschaft (z.B. die durch Frühberentung und Inanspruchnahme von Leistungen des Gesundheitssystems (z.B. Rehabilitationsmaßnahmen) und damit anfallenden indirekten Gesundheitskosten). Aufgrund des demografischen Wandels (prozentualer Zuwachs an alten Menschen in den nächsten Jahren) wird die Arthrose eine immer größer werdende Problematik in der Sport- und Unfallchirurgie sowie Orthopädie darstellen.

5.2 Ätiologie und Pathophysiologie der Arthrose

Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau (dadurch ein in summa Überwiegen der knorpelabbauenden Prozesse) stellt den Anfang der Arthroseentstehung dar [2].

Mehrere Ursachen der Arthrose können in Betracht gezogen werden. Sie können in primär-idiopathische und sekundär- angeborene oder erworbene Formen unterteilt werden. Zu den sekundären Ursachen zählen z.B. Fehlstellungen, Fehlbildungen, posttraumatische, metabolische und endokrinologische Erkrankungen [3]. Ursächlich für die weltweit zunehmende Inzidenz und

Prävalenz spielt - wie bereits beschrieben – das Alter des Patienten und die oben genannten Ursachen der Arthrose eine wichtige Rolle. Zudem ist wegen der äußerst begrenzten Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes und der geringen Kompensationsfähigkeit nach Verlust an Extrazellulärmatrix (ECM) die intrinsische Heilung im Knorpelgewebe im Vergleich zu anderen nicht-bradytrophen Geweben deutlich eingeschränkt [4].

Bei Kindern können nach Knorpelverletzungen Vorläuferzellen aus dem Periost in das Knorpelgewebe einwandern und dort zu Chondrozyten differenzieren. Da jedoch bei Erwachsenen eingewanderte mesenchymale Stromazellen (MSC) nicht zu Knorpelzellen sondern zu Bindegewebszellen oder mechanisch weniger belastbarem Faserknorpel differenzieren, entsteht anstelle von Knorpel minderwertiges Narbengewebe. Konservative Behandlungen wie die Gabe von Medikamenten oder nicht-medikamentöse Therapieverfahren erzielen nur im Anfangsstadium zufriedenstellende Ergebnisse. In vielen Fällen müssen bei Patienten mit großen Knorpelverletzungen und Nichtansprechen auf konservative (medikamentöse und nicht-medikamentöse) Therapieverfahren operative Eingriffe vorgenommen werden [5].

5.3 Epidemiologie

5.3.1 Prävalenz der Arthrose in Deutschland

Mehr als 50 % der über 65-jährigen Deutschen leiden an einer Arthrose. Dabei sind Arthrosen im Kniegelenk am häufigsten und etwa zwei Drittel der Menschen über 65 davon betroffen. Die GEDA-Studie (Gesundheit in Deutschland aktuell (2010)) zeigte eine direkte Korrelation zwischen Lebenszeitprävalenz der Arthrose und Alter. Das Auftreten der Arthrose schien dabei nicht nur alters-, sondern auch geschlechtsabhängig zu sein [6-9].

5.3.2 Risikofaktoren der Arthrose

Verschiedene Faktoren können zu einer Entstehung einer Arthrose beitragen. Mehrere Studien zeigen eine steigende Prävalenz mit höherem Alter [6-8]. Dies ist vor allem auf die begrenzte Haltbarkeit und Physiologie des alternden Knorpels (u.a. geringere Elastizität) und die altersbedingte Atrophie des Stützgewebes zurückzuführen, die die Anfälligkeit für Knorpelverletzungen erhöht. Auch das häufigere Auftreten der Arthrose bei Frauen wird in Studien beschrieben [9]. Zudem könnten genetische und ethnische Faktoren eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen [10]. Die Überbelastung des Gelenks, die z.B. durch erhebliches Übergewicht, Sportarten mit einseitiger Druckbelastung auf ein Gelenk oder berufliche Tätigkeiten, in denen schweres Heben oder Tragen nicht zu vermeiden sind, entsteht, kann auch mit der Arthroseentstehung assoziiert werden [11-13]. Desweiteren werden

Achsenfehlstellungen und Operationen (z.B. Menispektomien) als Risikofaktoren für Arthrose diskutiert und beschrieben [14,15].

5.4 Therapie von Knorpelläsionen

Das Potenzial zur Regeneration beschädigter Gelenkknorpel ist gering. Dies kann die Gelenkinematik negativ beeinflussen und in einem vorzeitigen Funktionsverlust des betroffenen Gelenks resultieren. Pathophysiologisch kommt es im Falle einer Läsion von Knorpelgewebe zur Proliferation der Vorläuferzellen im subchondralen Knochenmark und Gelenkkapsel, um anschließend, sofern Zugang z.B. durch die subchondrale Knochenplatte möglich ist, zum Ort der Verletzung zu migrieren und den Defekt zu decken. Diese Zellen differenzieren jedoch nur sehr langsam zu Chondrozyten und es entsteht ein faserknorpeliges oder hyalin-ähnliches Ersatzgewebe, das weniger stabil ist als der Knorpel. Aktuell gibt es eine Reihe von konservativen und operativen Therapieverfahren, wobei bei der Auswahl der Therapie auf das Stadium der Erkrankung und die patientenspezifischen Merkmale, wie Alter der Patientin bzw. Patienten, Ursache der Arthrose, Begleiterkrankungen, Risikofaktoren, etc. geachtet werden muss. Besonders entscheidend in der Therapie der Arthrose ist die Schmerzreduktion und der Funktionserhalt des betroffenen Gelenks. Die Arthrose ist jedoch derzeit nicht heilbar [16]. Die konservative Therapie beinhaltet medikamentöse (wie z.B. nicht-steroidale Antiphlogistika) sowie nicht-medikamentöse Therapiemaßnahmen (wie z.B. Physio- oder physikalische Therapie). Die operative Therapie kann dann in Erwägung gezogen werden, wenn konservative Maßnahmen nicht helfen [5].

Die operative Therapie von traumatischen Knorpelschäden, die prospektiv zur Arthrose führen können, besteht darin, beschädigten Gelenkknorpel wiederherzustellen, zu entlasten, zu ersetzen oder abzutragen. Die Wiederherstellung beschädigter Knorpelgewebe kann durch verschiedene Methoden, z.B. bei größeren Defekten, für die andere Methoden ungeeignet sind, durch das Transplantieren von Chondrozyten oder Zelltypen, die das Potenzial zur Knorpelneubildung haben, mithilfe des Tissue Engineering erreicht werden. Gegenwärtig bietet das relativ neue Konzept der regenerativen Medizin aussichtsreiche Möglichkeiten zur Therapie von durch den Funktions- und Substanzverlust des Knorpels entstehenden Folgen. In der Wiederherstellungschirurgie haben sich hierbei hauptsächlich die autologe (osteo-)chondrale Transplantationen und matrixgekoppelte autologe Chondrozytentransplantationen in der klinischen Anwendung etabliert [17-20]. Die durch Gelenkfehlstellungen entstehenden Fehlbelastungen der Gelenke können z.B. mittels gelenknahen Umstellungsosteotomien erfolgen, wobei hierdurch der Prozess einer Arthroseentstehung verzögert werden kann. Der Gelenkersatz

bei irreversiblen Knorpelschaden kann klassischerweise als *ultima ratio* mit Hilfe von Endoprothesen erreicht werden. Die Arthrodesen, die eine Alternative zur Endoprothetik darstellt und immer seltener in Erwägung gezogen wird, gehört zu den gelenkeliminierenden Verfahren [15].

5.5 Tissue Engineering in der Therapie von Knorpeldefekten

Gelenkknorpelverletzungen können in einer permanenten Störung der Gelenkkinematik mit Degeneration, Funktionseinbußen und Schmerzen resultieren.

Das Tissue Engineering soll hier potenziell Möglichkeiten der Gelenkknorpelheilung bieten. Die Herausforderung ist die Wiederherstellung eines mit dem hyalinen Gelenkknorpel in seinen biomechanischen Eigenschaften ähnlichen Ersatzknorpels, der nach einer Knorpelschädigung wieder die physiologische Kinematik des Gelenks bewerkstelligen soll. Hierbei liegt das Ziel des Tissue Engineering, ein Gewebetransplantat *in vitro* zu synthetisieren, um dieses später in verschiedenste Gewebedefekte zu implantieren. In der regenerativen Medizin kommt diese Methode z.B. in der matrixassoziierten autologen Chondrozytentransplantation zur Anwendung (siehe MACT). Ziel hierbei ist es, autologe bzw. patienteneigene Zellen aus ihrer Matrix herauszuisolieren und anschließend in Monolayerkultur zu vermehren, um mit diesen *in vitro* hergestellten Zellen und einem passenden bioaktiven Zellträger ein 3D Knorpelzellkonstrukt zu formen [18]. So wurden Knorpelzellen auf 3D resorbierbare Strukturen gebracht und nach subkutaner Implantation in Nacktmäuse eine Knorpelbildung beobachtet. In osteochondralen Defektmodellen im Kaninchen konnte in tierexperimentellen Studien mit Chondrozyten eine Defektdeckung mit hyalinartigem Ersatzgewebe erzielt werden. Ebenso wurden Gelenkdefekte bei Menschen mit Tissue engineernten Konstrukten repariert. Somit stellt das Tissue Engineering ein potentes Konzept für die Knorpelheilung dar [21-25].

5.6 Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)

Die intrinsische Knorpelheilung ist aufgrund der Biologie des bradytrophen Knorpelgewebes, das durch eine überwiegend fehlende Blutversorgung [26], geringe Zelldichte und niedrige Proliferationsrate [27] gekennzeichnet ist, massiv eingeschränkt. Deshalb stellen Knorpelverletzungen - trotz vieler Bemühungen und erheblicher Fortschritte in der invasiven und nichtinvasiven Knorpeltherapie - noch immer eine große therapeutische Herausforderung dar. Nicht selten können anfangs leichte Gelenkknorpeldefekte unbehandelt durch Überforderung der Reparaturmechanismen in Dauerschäden wie z.B. in Arthrose münden, die mit einer nicht unerheblichen Belastung für den Patienten einhergeht [28].

Eine der Hauptbemühungen der Wiederherstellungschirurgie ist es, geeignete Methoden zur Rekonstruktion defekter Gelenkknorpelareale zur Verfügung zu stellen.

Eine Alternative zur konservativen Behandlung von Gelenkknorpelschäden, die in der rekonstruktiven Chirurgie zur Anwendung kommt, stellt die ACT dar [29]. Die ACT wird als Mittel der Wahl bei jüngeren Patienten (max. bis ca. 55 Jahre), die Gelenkknorpelläsionen von über 4 cm² im Kniegelenk aufweisen, betrachtet [30]. Hier zeigen andere chirurgische Therapie-Methoden deutliche Nachteile. Im Hinblick auf ein verbessertes Outcome (raschere Heilung sowie günstigere Langzeitprognosen) - vor allem für die jungen Patienten - bedarf es jedoch einer Optimierung der Chondrozytenimplantationen.

Ein neuer Ansatz der Chondrozytenimplantation - die matrixassoziierte Autologe Chondrozytentransplantation (MACT, Abb. 1) stellt den Goldstandard für die Behandlung großer Gelenkknorpeldefekte dar. Hierfür werden autologe (patienteneigene) Knorpelzellen oder chondrogene Zellen auf eine künstlich synthetisierte, biokompatible und resorbierbare azelluläre Trägermatrix mit dem Vorteil verbracht, dass diese Zellen später mit ihrer bereits synthetisierten dreidimensionalen Matrix im Konstrukt in Gelenkdefekte implantiert werden können [29, 31]. Diese dreidimensionale Anordnung ist essentiell für die Bildung von Knorpel- ECM. Allerdings wird das chirurgische Vorgehen und die Prognose durch das limitierte proliferative Potential der Chondrozyten, die begrenzte Verfügbarkeit von gesundem autologen Ersatzgewebe, hohe Entnahmemorbidität und suboptimale funktionelle Eigenschaften der bisher verwendeten Biomaterialien und damit der dreidimensionalen Implantate eingeschränkt. Diese oben genannten Gründe beschränken deshalb auch die Einsetzbarkeit der MACT in der Therapie älterer Patienten mit chondrodegenerativen Erkrankungen [31].

5.7 Matrixassistierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT)

Das vorrangige Ziel gegenwärtiger Forschungen ist die erfolgreiche *in vitro* Vermehrung geringster Mengen autologen Spendergewebes und die Verwendung MSC als alternative Zellquelle sowie die Suche nach neuen funktionell sehr günstigen Trägermaterialien, die *in vitro* und *in vivo* die Knorpelneubildung begünstigen.

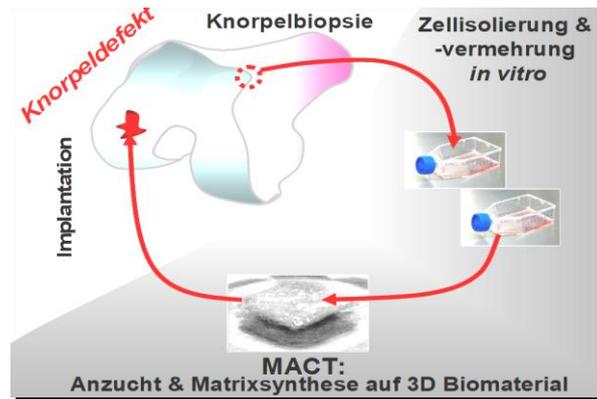


Abbildung 1: Prinzip der Matrix-assistierten Autologen Chondrozytentransplantation. Aus dem nicht-belasteten Bereich des Gelenkes wird eine kleine Menge Knorpel als Biopsie arthroskopisch entnommen und die isolierten Zellen in der Kultur vermehrt. Ein mit autologen Chondrozyten besiedeltes Knorpelzell-Biomaterial-Konstrukt (Scaffold) wird in den Gelenkknorpeldefekt implantiert. Diese sogenannte „matrix-assoziierte Chondrozytentransplantation“ kann für die Heilung größerer Knorpeldefekte genutzt werden (Quelle: AG Bioreconstruction).

Unterschiedliche dreidimensionale gewebeähnliche Konstrukte wurden in den letzten Jahren hergestellt in der Hoffnung, pathologisches Knorpelgewebe in einem Organismus zu ersetzen [32, 33]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch kein synthetisches Fasermaterial, das die Bedingungen der Resorbierbarkeit, der dauerhaften biomechanischen Beanspruchbarkeit und der Biokompatibilität im Säugetierorganismus in dem Maße erfüllt, dass es im klinischen Bereich der Gelenkknorpelrekonstruktion, gut nutzbar ist.

5.8 Zellquellen für die zellbasierte Knorpelgewebeheilung

5.8.1 Chondrozyten als Zellquelle für die Knorpelgewebeheilung:

Der Gelenkknorpel ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das zu 5% aus Chondrozyten, Progenitorzellen (wie z.B. Chondroblasten) und zu 95% aus ECM besteht, die als wesentliche Komponenten Aggrekan und Kollagen Typ II, etc. enthält. Dabei macht Kollagen einen Großteil der Trockenmasse des Knorpels aus (50-90%). In artikulärem Knorpel findet man hauptsächlich Kollagen vom Typ II [34]. Die Knorpelzellen sind als einziger Zelltyp des Knorpelgewebes für den Auf- und Abbau der Knorpelmatrix verantwortlich [35].

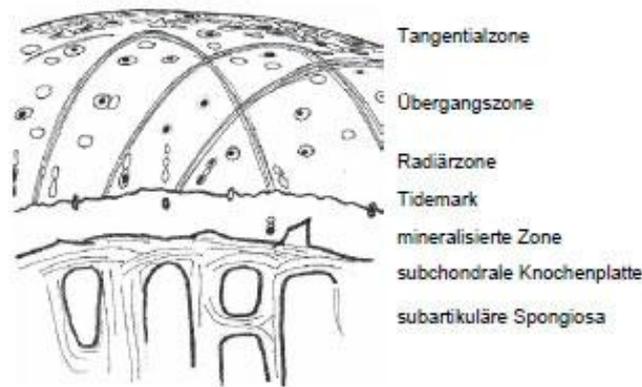


Abbildung 2: Zonen des Gelenkknorpels

In dieser Abbildung wird der grundlegende Aufbau des Gelenkknorpels eines Erwachsenen und die Größenverhältnisse der Zonen dargestellt. Quelle: http://www.sensorprod.com/news/white-papers/2004-07_aub/

Aufgrund der dichten ECM, der mangelnden Blutversorgung (Avaskularität), der alymphatischen und aneuralen Konditionen des Knorpelgewebes sind die Progenitorzellen nicht in der Lage, nach einer Verletzung des Knorpels in die entsprechende Läsion zu migrieren und dort Reparaturmechanismen zu entfalten. Die für die Regeneration unabdingbare Bereitstellung von Nährstoffen für Chondrozyten ist demzufolge nur sehr mangelhaft (geringer Stoffwechselumsatz) und erfolgt per Diffusion aus der Synovialflüssigkeit oder selten durch die Blutgefäße des subchondralen Knochens. Desweiteren besitzen die Progenitorzellen – u.a. auch die Chondroblasten –, welche wiederum aus MSC durch Differenzierung entstehen, eine begrenzte Teilungsfähigkeit. Reife Gelenkchondrozyten im gesunden Knorpel besitzen ein nur mehr niedriges Proliferationspotential. Ein weiteres Problem stellt – trotz der immerhin geringen Mitoserate der Chondroblasten – die Bildung isogener Gelenkknorpelzellgruppen. Diese isolierte Gruppierung innerhalb eines Gelenkknorpels entsteht durch das durch die ECM stark gehemmte Auseinanderweichen von Chondrozyten aufgrund der supramolekularen Anordnung der Komponenten der umgebenden Matrix. Wesentliche Bestandteile dieser Knorpelmatrix (u.a. Proteine wie Kollagen und Proteoglykane) werden von Progenitorzellen – den Chondroblasten – synthetisiert. Angesichts der erwähnten Probleme und fehlender medikamentöser Therapiemethoden wurden etliche zellbasierte Therapieverfahren im Bereich rekonstruktiver Chirurgie und Tissue Engineering entwickelt, von denen jedoch die meisten bislang keine optimalen Langzeitergebnisse mit sich brachten [31, 35].

Der Umstand, dass Chondrozyten limitierte Kapazitäten zur Proliferation aufweisen, bereitet große Schwierigkeiten im Erreichen einer bestimmten Mindestanzahl von Knorpelzellen für die Transplantation [36]. Ein weiteres Problem stellt die Dedifferenzierung der Chondrozyten (Verlust des Phänotyps) dar, die zu einer vermehrten Produktion von Kollagen Typ I führt.

Diese Problematik führte in letzter Zeit dazu, dass sich das Hauptaugenmerk immer mehr auf die Verwendung von MSC zur Knorpelheilung richtete [37].

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse der ACT besser bei traumatischen Läsionen als bei den weitaus häufiger vorkommenden degenerativen osteoarthritischen Defekten sind, da beim letzteren meist der subchondrale Knochen mitbetroffen und somit die Versorgung des in-vitro synthetisierten Knorpels nicht im ausreichenden Maße gegeben ist [38].

5.8.2 Mesenchymale Stromazellen als Zellquelle für Knorpelheilung:

Multipotente humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) zählen zu den alternativen Zellquellen für die Behandlung von Knorpelläsionen. hMSC können als multipotente Vorläuferzellen des Bindegewebes in verschiedene Zelltypen des Bindegewebes differenzieren. So können sie nach entsprechender Stimulation zu z.B. Chondrozyten, Osteoblasten, Tendozyten oder Adipozyten differenzieren und sind für die Gewebeheilung somit von wichtiger Bedeutung [38, 390].

In einigen Quellen sind Hinweise für eine vorteilhaftere Handhabung dieser Zellen in vielerlei Hinsicht, wie z.B. großer Pool an MSC im Knochenmark, besserer Zugang und einfachere Isolierung aus verschiedenen Geweben (Knochenmark, Fettgewebe, Synovium, Plazenta, etc.) sowie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und hohe Teilungsaktivität (hoher mitotischer Index) beschrieben worden [28, 40].

Zudem besitzen die Stromazellen und ihre weniger differenzierten Derivate eine vielfach höhere Proliferationsrate im Vergleich zu den reifen Chondrozyten, was ihren Einsatz als alternative Zellquelle für die zellbasierte Knorpelgewebeheilung vorteilhafter erscheinen lässt [28, 40]. In mehreren Tiermodellen kamen MSC zur Regeneration von Knorpeldefekten zur Anwendung [23].

In einigen Publikationen wurden MSC, die in Kollagengel eingebettet wurden, in chondrale Defekte im Knie effizient implantiert. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch unbekannt [41].

Einen Nachteil für die Verwendung von multipotenten MSC stellt der hohe Zeitaufwand durch die angestrebte chondrogene Differenzierung im Vergleich zu der Verwendung von autologen Chondrozyten dar [42].

Um Stammzellen wie MSC nutzbar für die Behandlung von Knorpelläsionen zu machen, erfolgt eine spezifische Differenzierung dieser Zellen in eine chondrogene Linie. Hierfür werden in mehreren Quellen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren aufgelistet, die die Chondrogenese antreiben (einige sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet).

Tabelle 1: Zytokine für die chondrogene Differenzierung von MSC

Zytokine / Wachstumsfaktoren	Referenzen
TGF- β , verschiedene Isoformen von TGF- β	[43]
Verschiedene Isoformen von BMPs (bone Morphogenetic proteins 2 und 4)	[44]
	[45]
Fibroblast growth factor-2	
Insulin-like growth factor-1	[46]

5.9 Zellträger für das Tissue Engineering

5.9.1 Anforderungen an resorbierbare Zellträger (Scaffolds)

Die künstlich synthetisierten 3D-Scaffolds stellen bioaktive azelluläre Gerüste dar, in die Wirtszellen einwachsen sollen. Diese 3D-Matrix soll die Gelenkchondrozyten unter Bewahrung des Phänotyps (Synthese von Aggrekan und Kollagen Typ II) aufnehmen. Von wichtiger Bedeutung für solche Zell-Matrix-Gerüste ist, dass die ausgesäten Zellen die Degradation der künstlichen Matrix durch Produktion von funktioneller ECM ausgleichen müssen. Im Endeffekt bildet sich nach Implantation in einem Knorpeldefekt ein dem hyalinen Knorpel in seiner Struktur und Biomechanik ähnlicher Ersatzknorpel. Zudem erfordern die Druckgegebenheiten (oft herrscht hoher Druck) in den Gelenken eine gewisse Widerstandsfähigkeit der Matrices auf physiologische Kräfte, sodass entscheidend für den Erfolg nicht nur die Rücksichtnahme auf die Zellart, die Überlebens- und Proliferationsrate der Zelle, die Degradationsrate und die chemische Zusammensetzung des Scaffoldmaterials, sondern auch sein biomechanischer Charakter ist. Aufgrund der Problematik, die sich z.B. bei allogener Knochentransplantation ergeben, nämlich die geforderte möglichst weitreichende Übereinstimmung der vom menschlichen Immunsystem erkannten Merkmale mit dem Empfängergewebe, sollten die resorbierbaren Scaffolds für den Knorpelersatz keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Darüber hinaus müssen die Vliese frei von kanzerogenen Stoffen und vollständig resorbierbar sein. Gleichzeitig sollten keine erheblichen zellulären Entzündungsreaktionen bei der Resorption stattfinden [29, 31].

5.9.2 Calcium-Zink (Ca-Zn)-Scaffolds

In der Fachliteratur sind zahlreiche 3D Strukturen (wie u.a. Alginat- oder Agarosekulturen) aufgelistet und im Handel, die im Gegensatz zu 2D Kulturen den Erhalt des Phänotyps der

Chondrozyten über mehrere Monate gewährleisten sollen. Jedoch wurde bisher auf Basis des stammzellbasierten Tissue Engineerings noch kein routinemäßig eingesetztes Scaffoldmaterial entwickelt. Hierbei ist grundsätzlich wichtig, dass das Trägermaterial zusätzlich zur biomechanischen Beanspruchbarkeit und Biokompatibilität im Säugetierorganismus die phänotypische Stabilität der chondrogen differenzierten MSC gewährleistet.

Die Kooperationspartnerin Prof. Hala Zreiqat (*Tissue Engineering and Biomaterials Research Unit* von der *School of Aerospace, Mechanical and Mechatronic Engineering*, Arbeitsgruppe Hala Zreiqat in Sydney) entwickelt seit mehreren Jahren mit ihrer Arbeitsgruppe neue bioresorbierbare Materialien in Form von sogenannten Vliesen (Ca-Zn), mit veränderbaren Zusammensetzungen, um diese für spätere klinische Anwendungen zum Gewebeersatz oder Verbesserung der Gewebeheilung nutzbar zu machen. Diese Ca-Zn-Scaffolds sind ein völlig neuartiges Material, das nach (autologer) Zellbesiedlung für den (autologen) Gelenkknorpelersatz zur Behandlung von traumatisch entstandenen Gelenkknorpeldefekten aussichtsreich sein könnte. Dieses Material wurde des Weiteren bereits für den Knochenersatz mit Erfolg als Hinweis auf eine Zytokompatibilität mit humanen Zellen getestet [47].

Die Modifikationen der Ca-Zn-Scaffolds wurden durch die Kooperationspartnerin wie folgt zur Verfügung gestellt:

- 1.- Strontium/Hydroxylapatit Gahnit
- 2.- Strontium/Hydroxylapatit Gahnit mit induktiven Kristallen
- 3.- Strontium/Hydroxylapatit Gahnit mit kristalliner Glasphase
- 4.- Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat

Strontium ist ein reaktionsfreudiges Erdalkalimetall, das in geringen Mengen auch im menschlichen Körper nachgewiesen werden kann – Strontiumsalze haben aktuell im Hinblick auf die Osteoporosetherapie das medizinische Interesse geweckt, da Strontium in seiner Eigenschaft große Ähnlichkeit mit Calcium hat. Dieses Element stimuliert den Aufbau von Knochenmatrix und erhöht die Knochendichte. Dabei verringert sich das Risiko für Knochenfrakturen bei Frauen mit Osteoporose [48, 49].

Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3$) repräsentiert den natürlichen mineralischen Anteil des Knochens und bildet hexagonale Kristalle. Ghanit ist ein eher seltenes Mineral der Zusammensetzung: ZnAl_2O_4 , das oktaedrische Kristalle bildet.

Die beschriebenen Modifikationen sollen die Bioaktivität und mechanischen Eigenschaften der Scaffolds verbessern. So kann die Nanostruktur von Kristallen induktive Reize auf die Differenzierung von Knochen- und wahrscheinlich auch Knorpelzellen ausüben.

Die Nanostruktur der Scaffolds wird über den Herstellungsprozess variiert.

5.10 Chondrogenese im Nacktmausmodell

Zur Anwendung der in dieser Arbeit dargestellten bioresorbierbaren Ca-Zn-Scaffolds für die Knorpelregeneration gibt es noch keine verfügbaren *in vivo* Daten. Das Bioscaffoldmaterial wird in mehreren Varianten hergestellt und *in vitro* mit Knorpel- bzw. chondrogen-differenzierten MSC besiedelt, so dass ein Knorpelzell-Konstrukt entsteht, das dann in den Säugetierorganismus (in der vorliegenden Arbeit im Nacktmaus-Modell) verbracht werden soll, um Knorpelbildungseigenschaften zu untersuchen. Zum einen ist das Verhalten der Knorpel- bzw. chondrogen differenzierten MSC (wie Zellvermehrung, -überleben, extrazelluläre Matrixsynthese, und – qualität) im Organismus von wichtiger Bedeutung und andererseits muss die Entstehung und Auswirkung von möglichen Abbauprodukten des bioresorbierbaren Scaffolds überprüft werden. Bei Verwendung von Trägermaterialien zur zellbasierten Transplantation von Knorpelzellkonstrukten besteht häufig die Gefahr von Reaktionen des Zielorganismus auf das Fremdmaterial. Als Fremdkörper-Reaktion des Organismus auf das Scaffold besteht z. B. das Risiko einer beschleunigten Abkapselung oder/und der beschleunigten Resorption des Trägermaterials und viele andere Reaktionen, die sich *in vitro* nicht überprüfen lassen [50].

Hierbei stellt sich zudem die Frage, ob beim Resorptionsprozess des mit Knorpelzellen bzw. chondrogen-differenzierten MSC besiedelten oder unbesiedelten Biomaterials eine Veränderung des Gewebemilieus (u.a. saurer pH) entsteht, wie z. B. für andere biodegradierbare Materialien beschrieben wird [51].

In vitro Untersuchungen können diese Fragen nicht beantworten, weil in der Zellkultur das Kulturmedium zur Ernährung der Zellen im Scaffold ständig ausgetauscht werden muss und so z.B. die Entstehung eines sauren Milieus durch Abbauprodukte des Fasermaterials, die Möglichkeit toxischer Effekte auf Organe, die für die Entgiftung zuständig sind nicht überprüft werden kann. Auch kann eine mögliche Abwanderung (und dort Fehldifferenzierung, Induktion unkontrollierter Zellteilungen) von chondrogen-differenzierten MSC in gut durchblutete Organe wie Lunge, Leber, Milz oder Gehirn durch *in vitro* Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Zudem ist für die klinische Anwendung die Gewährleistung einer langfristigen 3D Zellanordnung im bioresorbierbaren Scaffold, Produktion einer hyalinen belastbaren Knorpelmatrix sowie das Erzielen einer ausreichenden Gewebestabilität von großer Bedeutung. Diese Parameter können derzeit generell nur in einem *in vivo* Tierexperiment analysiert werden, nicht aber in der Zellkultur.

Für erste Experimente zur Überprüfung essentieller Eigenschaften des Scaffolds im Hinblick auf klinische Anwendungen wie z.B. Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und

Knorpelbildungsvermögen des besiedelten Faser-Trägermaterials im Zielorganismus eignet sich die immundefiziente Nacktmaus (*athymic mouse xenograft model*). Für derartige Versuche stellt diese Tierspezies ein gut bewährtes und in zahlreichen vergleichbaren Studien gut beschriebenes Versuchsmodell dar [51, 52]. Dieses Modell ist bereits von verschiedenen Untersuchern für die Beurteilung von Knorpel-Scaffold-Konstrukten erfolgreich genutzt worden und auch der vorgesehene Entnahmezeitpunkt ist repräsentativ in der Fachliteratur dokumentiert [51, 53].

6 Zielstellung

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob die neu entwickelten resorbierbaren Biomaterial-Knorpelzellkonstrukte, die zur Verbesserung der (osteo-)chondralen Defektheilung im Menschen bestimmt sind, bestimmte Kriterien wie Adhäsion, Differenzierung, Proliferation und Migration von Chondrozyten und MSC in die Scaffoldstrukturen *in vitro* erfüllen und sich als Trägermaterial für die Knorpelzellimplantation im Nacktmausmodell eignen. Um diese Aufgabe zu erfüllen mussten PGC und humane MSC isoliert und vermehrt werden. Diese *in vitro* gezüchteten Chondrozyten und MSC galt es in die Vliesstruktur zu bringen. Dabei wurden die Scaffolds von der australischen Arbeitsgruppe mit „A“, „B“, „C“ und „D“ pseudonymisiert und in dieser Arbeit somit verblindet gegeneinander verglichen.

Sofern die Scaffolds eine Adhäsion und Migration der Zellen erlaubten, erfolgte zudem die Bestimmung knorpelspezifischer Marker und anderer ECM-Komponenten *in vitro*.

Anhand dieser Ergebnisse sollte eine erste Entscheidung getroffen werden, welche der beiden Zellarten (PGC *versus* multipotente MSC) die oben genannten Kriterien in höherem Maße erfüllt. Im Anschluss an die *in vitro* Analysen sollte die Eignung der Ca-Zn-Knorpelzellkonstrukte im Hinblick auf klinische Anwendungen für die regenerative Therapie von Knorpelverletzungen auch *in vivo* geprüft werden. Zur Beurteilung der Zytokompatibilität, Stabilität, Formerhaltung, und Einwachsverhaltens der Implantate wurden die Scaffolds im nicht-immunkompetenten Tiermodell der Nacktmaus untersucht (vgl. [51]). Dazu wurden die Eigenschaften von einem Biomaterial in 4 verschiedenen Modifikationen („A - D“) mit und ohne Knorpelzellbesiedlung überprüft. Dabei erfolgte jeweils ein Vergleich der mit Zellen besiedelten und der unbesiedelten Variante. Hier sollte sich zeigen, ob eine Besiedlung mit Knorpelzellen die Voraussetzung für eine Knorpelbildung war oder ob auch schon in den unbesiedelten Scaffolds durch einwandernde Zellen eine Chondrogenese induziert werden konnte und das Material damit chondroinduktiv ist. Wichtig war es auch zu beobachten, ob die Ca-Zn-Scaffolds nach und nach durch die von den

Zellen gebildete ECM ersetzt wurden, ohne dass entzündliche Vorgänge bzw. toxische Abbauprodukte entstanden.

Nach sechs Wochen erfolgte die Explantation der Scaffolds, um umfangreiche morphometrische und histologische Untersuchungen der Vliese durchzuführen

Die Ergebnisse sollten richtungsweisend für eine weitere Optimierung des Materials sein, die im direkten Austausch mit der Projektpartnerin Frau Prof. Dr. Hala Zreiqat in Sydney in der Materialentwicklung praktisch umgesetzt werden.

Die Ergebnisse stellen weiterhin die Basis dar, um in weiteren Versuchen eine therapeutische Nutzbarkeit des Konstruktes zur Heilung von Gelenkknorpeldefekten im Menschen festzustellen.

7 Material und Methodik

7.1 Material

7.1.1 Verwendete Zellen

Tabelle 2: verwendete Zellart

Zellart	Herkunft	Zellart	Abkürzung	Alter
Gelenkchondrozyten	Hybridschweine (porcin), Knie	Primärzellen	PGC	4-6 Monate
mesenchymale-Stromazellen	Mensch (human), Knochenmark	Primärzellen	MSC	s. u.*

* Das mittlere Alter betrug 75,4 Jahre und 62,5% der Spender waren weiblich

(Altersspanne: 60 bis 88 Jahre)

Tabelle 3: MSC-Spender

MSC-Spender	Geschlecht	Alter	Entnahmeregion
MSC 68*	Weiblich	76	Hüftkopf
MSC 77	Weiblich	86	Hüftkopf
MSC 78	Männlich	69	Hüftkopf
MSC 79*	Weiblich	88	Hüftkopf
MSC 80*	Weiblich	72	Hüftkopf
MSC 85	Männlich	71	Hüftkopf
MSC 90	Weiblich	60	Hüftkopf
MSC 92	Männlich	81	Hüftkopf

*Multipotenznachweis im Rahmen anderer Studien erfolgt [54].

7.1.2 Verwendete Scaffolds

Die Scaffolds, die in der vorliegenden Arbeit verblindet untersucht werden sollten, stammten aus der Kooperation mit der *Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hala Zreiqat an der Tissue Engineering and Biomaterials Research Unit* in der Faculty of Engineering, Sydney.

Nachfolgend sind Bilder der unbesiedelten Scaffolds (Abbildung 3) und die gemittelten Dimensionen und Parameter der einzelnen Scaffoldvarianten aufgelistet (pro Variante wurden 10 Scaffolds gemessen) (siehe Tabelle 4):

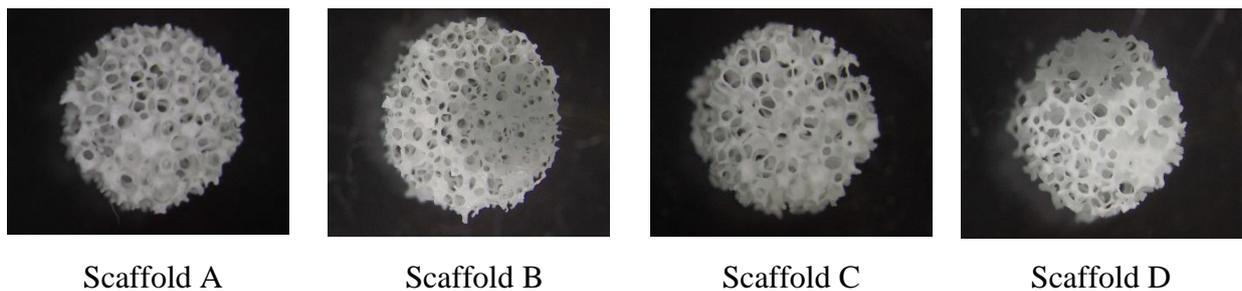


Abbildung 3: Verblindung. Während der Versuche erfolgte eine Verblindung der Ausführenden. Die Material-Modifikationen erhielten die Bezeichnungen „A-D“ und nur die Kooperationspartnerin kannte die Zuordnung zu den oben beschriebenen Gruppen. Die Auflösung der Verblindung erfolgte nach Abschluss aller Experimente. In der Abbildung ist die Zusammensetzung, der mittlere Porendurchmesser (in mm), das Trockengewicht (in mg) der Scaffolds angegeben.

Tabelle 4: Geometrie der Scaffolds

	Scaffold A	Scaffold B	Scaffold C	Scaffold D
Durchmesser des Scaffolds [mm]	5,34 +/- 0,05	5,48 +/- 0,06	5,45 +/- 0,13	5,3 +/- 0,11
Höhe des Scaffolds [mm]	2,46 +/- 0,1	2,74 +/- 0,1	2,86 +/- 0,1	2,83 +/- 0,1
Trockengewicht [mg]	152 +/- 1,3	161 +/- 1,6	96 +/- 1,2	152 +/- 1,1
mittlerer Porendurchmesser [mm]	0,29 +/- 0,2	0,24 +/- 0,2	0,33 +/- 0,4	0,34 +/- 0,3
Zusammensetzung	Hydroxylapatit/ Tricalciumphosphat	Strontium/ Hydroxylapatit Gahnit	Gehlenit (Ca ₂ Al ₂ SiO ₇)	Gehlenit + 2% Strontium

Tabelle 5: Trockenmasse (in mg) der Scaffolds (n=3)

Scaffold	I	II	III	Mittelwert	Standardabweichung
A	27,70	30,70	27,70	28,70	1,7
B	40,10	35,60	40,30	28,67	2,7
C	18,80	24,30	20,90	21,33	2,8
D	30,70	36,20	40,20	35,70	4,8

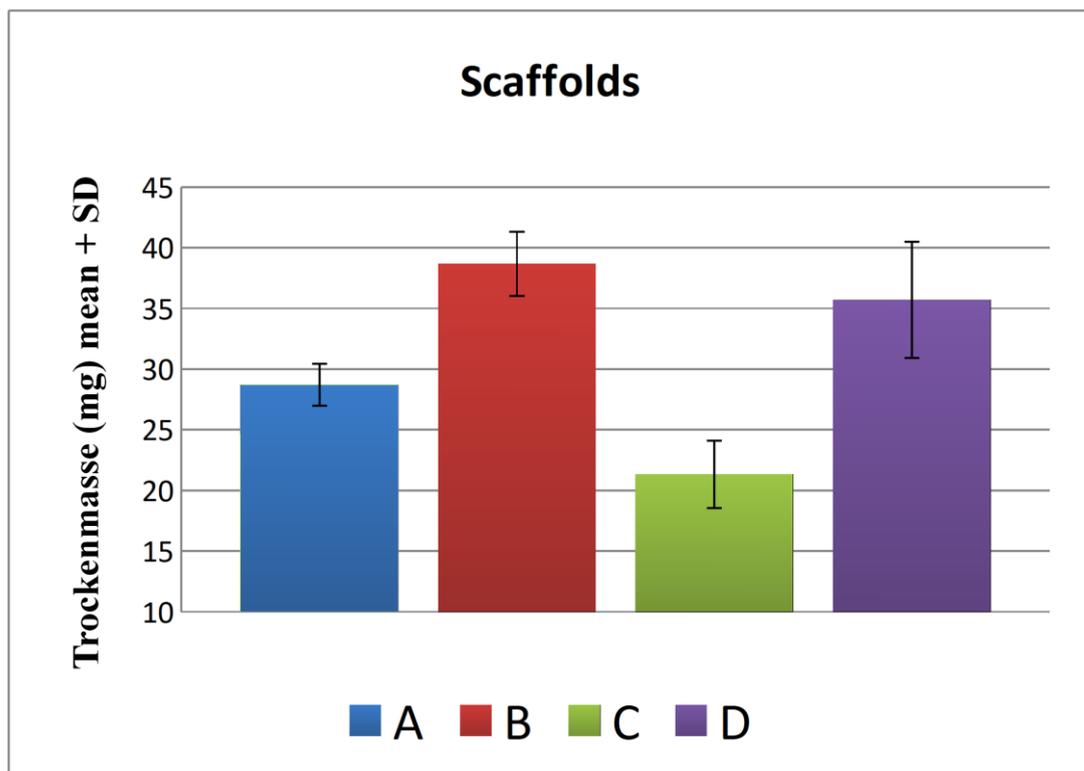


Abbildung 4: Trockenmasse. Abgebildet sind die Trockenmasse in mg und der Mittelwert (mean) mit Standardabweichung (SD).

Tabelle 6: Feuchtmasse (in mg) der Scaffolds (n=3)

Scaffold	I	II	III	Mittelwert	Standardabweichung
A	60,3	61,1	56	59,1	2,7
B	87	86,3	70,6	81,3	9,3
C	70	99,2	78	82,4	15,1
D	61,7	70,7	67,6	66,7	4,6

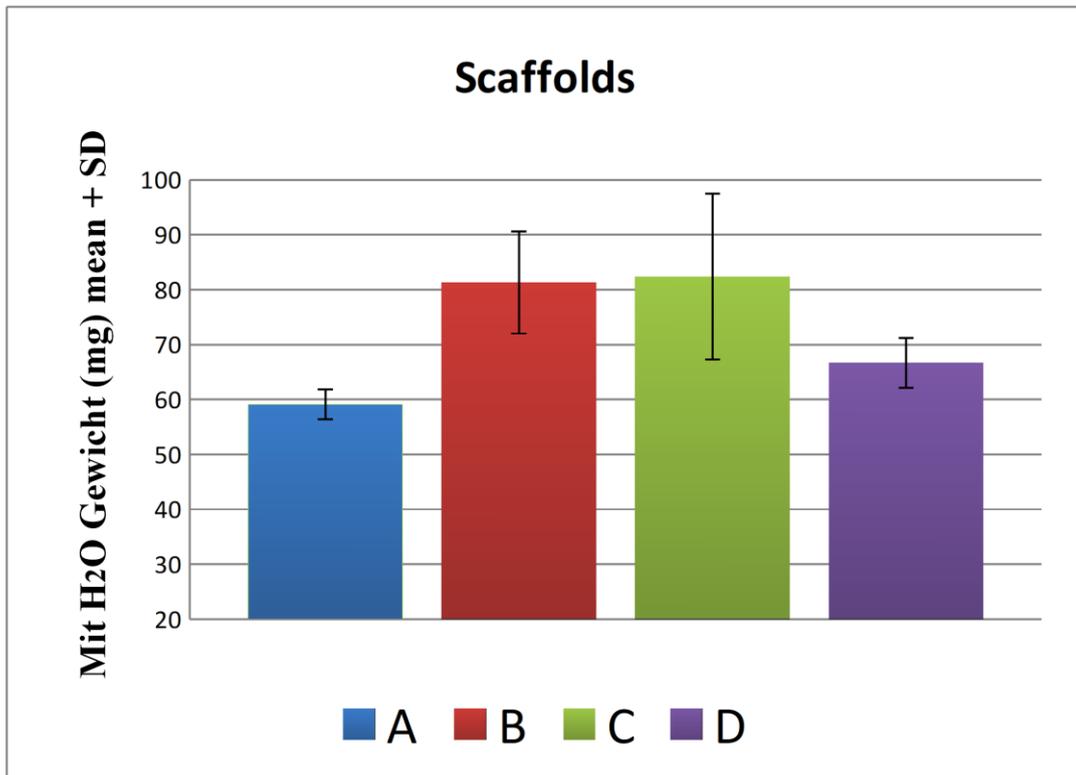


Abbildung 5: Feuchtmasse. Abgebildet sind die Feuchtmasse in mg und der Mittelwert (mean) mit Standardabweichung (SD).

Außerdem wurde an jeweils 3 Scaffolds die Feucht und Trockenmasse bestimmt (Tabelle 5 und 6; Abbildung 4 und 5).

7.1.3 Verwendete Tiere

Tabelle 7: Daten zu den Nacktmäusen

Tierart*	Alter	Tierstamm/-rasse:
36 homozygote, thymusaplastische Nacktmaus; weiblich	5 – 6 Wochen	Nacktmäuse <i>Cr1: CD1 nu/nu</i>

Tabelle 8: Daten zu den Kontrollmäusen

Tierart*	Alter	Tierstamm/-rasse:
3 Black six Mäuse; weiblich	8 Wochen	Black six Mäuse

*Die Mäuse stammen aus einer anerkannten Züchtung und wurden von der Firma Charles River (Sandhofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld) bezogen (AktENZEICHEN: G0036/13; behördliche Genehmigung lag vor: 10.06.2013 - 30.06.2016).

7.1.4 Verwendete Chemikalien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Azacytidin	Sigma-Aldrich, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biochrom AG, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, DE
Eserserum (Donkey-Serum)	Chemicon, USA
Essentielle Aminosäuren, 50x MEM-AS	Biochrom AG, DE
Ethanol, 70 %	Merck KGaA, DE
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, DE
FKS (hitzeinaktiviert 56 °C, 30 min)	Biochrom AG, DE
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich, USA
Fluoromount	Southern Biotech, USA
Gentamycin	Biochrom AG, DE
Ham's F12	Biochrom AG, DE
HEPES-Puffer	Biochrom AG, DE
Hydroxyprolin (1 mg/ml)	AppliChem GmbH, DE
Isofluran	Abott Animal Health, DE
Paraformaldehyd, 4 %	Carl Roth GmbH, DE
Partricin, 50 μ g/ml	Biochrom AG, DE
Penicillin / Streptomycin, 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
PBS	Biochrom AG, DE
Phalloidin	Santa Cruz, USA
Rimadyl	Pfizer Animal Health, USA
Roticlear	Carl Roth GmbH, DE
Trypanblau, 1 %	Biochrom AG, DE
Trypsin / EDTA (0,25 % / 0,1 % w/v in PBS)	Biochrom AG, DE
Vitamin C (25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, USA
TGF – β 1	Peprtech, DE

7.1.5 Verwendete Medien

Tabelle 10: Verwendete Medien

Stammzellmedium		chondrogenes Differenzierungsmedium	
Ascorbinsäure	1 μ g/ml	L-Glutamin	10 μ l/ml
Dexamethason	1 μ g/ml	HEPES	25 μ l/ml

DMEM	51ml/100ml	Na-Pyruvat	10 µl/ml
FKS	15ml/100ml	Dexamethason	0.1 µl/ml
Insulin	5 µg/ml	Ascorbinsäure	1.7 µl/ml
Linolsäure	4.7 µg/ml	Prolin	1 µl/ml
MCDB mit L-Glutamin	34ml/100ml	ITS+1	10 µl/ml
Penicillin	50 IU/ml	Streptomycin	50 IU/ml
Selen	5 ng/ml	Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 IU/ml	TGF-β1	10 ng/ml
Transferrin	5 µg/ml	DMEM	10 ml

7.1.6 Verwendete Antikörper

Zur qualitativen Charakterisierung der kollagenen Matrix wurden die in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten mono- und polyklonalen Antikörper verwendet.

Tabelle 11: Antikörper

Bezeichnung (Konjugat)	Primär-/ Sekundär- antikörper	Eingesetzte Konzentration	Firma
p-RAH-Kollagen Typ II	Primär-Ak	20 µg/mL	Acris, DE
m-GAH-Kollagen Typ I	Primär-Ak	8 µg/mL	Southern Biotech, USA
p-DAG-IgG (Alexa Fluor 488)	Sekundär-Ak	10 mg/mL	Invitrogen AG, USA
p-DAR-IgG (Alexa Fluor 555)	Sekundär-Ak	10 mg/mL	Life Technologies Corporation, USA

7.1.7 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 12: Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Eingesetzte Konzentration	Firma
DAPI	1 µg/ml	Roche, Schweiz
Phalloidin Alexa 633	1000 Units/ ml	Santa Cruz, USA

7.1.8 Geräte

Tabelle 13: Geräte

Gerät	Hersteller
Zellkulturflasche Cell plus T175	Sarstedt AG, DE
Zellkulturplatte Cell plus 6-Well	Sarstedt AG, DE
Objektträger und Deckgläser	Menzel, DE
Brutschrank HERA Cell 150	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG (Hamburg)
Feinwaage Adventurer	Ohaus Europe GmbH (Nänikon)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG (Göttingen)
Invertmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Göttingen)
Rollermischer SRT9D	Bibby Scientific Limited, UK
Kamera XC30	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Münster)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SPE II	Leica (Wetzlar)

7.1.9 Software

Tabelle 14: Software

Software	Hersteller	Methode
Cell [^] D Imaging Software	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Münster)	Bilderfassung
ImageJ 1.44p	Wayne Rasband National Institutes of Health (USA)	Bild - Analyse
Prism 5	GraphPad Software, Inc.	Statistik

7.2 Methodik

7.2.1 Versuchsaufbau

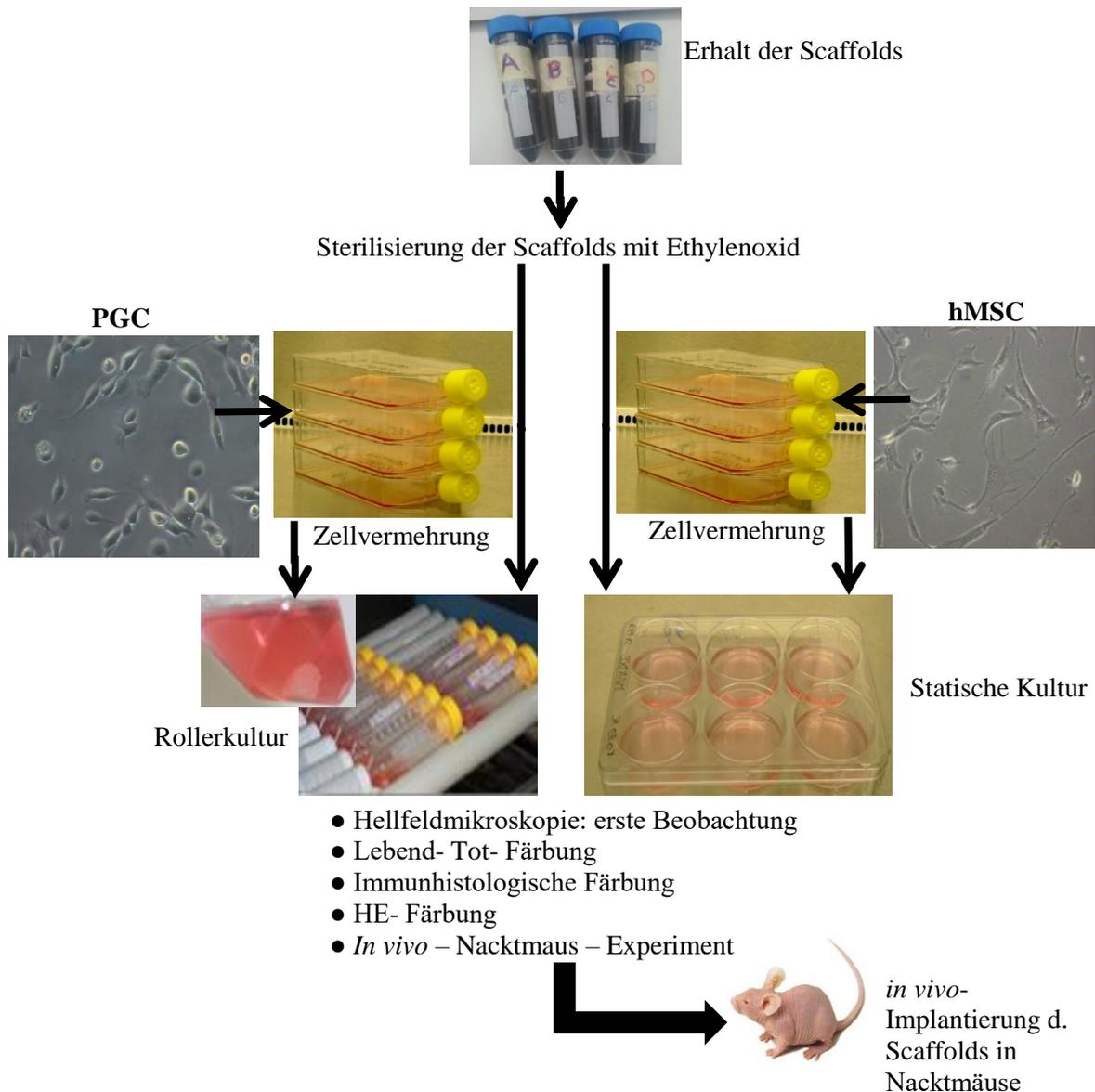


Abbildung 6: Experimentelle *in vitro* als auch *in vivo* Vorgehensweise als Vliesdiagramm dargestellt. hMSC: humane mesenchymale Stromazellen. PGC: porcine Gelenkchondrozyten.

In vitro-Versuch: Es erfolgten unabhängige Versuche mit jeweils zwei unterschiedlichen Zellarten (PGC und chondrogen-differenzierten hMSC aus dem Knochenmark) für vier im Aufbau und Zusammensetzung unterschiedliche Scaffolds „A-D“ (Abbildung 6).

Am Anfang erfolgte die Besiedlung der Scaffolds mit PGC von drei unterschiedlichen Spendern (n = 3). Anschließend wurde unabhängig davon mit MSC, die alle im weiteren Verlauf des *in vitro* - Experiments in die chondrogene Linie differenziert wurden, von 8 verschiedenen Spendern gearbeitet (n = 8).

Es wurden verschiedene Verfahren der Besiedlung und Kultivierung (Rollerkultur und statische Kultur) angewendet, um herauszufinden, welche der beiden Methoden die effektivere Variante darstellt, die zu einer größeren Zelladhärenz nach der Besiedlung führt. Die Besiedlung der Zellen auf den Scaffolds per Rollerkultur wurde jedoch aufgrund nicht-vielversprechender Ergebnisse frühzeitig beendet.

Der *in vitro*-Versuch bestand aus den drei nachfolgend genannten Experimenten: Die Determination der Besiedlungseffizienz erfolgte per invertmikroskopischem Monitoring. Desweiteren wurden Lebend-Tot-Färbungen für die Bestimmung der Vitalität der Zellen auf den Scaffolds durchgeführt. Schließlich wurden die *in vitro*-Versuche durch die Kollagen-Typ I/ II/ F-Aktin-Immunfärbung vervollständigt. Für jeden Versuch wurden mindestens drei Spender verwendet.

Tabelle 15: Spenderzellen und Kultivierung

Verwendete Spenderzellen mit Passage (P)	Kultivierungsart
PGC 20 P2	Rollerkultur
PGC 26 P2	Rollerkultur
PGC 33 P3	Anfangs Rollerkultur, später zur statischen Kultur gewechselt
MSC 68 P4*	Statische Kultur
MSC 77 P4	Statische Kultur
MSC 78 P4	Statische Kultur
MSC 79 P4*	Statische Kultur
MSC 80 P3*	Statische Kultur
MSC 84 P2	Statische Kultur
MSC 85 P2	Statische Kultur
MSC 90 P3	Statische Kultur
MSC 92 P4	Statische Kultur

*Multipotenznachweis im Rahmen anderer Studien erfolgt [54]

In vivo-Versuch: Erfahrungen der Arbeitsgruppe zu einem Chondrogenesemodell und einem Tendogenesemodell in der Nacktmaus konnten genutzt werden [51].

Tabelle 16: Vorgehensweise im *in vivo* Nacktmausmodell

Biomaterial	Implantationsmaterial	Untersuchungszeitpunkt: 6 Wochen
--------------------	------------------------------	---

1.	Modifikation	Scaffold A ohne Zellen	5 Tiere
		Scaffold A mit Zellen*	4 Tiere
2.	Modifikation	Scaffold B ohne Zellen	5 Tiere
		Scaffold B mit Zellen*	4 Tiere
3.	Modifikation	Scaffold C ohne Zellen	5 Tiere
		Scaffold C mit Zellen*	4 Tiere
4.	Modifikation	Scaffold D ohne Zellen	5 Tiere
		Scaffold D mit Zellen*	4 Tiere
5.	Kontrolle**	Nicht implantiert	3 Tiere
Gesamtanzahl		alle Gruppen	36 Tiere

* chondrogen differenzierte MSC. Daraus ergibt sich eine gesamte Tieranzahl von n= 36 bzw. n= 36 Scaffolds. **black six

9 Tiere werden je Scaffoldmodifikation entsprechend der Auflistung in Tabelle 16 verwendet. Die Nacktmäuse werden klinisch (Allgemeinbefinden, Inspektion der Implantationsnaht und wöchentliche Gewichtsmessung der Tiere) überwacht. Nach sechs Wochen erfolgt eine makroskopische Analyse und Gewichtsmessung der explantierten Scaffolds (Score-System siehe [51]): u.a. Größenerhalt, Farbe, Oberfläche, Konsistenz).

Zusätzlich erfolgt eine histologische Charakterisierung aller Scaffolds bezüglich der Knorpelgewebbildung, Zelladhäsion, Zeichen einer Fremdkörperreaktion und Abkapselung (Score-System siehe [51]). Hierfür werden aus jeder Gruppe (A, B, C, D) fünf (für Scaffolds ohne Zellen - in jeweils fünf Tieren gezüchtet) und vier (für Scaffolds mit Zellen – in jeweils vier Tieren gezüchtet) Konstrukte verwendet. Aus diesen Proben werden Paraffinblöcke hergestellt und Paraffinschnitte angefertigt.

7.2.2 Zellkultur

7.2.2.1 Auftauen und Einsaat PGC bzw. MSC

Die Lagerung der verwendeten kryo-konservierten PGC bzw. hMSC erfolgte in Kryoröhrchen mit Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Die Zellen mussten für die Einsaat durch Erwärmen im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut werden. Danach wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in 5 mL 10 % FKS enthaltendem Knorpelmedium (für die Gelenkhondrozyten) bzw. Stammzellmedium (Expansionsmedium mit 6 Faktoren [EM6F]) mit 15% FKS für die MSC aufgenommen und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der

Mediumüberstand vorsichtig abgesaugt, die zentrifugierten Zellen (Zellpellet) in einem entsprechenden Volumen (10-20 ml frischen 10 % FKS enthaltenden Knorpelmediums bzw. 15% FKS enthaltenden EM6F-Mediums aufgenommen, resuspendiert und die Suspension in eine Zellkulturflasche gegeben. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Schwenken der verschlossenen Kulturflasche wurde die Zellsuspension gleichmäßig über dem Flaschenboden verteilt und eine Vereinzelnung der Zellen angestrebt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Chondrozyten bzw. MSC bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator, um die Zellen zu expandieren, um somit eine ausreichende Anzahl (1,5 Millionen Zellen pro Scaffold) für die Besiedelung der Scaffolds zu erhalten.

7.2.2.2 Kultivieren und Passagieren von PGC

Die Kultivierung der Chondrozyten erfolgte zunächst im Monolayer (zweidimensional) in Zellkulturflaschen, um eine ausreichende Anzahl für die anschließende Rollerkultur bzw. statische Kultur in den Scaffolds zu gewinnen – die Kultivierung der Zellen in der Rollerkultur erfolgte nur in der Etablierungsphase und wurde nicht mehr weitergeführt, da die Scaffolds durch die ständige vertikale Rotation zu schnell degradierten.

Die Zellen wurden dafür im Brutschrank kultiviert (Kultivierungsbedingungen im Brutschrank lagen bei 37 °C und 5 % CO₂). Im Abstand von zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit frischen 10 % FKS enthaltenden Knorpelmedium.

Die Subkultivierung erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 10 mL PBS gespült. Nach dem vorsichtigen Absaugen des PBS wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA-Lösung (0,25 %/ 0,1 % w/v in PBS) für 10 s überschichtet. Diese wurde danach sorgfältig abgesaugt und die Zellen durch Inkubation bei 37 °C für 2-3 min vom Gefäßboden gelöst. Durch Spülen der Zellkulturflasche mit 2x 10 mL 10 % FKS enthaltenden Knorpelmedium konnten die Zellen abgelöst und in einem Falconröhrchen gesammelt werden. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 400 g für 5 min entstand durch Sedimentation der Zellen ein Zellpellet und der zellfreie flüssige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Durch die Zugabe eines entsprechenden Volumens (2 mL) frischen 10 % FKS enthaltenden Knorpelmediums und vorsichtiges Resuspendieren konnten die Zellen gleichmäßig auf neue Zellkulturflaschen verteilt und wieder bei 37 °C sowie 5 % CO₂ kultiviert werden. Jede folgende Subkultivierung wurde mit der entsprechenden Passagennummer P(x) dokumentiert.

7.2.2.3 Kultivieren und Passagieren der MSC

Die Kultivierung der MSC erfolgte ähnlich der Kultivierung der PGC auch zunächst im Monolayer (zweidimensional) in Zellkulturflaschen, um eine ausreichende Zahl für die anschließende Rollerkultur bzw. statische Kultur in den Scaffolds zu gewinnen. Für die MSC-Isolierung lag eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin vor (EA4_024/09). Die Zellen wurden zur Anzucht in den Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Abstand von zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Stammzellmedium. Die Subkultivierung erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 10 mL PBS gespült. Nach dem vorsichtigen Absaugen des PBS wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA-Lösung für 10 s überschichtet. Diese wurde danach sorgfältig abgesaugt und die Zellen durch Inkubation bei 37 °C für 2-3 min vom Gefäßboden gelöst. Durch Spülen der Zellkulturflasche mit 2x 10 mL Stammzellmedium konnten die Zellen abgewaschen und in einem Falconröhrchen gesammelt werden. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 400 g für 5 min entstand ein Zellpellet und der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Durch die Zugabe eines entsprechenden Volumens (2 mL) frischen Stammzellmediums und vorsichtiges Resuspendieren konnten die Zellen gleichmäßig auf neue Zellkulturflaschen verteilt und wieder bei 37 °C sowie 5 % CO₂ kultiviert werden. Jede folgende Subkultivierung wurde mit der entsprechenden Passagennummer P(x) dokumentiert.

7.3 Besiedelung der Scaffolds mit PGC und MSC

Sobald eine ausreichende Zellzahl (1,5 Millionen Zellen pro Scaffold) erreicht wurde, erfolgte die Besiedelung der dreidimensionalen Scaffold-Varianten A bis D sowie die Kultivierung dieser auf einer Rotationsapparatur (Rollerkultur) bzw. auf einer 12-Well-Platte (statische Kultivierung). Für beide Kultivierungsarten wurden die Scaffolds zuvor in frischem 10% FKS enthaltenden Knorpelmedium (für die Gruppe der Chondrozyten) bzw. Stammzellmedium mit 15% FKS (für die Gruppe der MSC) für 2 Tage konditioniert. Dazu wurden sie in Kryoröhrchen mithilfe einer Pinzette überführt, mit Knorpelmedium bedeckt und bei 37° C sowie 5 % CO₂ gelagert. Währenddessen wurden die Zellen wie im oberen Abschnitt beschrieben mit 3 mL 5x Trypsin/ EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in einem 50 mL-Falconröhrchen gesammelt. Daraufhin erfolgte die Bestimmung der Lebend-Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer (Trypanblaufärbung). Dabei wurden zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Differenzierung lebender und toter Zellen diese mit Trypanblaulösung versetzt. Vitale Zellen erschienen dadurch im mikroskopischen Bild hell, da sie den Farbstoff ausschließen und tote Zellen durch dessen Aufnahme tiefblau. 20 µL einer Zellsuspension wurden mit 20 µL einer

Trypanblau-Lösung (0,5% Trypanblau in 0,9% NaCl gelöst) gemischt und diese Mischung zum Füllen einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte berechnete sich nach folgender Formel:

Zelldichte (Zellen/ml) = (Zellzahl/Zahl der Großquadrate) $\times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$. Anschließend erfolgte die Besiedelung der Scaffolds mit den Chondrozyten durch vorsichtiges Aufpipettieren dieser Zellen (50 μl) auf die Scaffolds. Auf jedes Scaffold wurden 1,5 Millionen Chondrozyten bzw. MSC gegeben. Für die Besiedelung des gesamten Scaffolds A-D wurden diese separat in Knorpel- bzw. Stammzellmedium gefülltem Zellkultur-Röhrchen (A-D) überführt. Diese wurden anschließend auf eine Rotationsapparatur gelegt und bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie einer Rotationsgeschwindigkeit von 36 rpm und einem Rotationswinkel von 10 ° für 14 Tage dynamisch kultiviert. Angestrebt wurde hierbei eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Scaffolds durch die ständige Rotationsbewegung. Parallel zu dieser Vorgehensweise wurde auch eine statische Kultivierung durchgeführt. Die Scaffolds „A-D“ wurden hierfür in die Wells einer 12 -Well-Platte mithilfe einer Pinzette überführt und die Zellen direkt auf das Scaffold pipettiert. Zehn Minuten nach Aufpipettieren der Zellen wurde schließlich jedem Well 2 ml 10 % FKS Knorpelmedium bzw. Stammzellmedium hinzugefügt und die mit Scaffolds beladene 12-Well-Platte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

Um die Differenzierung der MSC in chondrogene Zellen zu ermöglichen, wurde am zweiten Tag der Kultivierung die Differenzierung durch Zugabe von 5'-Azacytidin (AZA, 2 μM) zu jedem Well vorbereitet und nach 24 h das Stammzellmedium durch 2 mL chondrogenes Knorpelmedium ersetzt. AZA führt zu einer DNA-Demethylierung und damit zu einer signifikanten Verstärkung des Differenzierungseffekts. In Zellen wird AZA über einen Nukleosid-spezifischen Transportmechanismus durch mehrere enzymatisch gesteuerte Phosphorylierungsschritte in das aktive Nukleotid 5-Aza-CTP umgewandelt. Nur 10 bis 20% des Azacytidins werden nach einer enzymatischen Umwandlung mittels einer Ribonukleotid-Reduktase in 5-Aza-dCTP in die DNA integriert. Die eingefügten 5-Aza-2'-deoxycytidine - Nukleotide binden die DNA-Methyltransferasen durch einen kovalenten Komplex, was anschließend zu einer Blockierung der aktiven DNA-Methyltransferase führen kann. Wenn dieses Cytosin-Analogon in einer entsprechend großen Anzahl vorhanden ist, entsteht zunächst eine hemimethylierte DNA. Durch weitere Zellteilungen kommt es zu einem reduzierten Zustand der DNA-Methylierung und letztendlich wird somit die Reaktivierung der Genexpression ausgelöst [55]. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, 2 mL frisches chondrogenes Knorpelmedium und 2 μM TGF- β 1 zugegeben, um die Differenzierung der MSC zu gewährleisten.

Der Medienwechsel mit TGF- β 1 Zugabe erfolgte hier ebenfalls alle 2 bis 3 Tage. Die Kultivierung der differenzierenden Zellen wurde insgesamt 14 Tage durchgeführt.

7.4 Multipotenznachweis der MSC (Adipo- und Osteogenese)

Der Nachweis der Multipotenz der isolierten hMSC erfolgte exemplarisch für drei in dieser Studie verwendete Spender (s. Tab. 15) im Rahmen von Vorarbeiten der AG Bioreconstruction [54]. Die Zellen wurden hierfür nach 24 stündiger Inkubation mit AZA in die osteogene und adipogene Richtung mithilfe eines osteogenen und adipogenen Kulturmediums differenziert [54]. Die Ölrot-Färbung diente dem Nachweis von Fettvakuolen als Zeichen einer erfolgreichen Adipogenese und durch die van Kossa-Färbung konnten die im Rahmen einer osteogenen Differenzierung entstehenden Kalziumablagerungen dargestellt werden.

Zusätzlich wurde exemplarisch eine FACS- Analyse zur Untersuchung der undifferenzierten Zellen auf die Expression einiger ausgewählter, für hMSC charakteristische Oberflächenmarker (CD14-, CD29+, CD34-, CD44+, CD90+, CD106+) durchgeführt [54, 56].

7.5 Bestimmung der Besiedlungseffizienz

Zur Bestimmung der Besiedlungseffizienz wurden die Scaffolds nach definierter Besiedlungszeit (3, 5, 7, 9 und 14 Tagen) am Invert-Mikroskop beurteilt und fotodokumentiert. Ein Scoresystem wurde erstellt, um die Besiedlungseffizienz zu semiquantifizieren. Anhand der in Tabelle 17 aufgeführten Kriterien konnte der Grad der Adhärenz der Zellen zu den Scaffolds beurteilt und semiquantifiziert werden.

Tabelle 17: Scoresystem zur Bestimmung der Besiedlungseffizienz

Monitoring der Zelladhärenz und Besiedlungseffizienz	Punkte
<u>Zelladhärenz</u>	
Zellschichten füllen fast alle Scaffold-Poren zu mehr als 50 % des Porendurchmessers aus	4
mehrere Zellsegel in Scaffold-Poren erkennbar	3
Zellschichten haften gut auf der Scaffoldoberfläche, nur wenige Zellsegel erkennbar	2
Zellaggregate adhäreren nur sehr leicht am Scaffold	1

Fast keine oder keine Zellen im Scaffold erkennbar	0
--	---

7.6 Lebend-Tot-Färbung (Vitalitätsassay)

Am Ende der Kultivierungsdauer in der Rotations- bzw. statischen Kultur wurde von den Zellen jedes Scaffolds eine Lebend-Tot-Färbung angefertigt, um die Vitalität der Zellen qualitativ (und später auch semiquantitativ; siehe Tabelle 18) zu beurteilen. Die Scaffolds wurden mithilfe einer Pinzette aus den Kulturröhrchen bzw. 12-Well-Platte entnommen und kurz mit PBS gespült. Die Lebend-Tot-Färbung erfolgte mit den Farbstoffen FDA (grün; lebende Zellen) und PI (rot; tote Zellen). Lebende Zellen hydrolysieren FDA zum fluoreszierenden Fluorescein, wohingegen Zellen, deren Zell- und Kernmembranen für den Farbstoff PI permeabel sind, der dann in die DNA interkaliert, als tot gelten. Es wurden dazu 5 µL einer FDA-Lösung (zuvor wurden 3 mg/mL FDA in Aceton gelöst) und 1 µL PI (10 mg/mL) in 1 mL PBS gegeben. Im Anschluss wurden 50 µL der gut durchmischten Färbelösung im Dunkeln auf die Scaffolds pipettiert. Die überschüssige Färbelösung wurde mit der Pipette vorsichtig aufgesaugt und diese wiederum auf die Scaffolds pipettiert, um eine vollständige Benetzung der Scaffolds mit der Lösung zu erreichen. Nach einer kurzen Inkubation von ca. 5 min erfolgte sofort die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Durch hydrolytische Spaltung des FDA erschienen vitale Zellen grün, während tote Zellen durch den Nukleinsäure-Interkalator PI rot gefärbt wurden. Die Aufnahmen erfolgten im direkten Anschluss an die Färbung am Axioskop 40 Firma Carl Zeiss AG.

Um zusätzlich die Anteil vitaler Zellen zu bewerten, wurde ein Punktesystem basierend auf Lohan et al. (2011) mit den in Tabelle 18 aufgeführten Kriterien erstellt.

Tabelle 18: Scoresystem zur Bewertung der Vitalität

Monitoring des Vitalitätsassays	Punkte
<u>Zellvitalität</u>	
Mehrzahl der adhärenen Zellen lebt	2
Weniger als die Hälfte der adhärenen Zellen leben	1
Fast keine vitalen Zellen erkennbar	0
<u>Zellverteilung</u>	
Fest adhärierende Zellen auf Mehrzahl der Oberflächen der	3

Scaffolds erkennbar	
Multifokale Kolonisation der Zellen	2
Zellverteilung nur auf wenige Orte beschränkt	1
Fast keine bzw. keine Zellkolonisation erkennbar	0

7.7 Immunfluoreszenzfärbung und Zellmarkierung

Zur immunzytochemischen Darstellung wichtiger ECM-Bestandteile wie Kollagen Typ I/ II und von zytoskeletalem F-Aktin wurde am Ende der Kultivierungsdauer eine Immunfluoreszenzfärbung angefertigt.

Vor der Färbung erfolgten hierfür eine Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd-Lösung für 15 min (ca. 1 mL pro Well) mit anschließender Spülung mit 1 x TBS. Danach wurde zur Blockierung 100 µL 5 % Eselserum in 1xTBS mit 0,1 % Triton X100 zur Permeabilisierung für 20 Minuten auf die mit chondrogen- differenzierten hMSC besiedelten Scaffolds aufgetragen. Nach dem Abgießen der Blockierungslösung erfolgte anschließend die Inkubation der polyklonalen Kaninchen- und Ziege-anti human Primärantikörper für Kollagen Typ II und I (siehe Materialien), gelöst in dem Blockierungsmedium über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die Isotypkontrollfärbung erfolgte mittels eines unspezifisch bindenden polyklonalen IgG-Antikörpers. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Scaffolds wieder mit 1xTBS gespült und unter UV-freien Bedingungen mit der Sekundärantikörperlösung behandelt. Diese Lösung enthielt den blauen Zellkernfarbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1:20 verdünnt), den F-Aktin-Farbstoff Phalloidin 633 (1:100 verdünnt), den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper anti-Ziege Alexa 488 (1:200 verdünnt) und den Sekundärantikörper anti-Kaninchen Alexa 555 (1:200 verdünnt) in Blockierungsmedium. Die Scaffolds wurden für 60 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die mikroskopische Kontrolle erfolgte im direkten Anschluss mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop und der Cell- D Software. Für die spätere Auswertung der Färbungen wurden repräsentative Ausschnitte fotografiert. Die Kollagen Typ I-Markierung wurde grün und Kollagen Typ II-Markierung rot dargestellt. Die Zellkerne erschienen durch DAPI blau und das Zytoskelett (F-Aktin) grau.

7.8 Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Um eine semiquantitative Aussage über die ECM-Bestandteile wie Kollagen Typ I/ II und F-Aktin treffen zu können, ist es erforderlich gewesen, die Aufnahmen unter standardisierten

Einstellungen des Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SPE II durchzuführen. Für jedes gefärbte Scaffold wurden grundsätzlich drei Aufnahmen in unterschiedlicher Vergrößerung (100-fach, 200-fach und 400-fach) erstellt, bei denen mit der Software ImageJ pro Aufnahme die Zellkerne, Kollagen Typ I/ II und F-Aktin auf ihre Fluoreszenzintensität hin ausgewertet wurden. Hierbei wurde speziell auf die Expression von bzw. Quantität der Kollagenfasern des Typ II geachtet. So konnten für jede Kontrollfärbung und spezifische Färbung Punkte mittels eigens erstelltem Punktesystem (siehe unten) vergeben und in die statistische Analyse einbezogen werden. Die Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgte hier semiquantitativ mittels unten aufgeführtem Scoresystem.

Tabelle 19: Scoresystem zur Semiquantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenz-Monitoring	Punkte
Kollagen Typ I (grün)	
<u>Farbintensität</u>	
Keine Färbung	3
Leicht gefärbt (+)	2
Mittelmäßig stark gefärbt, hauptsächlich auf den Zellkörper beschränkt (++)	1
Reichlich gefärbtes Kollagen Typ I (auch extrazellulär) (+++)	0
<u>Farbverteilung</u> : fokal: 2 Punkte, generalisiert: 1 Punkt	2/1
Kollagen Typ II (rot)	
<u>Farbintensität</u>	
Keine Färbung	0
Schwache Färbung (+)	1
Mittelmäßig starke Färbung, hauptsächlich auf Zellkörper beschränkt (++)	2

Reichlich gefärbtes Kollagen Typ II (+++)	3
Architektur des Zytoskeletts	
Stressfasern	1
F-Aktin homogen verteilt	2
<u>Farbverteilung</u> : fokal: 1 Punkt, generalisiert: 2 Punkte	1/2

7.9 Xenograft-Nacktmausmodell

Für eine initiale Prüfung auf eventuelle Eignung im Hinblick auf klinische Anwendungen bieten sich diese Nacktmäuse als Versuchstiere an, weil sie die Verwendung allogener Zellen zulassen. Chondrogen-differenzierte MSC wurden hierfür 14 Tage in einem statischen Kultursystem auf den Ca-Zn-Scaffolds vorkultiviert.



Abbildung 7: Homozygote, thymusaplastische Nacktmäuse. Das Bild wurde vier Wochen nach Implantation der Scaffolds aufgenommen. .

Für den Versuch wurden Scaffolds mit den Dimensionen von 5,7 mm Durchmesser und 1-3 mm Höhe (siehe Material) verwendet. Für die Implantation erhielten die homozygoten, thymusaplastischen Nacktmäuse 30 min vor Beginn des Eingriffes (präoperativ) eine Analgesie mit s. c. 5 mg/kg Körpergewicht Rimadyl (Carprofen, Pfizer Animal Health). Danach erfolgte die Gewichtsmessung der analgesiarten Tiere. Mittels Forene (Wirkstoff: Isofluran) wurden sie dann in eine ausreichend tiefe Inhalations-Narkose versetzt. Danach wurde eine ca. 0,5 bis 1 cm lange Längsinzision in die paravertebrale Rückenhaut eingeführt und eine Hauttasche präpariert, in die das Knorpelzellkonstrukt implantiert wurde. Der Kontrollgruppe wurden unbesiedelte Ca-

Zn-Scaffolds implantiert. Im Anschluss daran wurde die Hautwunde über eine Hautnaht verschlossen (Knopfhefte mit Prolene, Ethicon, monofil, Polypropylen, 6/0, EH7226). Die postoperative Schmerztherapie erfolgte nach 24 Stunden mit s.c. 5 mg/kg Körpergewicht Rimadyl. Anschließend wurden alle Tiere zur Kontrolle des Gesundheitsprofils klinisch überwacht und zu bestimmten Zeitpunkten deren Gewichtsverlauf über 6 Wochen dokumentiert. Die Tiere wurden in kleinen Gruppen (pro Käfig maximal 5 Tiere) in einem 12 h Licht-Dunkelrhythmus bei 20-24°C, 55% Luftfeuchte gehalten und erhielten Standard-Pelletfutter (sSniff-R/M-H) und leicht angesäuertes Trinkwasser (Infektionsschutz) *ad libitum*. Die Käfige waren zum Schutz der Tiere vor Keimen mit einer Filterhaube versehen. Alle Tiere erhielten über die gesamte Versuchszeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum*.

Nach Abschluss des jeweiligen Einzelexperimentes (nach sechs Wochen) erfolgte die Euthanasie der Tiere mit CO₂ und darauffolgend die Explantation der Scaffolds. Die Scaffolds inklusive Rückenhaut wurden mit Hilfe einer Stanze (Stanzenkerndurchmesser: 6 mm) vorsichtig ausgestant. Danach erfolgten Längen -und Gewichtsmessung für jedes Scaffold und die Dokumentation dieser Daten.



Abbildung 8: *In vivo* – Nacktmausmodell. In der linken Abbildung ist das subkutan implantierte Scaffold (paravertebral) dargestellt. Vor der Explantation wurde das Trägermaterial per Lineal gemessen (hier ca. 0,6 cm lang). Rechts: Zustand nach Hautinzision. Das Scaffold ist hier von Blutgefäßen umgeben.

Zudem erfolgte eine makroskopische und mikroskopische bzw. histologische Beurteilung der explantierten Scaffolds. Hierfür wurde ein Makro –und Mikroscore-System basierend auf Lohan et. al (2011) erstellt.

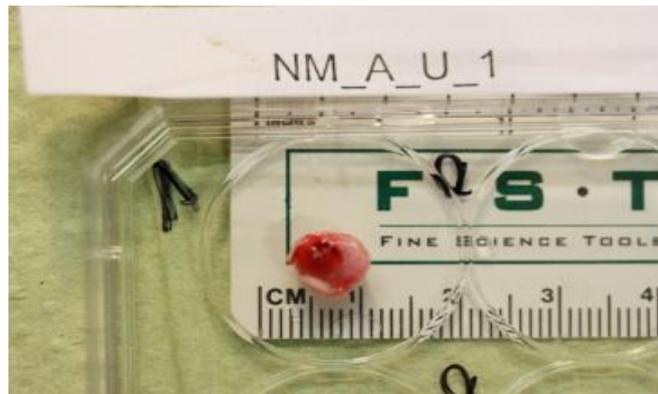


Abbildung 9: Scaffold inklusive Rückenhaut nach Explantation. Hier beträgt die Länge des Scaffolds ca. 0,7 cm.

Die Abbildung 9 bildet ein explantiertes Scaffold mit Rückenhaut ab.

Tabelle 20: makroskopische Beurteilung der Scaffolds mittels Punktevergabe

Makroscore	Punkte
Farbe	
weiß	2
rosa	1
andere Farben	0
Konstitution	
knorpelähnliche Konstitution	2
bindegewebig	1
Strukturelle Merkmale	
rund und regelmäßig	2
unregelmäßig rund	1
diffus, zirkuläre Form nicht mehr sichtbar	0
Erhalt der Originalgröße	
unverändert	2
reduziert	1

Um zusätzlich die Verteilung implantierter Zellen im Nacktmausmodell zu evaluieren, Toxizität und eine potentielle Tumorigenese in Prädilektionsorganen auszuschließen, wurden nach der Tötung der Tiere Gehirn, Lunge, Leber, Milz und Niere entnommen.

7.10 Messung des Gewichts der Nacktmäuse

Die Aufzeichnung des Gewichtsverlaufs der behandelten Tiere stellt einen nicht unwesentlichen Aspekt bei der Erkennung einer allgemeinen Belastung der Tiere und ggf. Entstehung von Neoplasien dar. Um Anzeichen solcher Prozesse so früh wie möglich zu erkennen, wurden die Gewichte der Nacktmäuse an bestimmten Zeitpunkten einmal pro Woche dokumentiert.

7.11 Histologische Analysen der Scaffolds

Um auch eine histologische Beurteilung der ECM- und Zell-Verteilung in den Scaffoldmaterialien zu erhalten wurden Paraffinschnitte von besiedelten und unbesiedelten Scaffolds in der Stärke 7 µm mit dem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einem Inkubator (65° C) verbracht. Die angewärmten Paraffinschnitte wurden in Roticlear (Roth, A538.5, 2,5 L) zur Entfernung des Paraffins für 5 min inkubiert. Für die Rehydrierung der Schnitte erfolgte anschließend die Behandlung der Präparate in einer alkoholischen Verdünnungsreihe für jeweils 2 min in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol. Abschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gespült.

Die erste Färbung erfolgte mit Harris' Hämatoxylin (Hämalaun, fertige Gebrauchslösung [Roth: X903.3, 5 L]) für 4 min. Die Schnitte wurden danach mit Leitungswasser gebläut. Nach Spülung in 96 % Alkohol konnten die Schnitte in 2 % alkoholischer Eosin-Färbelösung (Eosin Y, fertige Gebrauchslösung [Sigma Ref: HT110132-1L]) für 1,5 min inkubiert werden. Zur Dehydrierung wurden die Proben in eine aufsteigende Alkoholreihe aus 96 % - 100 % für jeweils 2 Minuten gegeben und anschließend in Roticlear für 5 min inkubiert. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Deckgläschen mit Roti - Histokitt II - Eindeckmedium eingedeckelt. Die Fotografie der histologischen Färbungen erfolgte mit dem Axioskop 40 der Firma Carl Zeiss AG.

Die Auswertung der histologischen Schnittpräparate der Scaffolds erfolgte semiquantitativ mittels eines Scoresystems (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: histologische Beurteilung der Scaffolds mittels Punktevergabe

Mikroscore	Punkte
------------	--------

Integration der Scaffolds	
Direkter Kontakt zwischen Scaffold/ Scaffoldfragmenten und Gewebe sichtbar	1
Viele Lücken und Spalten zwischen Scaffold und Gewebe	0
Zellinfiltration im Scaffold	
Zwischenräume zwischen Scaffoldsegmenten gefüllt	1
Offen	0
Einkapselung des Scaffolds	
Keine Kapsel	2
Dünne Kapsel	1
Dicke Kapsel	0
Entzündung	
Keine	2
Mäßige Ansammlung von Entzündungszellen	1
Starke Akkumulation von Entzündungszellen	0
Neovaskularisierung	
Normale Vaskularisierung	2
Hypervaskularisierung	1
Sehr starke Hypervaskularisierung	0

7.12 Histologische Analysen der Nacktmäuse

Um eine Entzündung und Tumorigenese in Prädilektionsorganen auszuschließen, wurden für die histologische Beurteilung bzw. Färbung Milz, Niere, Lunge, Leber und Gehirn der Nacktmäuse entnommen, in Paraffin eingebettet und mit HE gefärbt.

In der nachfolgenden Tabelle sind hierfür je Nacktmausorgan (Milz, Niere, Lunge, Leber und Gehirn) spezielle Auswertungskriterien aufgelistet. Betrachtet wurden vor allem das

Vorhandensein von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sowie eine Fibrosebildung. Als Referenz wurden dieselben Organe aus den drei Kontrollmäusen (siehe Material) herangezogen. Die Fotografie der histologischen Organfärbungen erfolgte mit dem Axioskop 40 der Firma Carl Zeiss AG.

Tabelle 22: histologische Beurteilung der Nacktmausorgane

Milz	<p>Generelle typische Struktur?</p> <p>Präsenz von Primär-/Sekundär-Follikeln?</p> <p>Megakaryozyten? Zellinfiltration?</p>
Niere	<p>Strukturerhalt?</p> <p>Nierenkörperchen gut oder schlecht abgrenzbar?</p> <p>Anzahl der Nierenkörperchen?</p> <p>Normale Vaskularisierung oder Hyperämie?</p> <p>Blutungen?</p> <p>Entzündungszellen?</p> <p>Areale mit Zellproliferation?</p> <p>Bindegewebszunahme? Zellinfiltration?</p>
Lunge	<p>Entzündungszellen?</p> <p>profuse Blutungen, Hyperämie?</p> <p>Fibrose, verdickte Alveolarsepten?</p> <p>Tumorartige Zellproliferation?</p> <p>Diffuse Hyperzellularität (in Arealen oder generalisiert)?</p> <p>Ödeme (in Arealen oder generalisiert)?</p> <p>Atelektasen (in Arealen oder generalisiert)?</p> <p>Emphysematöse Areale (in Arealen oder generalisiert)?</p> <p>rupturierte Alveolarsepten?</p> <p>Ablagerung von (Fremd)-Partikeln, beladene Makrophagen?</p> <p>Zellinfiltration?</p>
Leber	<p>veränderte degenerierte/toxisch belastete Hepatozyten (Zellkerne mit kondensiertem Chromatin) oder wabiges vakuoliges Zytoplasma?</p> <p>vermehrte Itozellen/ Bindegewebe (als Hinweis auf stattgefundenen Reparationsprozesse)?</p>

	fokale Proliferationsherde (als Hinweis auf stattgefundene Regeneration/ Reparation)? Tumorartige Zellproliferation? Hyperämie? Entzündungszellen? Zellinfiltration?
Gehirn	Zellinfiltration? Entzündungsherde? Rindenschichtung im Kleinhirn und Großhirn?

7.13 Statistik

Die Ermittlung der Signifikanzen erfolgte über den gepaarten student's t-Test mit einem festgelegten Konfidenzintervall von $p < 0,05$. Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. In den Diagrammen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

7.14 Richtlinien

Die experimentelle Arbeit basiert auf den Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis.

8 Ergebnisse

8.1 Isolierung der MSC und PGC

Die aus der Spongiosa von Femurköpfen isolierten MSC und die aus dem Kniegelenksknorpel vom Schwein gewonnenen Knorpelzellen (PGC) wurden auf ihre Vitalität, Zelladhärenz am Biomaterial und Matrixsynthese untersucht, da diese Faktoren grundlegend für den Erfolg der Therapie und der Experimente sind. Eine Beurteilung der Zellvermehrung und -morphologie in der Monolayerkultur ermöglichte die Hellfeld-Mikroskopie, die jeden zweiten Tag durchgeführt wurde.

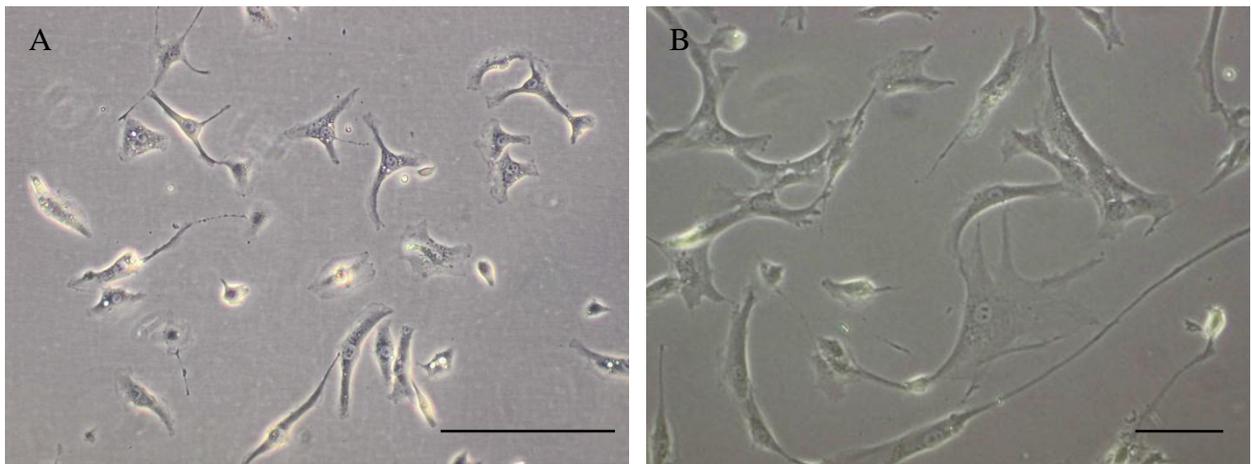


Abbildung 10: Aufnahmen von isolierten PGC (Passage 3) nach 48 Stunden und MSC (Passage 2) nach 7 Tagen in Monolayerkultur. PGC (A); MSC (B). Messbalken (Bild A): 200 μm . Messbalken (Bild B): 100 μm .

Die PGC, aber mehr noch die MSC, wiesen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf, die durch spindelförmig-langgestreckte Zellkörper und lange dünne Zellfortsätze charakterisiert war. Die Zellen nahmen typischerweise mit höherer Kulturdauer und Passagenzahl eine flachere und breitere Form an.

8.2 Besiedlungsversuche

8.2.1 Statische Kultur *versus* dynamische Rollerkultur

Zwei verschiedene Methoden und Ansätze wurden verwendet, um eine optimale Besiedlung der Ca-Zn-Scaffolds mit PGC und MSC zu ermöglichen. Zur Anwendung kamen anfangs drei Versuche mit einer dynamischen (Rollerkultur) und im weiteren Verlauf acht Experimente mit einer statischen Kultivierungsmethode, die miteinander verglichen wurden und im Methodenteil beschrieben sind.

Beide Applikationsformen hatten zwar 24 Stunden nach der Besiedlung keine deutlich sichtbaren Unterschiede in Anzahl und Verteilung der Zellen zur Folge, jedoch kam es in den

Rollerkulturen schneller als bei der statischen Besiedlungsform zu starken Degradationserscheinungen des Ca-Zn-Scaffolds und daraus resultierender Instabilität. Die dynamische Rollerkultur eignete sich deswegen nicht für die Besiedlung der Ca-Zn-Scaffolds. Schließlich wurde diese Besiedlungsmethode, die im weiteren Verlauf der Besiedlungsversuche durch die statische Kultivierung ersetzt wurde, früh verlassen und sie kam nur für die ersten drei Versuche für die Besiedlung mit PGC in Anwendung. PGC von drei und MSC von acht verschiedenen Spendern in unterschiedlichen Passagen (P2 bis P5) wurden für den Versuch eingesetzt. Mittels der Hellfeld-Mikroskopie, der Lebend - tot - Färbung und (immun-) histologischen Färbungen, konnte auch nach *in vivo* Implantation im Nacktmausmodell der Erfolg der Besiedlungen und der Matrixproduktion beurteilt werden.

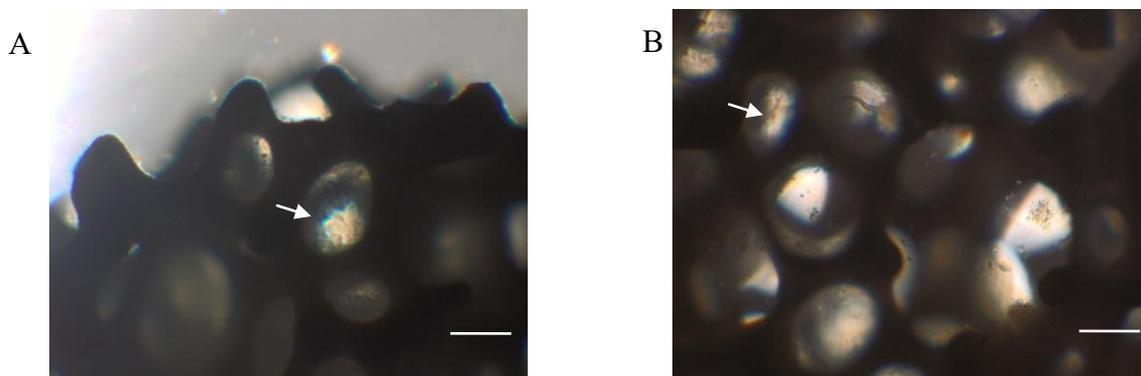


Abbildung 11: Repräsentative Hellfeldmikroskopische Aufnahmen: statische (links) und dynamische (rechts) Ca-Zn-Scaffold Besiedlungen (Scaffold A) mit PGC nach drei Tagen: Die Zellen zeigen sich in beiden Kultursystemen vergleichbar adhärent und einige Zellverbände haben die Poren zu ca. 50% gefüllt (weißer Pfeil). Messbalken: 200 μ m.

Beide Kultursysteme waren vergleichbar hinsichtlich der Adhärenz der PGC zu Scaffold A (Abbildung 11).

8.3 PGC versus chondrogen-differenzierte MSC

24 Stunden nach der Besiedlung der Ca-Zn-Scaffolds mit chondrogen- differenzierten MSC waren zahlreiche Zellen auf den Scaffolds im Gegensatz zu den PGC-Besiedlungen zu beobachten (Abb. 12, 13, 14). Mit längerer Kulturzeit änderte sich das morphologische Bild hinsichtlich der Zelldichte und Verteilung des Zellverbundes. Repräsentative hellfeldmikroskopische Aufnahmen an Tag 3 und 7 der PGC-Besiedlungen wurden gemacht, um dies darzustellen, wobei an Tag 7 eine deutliche Reduktion der Zelldichte im Vergleich zu Tag 3 (in allen Kultursystemen) zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu konnte man bei den MSC-Besiedlungen keine deutlich sichtbaren Unterschiede in Anzahl und Verteilung der Zellen an beiden Tagen beobachten. Desweiteren hatten die differenzierten MSC quantitativ mehr „Zell-

Matrix-Segel“ zwischen den Scaffold-Porenwänden ausgebildet als die PGC. Nachfolgend sind repräsentative hellfeldmikroskopische Aufnahmen der PGC - Besiedlungen pro Scaffold-Variante (A-D) und Zeitpunkt dargestellt.

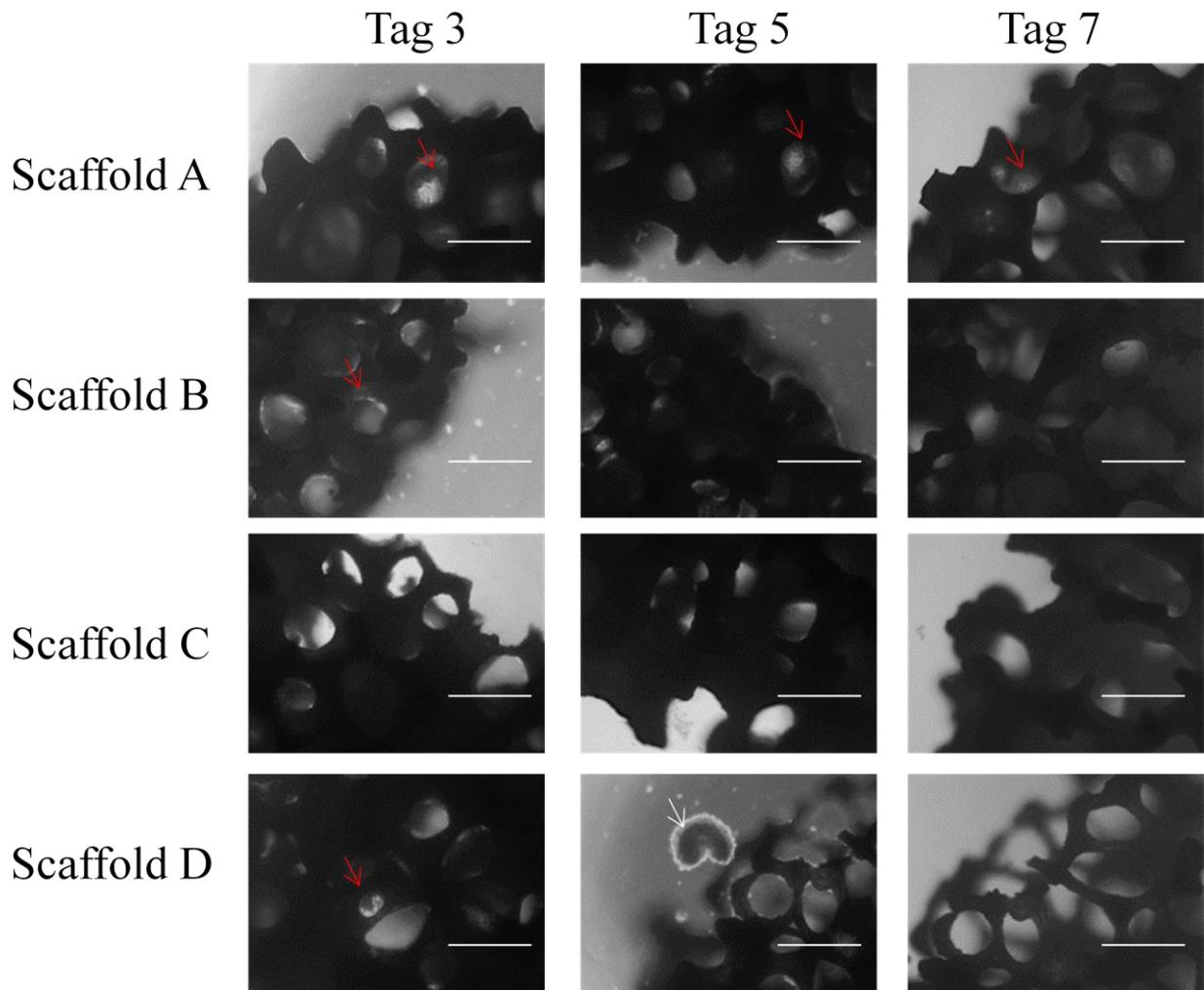


Abbildung 12: Invert-mikroskopische Aufnahmen von statischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit PGC nach drei, fünf und sieben Tagen. Scaffold A-D. Die besiedelten Scaffolds wurden lichtmikroskopisch mit einem Invert-Mikroskop betrachtet und repräsentative Ausschnitte fotografiert. Zellen in oder auf den Scaffold-Strukturen sind durch rote Pfeile markiert. Erste Reihe: Hellfeldaufnahme an Tag 3: Nur wenige Zellen, die sich an das Scaffoldgerüst anhaften, sind zu erkennen, wobei mehr Zellen an Scaffold A - verglichen mit Scaffold B, C und D - adhärirten. Zweite Reihe: An Tag 5 und 7 wird bei allen Scaffoldvarianten eine deutlich geringere Zelldichte im Vergleich zu Tag 3 beobachtet. Einige Zellen, die sich vorher zu kleinen Zellaggregaten in den Poren angeordnet haben, erscheinen ausgeschwemmt worden zu sein (weißer Pfeil). Messbalken: 200 µm.

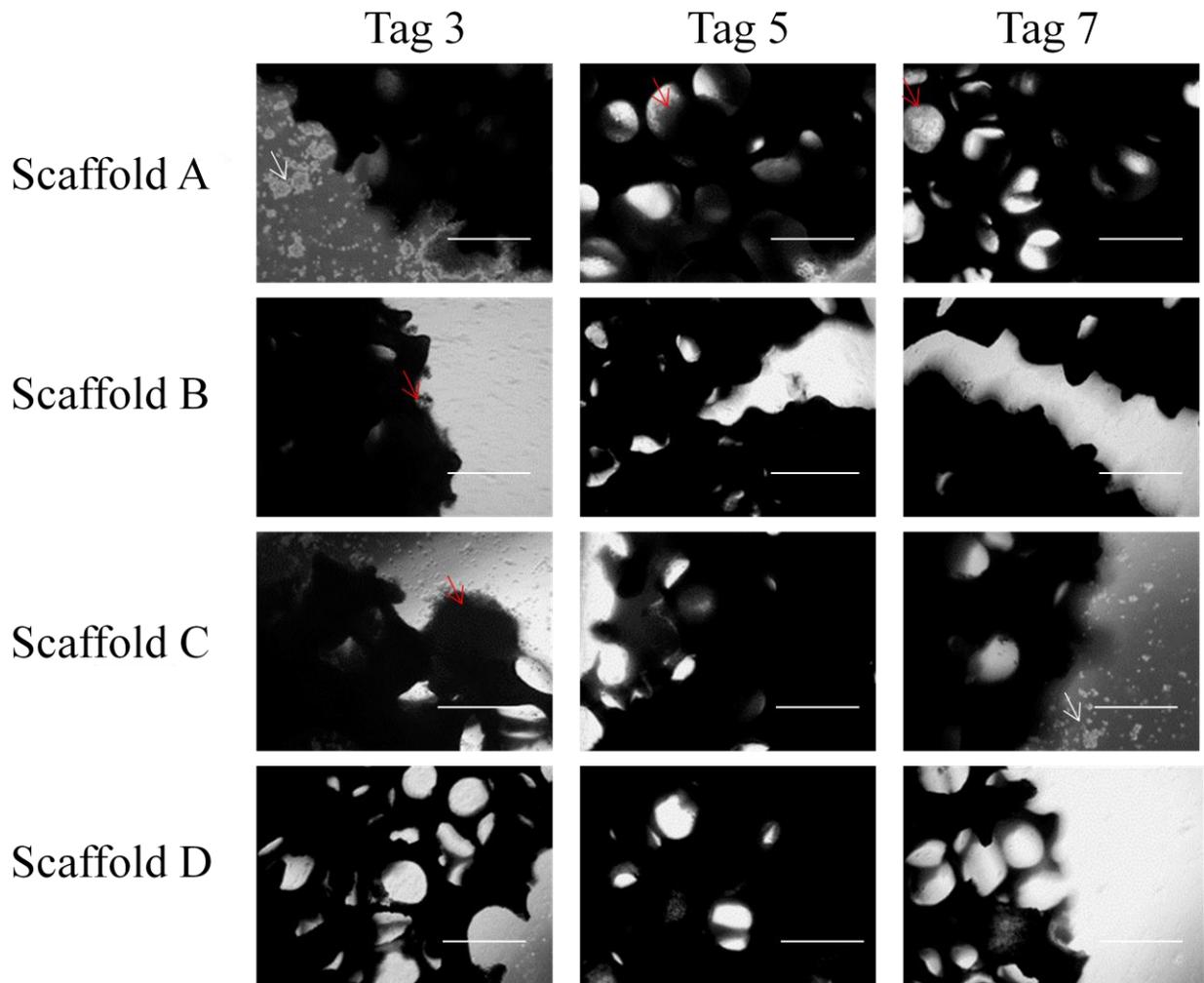


Abbildung 13: Invert-mikroskopische Aufnahmen von dynamischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit PGC nach drei, fünf und sieben Tagen. Scaffold A-D (A-D), Erste Reihe: Hellfeldaufnahme an Tag 3. Zweite Reihe: An Tag 7 beobachtet man einen deutlichen Rückgang der Zelldichte. Auch hier sieht man die meisten Zellen an Scaffold A adhären. Der rote Pfeil zeigt auf adhärenente Zellen. Zusätzlich zu sehen sind Zellen, die sich von den Scaffolds abgelöst haben (weißer Pfeil). Messbalken: 200 μm .

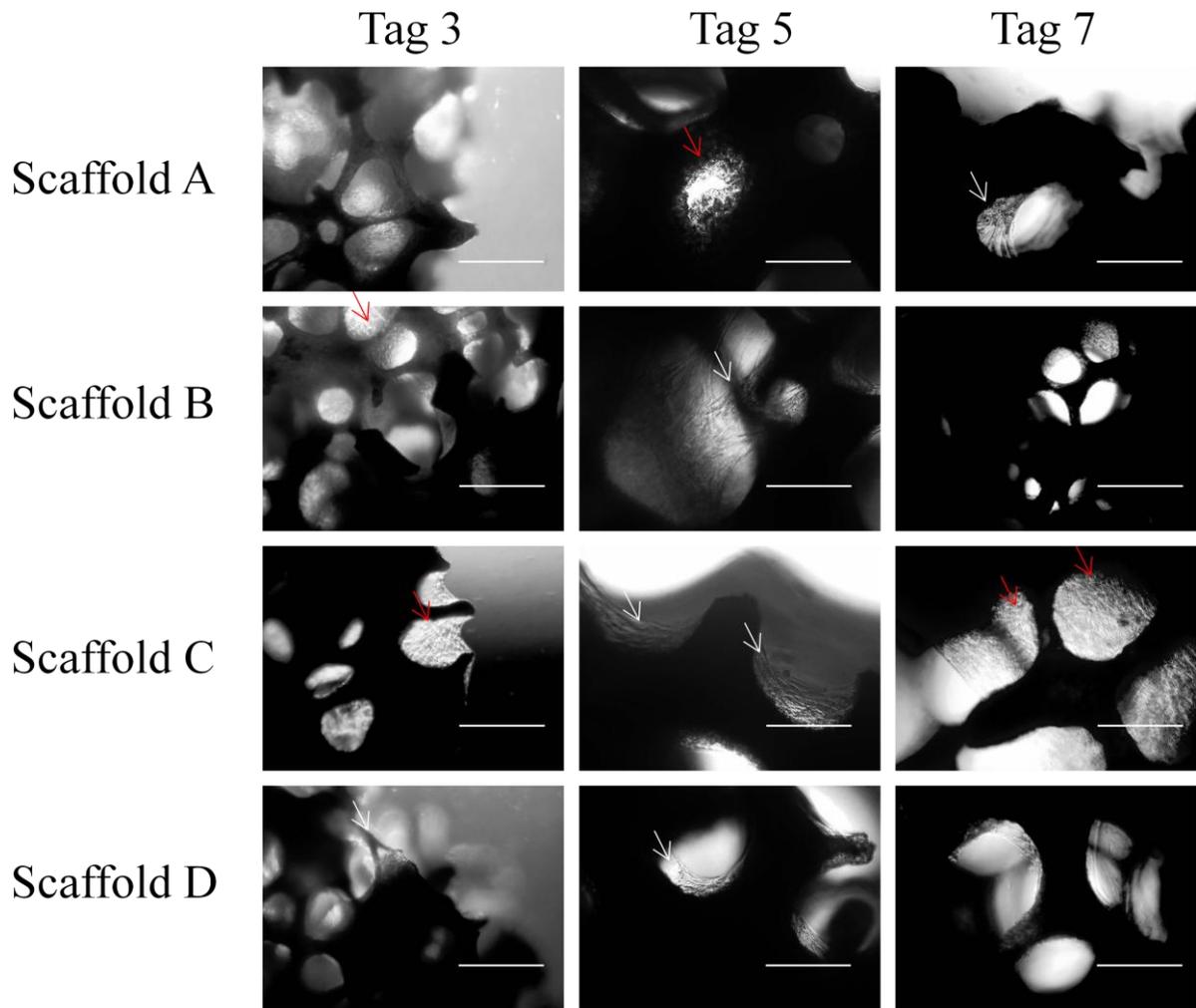


Abbildung 14: Invert-mikroskopische Aufnahmen von statischen Ca-Zn-Scaffold-Besiedlungen mit chondrogen differenzierten MSC nach drei, fünf und sieben Tagen. Scaffold A-D. Dargestellt sind die Scaffoldgerüste mit den mit Zellen gefüllten Poren. Die chondrogen-differenzierten MSC füllen hier häufig ganze Poren aus. Auch an Tag 7 erkennt man keinen sichtbaren Unterschied hinsichtlich Anzahl und Verteilung in den MSC-Besiedlungen. Teilweise bildeten die Zellen Aggregate aus abgerundeten Zellen (roter Pfeil). Die weißen Pfeile zeigen auf Zellsegel. Messbalken: 200 μm .

Der Unterschied hinsichtlich der Adhärenz zu den Scaffolds zwischen PGC und MSC war festzustellen (Abbildung 12, 13 und 14).

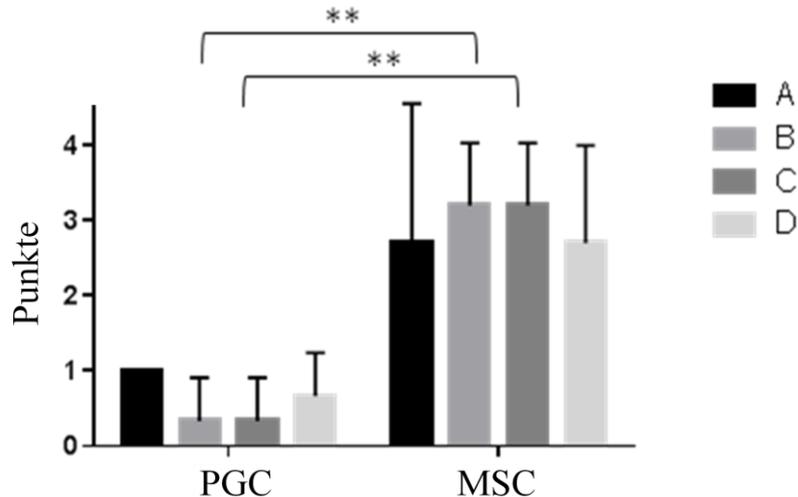


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Besiedlungseffizienz zwischen statischen PGC- und MSC-Besiedlungen und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. ** hoch-signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 4 Punkten.

Anhand eines Scoresystems wurden die Scaffolds A-D hinsichtlich ihrer Besiedlungseffizienz miteinander verglichen (siehe Methoden). Die chondrogen-differenzierten MSC füllten häufig ganze Poren aus und haften offensichtlich besser an den Scaffolds als die PGC. Die mit MSC besiedelten Scaffolds B und C wiesen beide die höchste Besiedlungseffizienz auf, wobei Scaffold A und D einen etwas geringeren Besiedlungserfolg zeigten. Bei den mit PGC besiedelten Scaffolds zeigten Scaffold B und C einen signifikant geringeren Besiedlungserfolg als die MSC-Besiedlungen (Abbildung 15).

Die Zellart (PGC versus MSC-Besiedlung) hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf die Besiedlungseffizienz ($p < 0,001$), und zwar sowohl hinsichtlich der Scaffoldvariante B wie auch C ($p < 0,01$). Bei den Unterschieden zwischen Scaffoldvarianten A und D konnte jedoch keine Signifikanz verzeichnet werden. Zwischen den mit PGC besiedelten Scaffoldvarianten waren keine signifikanten Unterschiede zu vermerken. Dies traf auch bei den MSC-Besiedlungen zu.

8.4 Lebend-tot-Färbungen

Um eine Aussage darüber zu erhalten, inwieweit die PGC und chondrogen differenzierten MSC auf und in den Scaffolds überlebten, wurden Vitalitätsfärbungen durchgeführt. Mit Hilfe der Lebend- tot- Färbung konnte die Vitalität der Zellen in den Besiedlungen beurteilt werden. Diese Vitalitätsfärbung zeigte lebende Zellen durch den Fluoreszenzfarbstoff FDA grün angefärbt und tote Zellen, deren Zellmembranen für Ethidiumbromid durchlässig sind, färbten sich rot an.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der Lebend-Tot-Färbung für die Scaffold-Varianten A bis D.

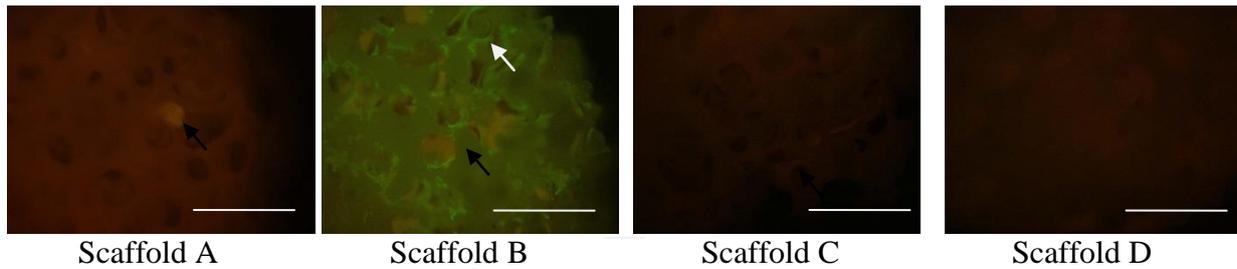


Abbildung 16: Lebend-tot-Färbung PGC-besiedelter Ca-Zn-Scaffolds an Tag 7. In der Abbildung ist die Vitalitätsfärbung von PGC-Besiedlungen (statisch) dargestellt. Die weiße Pfeil zeigt Zellkörper vitaler Zellen (grün); Die schwarzen Pfeile zeigen auf Zellaggregate toter Zellen (rot). Auffällig ist die Anfärbbarkeit des Scaffolds B und der dort anhaftenden Zellen. Messbalken: 500 μm .

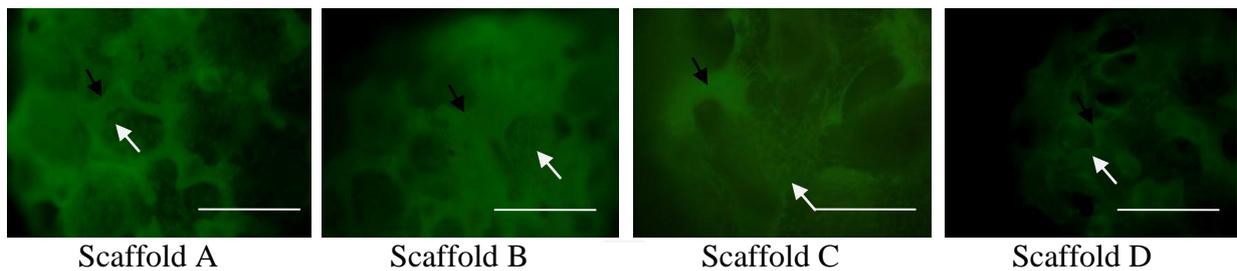


Abbildung 17: Lebend-tot-Färbung MSC-besiedelter Ca-Zn-Scaffolds an Tag 7. In der Abbildung ist die Vitalitätsfärbung von chondrogen-differenzierten MSC in der statischen Kultur dargestellt. Der weiße Pfeil zeigt Zellkörper vitaler Zellen (grün); der schwarze Pfeil zeigt ein angefärbtes Ca-Zn-Gerüst; Rote und somit tote Zellen sind in der Abbildung nicht zu erkennen. Messbalken: 500 μm .

Mikroskopisch waren deutliche Unterschiede zwischen den PGC- und chondrogen differenzierten MSC-Besiedlungen zu beobachten. Im Gegensatz zu den PGC-Besiedlungen (Abbildung 16) zeigten die Vitalitätsfärbungen chondrogen-differenzierter MSC-Besiedlungen (Abbildung 17) viele lebende und nur in sehr geringem Maße tote Zellen. Hier zeigten sich die Zellen zahlreich und homogen im Ca-Zn-Vlies verteilt. Im Gegensatz dazu waren kaum bis gering grün gefärbte vitale Zellen (nur bei Scaffoldvariante B) und rot gefärbte Zellkerne toter Zellen in den PGC-Besiedlungen zu sehen, bedingt durch die mangelhafte Adhärenz der PGC auf den Vliesen. Nur auf dem Scaffold B waren vitale Zellen zu erkennen. Desweiteren waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Scaffoldvarianten (A-D) hinsichtlich der Vitalität der Zellen zu beobachten. Dabei waren auch überall Zellaggregate zu erkennen, während an einigen Stellen der Scaffolds sogenannte "Zell-Matrix-Segelchen" zu beobachten waren (siehe Scaffold D). Offensichtlich konnten nur in chondrogen- differenzierten Scaffold-Besiedlungen bei allen Vliesvarianten vitale Zellen in ähnlicher Anzahl und Verteilung beobachtet werden.

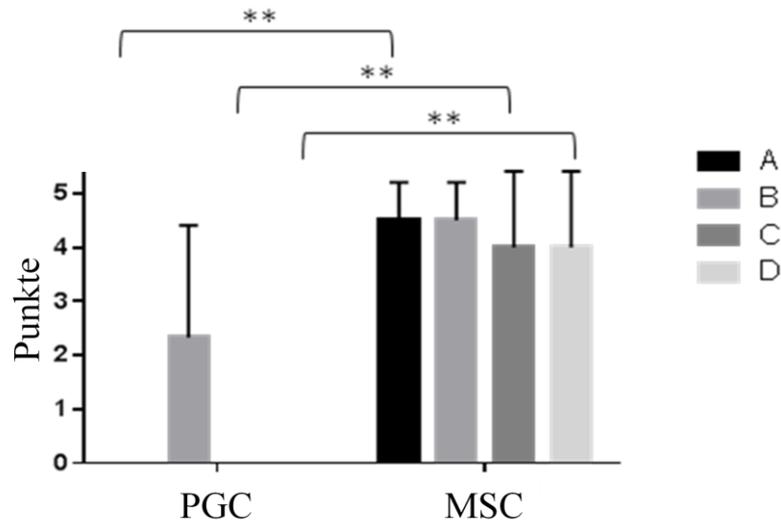


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Vitalität (statische Kultur) zwischen PGC und MSC und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. ** hoch-signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 5 Punkten.

Um diese Färbung semiquantitativ auszuwerten, wurde auch hier ein Scoresystem zur Bewertung der Vitalität der Zellen herangeführt (siehe Methoden). Die mit MSC besiedelten Scaffolds A und B wiesen am meisten vitale Zellen auf und schnitten beide mit 4,5 Punkten (Mittelwert) am besten ab, wobei bei den mit weniger lebendigen Zellen assoziierten Scaffolds C und D nur 4 Punkte (Mittelwert) vergeben wurden (Abbildung 18). Bei den PGC-Besiedlungen waren nur auf Scaffold B vitale Zellen zu beobachten (der Mittelwert lag bei 2,33 Punkten; Scaffold A, C und D bekamen 0 Punkte).

Zu registrieren war ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen beiden Zellarten hinsichtlich der Vitalität, und zwar bei den Varianten A, C und D. Zwischen den Varianten bei Besiedlung mit einer Zellart konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

8.5 Immunhistologische Färbungen (Kollagen Typ I, II, DAPI, F-Aktin)

Die immunhistologische Färbung wurde bei den Besiedlungen mit MSC zur Beurteilung des Erfolgs der Knorpelbildung herangezogen. Da hyaliner Knorpel überwiegend (zu 90 %) aus Typ II Kollagen und nur geringen Mengen Typ III, VI, IX und XI Kollagen besteht, wurden die Besiedlungen hinsichtlich der Verteilung und Expression von Kollagen Typ II und der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen untersucht. Ebenso wurde Kollagen Typ I als Dedifferenzierungsmarker untersucht (Abbildung 19).

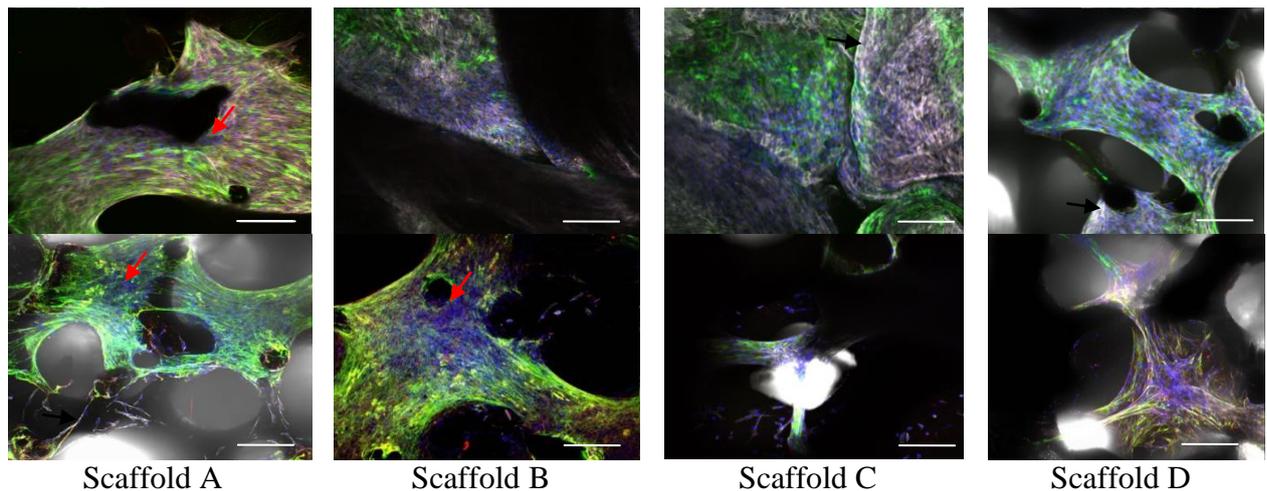


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ I und II/DAPI/Aktin. Dargestellt sind Ca-Zn-Scaffolds besiedelt mit chondrogen differenzierten MSC. Die Besiedlungen stammen von zwei unterschiedlichen Spendern nach 14 Tagen Kulturzeit (obere Reihe: Spender 1, untere Reihe: Spender 2). In den Besiedlungen ist eine Rotfärbung der ECM, als Hinweis auf ihren Kollagen Typ II-Gehalt, eine grüne Anfärbung der ECM, als Hinweis auf ihren Kollagen Typ I-Gehalt nachweisbar. Auf den Bildern erkennt man eine äußerst deutliche Immunreaktivität für Kollagen Typ I. Kollagen II lässt sich nur in geringer Menge darstellen. Rote Pfeile zeigen die mit dem DAPI-Farbstoff gefärbten Zellkerne; schwarze Pfeile deuten auf das Zytoskelett (grau dargestellt) gefärbt mit Phalloidin-633 hin; Messbalken: 100 μ m.

In der immunzytochemischen Darstellung von Kollagen Typ I (grün) waren nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Scaffoldvarianten zu erkennen. In den oberen Schichten der Scaffolds ließ sich eine deutliche Grünfärbung erkennen. Der Knorpelmarker Kollagen Typ II (rot) war deutlich schwächer als Kollagen Typ I zu erkennen. Die Zellkerne und das Zytoskelett waren in allen statischen Kulturen deutlich detektierbar (Abbildung 19). Die Zytoskelettfärbung gibt Hinweise auf fokale Adhäsionspunkte der Zellen am Biomaterial und ECM. In allen chondrogen differenzierten Besiedlungen mit MSC ließ sich eine äußerst intensive Immunreaktivität für Kollagen Typ I erkennen und somit eine deutliche Expression dessen in der ECM vermuten. Auf den Aufnahmen der Scaffolds A und B ließen sich am deutlichsten Kollagen Typ II sowie F-Aktin (Zytoskelett) nachweisen. Ein Scoresystem wurde für die Bewertung der Immunfluoreszenzfärbungen herangezogen, um die Scaffolds A-D hinsichtlich mehrerer Faktoren, die im Methodenteil aufgelistet sind, miteinander zu vergleichen und zu (semi-)quantifizieren (Abbildung 20).

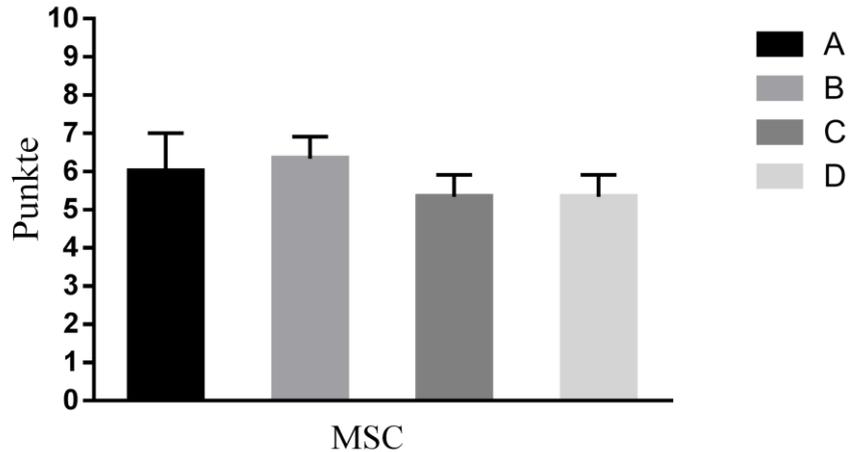


Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von MSC nach 14 Tagen und den einzelnen Scaffoldvarianten mittels Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 10 Punkten.

Zwischen den einzelnen Scaffoldvarianten konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden, d.h. alle vier Scaffoldvarianten wiesen eine ähnliche Kollagen II Expression auf.

8.6 *In vivo*- Nacktmausmodell

8.6.1 Makroskopische Beurteilung der Scaffolds

Die makroskopische Beurteilung der Scaffolds, die nach 6 Wochen aus den Nacktmäusen explantiert wurden, erfolgte anhand des Makroscores (siehe Methoden).

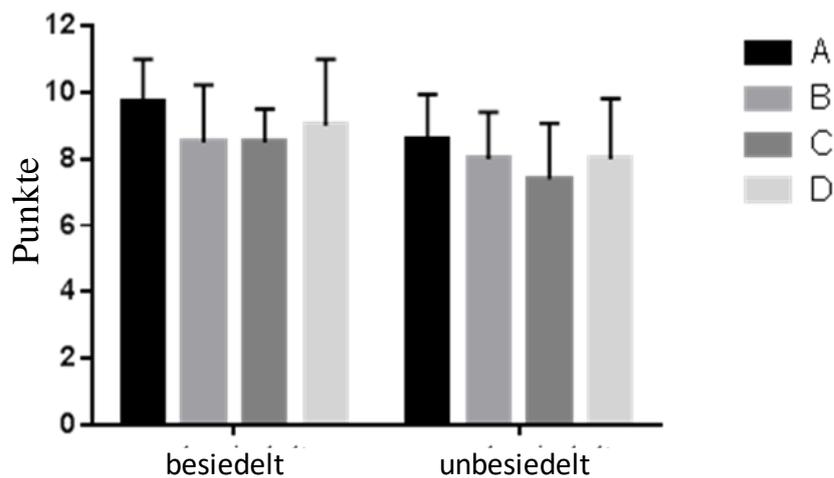


Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der Makroscorewerte zwischen mit MSC besiedelten und unbesiedelten Scaffolds nach 6 Wochen Implantation in der Nacktmaus mittels Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die maximal zu erreichbare Punktzahl lag bei 12 Punkten.

Der Mittelwert lag bei den unbesiedelten Scaffolds für A bei 8.6, für B und D bei 8 und für C bei 7.4 Punkten. Für die besiedelten Scaffolds wurden für A 9.75, für B und D 9 und C 8.5 Punkte vergeben.

Es konnte statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Zellen besiedelten und unbesiedelten Scaffolds nachgewiesen werden, d.h. die Besiedlung mit MSC hatte keinen signifikanten Einfluss auf das makroskopische Ergebnis (Abbildung 21). Alle Scaffoldvarianten wiesen eine eher bindegewebige Konstitution mit unveränderter Erhaltung der Originalgröße auf. Strukturell waren die explantierten Scaffolds rund und regelmäßig.

8.6.2 Gewichtsmessung der Nacktmäuse

Von jeder Nacktmaus wurde das Gewicht als Hinweis auf den Allgemeinzustand für die gesamte Implantationszeit (6 Wochen) wöchentlich gemessen.

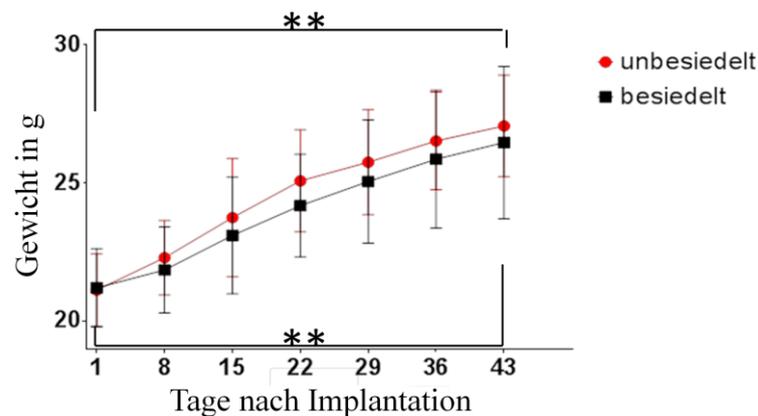


Abbildung 22: Gewicht der Nacktmäuse nach Tagen nach der Scaffoldimplantation. Dargestellt ist das Gewicht der Mäuse abhängig vom Tag nach Implantation. ** hoch-signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Bei allen Tieren war ein hoch-signifikanter Anstieg (**) des Gewichts zwischen Tag 1 und Tag 43 der Gewichtsmessung zu verzeichnen. Die rote Linie stellt das Gewicht der Nacktmäuse dar, die die unbesiedelten Scaffolds erhalten hatten, die schwarze Linie das Gewicht der Tiere mit den besiedelten Scaffolds.

Bei allen Nacktmäusen war eine signifikante Gewichtszunahme zu erkennen. Zwischen den Tieren mit den unbesiedelten und besiedelten Scaffolds war ein leichter - jedoch kein signifikanter - Unterschied des Gewichts zu erkennen (Abbildung 22).

8.6.3 Histologische Beurteilung der Scaffolds mittels HE-Färbung

Zur orientierenden Übersichtsfärbung wurde die HE-Färbung durchgeführt, die im Methodenteil beschrieben wurde. Die unten abgebildeten histologischen Färbungen der in Nacktmäuse implantierten besiedelten und unbesiedelten Scaffolds wurden nach der Explantation der Scaffolds durchgeführt.

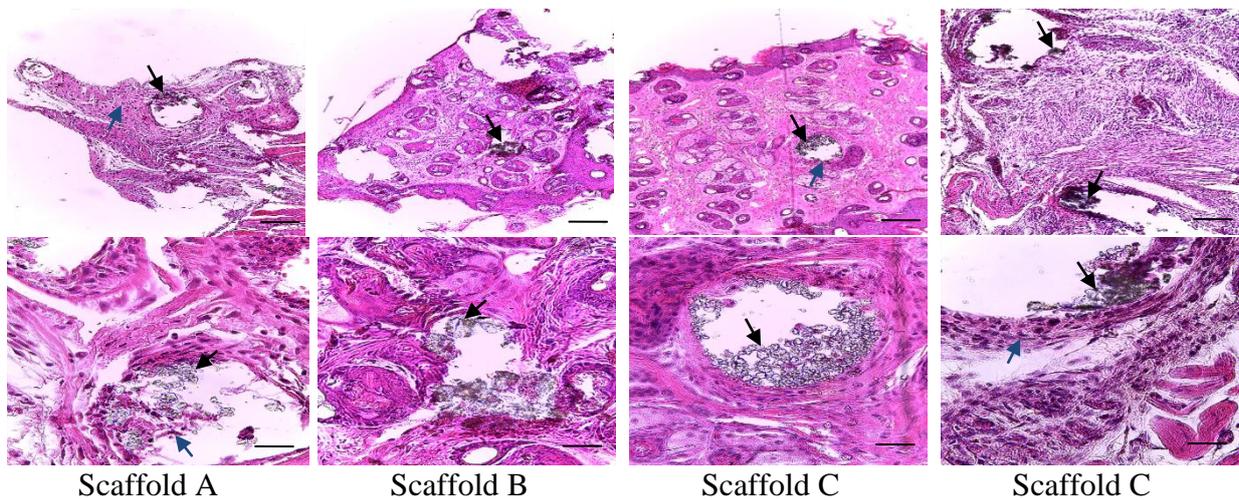


Abbildung 23: HE- Färbung unbesiedelter Ca-Zn-Scaffolds nach einer Implantationszeit von 6 Wochen Scaffoldanteile A-D mit Kutis und Subkutis; schwarze Pfeile zeigen Ca-Zn-Scaffoldanteile; blaue Pfeile zeigen auf Entzündungszellen. Messbalken (erste Reihe): 200 µm. Messbalken (zweite Reihe): 50 µm.

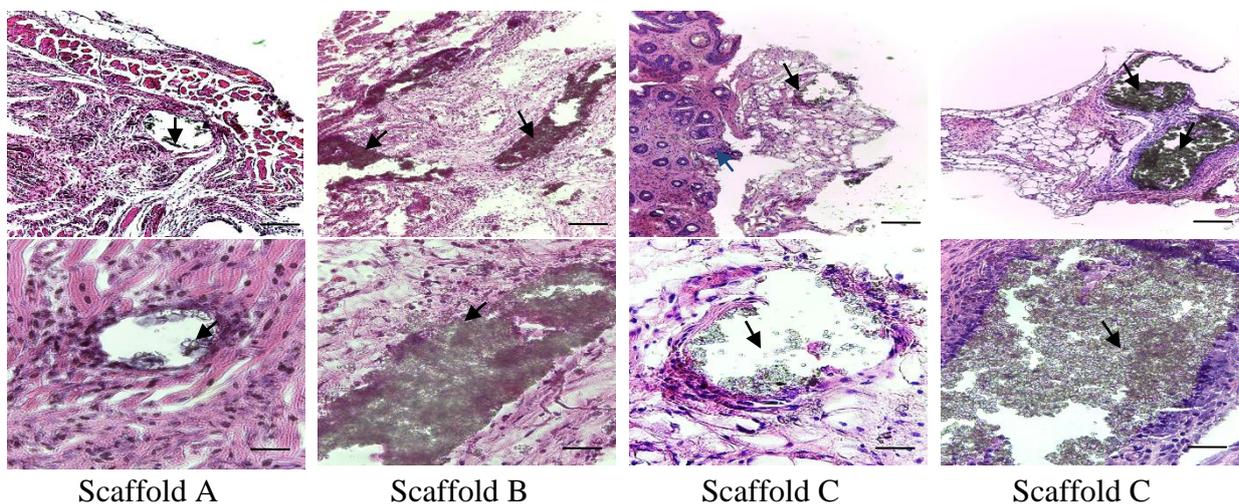


Abbildung 24: HE- Färbung besiedelter Ca-Zn-Scaffolds nach einer Implantationszeit von 6 Wochen Scaffoldanteile A-D mit Kutis und Subkutis; schwarze Pfeile zeigen Ca- Zn- Scaffoldanteile; der blaue Pfeil zeigt auf eine Talgdrüse. Messbalken (erste Reihe): 200 µm. Messbalken (zweite Reihe): 50 µm.

Im Hinblick auf die im Methodenteil genannten Beobachtungspunkte zwischen den Kontrollen (unbesiedelte Scaffolds) und besiedelten Scaffolds war histologisch kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 23, 24).

Bei allen chondrogen differenzierten Besiedlungen mit MSC zeigte sich eine ähnliche Anzahl und Verteilung an Zellen. In den chondrogen induzierten MSC in den statischen Kulturen der Scaffoldvariante B konnte man teilweise gefärbte Zellaggregate nachweisen. Wenn das Scaffold in der/ an der Epidermis war, waren oft mehr Entzündungszellen, als Ausdruck einer Gewebereaktion auf die implantierten Scaffolds zu beobachten. In Scaffoldnähe war auch oft eine Vermehrung der Talgdrüsen zu sehen, die durch die mechanische Reizung des Umgebungsgewebes durch das starre Scaffoldmaterial hervorgerufen wurde.

Zum Teil rutschten allerdings die Zellen durch den Schneidevorgang mitsamt des spröden Scaffoldgerüsts ab, sodass in solchen Fällen die ursprüngliche Lokalisation der Zellen an den Scaffolds nicht immer exakt dargestellt werden konnte. Dies lag daran, dass die Scaffolds aufgrund ihrer spröden Beschaffenheit nur recht schwer zu schneiden waren.

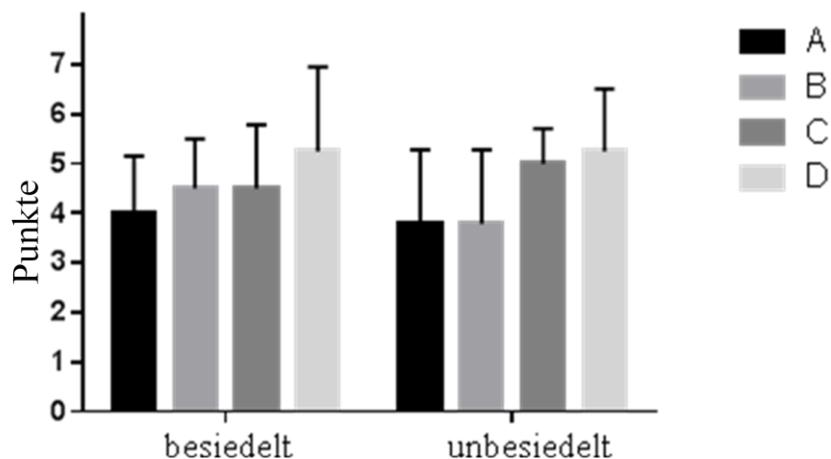
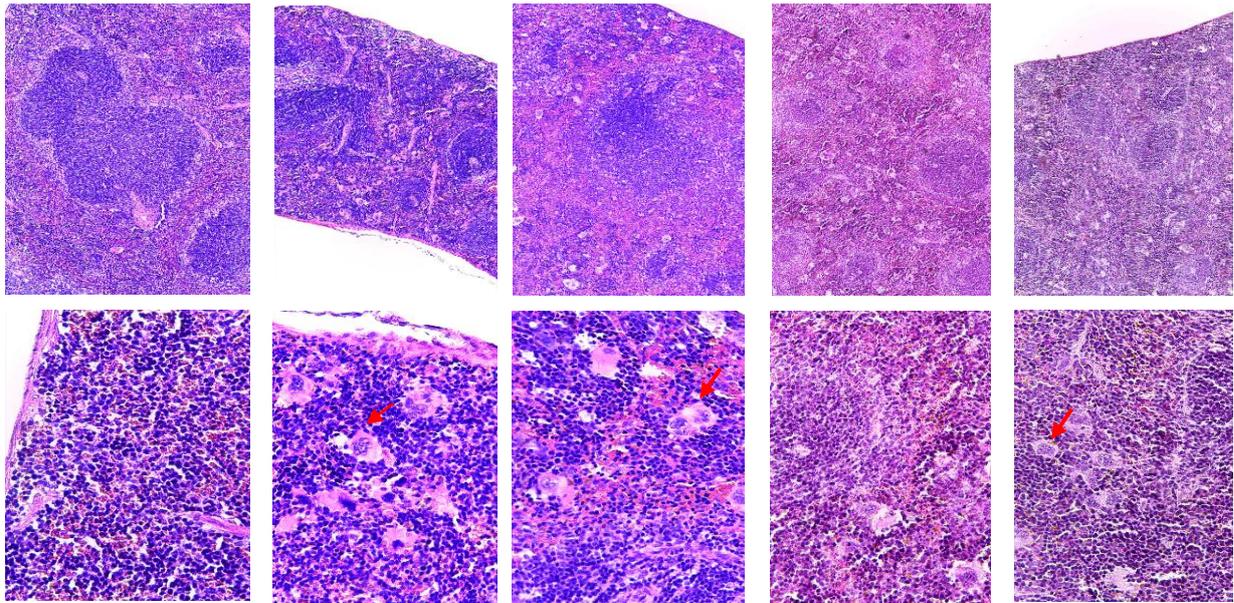


Abbildung 25: Vergleichende Darstellung des Makroscores von mit MSC besiedelten und unbesiedelten Scaffolds mittels Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 7 Punkten.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Zellen besiedelten und unbesiedelten Scaffolds ließ sich nicht herausstellen (Abbildung 25), sodass die Besiedlung mit MSC keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis bzw. auf das mikroskopische Outcome hatte.

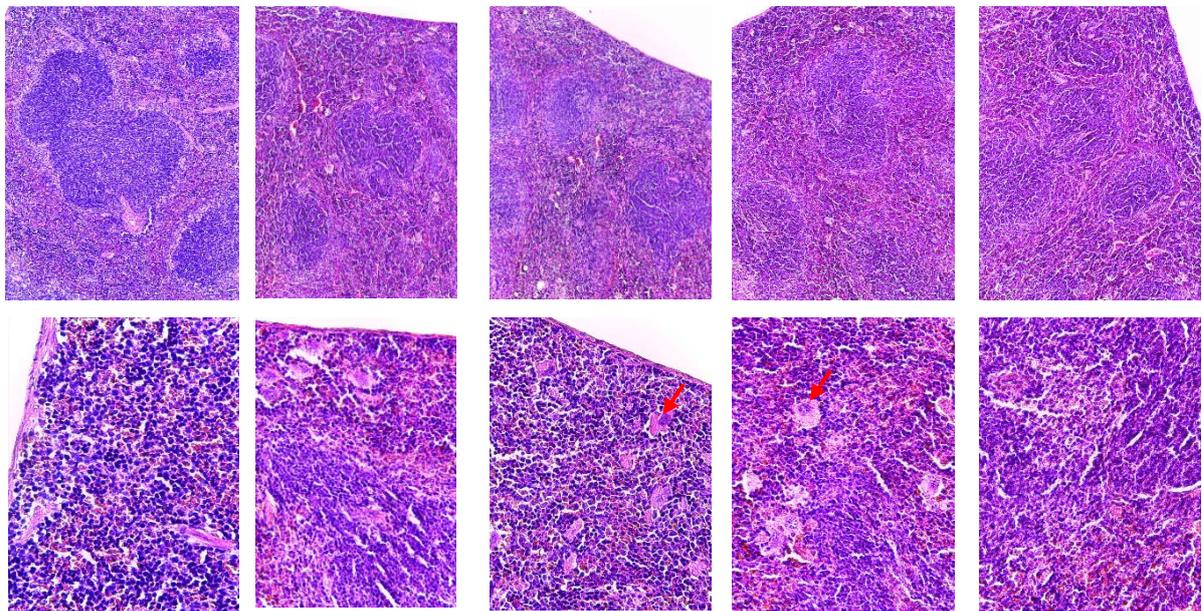
8.6.4 Histologische Beurteilung der Nacktmausorgane mittels HE-Färbung

Ein weiterer wichtiger Grund für das *in vivo*-Experiment war es, histologisch zu überprüfen, ob die mit MSC besiedelten und unbesiedelten Scaffolds Entzündungsprozesse oder sogar eine Tumorigenese in Prädispositionsorganen hervorriefen. Hierbei wurde hauptsächlich auf die Kriterien geachtet, die im Methodenteil aufgelistet sind.



Kontrolle Milz Scaffold A (unbesiedelt) Milz Scaffold B (unbesiedelt) Milz Scaffold C (unbesiedelt) Milz Scaffold D (unbesiedelt)

Abbildung 26: HE-Färbung der Milz von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Milzparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht. Der rote Pfeil zeigt auf einen Megakaryozyten.



Kontrolle Milz Scaffold A (besiedelt) Milz Scaffold B (besiedelt) Milz Scaffold C (besiedelt) Milz Scaffold D (besiedelt)

Abbildung 27: HE- Färbung der Milz von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Milzparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenzierten MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Alle Schnitte zeigten die typische Milzstruktur mit unterschiedlicher Follikelpräsenz (Primär-/Sekundärfollikel) sowohl bei den black six Kontrollmäusen als auch bei den besiedelten bzw.

unbesiedelten Scaffold-Gruppen. Selten waren Megakaryozyten in den Kontrollen und Scaffoldvarianten zu erkennen (Abbildung 26 und 27).

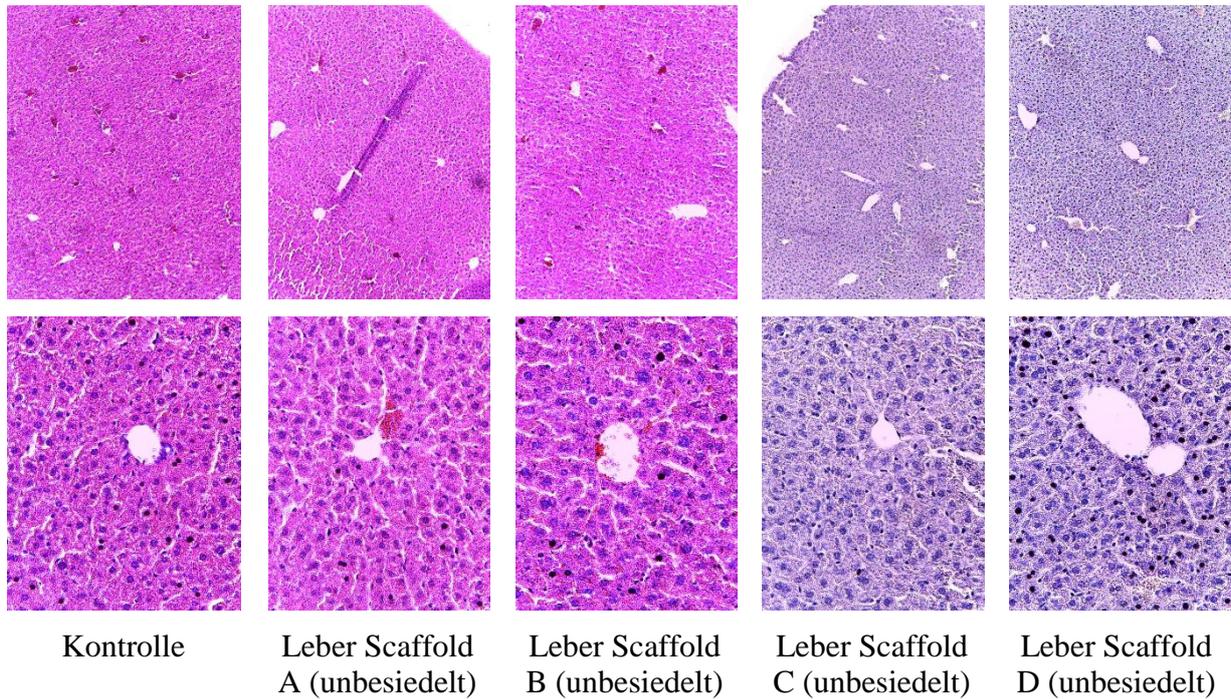


Abbildung 28: HE- Färbung der Leber von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Leberparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

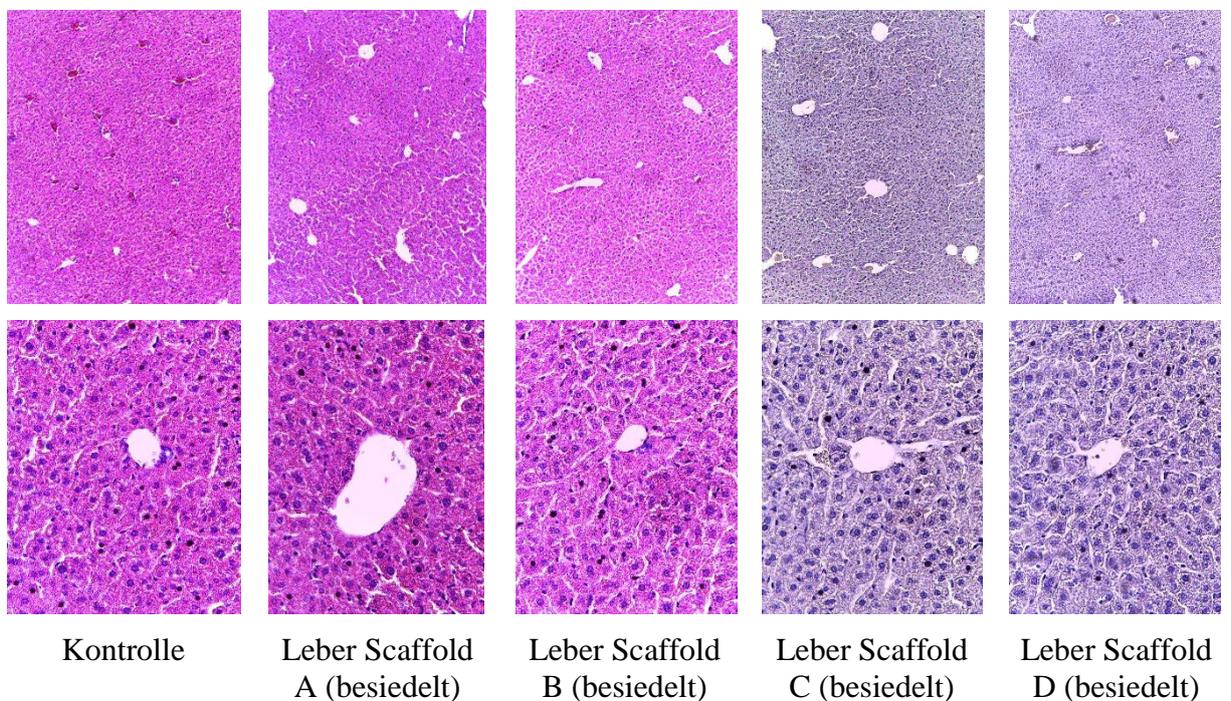


Abbildung 29: HE- Färbung der Leber von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Leberparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenzierten MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Tumoröse bzw. neoplastische Veränderungen, relevante Entzündungen und Bindegewebszubildungen waren weder bei den Kontroll-Tieren noch bei den Tieren, in die (un-) besiedelte Scaffoldvarianten implantiert wurden, beobachtbar (Abbildung 28 und 29).

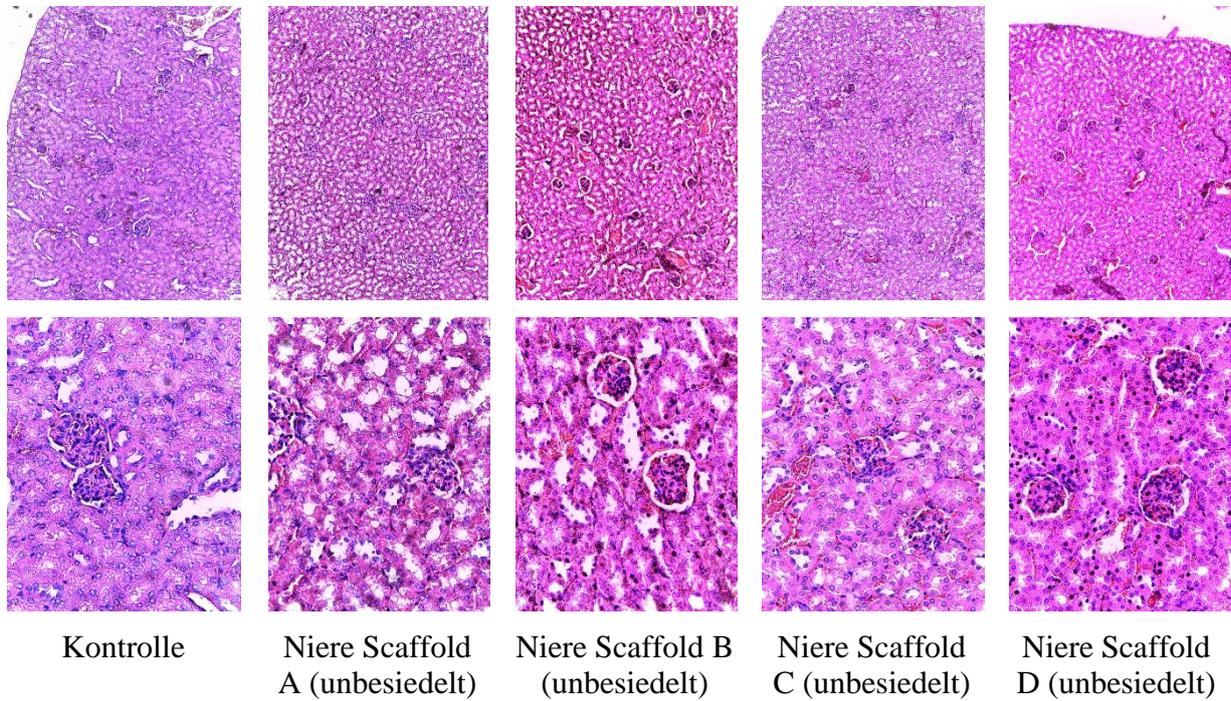


Abbildung 30: HE- Färbung der Niere von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Nierenparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

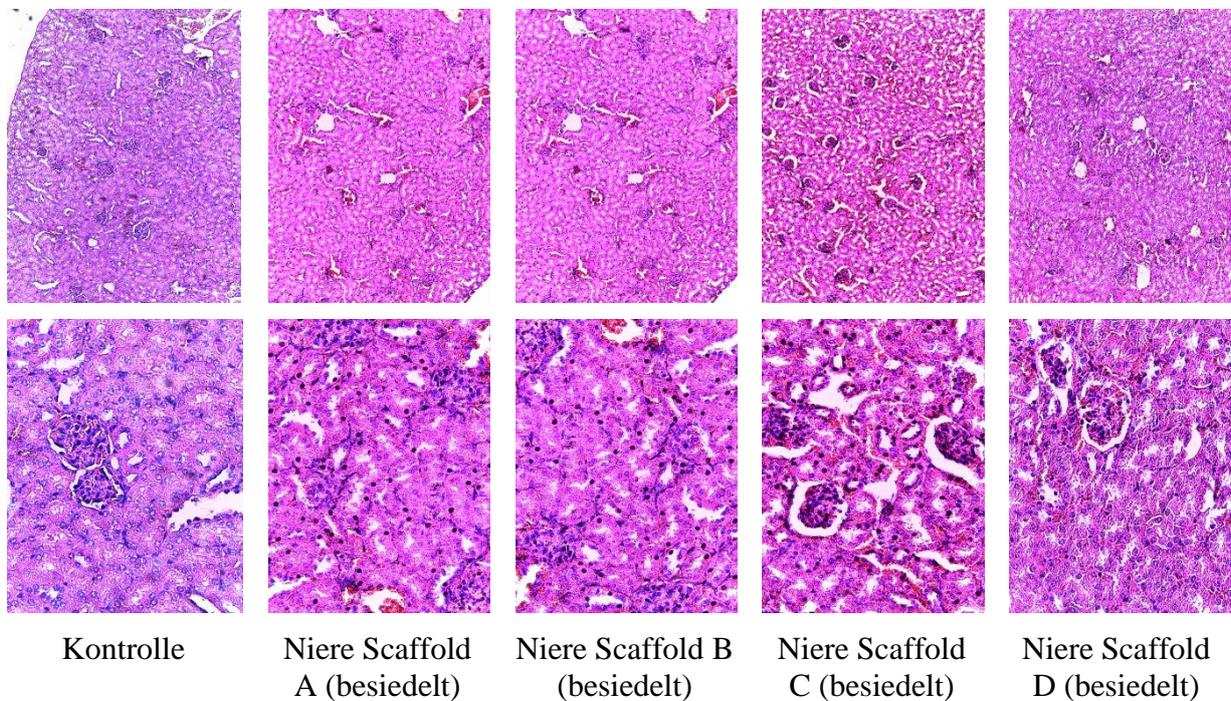


Abbildung 31: HE- Färbung der Niere von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Nierenparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenzierten MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Generell konnte bei fast allen Nieren eine Hyperämie durch die Euthanasiemethode (CO₂) beobachtet werden. Diffuse Nierenkörperchen waren eher Anzeichen lokaler autolytischer Veränderungen. Toxische Schäden wie eine Nekrose von Tubuli waren nicht erkennbar, auch wurden keine reparativen Veränderungen wie flache Tubulusepithelien oder Bindegewebszubildungen bzw. Zellproliferationsherde nachgewiesen (Abbildung 30 und 31).

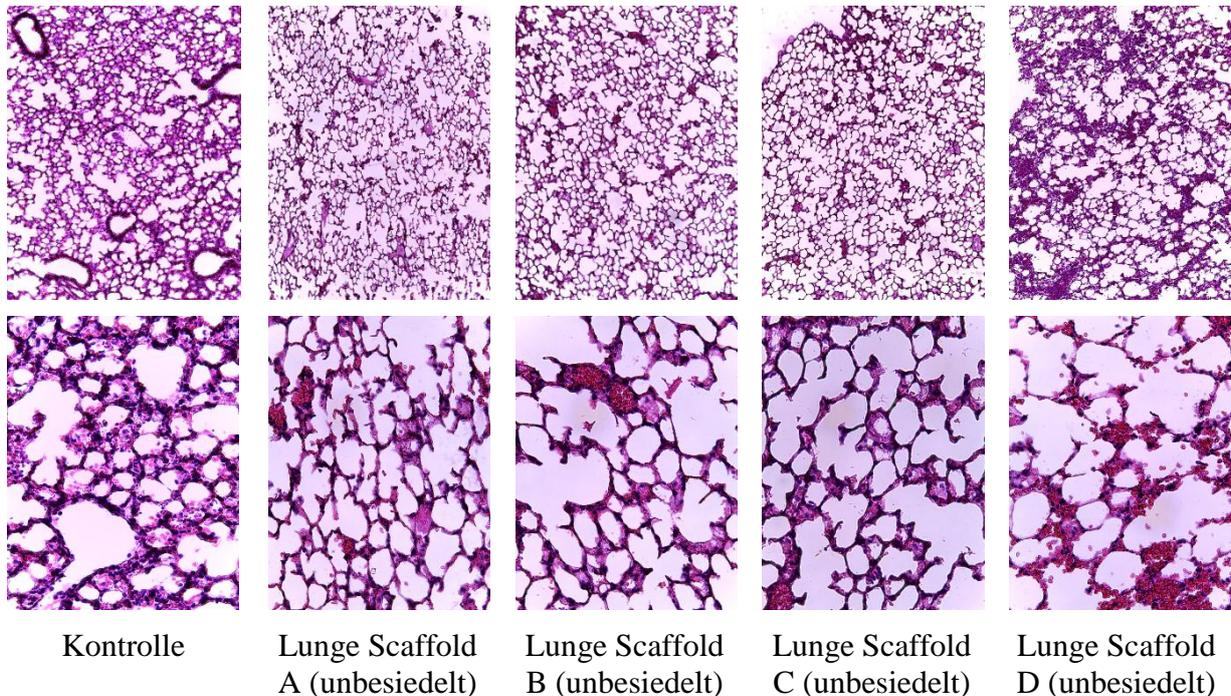


Abbildung 32: HE- Färbung der Lunge von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Lungenparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

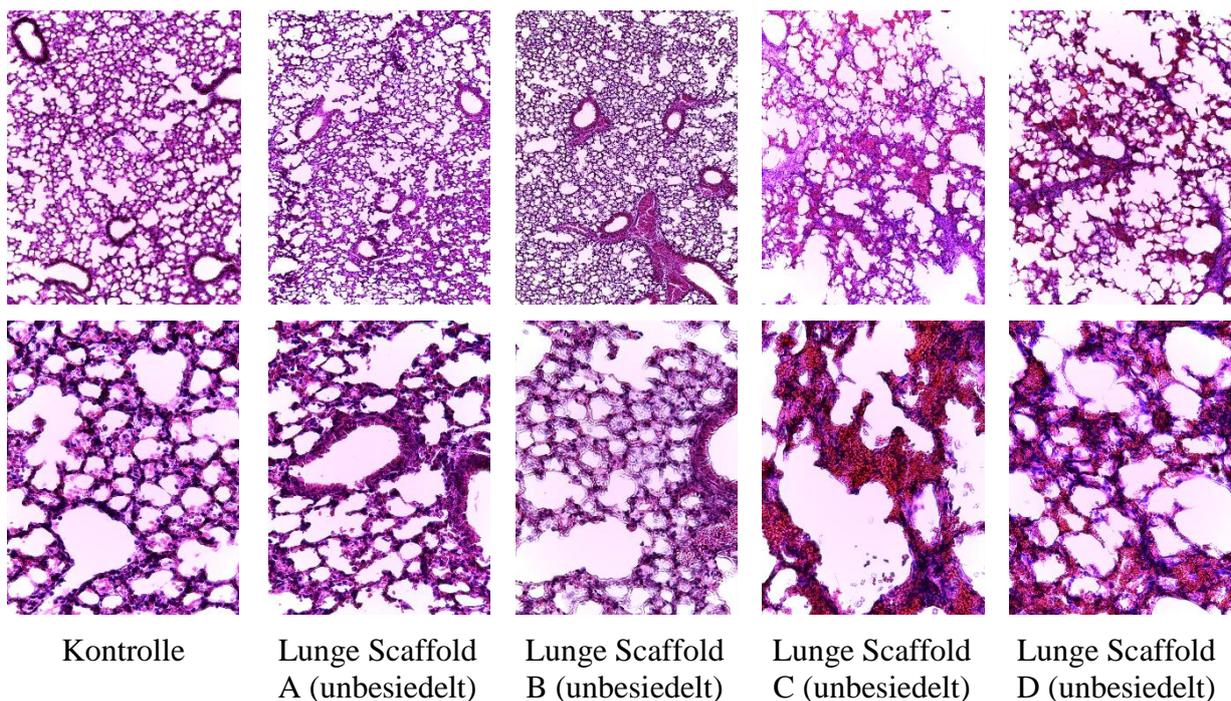


Abbildung 33: HE- Färbung der Lunge von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Lungenparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenzierten MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Auch in den Lungen aller Kontroll- und un-/besiedelten Scaffoldgruppen wurden oft hyperämische und zellreiche Areale beobachtet, was wahrscheinlich wiederum Zeichen eines Schocks durch die Euthanasiemethode war. Ebenso waren vereinzelte Atelektasen und Emphyseme darauf zurückzuführen. Jedoch konnte man keine tumoröse Veränderungen bzw. eine Neoplasiebildung detektieren (Abbildung 32 und 33).

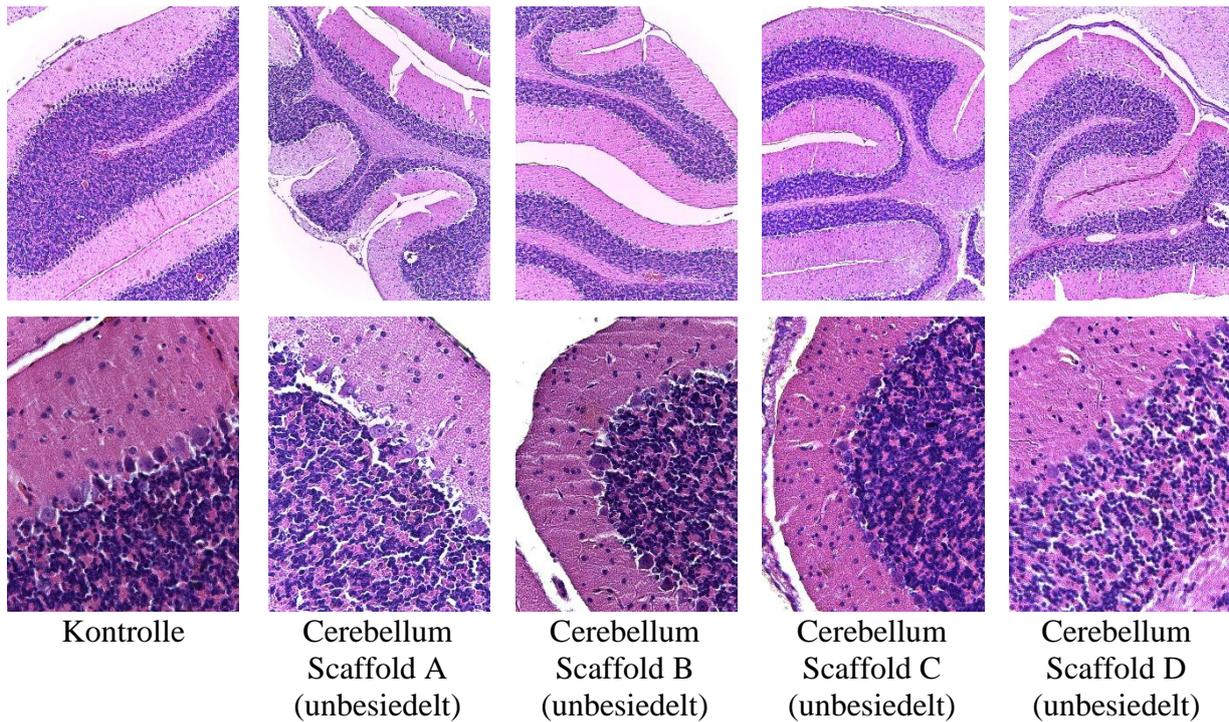
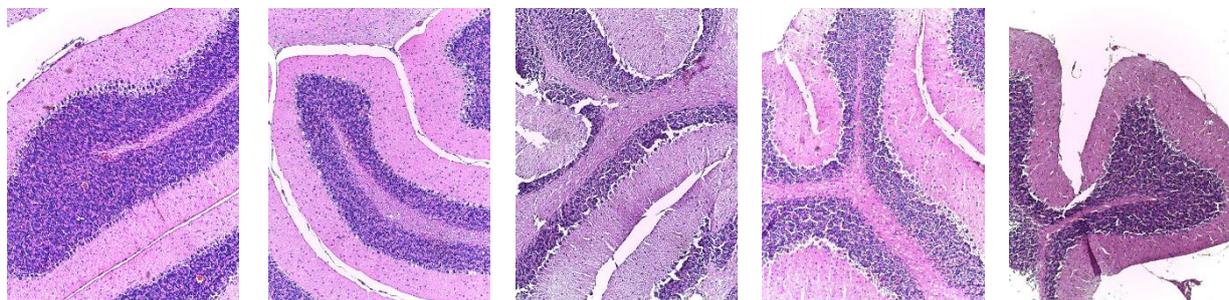


Abbildung 34: HE- Färbung des Cerebellums von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Kleinhirnparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.



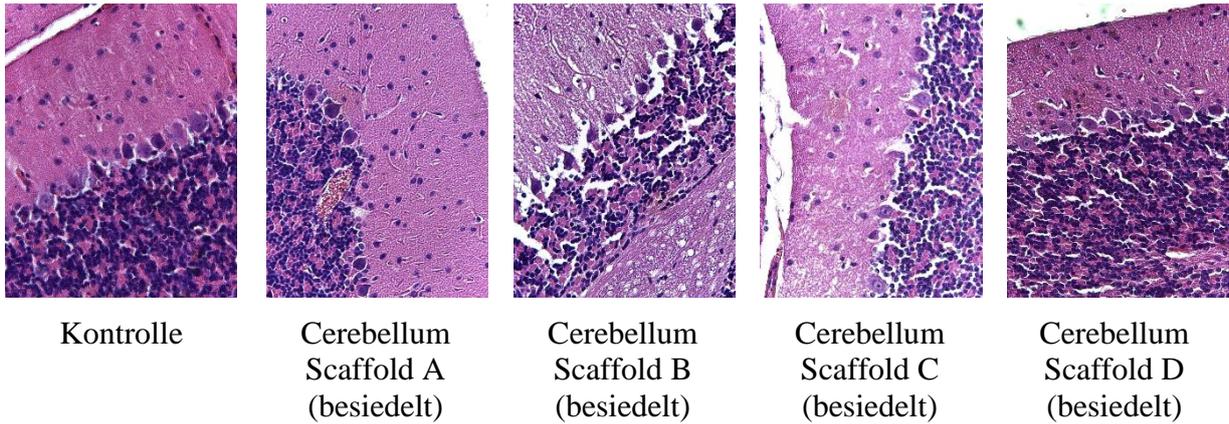


Abbildung 35: HE- Färbung des Cerebellums von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Kleinhirnparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenzierten MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Die explantierten Cerebelli waren sowohl makroskopisch als auch histologisch unauffällig (d.h. man konnte keine tumorösen Veränderungen bzw. eine Neoplasiebildung detektieren). Auch die Architektur des Kleinhirns ist ohne pathologischen Befund (Abbildung 34 und 35).

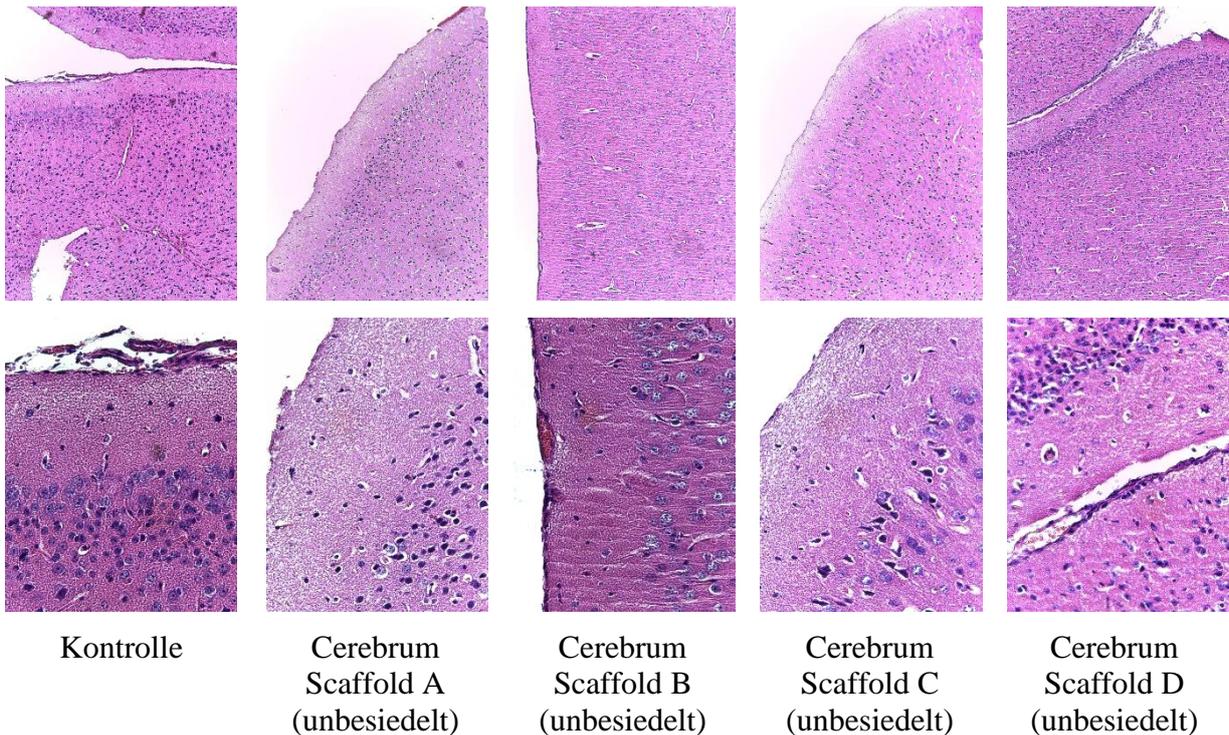
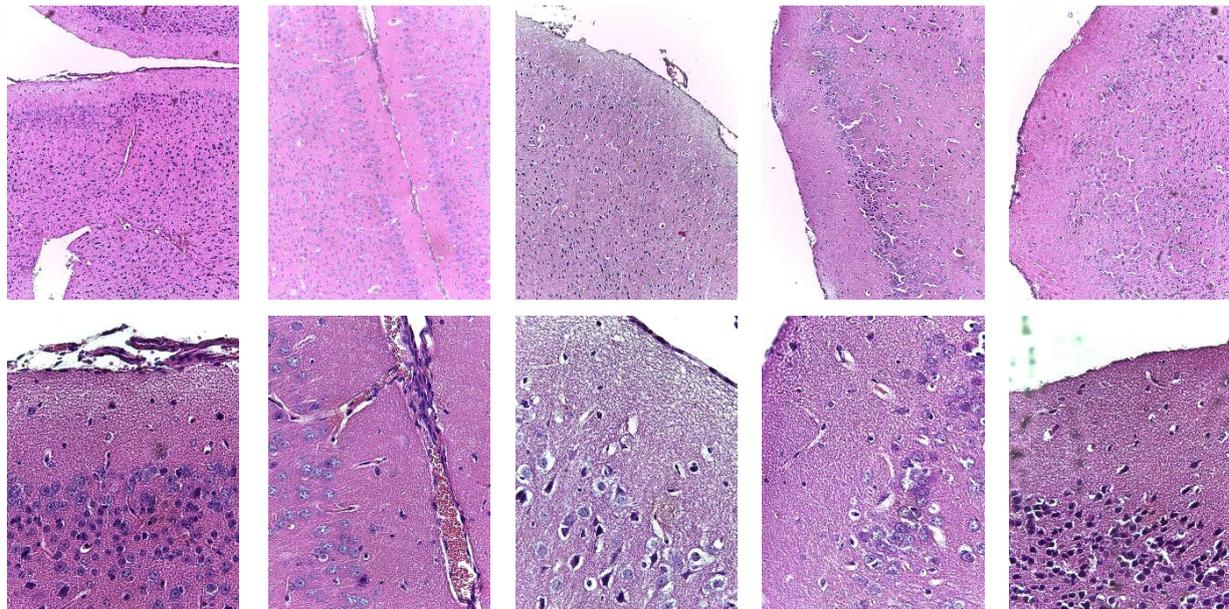


Abbildung 36: HE- Färbung des Cerebrums von Tieren mit unbesiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Großhirnparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein unbesiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.



Kontrolle

Cerebrum
Scaffold A
(besiedelt)

Cerebrum
Scaffold B
(besiedelt)

Cerebrum
Scaffold C
(besiedelt)

Cerebrum
Scaffold D
(besiedelt)

Abbildung 37: HE- Färbung des Cerebrums von Tieren mit besiedelten Scaffolds. Dargestellt ist das Großhirnparenchym der Tiere in Übersichts- (100x) und bei höherer Vergrößerung (400x), denen ein mit chondrogen differenziertes MSC besiedeltes Scaffold implantiert wurde. Als Kontrollen wurden black six Mäuse ohne Implantat untersucht.

Die Großhirnrinde war soweit histologisch beurteilbar unauffällig. Sie zeigte eine physiologisch zu erwartende Schichtenarchitektur und Zellverteilung. Die gelegentlich beobachteten kleinen Zellproliferationsareale stellten eher Gliaproliferationen als Reparatursignale dar und waren keine Entzündungszellen und auch keine Metastasen. Jene Veränderungen konnten aber auch bei den Kontrollgehirnen nachgewiesen werden (Abbildung 36 und 37).

9 Diskussion

Obwohl die Arthrose – im Englischen auch “Osteoarthritis” genannt – eine Erkrankung des gesamten Gelenks mit Beteiligung des Periosts, Gelenkkapsel, intergrierter Bänder und subchondralen Knochens darstellt [57], steht traditionell noch das Knorpelgewebe im Vordergrund der Arthroseforschung.

In der Fachliteratur sind zahlreiche Hinweise für den Einsatz von MSC im Tissue engineering beschrieben worden [38, 41]. Daher erfolgte in dieser Arbeit zusätzlich eine eigene Analyse, ob Kriterien wie Adhäsion, chondrogene Differenzierung, Proliferation und Migration der hMSC in die Scaffoldstrukturen *in vitro* erfüllt werden und das entstehende Zell-Trägermaterial sich für die Knorpelzellimplantation im Nacktmausmodell eignet. Weder die Kriterien der Besiedlungseffizienz noch die des Zellüberlebens waren bei Verwendung der PGC zur Scaffold-

Besiedlung ausreichend erfüllt, daher wurden für die weiteren Experimente wie die Immunfluoreszenzmarkierungen von Knorpelmatrixproteinen *in vitro* und *in vivo* Implantation keine PGC benutzt. Die Besiedlungen mit chondrogen differenzierten MSC zeigten jedoch eine deutliche Adhäsion und Migration der Zellen in die Scaffoldstrukturen, sodass von den beiden Zelltypen die MSC als besser geeignete Zellquelle für die *in vitro* und *in vivo* Experimente selektiert wurden. Die gerade genannten Resultate werden nun im folgenden Kapitel näher betrachtet und diskutiert.

9.1 Zellkultur

Die Zellkultur ermöglicht die Analyse der Besiedlungseffizienz eines Biomaterials ohne die Anwesenheit exogener Faktoren, so wirken physiologische Einflüsse durch z.B. mechanische Einwirkung im Gelenk oder Mediatoren in der Synovialflüssigkeit nicht ein.

Vier verschiedene Scaffold-Typen (A-D, unterschiedlicher Materialzusammensetzung) sollten in diesem Projekt unter anderem dahingehend geprüft werden, ob diese für die Besiedelung mit PGC und/oder chondrogen differenzierten hMSC *in vitro* geeignet sind. Die signifikanten Unterschiede bei der vergleichenden Charakterisierung beider Zellarten hinsichtlich der Besiedlungseffizienz lassen chondrogen differenzierte hMSC als eine zu präferierende Zellquelle erscheinen. Dabei zeigte sich invertmikroskopisch zu jedem definierten Zeitpunkt eine deutlich höhere Adhärenzfähigkeit der chondrogen differenzierten hMSC, unabhängig davon, welche Scaffoldvarianten besiedelt wurden. Die höhere Adhärenzfähigkeit der anfangs undifferenzierten MSC lässt eventuell auf ein anderes Rezeptorprofil dieser Zellen (höhere Expression von Integrinen, Fibronectin-Rezeptor, etc.) verglichen mit den PGC schließen [58, 59].

Darüberhinaus weisen die MSC oft eine etwas größere Zellgröße auf, sodass die Wahrscheinlichkeit der MSC durch die Poren durchzufallen geringer ist als bei den Chondrozyten.

Invertmikroskopisch konnte zudem eine leichte tendenzielle Abnahme der Zellzahl über den gesamten Kultivierungszeitraum (d.h. je differenzierter die MSC, desto weniger adhärente Zellen waren zu beobachten) bei Variante A bis D festgestellt werden. Auch hier könnte man behaupten, dass eine geringere Expression der Komponenten wie z.B. die Integrine und Fibronectin-Rezeptoren stattfand, je differenzierter die MSC waren. Auffällig war zudem eine hohe Variabilität der Besiedlungseffizienz der einzelnen MSC-Spender, wobei diese Varianz bei den PGC-Spendern nicht erkennbar war. Dies könnte daran liegen, dass insbesondere die MSC hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit und Proliferationsrate sehr unterschiedlich sein

können [59-61]. Um die festgestellte hohe Variabilität zwischen einzelnen Gewebedonoren zu reduzieren, wäre es sinnvoll, noch weitere Spender zu untersuchen.

Desweiteren wurde beobachtet, dass die PGC die Scaffolds eher oberflächlich und heterogen besiedelten. Angesichts der Feststellung, dass die Porendurchmesser eine tragende Rolle für die Einwanderung der PGC und MSC in die Konstrukte und Differenzierung der MSC übernimmt, wurde die Frage gestellt, wie groß die Porendurchmesser der untersuchten Scaffolds waren. Infolgedessen wurden die Porendurchmesser von mindestens zehn Scaffolds pro Variante gemessen und $0,29\pm 0,05$ mm für Scaffold A, $0,24\pm 0,06$ mm für Scaffold B, $0,33\pm 0,13$ mm für Scaffold C und $0,34\pm 0,11$ mm für Scaffold D als mittlerer Porendurchmesser ermittelt. Die Porengröße der Scaffolds spielt für die chondrogene Differenzierung der MSC eine tragende Rolle [62]. Kleinere Poren sorgen für eine hypoxische Umgebung, die wiederum einen Einfluss auf die Chondrogenese auszuüben scheint [63]. Der Einfluss der Porengröße wurde in mehreren experimentellen Studien aufgezeigt, die eine Induktion der Chondrogenese bei kleineren Poren (90–120µm) beobachteten [64, 65]. Der optimale Porendurchmesser für Chondrozyten liegt laut Getgood et al. (2009) zwischen 100 und 500 µm [50]. Folglich war davon auszugehen, dass theoretisch die Möglichkeit für eine Einwanderung der PGC bestand, da die Durchmesser der Scaffolds innerhalb dieses Bereichs lagen. Die Ursache für diese schlechte Besiedlungseffizienz war durch die Porengröße nicht erklärbar, vielmehr käme die Proliferations- und Überlebensunfähigkeit der PGC unter den vorgefundenen Bedingungen in Frage. Für die Adhäsion der PGC schien zudem die mineralische Oberfläche der Scaffolds nicht geeignet gewesen zu sein, da diese sich sehr leicht von den Konstrukten ablösten. Somit wären optimierende Modifizierungen der ursprünglich für die Knochenregeneration hergestellten Scaffolds hinsichtlich Materialzusammensetzung und der Oberflächentopographie notwendig, um eine bessere Adhäsion, Proliferation und Überleben der PGC bzw. chondrogen differenzierten MSC zu ermöglichen.

Die Frage, ob die Zellen auf den Scaffolds überlebten, könnte mit dem Vitalitätsassay (siehe nächsten Abschnitt) untersucht werden.

9.2 Lebend- tot- Färbungen mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid

Durch einen Vitalitätsassay konnte überprüft werden, ob die Scaffolds die Lebensfähigkeit der PGC und chondrogen differenzierten MSC beeinflussten. Hierbei konnten Zellen, die auf den Scaffolds kultiviert und sich durch aktiven Substratumsatz grün anfärbten, als lebendig eingestuft werden. Alle chondrogen differenzierten MSC-Kulturen zeigten in dieser Färbung eine signifikant höhere Vitalität an als die PGC-Besiedlungen. Bei diesen konnte nur bei

Scaffold B die höchste beobachtete Vitalität im Vergleich zu den restlichen PGC-Besiedlungen registriert werden, wobei hier methodisch berücksichtigt werden musste, dass lediglich adhärente PGC dargestellt werden konnten und solche, die möglicherweise bereits durch den Färbevorgang abgelöst wurden, nicht zur Darstellung kamen. Schließlich lösten sich die PGC generell viel leichter von den Scaffolds als die MSC und waren somit - in quantitativer Hinsicht – fluoreszenzmikroskopisch in deutlich geringerer Zahl detektierbar.

Warum jedoch die PGC in Variante B mit dem Lebendfarbstoff FDA gefärbt werden konnten, war unklar. Es zeigte sich zudem überraschenderweise nur bei Scaffold B eine starke Eigenfluoreszenz des Materials. Insgesamt ließ sich herausstellen, dass die Ursache für die generell schwache Grünfluoreszenz der PGC-Besiedlungen im Vergleich zu den hMSC-Besiedlungen hauptsächlich in der geringen Anzahl der PGC in und auf den Scaffolds lag. Andererseits handelte es sich bei den PGC-Besiedlungen mehrheitlich um tote Zellen im Vergleich zu den MSC-Besiedlungen, was wiederum vermuten ließ, dass die PGC auf den Konstrukten schneller und leichter abstarben.

Wesentlicher Aspekt der in dieser Arbeit vorliegenden Vitalitätsfärbung war der morphologische Nachweis, dass, im Gegensatz zu den PGC-Besiedlungen, die meisten chondrogen differenzierten MSC auf allen vier Scaffolds fast gleich gut überlebten. Dies stellt eine grundlegende Voraussetzung für eine kontinuierliche Produktion von Extrazellulärmatrix (vor allem Kollagen Typ II) dar.

Neben der Vitalitätsfärbung wäre zusätzlich auch eine quantitative Aussage des Überlebens der Zellen mittels des Laktat-Dehydrogenase-Tests möglich gewesen. Dieses intrazelluläre Enzym, das praktisch ubiquitär in Geweben vorhanden ist, wird bei Schädigung der Zellmembran bzw. von toten Zellen extrazellulär freigesetzt und kann so im Kulturmedium detektiert werden [66].

9.3 Immunhistologische Färbungen

Die Interzellulärsubstanz bzw. Matrix des Knorpelgewebes besteht neben ungeformten (z.B. Wasser – das den größten Anteil der ECM ausmacht und Proteoglykanen wie Aggrekan) aus geformten Komponenten (wie z.B. kollagene Fasern, hauptsächlich Kollagen Typ II, aber auch Typ IX und XI). Typ II Kollagen macht ca. 90% aller Kollagene im Knorpelgewebe aus und wird in hoher Konzentration von reifen Chondrozyten produziert [34]. Typ I Kollagen ist ein unspezifischer Bindegewebsmarker und kommt ubiquitär, jedoch relativ gering im gesunden Knorpel vor. Seine vermehrte Produktion wurde vor allem in zweidimensionalen (Monolayer-) Kulturen begleitet von einem Verlust des Phänotyps artikulärer Chondrozyten beobachtet [67, 68].

Um das Expressionsprofil der chondrogen differenzierten MSC für den wichtigen Knorpelmarker Kollagen Typ II auf den vier untersuchten Scaffoldvarianten festzustellen, wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung vorgenommen. Diese Immunmarkierung erlaubte einen Nachweis der Expression des Hauptknorpelmarkers Kollagen Typ II. Allerdings fiel dieser geringer aus als der Nachweis des unspezifischen Kollagen Typ I. Erfahrungsgemäß ist die chondrogene Differenzierung von MSC nach zwei Wochen noch nicht voll erreicht. In der frühen Differenzierung bilden die MSC zusätzlich zu Kollagen Typ II auch Kollagen Typ I. Zudem gab die Färbung Aufschluss darüber, ob die Zellen das gesamte Scaffold besiedelten. Um dies zu prüfen, wurden die Zellen nach der Kultivierung auf den Scaffolds zusammen mit den Kollagenen auch mit dem DNA Farbstoff DAPI zur Darstellung der Zellkerne gefärbt und konfokal mikroskopisch untersucht.

Aufgrund der bei der konfokal mikroskopischen Betrachtung in allen chondrogen differenzierten MSC – Besiedlungen noch schwach nachweisbaren Typ II Kollagen Proteinexpression konnte von einer eventuell noch unvollständigen Differenzierung der MSC nach Azacytidingabe ausgegangen werden. Azacytidin diente der Demethylierung der DNA, welche die für die nachfolgende Differenzierung erforderliche Genexpression erleichtert. Hinsichtlich dieses Musters zeigten sich zwischen den einzelnen MSC-Besiedlungen keine signifikanten Unterschiede, einzig die Variante B wies eine leicht vermehrte Expression von Kollagen Typ II auf. Inwieweit die gebildete ECM - mit der nachgewiesenen Kollagen Typ II Menge und der dargestellten Zytoskelettorganisation - der des hyalinen Knorpels entspricht, wäre noch mit einer immunhistologischen Kontrollfärbung artikulärer Knorpelproben zu verifizieren.

In allen Varianten war zudem das Zytoskelettprotein F-Aktin homogen verteilt. Konfokal mikroskopisch konnten auch in der Tiefe der Konstrukte viele gefärbte Zellkerne beobachtet werden, was auf eine Einwanderung der MSC in das gesamte Scaffold hindeutete.

Zusammenfassend wurde für die MSC bei Kultur in allen Ca-Zn-Scaffold Varianten nach 24 stündiger Stimulierung mit Azacytidin und zweiwöchiger Kulturdauer eine unvollständige chondrogene Differenzierung aber eine große Zahl adhärenter Zellen nachgewiesen. Um zu klären, ob das hier nachgewiesene ECM-Muster dem des hyalinen Gelenkknorpels weitestgehend entsprach, müsste zukünftig ein direkter Vergleich zwischen beiden Zellarten erfolgen. Mithilfe einer Quantifizierung des DNA-Gehaltes und der Komponenten der ECM wie z.B. sulfatierte Glukosaminoglykane oder Kollagene könnte analysiert werden, wie viel Knorpel-ECM pro Zelle gebildet wurde.

9.4 *In vivo* Nacktmausmodell

Nach der *in vitro* Evaluation der PGC und chondrogen differenzierten hMSC, die eine schlechte Adhärenz der PGC am Scaffold ergab, erschienen MSC als günstigere Zellquelle. Um eine weitere Aussage über die Eignung der hMSC-Scaffoldkonstrukte *in vivo* treffen zu können, waren allerdings weitere Untersuchungen im Nacktmausmodell nötig. Das in diesem Projekt verwendete Nacktmausmodell bezog im Gegensatz zum *in vitro* Modell komplexe Interaktionen wie systemische, biomechanische und biochemische Faktoren mit ein. Ferner erlaubt das *in vivo* Modell eine kontinuierlichere Zufuhr von Nährstoffen für die Zellen [51]. Durch die fehlenden reifen T-Lymphozyten besitzt die athymische Nacktmaus ein stark eingeschränktes Immunsystem, weshalb die Implantation von xenogenen Zellen wie die in dieser Arbeit verwendeten hMSC gewährleistet werden konnte.

9.5 Makroskopische Beurteilung der Scaffolds

Im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell gelang es zwar aus allen verwendeten Scaffolds nach sechs Wochen Implantationszeit ein makroskopisch bindegewebsreiches Konstrukt zu bilden, jedoch entstand kein makroskopisch erkennbarer fester Ersatzknorpel. Bei der Betrachtung der Farbe, Gewebeart in den Vliesen, Kapselbildung und Vaskularisierung zeigten sich zwischen den einzelnen MSC-Besiedlungen keine signifikanten Unterschiede. Die besiedelte Scaffoldvariante A wies nach Explantation eine sehr dicke Kapsel mit vielen in die Konstrukte eindringenden Blutgefäßen auf.

Insgesamt kam die große Bedeutung einer dicken Kapselbildung und einer ausreichenden Vaskularisation des Implantates mehr den besiedelten Varianten im Vergleich zu den unbesiedelten Kontrollen zu, die tendenziell nach Explantation kleiner waren, weniger Blutgefäße und dünnere Kapseln enthielten.

9.6 Histologische Beurteilung der Scaffolds mittels HE-Färbung

Die hier durchgeführten Färbungen dienten der histologischen Darstellung der besiedelten und unbesiedelten Scaffolds. Die Auswertung der histologischen Schnittpräparate der Scaffolds erfolgte semiquantitativ mittels eines Scoresystems. Bei allen besiedelten Scaffolds waren histologisch Zellen, Scaffoldmaterial und Gewebe nachzuweisen. Ob auch ein direkter Kontakt zwischen Scaffold und Zellen bestand, war mit dieser Methode nicht exakt widerzugeben, da das Scaffoldmaterial und die darauf angehafteten Zellen während des Schneide- und Färbevorgangs gelegentlich verloren gingen. Denn um ein Stück für die histologische Färbung der Scaffolds zu gewinnen, musste beim Schneiden der Scaffolds (Schnittdicke lag bei 7 µm) oft großer Druck

ausgeübt werden. Insofern wäre es möglich gewesen, dass während dem Schneidevorgang Zellen verloren gingen. Aufgrund der harten und spröden Beschaffenheit aller Scaffoldvarianten konnten meistens nur Fragmente abgebrochen werden, was nicht nur den Zellverlust sondern auch eine Beschädigung der Scaffoldstrukturen bedingt haben könnte. Auch während dem Färbeprozess lösten sich die Scaffoldmaterialien vom Objektträger, sodass die Beurteilung hinsichtlich direktem Kontakt zwischen Material und Zelle erschwert war. Inwiefern die chondrogen differenzierten hMSC auch ins Innere der Scaffolds migrierten bzw. die Räume zwischen den Vliessegmenten füllten, ließ sich somit nicht aussagen bzw. würde das Fehlen der chondrogen differenzierten hMSC in der HE-Färbung eine schlechte Adhärenz dieser an den Scaffolds vortäuschen. Zudem war es anhand der HE-Färbung nicht möglich zu beurteilen, ob es sich bei den gefärbten Zellen auf den Scaffoldmaterialien tatsächlich um chondrogen differenzierte MSC handelte. Hierbei wäre für die Detektierung notwendig gewesen, die hMSC z.B. mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe zu markieren. Histomorphologische Korrelate für einen hohen Besiedlungserfolg wären dabei eine Füllung der Zwischenräume mit chondrogen differenzierten Zellen und sichtbare direkte Kontakte zwischen Scaffold bzw.

Scaffoldfragmenten und Gewebe.

Die Biokompatibilität der Zell-Matrixkonstrukte ließ sich histologisch durch ein Fehlen von Entzündungszellen überprüfen. Sowohl die besiedelten als auch die unbesiedelten Scaffolds lösten nur leichte Entzündungsreaktionen aus, vor allem wenn diese in bzw. an der Epidermis lokalisiert waren. Dabei konnten in der Nähe der Scaffolds geringe Mengen von Entzündungszellen wie Makrophagen nachgewiesen werden. Hierbei spielte möglicherweise auch die abnormale mechanische Belastung des spröden xenogenen Materials bei subkutaner dorsaler Lokalisation im Vergleich zu einer Implantation im (osteo-)chondralen Gelenkdefekt eine Rolle. Möglicherweise führte dieser Umstand zur Induktion einer sehr leichten Entzündung mit Einwanderung und Einnisten von wenigen Makrophagen. Es konnten jedoch keine Ansammlungen von Fremdkörperriesenzellen detektiert werden. Zusätzlich wurde in Scaffoldnähe häufig eine Vermehrung der Talgdrüsen – wahrscheinlich auch als Reaktion auf die mechanische Reizung - beobachtet.

Ob die aufgetretene Inflammation eine Reaktion auf das künstlich hergestellte Implantat oder ein Charakteristikum der zugrunde liegenden Gewebedonorspezies in Kombination mit dem Xenograft-Nacktmausmodell war, war mit den vorliegenden Ergebnissen nicht erklärbar – beide Erklärungen konnten nicht ausgeschlossen werden.

Ebenso wurden vor allem bei der unbesiedelten Kontrollvariante A und B vermehrt Fibroblasten, die – mit einer Inflammation einhergehenden – Reparaturprozesse steuern, in der Scaffold

umgebenden Subkutis detektiert. Hingegen zeigte sowohl die besiedelte und unbesiedelte Scaffoldvariante C und D eine relativ dichte lokale ECM mit wenigen Entzündungszellen und Fibroblasten.

Eine Hypovaskularisation der Besiedlungszone würde in eine konsekutive lokale Hypoxie und eine verminderte Versorgung der Gewebe mit wichtigen Nährstoffen resultieren, wobei eine vermehrt beobachtbare Kapillarisation für stattgefundene Entzündungsprozesse oder gar für eine Neoplasie sprechen würde. In allen besiedelten und unbesiedelten Scaffoldvarianten waren Kapillarvermehrungen zu erkennen. Neoplastische Zellen konnten jedoch histologisch nicht nachgewiesen werden.

Schließlich könnten die histologischen Färbungen der MSC-Besiedlungen durch weitere knorpelspezifische Marker (wie z.B. Proteoglykane mittels einer Alcian-Blau Färbung) erweitert und auf eine für Knorpelgewebe charakteristische Lakunenbildung untersucht werden, was auf eine erfolgreiche Chondrogenese in den Scaffolds hindeuten würde.

9.7 Histologische Beurteilung der Nacktmausorgane mittels HE-Färbung

Eine systematische histopathologische Untersuchung der Organe Milz, Niere, Lunge, Leber, und Gehirn wurde durchgeführt um die Frage zu beantworten, ob die hMSC ggf. metaplastische Veränderungen in wichtigen Organen auslösen oder toxische Effekte von den Scaffolds resultierten. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Organe von acht Wochen alten, weiblichen black six Mäusen (siehe Materialien), die kein Implantat erhielten.

Milz: Alle ausgewerteten Tiere zeigten eine für die Milz typische Struktur mit Primär- und Sekundärfollikeln mit selten beobachtbaren Megakaryozyten. Typische Entzündungszellen waren nicht beobachtbar. Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass weder die besiedelten noch die unbesiedelten Scaffolds beträchtliche Entzündungsreaktionen oder Neoplasien in der Milz hervorriefen.

Leber: Da die Leber auch ein Schockorgan wie die Lunge und Milz darstellt, könnte eine Hyperämie eher als Zeichen eines Schocks durch die Euthanasiemethode in Frage kommen. Desweiteren wurden keine tumorösen Veränderungen, keine relevanten Entzündungen und keine Bindegewebszubildungen beobachtet. Vereinzelt konnten Veränderungen (winzige Areale mit Zellproliferation) nachgewiesen werden, jedoch waren diese auch in den Kontrolllebern zu sehen und standen daher wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit Scaffoldmaterial. Dezent vakuolige Veränderungen der Hepatozyten könnten jedoch als toxische Belastung beurteilt werden (v.a. bei der Variante „C“ [mit und ohne Zellen] und „D“ [mit Zellen]). Man könnte

hierbei die Hypothese aufstellen, dass eventuell Gehlenit, der Hauptbestandteil der Scaffolds C und D ist, dieses Phänomen auslöste - wobei hierzu keine Literatur zu finden war.

Niere: Die im Ergebnisteil erwähnte Hyperämie war eher als Zeichen eines Schocks durch die Euthanasiemethode (CO₂) zu beurteilen. Schlecht abgrenzbare Nierenkörperchen („diffuse Nierenkörperchen“) waren wahrscheinlich Anzeichen lokaler autolytischer Veränderungen. Die Autolyse tritt bei der Niere bei der Hämostase rasch ein, da sie ein stoffwechselaktives und sehr gut durchblutetes Organ ist. Essentiell war die Erkenntnis, dass keine toxischen Schäden wie eine Nekrose von Tubuli keine reparativen Veränderungen wie flache Tubulusepithelien, relevante Entzündungs- und Zellproliferationsherde und Bindegewebszubildungen nachgewiesen werden konnten.

Lunge: Häufiger beobachtete Entzündungsprozesse standen wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit dem Scaffoldmaterial, da auch bei der Kontrolle Entzündungszellen vorhanden waren. Man könnte dieses Phänomen auf die Immuninkompetenz der Tiere, die sehr empfindlich auf Atemwegsinfektionen reagieren, zurückführen. Daher wurden sie unter Filterhauben gehalten.

Gehirn: Kleine Veränderungen wie winzige Zellproliferationsareale (diese wurden eher als Gliaproliferation als Antwort auf Reparatursignale gedeutet) konnten nicht nur bei den (un-) besiedelten Scaffold-Gruppen, sondern auch bei den Kontrollgehirnen nachgewiesen werden und standen daher wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit Scaffoldmaterial.

Bösartige Neubildungen oder relevante Entzündungherde waren in keiner der Nacktmausgehirne zu detektieren.

Zusammenfassend konnte die Aussage getroffen werden, dass die Vliesmaterialien keine systemischen Reaktionen hervorriefen. Blogowski et al. konnten kürzlich (2016) eine Beziehung zwischen MSC aus dem Knochenmark und dem Adenokarzinom des Pankreas feststellen [69]. Dies könnte eventuell begrenzende Auswirkungen hinsichtlich der Verwendung dieser Zellen zukünftig haben.

9.8 Gewichtsmessung und Allgemeinzustand der Nacktmäuse

Der Allgemeinzustand war zu jeder Beobachtungszeit gut. Das Gewicht aller Tiere, denen Scaffolds implantiert wurden, wurde zu definierten Zeiten gemessen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit den besiedelten Scaffolds und den Kontrollmäusen beobachtet werden. Insofern ließ sich daraus schließen, dass die mit Zellen besiedelten Scaffolds keinen negativen Einfluss auf den Allgemeinzustand und das Gewicht bzw. den Gewichtsverlauf bewirkten. Jedoch wogen die Tiere mit den besiedelten Scaffolds – im

Trend weniger als die Kontrollmäuse, was eventuell auch auf eine leichte systemische Reaktion auf die implantierten xenogenen Zellen zurückzuführen wäre.

10 Fazit und Ausblick

Die im oberen Abschnitt aufgeführten Ergebnisse und Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass eine Besiedelung der Scaffolds mit Chondrozyten nur sehr schlecht möglich, mit MSC jedoch grundsätzlich möglich war. Dabei führten die MSC-Besiedlungen zu signifikant besseren Resultaten gegenüber den PGC-Besiedlungen hinsichtlich der mikroskopischen Betrachtungen bezüglich des Kriteriums Zelladhäsion. Insgesamt schienen die Voraussetzungen für eine Kultivierung nur von PGC nicht in dem Maße gegeben zu sein, dass die Knorpelzellen permanent auf bzw. in den Scaffolds adhärirten und in die Tiefe der Konstrukte migrieren konnten. Zusammenfassend wurde in allen MSC-Besiedlungen immunzytochemisch noch wenig Kollagen Typ II als einer der wichtigsten Bestandteile der ECM des hyalinen Knorpels nachgewiesen. Bei den detektierten Kollagenen handelte es sich um meistens um Kollagen Typ I. In geringer Menge wurde auch Kollagen Typ II gebildet, jedoch ergaben sich ungünstige Kollagen Typ II/I Verhältnisse als Zeichen einer wahrscheinlich unvollständigen Chondrogenese. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Scaffoldvarianten A-D konnten nicht ermittelt werden. Infolgedessen konnte durch die in dieser Arbeit dargestellten Resultate keine eindeutige Präferenz für eine der vier Konstrukte gewonnen werden.

Desweiteren muss hinzugefügt werden, dass die untersuchten Scaffolds ursprünglich klinisch zur Knochenregeneration eingesetzt werden (siehe Einleitung). Dies wiederum legt nahe, dass die Ca-Zn-Scaffolds bezüglich ihrer chemischen bzw. biomechanischen Zusammensetzung rein für die Gewährleistung eines optimalen Milieus für Überleben und Proliferation der Osteoblasten bzw. Osteoklasten hergestellt wurden. Die Konstrukte lassen jedoch die Erhaltung der Chondrozyten bzw. chondrogen differenzierten MSC außer Acht. Es war somit zu erwarten, dass sich Knorpelzellen auf den Vliesen nicht optimal kultivieren ließen wie vergleichsweise Osteoklasten und Osteoblasten.

Zudem schuf die Oberflächentopographie der Scaffolds keine chondrozytenfreundliche Umgebung, da sich die PGC sehr leicht von der Oberfläche lösten. Warum jedoch chondrogen differenzierte hMSC darauf wuchsen und ECM synthetisierten, lag möglicherweise an dem noch vorhandenen Charakter der Stammzelle, der proliferationstüchtiger ist als adulte reife Zellen und ein anderes Rezeptorprofil aufweist.

Von großer Bedeutung ist zudem die mechanische Belastbarkeit der Konstrukte, die den teilweise im menschlichen Gelenk herrschenden hohen Druck widerstehen und standhalten soll. Letzteres schließt die Eignung der als z.T. sehr brüchig - wahrgenommenen Ca-Zn-Scaffolds im Bereich der Knorpelregeneration aus, denn Knorpel ist ein Gewebe, das hohen Druckbelastungen Stand halten muss, sodass die Konstrukte für eine Besiedelung mit Knorpel- bzw. knorpelartigen Zellen und folglich für den Einsatz als biphasische Scaffolds im Bereich Tissue Engineering zur Behandlung chondraler Defekte wenig geeignet wäre. Weitere Modifizierungen hinsichtlich Materialzusammensetzung und Oberflächentopographie sind notwendig, um eine chondrozytenfreundlichere Umgebung zu schaffen.

Aus der vorhergehenden Diskussion kann geschlossen werden, dass die Einsatzmöglichkeit von reifen adulten PGC hinsichtlich der Kultivierung auf Ca-Zn-Scaffolds nicht gegeben ist. Die diesem Ergebnis insgesamt zugrunde liegenden Daten sprechen jedoch für die weitere Verwendung von MSC im Rahmen eines Tierversuches. Für eine klinische Anwendung müssen noch weitere z.B. in der Schlussfolgerung genannten *in vitro* Untersuchungen und *in vivo* Versuche im Großtiermodell folgen.

Abschließend zusammengefaßt müssten für eine Steigerung der Aussagekraft der Ergebnisse methodische Verbesserungen bzw. Alternativen - wie oben diskutiert - unternommen werden. Eine Transferierung der gewonnenen Daten auf den Menschen ist dennoch nur begrenzt möglich, da der Mensch durch seinen aufrechten Gang und somit auch die Biomechanik seiner Gelenke außergewöhnlich ist. Insgesamt reichen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse für eine explizit konkrete vergleichende Beurteilung aller vier Scaffold-Varianten nicht aus.

11 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
Ak	Antikörper
AZA	Azacytidin
COL	Kollagen
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethyl-methylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECM	extrazelluläre Matrix
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fetales Kälberserum
FDA	Fluorescein-Diacetat
GAG	Glycosaminoglykan
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
hMSC	humane mesenchymale Stromazelle
MACT	Matrix-induzierte autologe Chondrozyten Transplantation
mAk	monoklonaler Antikörper
m-MAH	monoclonal mouse anti-human
m-GAH	monoclonal goat anti-human
MSC	mesenchymale Stromazelle
NaCl	Natriumchlorid
P	Passage
pAk	polyklonaler Antikörper
Par	Partricin
Pen	Penicillin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGC	porcine Gelenk-Chondrozyten
p-DAG	polyclonal donkey anti-goat
p-DAR	polyclonal donkey anti-rabbit
p-RAH	polyclonal rabbit anti-human
s.c.	subkutan

Strep	Streptomycin
TGF-β	Transforming Growth Factor - beta

12 Literaturverzeichnis

1. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, *Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis*. Biogerontology, 2002. **3**(5): p. 257-64.
2. Mandelbaum, B. and D. Waddell, *Etiology and pathophysiology of osteoarthritis*. Orthopedics, 2005. **28**(2 Suppl): p. s207-14.
3. Altman, R.D., *The classification of osteoarthritis*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 42-3.
4. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage repair and transplantation*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(8): p. 1331-42.
5. Mancuso, C.A. and C.S. Ranawat, *Indications for total hip and total knee arthroplasties. Results of orthopaedic surveys*. J Arthroplasty, 1996. **11**(1): p. 34-46.
6. Felson, D.T. and Y. Zhang, *An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(8): p. 1343-55.
7. Garstang, S.V. and T.P. Stitik, *Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology*. Am J Phys Med Rehabil, 2006. **85**(11 Suppl): p. S2-11; quiz S12-4.
8. Lawrence, R.C. and D.T. Felson, *Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(1): p. 26-35.
9. Michael, J.W., K.U. Schluter-Brust, and P. Eysel, *The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(9): p. 152-62.
10. Lanyon, P. and K. Muir, *Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study*. BMJ, 2000. **321**(7270): p. 1179-83.
11. Blagojevic, M. and C. Jinks, *Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(1): p. 24-33.
12. Jensen, L.K., *Knee osteoarthritis: influence of work involving heavy lifting, kneeling, climbing stairs or ladders, or kneeling/squatting combined with heavy lifting*. Occup Environ Med, 2008. **65**(2): p. 72-89.
13. Kujala, U.M. and Kettunen J., *Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(4): p. 539-46.
14. Papalia, R. and A. Del Buono, *Meniscectomy as a risk factor for knee osteoarthritis: a systematic review*. Br Med Bull, 2011. **99**: p. 89-106.
15. Zhang, W. and M. Doherty, *EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT)*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(5): p. 669-81.
16. Felson, D.T. and R.C. Lawrence, *Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 635-46.
17. Basad, E. and B. Ishaque, *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(4): p. 519-27.
18. Egermann, M. and E. Schneider, *The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis*. Osteoporos Int, 2005. **16 Suppl 2**: p. S120-8.

19. Gille, J. and E. Schuseil, *Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(11): p. 1456-64.
20. Sun, H. and W. Liu, *Tissue engineering of cartilage, tendon and bone*. Front Med, 2011. **5**(1): p. 61-9.
21. Berninger, M.T. and G. Wexel, *Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model*. J Vis Exp, 2013(75): p. e4422.
22. Butler, D.L. and H.A. Awad, *Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S324-32.
23. Deng, S. and R. Huang, *Miscellaneous animal models accelerate the application of mesenchymal stem cells for cartilage regeneration*. Curr Stem Cell Res Ther, 2014. **9**(3): p. 223-33.
24. Piontek, T. and P. Bakowski, *Arthroscopic Treatment of Chondral and Osteochondral Defects in the Ankle Using the Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Technique*. Arthrosc Tech, 2015. **4**(5): p. e463-9.
25. Vinatier, C. and O. Gauthier, *An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects*. Biotechnol Bioeng, 2009. **102**(4): p. 1259-67.
26. Hardingham, T., S. Tew, and A. Murdoch, *Tissue engineering: chondrocytes and cartilage*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S63-8.
27. Mitchell, N. and N. Shepard, *The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone*. J Bone Joint Surg Am, 1976. **58**(2): p. 230-3.
28. Dewan, A.K. and M.A. Gibson, *Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 272481.
29. Brittberg, M., *Autologous chondrocyte transplantation*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S147-55.
30. Ducheyne, P., R.L. Mauck, and D.H. Smith, *Biomaterials in the repair of sports injuries*. Nat Mater, 2012. **11**(8): p. 652-4.
31. Kon, E. and G. Filardo, *ACI and MACI*. J Knee Surg, 2012. **25**(1): p. 17-22.
32. Iwasa, J. and L. Engebretsen, *Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009. **17**(6): p. 561-77.
33. Schulze-Tanzil, G., *Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair*. Ann Anat, 2009. **191**(4): p. 325-38.
34. Martinek, V., P. Ueblacker, and A.B. Imhoff, *Current concepts of gene therapy and cartilage repair*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(6): p. 782-8.
35. Loeser, R.F., Jr., *Aging cartilage and osteoarthritis--what's the link?* Sci Aging Knowledge Environ, 2004. **2004**(29): p. pe31.
36. Dozin, B. and M. Malpeli, *Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects*. Matrix Biol, 2002. **21**(5): p. 449-59.
37. Dhinsa, B.S. and A.B. Adesida, *Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2012. **7**(2): p. 143-8.
38. Huselstein, C., Y. Li, and X. He, *Mesenchymal stem cells for cartilage engineering*. Biomed Mater Eng, 2012. **22**(1-3): p. 69-80.
39. Pittenger, M.F. and A.M. Mackay, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
40. Zomorodian, E. and M. Baghaban Eslaminejad, *Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 980353.

41. Gobbi, A., G. Karnatzikos, and S.R. Sankineani, *One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee*. Am J Sports Med, 2014. **42**(3): p. 648-57.
42. Pelttari, K., E. Steck, and W. Richter, *The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S58-65.
43. Iwasaki, M. K. Nakata, *Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells*. Endocrinology, 1993. **132**(4): p. 1603-8.
44. Kramer, J. and C. Hegert, *Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4*. Mech Dev, 2000. **92**(2): p. 193-205.
45. Martin, I. and G. Vunjak-Novakovic, *Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue*. Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 681-8.
46. Fortier, L.A., A.J. Nixon, and G. Lust, *Phenotypic expression of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1*. Am J Vet Res, 2002. **63**(2): p. 301-5.
47. Ramaswamy, Y. and C. Wu, *The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic*. Biomaterials, 2008. **29**(33): p. 4392-402.
48. Meunier, P.J. and C. Roux, *The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis*. N Engl J Med, 2004. **350**(5): p. 459-68.
49. Reginster, J.Y. and E. Seeman, *Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2816-22.
50. Getgood, A. and R. Brooks, *Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice?* J Bone Joint Surg Br, 2009. **91**(5): p. 565-76.
51. Lohan, A. and U. Marzahn, *In vitro and in vivo neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds*. Histochem Cell Biol, 2011. **136**(1): p. 57-69.
52. Xu, J.W. and V. Zaporozhan, *Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources*. Plast Reconstr Surg, 2004. **113**(5): p. 1361-71.
53. Kafienah, W. and M. Jakob, *Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes*. Tissue Eng, 2002. **8**(5): p. 817-26.
54. Jagielski, M. and J. Wolf, *The influence of IL-10 and TNFalpha on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional cultures*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 15821-44.
55. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
56. Huang, Z. and P. Noeaid, *Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stromal cells in highly porous alginate-foams supplemented with chondroitin sulfate*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **50**: p. 160-72.
57. Loeser, R.F. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
58. Goessler, U.R. and P. Bugert, *Differential modulation of integrin expression in chondrocytes during expansion for tissue engineering*. In Vivo, 2005. **19**(3): p. 501-7.
59. Goessler, U.R. and P. Bugert, *Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation*. Int J Mol Med, 2008. **21**(3): p. 271-9.

60. Bartczak, A., I. McGilvray, and A. Keating, *Mesenchymal stromal cell therapy to promote cardiac tissue regeneration and repair*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2017. **22**(1): p. 86-96.
61. Russell, K.A. and N.H. Chow, *Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0167442.
62. Sundelacruz, S. and D.L. Kaplan, *Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine*. *Semin Cell Dev Biol*, 2009. **20**(6): p. 646-55.
63. Santos, M.I. and R.L. Reis, *Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges*. *Macromol Biosci*, 2010. **10**(1): p. 12-27.
64. Kuboki, Y. and Q. Jin, *Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis*. *Connect Tissue Res*, 2002. **43**(2-3): p. 529-34.
65. Kuboki, Y., Q. Jin, and H. Takita, *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis*. *J Bone Joint Surg Am*, 2001. **83-A Suppl 1**(Pt 2): p. S105-15.
66. Terauchi, R. and K.A. Takahashi, *Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(6): p. 1562-8.
67. Goessler, U.R. and P. Bugert, *In vitro analysis of matrix proteins and growth factors in dedifferentiating human chondrocytes for tissue-engineered cartilage*. *Acta Otolaryngol*, 2005. **125**(6): p. 647-53.
68. Nam, Y. and Y.A. Rim, *Cord blood cell-derived iPSCs as a new candidate for chondrogenic differentiation and cartilage regeneration*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 16.
69. Blogowski, W., T. Bodnarczuk, and T. Starzynska, *Concise Review: Pancreatic Cancer and Bone Marrow-Derived Stem Cells*. *Stem Cells Transl Med*, 2016. **5**(7): p. 938-45.

13 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, David Lee, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Biokeramische Scaffolds für die in vitro und in vivo Chondrogenese von mesenchymalen Stromazellen“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort, Datum

Unterschrift

14 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

15 Danksagung

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil für die Ermöglichung dieser Dissertation in ihrer ehemaligen Arbeitsgruppe danken. Ihre wertvollen und kreativen Vor- und Ratschläge und auch besonders ihre Motivation haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Genauso bedanke ich mich bei Benjamin Kohl für seine große, kompetente Unterstützung. Er war zu jeder Zeit erreichbar und bei Fragen und Problemen im und außerhalb des Laboralltags eine große Hilfe. Es war mir eine große Freude mit Benjamin zu arbeiten.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. med. vet. Anke Lohan für ihre zuverlässige und wertvolle Unterstützung beim Tierexperiment.

Vor allem möchte ich mich herzlich bei Carola Meier für ihre große Unterstützung bei den histologischen Färbungen bedanken.

Nicht zuletzt stand mir das gesamte Laborteam immer hilfreich zur Seite und bot auf diese Weise eine bestmögliche Betreuung meiner Arbeit. Es war mir eine überaus große Freude, in einer Arbeitsgemeinschaft zu arbeiten, die geprägt ist durch ein ausgesprochen kollegiales und freundliches Miteinander.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern sowie meiner gesamten Familie für ihre stets liebevolle und fürsorgliche Begleitung und Unterstützung.