

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie,  
des Zentrums für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie  
des Universitätsklinikums Heidelberg

**Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 beladener  
Gewebeleber zur verbesserten Integration von  
Knorpelersatzmaterialien mit subchondralem Knochen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Yvonne Renz  
aus Bühl (Baden)

Leipzig, 2018

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter  
Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger

Gutachter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter, Lehrstuhl für experimentelle Orthopädie,  
Zentrum für experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Heidelberg  
Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger, Professor für Histiologie und Embryologie,  
Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig  
Prof. Dr. med. vet. Sabine Wenisch, Professur für klinische Anatomie und  
experimentelle Chirurgie, Institut für Veterinär-Anatomie, - Histologie und –  
Embryologie der Justus-Liebig Universität Giessen

Tag der Verteidigung: 05.06.2018

*Für meinen Großvater Heinrich.*



## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1 KNORPELGEWEBE .....	3
2.1.1 Arten des Knorpelgewebes.....	3
2.1.2 Artikulärer Knorpel .....	3
2.2 ANSÄTZE ZUR THERAPIE VON KNORPELDEFEKTEN.....	6
2.2.1 Arten von Knorpeldefekten .....	7
2.2.2 Traditionelle Methoden zur Therapie fokaler Knorpeldefekte.....	7
2.2.3 Tissue Engineering Strategien zur Therapie von Knorpeldefekten.....	10
2.3 KNORPEL-TISSUE ENGINEERING .....	10
2.3.1 Zelltypen im Knorpel- Tissue Engineering .....	11
2.3.2 Biomaterialien im Knorpel-Tissue Engineering .....	12
2.3.3 Wachstumsfaktoren im Knorpel-Tissue Engineering.....	17
2.3.4 Fixationsmethoden für Tissue Engineering Konstrukte .....	20
2.4 TIERMODELLE .....	21
2.4.1 Mäuse als ektopes Modell zur Beurteilung der Biokompatibilität und Biodegradation .....	21
2.4.2 Mäuse als ektopes Modell zur Beurteilung der in vivo Chondrogenese .....	21
2.4.3 Das Minipig als orthotopes Tiermodell zur Beurteilung der Knorpelregeneration.....	22
<b>3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
3.1 TIERE .....	23
3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	23
3.1.2 Ektoper Konstruktimplantation in immundefiziente und –kompetente Mäuse.....	23
3.1.3 Orthotope Konstruktimplantation in Minipigs.....	24
3.2 MATERIALIEN .....	27
3.2.1 Puffer und Lösungen.....	27
3.2.2 Komponenten der Hydrogele .....	28
3.2.3 Zellkulturmedien .....	28
3.2.4 Färbelösungen .....	29
3.2.5 Primer.....	29
3.3 METHODEN .....	30
3.3.1 Zellkulturmethoden .....	30
3.3.2 Herstellung von Hydrogelkonstrukten .....	31
3.3.3 Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	33
3.3.4 Histologische Methoden.....	37
3.3.5 Mikro-CT Analyse.....	41
3.3.6 Methoden zur Bestimmung der Adhäsionskraft von Gewebeklebern .....	41
3.3.7 Statistische Analysen.....	43
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
4.1 CHARAKTERISIERUNG VON HMSC UND PMSC .....	44
4.2 BIOKOMPATIBILITÄT HYDROGELKONSTRUKTEN MIT UND OHNE CCT-VERSTÄRKUNG .....	45
4.3 DEGRADATION PORÖS GEDRUCKTER P(AGE/G)HA-SH HYDROGELE IN VIVO .....	47
4.3.1 Degradation von P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen nach 1-, 2- und 4-wöchiger ektoper Implantation.....	47
4.3.2 Zelleinwanderung in gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele.....	48
4.4 REDIFFERENZIERUNG VON PCHO IN NICHT VERSTÄRKTEN UND CCT VERSTÄRKTEN HYDROGELKONSTRUKTEN .....	49

4.5	AUSZUGSMESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER ADHÄSIONSKRAFT VERSCHIEDENER KLEBERVARIANTEN.....	51
4.6	EINFLUSS VON GDF-5 AUF DIE IN VITRO CHONDROGENESE VON MSC.....	53
4.6.1	<i>Einfluss von GDF-5 auf die Chondrogenese von hMSC und pMSC.....</i>	53
4.6.2	<i>Einfluss von GDF-5 auf die ALP-Aktivität und weitere hypertrophe Marker.....</i>	57
4.6.3	<i>Effekte von GDF-5 auf die in vitro Mineralisierung von MSC.....</i>	60
4.6.4	<i>Einfluss von GDF-5 auf die enchondrale Mineralisierung von MSC.....</i>	62
4.7	WIRKUNG VON GDF-5 AUF DIE REDIFFERENZIERUNG VON PCHO .....	71
4.8	EFFEKTE DER BELADUNG VON FIBRINKLEBER MIT GDF-5 AUF DIE INTEGRATION VON KNORPEL-TISSUE ENGINEERING KONSTRUKTEN MIT KNOCHENGeweBE IM EKTOPEN MODELL .....	74
4.9	STUDIE ZUR INTEGRATION VON HYDROGELKONSTRUKTEN IM MINIPIG.....	76
4.10	WEITERFÜHRENDE STUDIE ZUR KONSTRUKTFIXIERUNG IM MINIPIG .....	79
4.10.1	<i>Fixierung der StarPEG/Heparin Hydrogele im chondralen Vollschichtdefekt.....</i>	79
4.10.2	<i>Fixierung porös gedruckter P(AGE/G)HA-SH Hydrogele.....</i>	82
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
5.1	BIOKOMPATIBILITÄT DER BIOINSTRUKTIVEN HYDROGELE .....	84
5.2	REDIFFERENZIERUNG VON PCHO IN BIOINSTRUKTIVEN HYDROGELKONSTRUKTEN .....	85
5.3	MESSUNG DER KLEBERADHÄSIONSKRAFT .....	86
5.4	EINFLUSS VON GDF-5 AUF DIE IN VITRO CHONDROGENESE .....	87
5.5	WIRKUNG VON GDF-5 AUF DIE MINERALISIERUNG IN VIVO.....	88
5.6	EFFEKTE VON GDF-5 AUF DIE INTEGRATION VON TISSUE ENGINEERING KONSTRUKTEN IM EKTOPEN MODELL.....	89
5.7	FIXATION CCT VERSTÄRKTER KONSTRUKTE DURCH FIBRINGEWEBEKLEBER UND BIOGLUE IM ORTHOTOPEN MODELL.....	90
5.8	EINFLUSS VON BIOGLUE® AUF DAS UMLIEGENDE KNORPEL- UND KOCHENGeweBE .....	91
5.9	WEITERFÜHRENDE STUDIE ZUR FIXIERUNG VON HYDROGELKONSTRUKTEN IM ORTHOTOPEN MODELL.....	92
5.10	FAZIT UND AUSBLICK .....	94
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>136</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

### Abkürzungen

---

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μCT/ Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
μg	Mikrogramm
3D	Dreidimensional
Abb	Abbildung
ACAN	Aggrekan
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BMP	Knochen-morphogenetisches Protein (engl. bone morphogenetic protein)
Bp	Basenpaar
BS	Knochenoberfläche (engl. bone surface)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
BV	Knochenvolumen (engl. bone volume)
ca.	Circa
CDMP-1	Knorpelmorphogenetisches Protein 1 (engl. cartilage-derived morphogenetic protein 1)
cDNA	komplementäre DNA (engl. copy-DNA)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL10A1	Kollagen Typ X
COL2A1	Kollagen Typ II
C <sub>T</sub> -Wert	Schwellenwertzyklus (engl. threshold cycle)
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylen- Blau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	engl. enzyme linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
et al.	et alii
EXP	Exponential
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
Fg	Gewichtskraft
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
xg	x-faches der Erdanziehungskraft

GDF-5	Wachstums und Differenzierungsfaktor 5 (engl. growth and differentiation factor 5)
HCL	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin- Eosin
HM6	Heparinkomponente des StarPEG/Heparin Hydrogels
hMSC	humane Mesenchymale Stromazellen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
i.m.	in die Muskulatur (intramuskulär)
i.p.	in die Bauchhöhle (intraperitoneal)
i.v.	in die Vene (intravenös)
IBSP	Integrin bindendes Sialoprotein
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. insulin-like growth factor)
IGFR	Rezeptor für insulinähnlichen Wachstumsfaktor (engl. insulin-like growth factor receptor)
IHH	Indian hedgehog
IPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MACI	Matrix-assoziierte Autologe Chondrozyten Implantation
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
Mmu	Mus musculus
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger-RNA)
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OPN	Osteopontin
P(AGE/G)HA-SH	auf Polyglycidol und Hyaluronsäure basierendes Hydrogel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffer saline)
pCHO	Porzine Chondrozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglykolsäure (engl. polyglycolic acid)
pH	dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PLA	Polymilchsäure (engl. polylactic acid)
p-MMP	Durch Matrix Metalloproteinase abspaltbare Polyethylenglykol-Komponente des StarPEG/Heparin Hydrogels
pMSC	Porzine Mesenchymale Stromazellen
pNNP	p-Nitrophenyl Phosphat
p-SH	Nicht durch Matrix Metalloproteinase abspaltbare Polyethylenglykol-Komponente des StarPEG/Heparin Hydrogels
PTHrP	Parathormon verwandtes Protein (engl. parathyroid hormone-related Protein)
qRT-PCR	Quantitative reverse TranskriptionsPCR
RKI	Robert-Koch-Institut
RLP13	Ribosomales Protein L13
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROI	Auswertebereich (engl. region of interest)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
s.c.	unter die Haut (subcutan)
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (engl. severe combined immunodeficiency)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (engl. transforming growth factor beta)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton <sup>®</sup> X-100	O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]-polyethoxyethanol
Tween <sup>®</sup> -20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheit (engl. unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
β-Gal	β-Galactosidase



# 1 Einleitung

„Im Grunde haben die Menschen nur zwei Wünsche: Alt zu werden und dabei jung zu bleiben.“

*Peter Bamm, Arzt und Journalist*

Durch stetig bessere Lebensbedingungen und den fortschreitenden demografischen Wandel leben wir heute in einer alternden Gesellschaft, in der senile Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewinnen. Dies schließt besonders degenerative Erkrankungen des muskuloskeletalen Apparats ein. So sind entsprechend eines Berichts des statistischen Bundesamts in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut über 50% der weiblichen und 35% der männlichen über 70-Jährigen von Arthrose betroffen, leiden unter starken Schmerzen und teils massiven Einschränkung ihrer Beweglichkeit (RKI 2013). Von „jung geblieben“ kann für diese Menschen leider keine Rede sein. Neben dem individuellen Leiden betroffener Personen, stellen arthrotische Erkrankungen zudem auch eine hohe ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem und die Gesellschaft dar.

Während die altersbedingte Abnutzung der Gelenkflächen als wichtigste systemische Arthroseursache betrachtet wird, entstehen arthrotische Gelenkveränderungen häufig auch als Langzeitfolgen traumatischer Schädigungen der Gelenkstrukturen. Da Knorpelgewebe ein sehr geringes Selbstheilungspotential aufweist, spielen vor allem fokale Knorpeldefekte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Unbehandelte Knorpeldefekte heilen meist nicht aus und auch moderne Therapiemethoden resultieren häufig lediglich im Aufbau eines fibrösen, mechanisch inferioren Regenerationsgewebes. Die daraus entstehende Überbelastung benachbarter Gelenkstrukturen führt zu einer pathologischen Gelenkhomöostase und langfristig zu arthrotischen Veränderungen der Gelenke.

Um die Langzeitfolgen von Knorpeldefekten zu minimieren, wird daher stetig an der Entwicklung neuer Therapiemethoden geforscht. Diese basieren häufig auf dem Prinzip des Tissue Engineering, also der künstlichen Herstellung biologischen Gewebes unter Verwendung von Zellen, Trägermaterialien und Wachstumsfaktoren. Ein aktuell verfolgter Ansatz ist hierbei die Herstellung biogedruckter Tissue Engineering Konstrukte, in denen die komplexen zellulären Strukturen des nativen Knorpelgewebes durch das „Eindrucken“ lebender Zellen optimal nachgebildet werden können. In vitro und in Kurzzeitstudien wurden mit so hergestellten Tissue Engineering Konstrukten bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt, jedoch scheitert die langfristige Regeneration von Knorpeldefekten mittels Tissue Engineering häufig an der unzureichenden Integration der Konstrukte in das umliegende Wirtsgewebe. Die Herausforderung des Knorpel-Tissue Engineering besteht also nicht nur in der Generierung chondrogenese-fördernder Tissue Engineering Konstrukte, sondern auch in der Entwicklung einer optimalen Möglichkeit zur Fixierung und Integration der Konstrukte in Knorpeldefekte. Dies ist besonders für biogedruckte Hydrogelkonstrukte der Fall, die weder durch Annähen noch durch Eingießen oder die press-fit Methode fixiert werden können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher zum einen mit der Untersuchung neuartiger, biodruckbarer Hydrogele und deren Potential zur Unterstützung der Chondrogenese, zum anderen mit der Entwicklung einer geeigneten Methode zur Integration dieser in einen chondralen Vollschichtdefekt. Als Ansatz zur Verbesserung der osteochondralen Integration wurde in dieser Dissertation ein GDF-5 beladener Gewebekleber verwendet. Der Wachstumsfaktor GDF-5 kann die chondrogene Differenzierung sowie die Hypertrophie von Vorläuferzellen fördern. Durch den Einsatz eines GDF-5 beladenen Gewebeklebers sollen in den Defekt einwandernde Progenitorzellen zur

chondrogenen Differenzierung und Mineralisierung angeregt werden, mit dem Ziel, eine mineralisierte Knorpelgewebsschicht zwischen der subchondralen Knochenplatte und dem implantierten Tissue Engineering Konstrukt zu generieren. Durch diese Schicht, die die natürliche Verbindung zwischen hyalinem Knorpel und subchondraler Knochenplatte, die kalzifizierte Knorpelschicht, nachbilden soll, soll die Integration der Konstrukte zur subchondralen Knochenplatte verbessert werden.

Hinsichtlich der neuartigen, biodruckbaren Hydrogelsysteme sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die StarPEG-Heparin und P(AGE/G)HA-SH Hydrogelsysteme biokompatibel?
- Unterstützen die StarPEG-Heparin und P(AGE/G)HA-SH Hydrogelsysteme die Chondrogenese in vitro und in vivo?

Bezüglich der Methode zur Integration der Tissue Engineering Konstrukte in einen chondralen Vollschichtdefekt werden folgende Fragestellungen untersucht:

- Welcher Gewebekleber eignet sich zur Fixierung der neuartigen bioinstructiven Hydrogele?
- Besitzt GDF-5 das Potential, die Mineralisierung von Vorläuferzellen in vivo zu fördern?
- Kann ein GDF-5 beladener Gewebekleber die osteochondrale Integration neuartiger Hydrogelkonstrukte zur subchondralen Knochenplatte verbessern?

Wie vorgegangen wurde, um die jeweiligen Fragestellungen wissenschaftlich zu untersuchen, wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Knorpelgewebe

Gemeinsam mit Knochen stellt Knorpelgewebe den wichtigsten Bestandteil des Stützgewebes im Körper dar. Knorpel übernimmt wichtige Funktionen, wie die Formgebung und Stoßdämpfung und ermöglicht eine reibungsfreie Artikulation im Bereich der Gelenke. Auch während der embryonalen Skelettentwicklung, in deren Verlauf zunächst ein knorpeliges Vorgerüst gebildet wird, spielt Knorpel eine essentielle Rolle. Hauptbestandteil des Knorpelgewebes ist eine mechanisch widerstandsfähige extrazelluläre Matrix, die vom einzigen Zelltyp des Knorpelgewebes, den Chondrozyten, synthetisiert wird (KUETTNER et al. 1982). Im Körper kommen drei verschiedene Formen des Knorpelgewebes vor, die anhand der Zusammensetzung ihrer Extrazellulärmatrix differenziert werden können: hyaliner-, elastischer- und Faserknorpel.

#### 2.1.1 Arten des Knorpelgewebes

Der am häufigsten im Körper vorzufindende Knorpeltyp ist der hyaline Knorpel. Er bildet das knorpelige Vorgerüst im Zuge der Skelettentwicklung und ist im adulten Organismus auf den Gelenkoberflächen, an den Rippen, in der Trachea sowie im Nasenseptum vorhanden (SCHÜNKE 2014). Die extrazelluläre Matrix hyalinen Knorpels zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Kollagen Typ II aus, enthält aber auch geringe Mengen an Kollagen Typ IX und XI. Durch die in die Matrix eingelagerten Proteoglykane weist hyaliner Knorpel eine hohe Wasserbindungskapazität auf, welche ihm eine sehr hohe Druckelastizität verleiht (HERBERHOLD und FELDMANN 2013).

Die extrazelluläre Matrix des elastischen Knorpels ähnelt der des hyalinen Knorpels, mit einem hohen Anteil an Kollagen Typ II. Sie enthält allerdings zudem viele elastische Fasern, die sich aus Fibrillin und Elastin zusammensetzen und maßgeblich für die Verformbarkeit dieses Knorpelsubtyps verantwortlich sind (LÜLLMANN-RAUCH 2012). Weiterhin weist elastischer Knorpel die höchste Zelldichte der verschiedenen Knorpeltypen auf. Elastischer Knorpel findet sich im Körper in den kleinen Bronchen, in der Ohrmuschel und im äußeren Gehörgang, jedoch nicht im Skelettsystem (LIEBICH 2004).

Die dritte Form des Knorpelgewebes, der Faserknorpel, kommt im Annulus fibrosus der Bandscheibe, in den Menisken und in der Schambeinfuge vor. Er ist zellärmer als die beiden anderen Subtypen und enthält einen hohen Anteil an Kollagen Typ I Fasern in seiner extrazellulären Matrix. Diese Kollagenfasern richten sich in Bündeln entsprechend der Zug- und Druckbelastung aus und sind maßgeblich für den straffen, druckresistenten Charakter dieses Knorpeltyps verantwortlich (JUNQUEIRA et al. 2004).

#### 2.1.2 Artikulärer Knorpel

Hyaliner Knorpel, der die Gelenkoberflächen überzieht, wird als artikulärer Knorpel bezeichnet (POOLE et al. 2001). Er ist nicht von einem Perichondrium abgeschlossen und wird über die Synovia mit Nährstoffen versorgt (HALL et al. 2003). Da sich die vorliegende Arbeit mit der Therapie von artikulären Knorpeldefekten beschäftigt, werden die embryonale Entwicklung, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie der Aufbau artikulären Knorpels im Folgenden näher erläutert.

### 2.1.2.1 *Die embryonale Entwicklung des artikulären Knorpels*

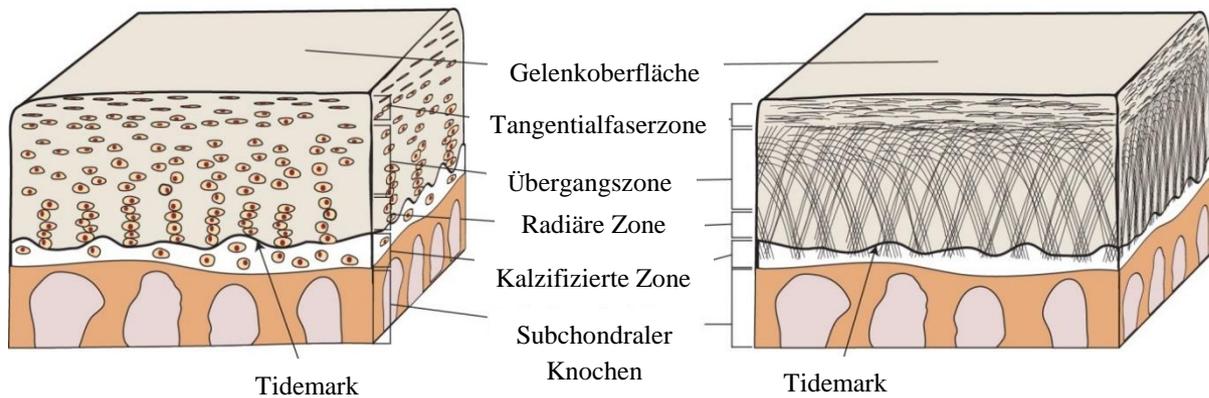
Die embryonale Entwicklung des artikulären Knorpels ist Teil der Extremitätenentwicklung. Diese beginnt mit der Bildung der Extremitätenknospen im lateralen Plattenmesoderm zwischen dem 26. und 28. Tag der embryonalen Entwicklung (O'RAHILLY und GARDNER 1975). Mesenchymale Vorläuferzellen aus dem lateralen Plattenmesoderm und den Somiten wandern zu den Extremitätenknospen, proliferieren stark und beginnen mit der Produktion extrazellulärer Matrixproteine (GOLDRING et al. 2006). Die entstehende Extrazellulärmatrix enthält vorwiegend Kollagen Typ I, Fibronectin, Tenascin sowie Hyaluronsäure und immobilisiert die Vorläuferzellen. Diese beginnen zu kondensieren, wodurch sich die Dichte der Zellen pro Volumen stark erhöht. Die hohe Zelldichte ermöglicht die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, sogenannten gap junctions, zwischen den Vorläuferzellen und fördert so den Austausch kleiner Moleküle und die direkte interzelluläre Kommunikation (COELHO und KOSHER 1991). Die Zellen im Kondensationskern, dem sogenannten Blastem, stellen bei einer sehr hohen Zelldichte ihre Proliferation ein und bilden die Knorpelanlagen (FLICKINGER 1974, OHTA und IWAMOTO 2011). Dieser Zellzyklusarrest ermöglicht den Zellen die weitere Differenzierung zu Prächondroblasten. Sie reprimieren mesenchymale Marker und beginnen mit der Produktion knorpelspezifischer Matrixproteine wie Aggrekan und Kollagen Typ II. Im Übergang zum Chondroblastenstadium treten die Zellen erneut in den Zellzyklus ein, proliferieren und bilden große Mengen knorpelspezifischer Extrazellulärmatrix (DELISE et al. 2000). Durch die Ablagerung der Matrixmoleküle entfernen sich die zunächst sehr dicht gelagerten Zellen immer weiter voneinander. In dieser Phase kommt es zudem zu einer Regression der Gefäße, ein essentieller Schritt für die Bildung reifen Knorpelgewebes (YIN und PACIFICI 2001). Während sich in der Diaphyse des späteren Knochens ein Ossifikationskern bildet und große Teile des transient gebildeten Knorpels über das Stadium der Hypertrophie zu permanentem Knochen umgebaut werden (FERGUSON et al. 1998), entsteht in der angelegten Knorpelmatrize die sogenannte Interzone, die im späteren Verlauf der Skelettentwicklung den Gelenkspalt bildet. Die Interzone wird durch Chondrozyten angelegt, die zunehmend abflachen und vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausbilden (IWAMOTO et al. 2007). Sie besteht aus drei Schichten, von denen die zwei äußeren Schichten eine perichondrium-ähnliche Struktur aufweisen (EDWARDS et al. 1994). In der mittleren Schicht, dem Intermediat, kommt es zunächst zur Nekrose zahlreicher Zellen, was zu einer Trennung der Knorpelmatrize, dem späteren Gelenkspalt, führt (KAN und TABIN 2013, MITROVIC 1978). Der genaue molekularbiologische Mechanismus hinter diesem Vorgang konnte bislang nicht geklärt werden (LONGOBARDI et al. 2015). Auf Grundlage einiger Studien, die zeigen, dass sowohl die Unterdrückung des TGF- $\beta$ /BMP - als auch des Wnt/Catenin- Signalwegs zur knöchernen Fusion von Gelenken führen, wird jedoch ein Zusammenhang mit diesen beiden Signalwegen vermutet (GUO et al. 2004, SHU et al. 2011, SPAGNOLI et al. 2007). Auch die Beteiligung weiterer Wachstumsfaktoren, wie der Familie der insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren und der Proteine des Hedgehog-Signalwegs, an der Entwicklung von Knorpelgewebe, konnte bereits nachgewiesen werden (LUI et al. 2014, YANG et al. 2015). Warum Chondrozyten der Interzone in den oberen Schichten des artikulären Knorpels nicht in die terminale Differenzierung eintreten, sich also nicht bis zum Stadium des hypertrophen Chondrozyten weiterentwickeln, konnte bis heute ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt werden. Diese Tatsache ist jedoch essentiell für die Bildung permanenten artikulären Knorpels.

### 2.1.2.2 *Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im artikulären Knorpel*

Obwohl Chondrozyten die alleinige Zellpopulation im Knorpelgewebe darstellen, machen sie nur 1-2% des Knorpelvolumens aus (STOCKWELL 1967). Das verbleibende Volumen nimmt die von ihnen gebildete Extrazellulärmatrix ein, die über ein sehr hohes Wasserbindungsvermögen verfügt (LINN und SOKOLOFF 1965). Bis zu 80% des Knorpelnassgewichts bildet Wasser, das von Proteoglykanen gebunden wird und maßgeblich zur Druckelastizität des Knorpels beiträgt (HEINEGARD und OLDBERG 1989, KUETTNER et al. 1982). Proteoglykane bestehen aus einem fadenförmigen Kernprotein und daran gebundenen, negativ geladenen Polysaccharidketten (LOHMANDER 1988). Diese Polysaccharidketten, auch Glykosaminoglykane genannt, sind im Bereich des artikulären Knorpels hauptsächlich aus Chondroitinsulfat- oder Keratansulfat-Disaccharideinheiten aufgebaut, deren negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen über osmotische Kräfte Flüssigkeit in das Knorpelgewebe ziehen. Proteoglykane, wie Aggrecan, das häufigste und größte in der extrazellulären Matrix, werden nicht-kovalent an Hyaluronsäureketten gebunden. Dieser Komplex interagiert dann mit den vorhandenen Kollagenfibrillen. Kollagene machen ca. 50% der Trockenmasse des artikulären Knorpels aus und sind somit ein weiterer Hauptbestandteil der Knorpelmatrix (KUETTNER 1992). Als Prokollagene von den Chondrozyten sezerniert, lagern sich reife Kollagenfibrillen nach Abspaltung der nicht-helikalen Amino- und Carboxylpeptide zu dreidimensionalen Netzen zusammen, die entscheidend zu den mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes beitragen. Im artikulären Knorpel kommen die Kollagentypen II, VI, IX, X und XI vor, wobei Kollagen Typ II mit 90-95% den dominierenden Kollagentyp darstellt (BUCKWALTER und MANKIN 1998). Kollagen Typ II ist ein sogenanntes Homotrimer, das aus drei gleichförmigen  $\alpha 1(\text{II})$ -Polypeptidketten besteht. Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix ist nicht im gesamten artikulären Knorpel homogen, sondern variiert zwischen den verschiedenen Zonen des Gelenkknorpels, die im Folgenden näher beschrieben werden.

### 2.1.2.3 *Funktionsweise und zonale Struktur des artikulären Knorpels*

Artikulärer Knorpel ermöglicht im Zusammenspiel mit der Synovialflüssigkeit das reibungsfreie Gleiten von knöchernen Strukturen übereinander und sorgt hierbei für eine gleichförmige Verteilung von Gewichts- und Scherkräften. Um diese Funktionen optimal zu erfüllen, ist artikulärer Knorpel in seiner Struktur und in der Zusammensetzung seiner extrazellulären Matrix angepasst. Er enthält keine verletzbaren Strukturen wie Blut- und Lymphgefäße oder Nervenstränge (BUCKWALTER 1997, DIJKGRAAF et al. 1995). Der Gelenkknorpel kann in vier Zonen unterteilt werden, die sich sowohl hinsichtlich der Zellmorphologie, -zahl und -anordnung als auch hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unterscheiden (CHEN et al. 2001, MOTAVALLI et al. 2014, POOLE et al. 1987, SICZKOWSKI und WATT 1990): die Tangentialfaserzone (auch Oberfläche- oder Superficialzone), die Übergangzone (auch Intermediär- oder Transitionalzone), die mittlere radiäre Zone (auch Basalzone) und die kalzifizierte Zone (Abb.1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch den artikulären Knorpel** (modifiziert nach (ZHANG et al. 2015)).

Die schmale Tangentialfaserzone ist durch eine hohe Dichte an abgeflachten, parallel zur Oberfläche angeordneten Chondrozyten, einen hohen Wassergehalt und einen hohen Gehalt an parallel zur Oberfläche ausgerichteten, dünnen Kollagenfibrillen gekennzeichnet (DIJKGRAAF et al. 1995, JADIN et al. 2005). Chondrozyten in der Übergangszone hingegen weisen eine halbkugelförmige Morphologie auf und liegen in keiner besonderen Anordnung vor (POOLE et al. 1987). Die Kollagenfibrillen dieser Schicht nehmen an Dicke zu und verlaufen ungeordnet (AP GWYNN et al. 2000). Die Menge an Proteoglykanen in der Übergangszone nimmt in Richtung der mittleren radiären Zone zu. Die mittlere radiäre Zone weist die höchste Menge an Proteoglykanen auf (BROOM und POOLE 1983). Sie zeichnet sich durch in geringer Dichte vorliegende, kugelförmige Chondrozyten aus, die sich säulenartig senkrecht zur Gelenkoberfläche anordnen (FEDERICO et al. 2005, HUNZIKER et al. 2002). Die vorhandenen Kollagenfibrillen sind dicker als in den oberen Schichten und verlaufen parallel zur Ausrichtung der Chondrozyten (AP GWYNN et al. 2000). Sie reichen bis in die sogenannte Tidemark, eine dünne Grenzschicht zwischen hyalinem und kalzifiziertem Knorpel, die Kalzium-Phospholipid-Komplex-haltige Lipide enthält und eine ATPase- und Alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität aufweist (BULLOUGH und JAGANNATH 1983, VANWANSEELE et al. 2002). Unterhalb der Tidemark liegt die kalzifizierte Zone. Sie ist durch stoffwechselträge, sehr große Chondrozyten gekennzeichnet, die von einer kalzifizierten Matrix mit hohem Anteil an Kollagen Typ X umgeben sind (BUCKWALTER und MANKIN 1998). Diese unterste Schicht, die die Verbindung zwischen dem darüber liegenden hyalinen Knorpel und der subchondralen Knochenplatte darstellt, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz eines potentiell mineralisierungsfördernden GDF-5 beladenen Gewebeklebers generiert werden.

## 2.2 Ansätze zur Therapie von Knorpeldefekten

Knorpelgewebe ist avaskulär und gilt als stoffwechselträge (BUCKWALTER 1997). Die im Gewebe vorhandenen Chondrozyten befinden sich in einem permanent postmitotischen Zustand und sind von extrazellulärer Matrix umgeben, was die Migration von benachbarten Zellen in den Defektbereich verhindert (KUETTNER et al. 1982). Diese Faktoren tragen maßgeblich dazu bei, dass sich Schädigungen des Knorpelgewebes nicht intrinsisch regenerieren können, sondern vom Körper durch Reparationsgewebe ersetzt werden, das den mechanischen Ansprüchen an Knorpelgewebe nicht gerecht werden kann (MANKIN 1982, MASON et al. 1998, SHAPIRO et al. 1993). Schädigungen des Knorpelgewebes führen deshalb häufig zu chronischen Schmerzen sowie zu Einschränkungen der Bewegungsfreiheit (BUCKWALTER 1997).

### 2.2.1 Arten von Knorpeldefekten

Hinsichtlich ihrer Ätiologie können 2 verschiedene Arten von Knorpeldefekten unterschieden werden: degenerative und fokale Knorpeldefekte. Während fokale Knorpeldefekte nur einen umschriebenen Bereich des Gelenkknorpels betreffen und durch eine mechanische Überbelastung, häufig ein akutes Trauma, entstehen, sind degenerative Knorpeldefekte durch einen flächigen Abrieb von Knorpelgewebe bis hin zur Freilegung des subchondralen Knochengewebes gekennzeichnet (UMLAUF et al. 2010).

Das Fortschreiten degenerativer Knorpeldefekte, die im Rahmen ihres chronischen Verlaufs gewöhnlich mit der Entwicklung einer Arthrose assoziiert sind, kann derzeit nicht kausal therapiert werden. Stattdessen werden Betroffene mit medikamentöser Schmerztherapie und Physiotherapie behandelt, bis ein Gelenkersatz durch eine Totalendoprothese unumgänglich wird.

Bei fokalen Knorpeldefekten wird das Potential zur Selbstregeneration des geschädigten Knorpelgewebes maßgeblich durch die Größe und Tiefe des Defekts beeinflusst (CAHILL 1995, CONVERY et al. 1972). Es muss zwischen chondralen Defekten, die entweder nur die oberen oder alle Schichten (Vollschichtdefekt) des artikulären Knorpels betreffen, und osteochondralen Defekten, die darüber hinaus auch eine Schädigung der subchondralen Knochenplatte beinhalten, unterschieden werden. Während bei chondralen Defekten Chondrozyten als alleinige Zellquelle zur Gewebsregeneration beitragen, kommt es bei Verletzung der subchondralen Knochenplatte zu Einblutungen in den Defekt und so zur Einwanderung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (SHAPIRO et al. 1993). Diese Vorläuferzellen tragen maßgeblich zur Bildung eines Regenerationsgewebes bei, das jedoch nicht die Eigenschaften von hyalinem Knorpel, sondern von Faserknorpel aufweist (O'DRISCOLL und SALTER 1986, SHAPIRO et al. 1993).

Auch der Durchmesser von Knorpeldefekten beeinflusst deren Heilungstendenzen. Sowohl bei Pferden als auch bei humanen Patienten zeigten Knorpeldefekte unter 3mm Durchmesser in mehreren Studien eine vollständige Heilung, während Defekte, die diese Größe überschritten, proportional verschlechterte Heilungstendenzen aufwiesen (CAHILL 1995, CONVERY et al. 1972). Defekte, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr selbständig regenerieren, werden als „critical-size“ oder kritische Defekte bezeichnet. Unbehandelt führen solche kritischen Knorpeldefekte beim Menschen zu einer Überbelastung des umliegenden gesunden Knorpelgewebes und können weitere Gelenkstrukturen wie Menisken oder Bänder schädigen (SCHWEWE et al. 2008). Des Weiteren können unbehandelte fokale Defekte langfristig ebenfalls zur Entwicklung von osteoarthrotischen Knorpelveränderungen führen, da sie eine pathologische Gelenkhomöostase hervorrufen (HJELLE et al. 2002, SCHEWE et al. 2008). Im Gegensatz zu degenerativen Knorpeldefekten bestehen für fokale Knorpeldefekte jedoch viele verschiedene Optionen zur Therapie, von denen die Wichtigsten im Folgenden näher beschrieben werden.

### 2.2.2 Traditionelle Methoden zur Therapie fokaler Knorpeldefekte

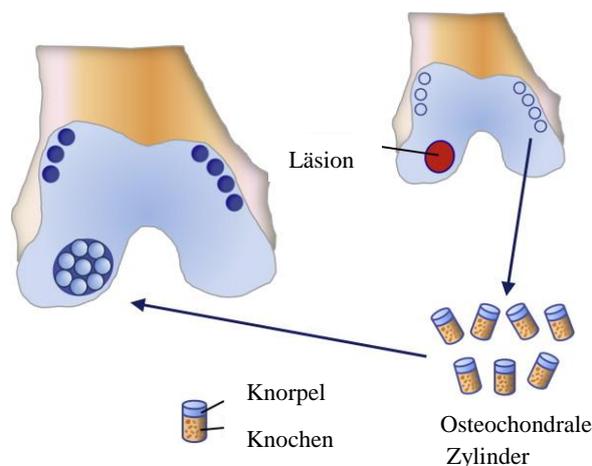
#### 2.2.2.1 *Konservative Behandlung und Debridement*

Unter der konservativen Therapie von Knorpeldefekten versteht man, neben der Gabe von schmerz- und entzündungshemmenden Medikamenten, die Mobilisierung betroffener Gelenke mittels Physiotherapie sowie die Gewichtsreduktion bei übergewichtigen humanen Patienten (AHMED und

HINCKE 2010, SHAH et al. 2007). Diese Form der Therapie ist jedoch nur symptomatisch und führt nachweislich nicht zu verbesserten Heilungsergebnissen (DETTERTLINE et al. 2005, ROSNECK et al. 2007). Der einfachste, bereits 1946 durch MAGNUSON etablierte chirurgische Eingriff zur Therapie von Knorpeldefekten ist das sogenannte Debridement, das im Abtragen und Glätten der Defektränder besteht. Durch das Glätten der Defektränder sollen weitere Schädigungen und Entzündungsreaktionen im Gelenk verhindert und abgestorbenes Knorpelgewebe entfernt werden (CLARKE und SCOTT 2003, LI et al. 2008). Zur Heilung des eigentlichen Defekts trägt diese Therapieform jedoch ebenfalls nur in geringem Maße bei. Daher wird sie häufig mit anderen, invasiveren Therapiemethoden wie beispielsweise der Mikrofrakturierung oder der Mosaikplastik kombiniert.

#### 2.2.2.2 Mosaikplastik

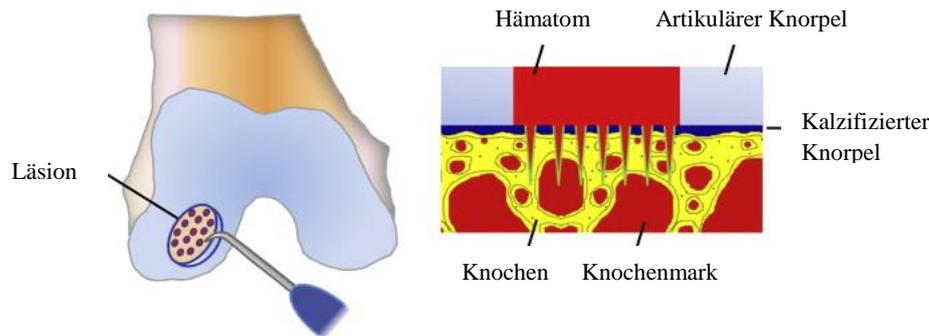
Die Mosaikplastik stellt eine Therapiemethode dar, die in der Humanmedizin vor allem zur Therapie von fokalen osteochondralen Knorpeldefekten im gewichtstragenden Bereich genutzt wird (Abb.2). Hierbei werden aus gesunden, nicht gewichtstragenden Knorpelarealen mehrere osteochondrale Zylinder unterschiedlicher Größe entnommen und in den bestehenden Defekt implantiert (HANGODY et al. 2004, HUNZIKER 2002, MATSUSUE et al. 1993). Je nach Defektgröße und -form kann so eine bis zu neunzigprozentige Füllung des osteochondralen Defekts erreicht werden. Diese Methode zeigt ebenfalls gute bis sehr gute Heilungsergebnisse bei 77% der behandelten Patienten, weist aber den Nachteil auf, dass, um den geschädigten Knorpelbereich zu therapieren, weitere Knorpelschäden an anderer Stelle gesetzt werden müssen. Zudem kann es zu Interferenzproblemen zwischen den Rändern der Spenderzylinder kommen (GUDAS et al. 2006, HANGODY et al. 2004, MATSUSUE et al. 1993).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mosaikplastik (modifiziert nach (HUNZIKER et al. 2015)).**

#### 2.2.2.3 Mikrofrakturierung und Mikrodrilling

Im Rahmen der Mikrofrakturierung, einer Knochenmark-stimulierenden Technik, die 1997 von STEADMAN für die Humanmedizin entwickelt wurde, wird der subchondrale Knochen im Defektbereich an mehreren Stellen penetriert (2-4mm tief) um Einblutungen aus dem subchondralen Knochengewebe zu erhalten (STEADMAN et al. 2003, STEADMAN et al. 1997) (Abb.3). So soll die Einwanderung von Vorläuferzellen in den Defekt gefördert werden, die dann zum Aufbau eines funktionellen Regenerationsgewebes beitragen können.

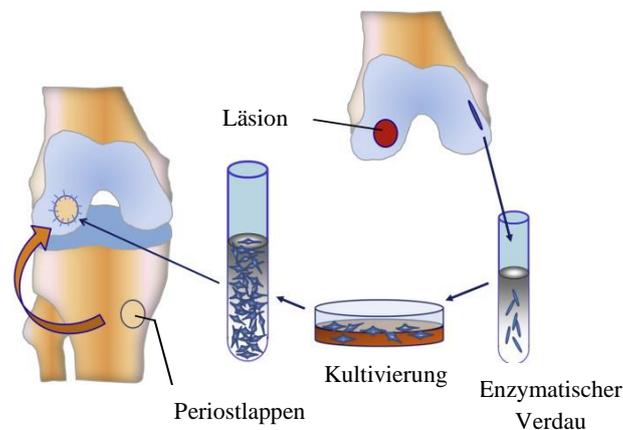


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mikrofrakturierung** (modifiziert nach (HUNZIKER et al. 2015)).

Kurzfristig wurden mittels Mikrofrakturierung bei 60-80% der Patienten, besonders bei jungen Patienten mit einer Defektgröße von bis zu 2,5cm<sup>2</sup>, gute bis sehr gute Ergebnisse erzielt (NEHRER und MINAS 2000, STEINWACHS et al. 2008). In den letzten Jahren wurde die Technik der Mikrofrakturierung zum sogenannten Mikrodrilling weiterentwickelt, bei dem die subchondrale Knochenplatte mittels eines sehr dünnen Bohrers perforiert wird (HUNZIKER et al. 2015). Diese Technik ist besser kontrollier- sowie reproduzierbar und mit einem geringeren Trauma verbunden (CHEN et al. 2009, HOEMANN et al. 2007). Beide Methoden resultieren jedoch meist nicht im Aufbau eines hyalinen Regenerationsgewebes, sondern in einem faserknorpelähnlichen Regenerat.

#### 2.2.2.4 Autologe Chondrozyten Implantation (ACI)

Bereits kurz nachdem die Isolation von Chondrozyten zum ersten Mal gelang (SMITH 1965), wurden erste Tierstudien durchgeführt, in deren Rahmen Chondrozyten in Knorpeldefekte implantiert wurden (CHESTERMAN und SMITH 1968). Seit 1994 wird die ACI auch in der Humanmedizin eingesetzt (BRITTBERG et al. 1994). Bei dieser Technik wird in einem ersten Eingriff zunächst Knorpelgewebe aus gesunden Knorpelbereichen entnommen. Dieses Gewebe wird anschließend verdaut und die gewonnenen Chondrozyten *in vitro* expandiert. In einem zweiten Eingriff wurde bei Einführung dieser Methode ein Periostlappen vom lateralen Anteil der Tibia resiziert und auf dem Defekt vernäht (Abb. 4). Als Weiterentwicklung wird derzeit eine Kollagenmembran zur Abdeckung des Defekts verwendet und so eine Tasche geschaffen, in welche die expandierten Chondrozyten eingebracht werden können (BRITTBERG et al. 1994, OSSENDORF et al. 2011).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der ACI** (modifiziert nach (HUNZIKER et al. 2015)).

Durch den zweifachen operativen Eingriff und die zusätzlich gesetzten Knorpelläsionen ist die ACI mit einer langen Rekonvaleszenz verbunden. Zudem besteht das Risiko, dass die expandierten Chondrozyten nicht im Defekt verbleiben oder ungleichmäßig in diesem verteilt sind (AHMED und HINCKE 2010, DRIESANG und HUNZIKER 2000). Des Weiteren zeigen länger expandierte Chondrozyten einen veränderten Phänotyp (siehe 2.2.3.3), weshalb die ACI häufig in der Bildung von fibrösem Regenerationsgewebe statt hyalinem Knorpelgewebe resultiert. Dennoch liefert diese Therapiemethode zufriedenstellende Ergebnisse bei 80-90% der Patienten im Bezug auf Schmerzreduktion und funktionelle Wiederherstellung

### **2.2.3 Tissue Engineering Strategien zur Therapie von Knorpeldefekten**

Eine weiterentwickelte Form der ACI ist die sogenannte Matrix assoziierte autologe Chondrozytenimplantation (MACI). Diese zählt zu den Tissue Engineering Verfahren (siehe 2.3) und unterscheidet sich von der klassischen ACI durch die Verwendung eines Trägermaterials für die Chondrozyten und gegebenenfalls eines Wachstumsfaktors (AHMED und HINCKE 2010, BEHRENS et al. 1999, DAI und CAI 2012). Der Ablauf des ersten operativen Eingriffs entspricht dem Vorgehen bei der klassischen ACI. Nach der Expansion werden die Zellen in einem zweiten Eingriff jedoch nicht direkt in den Defekt gespritzt. Stattdessen werden die Zellen mit einem Trägermaterial, beispielsweise einem Kollagenschwamm oder Hydrogel, vermischt oder mehrere Tage auf einem Trägermaterial kultiviert und anschließend mit diesem in den Defekt implantiert (JACOBI et al. 2011). Die MACI bietet dadurch im Vergleich zur ACI den Vorteil, dass kein Periostlappen gewonnen und über den Defekt genäht werden muss. So wird die Dauer der Operation verkürzt, das zusätzliche Trauma am Tibiakopf vermieden und die Operation kann endoskopisch durchgeführt werden (ABELOW et al. 2006). Ähnlich der klassischen ACI resultiert auch die MACI in einer funktionellen und symptomatischen Verbesserung post OP, die in Langzeitstudien auch noch nach 15 Jahren nachweisbar ist (D'ANCHISE et al. 2005, GILLE et al. 2016, RICHARDSON et al. 1999). Trotz der genannten Vorteile der MACI konnten in vergleichenden Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Therapiemethoden nachgewiesen werden (BARTLETT et al. 2005, DIBARTOLA et al. 2016, ZEIFANG et al. 2010). Die MACI zeigte jedoch bessere Resultate als die Mikrofrakturierung (MISTRY et al. 2017, SARIS et al. 2014).

Da alle der beschriebenen Therapieoptionen zwar das Heilungsergebnis verglichen zu unbehandelten Knorpeldefekten verbessern, jedoch nicht in der Wiederherstellung eines hyalinen Knorpelgewebes resultieren, wird weiter nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht. Einige Tissue Engineering Materialien werden bereits in der Klinik angewendet und liefern vielversprechende Resultate (ANDERSON et al. 2017, BECHER et al. 2017). Dieses Forschungsfeld bietet aber noch ein sehr großes Potential zur Entwicklung besserer Therapieoptionen für artikuläre Knorpeldefekte und wird daher im Folgenden detailliert vorgestellt.

## **2.3 Knorpel-Tissue Engineering**

Als Tissue Engineering wird die künstliche Herstellung von biologischen Geweben mit Hilfe verschiedener Trägermaterialien, in vitro kultivierter Zellen und Wachstumsfaktoren bezeichnet (LANGER und VACANTI 1993). Tissue Engineering wird in vielen Bereichen der medizinischen Forschung wie beispielsweise der Kardiologie oder der Neurologie genutzt. Im Folgenden wird jedoch nur auf das Tissue Engineering im Bereich der Knorpelregeneration näher eingegangen.

### 2.3.1 Zelltypen im Knorpel- Tissue Engineering

Im Rahmen des modernen Knorpel-Tissue Engineering werden verschiedenste Zelltypen wie Chondrozyten (NIEMIETZ et al. 2014), MSC (DEXHEIMER et al. 2012), Myoblasten (GU et al. 2013) oder IPS (TSUMAKI et al. 2015) zur Generierung von Knorpelgewebe verwendet. Da Chondrozyten und MSC die beiden am häufigsten für das Knorpel-Tissue Engineering genutzten Zellquellen darstellen, werden diese nachfolgend näher charakterisiert.

#### 2.3.1.1 Chondrozyten

Chondrozyten stellen den einzigen im adulten Knorpelgewebe vorkommenden Zelltyp dar. Erstmals wurden sie von MOSCANA 1952 aus embryonalen Knorpelgewebe isoliert. Wenig später gelang SMITH und KAWIAK mit Hilfe bakterieller Kollagenasen auch die Isolation reifer Chondrozyten (KAWIAK et al. 1965, SMITH 1965). Chondrozyten können im adulten Organismus aus artikulärem Knorpel, aus den Bandscheiben oder aber auch aus der Nasenscheidewand gewonnen werden. Frisch isolierte Chondrozyten zeigen einen runden bis polygonalen Phänotyp mit stark granulärem Zytoplasma (ANDERSON et al. 1970). Sie betreiben gewöhnlich Biosynthese von Kollagen Typ II sowie von knorpelspezifischen Proteoglykanen und Glykosamio glykanen (BASSLEER et al. 1986, KUETTNER et al. 1982). Durchgeführte Studien haben jedoch gezeigt, dass das Expressionsprofil der gewonnenen Chondrozyten abhängig von dem zur Isolation verwendeten Gewebe variiert. So produzieren Knorpelzellen aus der Bandscheibe andere Matrixmoleküle als Knorpelzellen aus artikulärem Knorpel und auch Chondrozyten aus unterschiedlichen Schichten des artikulären Knorpels weisen eine sich unterscheidende Matrixproduktion auf (QUINN et al. 2013, ROGERS et al. 2006, SICZKOWSKI und WATT 1990).

Da nur geringe Mengen autologen artikulären Knorpels gewonnen werden können und Chondrozyten lediglich ca. 1-2% des artikulären Knorpelgewebes ausmachen, müssen Chondrozyten häufig in vitro expandiert werden, um sie für das Tissue Engineering zu nutzen. Chondrozyten proliferieren in Monolayerkultur jedoch nur langsam und zeigen bei zunehmender Kulturdauer eine fortschreitende Dedifferenzierung, verlieren also die Fähigkeit zur Produktion von Kollagen Typ II und anderer knorpelspezifischer Matrixproteine (HOLTZER et al. 1960, VON DER MARK et al. 1977). Zwar können expandierte Chondrozyten durch Kultivierung unter chondrogenen Bedingungen (3D-Kultur; TGF- $\beta$ ) wieder redifferenziert werden (BARLIC et al. 2008), ihr ursprünglicher Phänotyp wird jedoch nicht vollständig wiederhergestellt. Dennoch lieferte der Einsatz von Chondrozyten in Kombination mit verschiedenen Biomaterialien bessere Heilungsergebnisse als die zellfreien Kontrollgruppen hinsichtlich der Defektfüllung und der Struktur des gebildeten Regenerationsgewebes (HUNZIKER 2002, YU et al. 2010). Daher stellen Chondrozyten trotz ihrer geringen Verfügbarkeit und ihres instabilen Phänotyps eine vielversprechende Zellquelle für das Tissue Engineering dar.

#### 2.3.1.2 Mesenchymale Stromazellen (MSC)

Mesenchymale Stromazellen sind Vorläuferzellen des Binde- und Stützgewebes, die aus dem Mesoderm entspringen. Während der embryonalen Entwicklung tragen sie maßgeblich zum Aufbau des Skelettsystems bei, im adulten Organismus liegen sie in diversen Geweben wie dem Knochenmark (KREBSBACH et al. 1999, PITTENGER et al. 1999), dem Fettgewebe (ZUK et al. 2001), dem Periost (NAKAHARA et al. 1991) oder dem Muskelgewebe (JACKSON et al. 1999) vor. Aufgrund ihrer Fähigkeit, in verschiedene mesodermale Gewebe zu differenzieren, wurden MSC schon früh als

potentielle Zellquelle für die regenerative Medizin sowohl im Bereich der Knorpelregeneration als auch auf Gebieten wie der Therapie von Knochendefekten erkannt (BIANCO et al. 2001, CAPLAN 1991, RICHTER und DIEDERICHS 2009). Erstmals beschrieben wurden MSC von Friedenstein in den 1960er Jahren, der sie aufgrund ihrer Plastikadhärenz von anderen Zellen des Knochenmarks separierte (FRIEDENSTEIN et al. 1968). Wenige Jahre später definierte er sie als nicht hämatopoetische Zellpopulation, die durch plastikadhärente, spindelförmige und zur Bildung von klonogenen Kolonien fähige Zellen (colony-forming unit fibroblastic (CFU-F)) gekennzeichnet ist (FRIEDENSTEIN et al. 1970). Im Jahr 2005 wurde durch die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy, ISCT) die Bezeichnung MSC als universelle Nomenklatur für diesen Zelltyp vorgeschlagen (HORWITZ et al. 2005). Im folgenden Jahr wurden ebenfalls durch die ISCT Minimalkriterien definiert, die Zellen aufweisen müssen, um als MSC bezeichnet zu werden (DOMINICI et al. 2006). Zu diesen Minimalkriterien zählt zum einen die Plastikadhärenz, zum anderen die Fähigkeit der Zellen *in vitro* in die chondrogene, adipogene und osteogene Richtung zu differenzieren. Zudem müssen MSC das folgende Oberflächenmarkerprofil aufweisen: positiv für die Marker CD73, CD90 und CD105 und negativ für die Marker CD14, CD19, CD31, CD34 und CD45.

Für das Knorpel-Tissue Engineering bieten MSC den Vorteil, dass sie aus verschiedenen Geweben autolog vom Patienten gewonnen und *in vitro* expandiert werden können. Sie weisen im Vergleich zu Chondrozyten eine höhere Proliferationsrate auf und neigen im Gegensatz zu diesen nicht so stark zur Seneszenz (DEXHEIMER et al. 2012, NAZEMPOUR und VAN WIE 2016). Zudem sind MSC multipotent, können also sowohl in die chondrogene als auch in die osteogene Richtung differenzieren, was sie auch für die Therapie von osteochondralen Defekten attraktiv macht (BERNINGER et al. 2013). Jedoch neigen MSC *in vitro* zur Bildung hypertrophen Knorpels, verbunden mit einer gesteigerten Produktion des Enzyms Alkalische Phosphase (ALP), der vermehrten Einlagerung von Kollagen X und der gesteigerten Expression der Matrixmetalloproteinase 13 (MMP 13) (PELTTARI et al. 2006, WINTER et al. 2003). Auch die ektope Implantation von MSC-haltigen Sphaeroiden nach chondrogener Vordifferenzierung, resultierte stets in deren Kalzifizierung und Vaskularisierung (PELTTARI et al. 2006). Die eingesetzten MSC entwickeln sich somit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht wie angestrebt zu stabilen artikulären Chondrozyten, sondern treten in die terminale Differenzierung ein, was *in vivo* langfristig zu einer unerwünschten Verknöcherung der Konstrukte führt. Obwohl bereits viele verschiedene Methoden zur Unterdrückung der terminalen Differenzierung von chondrogen differenzierten MSC genutzt wurden, konnte diese zwar durch manche Differenzierungsprotokolle reduziert, jedoch nicht vollständig verhindert werden (FISCHER et al. 2014, MUELLER et al. 2010). Daher spricht vieles laut RICHTER (2007) für die *in situ* Rekrutierung wirtseigener MSC in den Defektbereich, um diese gegebenenfalls zur Besiedelung eines zellfrei implantierten Tissue Engineering Konstrukts anzuregen.

Neben den verwendeten Zellen trägt das zum Herstellen eines Tissue Engineering Konstrukts verwendete Biomaterial maßgeblich zu dessen Potential die Knorpelregeneration zu fördern bei. Die wichtigsten Biomaterialien im Knorpel-Tissue Engineering werden daher im Folgenden vorgestellt.

### **2.3.2 Biomaterialien im Knorpel-Tissue Engineering**

Auf dem Gebiet der Knorpelregeneration werden für das Tissue Engineering verschiedenste Biomaterialien verwendet. Im Review von GAISSMAIER et al. (2003) werden diese in natürliche und

synthetische Biomaterialien untergliedert. Unabhängig von ihrem Ursprung müssen Biomaterialien bestimmte Anforderungen erfüllen, wie beispielsweise eine ausreichende biomechanische Stabilität und eine hohe Biokompatibilität (HUNZIKER 1999). Auch die Porosität (Ermöglichung der Zellmigration), die Möglichkeit zur Zelladhäsion sowie die Fähigkeit zur Bindung und Freisetzung von Signalmolekülen sind laut HUNZIKER (2002) wichtige Eigenschaften, die ein für das Knorpel-Tissue Engineering geeignetes Material aufweisen muss. Bisher konnte kein Material entwickelt werden, das allen genannten Ansprüchen vollständig gerecht wird. Eine Auswahl der dennoch im Knorpel-Tissue Engineering verwendet Trägermaterialien wird nachfolgend näher beschrieben.

### 2.3.2.1 Biomaterialien aus natürlichen Grundsubstanzen

#### Kollagene

Eine im Rahmen des Knorpel-Tissue Engineerings häufig genutzte natürliche Grundsubstanz sind Kollagene. Sie gelten als hochkonserviert, sind vom Körper abbaubar und weisen eine hohe Biokompatibilität auf (LUBIATOWSKI et al. 2006, YAMAOKA et al. 2006). Kollagen-basierte Trägermaterialien wurden in vielen verschiedenen Formen entwickelt (Schwamm, Hydrogel, Membran) und bereits vielfach in der vorklinischen Forschung getestet (DICKHUT et al. 2008, HAAPARANTA et al. 2014, YUAN et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sie die Viabilität von Chondrozyten unterstützen (DICKHUT et al. 2008). Zudem wurde nachgewiesen, dass Chondrozyten ihren Phänotyp bei Kultivierung auf Kollagenträgern beibehalten (YATES et al. 2005). Einige auf Kollagenen basierende Trägermaterialien sind bereits kommerziell erhältlich (MACI<sup>®</sup>, Optimaix<sup>®</sup>; Neocart<sup>®</sup>), Kollagenmembranen (ChondroGide<sup>®</sup>) werden im Rahmen der ACI/MACI bereits beim Menschen eingesetzt (CUELLAR et al. 2016, ZHANG et al. 2016).

#### Agarose und Alginat

Weitere natürliche Grundsubstanzen, die zur Herstellung von Trägermaterialien genutzt werden, sind Agarose und Alginat. Agarose ist ein aus Rotalgen gewonnenes Polysaccharid (D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose), bei Alginat handelt es sich um ein lineares Copolymer aus b-D-Mannuronsäure und a-L-Guluronsäure, das aus Braunalgen stammt. Beide Materialien gelieren unter Anwesenheit von Ca<sup>++</sup> spontan und können durch Zusatz von Ca<sup>++</sup>- Gelatoren wieder aufgelöst werden, was die Wiedergewinnung von in den Gelen kultivierten Zellen ermöglicht (HAUSELMANN et al. 1992). Sie werden bereits seit langem als Trägermaterialien für in vitro Studien genutzt (BENYA und SHAFFER 1982, YASUMOTO et al. 1980) und lieferten hierbei sehr gute Resultate. So konnte für beide Materialien nachgewiesen werden, dass sie die Aufrechterhaltung des Phänotyps von Chondrozyten sowie die Produktion knorpeltypischer Extrazellulärmatrix unterstützen (BENYA und SHAFFER 1982, BONAVENTURE et al. 1994). In vivo zeigten die beiden Trägermaterialien jedoch eher schlechte Resultate (HUNZIKER 2002) und führten zu Fremdkörperreaktionen bei den Wirtstieren, weshalb diese Trägermaterialien bislang nicht zur Knorpelregeneration in der Humanmedizin verwendet werden (FRAGONAS et al. 2000, SONG et al. 2015).

#### Fibrin

Die Reaktion von Fibrinogen mit Thrombin zu einer dreidimensionalen Fibrinmatrix sowie der Abbau dieser Matrix durch körpereigene Enzyme laufen physiologisch im Rahmen der Wundheilung ab und spielen auch bei Einblutungen in osteochondrale Knorpeldefekte eine Rolle (REDDI 1998). Durch seine vollständige biologische Abbaubarkeit und die Möglichkeit es von jedem Empfänger autolog zu gewinnen, stellt Fibrin ein für das Tissue Engineering attraktives Material dar (HAISCH et al. 2000).

Einen weiteren Vorteil des Fibrins bietet dessen hohe Adhäsionsfähigkeit (AHMED et al. 2008). Es ist nachgewiesen, dass MSC und Chondrozyten in Fibrinhydrogel chondrogen differenzieren können (DIEDERICHS et al. 2012, EYRICH et al. 2007, IM et al. 2005) und in diversen in vivo Studien konnten gute Resultate mit zellbeladenen Fibringelen erzielt werden. Als Nachteil von Fibrin ist dessen mangelnde mechanische Stabilität zu betrachten. Zudem führte der Einsatz von exogenem Fibrin in einigen Studien zu adversen Wirtsreaktionen (HAISCH et al. 2000, KAWABE und YOSHINAO 1991). Fibrin wird dennoch bereits in der klinischen Therapie von Knorpeldefekten eingesetzt, einerseits als selbständiges Trägermaterial, andererseits zur Fixierung anderer Tissue Engineering Konstrukte (CHERUBINO et al. 2003, RONGA et al. 2004). Es ist kommerziell unter anderem als Tisseel® Gewebekleber erhältlich.

### Hyaluronsäurematrices

Hyaluronsäure ist ein natürlicherweise im Knorpelgewebe vorkommendes Glykosaminoglykan. Unmodifiziert weist sie eine sehr hohe Biokompatibilität (GOA und BENFIELD 1994) und antiphlogistische Eigenschaften auf (VAN SUSANTE et al. 2001). Um ein für das Knorpel-Tissue Engineering geeignetes Trägermaterial aus Hyaluronsäure zu generieren, muss diese jedoch modifiziert werden (GOA und BENFIELD 1994). Meist wird dies durch Veresterung der Hyaluronsäure mit verschiedenen Alkoholen erreicht, was die Biokompatibilität der erhaltenen Matrix aber häufig verschlechtert (BARBUCCI et al. 2000, KNUDSON et al. 2000). Dennoch wurden in Hyaluronsäure-basierten Tissue Engineering Konstrukten sowohl in vitro als auch in vivo vielversprechende Resultate erzielt. So berichtet GRIGOLO et al. (2001) von der Ausbildung eines hyalinartigen Regenerationsgewebes. Allerdings weisen Hyaluronmatrices eine relativ geringe mechanische Stabilität auf und können daher ohne Verstärkung nicht für die Therapie größerer Knorpeldefekte genutzt werden. Daher wird versucht, durch andere Modifikationen der Hyaluronsäure, beispielsweise durch Kombination mit anderen Biomaterialien, die Funktionalität und Biokompatibilität von Hyaluronsäure basierten Tissue Engineering Materialien zu verbessern (BULPITT und AESCHLIMANN 1999, HUNZIKER 2002). Hyaff-11® ist ein kommerziell erhältliches, aus Hyaluronsäure hergestelltes Tissue Engineering Material, das auch bereits besiedelt mit Chondrozyten erworben werden kann (Hyalograft®).

### *2.3.2.2 Biomaterialien aus synthetischen Grundsubstanzen*

Im Rahmen des Knorpel-Tissue Engineering genutzte synthetische Materialien basieren häufig auf Milchsäure (polylactic acid; PLA), Glykolsäure (polyglycolic acid; PGA) oder Ethylenglykol (PEG) (KANG et al. 2009, SPAIN et al. 1998, SRIDHAR et al. 2015). Mechanisch stabileren Trägermaterialien, die zur Verstärkung von Hydrogelen oder zur Therapie von osteochondralen Defekten genutzt werden, liegen oft Verbindungen aus Polyurethan, Polyethylenterephthalat, Polytetrafluorethylen oder Polycaprolacton zugrunde (EMANS et al. 2013, HANFF et al. 1990, MESSNER 1993, MINTZ und COOPER 2014).

Neben der nicht tierischen Herkunft der Grundsubstanzen ist ein wesentlicher Vorteil aller synthetischen gegenüber natürlichen Trägermaterialien die höhere biomechanische Stabilität. Diese kann bei synthetischen Materialien durch die Wahl des zugrunde liegenden Monomers, den Grad der Quervernetzung sowie der Faserstärke modifiziert werden (MOGHADAM und PIOLETTI 2015, SPAIN et al. 1998). Zudem ermöglichen synthetische Materialien die Herstellung von porösen oder schwammartigen Strukturen, was die Migration von Zellen in die Trägermaterialien fördert. Sowohl in

vitro als auch in vivo zeigten einige synthetische Trägermaterialien das Potential zur Unterstützung der Chondrogenese verschiedener Zelltypen (BARRON et al. 2015, LIAO et al. 2015). Der Einsatz des derzeit kommerziell erhältliche Produkts BioSeed<sup>®</sup>, bestehend aus PGA, PLA und Polydioxanone, resultierte sogar in langfristig besseren Heilungsergebnissen bei der Therapie von Knorpeldefekten im Menschen (OSSENDORF et al. 2007). Nachteile von synthetischen Trägermaterialien sind jedoch ihre häufig schlechte biologische Abbaubarkeit und die Biokompatibilität ihrer Abbauprodukte (SITTINGER et al. 1996, SPAIN et al. 1998). Zudem wurde eine hohe Diffusion von neu synthetisierten Matrixmolekülen aus synthetischen Trägermaterialien sowie ein instabiler Chondrozytenphänotyp bei Kultivierung auf solchen beobachtet (GAISSMAIER et al. 2003, GRAD et al. 2003). Weltweit wird weiterhin von vielen Forschergruppen an der Entwicklung neuer und der Weiterentwicklung bereits bekannter synthetischer Materialien gearbeitet, um ein für das Knorpel-Engineering optimal geeignetes Trägermaterial zu generieren. Hierbei werden auch zunehmend Biomaterialien aus kombinierten Grundsubstanzen erforscht.

### 2.3.2.3 *Biomaterialien aus kombinierten Grundsubstanzen*

Da ein Biomaterial, das alle fürs Knorpel-Tissue Engineering notwendigen Eigenschaften aufweist bislang noch nicht entwickelt wurde, werden immer häufiger natürliche und synthetische Grundsubstanzen miteinander kombiniert, um die Vorteile beider zu nutzen (CHEN et al. 2004, MA et al. 2002, MARIJNISSEN et al. 2000). So werden natürliche Biomaterialien, bei denen es sich zum Großteil um mechanisch wenig stabile Hydrogele handelt, häufig mit mechanisch widerstandsfähigen, porösen Scaffolds aus synthetischen Materialien verstärkt (AMBROSIO et al. 1998, BAKARICH et al. 2014, LIAO et al. 2013, MINTZ und COOPER 2014). Ein solches synthetisches Biomaterial stellt beispielsweise das von der Firma CellCoTec (CCT) entwickelte, schwammartige Scaffold dar, das aus Polyethylenoxidterephthalat und Polybutylenterephthalat besteht und mit natürlichen und synthetischen Hydrogelen beladen werden kann. Ein weiterer Ansatz ist die Generierung mechanisch stärker belastbarer Hydrogele durch die Vernetzung natürlicher und synthetischer Komponenten miteinander (DASHTDAR et al. 2015, VISSER et al. 2015). So wird Hyaluronsäure häufig mit synthetischen Komponenten zu einem mechanisch stabileren Hydrogel vernetzt, zum Beispiel mit Polyglycidol. Durch die Kombination mit künstlichen Materialien werden aber auch natürliche Grundsubstanzen für das Knorpel-Tissue Engineering erschlossen, die alleine nicht zur Herstellung von Trägermaterialien geeignet sind, wie beispielsweise im Falle eines auf Heparin und sternförmigem PEG basierenden Hydrogels, dem StarPEG-Heparin Hydrogel (TSURKAN et al. 2013).

Eine Weiterentwicklung, die Biomaterialien aller Arten betrifft, ist das Bestreben diese biodruckbar zu gestalten. Durch die Möglichkeit des Biodruckens können die unterschiedlichen Zelldichten und -anordnungen der verschiedenen Knorpelschichten in Tissue-Engineering Konstrukten nachgebildet werden, mit dem Ziel, die Ausbildung eines knorpelähnlichen Regenerationsgewebes in den Konstrukten noch weiter zu fördern (ABBADESSA et al. 2016, MARKSTEDT et al. 2015). In den letzten Jahren wurde zudem versucht das Potential von Tissue Engineering Konstrukten zur Förderung der Chondrogenese durch das Aufrüsten der Biomaterialien natürlicher oder synthetischer Herkunft mit lokalen Wachstumsfaktoren bzw. Nanopartikeln zusätzlich zu steigern (MATURAVONGSADIT et al. 2016, PONNURANGAM et al. 2014, TSURKAN et al. 2013). Welche Biomaterialien im Rahmen der vorliegenden Dissertation eingesetzt wurden wird im Folgenden näher erläutert.

#### 2.3.2.4 *Biomaterialien dieser Dissertation*

Für die durchgeführten Studien wurden sowohl natürliche als auch halbsynthetische und synthetische Biomaterialien verwendet. Zur Herstellung der Tissue-Engineering Konstrukte wurden 2 halbsynthetische, biodruckbare Hydrogelsysteme genutzt, die in einigen Versuchen durch ein synthetisches Scaffold mechanisch verstärkt wurden.

Das StarPEG-Heparin Hydrogel setzt sich aus 2 Komponenten, einem sternförmigen Polyethylenglykol (StarPEG) und einem, mit 6 Maleimidgruppen aufgerüsteten Heparin (HM6) zusammen (siehe Anhang-Abb.1). Die beiden Komponenten reagieren über eine sogenannte Michaels-Addition, genauer über einen nukleophilen Angriff einer Thiol-Gruppe des HM6 am StarPEG miteinander. Das StarPEG trägt sogenannte Peptidlinker an den sternförmigen Ausläufern, die dazu dienen, die Verbindung der beiden Komponenten für Matrix Metalloproteinasen (MMPs) spaltbar zu gestalten (TSURKAN et al. 2013). Zudem bietet das StarPEG-Heparin Hydrogel die Möglichkeit durch die Beladung mit Wachstumsfaktoren und weiteren bioaktiven Peptiden die Chondrogenese eingebetteter Zellen zu modifizieren (HESSE et al. 2017).

Das P(AGE/G)HA-SH Hydrogel besteht aus den beiden Hauptkomponenten Hyaluronsäure und Polyglycidol (siehe Anhang-Abb. 2). Es geliert über die UV-Licht katalysierte Radikalisierung einer SH-Gruppe der Hyaluronsäurekomponente, die dann kovalent an die Polyglycidolkomponente bindet (siehe Anhang-Abb. 3). Durch die Kombination der Hyaluronsäure mit Polyglycidol entsteht ein Hydrogel, das verglichen mit einem reinen Hyaluronsäure Hydrogel, eine höhere mechanische Stabilität aufweist und zum dreidimensionalen Drucken zellhaltiger Tissue Engineering Konstrukte geeignet ist. Zur mechanischen Verstärkung der beiden Hydrogelsysteme wurde das von der Firma CellCoTec entwickelte CCT-Scaffold, bestehend aus den Kunststoffen Polyethylenoxidterephthalat und Polybutylenterephthalat, verwendet. Es weist eine gitternetzartige Struktur mit einer Porengröße von 0,1mm auf und kann innerhalb eines Jahres zu 90% durch den Organismus degradiert werden. Das Scaffold kann sowohl zur Therapie osteochondraler, als auch chondraler Defekte genutzt und mit zellfreien oder zellhaltigen Hydrogelen beladen werden.

Für die Fixierung der Tissue Engineering Konstrukte wurden 2 kommerziell erhältliche Gewebekleber (Tisseel®; BioGlue®) und eine Kollagenmembran (Chondrogide®) zum Übernähren des Defektes eingesetzt. Bei Tisseel® handelt es sich um einen Zwei-Komponenten-Kleber, der seine Klebekraft bei der Zusammenführung der beiden natürlichen Substanzen Fibrin und Thrombin entwickelt. Fibrinhaltige Gewebekleber werden bereits über längere Zeit im Knorpel-Tissue Engineering eingesetzt (siehe 2.3.2.1). Der Gewebekleber BioGlue® ist halbsynthetisch und basiert auf einer Bovinen Serum Albumin und einer Glutaraldehyd Komponente. Er wird bereits erfolgreich in der Gefäßchirurgie genutzt (TANSLEY et al. 2006) und zeichnet sich dort vor allem durch seine gute Funktionalität bei „feuchten“ Oberflächen aus. Auf dem Gebiet des Knorpel-Tissue Engineering fand BioGlue® bislang keine Verwendung.

Sowohl die Tissue Engineering Konstrukte als auch die genutzten Gewebekleber wurden in einigen Teilversuchen mit Wachstumsfaktoren bestückt. Lokale oder medium-assoziierte Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind essenziell für das Knorpel-Tissue Engineering und werden daher nachfolgend näher erläutert.

### 2.3.3 Wachstumsfaktoren im Knorpel-Tissue Engineering

Neben Zellen und Biomaterialien stellen Wachstumsfaktoren die dritte Säule des Tissue Engineerings dar. Es wurden bereits mehrere Wachstumsfaktoren identifiziert, die den Aufbau und den Erhalt von Knorpelgewebe fördern. Diese Faktoren werden daher Kulturmedien zugesetzt oder direkt in Trägermaterialien ein- oder auf diese aufgebracht um die Chondrogenese in Tissue Engineering Konstrukten zu fördern. In neueren Ansätzen wird zudem versucht durch Überexpression von Wachstumsfaktoren in Zellen deren Chondrogenese zu verstärken. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren im Bereich des Knorpel-Tissue Engineering zählen die TGF- $\beta$  Superfamilie, die die TGF- $\beta$  Familie, die Knochenmorphogenetischen Proteine (engl. Bone Morphogenetic Proteins (BMP)) sowie die Activine umfasst, die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren und die Proteine des Hedgehog- des Parathormon verwandeten Peptid (PTHrP) Signalweges sowie der Wingless- (Wnt) Familie (BHARDWAJ et al. 2015, REDDI 1998).

#### 2.3.3.1 Die TGF- $\beta$ Familie

Zur TGF- $\beta$  Familie zählen die Faktoren TGF- $\beta$  1-3, die das größte chondrogene Potential aller bislang im Tissue Engineering eingesetzten Wachstumsfaktoren aufweisen. Über die Bindung an das Heterodimer aus TGF- $\beta$ -Rezeptor I und TGF- $\beta$ -Rezeptor II veranlassen TGF- $\beta$  Signalmoleküle die Phosphorylierung sogenannter SMADs. Diese binden dann an SMAD 4 und wandern als Komplex in den Zellkern, wo sie die Genexpression prochondrogen beeinflussen (CANALIS et al. 2003, LI et al. 2012). Im Organismus werden TGF- $\beta$  Moleküle von verschiedenen Zelltypen des Skelettsystems gebildet und teils in inaktiver Form gespeichert. Für die Isoformen TGF- $\beta$  1-3 wurde gezeigt, dass sie die chondrogene Differenzierung von MSC in vitro ermöglichen und hierbei die Bildung und Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II stimulieren (FACCHINI et al. 2006, JOHNSTONE et al. 1998). Positive Effekte von TGF- $\beta$  1 auf die Matrixablagerung von CHO während der in vitro Chondrogenese konnten ebenfalls nachgewiesen werden (TEKARI et al. 2015, YOON et al. 2015). Für alle drei Isotypen konnten zudem auch positive Effekte auf die Regeneration von Knorpeldefekten gezeigt werden (FAN et al. 2006, HUNZIKER et al. 2001). Allerdings stellen einige Studien auch einen Zusammenhang zwischen der Behandlung von MSC mit TGF- $\beta$  und deren hypertropher Entwicklung her, was einen Nachteil dieser Wachstumsfaktorengruppe darstellt (NARCISI et al. 2012).

#### 2.3.3.2 Knochenmorphogenetische Proteine

Eine weitere Gruppe an Wachstumsfaktoren mit hohem chondrogenen Potential stellen die sogenannten BMPs dar. Physiologisch spielen BMPs eine entscheidende Rolle im Rahmen der Skelettentwicklung. Als alleiniger Stimulus führen BMPs zwar nicht zur chondrogenen Differenzierung von MSC (WEISS et al. 2010), jedoch fördern besonders die Faktoren BMP-2, BMP-4, BMP-6 und BMP-7 in Kombination mit TGF- $\beta$  die chondrogene Differenzierung von MSC und die Produktion von Knorpelmatrix durch Chondrozyten in vitro (HENNIG et al. 2007, MURPHY et al. 2015, SEKIYA et al. 2005). Hierbei zeigten BMP-2 und BMP-6 die stärksten prochondrogenen Effekte und durch die Kombination mehrerer BMPs konnten synergistische Effekte erzielt werden (CICIONE et al. 2015, PUETZER et al. 2010). Für BMP-2 und BMP-7 wurde zudem gezeigt, dass sie die Regeneration von Knorpeldefekten in vivo verbessern können (CHUBINSKAYA et al. 2007, GELSE et al. 2008). Ein Nachteil der Verwendung von BMPs zur Verbesserung der Chondrogenese ist deren ebenfalls hohes osteogenes Potential, was zu einer Steigerung der Hypertrophie von MSC

und Chondrozyten im Laufe der *in vitro* Chondrogenese führt (CARON et al. 2013, COLEMAN und TUAN 2003, COLEMAN et al. 2013). Zudem wirken BMP-2, BMP-6 und BMP-7 bei ektopter Implantation in Kombination mit Progenitorzellen osteoinduktiv, was bei der Therapie von artikulären Defekten vermieden werden sollte (NOEL et al. 2004, VISSER et al. 2012, ZHANG et al. 2015). Entsprechend ihrer unterschiedlichen Potenz zur Steigerung der Chondrogenese resultiert die Anwendung verschiedener BMP-Subtypen auch in einer unterschiedlich ausgeprägten osteogenen Stimulation von Vorläuferzellen. So zeigt BMP-2 ein höheres osteogenes Potential als beispielsweise BMP-7 oder GDF-5. Um darzustellen, warum GDF-5 als potentiell geeigneter Faktor zur Generierung einer mineralisierten Knorpelgewebsschicht ausgewählt wurde, wird dieses Mitglied der BMP-Familie nachfolgend näher charakterisiert.

#### 2.3.3.3 *Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5*

Der Wachstumsfaktor GDF-5, auch BMP 14 oder Knorpelmorphogenetisches Protein 1 (CDMP-1), wird während der Skelettentwicklung in der sogenannten Kondensationsphase exprimiert und fördert sowohl die frühe Chondrogenese als auch die Zellproliferation in der Epiphysenanlage (BUXTON et al. 2001). Fehlt GDF-5 zu diesem Zeitpunkt der skelettalen Entwicklung, resultiert dies in der Ausbildung verkürzter Extremitäten (FRANCIS-WEST et al. 1999). Aufgrund seiner Bedeutung für die natürliche Entwicklung des Knochen- und Knorpelgewebes wurde GDF-5 bereits früh auch in Studien zur *in vitro* Chondrogenese eingesetzt. Hierbei wurde gezeigt, dass GDF-5 das Potential besitzt die Chondrogenese sowohl von Chondrozyten als auch von MSC zu fördern (COLEMAN et al. 2013, MURPHY et al. 2015, SUN et al. 2012). Zudem weisen die Ergebnisse einer Studie von COLEMAN et al. (2013) darauf hin, dass GDF-5 auch die hypertrophe Entwicklung von Vorläuferzellen steigert und somit die Neigung dieser Zellen zur Mineralisierung *in vivo* positiv beeinflussen könnte. Dennoch weist GDF-5 ein geringeres osteogenes Potential auf als andere Mitglieder der Familie der Knochenmorphogenetischen Proteine. Der Einsatz von GDF-5 zur Therapie von Knochendefekten resultierte sogar häufig in der Entwicklung eines knorpelartigen Gewebes oder eines Pseudo-Gelenks an Stelle des angestrebten Knochengewebes (CARON et al. 2013, KLEINSCHMIDT et al. 2013). Auf Grundlage dieser Forschungsergebnisse wurde GDF-5 als Wachstumsfaktor mit dem größten Potential angesehen, die Entwicklung einer mineralisierten Knorpelgewebsschicht zur Verbesserung der Integration von Tissue Engineering Konstrukten zur subchondralen Knochenplatte zu erreichen.

#### 2.3.3.4 *Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren*

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren 1 und 2 (IGF-1, IGF-2) vermitteln ihre Wirkung über die Oberflächenrezeptoren IGFR1 und IGFR2. Sie sind essenziell für das Wachstum und die Entwicklung eines Organismus und beeinflussen auch die Entwicklung des Skelettsystems. Für den Faktor IGF-1 wurde gezeigt, dass er die Homöostase von Knorpelgewebe aufrecht erhält und das Überleben sowie die Proliferation und Proteoglykanablagerung von Chondrozyten fördert (UEBERSAX et al. 2008, YOON und FISHER 2008). Zudem wurde ein positiver Effekt von IGF-1 Supplementation auf die Regeneration von artikulären Knorpeldefekten nachgewiesen (ZHANG et al. 2016). Ähnlich wie bei der Familie der BMPs konnten auch bei IGF-1 durch Kombination mit TGF- $\beta$  synergistische prochondrogene Effekte erzielt werden (LONGOBARDI et al. 2006). Für die gemeinsame Anwendung von IGF-1 und BMP-7 wurde ebenfalls eine gesteigerte Chondrogeneseaktivität von Chondrozyten nachgewiesen (CHUBINSKAYA et al. 2007, LOESER et al. 2003). Jedoch gibt es Studien, die zeigen, dass IGF-1 vermittelte prochondrogene Effekte durch eine arthrotische

Mikroumgebung aufgehoben werden, was IGF-1 für den Einsatz in geschädigten Gelenken nur bedingt geeignet macht (BOEHM et al. 2007).

#### 2.3.3.5 *Proteine des Hedgehog - und PTHrP-Signalwegs*

Zu den Proteinen des Hedgehog-Signalwegs zählen Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog und Indian Hedgehog (IHH). Im Zuge der enchondralen Ossifikation regulieren IHH und PTHrP über eine negative Feed-Back-Schleife die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge (MININA et al. 2001). Hierbei stimuliert IHH über die Bindung an Patched und die nachfolgende Aktivierung der Glioma-associated oncogene homolog (Gli) Transkriptionsfaktoren die Differenzierung von Chondrozyten, aber auch deren Expression von PTHrP (KRONENBERG 2006). Wird PTHrP gebildet, aktiviert es durch die Bindung an PTH-Rezeptoren eine Proteinkinase, die die Gli-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und so wieder deaktiviert (JUPPNER 2000). Für den Faktor IHH und für mehrere Abwandlungen des Sonic Hedgehog Proteins wurde berichtet, dass sie die Chondrogenese von MSC fördern, dies ist jedoch umstritten (KELLNER et al. 2002, STEINERT et al. 2012). PTHrP hingegen wird im Rahmen des Knorpel-Tissue Engineering zur Unterdrückung der Hypertrophie von MSC genutzt. Zwar unterdrückt es bei konstanter Anwendung nahezu vollständig die Chondrogenese, bei gepulster Anwendung jedoch konnte eine verstärkte Ablagerung von chondrogener Matrix bei gesenkter ALP-Aktivität (FISCHER et al. 2014, FISCHER et al. 2016) beobachtet werden.

#### 2.3.3.6 *Proteine der Wnt-Familie*

Die Wnt-Familie umfasst über 20 Proteine, die ihre Wirkung über unterschiedliche Signalwege, den kanonischen,  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalweg und mehrere nicht-kanonische,  $\beta$ -Catenin-unabhängige Signalwege entfalten (MACDONALD et al. 2009). Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen der Wnt-Proteine fördern einige Proteine dieser Familie die Bildung von Knorpelgewebe durch Chondrozyten und Progenitorzellen, andere jedoch haben einen hemmenden Einfluss. Durch Stimulation mit Wnt-1, Wnt-4, Wnt-7a und Wnt-8 wird die Chondrogenese von Vorläuferzellen inhibiert, wohingegen die Behandlung mit Wnt-5a und Wnt-5b in einer erhöhten Chondrogeneseaktivität resultiert (CHURCH et al. 2002). Über die Effekte einer Behandlung mit Wnt-3a liefern Studien derzeit kontroverse Ergebnisse (FISCHER et al. 2002, HWANG et al. 2005). Während Wnt-Proteine über den  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalweg die Hypertrophie von Chondrozyten steigern, wurde für eine Kombination der Moleküle Wnt-3a und Wnt-5a gezeigt, dass sie die Hypertrophie von MSC unterdrücken können (DONG et al. 2006). Hinsichtlich der Auswirkungen von Wnt-Proteinen auf die Regeneration von artikulären Knorpeldefekten in vivo ist bislang noch sehr wenig bekannt. Jedoch werden die verschiedenen Wnt-Signalwege und deren Auswirkungen auf die Chondrogenese aktuell von Forschergruppen weltweit detaillierter untersucht.

Wird unter Nutzung von Zellen, eines geeigneten Biomaterials und Wachstumsfaktoren ein vielversprechendes Tissue Engineering Konstrukt generiert, soll dieses auch zur Therapie von Knorpeldefekten eingesetzt werden. Die Fixierung in vitro generierter Tissue Engineering Konstrukte in enchondralen Defekten ist daher eine wichtige Problemstellung, die im Folgenden näher beschrieben wird.

### 2.3.4 Fixationsmethoden für Tissue Engineering Konstrukte

Tissue Engineering Konstrukte können auf verschiedene Arten in Knorpeldefekten fixiert werden. Die optimale Fixationsmethode hängt hierbei sowohl von der Art des verwendeten Konstrukts als auch von der Tiefe des zu behandelnden Knorpeldefekts ab.

Das Annähen von Konstrukten im Defekt sichert zwar deren initiale Fixation, setzt aber gleichzeitig neue Knorpelläsionen, die, wie der ursprüngliche Defekt, zu arthrotischen Knorpelveränderungen führen können (HUNZIKER und STAHLI 2008). Sowohl das Annähen der Konstrukte als auch deren Fixation durch das Übernähen einer Membran sollte daher, wenn möglich, vermieden werden. Mechanisch verformbare Tissue Engineering-Konstrukte können zudem auch unter Nutzung ihrer Spannkraft im Defekt fixiert werden, eine Methode, die häufig bei der Therapie osteochondraler Defekte eingesetzt wird (EMANS et al. 2013, WEINZWEIG et al. 2000). Das verwendete Material wird bei dieser Methode geringgradig komprimiert in den Defekt eingebracht, dehnt sich dort aus und wird durch die nach außen wirkende Kraft im Defekt fixiert („press-fit“). Für die im Knorpel-Tissue Engineering häufig genutzten Hydrogelsysteme besteht ferner die Möglichkeit des Auspolymerisierens im Defekt, was häufig in einer guten Konstruktfixierung resultiert (FISHER et al. 2016, LIU et al. 2016, NIEMIETZ et al. 2014). Hierbei wird der Defekt mit dem noch in flüssiger Form vorliegenden Hydrogel befüllt und dieses dann in situ ausgehärtet. Je nach Art des Hydrogels kann diese Methode allerdings problematisch sein. Wird beispielsweise UV-Strahlung zum Auspolymerisieren benötigt, so besteht die Gefahr, das umliegende Gewebe durch die benötigte Strahlung zu schädigen. Zudem ist das Einbringen zonaler oder porös strukturierter Konstrukte mit dieser Methode nicht möglich.

Eine weitere häufig genutzte Möglichkeit zur Fixierung von Tissue Engineering Konstrukten ist die Verwendung eines Gewebeklebers. Hierzu werden häufig kommerziell erhältliche, auf Fibrin basierende Gewebekleber verwendet (CHERUBINO et al. 2003, EFE et al. 2012, GELSE et al. 2015). Aber auch andere Kleber wie beispielsweise LYDEX<sup>®</sup>, ein aus den Komponenten Dextran und Polylysin bestehendes Präparat, stehen zur Fixation von Tissue Engineering Konstrukten zur Verfügung (KAZUSA et al. 2013). Abhängig von der Art des verwendeten Konstrukts gewährt das Einkleben jedoch keine ausreichende Fixierung, was in einem Verlust der Konstrukte resultieren kann (DROBNIC et al. 2006, GELSE et al. 2015, VAHDATI und WAGNER 2013). Die Fixierung von Konstrukten mittels eines Gewebeklebers gewinnt besonders im Hinblick auf das Vorhaben vermehrt biogedruckte Tissue Engineering Konstrukte auf Hydrogelbasis zur Knorpelregeneration zu nutzen an Bedeutung. Diese werden bereits prä-OP hergestellt, weshalb das bisher häufig praktizierte Eingießen zur Fixierung der Hydrogele im Defekt nicht möglich ist. Aufgrund der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele können diese jedoch auch nicht mit der press-fit Methode oder durch Einnähen fixiert werden, sodass als einzige Option die Fixierung mittels eines Gewebeklebers verbleibt.

Obwohl einige Tissue Engineering Konstrukte in vitro vielversprechende Ergebnisse liefern, scheitert die langfristige Knorpelregeneration mittels Tissue Engineering in vivo häufig an der mangelhaften Fixation und Integration der Konstrukte in das umliegende Wirtsgewebe (ENDERS et al. 2010, HORAS et al. 2003, KHAN et al. 2008), weshalb auf dem Feld der Konstruktfixierung ebenfalls nach wirkungsvolleren Alternativen gesucht wird. Da die adäquate Fixierung von Tissue Engineering Konstrukten, aber auch deren andere Eigenschaften, wie beispielsweise die Biokompatibilität, nur

bedingt in vitro evaluiert werden können, ist die präklinische Untersuchung von Tissue Engineering Konstrukten in Tiermodellen unabdingbar.

## **2.4 Tiermodelle**

Um bereits vor dem Beginn klinischer Studien im Menschen Informationen über die Biokompatibilität, die Biodegradation und das Potential getesteter Biomaterialien zur Unterstützung der in vivo Chondrogenese zu erhalten, nutzt man in der Forschung verschiedene ektope und orthotope Tiermodelle (COOK et al. 2014, MADRY et al. 2015, MORAN et al. 2016, WANCKET 2015). Hierbei sollte jedoch stets das Prinzip der sogenannten 3 R's: Reduction, Refinement und Replacement gelten, also die Anzahl an Tierstudien, die Zahl der im Rahmen dieser Studien benötigten Tiere und die Belastung der Tiere während der Studie möglichst gering gehalten werden (RUSSELL und BURCH 1959). Die im Rahmen dieser Arbeit dennoch notwendigerweise angewendeten Tiermodelle werden im Folgenden näher erläutert.

### **2.4.1 Mäuse als ektopes Modell zur Beurteilung der Biokompatibilität und Biodegradation**

Die ektope Implantation von Biomaterialien in Mäuse stellt eine kostengünstige und effektive Methode dar, um deren Biokompatibilität und Biodegradation zu beurteilen (WANCKET 2015). Hierzu werden die zu analysierenden Materialien in subkutane Taschen implantiert oder, im Falle mancher Hydrogele, den Tieren direkt unter die Haut gespritzt (LIU et al. 2016, POPA et al. 2014). Die Auswertung der Versuche erfolgt meist histologisch. Da zur Beurteilung der Biokompatibilität ein funktionierendes Immunsystem des Wirtstieres essentiell ist, werden immunkompetente Mausstämmen verwendet. Es wurde gezeigt, dass die Immunantwort von Mäusen zwischen verschiedenen Mausinzuchtstämmen variiert (HSIEH et al. 1995, JONES et al. 2013). So gelten beispielsweise Mäuse des Stammes C57/Bl6 als Tiere mit einer hauptsächlich Th1-geprägten, relativ aggressiven Immunantwort, während BALB/C und DAB/2 Mäuse eine eher gemäßigte, hauptsächlich Th2-geprägte Immunantwort aufweisen (JOVICIC et al. 2015). Die Wahl des Mausstammes ist daher ein Faktor, der die Resultate von Biokompatibilitäts- und Biodegradationsstudien beeinflussen und deren Übertragbarkeit auf den Menschen begrenzen kann. Als weitere Grenze des Modells ist zu beachten, dass sich das Mikromilieu unter der Haut deutlich von dem im Gelenk vorherrschenden unterscheidet. Zudem wirken auf ektop implantierte Konstrukte andere mechanische Kräfte ein als in der Gelenkumgebung (MORAN et al. 2016). Daher, und aufgrund der höheren Blut- und Nährstoffversorgung unter der Haut, verglichen mit der Gelenkumgebung, können besonders Ergebnisse hinsichtlich der Kinetik der Biodegradation nur bedingt auf den orthotopen Einsatz von Biomaterialien übertragen werden.

### **2.4.2 Mäuse als ektopes Modell zur Beurteilung der in vivo Chondrogenese**

Neben der Nutzung für Biokompatibilitätsstudien können ektope Mausmodelle auch zur Beurteilung der in vivo Chondrogenese verschiedener Zelltypen, wie beispielsweise MSC oder IPS genutzt werden (DICKHUT et al. 2008, PELTTARI et al. 2006, YAMASHITA et al. 2015). Die Auswertung dieser Modelle erfolgt ebenfalls meist histologisch. Wird auch die terminale Differenzierung oder enchondrale Ossifikation der implantierten Zellen begutachtet, werden häufig auch  $\mu$ CT-Analysen der implantierten Konstrukte durchgeführt (FREEMAN et al. 2015, JEONG et al. 2012). Durch das Vorhandensein von immuninkompetenten Inzuchtstämmen, beispielsweise SCID oder NUDE Mäusen,

ermöglichen ektope Mausmodelle auch die Untersuchung von Biomaterialien, die mit allogenen oder xenogenen Zellen beladen sind, ohne Abwehrreaktionen der Wirtstiere zu generieren. Wie auch bei der Nutzung von Mausmodellen zur Evaluation der Biokompatibilität, sind das abweichende Mikromilieu und die bessere Nährstoffversorgung unter der Haut als Grenzen des Modells zu betrachten.

### **2.4.3 Das Minipig als orthotopes Tiermodell zur Beurteilung der Knorpelregeneration**

Unter orthotoper Implantation versteht man das Einsetzen von Biomaterialien in die anatomische Umgebung des Gewebes, das sie ersetzen sollen. Ziel der Austestung zellfreier und zellhaltiger Biomaterialien in orthotopen Knorpeldefekten ist es, deren Potential zur Unterstützung der Knorpelregeneration in der artikulären Mikroumgebung zu untersuchen. Da große anatomische Ähnlichkeiten zwischen porcinem und humanem Knorpel bestehen, ist das Minipig ein häufig genutztes Modell für orthotope Studien (GOTTERBARM et al. 2008, KAAB et al. 1998, MORAN et al. 2016). Zudem konnte für mehrere Minipig-Rassen gezeigt werden, dass bei diesen Tieren weder chondrale noch osteochondrale Defekte selbständig ausheilen, was dem Selbstheilungspotential von humanem Gelenkknorpel entspricht (KUO et al. 2006, MAINIL-VARLET et al. 2001). In Minipigs wurden bereits viele zellfreie Materialien, aber auch zellhaltige Tissue Engineering Ansätze untersucht (NIEMIETZ et al. 2014, STECK et al. 2009). Da Knorpelläsionen bei humanen Patienten meist im Erwachsenenalter auftreten, sollten nur ausgewachsene Tiere für Studien verwendet werden, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit des Modelles auf die humane Problematik sicherzustellen. Mit dem Schluss der distalen femoralen Epiphysenfuge im Alter von 18-22 Monaten gelten Minipigs als ausgewachsen. Daher sollten für Knorpelregenerationsstudien nur Tiere genutzt werden, die dieses Alter bereits überschritten haben (HURTIG et al. 2011, MORAN et al. 2016).

Welche Tiere, Materialien und Methoden im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet wurden, wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

## 3 Tiere, Material und Methoden

### 3.1 Tiere

#### 3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe (Sitz: Schlossplatz 4-6, 76131 Karlsruhe) geprüft und genehmigt (Aktenzeichen 35-9185.81/G-144/15 genehmigt am 08.09.2015; Aktenzeichen 35-9185.81/G-249/14 genehmigt am 13.01.2015; Aktenzeichen 35-9185.81/G-76/11 genehmigt am 27.06.2011; Aktenzeichen 35-9185.81/G-203/14 genehmigt am 19.11.2014)

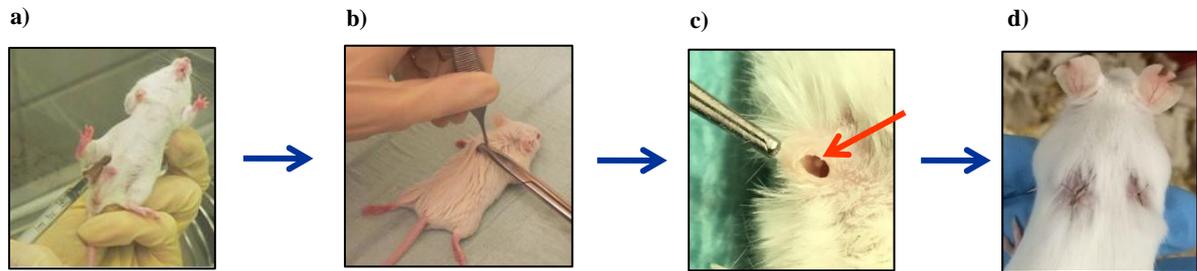
Sowohl die immunkompetenten B6D2F1/Crl (BDF1) als auch die immundefizienten CB17/Icr-Prkdcscid/IcrCr (SCID) Mäuse wurden über Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in den Tierhaltungsräumen des Orthopädischen Universitätsklinikums Heidelberg gehalten sowie operiert. Insgesamt wurden 14 BDF1 und 25 SCID Mäuse sowie mehrere Schädeldecken, die von SCID Mäusen im Rahmen anderer Versuchsvorhaben bzw. post mortem entnommen wurden, für die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Experimente verwendet. Die Tiere wurden je nach Umfang eines Teilversuchs in Gruppengrößen von 2 bis 9 Tieren eingestallt. Gruppen bis zu einer Größe von 4 Tieren wurden in Makrolonkäfigen Typ 2, größere Gruppen in Typ 3 Käfigen gehalten. In den Haltungsräumen wurde eine Temperatur von 22°C mit einer Luftfeuchte von ca. 45% aufrechterhalten, zudem fand ein Tag-Nacht-Wechsel in zwölfstündigem Rhythmus statt. Alle Tiere wurden wöchentlich umgesetzt und erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die immundefizienten SCID wurden in Inkubatorschränken mit Luftfilterung gehalten, alle Käfige und Haltungsmaterialien für diese Tiere wurden vor Einstellung der Tiere autoklaviert. Für alle durchgeführten Versuche wurden Tiere im Alter von 8-16 Wochen verwendet.

Für den ersten durchgeführten Minipig-Versuch wurden weibliche Göttinger Minipigs von der Firma Ellegaard (Dalmoose, Dänemark; insgesamt 4 Tiere), für die weiteren Versuche weibliche Mini Leve Minipigs über das Lehr- und Versuchsgut Ruthe (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Sarstedt; insgesamt 4 Tiere) bezogen. Alle Tiere wurden im Alter von 24-33 Monate operiert. Sie wurden in der Interdisziplinären Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums in benachbarten Einzelboxen auf Stroh eingestallt. Die Tiere wurden einmal täglich gefüttert und hatten freien Zugang zu Wasser, Spielzeug/Stroh stand immer zur Verfügung.

#### 3.1.2 Ektope Konstruktimplantation in immundefiziente und –kompetente Mäuse

Die ektope Implantation von zellfreien und zellhaltigen Hydrogelen, sowie von Hydrogel-CCT Kombinationskonstrukten und den dreischichtigen osteochondralen Konstrukten wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden die Mäuse per intraperitoneale (i.p.) Injektion von 120mg/kg Ketamin (Ketamin<sup>®</sup>) und 0,5mg/kg Medetomidinhydrochlorid (Sedin<sup>®</sup>) narkotisiert (Abb. 9a). Die 4 Implantationsstellen, auf beiden Seiten caudal der Vorderbeine und cranial der Hinterbeine, jeweils ca. 5mm paramedian, wurden rasiert und mit Promanum<sup>®</sup> desinfiziert. Mit Hilfe einer Schere wurden 0,7-1,5cm lange Hautschnitte gesetzt und subkutane Taschen präpariert (Abb. 9b). Die Konstrukte wurden daraufhin mit einer stumpfen Pinzette tief in die Hauttaschen eingebracht (Abb. 9c). Zum Verschluss der subkutanen Taschen wurden mit einer 6/0 Nadel-Faden-Kombination 2 bis 3 Einzelhefte gesetzt (Abb. 9d). Frühestens 1 Stunde nach Narkosebeginn erhielten die Tiere 2,5mg/kg Atipamezol (Alzane<sup>®</sup>)

zur Teilantagonisierung der Narkose und 10µl/g subkutane (s.c.) Infusion mit körperwarmer 0,9% Kochsalzlösung. Nach Ablauf der Standzeit wurden die Tiere mittels cervicaler Dislokation getötet. Die Haut der Tiere wurde dann vorsichtig abpräpariert und die Konstrukte mit einem Skalpell aus dem umliegenden Gewebe entnommen.



**Abbildung 5: Ablauf einer subkutanen Implantation.** a) *Intraperitoneale Injektion der Narkose*; b) *Setzen einer subkutanen Tasche caudal des linken Schulterblatts*; c) *Implantiertes Hydrogelkonstrukt (roter Pfeil)*; d) *verschlossene subkutane Taschen post OP*

### 3.1.3 Orthotope Konstruktimplantation in Minipigs

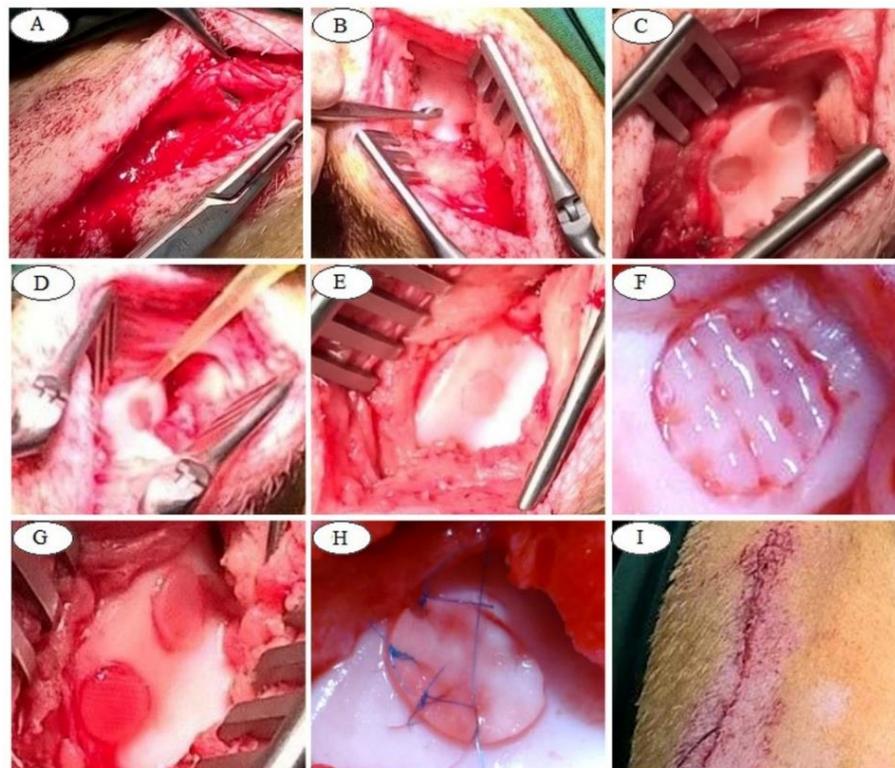
#### OP- Vorbereitung und Narkose

Die Minipigs wurden prä OP mit intramuskulärer (i.m.) Injektion von 4mg/kg Azaperon (Stresnil®) sediert. Nach 20min Ruhezeit wurden die Tiere dann mit 0,4mg/kg Ketamin (Ketamin®) und 0,35mg/kg Midazolamhydrochlorid (Midazolam – Hameln®) i.m. narkotisiert. Es wurde ein venöser Zugang in eine Ohrvene gelegt und die Narkose der Tiere mit Hilfe von intravenöser (i.v.) Gabe von Propofol nach Bedarf vertieft. Zudem erhielten die Tiere prä-OP als Schmerzmittel Buprenorphin i.v. und zur antibiotischen Therapie Gentamicinsulfat 4mg/kg (Gentamin 50®) i.m. Im Anschluss wurden die Tiere intubiert und für die Dauer der OP in einer Isofluran-Inhalationsnarkose gehalten. Beide Hinterbeine der Tiere wurden geschoren, gewaschen und anschließend mit Braunol® mehrfach desinfiziert.

#### Konstruktimplantation

Zur Konstruktimplantation wurde die OP-Methode nach MACI (JUNG et al. 2009) angewandt. Hierbei wurde an beiden Knien die Haut mit einem medianen Schnitt von der Tuberositas tibiae bis zum distalen Patellarpol eröffnet (Abb. 10A). Im Anschluss wurde die Patellarsehne freigelegt und mit einem medianen Längsschnitt durchtrennt. Mit Hilfe eines Wundspreizers wurden die beiden Patellarsehnenanteile nach lateral verlagert um einen gut einsehbaren Zugang zum Kniegelenk präparieren zu können. Nach Eröffnung des Kniegelenks wurde der Wundspreizer umgesetzt um die Gelenkkapsel geöffnet zu halten (Abb. 10B). An beiden Kniegelenken wurden dann in den Knorpel des medialen Femurkondylus je 2 Vollschichtdefekte mit einem Durchmesser von 6mm und mindestens 2mm Abstand voneinander gesetzt. Hierzu wurde zunächst mittels einer Biopsiestanze das entsprechende Knorpelareal ausgestanzt, dann der Defekt unter Verwendung einer Kürette bis zur subchondralen Knochenplatte freipräpariert (Abb. 10C). Hierbei wurde speziell darauf geachtet die Knochenplatte nicht zu beschädigen, da dieses Vorgehen der Standardoperationsmethode am Menschen entspricht. Das Auftreten bzw. Ausbleiben von Blutungen aus der subchondralen Knochenplatte wurde hierbei als Kriterium dafür herangezogen ob es zu Verletzungen dieser Struktur durch die Präparation gekommen ist. Die präparierten Defekte wurden mit 0,9% NaCl gespült. Im Anschluss wurden je nach Versuchsdesign die Konstrukte in die Defekte eingebracht. In der ersten Minipigintegrationsstudie wurden verschiedene Gewebekleber zur Fixation verwendet. Hierbei wurden die Defekte zunächst

trocken getupft. Dann wurden entweder 6,25µl der Fibrinkomponente des Tisseelklebers (unverdünnt) mit oder ohne 5µg GDF-5 oder 10µl BSA-Komponente des Bioglues® in den Defekt vorgelegt. Anschließend wurde die jeweils zweite Kleberkomponente, also 6,25µl des Thrombins (unverdünnt) oder 2,5µl Glutaraldehyd-Komponente des Bioglues® hinzupipettiert (Abb. 10D). Unmittelbar nach Hinzufügen der zweiten Kleberkomponente wurden die Konstrukte in den Defekt gelegt und über 2min festgedrückt. Bei den weiterführenden Integrationsstudien wurde zusätzlich zur Fixation der Konstrukte mit Tisseel® ein Konstrukt durch das Übernähen einer Kollagen-Membran (Chondrogide®) fixiert (Abb. 10H). Die Membran wurde hierbei zunächst mit 2 Einzelheften an den Knorpel angeheftet, dann nach Einkleben des Konstrukts mit 2 weiteren Einzelheften über den Defekt gespannt. Zudem wurden Hydrogel-CCT Konstrukte durch Annähen fixiert und Hydrogele ohne Verstärkung direkt in den Defekt injiziert. Der Sitz der Implantate wurde bei allen Teilversuchen durch Beugen und Strecken des Kniegelenks überprüft. Im Anschluss wurde das Gelenk durch das Vernähen von 3 Schichten (Patellarsehne, Subcutis, Dermis) wieder verschlossen (Abb. 10I). Die Wunden wurden mit Aluminium-Micronisat-Spray behandelt.



**Abbildung 6: OP-Verlauf des orthotopen Minipig Modells.** A) Zugang zum Gelenk unter medianer Durchtrennung der Patellarsehne; B) Präparation eines Vollschichtknorpeldefekts mit Hilfe einer Biopsiestanze und einer Kürette; C) Leere präparierte Vollschichtknorpeldefekte; D) Einpipettieren der Gewebekleberkomponenten in den Defekt; E-F: implantierte Konstrukte im Defekt; E) eingegossenes StarPEG/Heparin Hydrogel; F) eingeklebtes gedrucktes P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukt; G) eingeklebte CCT verstärkte P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukte; H) eingenähte Kollagenmembran (Chondrogide®) zur Fixation eines Hydrogelkonstrukts; I) durch einfach fortlaufende Nähte (Patellarsehne, Subcutis, Dermis) verschlossener OP-Situs

Die Designs der verschiedenen Minipigstudien sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 1. Design der 1. Minipig-Integrationsstudie**

Art des Konstrukts	Gewebekleber	Anzahl der Implantate
Fibrinhydrogel + CCT	Fibrinkleber	4
P(AGE/G)HA-SH + CCT	Fibrinkleber	4
	GDF-5 beladener Fibrinkleber	4
	BioGlue®	4

**Tabelle 2. Design der weiterführenden Minipig-Integrationsstudie**

Art des Konstrukts	Gewebekleber	Anzahl der Implantate
Leerdefekt	-	3
Porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH	Fibringewebekleber	1
	Fibringewebekleber + Chondrogide®	1
StarPEG/Heparin + CCT	Fibringewebekleber + eingenäht	3
StarPEG/Heparin	Auspolymerisieren im Defekt	3
	Fibringewebekleber	3

#### OP-Nachsorge

In der Aufwachphase wurden die Tiere mit Rotlicht bestrahlt um eine Auskühlung zu verhindern. Am OP-Tag sowie einen Tag post OP erhielten sie zur Schmerztherapie 5µg/kg Buprenorphin (Buprenovet®) i.m. im Abstand von 12h, anschließend wurde 3mg/kg Ketoprofen (Ketoprosol®) für weitere 4 Tage als Schmerzmittel i. m. verabreicht. Zur antibiotischen Abdeckung erhielten die Tiere über 4 Tage einmal täglich 6,8mg/kg Gentamicinsulfat (Gentamicin 50) i.m.. Die Wundheilung sowie das Gangbild der Tiere wurden täglich begutachtet und die Schmerz- und Antibiotikatherapie bei Bedarf für längere Zeit fortgesetzt.

#### Euthanasie und Explantation

Nach Ablauf der Standzeit von vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Die Vorbereitung der Tiere hierfür erfolgte entsprechend dem Vorgehen prä-OP (siehe OP-Vorbereitung und Narkose), mit Ausnahme der Intubation, auf die verzichtet wurde. Bei Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe erhielten die Tiere Pentobarbital-Natrium (Narcoren®) i.v. (durchschnittlich 48mg/kg Körpergewicht). Die Herztöne wurden bis zu ihrem Ausbleiben auskultiert. Direkt nach sicherer Feststellung des Todes wurde den Tieren mittels einer mit Heparin-Natrium präparierten Knochenmarksbiopsienadel Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen. Im Anschluss wurden die Kniegelenke erneut entsprechend dem Vorgehen intra-OP eröffnet. Die Defekte wurden zunächst in situ fotografisch dokumentiert, dann wurde die mediale Femurkondyle ausgesägt und in 4% PFA überführt.

## 3.2 Materialien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Antikörper und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang 1 aufgeführt. Selbst hergestellte bzw. bearbeitete Materialien werden im Folgenden aufgelistet.

### 3.2.1 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1% BSA	0,5g Bovines Serum Albumin in 50ml TBS
5x Laufpuffer für Western Blot	125mM Tris Base, 960mM Glycin, 0,5% SDS
ALP-Puffer	0,1M Glycin, 1mM MgCl <sub>2</sub> , mM ZnCl <sub>2</sub> (pH: 9,6)
Blockierlösung für Western Blot	TBS-T mit 5% Magermilchpulver
Blockierlösung für in situ Hybridisierung	DIG-Puffer 1, 1% Blocking Reagenz
Chondroitinsulfat-Lösung	10mg/ml Chondroitinsulfat in destilliertem H <sub>2</sub> O
DIG-Puffer 1	100mM Maleinsäure, 150mM NaCl (pH: 7,5) in Aqua dest.
DIG-Puffer 3	100mM Tris-Hcl, 100mM NaCl, 50mM MgCl <sub>2</sub> in Aqua dest. (pH: 9,5)
DIG-Waschpuffer	DIG-Puffer 1, 0,3% Tween
DMMB- Lösung	3,04g/l Glycin, 2,38g/l NaCl, 0,02g/l DMMB in Aqua dest. (pH: 3,0)
EDTA	625 g EDTA in 2 L Aqua dest, mit 40 % NaOH auf pH 7,4 einstellen
Gel-Lade-Puffer	40 % Saccharose in H <sub>2</sub> O, 0,5 % Xylen Cyanol FF
Imidazol-HCl-Puffer	6,81g/l Imidazol in Aqua dest., 500ml 0,1M HCl
Lysepuffer zur Kollagenisolierung	50mM Tris, 150mM NaCl, 1% Triton (pH: 8,0)
PBS	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.4)
Pepsinlösung zur Kollagenisolierung	25mg Pepsin gelöst in Pepsinpuffer
Pepsinpuffer zur Kollagenisolierung	0,5M Essigsäure, 0,2M NaCl
PFA (4 %)	40 g/l PFA in PBS
Präzipitationspuffer zur Kollagenisolierung	0,1M Tris, 0,4M NaCl (pH: 7,4)
Proteinase K Lösung	0,5mg/ml Proteinase K in TE-Puffer
Sammelgel-Lösung für Western Blot (5%)	17% Rotiphorese 30 Gellösung, 0,125M Tris HCl, 0,1% SDS, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1% TEMED
SSC (20x)	175,3g/l NaCl, 88,2g/l Na-Citrat Aqua dest. (pH 7,0)
Substrat-Puffer (für ALP-Aktivität)	1 mg/ml pNPP in ALP-Puffer
TAE (50x)	242 g/l Tris base, 57,1 g/l Eisessig, 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8)
TBS (10x)	8,77 g/l NaCl, 6,07 g/l TrisHCl
TBS-T	1:10 verdünntes TBS (10x), 0,5% Tween 20

TE-Puffer	10 mM TrisHCl pH 7.4, 1 mM EDTA (pH 8)
Trenngel - Lösung für Western Blot (8%)	26% Rotiphorese 30 Gellösung, 0,375M Tris HCl (pH:8,8), 0,1% SDS, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1% TEMED
Triethanolamidhydrochloridlösung	1M Triethanolamid in Aqua dest. (pH: 8,0)

### 3.2.2 Komponenten der Hydrogele

Bezeichnung	Hersteller
CellCoTec-Scaffold	CellCoTec B.V., Bilthoven, Niederlande
Hyaluronsäure-Komponente des P(AGE/G)HA-SH- Hydrogels	Universitätsklinikum Würzburg
Photoinitiator I2959	Universitätsklinikum Würzburg
Polyglycidol-Komponente des P(AGE/G)HA-SH- Hydrogels	Universitätsklinikum Würzburg
sternförmige Polyethylenkomponente mit MMP-spaltbaren Linkern (p-MMP)	Leibnitz Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

### 3.2.3 Zellkulturmedien

#### Expansionmedium für humane und porcine MSC

DMEM high glucose (+ 4,5 g/l Glucose, + 0,11 g/l Natriumpyruvat, - L-Glutamin), 12,5 % Fetales Kälberserum (FCS), 1x nicht essenzielle Aminosäuren (NEAA), 10 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 4 ng/ml FGF-2 (frisch zugegeben)

#### Expansionsmedium für porcine artikuläre Chondrozyten

DMEM low glucose (+1,5 g/l Glucose, +0,58 g/l L-Glutamin, +0,11 g/l Natriumpyruvat), 10 % FCS, 10 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin

#### Verdaumedium (Knorpelgewebe)

DMEM low glucose, 1,5mg/ml Kollagenase B, 100µg/ml Hyaluronidase

#### Kryokonservierungsmedium

FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### Chondrogenes Differenzierungsmedium

DMEM (+ 4,5 g/l Glucose, + 0,58 g/l L-Glutamin, + 0,11 g/l Natriumpyruvat), 10 ng/ml Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF-β1) (frisch zugegeben), 0,1 mM Dexamethason, 0,17 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat, 1µl/ml ITS-Premix (frisch zugegeben)

#### Osteogenes Differenzierungsmedium

DMEM (4,5 g/l Glucose + 0,58 g/l L-Glutamin, + 0,11 g/l Natriumpyruvat), 10 % FCS, 0,1 µM Dexamethason, 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat, 10 mM β-Glycerophosphat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Adipogenes Differenzierungsmedium

DMEM (4,5 g/l Glucose + 0,58 g/l L-Glutamin, + 0,11 g/l Natriumpyruvat), 10 % FCS, 0,5 mM Isobutylmethylxanthin, 0,2 mM Indomethacin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 µM Dexamethason, 10 µg/ml Insulin (frisch zugegeben)

Alle Differenzierungsmedien wurden nach dem Ansetzen mit einem Sterilfilter (0,22µm) filtriert.

**3.2.4 Färbelösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung
ALP-Färbelösung	20µl NBT/BCIP Substratlösung in 980µl PBS
Eosin (1 %)	1 g Eosin in 100 ml Aqua dest., 1 Tropfen Eisessig
Fast Green (0,04 %)	0,04 g Fast Green in 100 ml Aqua dest., 0,2 ml Eisessig
Fast Red	1 Tablette/2ml Tris HCl pH 8,2
Hämalaun nach Mayer	Gebrauchsfertig
Safranin O (0,2 %)	0,2 g Safranin O in 100 ml Aqua dest., 1 ml Eisessig

**3.2.5 Primer***Humane Primer Sequenzen*

Genname	Forward primer	Reverse Primer
ACAN	5'-GGAACCACTTGGGTCACG-3'	5'-GCACATGCCTTCTGCTT-3'
IHH	5'-CGACCGCAATAAGTATGGAC-3'	5'-GGTGAGCGGGTGTGAGTG-3'
IBSP	5'-CAGGGCAGTAGTGACTCATCC-3'	5'-TCGATTCTTCATTGTTTTCTCCT-3'
Col2A1	5'-TGGCCTGAGACAGCATGA C-3'	5'-AGTGTTGGGAGCCAGATTGT-3'
Col10A1	5'-TTTACGCTGAACGATACCAA-3'	5'-TTG CTC TCC TCT TAC TGC TAT-3'
MMP13	5'-CTGGAGATATGATGATACTAA C-3'	5'-CACGCATAGTCATATAGATACT-3'
OPN	5'-GCTAAACCCTGACCCATCTC-3'	5'-ATAACTGTCCTTCCCACGGC-3'
PTHrP1R	5'-GGTGAGGTGGTGGCTGT-3'	5'-AGCATGAAGGACAGGAAC-3'
RPL13	5'-CATTCTGGCAATTTCTACAG-3'	5'-CAGGCAACGCATGAGGAAT-3'

*Porzine Primer Sequenzen*

Genname	Forward primer	Reverse Primer
ACAN	5'-CAG GAG AAG AGA TGC CAA C-3'	5'-CTG AAT TTG TGA GCC GTT CT-3'
Col10A1	5'-TAA AGG GGA TCC AGG AAA T-3'	5'-CTC TCC AGC ATG ACC TTT TG-3'
Col2A1	5'-CAC GGA TGG TCC CAA AGG-3'	5'-ATA CCA GCA GCT CCC CTC T-3'
GAPDH	5'-CAA AAT CAA ATG GGG CGA TG-3'	5'-TGG CAG TAG GGA CAC GGA AG-3'
MMP 13	5'-CAT GAG TTT GGC CAT TCC TT-3'	5'-GTG GCT TTT GCC AGT GTA GG-3'
RPL13A	5'-ACT GAA GTA CCT GGC CTT CC-3'	5'-CAT CGA ACA CCT TGA GAC G-3'

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Zellkulturmethoden

#### 3.3.1.1 Isolation und Kultivierung humaner und porziner MSC

Im Verlauf einer Totalendoprothese-Operation am Hüftgelenk wurden mit Einverständnis der Patienten durch Aspiration je 7-20ml Knochenmark steril entnommen. Zur Gewinnung porziner MSC (pMSC) wurde bei Göttinger Minipigs (22-30 Monate) direkt nach deren Euthanasie dasselbe Verfahren angewendet. Um die mononukleäre Zellfraktion aus dem Knochenmark zu isolieren wurde dieses nach 2 Waschschritten in PBS aufgenommen und auf Ficoll-Paque™, ein synthetisches Co-Polymer, mithilfe dessen Zellen entsprechend ihres Dichtegradienten aufgetrennt werden können, aufgetragen. Nach 30 Minuten Zentrifugation (2700rpm) sammelten sich die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Überstand und Ficollschicht und konnten vorsichtig abgenommen werden. Die so isolierten Zellen wurden erneut mehrfach mit PBS gewaschen, unter Nutzung von Türkscher Lösung in einer Neubauerzellkammer gezählt und anschließend mit 125.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in eine Zellkulturflasche mit Expansionsmedium für MSC ausgelegt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° und 6% CO<sub>2</sub>, das Kultivierungsmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Bei Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert und mit einer Zelldichte von 5000/cm<sup>2</sup> erneut ausgelegt. In allen durchgeführten Versuchen wurden Zellen der Passage 3 verwendet.

#### 3.3.1.2 Differenzierung humaner und porziner MSC

Die gewonnenen humanen MSC (hMSC) und pMSC wurden hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung untersucht.

##### Osteogene und adipogene Differenzierung

Für die osteogene und adipogene Differenzierung wurden 35.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte ausgelegt und mit 500µl osteogenem bzw. adipogenem Medium versorgt. Der Mediumwechsel erfolgte 2 mal wöchentlich, die Zellen wurden zu den Zeitpunkten Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 (osteogen) geerntet und mit Alizarinrot bzw. Öl-Rot O angefärbt.

##### Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden 500.000 Zellen jeder untersuchten Zellpopulation in 500µl chondrogenem Medium resuspendiert und in einem 1,5ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert, um eine Hochdichte-Kultur zu generieren. Nach 7 Tagen wurden die so entstandenen Zellpellets in eine 96-Well-Platte überführt und ab diesem Zeitpunkt mit 200µl Medium versorgt. Das chondrogene Medium wurde 3 mal wöchentlich gewechselt. Die Pellets wurden an Tag 42 geerntet und histologisch prozessiert.

#### 3.3.1.3 Isolation und Kultivierung porziner Chondrozyten (pCHO)

Alle in dieser Dissertation verwendeten pCHO wurden aus Kniegelenken von 7-10 Monate alten Schlachtschweinen ohne Gelenkerkrankungen gewonnen. Die noch geschlossenen Kniegelenke wurden unter einer Sterilwerkbank freigelegt und eröffnet. Mithilfe von sterilen Einmalskalpellen wurde von allen Gelenkflächen, inklusive der Patella, der nicht kalzifizierte Knorpel abpräpariert und mit sterilem PBS gewaschen. Die gewonnenen Knorpelstücke wurden soweit wie möglich mit Skalpellen zerkleinert und dann zum Verdau der Knorpelmatrix in ein 50ml Reaktionsgefäß mit je 10ml

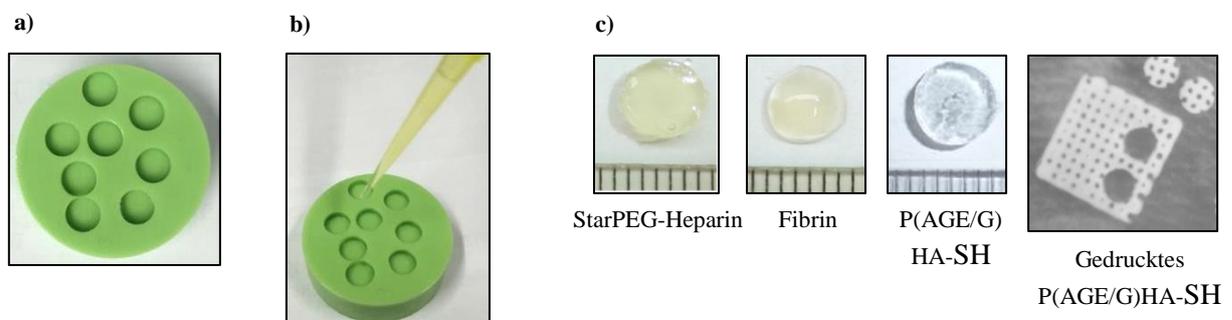
Verdaumedium pro Gramm Knorpel überführt. Der Verdau erfolgte über 12-16 Stunden bei 37°C unter permanenter Rotation. Im Anschluss wurde die entstandene Zellsuspension durch ein 40µm Nylonsieb filtriert um verbleibende Gewebereste zu entfernen. Die gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert und mit PBS gewaschen, sowie die Lebendzellzahl unter Benutzung von Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

### 3.3.2 Herstellung von Hydrogelkonstrukten

Die im Folgenden beschriebenen Hydrogelkonstrukte wurden nach ihrer Herstellung für verschiedene Untersuchungen genutzt. Zellfreie Hydrogele wurden entweder über 1,2 bzw. 4 Wochen ektop in immunkompetente Mäuse oder für 4 Wochen orthotop in das Kniegelenk von Minipigs implantiert. Zellhaltige Gele wurden entweder direkt oder nach 4-wöchiger chondrogener Vordifferenzierung (+/- 150ng/ml GDF-5 als Mediumzusatz) ektop für 2,4 und 8 Wochen in immundefiziente Mäuse implantiert oder für 2 bzw. 4 Wochen in vitro chondrogen (+/- 150ng/ml GDF-5 als Mediumzusatz) differenziert.

#### 3.3.2.1 Gegossenes StarPEG-Heparin Hydrogel

Die beiden Grundsubstanzen des StarPEG-Heparin Hydrogels wurden bereits aliquotiert durch den Kooperationspartner „Leibniz Institut für Polymerforschung“ zu Verfügung gestellt. Die Aliquots wurden mit 22,5µl PBS pro mg Heparin und 14,5µl PBS pro mg StarPEG gelöst. Bei der Herstellung zellhaltiger Gelkonstrukte wurden die Zellen in der HM6 Komponente resuspendiert. Die beiden Komponenten wurden dann 1:1 miteinander vermischt, kurz resuspendiert und zum Aushärten in die dafür hergestellten Formen (Abb. 5a) gegossen. Für Gele mit 4mm Durchmesser wurde ein Gesamtgelvolumen von 30µl, für Gele mit 6mm ein Gesamtgelvolumen von 60µl verwendet.



**Abbildung 7: Herstellung von Hydrogelkonstrukten.** a) Form zur Gelherstellung; b) Einfüllen der Gelkomponenten c) zellfreie Hydrogele (6mm Durchmesser)

#### 3.3.2.2 Gegossenes P(AGE/G)HA-SH Hydrogel

Die zur Gelherstellung benötigten Komponenten, Hyaluronsäure, Polyglycidol, Photoinitiator und sterile 5M NaOH wurden durch den Kooperationspartner „Universitätsklinikum Würzburg“ bereits aliquotiert bereitgestellt. Die Hyaluronsäurekomponente wurde vor der Gelherstellung für 10 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm bestrahlt und so sterilisiert. Die Polyglycidolkomponente wurde in 22,6µl PBS/mg gelöst und steril filtriert. Dann wurde zunächst der Photoinitiator, und daraufhin die Hyaluronsäurekomponente zur Polyglycidollösung hinzugegeben und resuspendiert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der 5M NaOH auf 6 eingestellt (pH-Papier). Abschließend wurde die benötigte Gelmenge (30µl oder 60µl) in die Formen gegossen und für 5min UV-Licht der Wellenlänge 365nm

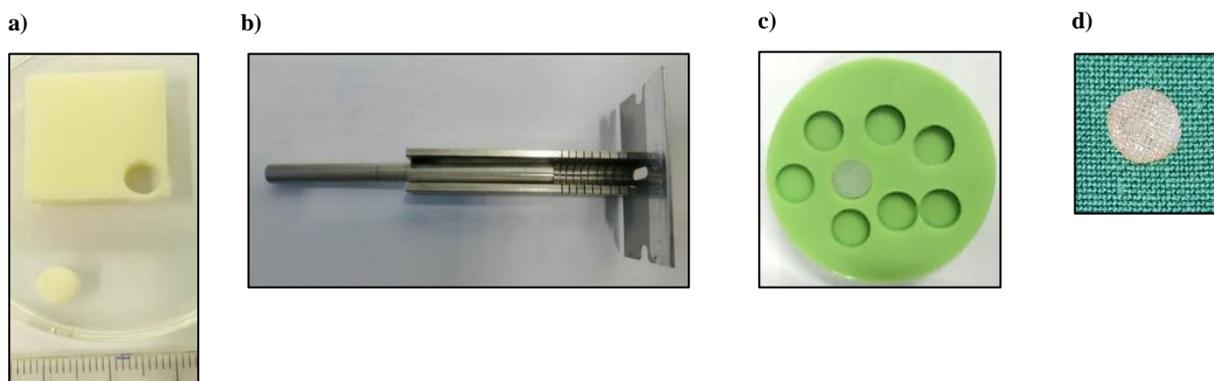
zur Aushärtung ausgesetzt. Wurden zellhaltige Gele hergestellt, wurden die Zellen nach Einstellen des pH-Wertes in die Gellösung eingebracht.

### 3.3.2.3 Gegossenes Fibrin Hydrogel

Die Fibrinkomponente des Tisseel Gewebeklebers wurde 1:15 mit PBS verdünnt, die Thrombinkomponente dieses Klebers 1:50. Mit den so hergestellten 2 Gelkomponenten wurde im Folgenden wie bei der Herstellung von StarPEG/Heparin Hydrogelen verfahren. Zellen wurden gegebenenfalls in der Fibrinkomponente gelöst.

### 3.3.2.4 CellCoTec (CCT) verstärkte Hydrogelkonstrukte

Für die Herstellung von CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten wurde der CCT-Scaffold zunächst zum Quellen für 10min in PBS überführt. Danach wurde mit Hilfe einer Biopsiestanze das Scaffold im benötigten Durchmesser (4mm oder 6mm) ausgestanzt (Abb. 6a) und mittels einer speziell entwickelten Guillotine auf die benötigte Höhe (1mm oder 2mm) zugeschnitten (Abb. 6b). Die fertigen Scaffolds wurden im Anschluss zur Desinfektion für eine Stunde in 80% Isopropanol inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in sterilem PBS wurden das CCT dann in die Gelformen vorgelegt und die Hydrogele wie bereits erläutert in die Formen und das CCT eingegossen (Abb. 6c). Das Eindringen der Hydrogele in die Poren des Scaffolds wurde am Mikroskop überprüft.



**Abbildung 8: Herstellung von CCT verstärkten Hydrogelen.** a) CCT Scaffold; b) „Guillotine“ zum Anpassen der Scaffoldhöhe; c) CCT- Scaffold in einer Gelform; d) CCT-verstärktes Hydrogelkonstrukt

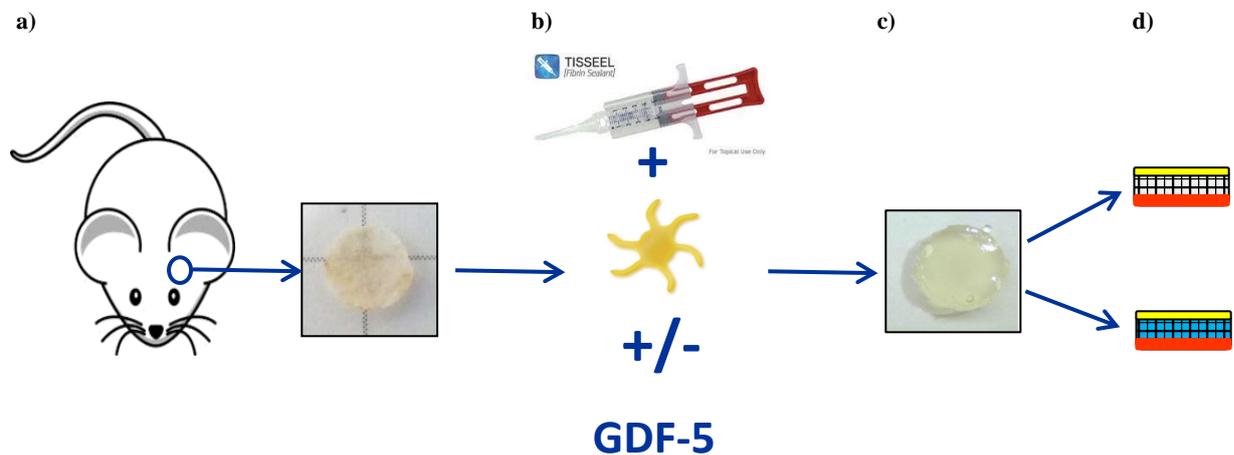
### 3.3.2.5 Gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel

Die porös gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele wurden von dem Kooperationspartner “Universitätsklinikum Würzburg“ in 2 Formulierungen hergestellt. Eine Gelformulierung entspricht in ihrer Zusammensetzung exakt den gegossenen P(AGE/G)HA-SH Gelen, die zweite wurde durch eine Erhöhung des Gesamtpolymergehalts (bei gleichem Verhältnis der Polymeren zueinander) pro Gel für den Körper langsamer degradierbar gestaltet. Die porösen Hydrogele wurden durch den Kooperationspartner bereits als gedruckter Schwamm (12mm / 12mm) mit 1mm Höhe und 1mm Abstand zwischen den Gelsträngen geliefert. Als einziger Herstellungsschritt wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze Konstrukte mit 6mm Durchmesser aus dem Hydrogelschwamm ausgestanzt (Abb. 5c).

### 3.3.2.6 Herstellung von dreischichtigen Konstrukten

Die hergestellten dreischichtigen Konstrukte sollen die Situation bei der Therapie eines Vollschichtknorpeldefekts mittels eines Tissue Engineering Konstrukts nachstellen. Zur Nachahmung

der freiliegenden subchondralen Knochenplatte wurden Explantate aus Mäuschädeldecken mit 4mm Durchmesser verwendet (Abb. 7a). Die konkave Seite dieser Schädeldecken wurde unter Verwendung eines Skalpell aufgeraut. Als Kleberschicht zur Befestigung des Tissue Engineering Konstrukts wurde eine Schicht aus 20 $\mu$ l Fibrinkleber mit 0,6 Mio pMSC entweder mit oder ohne Zusatz von 900ng GDF-5 verwendet (Abb. 7b). Als Tissue Engineering Konstrukt wurde zellfreies StarPEG/Heparin Hydrogel (4mm Durchmesser, 30 $\mu$ l) genutzt (Abb.7c).



**Abbildung 9: Herstellug eines osteochondralen Konstrukts.** a) Knöcherne Schicht: Mausschädeldecke (4mm Durchmesser); b) Verbindungsschicht: 20 $\mu$ l pMSC-haltiger Fibrinkleber mit und ohne 900ng GDF-5; c) Tissue-engineering Konstrukt: StarPEG-Heparin Hydrogel (4mm Durchmesser); d) Schematische Darstellung eines osteochondralen Konstrukts: gelbe Schicht: Tissue-engineering Konstrukt, grau/blau Schicht: Gewebekleber +/- GDF-5, rote Schicht: Mausschädeldecke

Im ektopen Versuch zur Beladung von Fibringewebekleber mit GDF-5 wurden je zwei Konstruktpaare von 4 unabhängigen Spenderpopulationen histologisch untersucht. Bei 4 der 8 untersuchten Konstruktpaare wurde zudem das mineralisierte Volumen der verwendeten Mausschädeldecken prä-Implantation mittels  $\mu$ CT-Scan ermittelt. Nach der Explantation konnte dann durch erneutes Bestimmen des mineralisierten Volumens die Menge an neu gebildetem mineralisiertem Gewebe ermittelt werden.

### 3.3.3 Biochemische und molekularbiologische Methoden

#### 3.3.3.1 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität in Kulturüberständen

Produzieren Zellen das Enzym Alkalische Phosphatase während der in vitro Chondrogenese, geben sie dieses in das Kulturmedium ab. Zur Quantifizierung der ALP-Aktivität in chondrogen differenzierenden Gelkonstrukten wurden daher zu definierten Zeitpunkten während der Chondrogenese (d7, d14, d21, d28) konditionierte Kulturüberstände (48h) abgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Analyse wurden pro Kondition und Zeitpunkt je 100 $\mu$ l Kulturüberstand mit 100 $\mu$ l p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung in einer 96-Well-Flachbodenplatte vermischt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Umsatz des Substrats wurde in 30 minütigen Intervallen fotometrisch bei den Wellenlängen  $\lambda = 405/490\text{nm}$  nachgewiesen. Anhand einer mitgeführten Standardverdünnungsreihe aus p-Nitrophenol wurde die Quantifizierung des Substratumsatzes ermöglicht. Sowohl bei allen Proben als auch bei der Standardverdünnungsreihe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.3.3.2 *Quantifizierung des Glykosaminoglycangehalts mittels DMMB-Assay*

Zur Quantifizierung des Glykosaminoglycangehalts (GAG-Gehalt) wurden die zu untersuchenden Konstrukte zunächst im Lyophilisierungsgefrieretrocknet (60h bei  $-40^{\circ}\text{C}$ ; Vakuum). Anschließend wurden sie in 1ml Proteinase K Lösung (0,5mg/ml) aufgenommen und für 16 Stunden unter ständiger Rotation bei  $60^{\circ}\text{C}$  verdaut. Die Hälfte der so entstandenen Lösung wurde 1:20 mit TE-Puffer verdünnt und je  $30\mu\text{l}$  dieser Verdünnung in eine 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert. Dann wurde jede Probe mit  $200\mu\text{l}$  einer Lösung des Farbstoffs DMMB, der an sulfatierte Glykosaminoglycane (GAG) bindet und dabei sein Absorptionsspektrum verändert, versetzt. Als Standardreihe wurden Chondroitinsulfatlösungen unterschiedlicher Konzentration mitgeführt, die ebenfalls mit  $200\mu\text{l}$  DMMB-Lösung versetzt wurden. Der Gehalt an GAG in einer Probe wurde mittels fotometrischer Messung bei der Wellenlänge  $\lambda=530\text{nm}$  bestimmt. Alle Werte inklusive der Standardwerte wurden dreifach gemessen.

### 3.3.3.3 *Quantifizierung des DNA-Gehalts mittels Picogreen-Assay*

Von allen Proben, die mittels DMMB-Assay auf ihren GAG-Gehalt hin untersucht wurden, wurde ebenfalls mit Hilfe des Picogreen-Assays der DNA-Gehalt bestimmt, um eine Aussage über die GAG-Produktion pro Zelle zu ermöglichen. Hierzu wurde die zweite Hälfte der Lösung aus dem Proteinase K Verdau (siehe 3.2.3.2) 1:50 mit TE-Puffer verdünnt. Je  $100\mu\text{l}$  dieser Verdünnungslösung wurden in eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte überführt und 1:1 mit Picogreenfärbelösung vermengt. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Proben mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=485\text{nm}$  angeregt und ihre Emission bei der Wellenlänge  $\lambda=535\text{nm}$ , der Wellenlänge, mit der an die DNA gebundenes PicoGreen fluoresziert, gemessen. Zur Quantifizierung der DNA-Konzentration in den Proben wurde eine DNA-Standardverdünnungsreihe mitgeführt und ebenfalls mit Picogreenfärbelösung versetzt. Es wurde bei allen untersuchten Proben eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 3.3.3.4 *Isolation und Quantifizierung der GesamtRNA*

Zur Isolierung der RNA wurden je 3 Konstrukte pro Kondition und Zeitpunkt in einem Milliliter Trifast, einer einphasigen Guanidinisothiocyanat/Phenol Lösung, welche Zellen lysiert und deren Proteine denaturiert, aufgenommen und mit Hilfe eines RNase freien Polytrons homogenisiert. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden der Lösung  $200\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt, gevortext und daraufhin zentrifugiert (15min; 13000rpm;  $20^{\circ}\text{C}$ ), um eine Trennung der Lösung in eine RNA-haltige, eine DNA-haltige und eine proteinhaltige Komponente zu erreichen. Im Anschluss wurde die wässrige RNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. In dieses wurden dann  $500\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben, das Gemisch 20min auf Eis inkubiert und die RNA per Zentrifugation (15min; 13000rpm;  $4^{\circ}\text{C}$ ) pelletiert. Nach mehreren Waschschritten mit 75% Ethanol wurde die gewonnene Gesamt RNA in  $40\text{-}60\mu\text{l}$  RNase-freiem 10 mM Tris HCl aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Prozessierung gelagert. Die Konzentration der gewonnenen Gesamt RNA pro  $\mu\text{l}$  wurde photometrisch ( $\lambda=260\text{nm}$ ) mit Hilfe des Nanodrop Spektrometers bestimmt.

### 3.3.3.5 *Reverse Transkription von mRNA in cDNA*

Um eine Polymerasekettenreaktion durchführen zu können, muss zunächst aus dem mRNA-Anteil der GesamtRNA eine cDNA synthetisiert werden. Hierzu wurde ein Mikrogramm GesamtRNA in einem Volumen von  $9\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser  $1\mu\text{l}$  Oligo (dT) Primer ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zugesetzt und dann

gemeinsam zur Denaturierung für 10min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden diesem Ansatz je 1 µl RNase out (40 U/ml), 2 µl RT-Puffer, 1 µl dNTP's (5 mM), und 5 µl Wasser hinzugefügt. Im Anschluss an 2 Minuten Inkubation bei 42°C wurde jeder Probe 1µl Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/ml) zugesetzt und der Ablauf der Reversen Transkription bei 37°C ermöglicht. Nach 60min wurde der Vorgang durch Erhitzen auf 93°C abgestoppt. Die generierte cDNA wurde dann bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### 3.3.3.6 *Quantitative Polymerase-Kettenreaktion*

Die synthetisierte cDNA wurde 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt und jeweils 2µl dieser Verdünnung wurde mit 12,5µl SYBR® Green Mix, 9,5µl RNase freiem H<sub>2</sub>O sowie je 0,5µl des forward und reverse Primer vermengt und zur Durchführung einer quantitativen real-time PCR (qPCR) genutzt. Im Unterschied zur klassischen Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht diese durch Nutzung von interkalierenden Farbstoffen (SYBR® Green) die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte in Echtzeit. SYBR® Green wird in jede neu synthetisierte doppelsträngige DNA eingelagert und emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=494\text{nm}$  Licht der Wellenlänge  $\lambda=521\text{nm}$ . Dieses emittierte Licht wird nach jedem Zyklus durch die PCR-Maschine detektiert und quantifiziert. Im Rahmen der qPCR laufen 40 gleichförmige Zyklen aufeinanderfolgend ab. Jeder einzelne Zyklus besteht aus den folgenden Anteilen:

10 min	95°C	
20 s	40x	95°C (Aufschmelzen)
10 s		spezifisch für das jeweilige Primerpaar (58° oder 60°; Annealing)
30 s		72°C (Verlängerung der neuen DNA-Stränge)
10 s		95°C
60 s		65°C (Anstieg um je 1°C/s)
1 s		97°C (Schmelzkurvenanalyse)

Der Zyklus, bei dem das emittierte Lichtsignal zum ersten Mal signifikant höher ist als das detektierte Hintergrundsignal, wird als Threshold Cycle ( $C_t$ ) bezeichnet. Die  $C_t$ -Werte der untersuchten Gene wurden dann in Relation zum  $C_t$ -Wert eines mitgeführten Referenzgenes (RPL13 für MSC oder GAPDH für pCHO) gesetzt und so mittels der unten genannten Formel die relative Genexpression berechnet. Es wurden nur Gene in die Auswertung einbezogen, deren Schmelzkurven den für das Gen spezifischen Verlauf zeigten und deren Amplifikationsprodukt mittels Gelelektrophorese verifiziert wurde.

$C_t$ -Wert des Referenzgens –  $C_t$ -Wert Gen =  $\Delta C_t$ -Wert

Relative Genexpression in % =  $1,8^{\Delta C_t\text{-Wert}} \times 100$

### 3.3.3.7 *Gelelektrophorese*

Zur Verifizierung der Spezifität der qPCR-Amplifikationsprodukte wurden diese mit je 5µl Gel-Lade-Puffer versetzt und auf ein, mit dem Farbstoff PeqGreen versetztes 1,5% Agarose-Gel (2,25g Agarose in 150ml TAE-Puffer) aufgetragen. Durch Elektrophorese mit einer Spannung von 120V für 35min wurden die enthaltenen PCR-Produkte entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Mittels Anregung des Farbstoffs Peqgreen, der an die Amplifikationsprodukte gebunden wird, wurden diese optisch

dargestellt. Anhand des mitgeführten Längenstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder wurde die Länge der detektierten Fragmente bestimmt.

### 3.3.3.8 Kollagen detektion mittels Western Blot

#### Kollagenisolierung aus Kulturüberständen und Hydrogelkonstrukten

Zum Nachweis von Kollagen Typ II und Kollagen Typ X mittels Western Blot müssen die abgelagerten Kollagene zunächst mittels einer Fällungsreaktion aus den Konstrukten und Überständen isoliert werden. Hierzu wurden die Konstrukte zunächst mit einem Stößel zerkleinert. Die Überstände konnten direkt verwendet werden. Beide Arten von Proben wurden mit Pepsinlösung versetzt und über Nacht bei 4° C unter Rotation verdaut. Anschließend wurden die Lösungen mit Tris Base auf pH 7 eingestellt und schrittweise je 4,5M NaCl in jeder Probe gelöst. Nach erneuter Inkubation bei 4° C für 16 Stunden erfolgte ein Zentrifugationsschritt (14000rpm, 30min, 4°C). Das so gewonnene Präzipitat wurde in Präzipitationspuffer resuspendiert und zur Fällung der Kollagene mit einem dreifachem Volumen 100% Ethanol versetzt und für 4 Stunden bei -20°C inkubiert. In Anschluss an die Inkubation wurde die Lösung erneut abzentrifugiert und so ein Kollagenpellet isoliert. Dieses wurde in Lysepuffer aufgenommen und bis zur Durchführung des Western Blots bei -20°C gelagert.

#### Auftrennung und Transfer der isolierten Kollagene

Das gewonnene Kollagenlysat wurde hitzeinaktiviert und die enthaltenen Proteine durch Zugabe von Ladepuffer entsprechend ihres Molekulargewichts positiv geladen. Die Kollagenlösung wurde dann auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die enthaltenen Proteine mittels Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierzu wurde zunächst für ca. 20min eine Spannung von 80V zum Durchlaufen des 5% Sammelgels angelegt, dann wurden die Proteine bei 120V für ca. 75min in einem 8% Trenngel aufgetrennt. Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand eines mitgeführten Standards (Precision Plus Protein Standards™ Dual Color) bestimmt. Der Transfer der Proteine aus dem SDS- Polyacrylamid Gel auf eine Nitrocellulose-Transfermembran erfolgte in einem sogenannten Wetblot System. Hierbei wurden 3 Lagen Filterpapier, das SDS-Gel, die Nitrocellulose-Transfermembran und weitere 3 Lagen Filterpapier in Transferpuffer getränkt und in der genannten Reihenfolge in einer Wetblot Kammer aufeinander geschichtet. Zum Blotten der Proteine wurde die WetBlot Kammer für 120min bei einer angelegten Spannung von 120 V in Transferpuffer inkubiert.

#### Detektion von Kollagen Typ II und Kollagen Typ X

Zur Detektion der beiden Kollagentypen wurde die Nitrocellulose- Transfermembran zunächst direkt oberhalb der 75kDa mit Hilfe eines Skalpell's zerteilt. Die unspezifischen Bindestellen beider Anteile wurden dann durch einstündige Inkubation in Blockierlösung blockiert. Der obere Anteil der Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C unter fortlaufender Rotation in einem 1:1000 verdünnten primären Kollagen Typ II Antikörper (Molekulargewicht Kollagen Typ II: 148kDa), der untere Anteil unter entsprechenden Bedingungen in einem 1:500 verdünnten Kollagen Typ X Antikörper inkubiert (Molekulargewicht Kollagen Typ X: 62kDa). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden beide Membranhälften für 1 Stunde in einen 1:5000 verdünnten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper überführt. Sowohl beide Primär- als auch der Sekundärantikörper wurden mit Blockierlösung verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des HRP Lumi-Light Western Blotting Substrates nachgewiesen.

### 3.3.4 Histologische Methoden

#### 3.3.4.1 Fixierung und Paraffineinbettung der Präparate

##### Nicht kalzifizierte Hydrogelkonstrukte

Nicht kalzifizierte Proben wurden zunächst für 2h in 4% PFA fixiert und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH) für jeweils eine Stunde entwässert. Die Präparate wurden dann für 20min im Aceton inkubiert, anschließend in flüssiges Paraffin überführt und in diesem für 2 Stunden (Fibrinpräparate und P(AGE/G)HA-SH) bzw. für 24 Stunden (StarPEG/Heparin Gele) gelagert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Präparate in frisches Paraffin überführt, das über Nacht zur Aushärtung bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Rahmen der Etablierung wurden einige der genannten Parameter variiert um das hier beschriebene, optimale Protokoll zu entwickeln.

##### Kalzifizierte Hydrogelkonstrukte

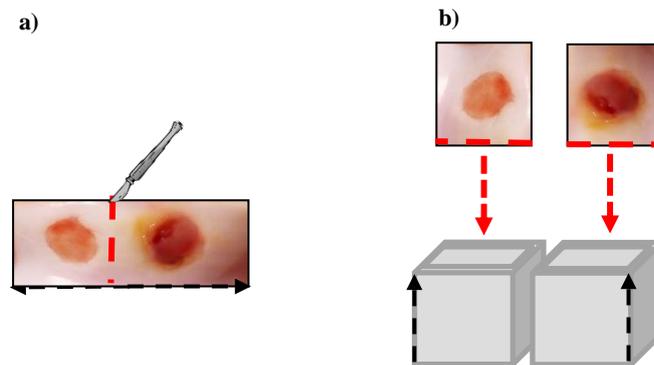
Der Kalzifizierungsgrad der Proben wurde zunächst per Micro-CT Analyse bestimmt und die Präparate entsprechend prozessiert (siehe 3.2.7.1). Anschließend wurden die Präparate mit PBS rehydriert und für 48 Stunden in Bouin'scher Lösung teilkalkt. Im Folgenden wurde mit der Entwässerung begonnen und die Proben entsprechend dem Vorgehen bei nicht kalzifizierten Präparaten weiterbehandelt.

##### Dreischichtige Konstrukte

Nach Fixierung der Konstrukte für 48h in 4% PFA, wurden diese mit Hilfe eines Skalpells senkrecht zu den 3 Schichten halbiert. Die eine Hälfte der Konstrukte wurde anschließend für 48h in Bouin'scher Lösung, die andere Hälfte für 72h unter ständiger Rotation in EDTA entkalkt. Die weitere Prozessierung erfolgte entsprechend den nicht kalzifizierten Hydrogelkonstrukten.

##### Explantate aus den Schweinekondylen

Direkt nach der Euthanasie wurde die mediale Kondyle des Femurs mit Hilfe einer Säge geerntet und zur Fixierung für 72h in 4% PFA (Wechsel des 4% PFA nach 12h) überführt. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurden die Konstrukte zur Entkalkung in EDTA verbracht. Das EDTA wurde 5x wöchentlich gewechselt. Per Nadelstichkontrolle wurde der Entkalkungsgrad der Präparate regelmäßig kontrolliert und über die Beendigung der Entkalkung ( $\emptyset$  nach 2 ½ Monaten) entschieden. Im Anschluss an die Entkalkung wurden die explantierten Schweinekondylen mit Hilfe eines Skalpells zerteilt um die beiden Defekte zu separieren und getrennt weiter zu prozessieren (Abb. 8a). Dann wurden die Konstrukte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70% und 96% Isopropanol für 3d, 100% Isopropanol für 1d) und anschließend für 12h in Aceton inkubiert. Die Konstrukte wurden anschließend für 60h in flüssigem Paraffin gelagert (Wechsel des Paraffins nach 24h) dann in frisches Paraffin überführt, das über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet wurde. Die Explantate wurden beim Einbetten auf die Schnittkante, die durch die Trennung des proximalen vom distalen Defekt entstanden ist, positioniert (Abb. 8b).



**Abbildung 10: Histologische Einbettung der Schweinekondylen.** a) Trennung des distalen und des proximalen Defekts (rote Linie) mit Hilfe eines Skalpell; b) Orientierung der Präparate im Paraffinblock; Schnittrichtung bei Anfertigung der histologischen Serienschnitte (Schwarze Pfeile)

#### 3.3.4.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 5µm dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Konstrukten angefertigt. Diese wurden dann kurz zum Austrecken in ein Wasserbad überführt und anschließend auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte zum Trocknen zunächst für 20min auf eine auf 37°C eingestellte Wärmeplatte, dann für 48h in einem auf 42°C beheizten Brutschrank gelagert. Bei den Explantaten aus den Schweinekondylen wurde die Defektbreite in den angefertigten Schnitten gemessen, zur Färbung wurden nur Schnitte mit einer Defektbreite > 4mm verwendet. Für alle vergleichenden Darstellungen verschiedener histologischer Färbungen wurden Serienschnitte verwendet.

#### 3.3.4.3 Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Vor jeder Art der Färbung wurden die angefertigten Paraffinschnitte zunächst entfettet und rehydriert. Hierbei wurden sie zunächst für 4 x 10min in Rotihistol, einem organischen Lösungsmittel, inkubiert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50% Isopropanol) rehydriert.

#### 3.3.4.4 Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin

Zur Darstellung der verschiedenen Gewebearten wurde je ein Schnitt aller in vivo Präparate nach Entparaffinierung und Rehydratation für 6 min mit Hämalaun gefärbt (Zellkernfärbung) und zur Farbintensivierung für 20min in Leitungswasser gebläut. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte für 1min in einer 1% Eosin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über 96% und 100% Isopropanol wieder dehydriert und nach erneutem Durchlaufen der Rotihistolreihe mit Neomount luftdicht eingedeckelt.

#### 3.3.4.5 Färbung der Alkalischen Phosphatase

Im Anschluss an die Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase für 20min mit ALP-Färbelösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS erfolgte die erneute Dehydrierung. Alle folgenden Schritte entsprechen dem Vorgehen bei der Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin. In den Zellen vorhandene Alkalische Phosphatase wird durch die Umsetzung des in der Färbelösung enthaltenen NBT/BCIP- Substrat grauschwarz dargestellt.

#### 3.3.4.6 *Safranin-O Färbung zum Nachweis von Proteoglykanen*

Während der Chondrogenese lagern Zellen Proteoglykane ab, die mit Hilfe der Safranin O Färbung orangerot dargestellt werden können. Hierzu wurden die Schnitte für 25min in einer 0,2% Safranin-O Färbelösung inkubiert und anschließend für 25s mit einer 0,04% Fast Green Lösung gegengefärbt. Im Folgenden wurden die Schnitte entsprechend dem Vorgehen bei der Hämalaun und Eosin Färbung dehydriert und eingedeckelt. Aufgrund ihres intrinsischen Proteoglykangehalts konnte diese Färbung bei den verwendeten Hydrogelen mit Ausnahme des Fibrinhydrogels nicht angewendet werden.

#### 3.3.4.7 *Masson-Goldner Färbung zum Nachweis verschiedener Stadien der enchondralen Ossifikation*

Im Zuge der enchondralen Ossifikation durchlaufen Knorpelzellen verschiedene Stadien, die mit Hilfe der Masson-Goldner Färbung differenziert dargestellt werden können. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte wurden diese entsprechend der Herstellervorgaben mit einem Masson-Goldner Färbekit gefärbt. Hierbei wurden zunächst die Zellkerne durch 5min Inkubation in einer Eisen-Hämatoxylin-Lösung angefärbt. Dann wurden die Schnitte zunächst für 10min mit Azophloxin, anschließend für 1min mit Phosphorwolframsäure- Orange G und abschließend für 3min in Lichtgrün SF inkubiert. Zwischen den einzelnen Färbeschritten erfolgten je drei Waschschritte in 1% Essigsäure. Die Dehydrierung und das Eindeckeln der Schnitte erfolgte entsprechend dem Vorgehen bei der Hämalaun und Eosin Färbung.

#### 3.3.4.8 *Immunhistologischer Nachweis von Kollagen Typ II*

Nach entsprechender Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Antigene durch enzymatischen Verdau zunächst für 15min mit Hyaluronidase (4mg/ml), anschließend für 30min mit bovinem Pepsin (3,6mg/ml) jeweils bei 37°C, freigelegt. Unspezifische Bindestellen wurden im Anschluss durch Inkubation in einer 5% bovinen Serumalbuminlösung bei Raumtemperatur geblockt. Zwischen allen genannten Schritten wurden die Schnitte mehrfach mit PBS gewaschen. Im Anschluss an das Blockieren wurde ein, einprozentig in Serumalbuminlösung gelöster, Maus anti-human Kollagen Typ II Primärantikörper aufgetragen und die Schnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde nach mehrmaligem Waschen mit TBS ein biotynilierter Ziege anti-maus IgG Sekundärantikörper auf die Schnitte aufgebracht. Nach 30min Inkubationszeit wurden die Schnitte zunächst mit TBS gewaschen, dann erfolgte das Auftragen einer Alkalischen Phosphatase-Lösung (30min). Die ALP wird über Streptavidin an den Sekundärantikörper gekoppelt. Anschließend wurde für 15min der Farbstoff Fast Red aufgetragen. Dieser bildet einen roten Farbkomplex mit Naphthol, das in Anwesenheit von ALP aus Naphthol-phosphat entsteht. Die rote Färbung erscheint daher nur dort, wo ALP und somit Primär- und Sekundärantikörper an den Schnitt gebunden sind. Abschließend erfolgte die Kerngegenfärbung durch Inkubation in Hämatoxylin für 6min und das Eindeckeln in Aquatex. Bei jeder durchgeführten Immunhistologie wurde eine Negativkontrolle ohne aufgetragenen Primärantikörper mitgeführt.

#### 3.3.4.9 *In-situ Hybridisierung humaner, muriner und porziner DNA*

Auf die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte folgte zunächst der enzymatische Verdau mit Proteinase K Lösung bei 37°C (15min). Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 10min bei Raumtemperatur in Triethanolamidhydrochloridlösung inkubiert. Dann folgte nach einem erneuten Waschschritt das Auftragen des Hybridisierungsmixes für 30min bei 42°C. Durch die im Mix

enthaltene Heringssperma DNA wurden unspezifische Bindungen in diesem Schritt geblockt. Für den anschließenden Hybridisierungsschritt wurden bereits etablierte DIG-gelabelte DNA-Sonden (DIG SINE/B1, SINE/B2 zum Nachweis muriner DNA; DIG ALUYb8 zum Nachweis humaner DNA; DIG pSINE zum Nachweis porciner DNA) gelöst in Hybridisierungsmix (50ng/ $\mu$ l) aufgetragen, die Schnitte für 3min auf 93°C erhitzt und dann für 3min auf 4° C abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte für 16h bei 42°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach mehreren Waschschritten in 0,1% SSC-Lösung die Äquikalibrierung mit DIG-Puffer 1 (1min). Dann wurden unspezifische Bindestellen durch 15min Inkubation in Blockierungslösung blockiert, bevor für 1h ein ALP-konjugierter Schaf Anti-Digoxigenin Antikörper aufgetragen wurde. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mit DIG-Waschpuffer wurden die Schnitte für 3min mit DIG- Puffer 3 äquikalibriert. Abschließend wurde für 15min NBT/BCIP- Substratlösung aufgetragen. Diese wird durch die am Antikörper gebundene ALP umgesetzt und färbt so den Antigen-Antikörperkomplex grau-schwarz an. Nach Abstoppen der Reaktion durch Aqua dest. wurden die Schnitte eingedeckelt. Zum Nachweis der Spezifität der angewendeten Färbemethode wurde bei jeder Färbung sowohl eine Positivkontrolle (Pellets aus humanen Stammzellen für ALU, Pellets aus porcinen Stammzellen für porcine *Sine*, muriner Embryo für *Sine* A/B) als auch eine Negativkontrolle (Muriner Embryo für ALU/porcine *Sine* und menschlicher Daumen für *Sine* A/B) mitgeführt.

#### *3.3.4.10 Messung des Kontakts zwischen Knochenplatte und Gewebekleber nach der histologischen Prozessierung*

Zur Messung des Kontakts zwischen der Knochenplatte und dem Gewebekleber der dreischichtigen Konstrukte wurde je ein histologischer Schnitt pro Konstrukt mit der Software ImageJ<sup>®</sup> ausgewertet. Hierbei wurde zunächst bei jeder Fotografie anhand des Maßstabsbalkens die Anzahl an Pixeln pro mm bestimmt. Dann wurde manuell eine Linie entlang der Grenze zwischen Knochenplatte und Gewebekleber gelegt und diese mit Hilfe des Programms vermessen. Im Anschluss wurden manuell alle Bereiche markiert und mittels ImageJ<sup>®</sup> vermessen, bei denen zwischen der Knochenplatte und dem Gewebekleber Kontakt bestand. Die gemessene Kontaktlänge wurde dann in Relation zur Länge der ganzen Grenzlinie gesetzt.

#### *3.3.4.11 Alizarinrot Färbung zum Nachweis von Ca<sup>++</sup>-Einlagerungen*

Zum Nachweis von Ca<sup>++</sup>-Einlagerungen wurden die im Monolayer osteogen differenzierten MSC zunächst mit 70% EtOH bei 4°C fixiert. Nach einem Waschschriff mit Aqua dest. wurde für 10min Alizarinrot Färbelösung aufgetragen. Das Alizarinrot bildet mit dem in den Zellen gebunden Calcium einen roten Farbkomplex. Anschließend wurden durch mehrfaches Waschen mit Aqua dest. sämtliche Reste der Färbelösung entfernt und das Färberesultat fotografisch festgehalten.

#### *3.3.4.12 Ölrot-O Färbung zum Nachweis von Lipideinlagerungen*

Die im Monolayer adipogen differenzierten MSC wurden zum Nachweis von Lipideinlagerung zunächst für 30min bei 4°C in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gewaschen und für 5min in 60% Isopropanol inkubiert. Über das Auftragen der Ölrot-O Gebrauchslösung für 15min erfolgte das Anfärben eingelagerter Fetttropfchen. Nach einem Waschschriff und einer erneuten Inkubation in 60% Isopropanol für 5min wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin (6min) durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen mit Leitungswasser wurde das Ergebnis abschließend fotografisch dokumentiert.

### 3.3.5 Mikro-CT Analyse

#### 3.3.5.1 Vorbereitung der Proben für den Mikro-CT Scan

Die nach einer chondrogenen Vorkultivierung ektop implantierten zellhaltigen Fibrinpellets wurden explantiert und zunächst für 2 Stunden in 1ml 4% PFA fixiert. Sie wurden dann in ein 2ml Eppendorfgefäß mit 1ml 70% Ethanol überführt und, um Artefakte im Scan durch die fortschreitende Entwässerung des Konstrukts zu vermeiden, nach 24h in diesem Gefäß gescannt. Die dreischichtigen osteochondralen Konstrukte (siehe 3.2.2.6) sowie die explantierten Schädeldecken am Tag 0 wurden direkt nach Explantation auf einen Styroporbalken gelegt und auf diesem gegen Luft gescannt. Um das Austrocknen der Proben zu verhindern wurden der Styroporbalken in einem 5ml Eppendorfgefäß gescannt, das als feuchte Kammer genutzt wurde.

#### 3.3.5.2 Mikro-CT Scan

Der Mikro-CT Scan der nach einer chondrogenen Vorkultivierung ektop implantierten zellhaltigen Fibrinpellets wurde mit einem 0,025mm Titanfilter durchgeführt. Die Auflösung betrug 9 $\mu$ m, die angelegte Spannung 65kV bei einer Stromstärke von 153 $\mu$ A. Über 180° wurden Bilder im Abstand von 0,4° erstellt, jedes Bild wurde 1000ms belichtet. Die dreischichtigen Konstrukte sowie die Schädeldecken an Tag 0 wurden ebenfalls mit einem 0,025mm Titanfilter und einer Auflösung von 9 $\mu$ m gescannt. Die angelegte Spannung betrug 59kV bei einer Stromstärke von 167 $\mu$ A. Es wurde ein 360° Scan durchgeführt, bei dem Bilder im Abstand von 0,6° mit einer Belichtungszeit von 1250ms aufgenommen wurden. Bei allen durchgeführten Scans wurden jeweils 3 Einzelbilder gemittelt.

#### 3.3.5.3 Rekonstruktion und 3D-Analyse der Mikro-CT Scans

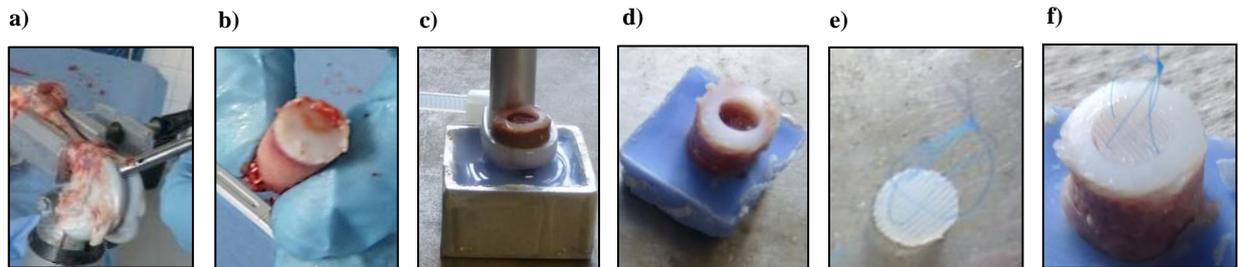
Die Errechnung der Rekonstruktionsbilder aus den aufgenommenen Röntgenbildern erfolgte mittels des Programms NRecon unter Verwendung folgender Einstellungen: Weichzeichnen (Smoothing) 1, Ringartefaktreduktion 15, Reduktion der Röntgenstrahlenhärte (Beam-hardening) 30%, Korrektur von Defektpixeln (defectpixel masking) 5% und automatischer Korrektur von Überlagerungsfehlern (Misalignment). Als zu rekonstruierender Grauwertbereich wurde für die nach einer chondrogenen Vorkultivierung ektop implantierten zellhaltigen Fibrinpellets 0,00- 0,085 sowie für die dreischichtigen osteochondralen Konstrukte 0,00-0,12 gewählt. Mittels des Programms CTVox wurden 3D-Darstellungen der Konstrukte errechnet. Zur Berechnung des Knochenvolumens und der Knochenoberfläche wurde das Programm CTAnalyser verwendet. Hierbei wurde als Auswertebereich (Region of Interest = ROI) für die nach einer chondrogenen Vorkultivierung ektop implantierten zellhaltigen Fibrinpellets ein rundes Areal mit 500 Pixel Durchmesser definiert und über 501 Schnittbilder analysiert. Grauwerte von 40 bis 255 wurden hierbei als Knochen definiert. Für die dreischichtigen Konstrukte wurden ein rechteckiges ROI über 700 Ebenen ausgewertet. Ein Grauwertbereich zwischen 50 und 255 wurde als Knochen betrachtet.

### 3.3.6 Methoden zur Bestimmung der Adhäsionskraft von Gewebeklebern

#### 3.3.6.1 Herstellung der Testpräparate

Aus Kniegelenken von Schlachtschweinen wurden mit Hilfe eines Hohlbohrers runde Knorpel-Knochenzylinder mit einem Durchmesser von 10mm und einer Höhe von 3-6cm ausgesägt (Abb.11a). Die Zylinderenden wurden mittels Skalpell begradigt. Im Anschluss wurden die Zylinder in nach Herstellerangaben angemischtes Beracryl® eingegossen (Abb. 11c). Hierzu wurden eine 1x1cm große

Metallform und 12ml des Knochenzements verwendet. Nach Aushärtung des Knochenzements (40min) wurde mittels einer Biopsiestanze aus der Zylinderoberfläche ein rundes Knorpelareal mit 6mm Durchmesser bis zur subchondralen Knochenplatte ausgestanzt (Abb.11 d). In dieses Areal wurden die parallel angefertigten Hydrogel-CCT-Präparate mit den verschiedenen Gewebeklebern eingeklebt (Abb. 11f). Die Präparate wurden entsprechend der Herstellung von CCT-Hydrogelkonstrukten (siehe 3.2.2.4) angefertigt mit dem Unterschied, dass vor dem Eingießen der Hydrogele mit einer 6/0 Nadel-Faden-Kombination eine Aufhängung in das CCT eingenäht wurde.



**Abbildung 11: Herstellung eines Testpräparats zur Bestimmung der Adhäsionskraft.** a)-b) Ausbohren des Knorpel-Knochen-Zylinders aus einem Schachtschwein-Knie; c) Eingießen des Zylinders in Beracryl®; d) Ausstanzen eines Knorpeldefekts; e) CCT verstärktes Hydrogelkonstrukt mit Fadenöse; f) fertiges Testpräparat

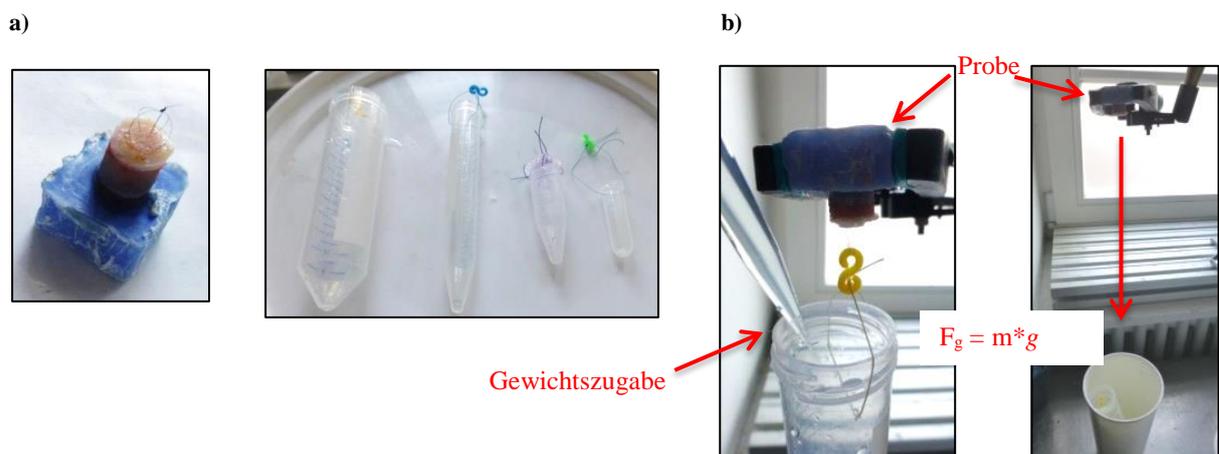
### 3.3.6.2 Auszugsmessung zur Bestimmung der Adhäsionskraft

Die fertigen Präparate (Abb. 12a) wurden nach 5min Trocknungszeit des Klebers mit dem CCT-Hydrogelkonstrukt zum Boden zeigend in einen Schraubstock eingespannt. An der eingenähten Fadenöse wurde ein Haken eingehängt, an welchem im Folgenden die verschiedenen Flüssigkeitsgefäße (5ml Eppendorfgefäß, 15ml Falcon, 50ml Falcon) befestigt wurden. Dann wurden schrittweise bis zum Versagen des Klebers je 500µl H<sub>2</sub>O in das jeweils angehängt Gefäß zugegeben. Aus der Summe des Gewichts des angehängten Gefäßes und der Flüssigkeit konnte dann mit unten genannter Formel die Gewichtskraft berechnet werden, die benötigt wurde um zum Versagen des Klebers zu führen (Abb.12b).

$$F_g = m \times g$$

$$g = 9,81 \text{ m/s}^2 \text{ (Erdbanziehungskraft)}$$

$$m = \text{Summe (Gewicht Gefäß + Gewicht Flüssigkeit) in g}$$



**Abbildung 12: Messung der Adhäsionskraft eines Gewebeklebers.** a) Präparat mit Fadenöse und Gefäße zum Anhängen an diese Öse b) schrittweise Steigerung des angehängten Gewichts (Flüssigkeitszugabe) bis zum Versagen des Gewebeklebers

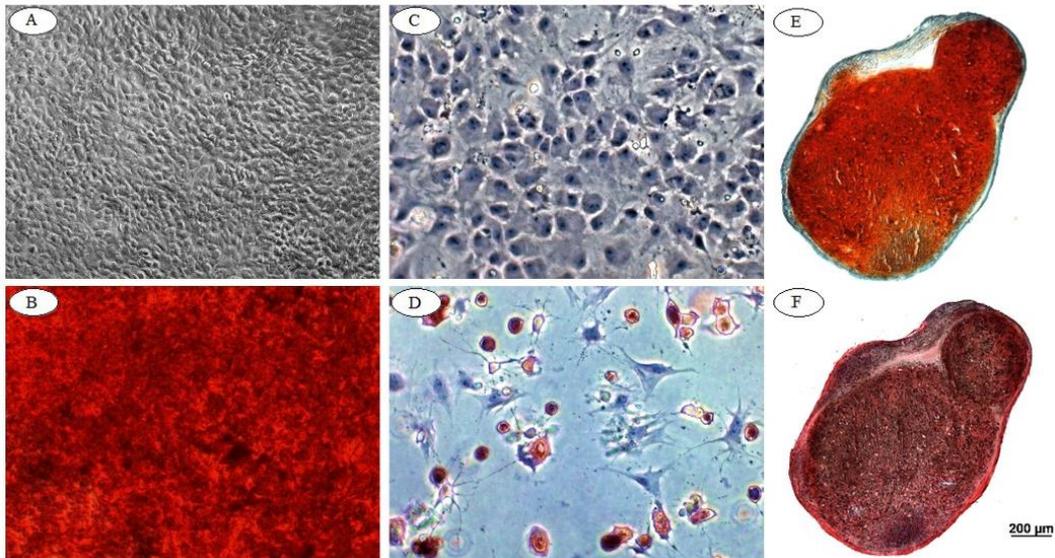
### **3.3.7 Statistische Analysen**

Die statistischen Analysen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit dem Programm SPSS 16.0 (SPSS 16.0 Inc, Chicago, USA) berechnet und graphisch dargestellt. Hierbei wurde stets eine nicht-parametrische Datenanalyse gewählt, da aufgrund der geringen Gruppengrößen kein Test auf eine Normalverteilung als verlässlich angenommen wurde. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  gewertet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen miteinander wurden die Daten zunächst mit einem Kruskal-Wallis-Test über alle Gruppen auf vorliegende Signifikanzen geprüft. Wurden durch diesen Test signifikante Unterschiede angezeigt, erfolgte der Vergleich jeweils zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U Test. Das Signifikanzniveau wurde dann mit einem Bonferroni Test korrigiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung von hMSC und pMSC

Um sicherzustellen, dass es sich bei den aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen um MSC handelt wurden je drei Populationen pro Zelltyp in die osteogene, die chondrogene und die adipogene Richtung differenziert. Abb. 13 zeigt beispielhaft die histologische Auswertung eines pMSC Spenders.



**Abbildung 13: Drei-Wege-Differenzierung eines pMSC-Spenders.** A-B: Alizarinrot Färbung einer Monolayerkultur zum Nachweis der osteogenen Differenzierung A) d3, B) d21; C-D: Ölrot-O Färbung einer Monolayerkultur zum Nachweis der adipogenen Differenzierung C) d3, D) d14; E-F: Histologische Schnitte eines Sphäroids nach 42 Tagen chondrogener Differenzierung E) Safranin O Färbung, F) Kollagen Typ II Färbung; n=3

Am Tag 3 der osteogenen Differenzierung konnte mittels der Alizarinrot-Färbung bei keiner der untersuchten Zellpopulationen abgelagertes  $\text{Ca}^{++}$  nachgewiesen werden (Abb. 13A). Am Tag 21 der osteogenen Differenzierung hingegen zeigten sich in der Alizarinrot-Färbung bei allen untersuchten Populationen starke, flächendeckende  $\text{Ca}^{++}$ -Einlagerungen (Abb. 13B), was auf eine fortschreitende osteogene Differenzierung hindeutet.

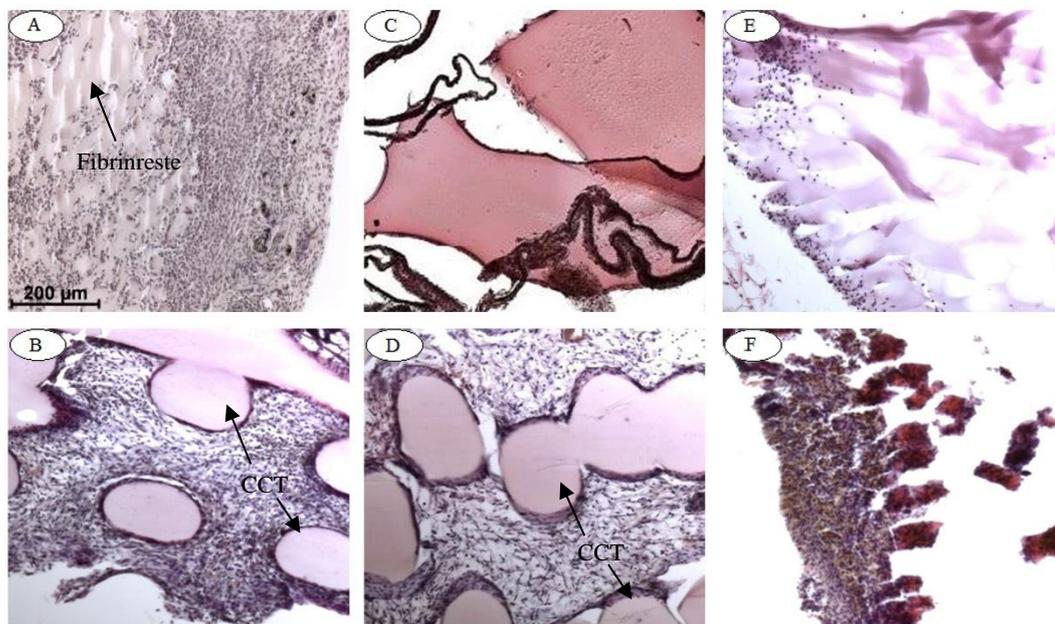
Adipogen induzierten Zellen wurden mit Hilfe der Ölrot-O-Färbung auf mögliche Lipideinlagerungen untersucht. Während am Tag 3 bei keiner der untersuchten Zellpopulationen der Nachweis von Lipiden möglich war (Abb. 13C), konnten am Tag 14 in allen Zellpopulationen rot angefärbte Lipide nachgewiesen werden. Zudem zeigte ein Teil der untersuchten Zellen nach 14 Tagen durch die Einlagerung von Lipidvakuolen eine stark veränderte Zellmorphologie (Abb 13D). Diese Ergebnisse sprechen für ein Fortschreiten der Zelldifferenzierung in die adipogene Richtung.

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit wurden hochdichte Kulturen aller Zellpopulationen nach 42 Tagen in vitro Differenzierung auf die Ablagerung chondrogener Matrixproteine untersucht. Abgelagerte Proteoglykane wurden mit Hilfe der Safranin O-Färbung (Abb. 13E), Kollagen Typ II mittels Immunhistochemie (Abb. 13F) angefärbt. Für alle untersuchten Zellpopulationen (n=3) konnte sowohl eine massive Ablagerung von Proteoglykanen als auch von Kollagen Typ II nachgewiesen werden.

Die isolierten Zellen sind demnach fähig in alle drei untersuchten Richtungen zu differenzieren und erfüllen so eines der Hauptkriterien für die Charakterisierung von MSC.

## 4.2 Biokompatibilität Hydrogelkonstrukten mit und ohne CCT-Verstärkung

Da es sich bei den verwendeten Hydrogelsystemen P(AGE/G)HA-SH und StarPEG/Heparin um neuartige, bisher noch nicht in vivo verwendete Materialien handelt, wurden diese sowohl allein als auch in Kombination mit CCT auf ihre Biokompatibilität hin untersucht. Hierzu wurden  $n = 3$  zellfreie Gele pro Kondition ektop in immunkompetente BDF-1 Mäuse implantiert. Als Positivkontrolle diente das biokompatible Fibrinhydrogel. Die ektopen Konstrukte wurden nach 2 Wochen explantiert und histologisch prozessiert. Mehrere Schnitte der Gele wurden HE gefärbt und auf die Kriterien Zelleinwanderung, Integration in das umliegende Gewebe, Gel-Degradation und adverse Gewebsreaktionen hin untersucht.



**Abbildung 14: Zellfreie Hydrogelkonstrukte nach 14 Tagen ektop in BDF-1 Mäusen (HE-Färbung). Darstellung je eines repräsentativen Schnittes ( $n=3$ ) A) nicht verstärktes Fibrinhydrogel B) CCT verstärktes Fibrinhydrogel; C) nicht verstärktes P(AGE/G)HA-SH Hydrogel; D) CCT verstärktes P(AGE/G)HA-SH Hydrogel; E) nicht verstärktes StarPEG-Heparin Hydrogel; F) CCT verstärktes StarPEG-Heparin Hydrogel**

Zur besseren Vergleichbarkeit und Bewertung der einzelnen Gele wurde ein semi-quantitativer Score entwickelt. Für jedes der genannten Kriterien wurden bei einem positiven, also erwünschten Gelverhalten 2 Punkte, für ein neutrales Gelverhalten 1 Punkt und für ein negatives, nicht erwünschtes Verhalten 0 Punkte vergeben. Das Kriterium Gelresorption wurde mit Ja /Nein bewertet. Die Auswertung der Proben mit Hilfe dieses Scores zeigt Tabelle 3.

**Tabelle 3. Semi-quantitative Bewertung der Biokompatibilität der Hydrogelkonstrukte**

Kriterien	Ohne CellCoTec-Scaffold						Mit CellCoTec-Scaffold											
	Fibrin		P(AGE/G) HA-SH		100% StarPEG		Fibrin		P(AGE/G) HA-SH		100% StarPEG							
Gewebsreaktionen	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
Zelleinwanderung	2	2	2	0	0	0	kA	1	2	2	2	2	2	2	2	kA	kA	kA
Integration	2	2	2	0	0	0	kA	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
Gelresorption	Ja		Nein			Ja			Ja			Ja						
Gesamtpunktzahl	18			6			10			18			18			0		

Die Positivkontrolle Fibrin erreichte sowohl ohne als auch mit Verstärkung durch das CCT-Scaffold die Höchstpunktzahl von 18 Punkten. In allen 6 untersuchten Konstrukten fand Zelleinwanderung statt, die Gelkonstrukte wurden durch Wirtszellen abgebaut und in das umliegende Gewebe integriert. Adverse Wirtsreaktionen gegen das Hydrogel traten nicht auf.

Ohne CCT-Verstärkung wurde bei P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen keine Zellinvasion detektiert, die Integration in das umliegende Gewebe war gering (Abb. 14C). Alle 3 Gele waren vollständig explantierbar, Gelabbau war nicht offensichtlich. Die Aufrüstung der P(AGE/G)HA-SH Hydrogele mit CCT führte überraschenderweise zu einem stark veränderten Gelverhalten. Alle drei verstärkten Gelkonstrukte zeigten sehr starke Zelleinwanderung mit Aufbau eines Regenerationsgewebes und eine gute Integration der Konstrukte in das umliegende Wirtsgewebe. Es kam auch bei den Kombinationskonstrukten zu keinen adversen Wirtsreaktionen. In den CCT-Scaffolds konnten nach 2 Wochen nur geringe P(AGE/G)HA-SH Gelreste nachgewiesen werden (Abb. 14D).

Im Gegensatz zu den nicht verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen wurden alle 3 getesteten nicht verstärkten StarPEG/Heparin-Gele teilweise absorbiert. Um eines der untersuchten StarPEG/Heparin Gele wurde ein Hämatom gebildet, was als adverse Wirtsreaktion gewertet wurde. Bei den beiden verbleibenden Gelkonstrukten konnte Zelleinwanderung und eine gute Integration ins umliegende Gewebe detektiert werden (Abb. 14E). StarPEG/Heparin Hydrogele mit CCT-Verstärkung führten zu starken Gewebsreaktionen der Wirtstiere und zur Bildung von Hämatomen, die zwar ebenfalls in einem vollständigen Gelabbau, jedoch nicht im Aufbau eines Regenerationsgewebes durch die Wirtszellen resultierten. Eine Integration in das umliegende Gewebe fand kaum statt. Die histologische Darstellung dieser Konstrukte gestaltete sich durch das Fehlen einer Matrix im CCT-Scaffold schwierig (Abb. 14F).

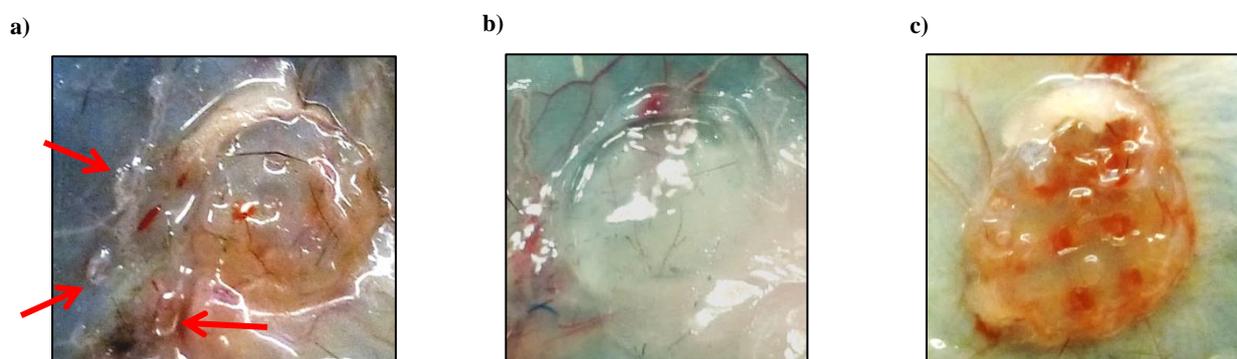
Basierend auf diesen Ergebnissen kann festgestellt werden, dass P(AGE/G)HA-SH Hydrogele in der orthotopen Studie in Kombination mit CCT eingesetzt werden sollten, während StarPEG-Heparin Hydrogele ohne CCT Verstärkung genutzt werden sollten. Hinsichtlich der mitgeführten Positivkontrolle ist festzustellen, dass Fibrinhydrogel zwar eine hohe Biokompatibilität aufweist, jedoch als Trägermaterial im Rahmen des Tissue Engineering nur bedingt geeignet ist, da es sehr schnell durch den Wirtsorganismus abgebaut wird.

### 4.3 Degradation porös gedruckter P(AGE/G)HA-SH Hydrogele in vivo

Als Weiterentwicklung des konventionellen gegossenen P(AGE/G)HA-SH Hydrogels wurden ebenfalls porös 3D-gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele ektop in immunkompetenten Mäusen untersucht. Über das Eindringen von Poren soll durch die starke Vergrößerung der Geloberfläche die Einwanderung von wirtseigenen Zellen gefördert sowie der Gelabbau beschleunigt werden. Da die gedruckten Gele in allen anderen Eigenschaften mit den gegossenen Gelen übereinstimmten, stellte der Vergleich der Zelleinwanderung in die Gele sowie der Gel-Degradation das Hauptziel der durchgeführten Studie dar. Hierzu wurden sowohl gegossene als auch porös gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele mit zwei unterschiedlichen Abbaubarkeitsraten (siehe 3.2.2.5) ektop in BDF-1 Mäuse implantiert. Je vier Konstrukte jedes Konstrukttyps wurden nach 7 Tagen, 14 Tagen und 28 Tagen explantiert und makroskopisch sowie histologisch analysiert. Einige der verwendeten Tiere zeigten häufiges Kratzen und Nagen an den Implantationsstellen. Diese wurden aus Tierschutzgründen am 7 Tage-Zeitpunkt euthanasiert.

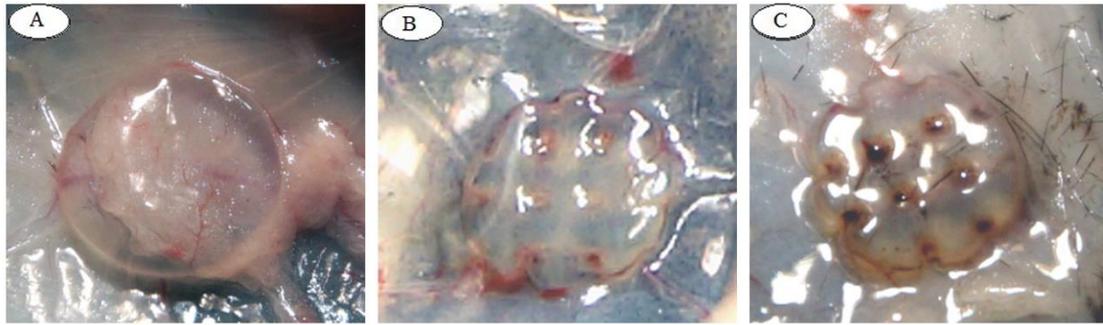
#### 4.3.1 Degradation von P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen nach 1-, 2- und 4-wöchiger ektopter Implantation

Auffällig war bei der makroskopischen Untersuchung der Explantate am Tag 7, dass die Struktur gedruckter Konstrukte aus Tieren, die Abwehrreaktionen zeigten zerstört war (Abb. 15a), während gegossene Gele aus Tieren mit Abwehrreaktionen (Abb. 15b) und gedruckte Konstrukte aus Tieren ohne Abwehrreaktionen sich intakt darstellten (Abb. 15c).



**Abbildung 15: Makroskopische Ansicht porös gedruckter und gegossener P(AGE/G)HA-SH Hydrogele bei Explantation am Tag 7.** a) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel (reduzierte Abbaubarkeit) aus einem Tier mit Abwehrreaktionen (rote Pfeile markieren Gelbruchstücke); b) gegossenes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel aus einem Tier mit Abwehrreaktionen c) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel (reduzierte Abbaubarkeit) aus einem Tier ohne Abwehrreaktionen

Sowohl am Tag 14 (Anhang-Abb. 4) also auch nach 28 Tagen (Abb. 19) konnten alle Konstrukttypen makroskopisch intakt explantiert werden.

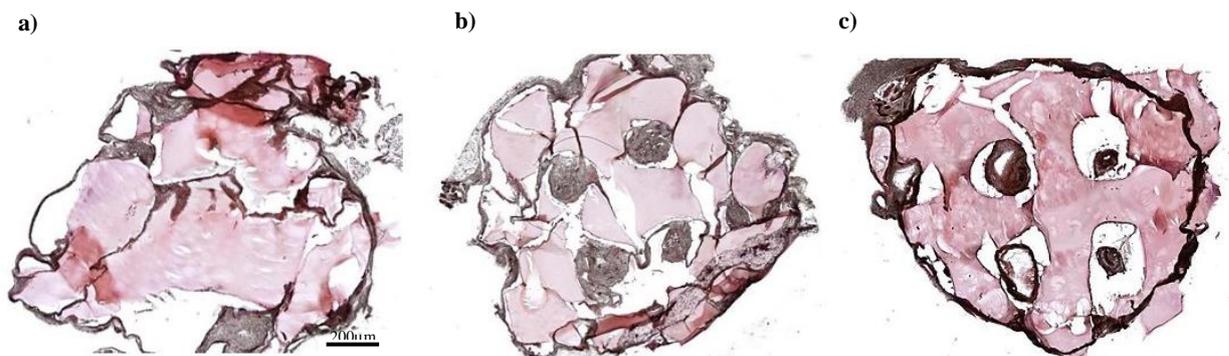


**Abbildung 16: Makroskopische Ansicht porös gedruckter und gegossener P(AGE/G)HA-SH Hydrogele bei Explantation am Tag 28.** A) gegossenes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; B) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; C) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel mit reduzierter Abbaubarkeit

Makroskopisch konnte demnach keine beschleunigte Gel-Degradation durch den porösen Druck der Hydrogele festgestellt werden. Auffällig war jedoch die Zerstörung der Gelstruktur bei porös gedruckten Hydrogelen, die durch die Tiere einer mechanischen Belastung (Beißen, Kratzen) unterzogen wurden. Dies legt nahe, dass porös gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele eine geringere mechanische Stabilität aufweisen als gegossene.

#### 4.3.2 Zelleinwanderung in gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele

Neben der makroskopischen Beurteilung wurden die implantierten Hydrogele auch histologisch analysiert. Beurteilt wurden hierbei neben dem Erhalt der Gelstruktur die Einwanderung von Zellen in die Poren und in das Gel selbst. Hinsichtlich der Zelleinwanderung ist festzustellen, dass zwar bei allen gedruckten Gelen eine gute Füllung der Poren stattgefunden hat, die Einwanderung in die Gele selbst jedoch sowohl bei den beiden gedruckten als auch bei der gegossenen Gelformulierung sehr gering war (Abb. 17).



**Abbildung 17: Histologische Darstellung porös gedruckter und gegossener P(AGE/G)HA-SH Hydrogele bei Explantation am Tag 28 (HE-Färbung).** a) gegossenes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; b) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; c) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel mit reduzierter Abbaubarkeit

Zwischen den beiden gedruckten Gelformulierungen sind sowohl makroskopisch als auch histologisch keine Unterschiede in den untersuchten Kriterien erkennbar. Die massive Zelleinwanderung in die Poren stellt jedoch einen Vorteil der gedruckten gegenüber den gegossenen Gelen dar. Daher wurde für die Implantation in die orthotopen Defekte die Gelformulierung gewählt, die durch das Wirtstier leichter abgebaut und durch endogenes Gewebe ersetzt werden kann.

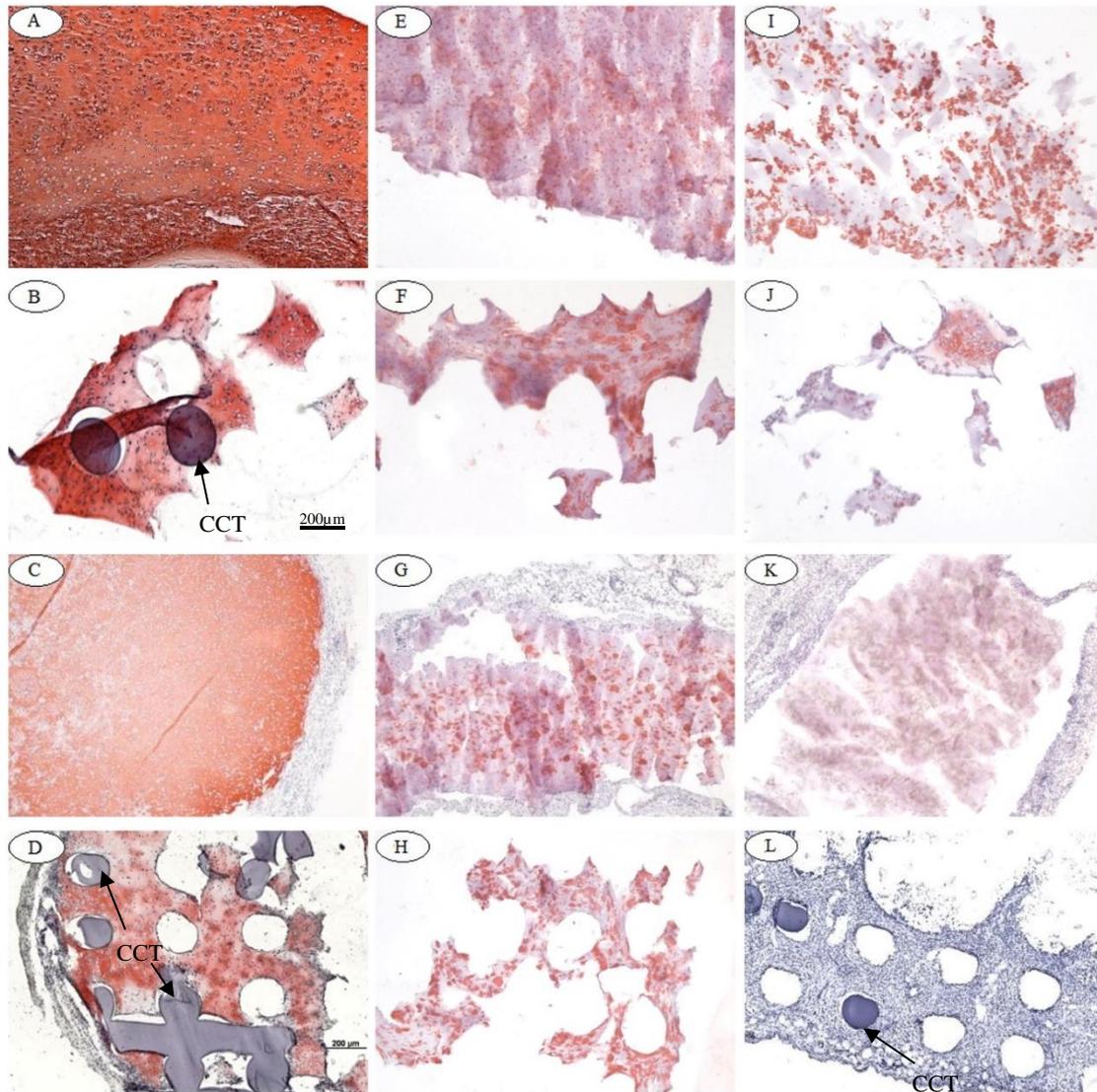
#### 4.4 Redifferenzierung von pCHO in nicht verstärkten und CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten

Sollen CCT verstärkte Hydrogelkonstrukte zukünftig zur Knorpelregeneration eingesetzt werden, müssen diese die chondrogene Differenzierung von Zellen unterstützen. Um nachzuweisen, dass sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Redifferenzierung von Zellen in CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten möglich ist, wurden CCT-Scaffolds (6mm Durchmesser; 2mm Höhe) mit 1,8 Mio pCHO in 60µl Hydrogelvolumen (Fibrin, StarPEG-Heparin, P(AGE/G)HA-SH) beladen. Die Hydrogele wurden mit 50ng TGF-β pro Konstrukt bestückt und für 2 Wochen sowohl *in vitro* (+ 10ng/ml TGF-β) als auch *ektop* in SCID-Mäusen redifferenziert (n = 2 bzw. 3). Als Vergleichsgruppe wurde hierbei das jeweilige Hydrogel ohne CCT Verstärkung, als Positivkontrolle Fibrinhydrogel mitgeführt.

Fibrinhydrogele zeigten sowohl *in vitro* also auch *in vivo* eine über das gesamte Konstrukt verteilte, massive Ablagerung von Kollagen Typ II Matrix (Abb. 18A+C), was für eine gleichmäßige chondrogene Redifferenzierung innerhalb der Konstrukte spricht. Histologisch waren zwischen CCT-verstärkten und nicht verstärkten Hydrogelkonstrukten bei diesem Hydrogeltyp keine Unterschiede in der Kollagen Typ II Ablagerung erkennbar (Abb. 18A-D).

Die untersuchten nicht verstärkten StarPEG-Heparin Hydrogele wiesen einen deutlich geringeren Kollagen Typ II Gehalt auf, wobei *in vivo* differenzierte Konstrukte (Abb. 18G+H) im Vergleich zu *in vitro* kultivierten Konstrukten (Abb. 18E+F) vermehrt Matrix einlagerten. Auffällig war hierbei die perizelluläre Verteilung der abgelagerten Kollagenmatrix in allen StarPEG-Heparin Hydrogelkonstrukten. Auch bei diesem Hydrogeltyp waren histologisch keine Unterschiede hinsichtlich der chondrogenen Redifferenzierung zwischen CCT-verstärkten und nicht verstärkten Konstrukten detektierbar.

Die Kollagen Typ II Ablagerung in P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukten war ebenfalls gering im Vergleich zu den getesteten Fibrinhydrogelkonstrukten und war genauso wie bei den StarPEG-Heparin Hydrogele hauptsächlich perizellulär vorhanden (Abb. 18I). Im Gegensatz zu den StarPEG-Heparin Hydrogelkonstrukten zeigten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukte jedoch eine tendenziell höhere Matrixablagerung während der *in vitro* Kultivierung verglichen mit den *in vivo* differenzierten Konstrukten (vgl. Abb. 18I mit Abb. 18H). Von P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen mit CCT-Verstärkung konnten sowohl bei den *in vitro* als auch bei den *in vivo* differenzierten Konstrukten nur noch geringe oder keine Reste des Hydrogelmaterials in den Schnitten detektiert werden (Abb. 18L). Die noch vorhandenen Fragmente zeigten jedoch ebenfalls perizelluläre Kollagen Typ II Ablagerungen (Abb. 18J).



**Abbildung 18: Redifferenzierung von pCHO in Hydrogelkonstrukten in vitro und in vivo am Tag 14 (Kollagen Typ II Färbung).** A-D: Darstellung je eines repräsentativen Fibrinhydrogelkonstrukts (n=3) A) nicht verstärkt, in vitro; B) CCT verstärkt, in vitro; C) nicht verstärkt, in vivo; D) CCT verstärkt, in vivo; E-H: Darstellung je eines repräsentativen StarPEG-Heparin Hydrogelkonstrukts (n=3) E) nicht verstärkt, in vitro; F) CCT verstärkt, in vitro; G) nicht verstärkt, in vivo; H) CCT verstärkt, in vivo; I-L: Darstellung je eines repräsentativen P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukts (n=2) I) nicht verstärkt, in vitro; J) CCT verstärkt, in vitro; K) nicht verstärkt, in vivo; L) CCT verstärkt, in vivo.

Zunächst ist daher festzustellen, dass sowohl StarPEG-Heparin als auch P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukte die Redifferenzierung von pCHO in vitro und in vivo zulassen, jedoch nicht im selben Ausmaß wie Fibrinhydrogel. Hinsichtlich der Aufrüstung der Fibrin- und StarPEG-Heparin Hydrogele mit einem CCT-Scaffold konnten weder chondrogenesefördernde noch chondrogenesehemmende Effekte beobachtet werden. Für das P(AGE/G)HA-SH Hydrogel kann aufgrund der geringen nachweisbaren Gelmengen keine verlässliche Aussage hinsichtlich möglicher Auswirkungen von CCT getroffen werden.

## 4.5 Auszugsmessungen zur Bestimmung der Adhäsionskraft verschiedener Klebervarianten

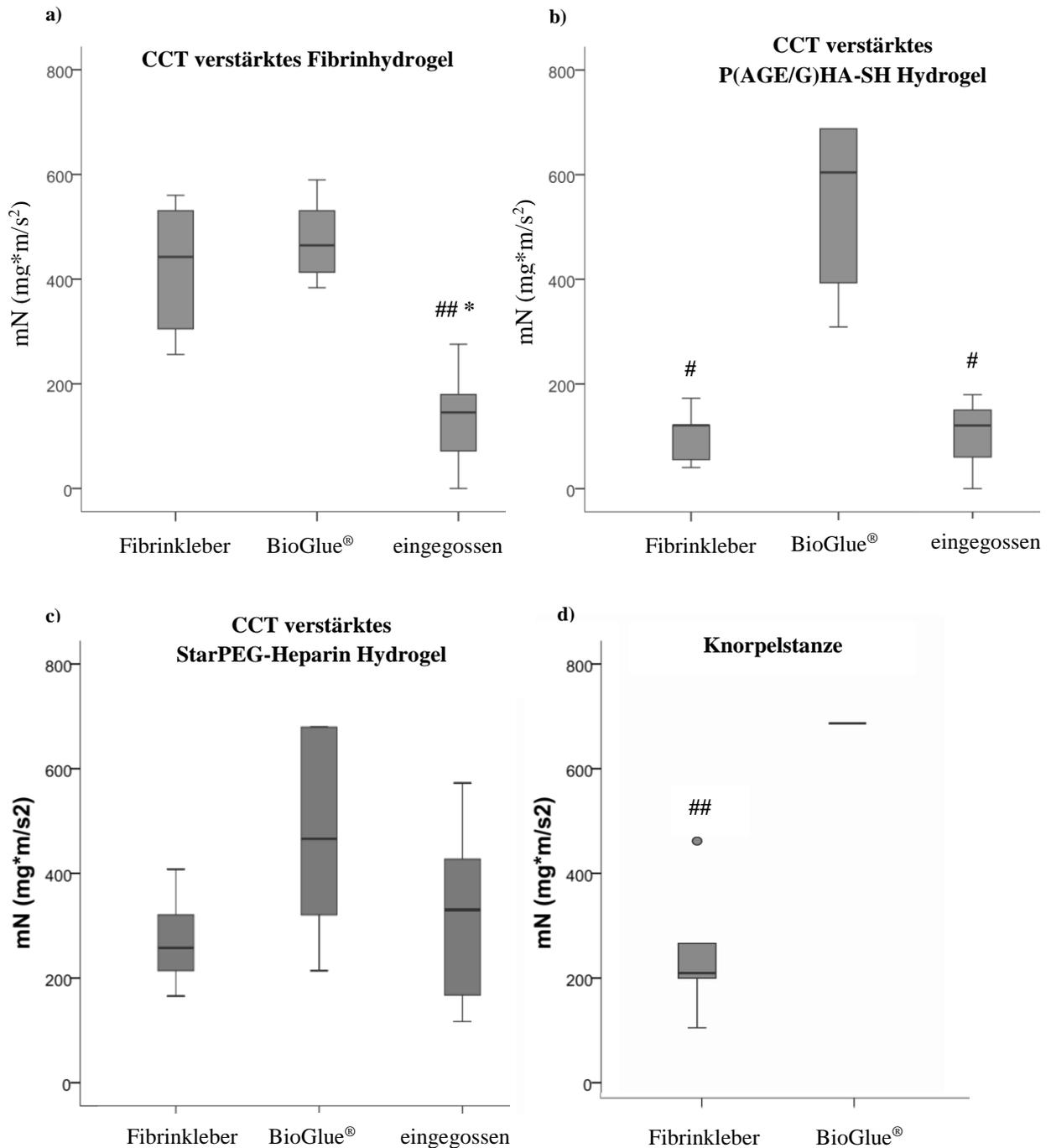
Um vor der orthotopen Minipigstudie die Klebekraft der verschiedenen Klebervarianten einschätzen zu können wurden diese in einer Kadaverstudie getestet. Als Klebervarianten wurden der Fibrinkleber Tisseel® und BioGlue® verwendet. Diese Varianten wurden zudem mit der Adhäsionskraft im Defekt auspolymerisierter Gele verglichen. Auf die Beladung des Fibrinklebers mit GDF-5 wurde verzichtet, da dieser seine Wirkung nur in vivo entfalten kann. Getestet wurden die verschiedenen Kleber in Kombination mit CCT-verstärkten Fibrin-, P(AGE/G)HA-SH-, und StarPEG-Heparin Hydrogelkonstrukten sowie mit einer Knorpelstanze als Positivkontrolle. Die Versuche wurden mit Ausnahme des Auspolymerisierens von CCT-verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen im Defekt (n = 3) jeweils 6 mal durchgeführt.

Für die Fixierung der CCT-Fibrinkonstrukte zeigte der Fibrinkleber eine mittlere Klebeleistung von 422,81mN und lag hiermit in einem ähnlichen Bereich wie BioGlue®, der eine mittlere Klebeleistung von 474,31mN aufwies (Abb. 21a). Beide Kleber lagen damit signifikant über der Adhäsionskraft, die ein direkt im Defekt auspolymerisiertes Fibrin-CCT Konstrukt durchschnittlich erreichte (mittlere Klebeleistung: 136,20mN) (Abb. 21a).

Bei der Fixation von Kombinationskonstrukten aus P(AGE/G)HA-SH und CCT erreichte der Fibrinkleber eine mittlere Klebeleistung von 102,10mN. Fibrinkleber wies somit für diesen Konstrukttyp eine signifikant schlechtere Klebeleistung auf als BioGlue®, der mit einer mittleren Adhäsionskraft von 547,73mN CCT verstärkte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele besser als alle anderen Konstrukttypen im Defekt fixiert. Das Auspolymerisieren der CCT verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele im Defekt gewährleistet mit einer mittleren Klebeleistung von 100,10mN eine Konstruktfixierung, die dem Einkleben der Konstrukte mit Fibrinkleber entspricht. Das direkte Eingießen der Gele in den Defekt zeigte ebenfalls eine signifikant schlechtere Klebeleistung für CCT verstärkte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele als BioGlue® (Abb. 21b).

Hinsichtlich der CCT verstärkten StarPEG-Heparin Hydrogele erreichte der getestete Fibrinkleber eine mittlere Klebeleistung von 274,03mN. BioGlue® hingegen zeigte mit 476,77mN eine vergleichbare mittlere Klebeleistung wie für die anderen Hydrogelarten. Das Auspolymerisieren im Defekt wies bei CCT verstärkten StarPEG-Heparin Hydrogelen eine mittlere Klebeleistung von 328,30mN auf und erreichte damit eine mit Fibrinkleber und BioGlue® vergleichbar starke Fixierung (Abb. 21c).

In Kombination mit der Positivkontrolle, einer Knorpelstanze, konnten lediglich die Varianten BioGlue® und Fibrinkleber getestet werden, da ein Eingießen nicht möglich war. Der getestete Fibrinkleber zeigte hierbei eine mittlere Klebeleistung von 248,00mN. BioGlue® hingegen erreichte bei jeder durchgeführten Messung die höchste mit dem angewendeten System messbare Adhäsionskraft von 687,68mN und zeigte damit signifikant bessere Resultate als der Fibrinkleber (Abb. 21d)



**Abbildung 19: Adhäsionskraft verschiedener Gewebekleber für die Fixierung von CCT-verstärkten Hydrogelkonstrukten.** Adhäsionskraft für die Fixierung von a) CCT-verstärkten Fibrinhydrogelkonstrukten; b) CCT-verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukten; c) CCT-verstärkten StarPEG-Heparin Hydrogelkonstrukten; d) Knorpelstanzen; ## =  $p \leq 0,01$  vs. BioGlue® (Mann-Whitney-U;  $n=6$ ) \* =  $p \leq 0,05$  vs. Fibringewebekleber (Mann-Whitney-U;  $n=6$ ); # =  $p \leq 0,05$  vs. BioGlue® (Mann-Whitney-U;  $n=6$  bzw.  $n=3$ )

Abschließend ist festzustellen, dass die mittlere Klebeleistung des getesteten Fibrinklebers abhängig von der fixierten Konstruktart stark variierte, während BioGlue® für alle 3 getesteten Hydrogelkonstrukte eine vergleichbar hohe mittlere Klebeleistung aufwies. Zur Fixierung von CCT-verstärkten Fibrin Hydrogelen eignen sich sowohl der Fibrinkleber als auch BioGlue®, für das Einkleben von P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen stellt BioGlue® die beste Klebervariante dar. CCT- verstärkte StarPEG-Heparin Hydrogele wurden ebenfalls von BioGlue® tendenziell am besten im Defekt fixiert. Beide

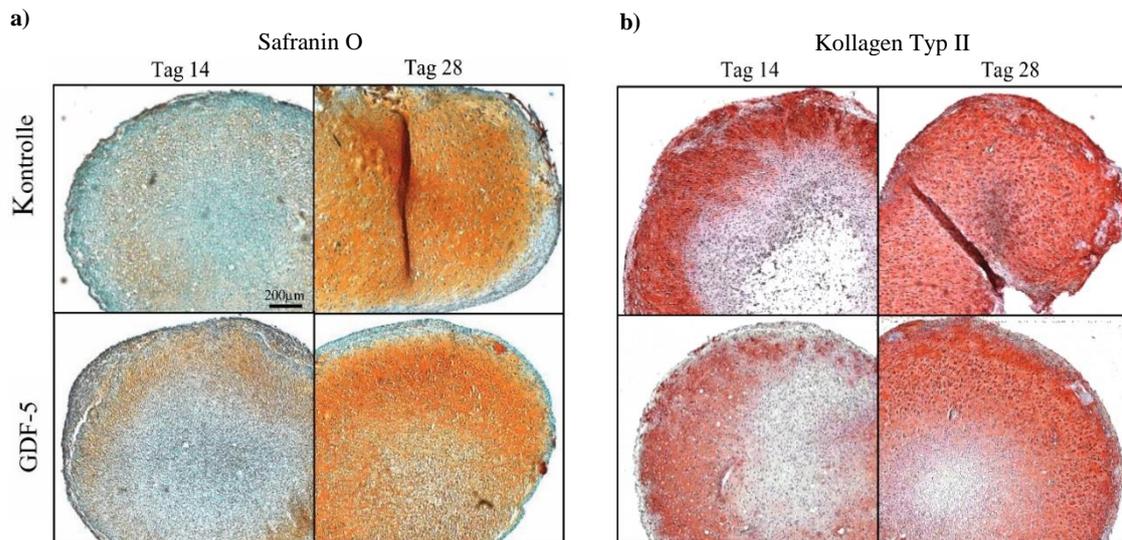
getestete Kleberarten zeigten für alle CCT-verstärkten Hydrogele eine gleichwertige oder sogar höhere Adhäsionskraft als das direkte Auspolymerisieren der Hydrogele im Defekt, wie es derzeit häufig in der Klinik angewendet wird. Um die Fixierung und Intregation von CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten in orthotopen Defekten noch weiter zu verbessern soll dem Gewebekleber in der vorliegenden Arbeit zusätzlich GDF-5 zugesetzt werden. Um eventuelle Effekte von GDF-5 auf in den Defekt einwandernde Vorläuferzellen vorab in vitro beurteilen zu können werden im Folgenden die Effekte von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese von MSC analysiert.

## **4.6 Einfluss von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese von MSC**

Die Effekte von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese wurden sowohl für hMSC, aufgrund der Relevanz für eine spätere klinische Anwendung, als auch für pMSC, aufgrund der geplanten in vivo Studien im Minipig, untersucht. Hierbei wurden Fibrinhydrogele mit je 600.000 Zellen in 60µl Hydrogel für 4 Wochen in chondrogenem Medium (+10ng/ml TGFβ) mit oder ohne Zusatz von 150ng/ml GDF-5 differenziert. Frühere Studien weisen darauf hin, dass GDF-5 in dieser Konzentration sowohl die Chondrogenese von MSC fördern als auch deren Hypertrophie steigern kann. Daher wurden mehrere chondrogene und hypertrophe Parameter während und nach 14 sowie 28 Tagen in vitro Chondrogenese untersucht. Die Experimente wurden mit je 3 unabhängigen Zellpopulationen durchgeführt.

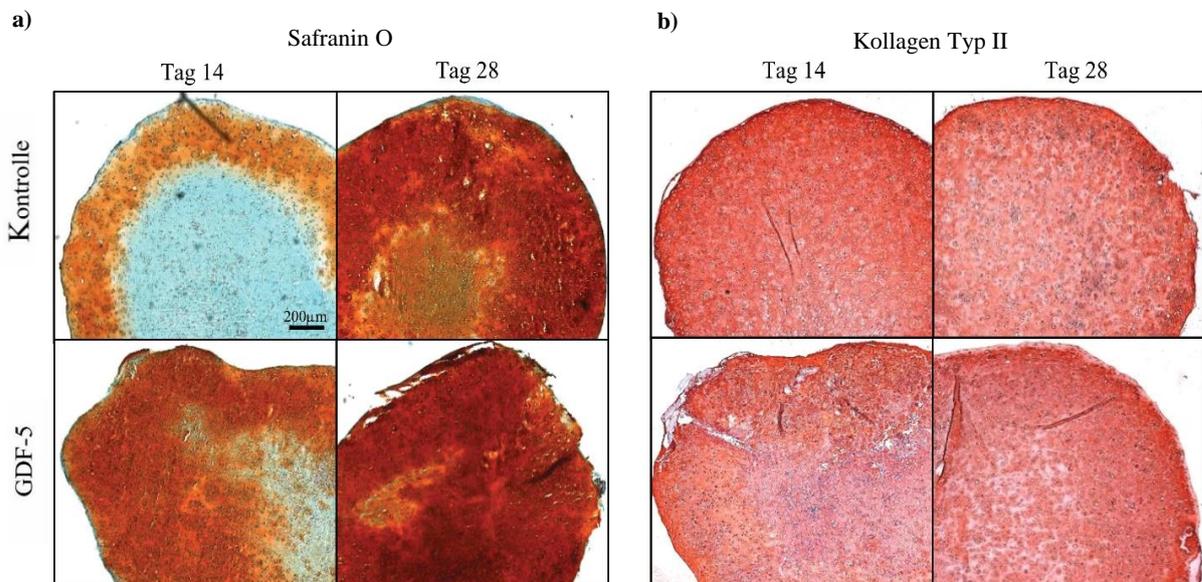
### **4.6.1 Einfluss von GDF-5 auf die Chondrogenese von hMSC und pMSC**

Die Ablagerung chondrogener Matrixproteine ist ein Indikator für eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung. Daher wurden zunächst je 2 Konstrukte pro Zellpopulation und Kondition nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung histologisch prozessiert und Safranin O (Nachweis von Proteoglykanen; (Abb. 22a) sowie immunhistologisch auf Kollagen Typ II gefärbt (Abb. 22b). Konstrukte aller untersuchten hMSC-Populationen zeigten am Tag 14 sowohl in der Safranin O als auch in der Kollagen II Färbung eine in den Randbereichen beginnende Ablagerung chondrogener Extrazellulärmatrix. Am Tag 28 der chondrogenen Differenzierung konnte dann eine über Konstrukte hinweg verteilte Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II detektiert werden (Abb. 22). Ein Unterschied zwischen der GDF-5 behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe war zu keinem der beiden Zeitpunkte erkennbar. Alle untersuchten hMSC-Populationen waren demnach unabhängig von ihrer Behandlung mit GDF-5 erfolgreich chondrogen differenziert.



**Abbildung 20: Histologische Darstellung der Matrixablagerung von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) ohne und mit 150ng/ml GDF-5. Darstellung von Konstrukten einer repräsentativen Zellpopulation (n=3). a) Safranin-O Färbung; b) Kollagen II-Färbung**

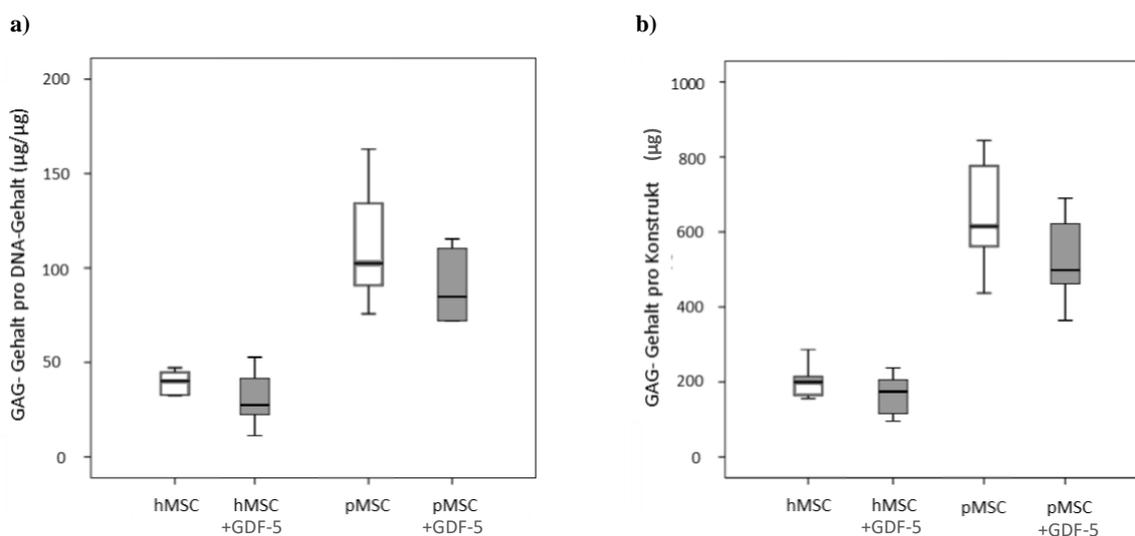
Die untersuchten pMSC Konstrukte zeigten bereits am Tag 14 der Chondrogenese eine das gesamte Konstrukt durchdringende Ablagerung von Kollagen Typ II, während die Proteoglykanablagerung besonders in der Kontrollgruppe hauptsächlich an den Konstruktträgern vorzufinden war (Abb. 23). Nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese waren, entsprechend dem Bild bei den untersuchten hMSC-Populationen, alle Konstrukte durch eine über das gesamte Konstrukt verteilte Ablagerung knorpeltypischer Extrazellulärmatrizen gekennzeichnet. GDF-5 behandelte pMSC Konstrukte wiesen an Tag 14 eine intensivere Safranin-O Färbung auf (Abb. 23a), was auf eine vermehrte Einlagerung von Proteoglykanen durch GDF-5 behandelte pMSC hindeutete.



**Abbildung 21: Histologische Darstellung der Matrixablagerung von pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+ 10ng/ml TGF- $\beta$ ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5. Darstellung einer repräsentativen Zellpopulation a) Safranin-O Färbung; b) Kollagen II-Färbung**

Um die sich histologisch andeutenden Effekte von GDF-5 auf die GAG-Ablagerung der Zellen zu quantifizieren wurden je 2 Konstrukte pro Zellpopulation und Kondition nach 28 Tagen in vitro

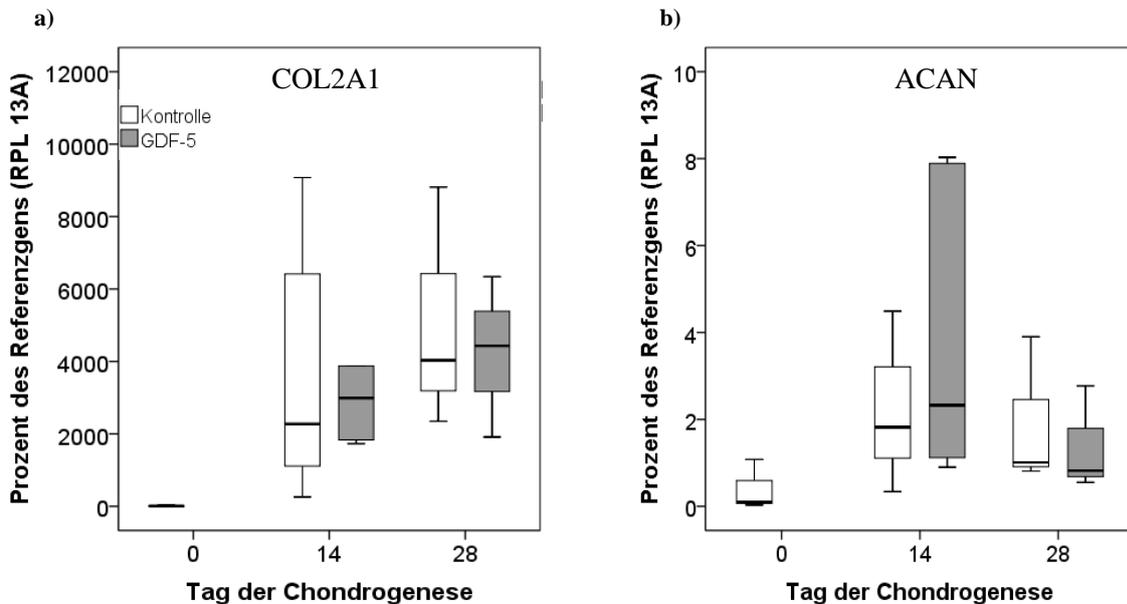
Chondrogenese mittels eines DMMB-Assays auf ihren GAG-Gehalt hin untersucht. Dieser wurde zusätzlich in Relation zum DNA-Gehalt der untersuchten Proben gesetzt, um die GAG-Produktion pro Zelle beurteilen zu können. Der mittlere Proteoglykangehalt in den Konstrukten der Kontrollgruppe betrug bei den hMSC-Populationen 204,0 $\mu$ g/Konstrukt und liegt damit höher als der der GDF-5 behandelten Gruppe (mittlerer GAG-Gehalt: 165,7 $\mu$ g/Konstrukt) (Abb. 24a). Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant. Auch bei Betrachtung der GAG-Ablagerung pro Zelle (GAG-Gehalt/DNA-Gehalt) waren keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den GDF-5 supplementierten MSC-Konstrukten erkennbar.



**Abbildung 22: Glykosaminoglykan-Gehalt von hMSC und pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5 (n=3). a) Gehalt pro Zelle; b) Gehalt pro Gesamtkonstrukt**

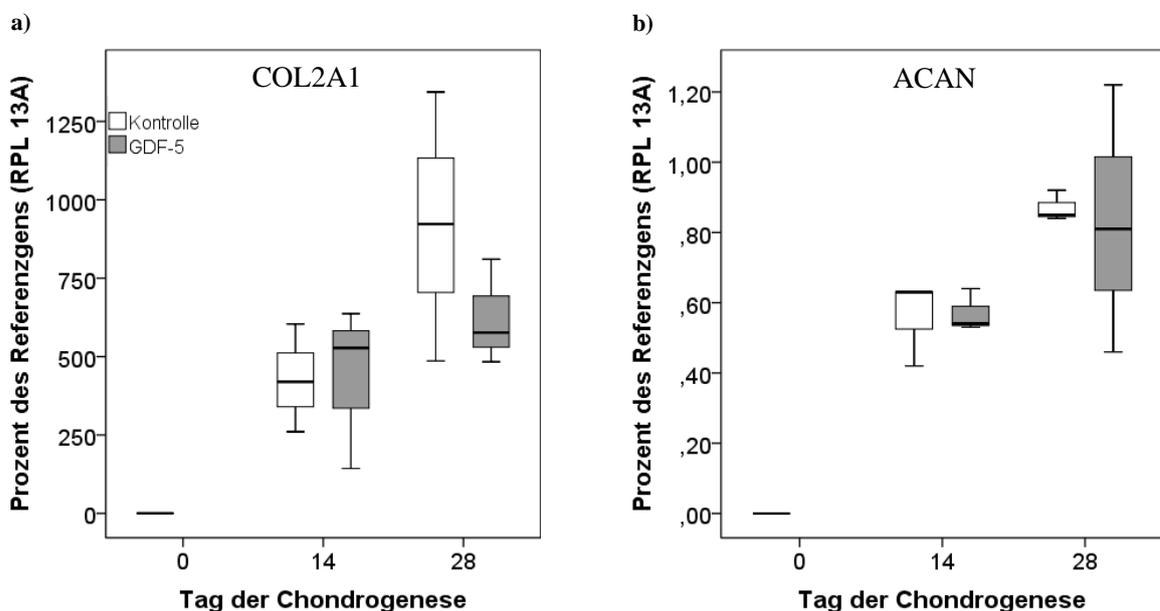
Auch bei den untersuchten pMSC-Konstrukten erreichte die Kontrollgruppe mit einer mittleren GAG-Ablagerung pro Konstrukt von 641,4  $\mu$ g und 111,4  $\mu$ g GAG/ $\mu$ g DNA geringfügig höhere Werte als die mit GDF-5 behandelte Gruppe (mittlere GAG-Ablagerung: 522,4 $\mu$ g pro Konstrukt; 89,9 $\mu$ g GAG/ $\mu$ g DNA). Es konnten aber weder bei den untersuchten hMSC- noch bei den pMSC-Populationen signifikante Effekte der GDF-5 Behandlung auf die Ablagerung von GAG festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass die pMSC-Populationen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit GDF-5 behandelten Gruppe eine deutlich höhere mittlere GAG-Ablagerung pro Konstrukt zeigten als hMSC.

Um die Effekte von GDF-5 auf die Expression chondrogener Marker (COL2A1, ACAN) zu ermitteln wurde die Genexpression der Konstrukte am Tag 14 und Tag 28 der chondrogenen Differenzierung mittels quantitativer PCR untersucht. Wie bei einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung zu erwarten, wurde die Expression von Kollagen Typ II von allen untersuchten hMSC-Populationen von Tag 0 zu Tag 28 bis zu 15.000fach nach oben reguliert (Abb. 23a). Die Expression von Aggrekan wurde ebenfalls nach oben reguliert, aber in deutlich geringerem Ausmaß (Abb. 23b). Entsprechend den Ergebnissen der histologischen und der GAG-Analyse, waren zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression chondrogener Marker zwischen der Kontrollgruppe und der GDF-5 behandelten Gruppe erkennbar.



**Abbildung 23:** mRNA-Expression chondrogener Marker bei hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+ 10ng/ml TGF- $\beta$ ) in vitro ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). Darstellung der Expression in Relation zum Referenzgen RPL13. a) Kollagen Typ II; b) Aggrecan

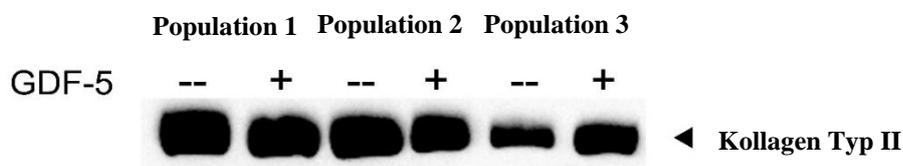
Die untersuchten pMSC-Populationen zeigten hinsichtlich der Expression chondrogener Marker ebenfalls eine Hochregulation der Expression von Kollagen Typ II von Tag 0 zu Tag 28 (Abb.24a). Auch die Expression von Aggrecan wurde mit einer mittleren Steigerung um das 7000fache im Verlauf der Chondrogenese stark reguliert (Abb.24b). Signifikante Effekte des supplementierten GDF-5 auf die Expression chondrogener Marker konnten auch bei den untersuchten pMSC nicht beobachtet werden.



**Abbildung 24:** mRNA-Expression chondrogener Marker bei pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) in vitro ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). Darstellung der Expression in Relation zum Referenzgen RPL13. a) Kollagen Typ II; b) Aggrecan

Der Kollagen Typ II-Gehalt der hMSC Konstrukte wurde zusätzlich zur Betrachtung auf Genexpressionsebene auch via Western Blot auf Proteinebene analysiert. Hierzu wurde aus je 3 Konstrukten pro Zellpopulation und Kondition das Gesamtkollagen isoliert. Bei den einzelnen

Zellpopulationen waren unterschiedliche Effekte der GDF-5-Behandlung auf die Produktion von Kollagen Typ II zu beobachten, über die Gesamtheit der Populationen wurde in der GDF-5 behandelten Gruppe jedoch eine der Kontrollgruppe entsprechende Menge an Kollagen Typ II abgelagert (Abb. 25).

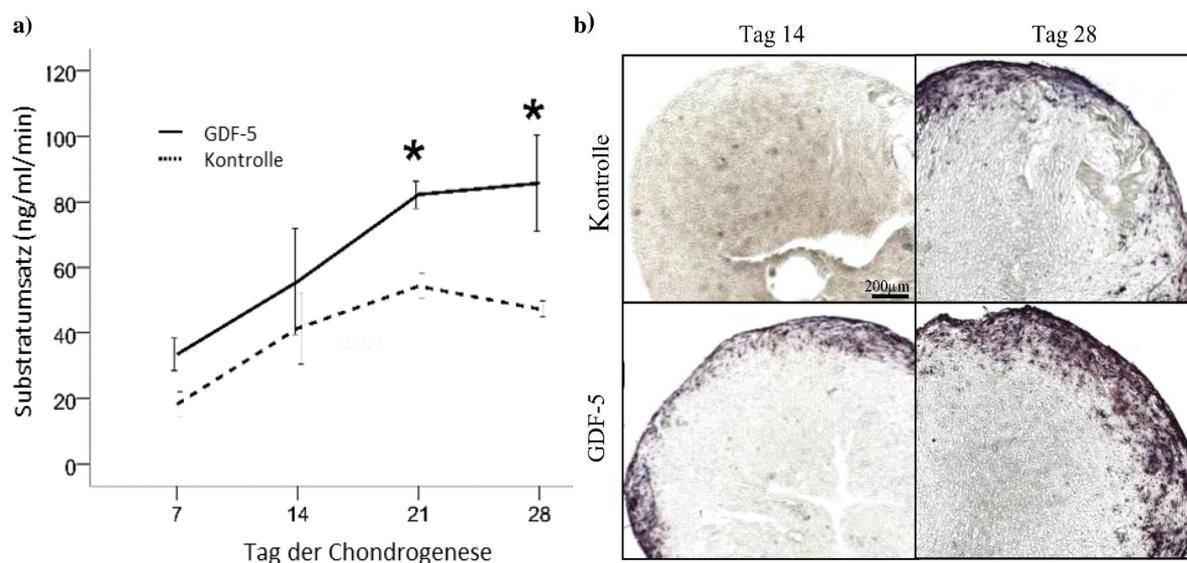


**Abbildung 25:** Kollagen Typ II-Gehalt von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen *in vitro* Chondrogenese (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5. Je drei Konstrukte pro Population und Kondition wurden zur Kollagenisolierung gepoolt.

Betrachtet man die Gesamtheit der Ergebnisse der histologischen, GAG-Ablagerungs- und Genexpressionsanalyse ist abschließend festzustellen, dass GDF-5 die Chondrogenese von humanen und porcinen MSC weder auf positive noch auf negative Weise beeinflusst.

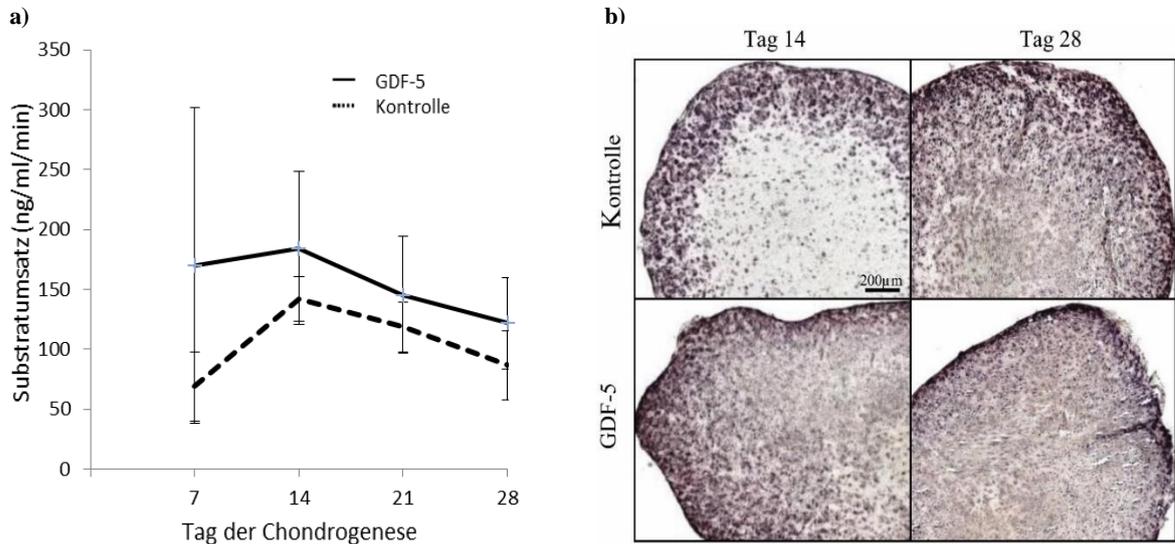
#### 4.6.2 Einfluss von GDF-5 auf die ALP-Aktivität und weitere hypertrophe Marker

Die ALP-Aktivität der chondrogen differenzierenden Zellen wurde zu den Zeitpunkten Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 in Kulturüberständen quantifiziert. In allen drei hMSC-Populationen stieg die ALP-Aktivität im Verlauf der Chondrogenese bei beiden Gruppen deutlich an (Abb. 26a). Zudem führte die Zugabe von GDF-5 zu einer signifikant erhöhten ALP-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 21, was auf eine gesteigerte Mineralisierungsneigung der Zellen hindeutete. Die quantitativen Ergebnisse der ALP-Aktivitätsmessung wurden auch durch den histologischen Nachweis der Alkalischen Phosphatase bestätigt (Abb. 26b), ein Effekt der GDF-5 Behandlung wurde mit dieser Methode bereits am Tag 14 beobachtet.



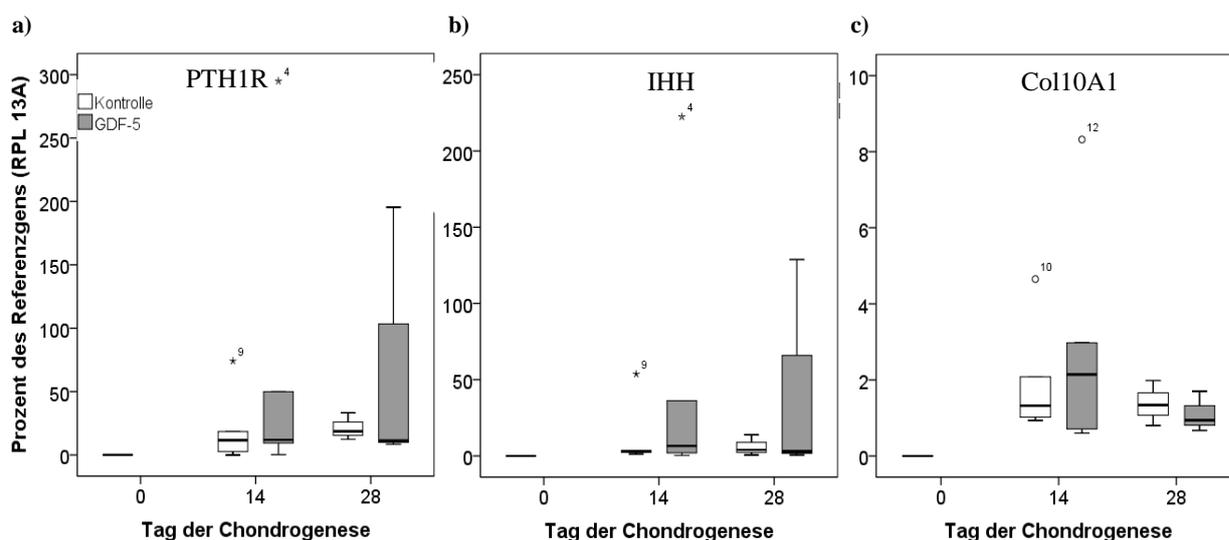
**Abbildung 26:** ALP-Nachweis während der *in vitro* Chondrogenese (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) ohne und mit 150ng/ml GDF-5. a) ALP-Aktivitätsbestimmung aus gepoolten Kulturüberständen von je 8 Konstrukten pro Zeitpunkt und Kondition; b) Histologischer ALP-Nachweis an repräsentativen Schnitten von 14 und 28 Tagen mit oder ohne 150ng/ml GDF-5 chondrogen differenzierten Fibrinhydrogel Konstrukten; \* =  $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U;  $n=3$ )

Die untersuchten pMSC-Populationen zeigten über den gesamten Verlauf der in vitro Differenzierung ein sehr hohes ALP-Aktivitätsniveau mit einem Hochpunkt am Tag 14 (Abb. 29a). Die Zugabe von GDF-5 resultierte in einer tendenziell erhöhten ALP-Aktivität, diese erreichte jedoch keine Signifikanz. Auf den histologischen Schnitten ist ein Effekt des verwendeten GDF-5 auf die ALP-Aktivität bereits am Tag 14 detektierbar (Abb. 29b).



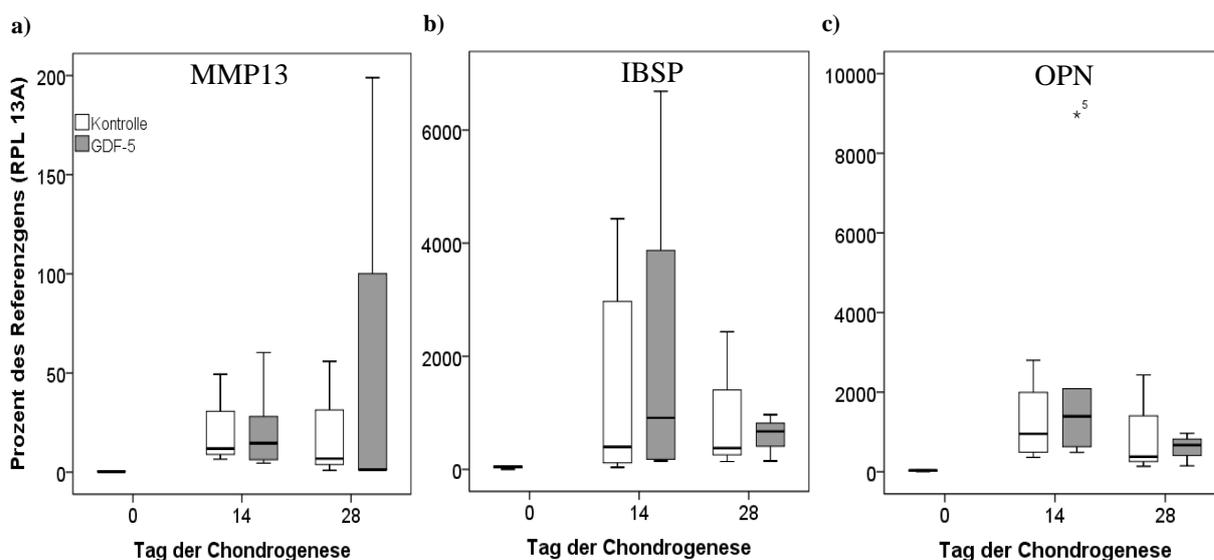
**Abbildung 27: ALP-Nachweis während der in vitro Chondrogenese von pMSC Konstrukten ohne und mit 150ng/ml GDF-5.** a) ALP-Aktivitätsbestimmung aus gepoolten Kulturüberständen von je 8 Konstrukten pro Zeitpunkt und Kondition; b) Histologischer ALP-Nachweis an repräsentativen Schnitten von 14 und 28 Tagen mit oder ohne 150ng/ml GDF-5 chondrogen differenzierten Fibrinhydrogel Konstrukten

Weitere von den hMSC und pMSC exprimierte hypertrophe (Kollagen Typ X (COL10A1), Parathormon Rezeptor (PTH1R), IHH), terminale Differenzierungs- (Matrix-Metallo-Proteinase 13 (MMP 13)) und osteogene (Osteopontin (OPN), Integrin Binding Sialoprotein (IBSP)) Marker wurden auf Genexpressionsebene analysiert. Hinsichtlich der hypertrophen Marker war dabei auffällig, dass die Behandlung mit GDF-5 bei den 3 untersuchten hMSC-Populationen unterschiedliche Reaktionen hervorrief. Über die Gesamtheit der getesteten Populationen führte die Behandlung mit GDF-5 daher bei den hMSC-Populationen zu einer verstärkten Streuung der detektierten Werte, jedoch zu keinem signifikanten Effekt (Abb. 28).



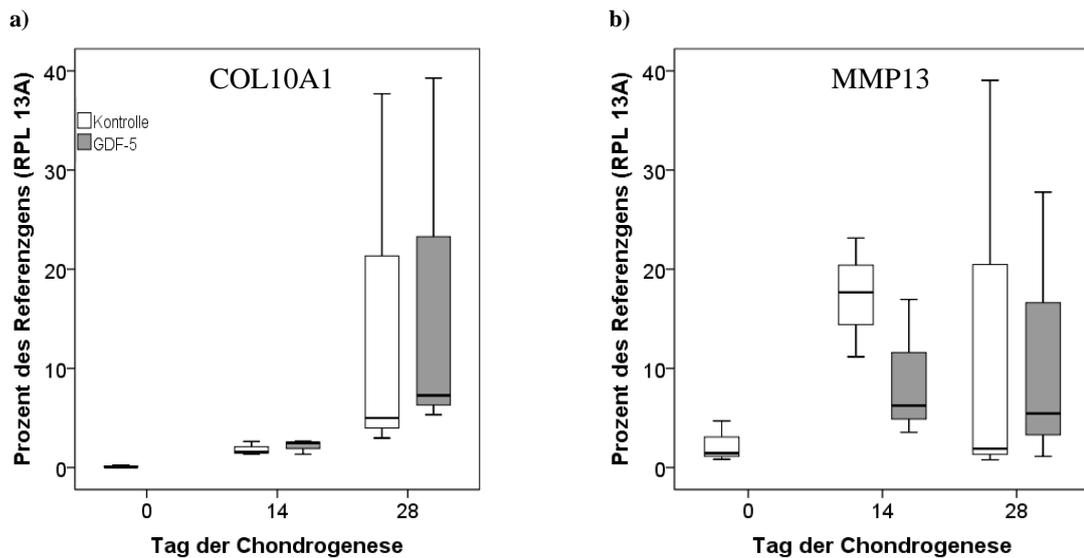
**Abbildung 28:** mRNA-Expression hypertropher Marker von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) *in vitro* ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). Darstellung der Expression in Relation zum Referenzgen RPL13. a) PTH1R; b) IHH; c) COL10A1

Bezüglich der Expression terminaler Differenzierungs- und osteogener Marker waren bei den untersuchten hMSC-Populationen keine Effekte durch die Behandlung mit GDF-5 erkennbar. In beiden Gruppen war eine Steigerung der Expression von MMP13, IBSP, OPN im Verlauf der Chondrogenese zu erkennen (Abb. 29).



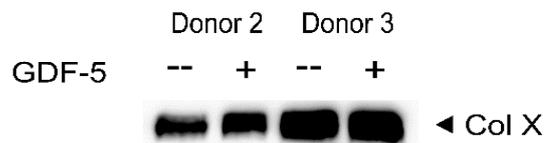
**Abbildung 29:** mRNA-Expression terminaler Differenzierungs- und osteogener Marker von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+10ng/ml TGF- $\beta$ ) *in vitro* ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). Darstellung der Expression in Relation zum Referenzgen RPL13. a) MMP 13; b) IBSP; c) OPN

Bei den untersuchten pMSC-Populationen konnte für den hypertrophen Marker Kollagen Typ X und den terminalen Differenzierungsmarker MMP13 ebenfalls keine Effekte von GDF-5 detektiert werden. Wie auch bei den hMSC-Populationen stieg die Expression von Kollagen Typ X im Laufe der chondrogenen Differenzierung kontinuierlich an (Abb.30).



**Abbildung 30: mRNA-Expression hypertropher und terminaler Differenzierungsmarker von pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+10ng/ml TGF-β) in vitro ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). Expression in Relation zum Referenzgen RPL13. a) COL10A1; b) MMP13**

Die Produktion des hypertrophen Markers Kollagen Typ X wurde für die untersuchten hMSC-Populationen auch auf Proteinebene untersucht. Hierbei zeigte die Supplementation von GDF-5 ebenfalls keinen detektierbaren Effekt (Abb. 33).



**Abbildung 31: Kollagen Typ X-Gehalt in Mediumüberständen von hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGF-β) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5. Überstände von je 8 Konstrukten pro Population und Kondition wurden zur Kollagenisolierung gepoolt.**

Die Behandlung mit GDF-5 steigerte demnach sowohl bei MSC humanen als auch porzinen Ursprungs die ALP-Aktivität und somit die Neigung der Zellen zu mineralisieren, beeinflusste darüber hinaus jedoch nicht deren hypertrophe Entwicklung. Auch eine Stimulation der osteogenen Differenzierung der Progenitorzellen durch GDF-5 war nicht zu beobachten.

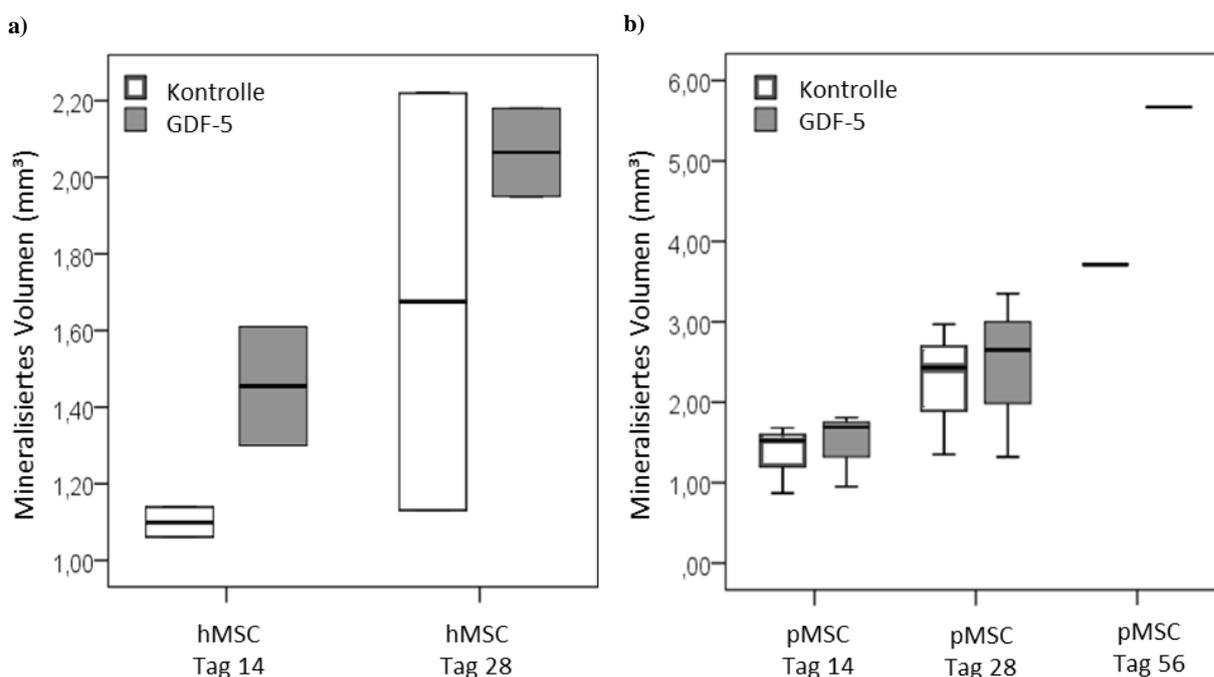
#### 4.6.3 Effekte von GDF-5 auf die in vitro Mineralisierung von MSC

Nach vier Wochen chondrogener Vordifferenzierung (+10ng/ml TGF-β) ohne bzw. mit 150ng/ml GDF-5 wurde je ein Konstrukt pro Zellpopulation und Kondition (außer eine hMSC-Population) für weitere 2, 4 bzw. 8 Wochen in osteogenem Medium kultiviert. Im Anschluss an diese Kultivierung wurden die Konstrukte mittels μCT gescannt um ihre Mineralisierung und eventuelle Effekte der GDF-5 Behandlung auf diese zu quantifizieren. 3-D Rekonstruktionen der gescannten Konstrukte je einer repräsentativen hMSC- und pMSC- Zellpopulation sind im Anhang dargestellt (Anhang-Abb. 5+6).

Sowohl nach 14 Tagen (durchschnittliches mineralisiertes Volumen Kontrollgruppe: 1,1 mm<sup>3</sup>; GDF: 1,5 mm<sup>3</sup>) als auch nach 28 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium (durchschnittliches

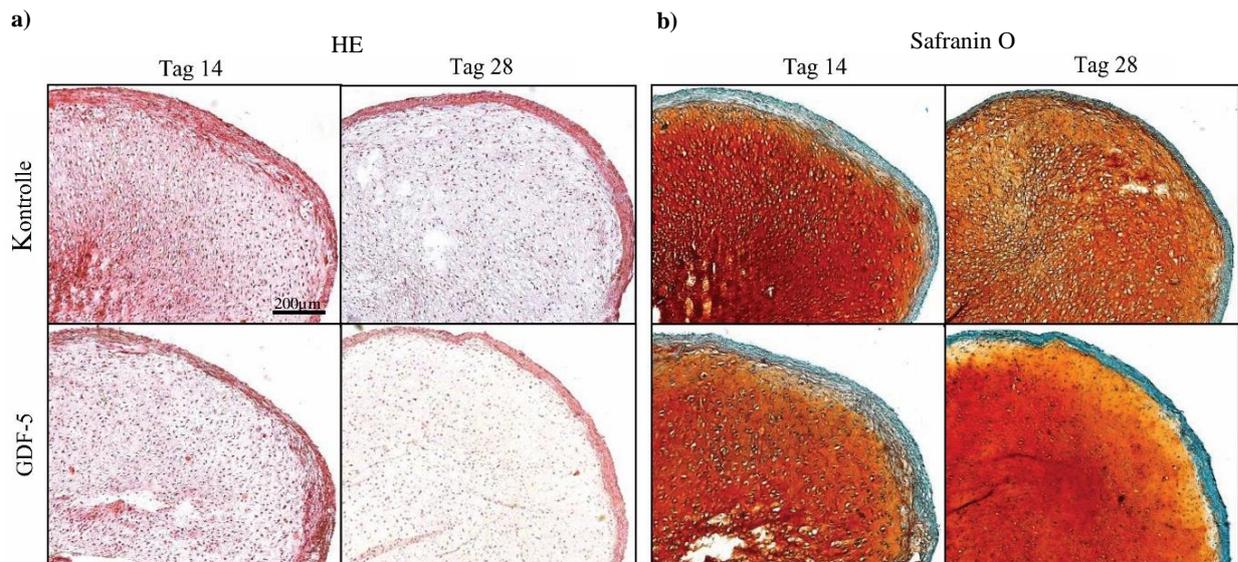
mineralisiertes Volumen Kontrollgruppe: 1,6 mm<sup>3</sup>; GDF: 2,0 mm<sup>3</sup>) wies die GDF-5 supplementierte Gruppe ein höheres mineralisiertes Volumen auf (Abb. 32a). Die Behandlung mit GDF-5 während der chondrogenen Vordifferenzierung schien demnach die spätere Mineralisierung von hMSC-Konstrukten bei Kultivierung in osteogenem Medium zu fördern. Da jedoch nur je 2 Konstrukte pro Zeitpunkt untersucht wurden, konnte keine statistische Aussage über einen Effekt von GDF-5 auf die in vitro Mineralisierung chondrogen vordifferenzierter hMSC-Konstrukte getroffen werden.

Bei den pMSC Konstrukten hingegen war weder am Tag 14 noch am Tag 28 ein Effekt des GDF-5 auf die Mineralisierung ersichtlich (Abb. 32b). Auffällig war jedoch, dass diese im Vergleich zu den untersuchten hMSC im Mittel mehr mineralisiertes Gewebe aufwiesen, was mit der höheren ALP-Aktivität der pMSC Konstrukte während der Vorkultivierung im Einklang steht.



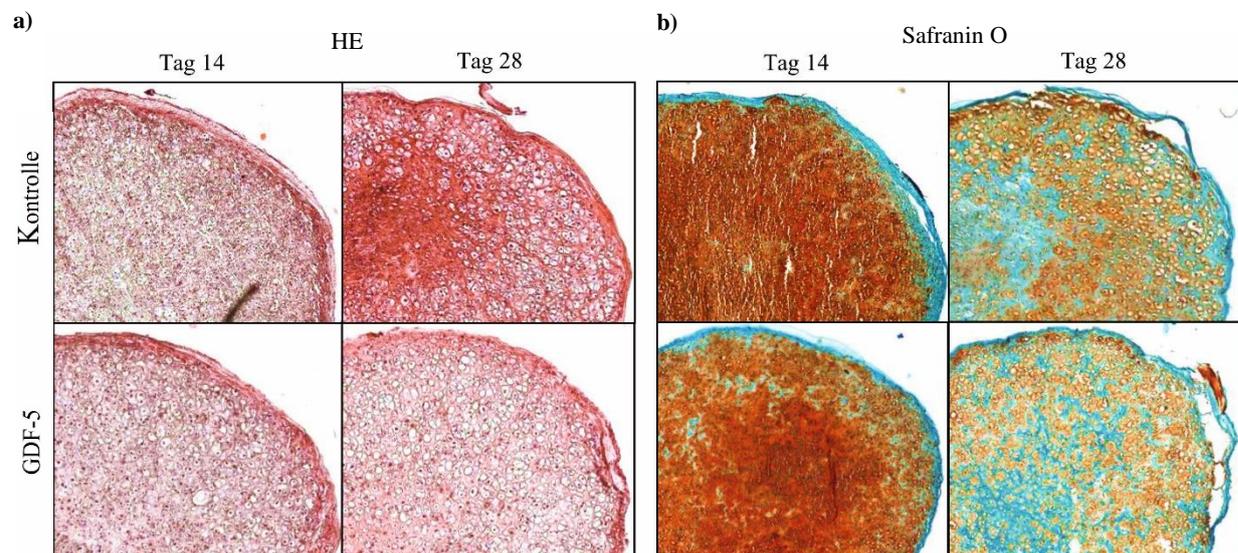
**Abbildung 32: In vitro Mineralisierung von 4 Wochen chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC und pMSC Konstrukten nach 14 und 28 Tagen osteogener Differenzierung in vitro. Volumen des gebildeten mineralisierten Gewebes in mm<sup>3</sup> a) hMSC-Konstrukte (n=2); b) pMSC-Konstrukte (n=3)**

Nach Beendigung des  $\mu$ CT-Scans wurden die Konstrukte histologisch prozessiert. In der HE-Färbung zeigte sich nach 14 Tagen eine verstärkte rötliche Färbung in den Randbereichen der Konstrukte, die auf eine beginnende Mineralisierung hinwies (Abb. 35a). Zudem zeigten die Zellen in Konstrukten beider Gruppen einen hypertrophen Phänotyp. Auch nach 28 Tagen Kultivierung unter osteogenen Bedingungen wurde im Zentrum aller untersuchten hMSC Konstrukte weiterhin eine positive Safranin O-Färbung, also persistierende proteoglykanhaltige Matrix detektiert (Abb. 35b). Zwischen der Kontroll- und der GDF-5 behandelten Gruppe waren histologisch jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt Unterschiede erkennbar.



**Abbildung 33:** Histologische Darstellung 4 Wochen vorkultivierter (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukte nach 14 bzw. 28 Tagen osteogener Differenzierung *in vitro*. Darstellung eines repräsentativen Konstruktes ( $n=2$ ). a) HE-Färbung; b) Safranin-O-Färbung

Auch die untersuchten pMSC-Konstrukte zeigten in der HE-Färbung zunehmend hypertrophe Zellen sowie eine Rotfärbung in deren Randbereichen (Abb. 34a). Anders als bei den Konstrukten der untersuchten hMSC-Populationen wurde mittels der Safranin O-Färbung bei den pMSC Konstrukten ein Verlust an proteoglykanhaltiger Matrix über die Dauer der osteogenen Kultivierung festgestellt (Abb. 34b). Effekte der Behandlung mit GDF-5 waren nicht detektierbar.



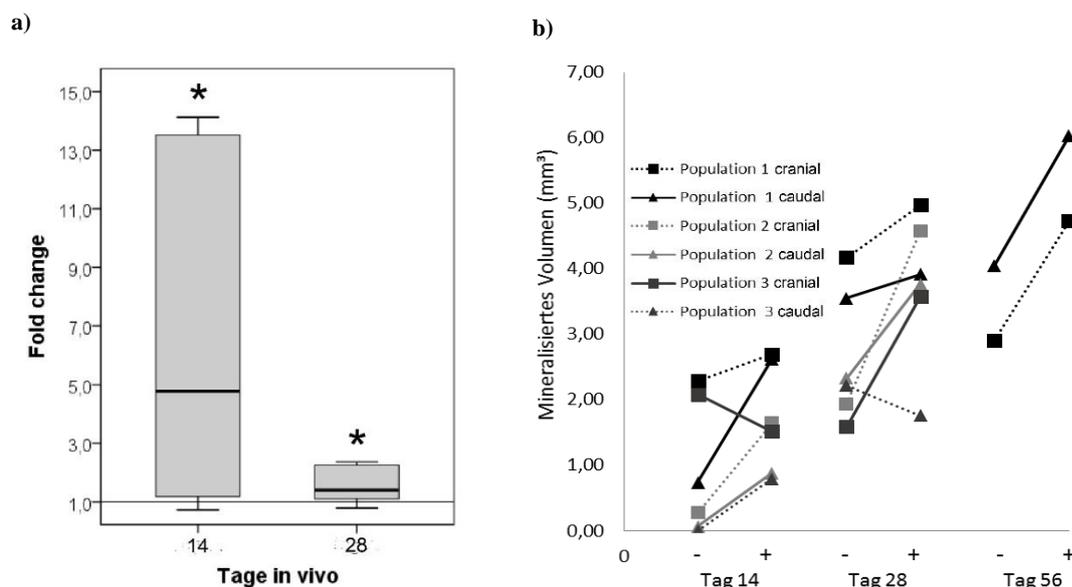
**Abbildung 34:** Histologische Darstellung 4 Wochen vorkultivierter pMSC Konstrukte (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) nach 14 bzw. 28 Tagen osteogener Differenzierung *in vitro*. Darstellung eines repräsentativen Konstrukts ( $n=3$ ). a) HE-Färbung; b) Safranin-O-Färbung

#### 4.6.4 Einfluss von GDF-5 auf die enchondrale Mineralisierung von MSC

Im Anschluss an den bereits beschriebenen *in vitro* Versuch wurden des Weiteren mehrere Konstrukte für 2, 4 und 8 Wochen ektop in SCID- Mäuse implantiert um die Effekte von GDF-5 auf die enchondrale Mineralisierung von MSC *in vivo* zu untersuchen. Nach Explantation wurden die Konstrukte per  $\mu$ CT gescannt. So konnte das mineralisierte Volumen innerhalb der Konstrukte

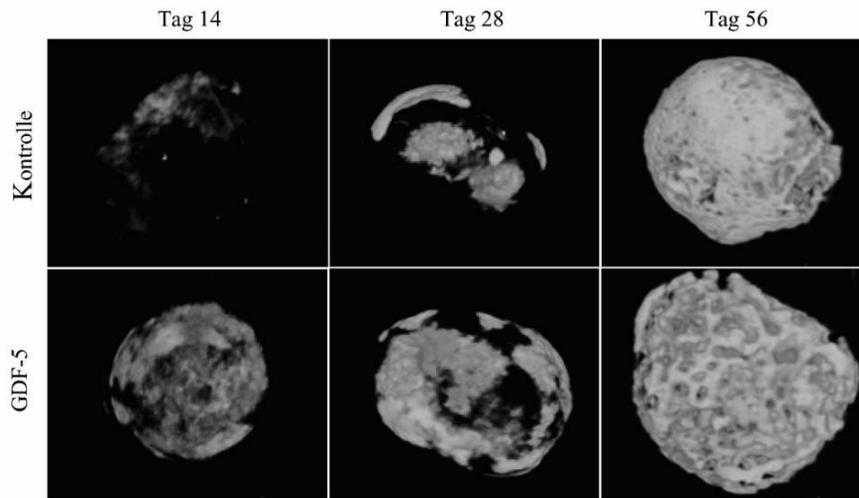
quantifiziert werden. Um eventuelle Einflüsse durch die Wirtstiere und die Implantationsstelle sowie die Unterschiede zwischen den betrachteten Zellpopulationen zu eliminieren, wurden die GDF-5 behandelten Konstrukte stets in Relation zu ihrem Kontrollkonstrukt betrachtet (identische Zellpopulation, Implantation im selben Wirtstier an derselben Lokalisation (cranial bzw. caudal)).

Das mineralisierte Volumen in den nach 14 Tagen geernteten hMSC Konstrukten lag bei 5 von 6 Konstrukten der GDF-5 behandelten Gruppe über dem der zugehörigen Kontrollkonstrukte (Abb.37 a). Die Mineralisierung der Konstrukte wurde durch die Behandlung mit GDF-5 signifikant um das bis zu 14-fache gesteigert (mittlere Steigerung: 5,1-fach). Bei den nach 28 Tagen explantierten Konstrukten war die durch Supplementation von GDF-5 während der Vorkultivierung erreichte Steigerung der Mineralisierung maximal 2,3fach (mittlere Steigerung: 1,6 fach), wurde aber dennoch signifikant (Abb. 35a). Wie am Tag 14 wiesen auch am Tag 28 5 der 6 explantierten GDF-5 behandelten hMSC Konstrukte im Vergleich zu ihren Kontrollkonstrukten ein höheres mineralisiertes Volumen auf. Auch die beiden für 8 Wochen ektop implantierten GDF-5 behandelten Konstrukte zeigten ein höheres mineralisiertes Volumen als ihre beiden Kontrollkonstrukte (Abb. 35b). Über die zunehmende Dauer der ektopen Implantation stieg das mineralisierte Volumen pro Konstrukt stetig an.



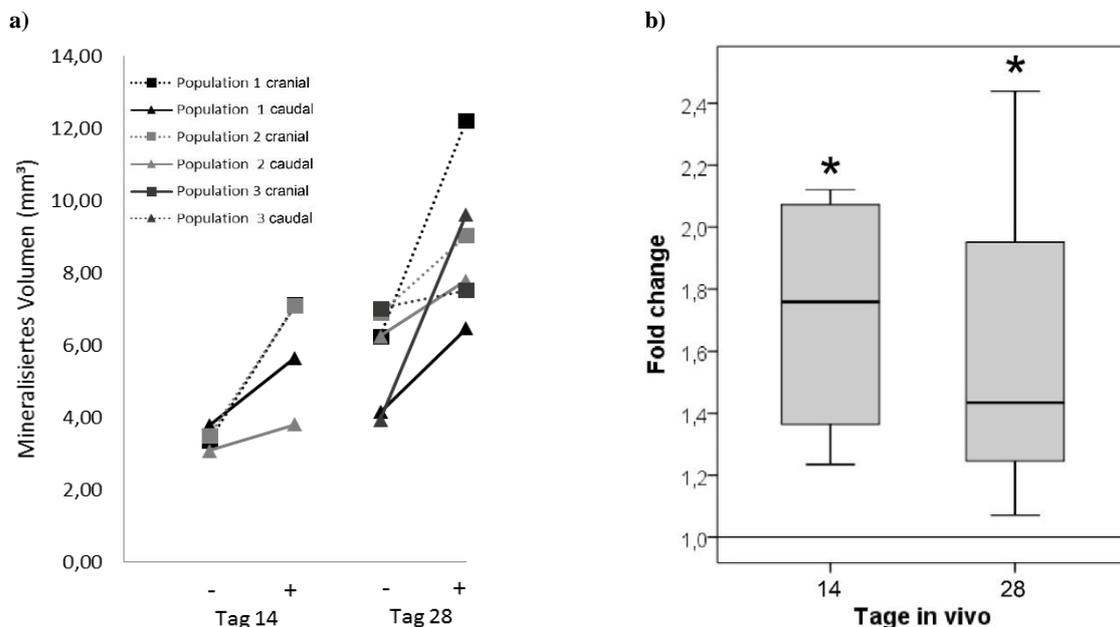
**Abbildung 35: In vivo Mineralisierung von chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukten nach 14, 28 und 56 Tagen ektop in SCID-Mäusen. a) Relatives mineralisiertes Volumen der GDF-5 behandelten Konstrukte am Tag 14 und Tag 28, normalisiert auf die Kontrolle (Linie beim Wert 1,0); b) Paarweise Darstellung des mineralisierten Volumens der Kontrollkonstrukte in Relation zu deren zugehörigen GDF-5 behandelten Konstrukte; \*=  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U ( $n=6$ )).**

3D-Rekonstruktionen von je einem GDF-5 Konstrukt und seinem zugehörigen Konstrukt aus der Kontrollgruppe zu allen 3 Zeitpunkten sind in Abb. 38 dargestellt.



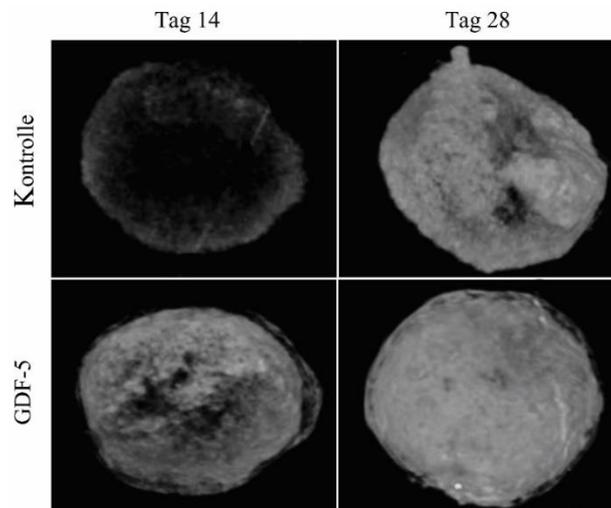
**Abbildung 36: 3D-Rekonstruktionen der chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukte (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14, 28 und 56 Tagen in vivo.** Die Konstrukte wurden nach Fixierung mit einer Auflösung von 9 $\mu$ m und einem 0,025mm Titanfilter gescannt. Für die Rekonstruktion wurden Grauwerte zwischen 0,0 und 0,085 verwendet. Darstellung je eines repräsentativen Konstrukts (n=6).

In allen 4 mit GDF-5 behandelten pMSC-Konstrukten lag das mineralisierte Volumen am Tag 14 über dem des jeweiligen Kontrollkonstrukts (Abb. 37a). Im Durchschnitt wiesen Konstrukte mit GDF-5 Behandlung das 1,8-fache mineralisierte Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (maximale Steigerung: 2,0-fach). Dieser Effekt nahm zwar zum Tag 28 ab, an dem das mineralisierte Volumen der behandelte Gruppe im Mittel noch das 1,4-fache der Kontrollgruppe betrug, blieb aber dennoch signifikant (Abb. 37b). Auch zu diesem Zeitpunkt lag das mineralisierte Volumen aller Konstrukte der GDF-5 behandelten Gruppe über dem der ihnen zugehörigen Kontrollkonstrukte (maximale Steigerung: 2,1-fach).



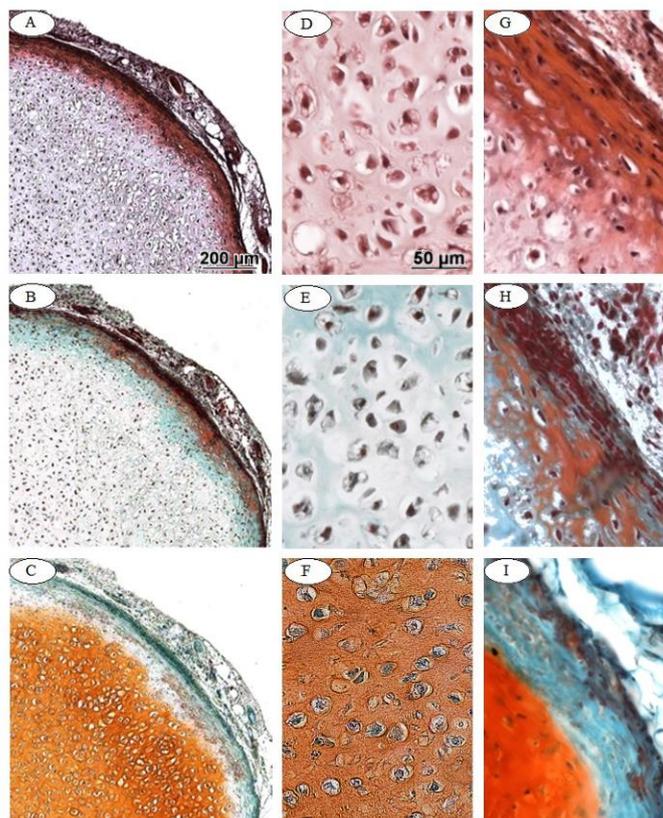
**Abbildung 37: In vivo Mineralisierung von chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen ectop in SCID-Mäusen.** a) Paarweise Darstellung des mineralisierten Volumens der Kontrollkonstrukte in Relation zu deren zugehörigen GDF-5 behandelten Konstrukte; b) Relatives mineralisiertes Volumen der GDF-5 behandelten Konstrukte am Tag 14 und Tag 28, normalisiert auf die Kontrolle (Linie beim Wert 1,0); \*=  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U (n=6)).

Der Einfluss der GDF-5 Behandlung während der chondrogenen Vordifferenzierung auf die anschließende in vivo Mineralisierung von pMSC Konstrukten war demnach geringer als bei den entsprechend behandelten hMSC. Sie bildeten jedoch sowohl am Tag 14 als auch nach 28 Tagen deutlich mehr mineralisiertes Gewebe aus, was im Einklang mit der höheren ALP-Aktivität in vitro steht.



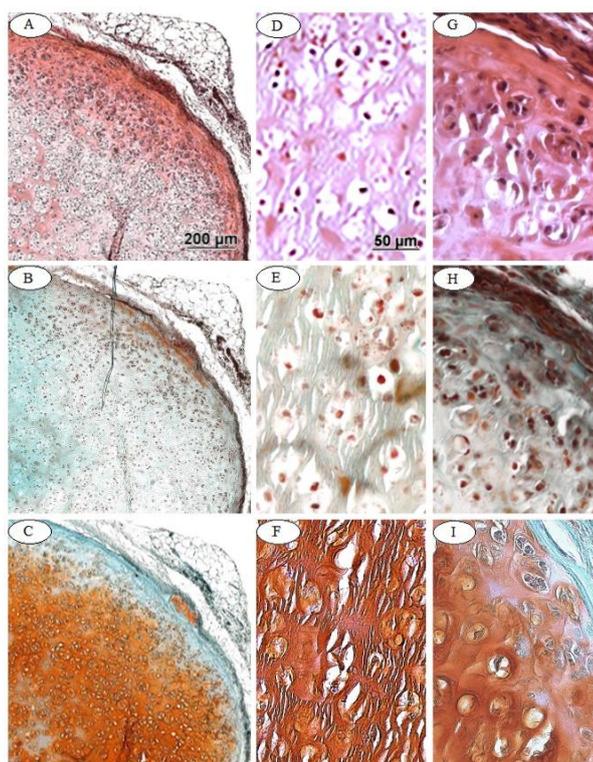
**Abbildung 38: 3D-Rekonstruktionen der chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) pMSC Konstrukte (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 und 28 Tagen in vivo.** Die Konstrukte wurden nach Fixierung mit einer Auflösung von 9 $\mu$ m und einem 0,025mm Titanfilter gescannt. Für die Rekonstruktion wurden Grauwerte zwischen 0,0 und 0,085 verwendet. Darstellung je eines repräsentativen Konstrukts (n=6).

Zur Beurteilung des ausgebildeten Gewebes wurden alle Konstrukte histologisch analysiert (Abb. 39). Von den untersuchten hMSC Konstrukten wiesen nach 14 Tagen in vivo sowohl Konstrukte der GDF-5 behandelten Gruppe als auch Konstrukte der Kontrollgruppe hypertrophes Knorpelgewebe auf, das durch eine Persistenz von proteoglykanreicher Matrix gekennzeichnet war (Abb. 39C). Zudem zeigten alle Konstrukte mit GDF-5 Behandlung und der Kontrollgruppe eine deutlich intensive Rotfärbung (HE-Färbung) in den Randbereichen (Abb. 39A,G), was auf eine Mineralisierung in diesem Bereich hindeutet. Diese Randbereiche stellten sich in der Masson-Goldner-Färbung bei 1/6 Konstrukten der GDF-5 behandelten Gruppe und 1/6 Konstrukten der Kontrollgruppe ebenfalls rötlich dar (Abb. 39H), was für eine beginnende Bildung von Osteoid spricht. In den verbleibenden Konstrukten wiesen die Randbereiche in der Masson-Goldner-Färbung eine intensiv grüne Färbung auf. Im Gegensatz zu den zentralen Bereichen der Konstrukte waren die Konstruktränder durch eine proteoglykanarme Matrix gekennzeichnet (Abb. 39I). Knochenbälkchen und Knochenmark wurden erwartungsgemäß nach 14 Tagen in keinem der untersuchten Konstrukte vorgefunden. Zum 14 Tage-Zeitpunkt konnten zwischen GDF-5 behandelten Konstrukten und den Konstrukten der Kontrollgruppe histologisch keine Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Kriterien festgestellt werden.



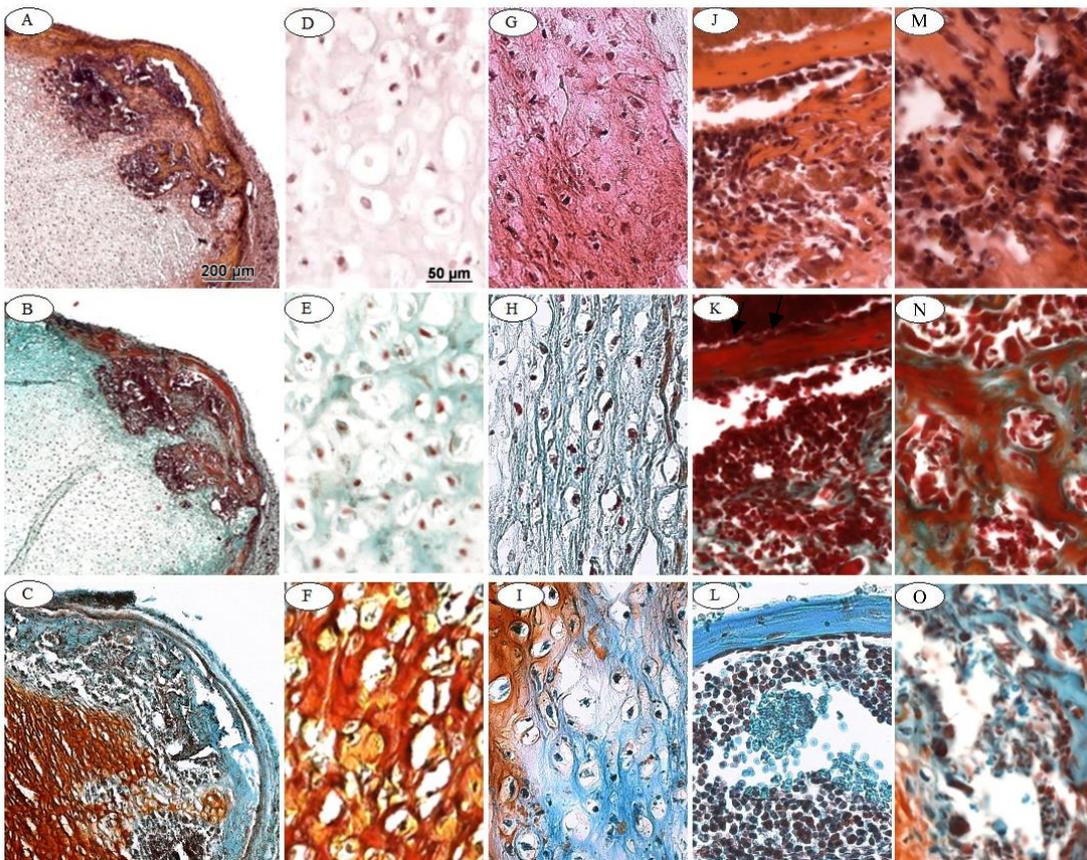
**Abbildung 39: Histologische Analyse von 4 Wochen chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 Tagen ectop in SCID-Mäusen. Darstellung je eines repräsentativen GDF-5 behandelten Konstrukts (n=6); A,D,G: HE-Färbung; B,E,H Masson-Goldner-Färbung; C,F,I: Safranin-O Färbung; A-C: Übersicht; D-F:Hypertrophes Knorpelgewebe; G-I: Beginnende Mineralisierung in den Randbereichen**

Auch bei den für 14 Tage ektop in SCID-Mäuse implantierten pMSC Konstrukten konnten histologisch keine Auswirkungen der Supplementation von GDF-5 während der chondrogenen Vordifferenzierung festgestellt werden. Entsprechend den hMSC Konstrukten bestanden auch die untersuchten pMSC Konstrukte hauptsächlich aus Gewebe mit einer dem hypertrophen Knorpelgewebe ähnlichen Morphologie, das hauptsächlich durch vereinzelte, blasig veränderte Zellen gekennzeichnet war (Abb. 40D-F). Bei allen 4 Konstrukten beider Gruppen zeigte sich eine beginnende Mineralisierung in den Randbereichen, die bei je einem Konstrukt der Kontroll- und der GDF-5 behandelten Gruppe bereits in die Bildung von Osteoid überging. Reifes mineralisiertes Knochengewebe oder Knochenmark konnte zu diesem frühen Zeitpunkt in keinem der untersuchten Konstrukte festgestellt werden.



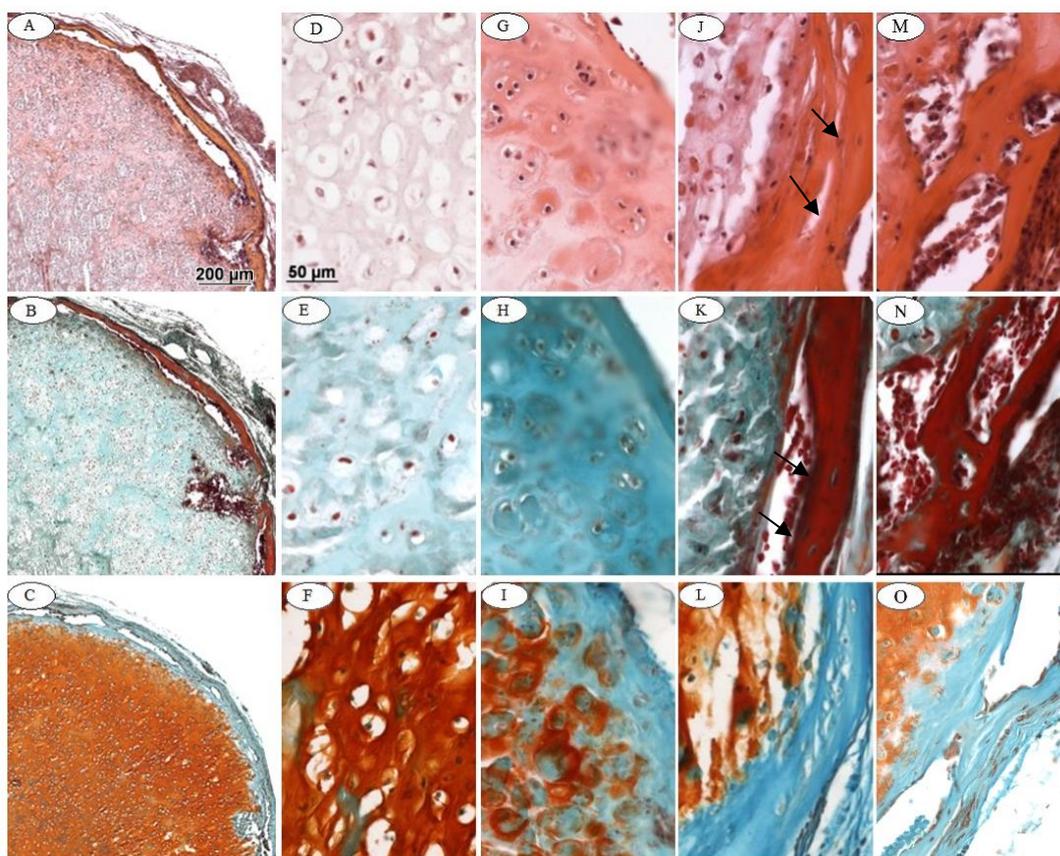
**Abbildung 40:** Histologische Analyse von 4 Wochen chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 14 Tagen ektop in SCID-Mäusen. Darstellung je eines repräsentativen GDF-5 behandelten Konstrukts (n=4); A,D,G: HE-Färbung; B,E,H Masson-Goldner-Färbung; C,F,I: Safranin-O Färbung; A-C: Übersicht; D-F: Hypertrophes Knorpelgewebe; G-I: Beginnende Mineralisierung in den Randbereichen

Die über 28 Tage implantierten hMSC Konstrukte wiesen ebenfalls alle hypertrophes Knorpelgewebe auf, dieses fand sich jedoch hauptsächlich noch in den zentralen Bereichen (Abb.41 D-F). In den Randbereichen wurde das vorliegende Knorpelgewebe bei allen untersuchten Konstrukten zunehmend mineralisiert, was sich in einer breiten, in der HE-Färbung intensiv roten Randschicht zeigte (Abb. 41G). Bei 3/6 Konstrukten der GDF-5 behandelten Gruppe und 2/6 Konstrukten der Kontrollgruppe wurde das randständige Knorpelgewebe zudem auch durch Knochenbälkchen ersetzt (Abb. 41J-L; schwarze Pfeile). 28 Tage nach ektopter Implantation kam es in jeweils einem Konstrukt beider Gruppen darüber hinaus zur Bildung von Knochenmark (Abb. 41M-O).



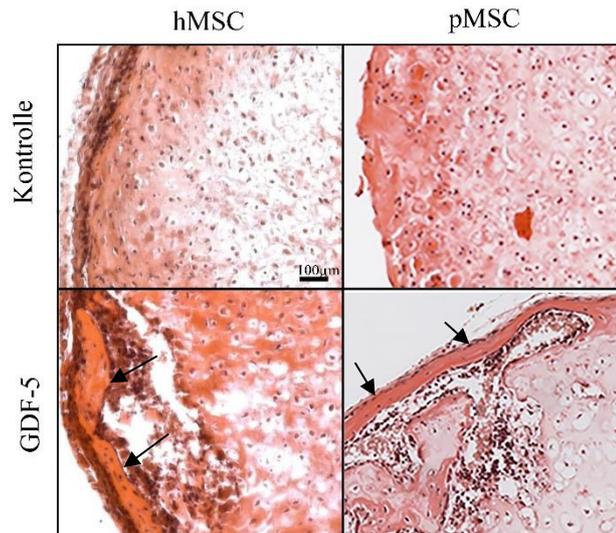
**Abbildung 41: Histologische Analyse von chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen ektopter Implantation in SCID-Mäusen. Darstellung je eines repräsentativen GDF-5 behandelten Konstrukts (n=6). A, D, G, J, M: HE-Färbung; B, E, H, K, N: Masson-Goldner-Färbung; C, F, I, L, O: Safranin-O Färbung; D-F: Hypertrophes Knorpelgewebe; G-I: Kalzifizierter Knorpel; J-L: Knochenspanne im Randbereich des Konstrukts; M-O: Knochenmark im Randbereich des Konstrukts**

Im Zentrum aller pMSC Konstrukte konnte nach 28 Tagen in vivo persistierendes Knorpelgewebe detektiert werden (Abb. 42C,F). In den Randbereichen wurde wie in den untersuchten hMSC Konstrukten eine sich in der HE-Färbung rötlich darstellende Kalzifizierung des Gewebes festgestellt (Abb. 42G). In 4/6 GDF-5 Konstrukten sowie in 1/6 Konstrukten der Kontrollgruppe konnte zudem die Ausbildung von reifen Knochenspannen nachgewiesen werden (Abb. 42J+K; schwarze Pfeile). Bei 3 Konstrukten der GDF-5 behandelten Gruppe wurde auch die Bildung von Knochenmark festgestellt (Abb. 42M-O).



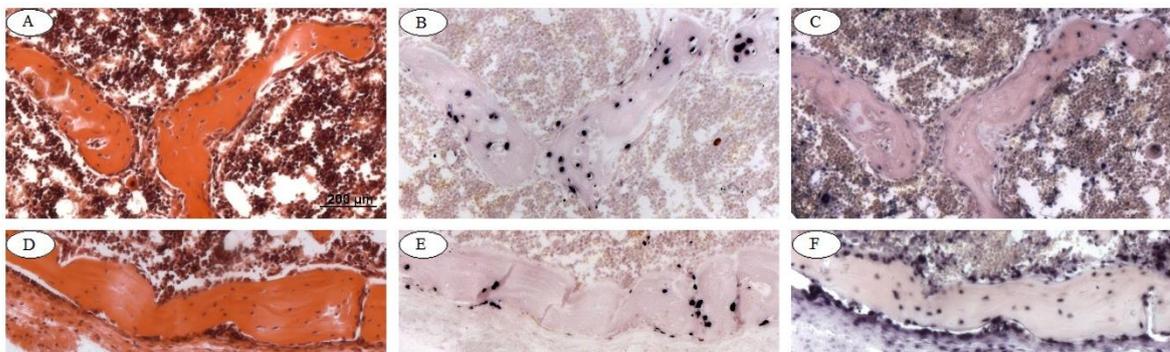
**Abbildung 42: Histologische Analyse von chondrogen vordifferenzierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) pMSC Konstrukten (0,6Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen ectop in SCID-Mäusen.** Darstellung je eines repräsentativen GDF-5 behandelten Konstrukts (n=6). A, D, G, J, M: HE-Färbung; B, E, H, K, N: Masson-Goldner-Färbung; C, F, I, L, O: Safranin-O Färbung; D-F: Hypertrophes Knorpelgewebe; G-I: Kalzifizierter Knorpel; J-L: Knochenspanne im Randbereich des Konstrukts; M-O: Knochenmark im Randbereich des Konstrukts

Bei einer der drei untersuchten hMSC sowie bei zwei von drei pMSC-Populationen war in Konstrukten der Kontrollgruppe nach 28 Tagen ectop in SCID-Mäusen kein Knochengewebe detektierbar, während in GDF-5 behandelten Konstrukten bereits die Bildung von Knochen und zum Teil sogar Knochenmark eingesetzt hatte (Abb. 43). Die Behandlung mit GDF-5 während der Vorkultivierung schien demnach die Knochenbildung in vivo zu beschleunigen.



**Abbildung 43:** HE-Färbung von für 4 Wochen chondrogen vordifferenzierten Kontroll- und deren zugehörigen GDF-5 supplementierten (+10ng/ml TGF- $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC und pMSC Konstrukten (0,6 Mio Zellen in Fibrin) nach 28 Tagen ektop in SCID-Mäusen. Knochenstrukturen sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

Mit Hilfe einer In-situ Hybridisierung humaner bzw. porciner und muriner DNA wurde der Ursprung des nachgewiesenen Knochens näher untersucht. Die meisten Osteoblasten und Bone Lining Cells waren positiv für humane bzw. porcine und negativ für murine DNA (Abb. 46B+C; pMSC siehe Anhang-Abb. 7), sind also humanen bzw. porcinen Ursprungs, was für eine enchondrale Bildung des detektierten Knochens durch die implantierten, chondral vordifferenzierten MSC spricht. Vor allem in den Randbereichen der Konstrukte wurden jedoch auch murine Knochenbälkchen nachgewiesen (Abb.46 E+F).



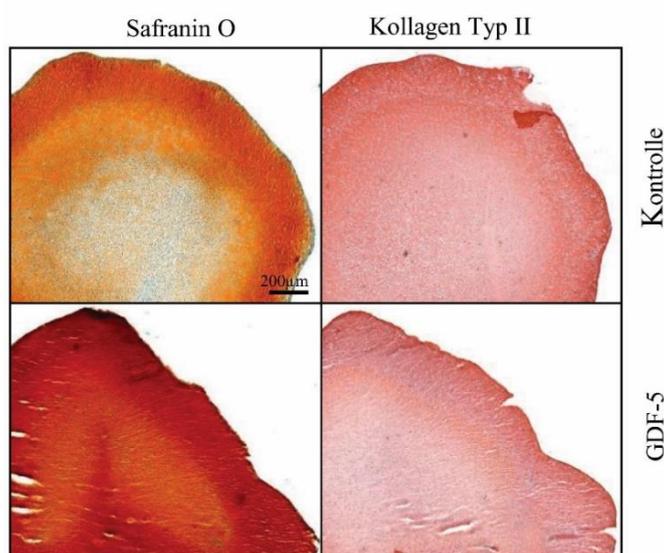
**Abbildung 44:** In situ-Hybridisierung humaner ALU und muriner SINE A/B an einem repräsentativen Kontrollkonstrukt nach 4-wöchiger chondrogener Vordifferenzierung (+10ng/ml TGF $\beta$  und 56 Tagen ektop in SCID-Mäusen. A) HE-Färbung eines humanen Knochenbalkens; B) Färbung des Knochenbalkens aus A) auf humane ALU; C) Färbung des Knochenbalkens aus A) auf murine Sine; D) HE-Färbung eines murinen Knochenbalkens; E) Färbung des Knochenbalkens aus D) auf humane ALU; F) Färbung des Knochenbalkens aus D) auf murine SINE A/B

Betrachtet man sowohl die Resultate der  $\mu$ CT-Analyse als auch der histologischen Untersuchung, so ist festzustellen, dass die Vorkultivierung unter Zugabe von 150ng/ml GDF-5 zu einer beschleunigten Mineralisierung von hMSC und pMSC Konstrukten führte. Die Anwendung von GDF-5 förderte bei einigen Zellpopulationen auch die Knochenbildung.

#### 4.7 Wirkung von GDF-5 auf die Redifferenzierung von pCHO

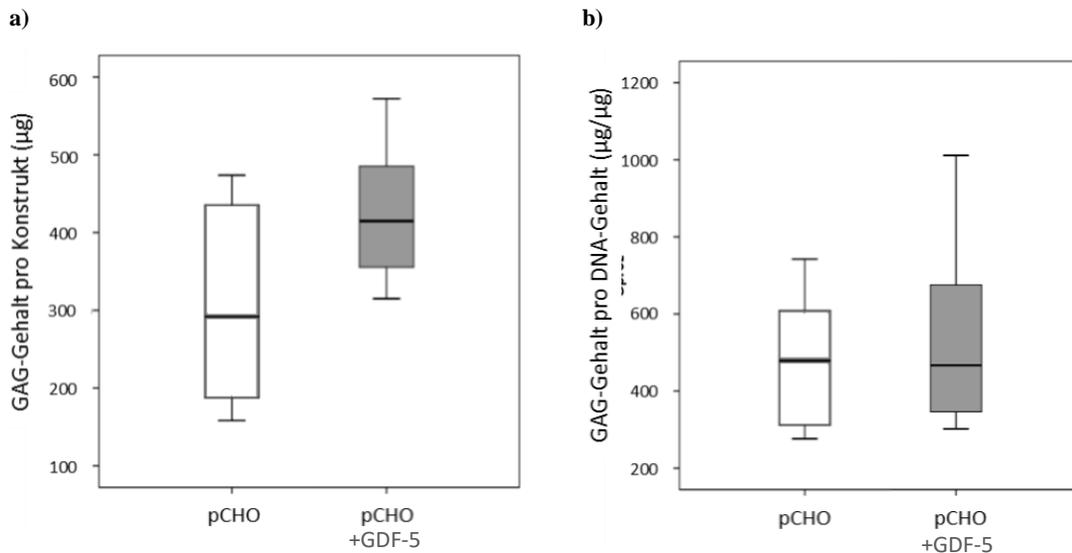
Zur Beurteilung der Effekte von GDF-5 auf das umliegende Knorpelgewebe bei einer Anwendung eines GDF-5-beladenen Gewebeklebers im Gelenk wurden auch pCHO mit und ohne Zugabe von 150ng GDF-5 chondrogen in vitro redifferenziert (+10ng/ml TGF $\beta$ ).

Die Matrixablagerung der pCHO wurde am Tag 28 histologisch an je 2 Konstrukten pro Zellpopulation (n=3) über eine Safranin O-Färbung und eine Kollagen Typ II Immunhistologie untersucht. Sowohl die Proteoglykane als auch das Kollagen Typ II wurden bei allen untersuchten Zellpopulationen über die gesamten Konstrukte verteilt abgelagert. Während in der Kollagen Typ II Immunhistologie keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar waren, deutete die intensivere Safranin O-Färbung der GDF-5 behandelten Konstrukte auf eine vermehrte Proteoglykanablagerung in diesen Konstrukten hin (Abb. 47)



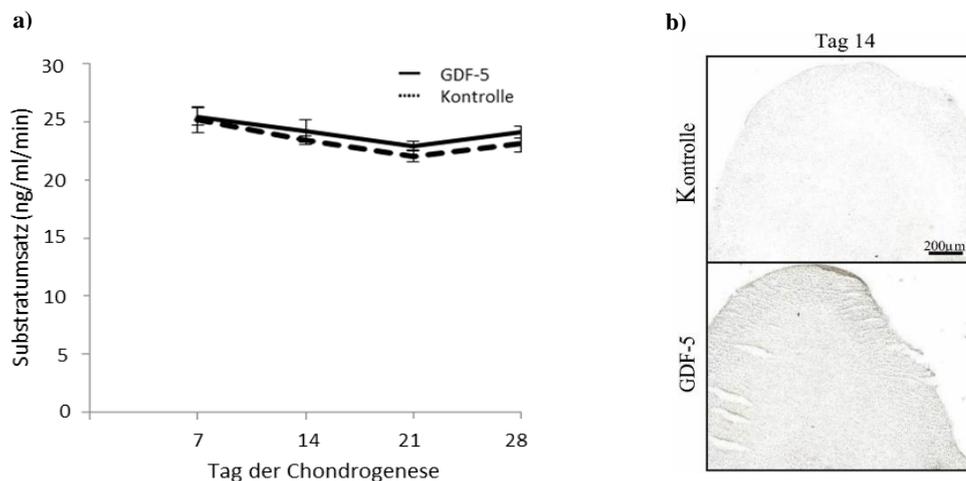
**Abbildung 45:** Histologische Darstellung der Matrixablagerung von pCHO Konstrukten (1,2Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung (+ 100ng/ml TGF $\beta$ ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5. Safranin-O Färbung und Kollagen Typ II Immunhistologie von Konstrukten einer repräsentativen Zellpopulation (n=3)

Nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung wurde zudem bei je 2 Konstrukten pro Kondition und Zellpopulation der Glykosaminoglykangehalt mittels eines DMMB-Assays bestimmt. Wie in Abb. 46a dargestellt, zeigten GDF-5 behandelte Konstrukte mit einem mittleren GAG-Gehalt von 544,7 $\mu$ g/Konstrukt einen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell gesteigerten Glykosaminoglykangehalt (mittlerer GAG-Gehalt: 482,8 $\mu$ g). Diese Steigerung wurde jedoch nicht signifikant. Betrachtete man die mittlere GAG-Ablagerung in Relation zum DNA-Gehalt, also die Glykosaminoglykanablagerung pro Zelle, bestanden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 46b).



**Abbildung 46:** Glykosaminoglykan-Gehalt von pCHO Konstrukten (1,2Mio in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGFβ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5 (n=3). a) Glykosaminoglykan-Gehalt pro Zelle; b) Glykosaminoglykan-Gehalt pro Gesamtkonstrukt

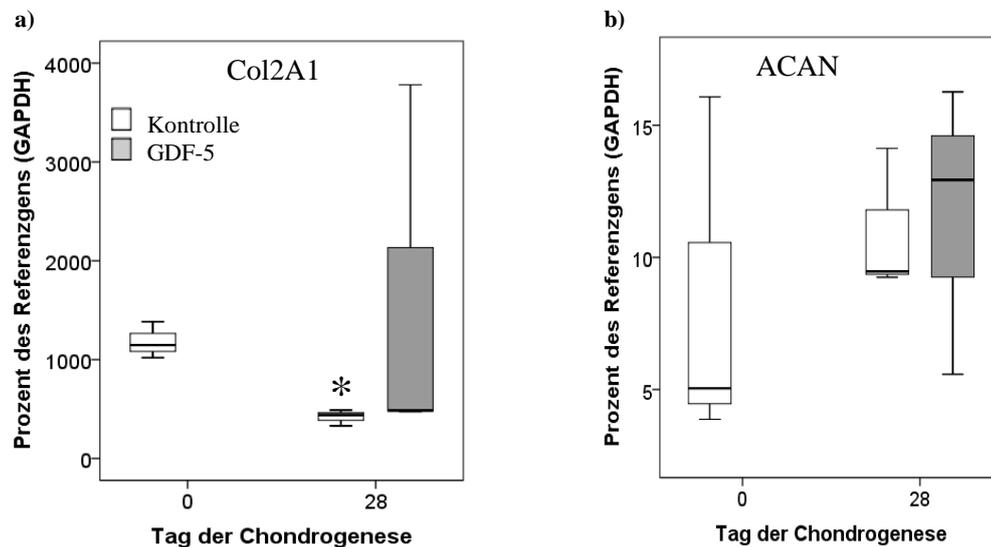
Zur Beurteilung der hypertrophen Entwicklung wurde die ALP-Aktivität der pCHO im Verlauf ihrer Redifferenzierung untersucht. Wie für artikuläre Chondrozyten, die im Gelenk nicht in die hypertrophe Differenzierung eintreten, charakteristisch, konnte nur eine sehr geringe ALP-Aktivität nachgewiesen werden, die im Verlauf der Chondrogenese nicht weiter anstieg. Die Zugabe von GDF-5 beeinflusste die ALP-Aktivität der pCHO zu keinem der betrachteten Zeitpunkte (Abb. 47a) und führte demnach nicht zu einer vermehrt hypertrophen Differenzierung der untersuchten pCHO Populationen. Dieses Ergebnis wurde auch durch die in beiden Gruppen negativ ausfallende ALP-Färbung bestätigt (Abb. 47b), mit Hilfe derer die geringe vorhandene ALP-Aktivität nicht mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 47:** ALP-Nachweis während der in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGFβ) von pCHO Konstrukten (1,2Mio Zellen in Fibrinhydrogel) ohne und mit 150ng/ml GDF-5 (n=3). a) ALP-Aktivitätsbestimmung aus gepoolten Kulturüberständen von je 8 Konstrukten pro Zeitpunkt und Kondition; b) Histologischer ALP-Nachweis an Schnitten von 14 Tagen mit oder ohne 150ng/ml GDF-5 chondrogen differenzierten Fibrinhydrogel Konstrukten

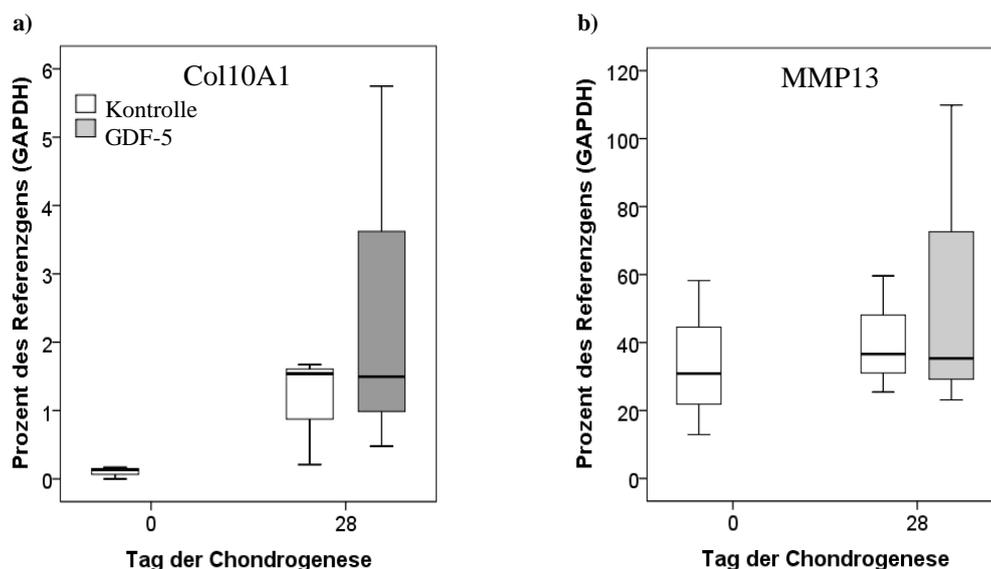
Zur Evaluation möglicher prochondrogener und prohypertropher Effekte einer Behandlung mit GDF-5 während der Redifferenzierung von pCHO wurden am Tag 28 je 3 Konstrukte pro Kondition und Zellpopulation mittels quantitativer PCR untersucht und deren Genexpression in Relation zur Expression der Zellen am Tag 0 betrachtet. Die untersuchten pCHO-Populationen zeigten bereits am

Tag 0 eine hohes Expressionslevel für Kollagen Typ II, das am Tag 28 der Redifferenzierung in der Kontrollgruppe signifikant nach unten reguliert wurde (Abb. 48a). Die GDF-5 behandelte Gruppe zeigte ebenfalls eine abgesenkte Expression von Kollagen Typ II, diese wurde jedoch nicht signifikant. Das Expressionsniveau von Aggrekan hingegen stieg, unabhängig von einer Behandlung mit GDF-5, im Laufe der Redifferenzierung auf das bis zu 2,5-fache an (Abb. 48b).



**Abbildung 48:** mRNA-Expression von chondrogenen Markern bei pCHO Konstrukten (1,2Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGF $\beta$ ) ohne und mit 150 ng/ml GDF-5. a) Kollagen Typ II (Referenzgen GAPDH); b) Aggrekan (Referenzgen GAPDH); \* =  $p \leq 0,05$  vs. d0 (Mann-Whitney-U; n = 3)

Der hypertrophe Marker Kollagen Typ X wurde von den untersuchten pCHO nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese geringgradig höher exprimiert (Abb. 49a) als am Tag 0. Die Expression des terminalen Differenzierungsmarkers MMP13 wurde hingegen während 28 Tagen in vitro Chondrogenese nicht reguliert. Beide Marker wurden durch die Supplementation mit GDF-5 nicht beeinflusst.



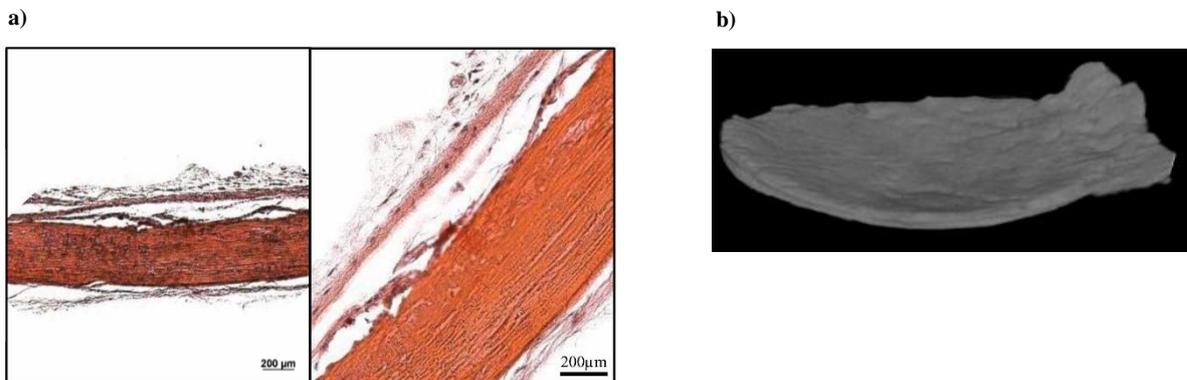
**Abbildung 49:** mRNA-Expression von hypertrophen und terminalen Differenzierungsmarkern bei pCHO Konstrukten (1,2Mio Zellen in Fibrinhydrogel) nach 28 Tagen in vitro Chondrogenese (+10ng/ml TGF ohne und mit 150 ng/ml GDF-5 (n=3). a) Col10A1 (Referenzgen GAPDH); b) MMP13 (Referenzgen GAPDH)

In vitro wurden keine prohypertrophen Effekte von GDF-5 auf pCHO nachgewiesen. Eine Indikation gegen die Anwendung eines GDF-5 beladenen Gewebeklebers im Gelenk liegt somit auf Grundlage dieses Versuchs nicht vor.

#### 4.8 Effekte der Beladung von Fibrinkleber mit GDF-5 auf die Integration von Knorpel-Tissue Engineering Konstrukten mit Knochengewebe im ektopen Modell

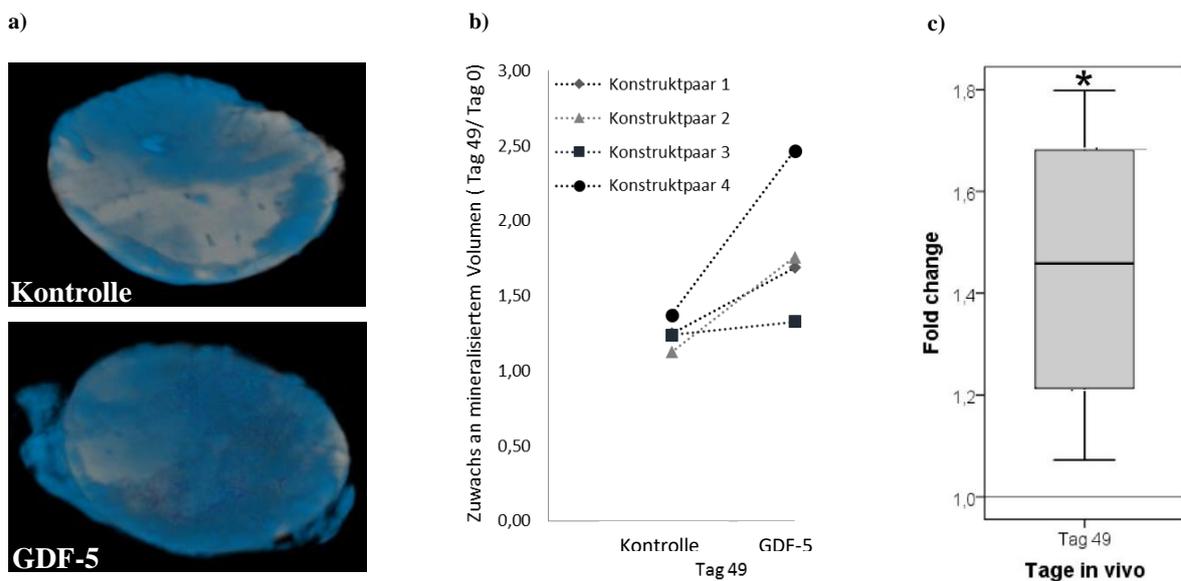
Um festzustellen, ob die Anwendung von GDF-5 auch in einem zur Befestigung eines Tissue-Engineering Konstrukts genutzten Gewebeklebers die Mineralisierung von Vorläuferzellen fördern kann, wurde die Situation im Gelenk bei der Therapie eines Knorpeldefekts mit Hilfe eines dreischichtigen Konstrukts ektop simuliert. Hierzu wurden dreischichtige Konstrukte bestehend aus einer Knochenplatte, einer zellhaltigen Fibrinkleberschicht (0,6 Mio pMSC) mit bzw. ohne 900ng GDF-5 und einem StarPEG-Heparin Hydrogel hergestellt (siehe 3.2.2.6) und für 7 Wochen subkutan in SCID Mäuse implantiert. Wie bei der Beurteilung des Effekts von GDF-5 auf die in vivo Mineralisierung vordifferenzierter MSC, wurde auch bei diesem Versuch jedes GDF-5 behandelte Konstrukt mit seinem zugehörigen Kontrollkonstrukt (gleiche Zellpopulation, gleiches Tier, gleiche Lokalisation (cranial bzw. caudal)) verglichen. Um auszuschließen, dass es allein durch die Präparation und Implantation der Mausschädeldecken zur ektopen Knochenbildung durch die Wirtstiere kommt, wurden zusätzlich 2 Mausschädeldecken ohne Gewebekleber und StarPEG-Heparin Hydrogel implantiert (Leerkontrolle).

Bei den beiden Leerkontrollen konnte nach 7 Wochen ektop in SCID-Mäusen sowohl histologisch (Abb. 50a) als auch mittels  $\mu$ CT-Analyse (Abb. 50b) kein auf die Knochenplatten aufgelagertes mineralisiertes Gewebe detektiert werden. Ohne den verwendeten zellhaltigen Fibrinkleber kam es demnach nicht zur ektopen Knochenbildung durch das Wirtstier.



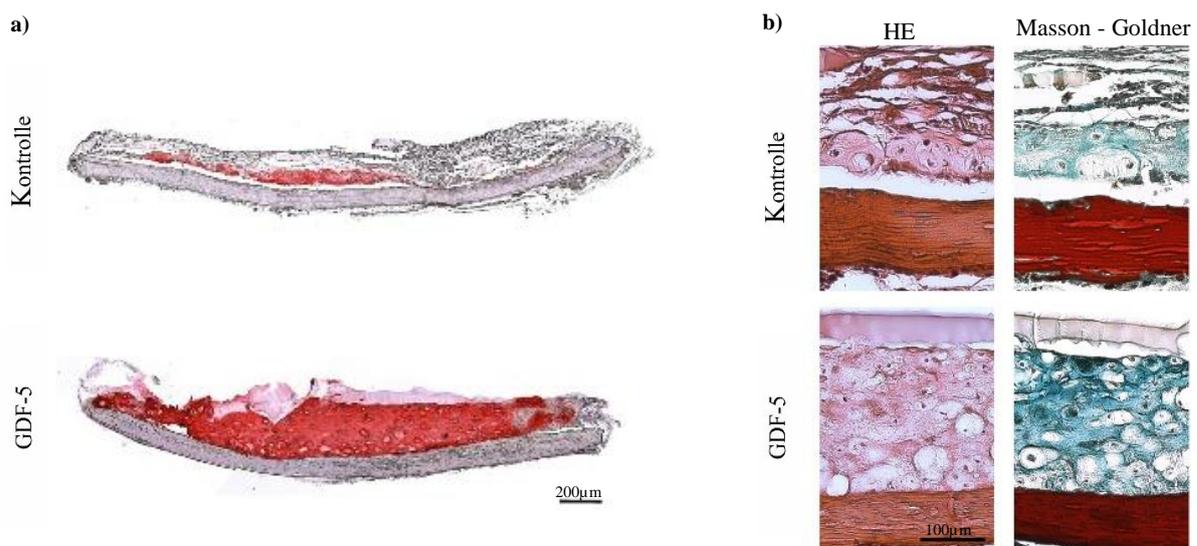
**Abbildung 50:** Darstellung einer Leerkontroll-Schädeldecke nach 7 Wochen ektop in SCID-Mäusen. a) HE- Färbung eines histologischen Schnitts einer Leerkontrolle; b) 3D-Rekonstruktion einer Leerkontrolle (n=2)

Im Gegensatz zu den untersuchten Leerkontrollen zeigten Konstrukte beider Gruppen in der  $\mu$ CT-Analyse einen Zuwachs an mineralisiertem Gewebe (Abb.51a). Das Verhältnis des mineralisierten Volumens nach 7 Wochen ektop in SCID-Mäusen zu dem bereits am Tag 0 vorhandenen mineralisierten Volumen, lag bei Konstrukten mit GDF-5 beladenem Fibrinkleber signifikant über dem der Kontrollkonstrukte. Bei allen 4 untersuchten Konstruktpaaren wurde durch die Beladung mit GDF-5 eine Steigerung des neu gebildeten mineralisierten Volumens erreicht, die das bis zu 1,8 fache betrug.



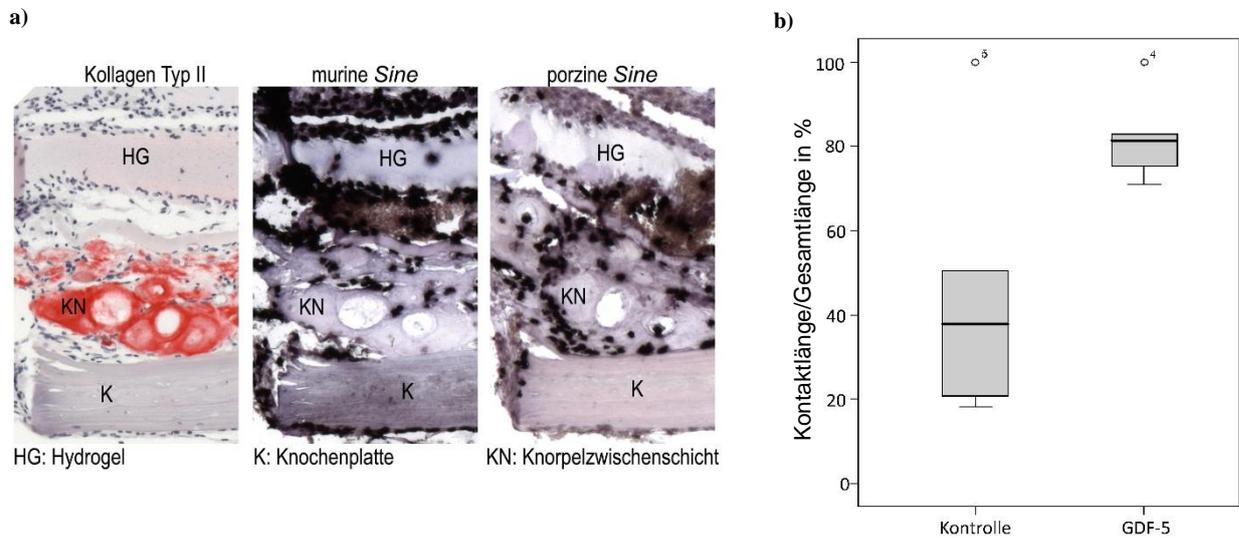
**Abbildung 51: µCT-Analyse der dreischichtigen Konstrukte ohne und mit GDF-5-Beladung nach 7 Wochen in vivo.** a) Überlagerte Darstellung der 3D-Rekonstruktionen von Tag 0 (weiss) und Tag 49 (blau) eines Kontroll- und eines GDF-5 behandelten Konstrukts; b) Mineralisiertes Volumen der dreischichtigen Konstrukte am Tag 49 im Verhältnis zu deren mineralisiertem Volumen am Tag 0. Darstellung der jeweiligen Partnerkonstrukte in Bezug zueinander; c) Relatives zugebildetes mineralisiertes Volumen von dreischichtigen Konstrukten mit GDF-beladenem Gewebekleber normalisiert zur Kontrolle (Linie beim Wert 1,0); \* =  $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U:  $n=4$ )

Histologische Untersuchungen zeigten bei Konstrukten mit GDF-5 beladenem Fibrinkleber eine breite, auf die Schädeldecken aufgelagerte Zellschicht mit chondrozytenartiger, hypertropher Zellmorphologie (Abb. 52). Bei den untersuchten Konstrukten der Kontrollgruppe stellte sich diese Zellschicht hingegen deutlich flacher und fibrös dar, eine chondrogene Zellmorphologie war nicht in allen Konstrukten erkennbar. Dass es sich bei der gebildeten Zwischenschicht um Knorpelgewebe handelte, konnte durch den immunhistologischen Nachweis von Kollagen Typ II in beiden Gruppen (Abb. 52a) bestätigt werden. Die bereits im µCT beobachtete starke Mineralisierung der gebildeten Zwischenschicht wurde durch die intensive Grünfärbung in der Masson-Goldner-Färbung bestätigt (Abb. 52b).



**Abbildung 52: Histologische Analyse der dreischichtigen Konstrukte ohne und mit GDF-5-Beladung nach 7 Wochen in vivo.** Darstellung je eines Kontroll- und eines GDF-5 beladenen Konstrukts ( $n=6$ ). a) Kollagen Typ II Färbung; b) Vergrößerte Darstellung eines repräsentativen Ausschnitts in der HE- und der Masson-Goldner-Färbung

Durch eine In-situ-Hybridisierung auf porcine *Sine* und murine *Sine* A/B konnte gezeigt werden, dass die gebildete Knorpelgewebeschicht hauptsächlich porcinen Ursprungs ist (Abb. 53a). Zudem bestand zwischen der Knochenplatte und dem verwendeten Gewebekleber in der GDF-5 supplementierten Gruppe bei 4 von 5 untersuchten Konstruktpaaren eine stärker ausgeprägte Kontaktlinie (Abb. 53b).



**Abbildung 53: In-situ Hybridisierung und Analyse des Kontakts zwischen Knochenplatte und Gewebekleber von dreischichtigen Konstrukten ohne und mit GDF-5-Beladung nach 7 Wochen in vivo.** a) Kollagen Typ II, sowie murine *Sine* und porcine *Sine* Färbung an Serienschritten eines repräsentativen GDF-5 beladenen Konstrukts b) Prozentualer Anteil der Kontaktlänge an der Gesamtlänge des Konstrukts. Je 1 Schnitt von  $n=5$  Konstrukten pro Kondition wurde mit der Software ImageJ vermessen.

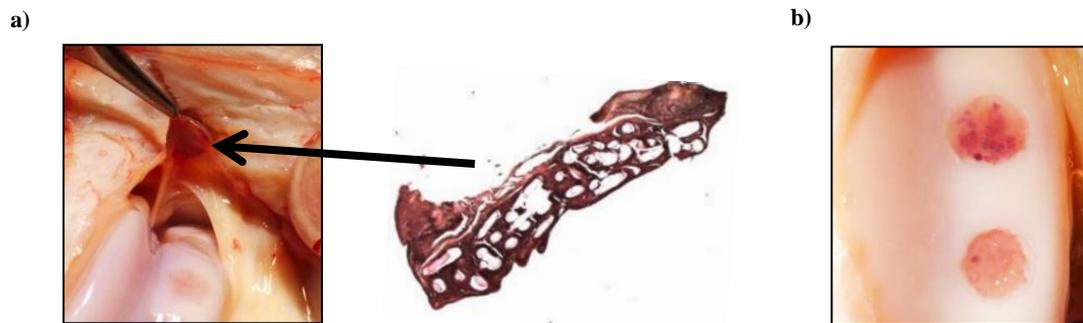
Die Beladung des Gewebeklebers mit GDF-5 resultierte also in der Ausbildung einer im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägten, mineralisierten Knorpelzwischenicht durch die eingebrachten pMSC, die einen verbesserten Kontakt zur Knochenplatte gewährleistete.

#### 4.9 Studie zur Integration von Hydrogelkonstrukten im Minipig

Um festzustellen ob ein GDF-5 beladener Gewebekleber tatsächlich in der Lage ist, die Integration neuartiger Tissue Engineering Konstrukte zum subchondralen Knochen zu verbessern, wurden verschiedene Gewebeklebervarianten in einer orthotopen Minipigstudie getestet. Auf Grundlage der Ergebnisse der Biokompatibilitätsuntersuchung wurden für den ersten Teilversuch der Minipigintegrationsstudie zellfreie P(AGE/G)HA-SH-CCT Konstrukte als Konstruktart gewählt. Als Positivkontrolle dienten Fibrinhydrogel-CCT-Konstrukte, da Fibrin bereits im klinischen Alltag Verwendung findet. Entsprechend den Ergebnissen aus der Studie zur Kleberadhäsion wurde für die Fixation der Kontroll-Konstrukte Fibrinkleber gewählt. Für die P(AGE/G)HA-SH-CCT Konstrukte wurde neben Fibrinkleber aufgrund seiner guten Klebeeigenschaften auch BioGlue® verwendet. Zusätzlich wurde in Anbetracht der vielversprechenden Ergebnisse aus den ektopen in vivo Versuchen auch eine Fibrinklebervariante beladen mit  $5\mu\text{g}$  GDF-5 verwendet (Studiendesign siehe: 3.2.5.3).

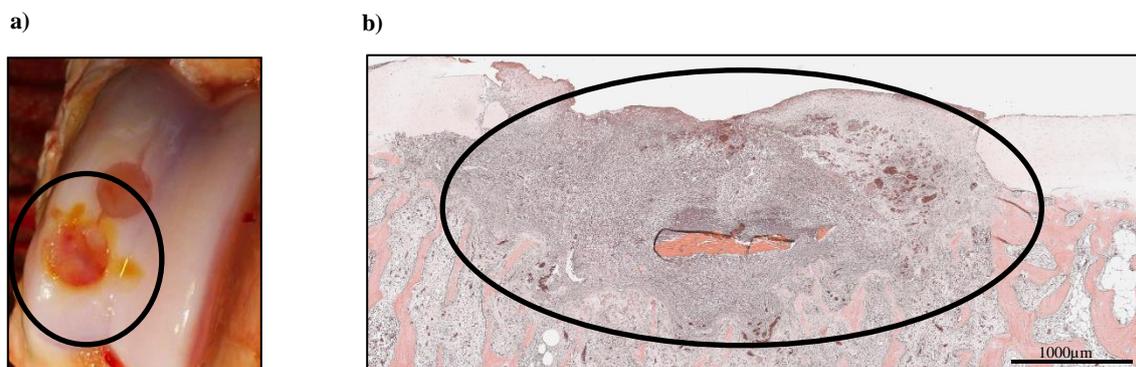
Bei Explantation der Femurkondylen wurden in den Gelenken mehrerer Tiere konstrukt-ähnliche Objekte außerhalb der Defekte vorgefunden. Diese wiesen in der histologischen Analyse CCT-förmige Strukturen auf, sodass nachweislich 5 der 16 implantierten Konstrukte während der Standzeit aus den Defekten fielen (Abb. 54a). Darüber welche Präparate aus den Defekten fielen und über den Verbleib

der weiteren Konstrukte in den Defekten konnte makroskopisch keine Aussage getroffen werden, jedoch erschienen alle Defekte gut gefüllt (Abb. 54b).



**Abbildung 54: Befunde bei der Explantation von CCT- verstärkten Hydrogelkonstrukten nach 28 Tagen orthotop im Kniegelenk von Minipigs.** a) Makroskopische und histologische Darstellung (HE-Färbung) eines bei Explantation in den Gelenken vorgefundenen Objekts; b) Makroskopische Darstellung einer Trochlea mit zwei repräsentativen Defekten (n=16)

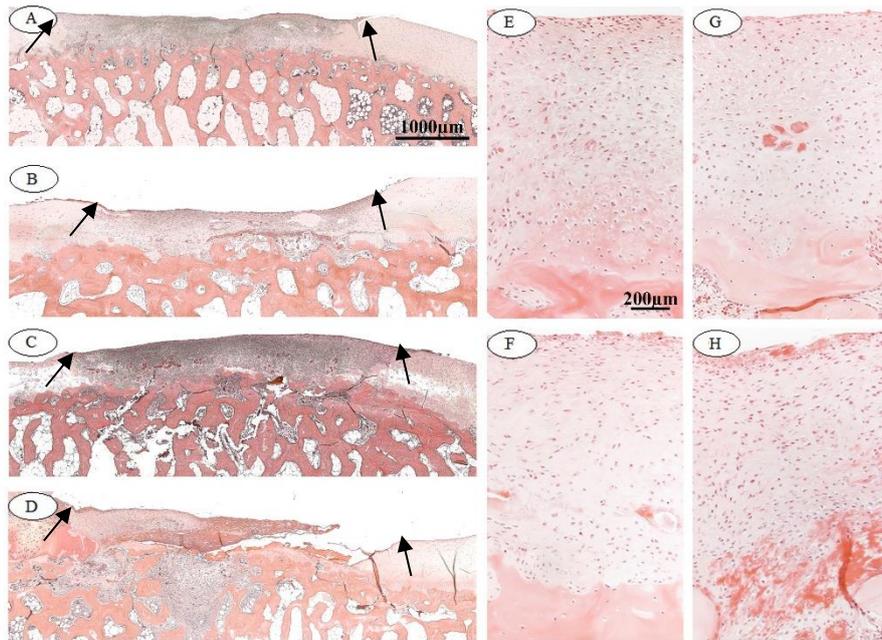
Zudem zeigten alle mit BioGlue® behandelten Defekte eine bräunliche Verfärbung des umgebenden Knorpelgewebes (Abb. 55a; schwarzer Kreis) und wiesen darüber hinaus histologisch lytische Veränderungen des subchondralen Knochens auf (Abb. 55b; schwarze Ellipse).



**Abbildung 55: Makroskopische und histologische Befunde bei mit BioGlue® behandelten Defekten 28 Tage nach Implantation.** a) Makroskopische Darstellung einer explantierten Trochlea. Bräunliche Verfärbung des umliegenden Knorpelgewebes bei einem mit BioGlue® behandelten Defekt (schwarze Ellipse); b) HE-Färbung eines mit BioGlue® behandelten Defekts. Knochenlysen im Defektbereich (schwarze Ellipse).

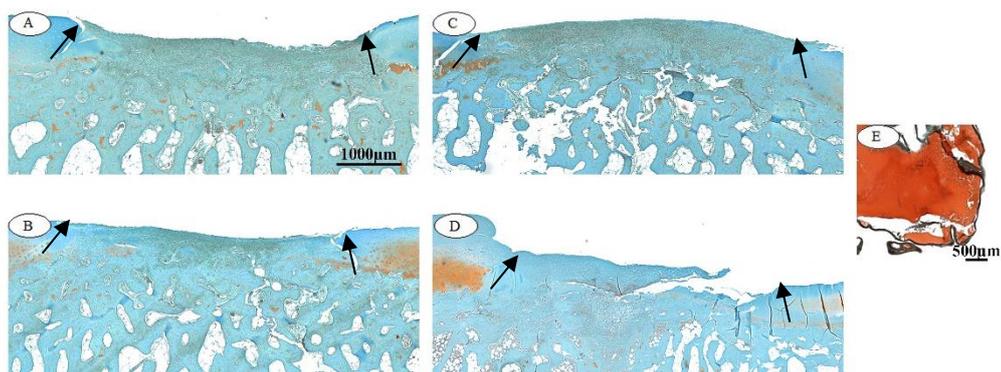
Diese Befunde deuteten auf zytotoxische Eigenschaften des Gewebeklebers BioGlue® hin und stellten dessen Eignung zur Fixierung von Knorpel-Tissue Engineering Konstrukten in Frage.

Bei der histologischen Untersuchung wurde frühzeitig auffällig, dass in keinem der untersuchten Schnitte Hinweise auf CCT-ähnliche Strukturen und somit einen Verbleib der Hydrogel-CCT Konstrukte im Defekt erkennbar waren. Dies spricht dafür, dass unabhängig von der getesteten Klebervariante keines der 16 implantierten Konstrukte über 4 Wochen im Defekt verblieb. Dennoch war in allen untersuchten Defekten eine gute Defektfüllung mit Regenerationsgewebe zu erkennen (Abb. 56). Das aufgebaute Regenerationsgewebe wies jedoch keine knorpelartige Zellmorphologie auf, sondern war reich an spindelförmigen Zellen, was für einen fibrösen Charakter des Regenerats sprach.



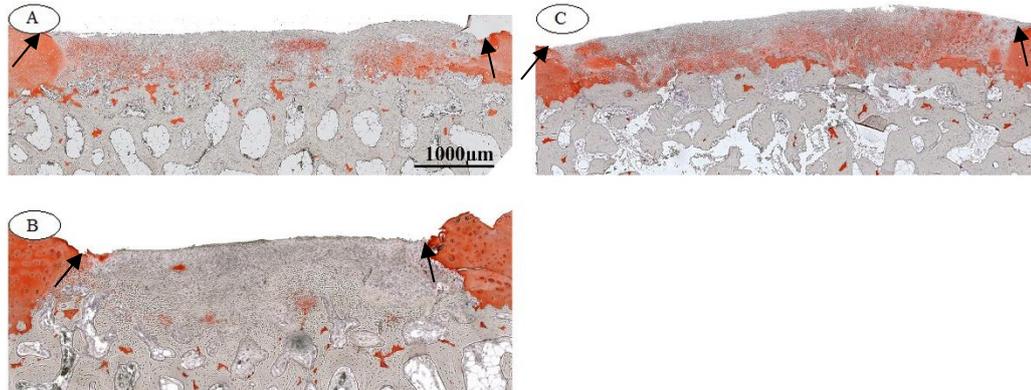
**Abbildung 56: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten fixiert mit verschiedenen Gewebeklebern (HE-Färbung).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Fibrinhydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; B) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit Fibrinkleber; C) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit GDF-5 beladenem Fibringewebekleber; D) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit BioGlue®; E) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von A); F) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von B); G) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von C); H) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von D)

Zudem konnten in keinem der untersuchten Defekte Safranin O positive Extrazellulärmatrix im gebildeten Regenerationsgewebe detektiert werden (Abb. 57). Da die verwendeten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele aufgrund der enthaltenen Hyaluronsäure in der Safranin O Färbung stark gefärbt werden (Abb. 56E), ist die Abwesenheit Safranin O positiver Areale ein weiterer Hinweis darauf, dass keine Konstrukte in den Defekten verblieben sind.



**Abbildung 57: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten fixiert mit verschiedenen Gewebeklebern (Safranin O-Färbung).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Fibrinhydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; B) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit Fibrinkleber; C) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit GDF-5 beladenem Fibringewebekleber; D) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit BioGlue®; E) zellfreies P(AGE/G)HA-SH Hydrogel nach vier Wochen subkutan in einer immunkompetenten Maus

Kollagen Typ II wurde ebenfalls in 10 der 12 untersuchten Defekte nicht nachgewiesen. Nur bei je einem Defekt der Positivkontrolle und der GDF-5 Klebergruppe war im Defektbereich eine geringgradig positive Kollagen Typ II Färbung detektierbar (Abb. 58A+C). Von einer Untersuchung der mit BioGlue® behandelten Defekte wurde aufgrund der Ergebnisse der Übersichtsfärbung abgesehen (siehe 4.9.2).



**Abbildung 58: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von CCT verstärkten Hydrogelkonstrukten in Kombination mit verschiedenen Gewebeklebern (Kollagen Typ II Färbung).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Fibrinhydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; B) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit Fibrinkleber; C) P(AGE/G)HA-SH Hydrogel fixiert mit GDF-5 beladenem Fibringewebekleber

Das vorhandene Reparationsgewebe weist somit keine knorpelartigen Charakteristika auf, sondern ist rein fibröser Natur. Abschließend ist festzustellen, dass keiner der getesteten Kleber über eine ausreichende Klebekraft verfügte um die getesteten CCT verstärkten Fibrin - und P(AGE/G)HA-SH Hydrogelkonstrukte im Defekt zu fixieren. Über einen eventuellen integrationsfördernden Effekt von GDF-5 im orthotopen Modell konnte leider keine Aussage getroffen werden, da davon auszugehen ist, dass die Konstrukte nicht ausreichend lange im Defekt verblieben um eine Wirkung des GDF-5 zu ermöglichen.

## 4.10 Weiterführende Studie zur Konstruktfixierung im Minipig

Da die Steifheit des verwendeten CCT-Scaffolds einen möglichen Faktor für das Versagen der Kleber darstellt, wurde in einer weiteren Studie die Fixation von Hydrogelen ohne CCT-Verstärkung untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse aus der Biokompatibilitätsstudie (siehe 4.3) wurden für diese in der Mehrzahl StarPEG-Heparin Gele genutzt. Die StarPEG-Heparin Hydrogele (30µl) wurden entweder in die Defekte eingegossen oder mit Fibrinkleber in diesen fixiert. Zudem wurde versucht CCT-verstärkte Konstrukte mit Hilfe von 4 Einzelheften initial im Defekt zu verankern (jeweils n = 3). Darüber hinaus wurden weiterentwickelte, porös 3D gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele in Kombination mit Fibrinkleber mit oder ohne zusätzlicher Sicherung durch eine Kollagenmembran (n = 1) untersucht. Als Kontrolle wurden Leerdefekte gesetzt. Nach 4 Wochen Standzeit wurden die Tiere euthanasiert und die Femurkondylen explantiert. Das Studiendesign ist in Tab. 3 dargestellt.

### 4.10.1 Fixierung der StarPEG/Heparin Hydrogele im chondralen Vollschichtdefekt

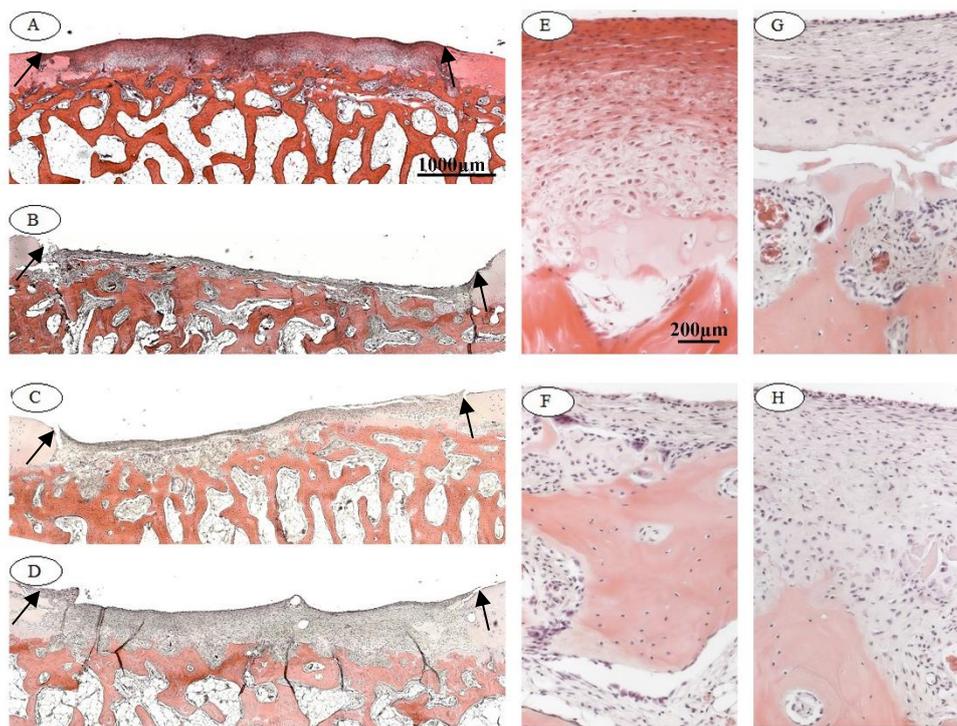
Makroskopisch waren bei Explantation keine Anzeichen für Entzündungen, wie beispielsweise vermehrte Gelenksflüssigkeit, erkennbar. Hinsichtlich der CCT-verstärkten StarPEG/Heparin-Konstrukte konnte bereits bei Explantation festgestellt werden, dass die Einzelhefte keine ausreichende

Fixation darstellten und es zum Verlust der Konstrukte kam (Abb. 59d). Über den Verbleib der anderen Konstrukte im Defekt konnte makroskopisch keine Aussage getroffen werden. Alle Defekte inklusive der Leerkontrolle erschienen gut gefüllt.



**Abbildung 59: Makroskopische Ansicht chondraler Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von StarPEG/Heparin Konstrukten in Kombination mit verschiedenen Fixierungsmethoden.** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; a) Leerdefekt b) nicht verstärktes StarPEG/Heparin Hydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; c) im Defekt auspolymerisiertes, nicht verstärktes StarPEG/Heparin Hydrogel; d) CCT verstärktes StarPEG/Heparin Hydrogel fixiert mit Fibringewebekleber und vier Einzelheften ; n=3

Histologisch zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Defektfüllung. Während alle Leerdefekte eine sehr gute Füllung aufwiesen, zeigten Defekte mit eingegossenem und eingeklebtem StarPEG/Heparin-Hydrogel ein deutlich geringer ausgeprägtes Reparaturgewebe.

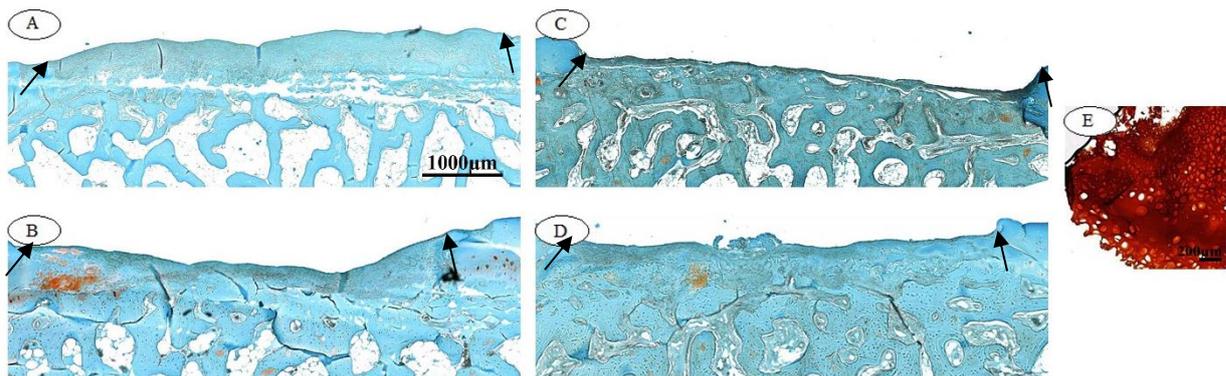


**Abbildung 60: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von StarPEG/Heparin Hydrogelkonstrukten in Kombination mit verschiedenen Fixierungsmethoden (HE-Färbung).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Leerdefekt; B) StarPEG-Heparin Hydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; C) in den Defekt eingegossenes StarPEG-Heparin Hydrogel; D) eingenahtes CCT verstärktes StarPEG/Heparinhydrogel E) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von A); F) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von B); G) Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von C); Vergrößerte Darstellung des Defektbereichs von D); n=3

Betrachtet man die Struktur des neu gebildeten Gewebes, ist dieses in allen vier Gruppen maßgeblich durch dicht gelagerte, spindelförmige Zellen charakterisiert. Verschiedene horizontale Schichten mit

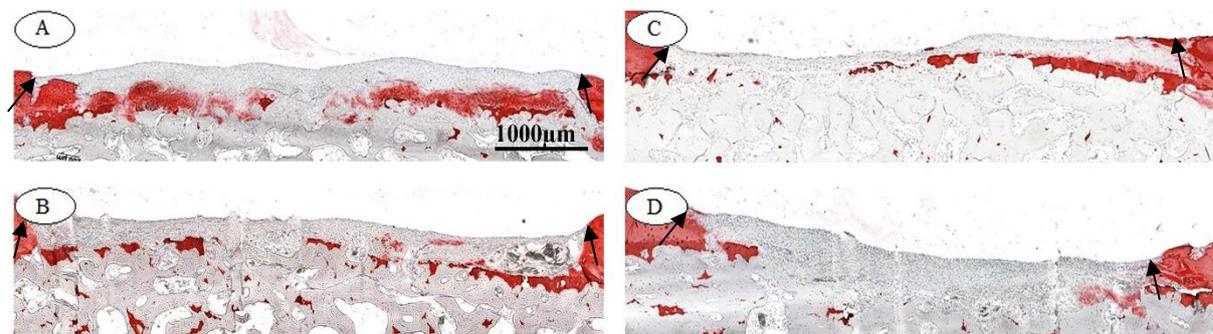
unterschiedlicher Zellmorphologie, wie typisch für artikulären Knorpel, sind in keinem der untersuchten Defekte erkennbar. Bei dem gebildeten Wirtsgewebe handelt es sich somit bei allen untersuchten Gruppen um fibröses Reparatursgewebe ohne erkennbare knorpelartige Strukturen.

Die Safranin-O Färbung zeigte in allen untersuchten Defekten ein Fehlen von proteoglykanreicher Matrix an, was die morphologische Charakterisierung des Regenerationsgewebes zusätzlich bestätigte. Hinweise auf verbleibende Hydrogelreste waren zudem in keinem der untersuchten Präparate vorzufinden. Diese würden sich aufgrund des enthaltenen Heparins, ähnlich wie die in der ersten Minipigintegrationsstudie verwendeten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele positiv in der Safranin-O Färbung darstellen (Abb. 61E).



**Abbildung 61: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von StarPEG/Heparin Hydrogelkonstrukten in Kombination mit verschiedenen Fixierungsmethoden (Safranin-O Färbung).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Leerdefekt; B) StarPEG-Heparin Hydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; C) in den Defekt eingegossenes StarPEG-Heparin Hydrogel; D) eingenähtes CCT verstärktes StarPEG/Heparinhydrogel; E) zellfreies StarPEG/Heparin Hydrogel nach 4 Wochen subkutan in einer immunkompetenten Maus; n=3

Mittels der immunhistologischen Färbung auf Kollagen Typ II konnten ebenfalls in keinem der untersuchten Präparate Hinweise auf das Vorhandensein einer knorpelähnlichen Extrazellulärmatrix im Defektbereich detektiert werden (Abb. 62). Die Kollagen Typ II positiven Areale im unteren Bereich der Defekte sind aufgrund ihrer Morphologie als bei der Präparation der Defekte nicht entfernte Anteile des ursprünglichen Knorpelgewebes erkennbar.

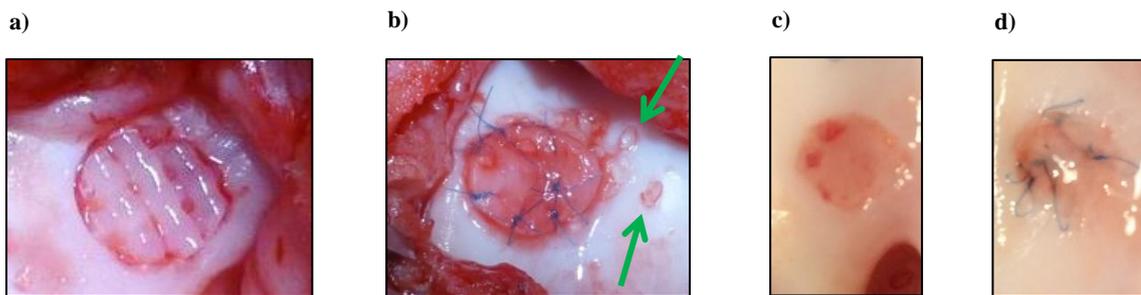


**Abbildung 62: Chondrale Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs 28 Tage nach Implantation von StarPEG/Heparin Hydrogelkonstrukten in Kombination mit verschiedenen Fixierungsmethoden (Kollagen Typ II Immunhistologie).** Die Defektränder sind mit schwarzen Pfeilen markiert; A) Leerdefekt; B) StarPEG-Heparin Hydrogel fixiert mit Fibringewebekleber; C) in den Defekt eingegossenes StarPEG-Heparin Hydrogel; D) eingenähtes CCT verstärktes StarPEG-Heparin Hydrogel; n=3

Abschließend ist festzustellen, dass keine der in Kombination mit StarPEG-Heparin Hydrogel getesteten Fixierungsvarianten verlässlich den Verbleib der Konstrukte im Defekt über 4 Wochen sicherstellte. Die Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Defekten hinsichtlich der Defektfüllung weisen zwar darauf hin, dass die Konstrukte zunächst im Defekt fixiert werden konnten, nach Ablauf von 4 Wochen waren jedoch in keinem der untersuchten Defekte Hydrogelreste nachzuweisen. Mögliche Effekte der StarPEG-Heparin Hydrogele auf die Entwicklung eines chondrogenen Regenerationsgewebes konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden, jedoch kann hierzu nur eine begrenzte Aussage getroffen werden, da unklar ist, wie lange die Hydrogele im Defekt verblieben.

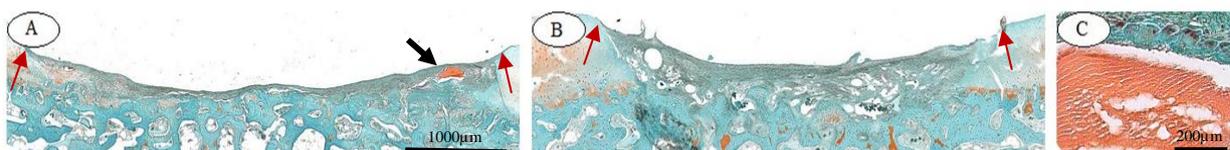
#### 4.10.2. Fixierung porös gedruckter P(AGE/G)HA-SH Hydrogele

Bereits bei der Implantation der gedruckten Hydrogelkonstrukte kam es zu Problemen hinsichtlich der Konstruktstabilität. Wie auch durch die Ergebnisse der ektopen Studie angedeutet (siehe 4.4.1), wiesen porös gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele eine geringere mechanische Stabilität auf als gegossene oder CCT verstärkte Konstrukte. Beim Übernähen der Chondrogide<sup>®</sup>-Membran über den mit dem gedruckten Hydrogel gefüllten Defekt kam es daher zum Zerschneiden des Gels (Abb. 63b). Bei Explantation nach 4 Wochen war die angenähte Chondrogide<sup>®</sup>-Membran noch in Position, die beiden Defekte erschienen gut gefüllt (Abb. 63c+d).



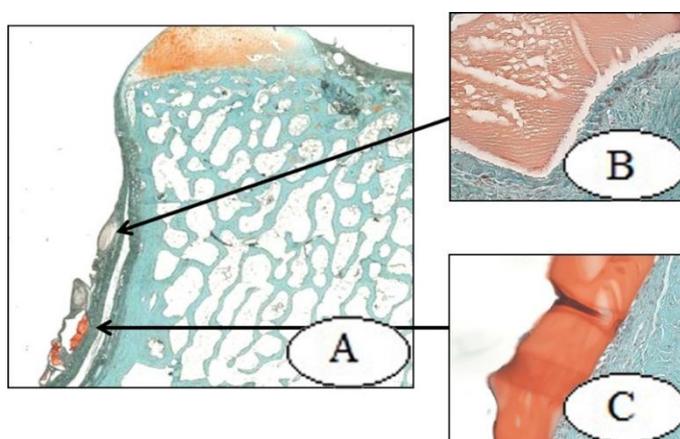
**Abbildung 63: Makroskopische Ansicht chondraler Vollschichtdefekte im Kniegelenk von Minipigs mit gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen bei Implantation und Explantation nach 28 Tagen in vivo (n=1).** a) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel direkt nach Implantation; b) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel übernäht mit einer Chondrogide-Membran<sup>®</sup> direkt nach Implantation (grüne Pfeile markieren Gelbruchstücke); c) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel bei Explantation; d) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel übernäht mit einer Chondrogide-Membran<sup>®</sup> bei Explantation

In der histologischen Analyse der beiden Defekte konnten nur sehr kleine Teilstücke des Hydrogels im Defektbereich des nicht-übernähten Defektes nachgewiesen werden (Abb. 64A; schwarzer Pfeil; Abb. 64C), im übernähten Defekt wurden keine Hinweise auf verbliebene Gelrückstände detektiert (Abb. 64B). Das gebildete Regenerationsgewebe stellt sich entsprechend den Ergebnissen für die getesteten StarPEG-Heparin Hydrogele in der Safranin-O Färbung negativ dar. Die Morphologie der Zellen im Defektbereich war spindelförmig, die Dichte der Zellen sehr hoch. Das gebildete Regenerationsgewebe wies somit keine knorpelähnlichen Strukturen, sondern einen fibrösen Charakter auf.



**Abbildung 64: Chondrale Vollschichtdefekte nach 28 Tagen orthotoper Implantation von gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen (Safranin O-Färbung).** Die Defektränder sind mit roten Pfeilen markiert; A) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel (schwarzer Pfeil markiert Gelrest) B) Defekt mit gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogel übernäht mit einer Chondroide-Membran®; C) Vergrößerte Ansicht des Gelstückes im Defekt aus A)

Zudem wurden Bruchstücke der gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele außerhalb der Defekte vorgefunden (Abb. 65A). Bei allen detektierten Hydrogelbruchstücken war auffällig, dass entsprechend den Ergebnissen der ektopen Studie keine Zellen eingewandert waren (Abb. 65B+C).



**Abbildung 65: Randbereich eines Explantats nach 28 Tagen orthotoper Implantation eines gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogels (Safranin O-Färbung).** A) Übersicht über eine Femurkondyle mit Bruchstücken eines gedrucktem P(AGE/G)HA-SH Hydrogels im Randbereich (schwarze Pfeile markieren Gelreste); B) Vergrößerte Ansicht des oberen Gelstückes aus A); C) Vergrößerte Ansicht des unteren Gelstückes aus A)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass porös gedruckte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele eine geringe mechanische Stabilität aufwiesen. Zudem fand entsprechend den Ergebnissen der ektopen Studie auch orthotop keine Einwanderung von Zellen in die gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele statt, was die Verwendung zellfreier Konstrukte in weiterführenden Studien in Frage stellt.

## 5 Diskussion

Tissue Engineering ist ein vielsprechender Ansatz zur Therapie von Knorpeldefekten, jedoch scheitert die langfristige Regeneration defekten Knorpelgewebes mittels Tissue Engineering häufig an der mangelnden Integration der Konstrukte in das umliegende Wirtsgewebe (ENDERS et al. 2010, HORAS et al. 2003, KHAN et al. 2008, SPILLER et al. 2011). Daher ist die Entwicklung einer Methode zur adäquaten Fixierung und verbesserten Integration von Tissue Engineering Konstrukten in das umliegende Wirtsgewebe besonders auch im Hinblick auf den Einsatz biogedruckter Hydrogelkonstrukte, für die sich nur wenige der bisher genutzten Fixierungsoptionen eignen, essenziell, um langfristig eine erfolgreiche Knorpelregeneration zu erzielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob ein, mit dem Wachstumsfaktor GDF-5 beladener Gewebekleber in der Lage ist, die osteochondrale Integration von Tissue Engineering Konstrukten durch die Generierung einer knorpelartigen mineralisierten Verbindungsschicht zwischen den Konstrukten und der subchondralen Knochenplatte, zu verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass ein GDF-5 beladener Fibringewebekleber das Potential zur Verbesserung der osteochondralen Integration von bioinstructiven Hydrogelen aufweist. Die initiale Fixierung der CCT-verstärkten Hydrogelkonstrukte konnte jedoch durch den neu entwickelten Kleber nicht gewährleistet werden. Im Folgenden werden sowohl die Eigenschaften der verwendeten Hydrogelkonstrukte als auch die Frage welche konstruktbezogenen Faktoren zum Versagen des Gewebeklebers beigetragen haben könnten näher diskutiert. Des Weiteren wird erörtert welche Ansätze in Zukunft verfolgt werden können, um die mineralisationsfördernden Effekte eines GDF-5 beladenen Gewebeklebers dennoch nutzen zu können.

### 5.1 Biokompatibilität der bioinstructiven Hydrogele

Die Untersuchung von neuartigen Biomaterialien im ektope Mausmodell bildet eine Brücke zwischen deren *in vitro* Analyse und ihrem Einsatz im Großtiermodell und liefert Informationen über Materialeigenschaften, wie beispielsweise die Biokompatibilität (CHU et al. 2010, WANCKET 2015). So kann die Beeinflussung der späteren Ergebnisse durch unerwünschte Wirtsreaktionen vermieden werden. Die Evaluation der Biokompatibilität des StarPEG-Heparin und des P(AGE/G)HA-SH Hydrogels ergab, dass beide Gelsysteme biokompatibel sind. Im Vergleich mit der Positivkontrolle Fibrinhydrogel war jedoch festzustellen, dass besonders das P(AGE/G)HA-SH Hydrogel nur sehr langsam durch die Wirtszellen abgebaut werden konnte. Zelleinwanderung in die nicht verstärkten Hydrogele wurde nur in sehr geringem Maße detektiert. Für eine Anwendung zellfreier Hydrogele zur Knorpelregeneration, ist die Einwanderung von Wirtszellen in die Gelkonstrukte und ein langfristiger Abbau der Konstrukte durch den Wirt jedoch essenziell (DAI et al. 2016, FILOVA et al. 2013). Ektope Studien erlauben zwar nur bedingt Aussagen über das Verhalten von Biomaterialien im orthotopen Mikromilieu (LIU et al. 2010), jedoch ist aufgrund der höheren Durchblutung und Nährstoffversorgung subkutan von einer im Vergleich zur Gelenkumgebung stärkeren Zelleinwanderung bei ektope Implantation auszugehen. Es ist also basierend auf den ektope Ergebnissen wahrscheinlich, dass auch bei einem orthotopen Einsatz von nicht CCT-verstärkten Hydrogelen die Zelleinwanderung, besonders in Gele vom Typ P(AGE/G)HA-SH, gering ausfallen würde.

Durch die Kombination mit dem CCT-Scaffold konnte die Zelleinwanderung in das P(AGE/G)HA-SH Hydrogel massiv gesteigert werden. Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, dass Wirtszellen die Einwanderung entlang der Stränge des Scaffolds erleichtert wurde (DAI et al. 2016, MALDA et al.

2004). Zum anderen könnte die hohe Steifheit der CCT-Konstrukte zu vermehrten Gewebsirritationen und einer stärkeren Aktivierung des Abwehrsystems geführt haben, was die verstärkte Zelleinwanderung und den beschleunigten Gelabbau bewirkt haben könnte. Zudem stellte sich nach Abschluss der durchgeführten Versuche heraus, dass durch die Beschichtung des CCT-Scaffolds mit dem Radikalfänger Vitamin E, die UV-Licht medierte Vernetzung des P(AGE/G)HA-SH Hydrogel höchstwahrscheinlich behindert wurde (KIM et al. 2009). Ein verringerter Vernetzungsgrad ging wahrscheinlich mit einer reduzierten Festigkeit des Hydrogels einher (MOGHADAM und PIOLETTI 2015). Dass der Vernetzungsgrad von Hydrogelen einen Einfluss auf deren Biokompatibilität hat, wurde bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt (MOGHADAM und PIOLETTI 2015, ZHANG et al. 2014). Die verstärkte Zelleinwanderung in das mit CCT aufgerüstete P(AGE/G)HA-SH Hydrogel könnte demnach auch aus der geringeren Festigkeit des Hydrogels resultiert sein.

Die Kombination von StarPEG-Heparin Hydrogelen mit CCT führte zu vermehrt adversen Wirtsreaktionen, genauer zu Hämatomen. Diese könnten ebenfalls dadurch hervorgerufen worden sein, dass die Einwanderung von Wirtszellen in das StarPEG-Heparin Hydrogel und damit der Abbau des Gels, durch das CCT-Scaffold begünstigt wurde. Im Zuge eines beschleunigten Gelabbaus wurden möglicherweise größere Mengen an Heparin, einer der beiden Hauptkomponenten des Hydrogels, dessen physiologische Funktion die Gerinnungshemmung darstellt (AZNAR 1966), freigesetzt, was zu lokalen Störungen in der Blutgerinnung geführt haben könnte.

Auf Grundlage der Ergebnisse der Biokompatibilitätsstudie sollten StarPEG-Heparin Hydrogele in weiterführenden Studien ohne CCT-Verstärkung, P(AGE/G)HA-SH Hydrogele dagegen mit CCT-Verstärkung eingesetzt werden. Zudem könnte eine gezielte Herabsetzung der Festigkeit von nicht verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen in Betracht gezogen werden, um die Einwanderung von Wirtszellen zu begünstigen.

## **5.2 Redifferenzierung von pCHO in bioinstruktiven Hydrogelkonstrukten**

Im Rahmen der durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die bioinduktiven Hydrogelsysteme die Redifferenzierung von Chondrozyten sowohl mit als auch ohne Verstärkung mit CCT unterstützen. Verglichen mit der Positivkontrolle Fibrinhydrogel zeigten beiden Varianten der zwei Hydrogeltypen jedoch deutlich schlechtere Resultate, mit einer geringeren und vermehrt perizellulären Ablagerung knorpeliger Matrix. Ein exakter quantitativer Vergleich hinsichtlich der Menge an abgelagerter Kollagen Typ II Matrix in den verschiedenen Hydrogelkonstrukten war nicht möglich, da lediglich Proben für eine histologische Analyse generiert wurden und histologische Untersuchungen allenfalls semiquantitative Eindrücke ermöglichen.

Eine mögliche Erklärung für die lediglich perizelluläre Ablagerung der chondrogenen Matrix im StarPEG-Heparin und P(AGE/G)HA-SH Hydrogel ist, dass die Hydrogelmatrices nur um die eingebrachten Zellen herum abgebaut wurde und somit die neu gebildete Matrix nur in direkter Umgebung der Zellen abgelagert werden konnte (DHOTE et al. 2013, ROBERTS et al. 2011). Diese Annahme wird auch durch die Resultate der ektopen Studie zur Biokompatibilität bekräftigt, die bereits Hinweise darauf lieferte, dass nicht mit CCT verstärkte Hydrogele nur langsam durch einwandernde Wirtszellen abgebaut werden können. Die langsame Biodegradabilität stellt ein häufig beschriebenes Phänomen für Biomaterialien dar, die synthetische Bestandteile aufweisen und ist für viele

biodruckbare Herstellungsverfahren auch erwünscht (BROWNING et al. 2014, GAISSMAIER et al. 2003). Die beiden getesteten Hydrogeltypen, StarPEG-Heparin und P(AGE/G)HA-SH zeigten vergleichbare Resultate zu anderen Biomaterialien, die derzeit für die Regeneration von Knorpelgewebe getestet werden (NICODEMUS und BRYANT 2008, PARMAR et al. 2015, ROBERTS und BRYANT 2013). Im Unterschied zu anderen Gelsystemen bieten die beiden Hydrogelsysteme jedoch die Möglichkeit der Beladung mit Wachstumsfaktoren und bioinstruktiven Peptiden um so die Redifferenzierung bzw. die Chondrogenese der Zellen in ihnen zu modifizieren (HESSE et al. 2017). Eine weitere Option wäre auch, durch Modifikation des Polymeranteils in den Hydrogelen oder des Vernetzungsgrades die Abbaubarkeit der Gele durch wirtseigene Zellen anders einzustellen, um zu versuchen eine über das gesamte Konstrukt verteilte Matrixablagerung zu erhalten (NICODEMUS et al. 2011). Dabei muß ergänzend jedoch auch die mechanische Stabilität der Hydrogelkonstrukte beachtet werden.

Im Gegensatz zur Biokompatibilitätsstudie konnten hinsichtlich der Redifferenzierung keine Effekte durch Verstärkung mit CCT detektiert werden. Auffällig war jedoch, dass auch in dieser Studie nur geringe Reste des P(AGE/G)HA-SH Hydrogels in den CCT-Scaffolds nachgewiesen werden konnte, was höchstwahrscheinlich auf die geringere Vernetzung und damit eine zu schnelle Abbaubarkeit des Gels in Kombination mit CCT zurückzuführen ist (siehe 5.1). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Redifferenzierungsstudie somit, dass in zellhaltigen Hydrogelen, aufgerüstet beispielsweise mit allogenen Chondrozyten oder MSC, Knorpelmatrix abgelagert wird, sich positiv auf die Regeneration von chondralen Vollschichtdefekten auswirken könnte.

### **5.3 Messung der Kleberadhäsionskraft**

Mit Hilfe der Adhäsionskraftmessung wurde die Wirksamkeit der verschiedenen Gewebekleber in Kombination mit den neuartigen CCT-verstärkten Hydrogelkonstrukten getestet. Hierbei zeigte besonders der Fibringewebekleber stark variierende Ergebnisse für die verschiedenen Konstrukttypen und die Positivkontrolle. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der verschiedenen Hydrogele zurückzuführen, die daher eine unterschiedlich starke Verbindung mit dem Fibringewebekleber eingehen konnten (KNECHT et al. 2007). In Relation zu den Ergebnissen anderer Studien zur Adhäsionskraft von Gewebeklebern in chondralen Defekten, lieferte der Fibringewebekleber in Kombination mit den CCT-verstärkten Hydrogelen vergleichbar gute Ergebnisse (DEHNE et al. 2012, KULL et al. 2009).

BioGlue® ist ein kommerziell erhältlicher Gewebekleber, der derzeit erfolgreich in der humanen Gefäßchirurgie eingesetzt wird (TANSLEY et al. 2006). Er zeichnet sich dort vor allem durch seine gute Funktionalität bei „feuchten“ Oberflächen aus, was ihn auch für das Knorpel-Tissue Engineering als interessante Alternative erscheinen ließ. Ein in vitro Studie zur Fixierung von Knorpelkonstrukten mittels Glutaraldehyd lieferte zudem vielversprechende Resultate (OUNGOULIAN et al. 2014). Bislang waren keinerlei Studien zur Effektivität von BioGlue® als Mittel zur Fixierung von Tissue Engineering Konstrukten in chondralen Defekten bekannt, weshalb die Vorstudie zur Kleberadhäsionskraft besonders für diesen Klebertyp notwendig war. In der vorliegenden Untersuchung konnten im Gegensatz zum Fibringewebekleber kaum Varianzen hinsichtlich der Adhäsionskraft von BioGlue® in Kombination mit verschiedenen Konstrukttypen festgestellt werden. Da BioGlue® jedoch für mehrere der getesteten Hydrogelkonstrukte die maximal messbare Adhäsionskraft erreichte bzw.

überschritt, wäre es möglich, dass oberhalb der, im vorliegenden Modell maximal messbaren Adhäsionskraft, Unterschiede zwischen den Gruppen auftreten. Um hierzu eine verlässliche Aussage treffen zu können, müssten die durchgeführten Versuche in einem abgeänderten Versuchsdesign erneut durchgeführt werden. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber lediglich die Information relevant war, ob BioGlue® aufgrund seiner Adhäsionskraft eine mögliche Alternative zur Konstruktfixierung darstellen könnte, und bereits im ursprünglichen Versuchsdesign gezeigt werden konnte, dass BioGlue® den bisher häufig genutzten Fibrinkleber hinsichtlich der Adhäsionskraft deutlich übertraf, wurde von einem solchen abgeänderten Versuchsdesign abgesehen.

Eine Begründung dafür, dass trotz der guten Ergebnisse im ex vivo Modell zur Adhäsionskraftmessung die Fixierung der Konstrukte in vivo weder mit Fibringewebekleber noch mit BioGlue® gelang, ist, dass nicht alle im Gelenk auftretenden Kräfte, sondern lediglich eine senkrecht auf den Kleber einwirkende Zugkraft im vorliegenden Modell untersucht wurde (VAHDATI et al. 2012). Zudem wurden die Messungen an den Kniegelenken junger Schlachtschweine durchgeführt, die mit ca. 2,0 mm Dicke eine deutlich stärker ausgeprägte Gelenkknorpelschicht aufwiesen, als sie in den Kniegelenken der operierten Minipigs vorgefunden wurde. Die tieferen Defekte in den Schlachtschweinknien ermöglichten eine bessere Fixierung der Testkonstrukte, als dies in vivo möglich war. Das Modell lieferte daher nur begrenzt auf die Anwendung in vivo übertragbare Ergebnisse, ermöglichte aber dennoch Aussagen über die Eignung der verschiedenen Gewebekleber zur Fixation der neuartigen Hydrogel-CCT-Konstrukte, was das Hauptziel der Studie darstellte. So eignet sich Fibringewebekleber besonders zur Fixierung von Fibrin-CCT-Konstrukten, während für die Fixierung von StarPEG-Heparin und P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen eher BioGlue® heran gezogen werden sollte.

## **5.4 Einfluss von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese**

Die Untersuchung der Effekte von GDF-5 als Mediumszusatz auf die in vitro Chondrogenese von hMSC zeigte, dass GDF-5 die ALP-Aktivität von hMSC signifikant steigerte. Bei den untersuchten pMSC konnte keine signifikante Steigerung durch die Supplementation von GDF-5 erreicht werden, was jedoch wahrscheinlich auf die bereits sehr hohe ALP- Aktivität dieses Zelltyps ohne GDF-5 Supplementation zurückzuführen ist. Eine gesteigerte ALP-Aktivität deutet auf eine erhöhte Mineralisierungsneigung und Hypertrophie der Zellen hin (DICKHUT et al. 2009, MUELLER et al. 2010). Andere hypertrophe Marker wie beispielsweise Kollagen Typ X wurden aber in der vorliegenden Studie durch die Behandlung mit GDF-5 nicht beeinflusst, sodass nicht von einer generell gesteigerten Hypertrophie der Zellen ausgegangen werden kann (BRUCKNER et al. 1989, NURMINSKAYA und LINSENMAYER 1996, RUTGES et al. 2010). Zwar wurden in einer anderen Studie auch positive Effekte von GDF-5 auf die Ablagerung von Kollagen Typ X nachgewiesen, jedoch wurde in dieser Studie durch die Behandlung mit GDF-5 auch die Steigerung anderer chondrogener Marker erzielt (COLEMAN et al. 2013). Der gesteigerte Gehalt an Kollagen Typ X in dieser Studie könnte daher auch auf eine generell gesteigerte Chondrogenese zurückzuführen sein (PELTTARI et al. 2006). Ein Vergleich des Verhältnisses zwischen dem abgelagerten Kollagen Typ X und dem abgelagerten Kollagen Typ II, welcher es ermöglicht hätte den Gehalt an Kollagen X in Relation zur Gesamtchondrogenese zu betrachten (STECK et al. 2009), wurde nicht durchgeführt, sodass aus früheren Studien keine verlässlichen Aussagen über die Effekte von GDF-5 auf Kollagen Typ X abgeleitet werden können.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnten in der vorliegenden Arbeit auch keine positiven Effekte von GDF-5 auf die Proteoglykan- und Kollagen Typ II Ablagerung von hMSC im Rahmen der in vitro Chondrogenese nachgewiesen werden (BAI et al. 2004, COLEMAN et al. 2013). Eine denkbare Erklärung hierfür wäre, dass durch die Verwendung von Fibrinhydrogel, dessen chondrogenesefördernde Wirkung schon mehrfach nachgewiesen wurde (AHMED et al. 2011, DICKHUT et al. 2008), bereits eine sehr gute Chondrogenese erzielt wurde. Diese äußerte sich beispielsweise in der kompletten Differenzierung der Konstrukte nach bereits 28 Tagen, sowie in der mittleren Steigerung der Kollagen Typ II Expression um das Siebzehntausendfache. In den beiden Studien anderer Arbeitsgruppen, die positive Effekte von GDF-5 auf die Chondrogenese nachweisen konnten, wurde nur eine deutlich geringere Kollagen Typ II Expression und Matrixablagerung erzielt (BAI et al. 2004, COLEMAN et al. 2013). Es ist daher durchaus denkbar, dass GDF-5 bei einer nicht optimal verlaufenden Chondrogenese, diese deutlich verbessern kann, während bei einer bereits sehr guten Chondrogenese, wie im Falle der vorliegenden Studie, durch die Supplementation von GDF-5 keine weitere Steigerung der Matrixablagerung mehr erzielt werden kann.

Ähnliches gilt wahrscheinlich auch für die untersuchten pCHO-Populationen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese ebenfalls in Fibrinhydrogel redifferenziert, was in einer sehr guten Chondrogenese resultierte. Zusätzliche positive Effekte der GDF-5-Supplementation auf die Proteoglykan- oder Kollagen Typ II-Ablagerung konnten, wahrscheinlich aufgrund der bereits sehr guten Chondrogenese, nicht beobachtet werden. Zwar wurden andere Studien zu den Effekten von GDF-5 auf die Redifferenzierung von Chondrozyten in Zellpopulationen verschiedener Spezies durchgeführt und sind damit nur bedingt vergleichbar, dennoch wiesen diese meist positive Effekte von GDF-5 auf die Redifferenzierung von Chondrozyten nach (COLEMAN und TUAN 2003, ENOCHSON et al. 2014, HOTTEN et al. 1996). Für den intraartikulären Einsatz von GDF-5 in einem Gewebekleber, wie in der Minipig-Integrationsstudie geplant, war jedoch hauptsächlich die Information relevant, dass GDF-5 weder die ALP-Aktivität noch andere hypertrophe Marker beeinflusst und somit keine prohypertrophen Effekte auf die untersuchten Chondrozytenpopulationen ausübte. Intraartikulär sollten prohypertrophe Effekte von eingebrachten Tissue Engineering Präparaten auf das umliegende, gesunde Knorpelgewebe unbedingt vermieden werden. Durch die prohypertrophe Beeinflussung artikulärer Chondrozyten könnte es anderenfalls zur beginnenden Verknöcherung des artikulären Knorpels und damit langfristig zur Entwicklung einer Osteoarthritis kommen (DREIER 2010, VAN DER KRAAN und VAN DEN BERG 2012).

Die Effekte von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese bestätigten somit die Anfangshypothese der vorliegenden Arbeit, dass der Faktor GDF-5 das Potential besitzt, ohne die Chondrogenese von Progenitorzellen oder die Homöostase artikulärer Chondrozyten negativ zu beeinflussen, die Mineralisierungsneigung von Progenitorzellen zu steigern. Ob GDF-5 diese Effekte auch in vivo entfaltet wurde ebenfalls untersucht und wird nachfolgend diskutiert.

## **5.5 Wirkung von GDF-5 auf die Mineralisierung in vivo**

Alle bislang gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen von GDF-5 auf die hypertrophe Entwicklung von MSC beschränkten sich auf die in vitro Chondrogenese (BAI et al. 2004, COLEMAN et al. 2013, XU et al. 2006). Für eine Verwendung von GDF-5 in einem mineralisierungsfördernden Gewebekleber musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch ermittelt werden, ob GDF-5 auch

Auswirkungen auf das Verhalten von MSC *in vivo* hat. Die Supplementation von GDF-5 während einer 4-wöchigen Vorkultivierung führte nach weiteren 4 Wochen *in vivo* zu einer signifikant gesteigerten Mineralisierung der subkutan implantierten Konstrukte (DIEDERICHS et al. 2017). Dieser Effekt wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit über die durch GDF-5 bedingte signifikant gesteigerte ALP-Aktivität der Konstrukte *in vitro* vermittelt, ein Zusammenhang der bereits in mehreren Studien hergestellt wurde (USTUNEL und DEMIR 1995, ZHANG et al. 1997). Auch nach 8 Wochen subkutan ist der mineralisationsfördernde Effekt von GDF-5 noch detektierbar, was für eine lang anhaltende Beeinflussung der Zellen durch die GDF-5 Supplementation während der Vorkultivierung spricht. Dies ist für eine spätere Anwendung von GDF-5 in einem Gewebekleber von Relevanz, da in diesem Fall der Wachstumsfaktor nur einmalig in den Defekt eingebracht werden kann, die einwandernden Progenitorzellen jedoch über einen längeren Zeitraum mineralisationsfördernd beeinflussen soll. Neben der erhöhten Mineralisierung der Konstrukte führte GDF-5 bei einer von drei hMSC und zwei von drei pMSC-Populationen zu einer Verknöcherung der Konstrukte *in vivo*, die in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden konnte. Es ist bereits hinlänglich bekannt, dass chondrogen vordifferenzierte MSC Konstrukte bei ektopter Implantation aufgrund des subkutanen Mikromilieus meist verknöchern (LIU et al. 2010, PELTTARI et al. 2006, WEISS-BILKA et al. 2016). Die vorgefundene Knochenbildung in GDF-5 behandelten Konstrukten wurde daher höchstwahrscheinlich nicht durch den Wachstumsfaktor ausgelöst, sondern lediglich durch diesen beschleunigt.

Darüber, ob GDF-5 als Aufrüstung eines Gewebeklebers im orthotopen Modell die Mineralisierung einer Gewebekleberschicht fördern kann, oder ob der Wachstumsfaktor auch im orthotopen Modell die Bildung knöcherner Strukturen begünstigt, kann anhand dieses Versuchs keine verlässliche Aussage getroffen werden, weshalb das im Folgenden diskutierte Modell entwickelt wurde.

## **5.6 Effekte von GDF-5 auf die Integration von Tissue Engineering Konstrukten im ektopten Modell**

Um die Situation im Gelenk bei Therapie eines Knorpeldefekts ektop bestmöglich nachbilden zu können, wurde ein ektopes Modell entwickelt. Zur Nachbildung der subchondralen Knochenplatte wurden hierbei runde Knochenscheiben aus frisch explantierten Mausschädeldecken von SCID-Mäusen verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass es sich aufgrund der genetischen Homogenität von Mausinzuchtstämmen um nahezu autologes Material handelte (MORAN et al. 2016). Jedoch begann mit der Explantation der Schädeldecken bereits das Absterben des Knochengewebes, welches zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und damit gegebenenfalls zu einer negativen Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse geführt haben könnte (ATARI et al. 2011, MOLLAZADEH et al. 2015). Zudem wurde von den Schädeldecken mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Gemisch aus verschiedenen Wachstumsfaktoren freigesetzt, das nicht genau definiert werden konnte und bei jeder Schädeldecke individuell zusammengesetzt war, was die Ergebnisse des Modells ebenfalls beeinflusst haben könnte (MIRON et al. 2013). Als Gewebekleber wurde eine Kleberschicht von 20µl Fibringewebekleber mit bzw. ohne Beladung mit 900ng GDF-5, verwendet. Dieser wurde mit 0,6 Mio pMSC beladen, da im Gegensatz zur Situation im Gelenk, beim ektopten dreischichtigen Modell nicht zu erwarten war, dass Progenitorzellen durch die Knochenplatte in den Gewebekleber einwandern können. Als Tissue Engineering Konstrukte wurden StarPEG-Heparin Hydrogele verwendet. Diese wurden noch nicht mit Zellen beladen, um eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch die zweite Zellquelle und ihre

Stoffwechselprodukte, beispielsweise durch Migration der Zellen aus den Konstrukten in den Gewebekleber, zu vermeiden (BETTAHALLI et al. 2014, PLATAS et al. 2013).

Im beschriebenen dreischichtigen Modell resultierte die Anwendung von GDF-5 im Aufbau einer verstärkten knorpelartigen Verbindungsschicht zwischen der Knochenplatte und dem StarPEG-Heparin Hydrogel mit verbesserter Integration der Kleberschicht zur Knochenplatte (DIEDERICHS et al. 2017). In dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelten Modell ist es gelungen nicht vordifferenzierte pMSC ektop zu Chondrozyten zu differenzieren. In bisherigen ektopten Studien wurde bei der Implantation undifferenzierter MSC lediglich die osteogene Differenzierung der Zellen durch Verwendung osteoinduktiver Trägermaterialien oder Wachstumsfaktoren erreicht (KASTEN et al. 2005, ZANNETTINO et al. 2010). Es ist bekannt, dass MSC unterschiedlichen Ursprungs ein differierendes chondrogenes Potential aufweisen (BERNARDO et al. 2007, NOORT et al. 2012). Da in den meisten durchgeführten Studien MSC humanen oder murinen Ursprungs verwendet wurden, wäre es also denkbar, dass porcine MSC ein verstärktes chondrogenes Potential aufweisen. Eine weitere mögliche Erklärung bietet auch das von den frisch reimplantierten Mausschädeldecken freigesetzte Wachstumsfaktorengemisch, das die Chondrogenese der eingebrachten pMSC gefördert haben könnte (PARK et al. 2010, YIN et al. 2016). Weiterhin ist anzunehmen, dass durch die Abschirmung des Gewebeklebers durch die Knochenplatte auf der einen, und das Hydrogel auf der anderen Seite ein verändertes Mikromilieu geschaffen wurde. Die Gefäß- und Nährstoffversorgung der eingebrachten Zellen war im Vergleich zu traditionellen ektopten Modellen stark reduziert, was annähernd den Verhältnissen im artikulären Knorpel entspricht und daher eine chondrogene Differenzierung der Progenitorzellen begünstigt haben könnte (BUCKWALTER 1997, KRINNER et al. 2009). Das chondrogenesefördernde Potential des Wachstumsfaktors GDF-5, besonders bei einer sonst eher schlecht verlaufenden chondrogenen Differenzierung, wurde *in vitro* bereits in mehreren Studien gezeigt (BAI et al. 2004, COLEMAN et al. 2013). Durch die deutlich stärker ausgeprägte knorpelige Zwischenschicht in der Versuchsgruppe mit dem GDF-5 beladenen Gewebekleber konnte nun nachgewiesen werden, dass GDF-5 diesen prochondrogenen Effekt auf pMSC auch *in vivo* entfaltet. Zudem wurden keine Hinweise auf die beginnende Verknöcherung der knorpelartigen Zwischenschicht detektiert, was dafür spricht, dass die Verknöcherung der vorkultivierten MSC-Konstrukte (siehe 5.5) tatsächlich ein modellbedingtes Phänomen darstellte und nicht durch die Supplementierung von GDF-5 während der Vorkultivierung verursacht wurde.

## **5.7 Fixation CCT verstärkter Konstrukte durch Fibringewebekleber und BioGlue im orthotopen Modell**

Im Rahmen der orthotopen Studie zur Fixation und Integration von Tissue Engineering Konstrukten wurde festgestellt, dass keines der 16 implantierten Konstrukte über die gesamte Versuchsdauer im Defekt verblieb. Aufgrund des stark ausgeprägten fibrösen Regenerationsgewebes, das alle untersuchten Defekte vollständig ausfüllte, erschien es zudem wahrscheinlich, besonders auch in Relation zu den Ergebnissen der weiterführenden Minipigstudie (siehe 4.10.1 und 5.9), dass die Konstrukte bereits kurz nach Implantation wieder aus den Defekten fielen. Andernfalls hätte die verbliebene Regenerationszeit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zum Aufbau eines Regenerationsgewebes im vorliegenden Ausmaß ausgereicht (NIEMIETZ et al. 2014). Bezüglich der Effekte von CCT verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen auf die Regeneration von chondralen Vollschichtdefekten, kann daher auf Grundlage der vorliegenden Studie keine Aussage getroffen werden.

Fibrinkleber wird aufgrund seiner guten Klebeeigenschaften bereits häufig in der Klinik verwendet (CHERUBINO et al. 2003, KIM et al. 2015, MARLOVITS et al. 2005). Dennoch reichte weder die Klebekraft von Fibringewebekleber noch die, in der ex vivo Vorstudie stärkere, Adhäsionskraft von BioGlue® aus, um die Fixierung der Konstrukte im Defekt zu gewährleisten. Denkbar wäre zum einen, dass aufgrund der Rigidität der implantierten CCT verstärkten Konstrukte viele Scherkräfte auf den Gewebekleber einwirkten und die Klebekraft daher nicht ausreichte, um die initiale Fixierung der Konstrukte zu sichern. Ähnliche Probleme hinsichtlich der Fixierung rigider Konstrukte mittels Fibringewebekleber wurden bereits in anderen Studien beobachtet (VAHDATI et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit für die gescheiterte Fixierung der Konstrukte wäre, dass der Fibringewebekleber aufgrund ihrer chemischer Zusammensetzung keine ausreichend starke Verbindung zu den CCT verstärkten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen aufbauen konnte. Da jedoch auch die mit CCT verstärkten Fibrinhydrogele nicht im Defekt verblieben, erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich.

Hinsichtlich eines Effekts des eingebrachten GDF-5 auf die Integration der Hydrogelkonstrukte kann anhand der vorliegenden Studie ebenfalls keine verlässliche Aussage getroffen werden. Zwar konnten keine Effekte des verwendeten GDF-5 detektiert werden, da aber vermutet wird, dass die Konstrukte bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt aus den Defekten fielen, ist anzunehmen, dass GDF-5 seine gegebenenfalls prochondrogenen sowie mineralisierungsfördernden Effekte auf einwandernde Progenitorzellen gar nicht entfalten konnte. Zudem wurden im Gegensatz zum ektopen Modell keine Progenitorzellen in den Kleber eingebracht. Ob durch die intakt belassene subchondrale Knochenplatte überhaupt eine ausreichende Anzahl an wirtseigenen Progenitorzellen in die Defekte einwandern konnte, die beim Verbleib der Konstrukte in den Defekten, unter dem Einfluss von GDF-5, eine knorpelartige Verbindungsschicht zwischen Konstrukt und subchondraler Knochenplatte hätten aufbauen können, ist ein weiterer Unsicherheitsfaktor bei der Bewertung des Effekts von GDF-5 auf die osteochondrale Integration (DOROTKA et al. 2005, IM 2016, SHAPIRO et al. 1993).

Zur Verbesserung der initialen Fixierung der Hydrogelkonstrukte wurden im Rahmen der weiterführenden Minipigstudie (siehe 4.10.1 und 5.9) mehrere Ansätze, wie die Verwendung nicht verstärkter Konstrukte oder das Auspolymerisieren der Hydrogele im Defekt, untersucht. Da zur weiteren Untersuchung eines potentiell integrationsfördernden Effekts von GDF-5 zunächst die initiale Verankerung der Konstrukte im Defekt gesichert werden musste, wurde von weiterführenden Versuchen mit GDF-5 zunächst abgesehen.

## **5.8 Einfluss von BioGlue® auf das umliegende Knorpel- und Kochengewebe**

Im Zuge der orthotopen Studie zur Integration von Tissue Engineering Konstrukten im Minipig, kam es bei der Anwendung von BioGlue® in 4 von 4 Knorpeldefekten zu Lysen der subchondralen Knochenplatte. BioGlue® ist für die Anwendung am Menschen zugelassen und wird bereits sehr erfolgreich auf dem Gebiet der Gefäßchirurgie eingesetzt (TANSLEY et al. 2006). Auch bei Anwendung des Gewebeklebers im Bereich der Neurochirurgie wurden keine cytotoxischen Eigenschaften detektiert (STYLLI et al. 2004). Daher wurde auf einen Nachweis der Biokompatibilität im Vorfeld der orthotopen Studie verzichtet, während die Adhäsionskraft des Gewebeklebers in einer ex vivo Studie untersucht wurde. Ein Bestandteil von BioGlue® ist jedoch Glutaraldehyd, eine giftige Substanz, die auch in anderen Studien zu einer verschlechterten Biokompatibilität von Biomaterialien führte (LAI 2010, LAI 2012). Die Tatsache, dass es bei der Anwendung von BioGlue® in der humanen

Gefäßchirurgie nicht, bei der Nutzung in den Gelenken von Minipigs jedoch mehrmals zum Auftreten adverser Wirtsreaktionen kam, ist möglicherweise auf die geringe Stoffwechselaktivität des Knorpelgewebes zurückzuführen (BUCKWALTER 1997). Zytotoxische Kleberabbauprodukte können in dieser Mikroumgebung nur langsam abtransportiert werden, reichern sich im Gewebe an und könnten so zu den detektierten Knochenlysen geführt haben. Ähnliches wurde auch für einen auf Cyanoacrylat basierenden Kleber bei der Anwendung im Kaninchen festgestellt (RECKERS et al. 2009). Eine weitere denkbare Erklärung wäre, dass der Organismus von Minipigs auf Glutaraldehyd oder auch auf die zweite Kleberkomponente, bovines Serumalbumin, mit einer Abstoßungsreaktion antwortet, während der humane Organismus diese Substanzen toleriert.

Ohne weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verträglichkeit von BioGlue® sollte dieser auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse, trotz seiner guten Klebeeigenschaften, nicht mehr zur Fixierung von Tissue-Engineering Konstrukten im Bereich der Knorpelregeneration verwendet werden. Auch vor einer Verwendung von BioGlue® in anderen Bereichen des Tissue Engineerings sollte dessen Biokompatibilität überprüft werden.

## **5.9 Weiterführende Studie zur Fixierung von Hydrogelkonstrukten im orthotopen Modell**

In der weiterführenden Studie zur Fixierung von Hydrogelkonstrukten im orthotopen Modell wurden 3 verschiedenen Methoden zur Fixierung von StarPEG-Heparin Hydrogelen sowie die Fixierung von porös gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen untersucht. Aufgrund der geringeren Rigidität nicht verstärkter Hydrogelkonstrukte und den damit geringeren Scherkräften, die durch das Gleiten der Patella über die Konstrukte auf den Gewebekleber übertragen werden, war ein Verbleib der nicht CCT verstärkten Konstrukte im Defekt als wahrscheinlicher zu erachten (VAHDATI und WAGNER 2013).

Vorab ist hierbei festzuhalten, dass die Aussagekraft der Untersuchung hinsichtlich der gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele aufgrund der Anzahl an Versuchen von lediglich  $n = 1$  stark begrenzt ist (WILSON 1923). Dennoch war auffällig, dass bei der Implantation bereits die kleinen mechanischen Belastungen, denen das gedruckte Gel während des Übernähens der Kollagenmembran ausgesetzt war, ausreichten um das Konstrukt in mehrere Stücke zu zerbrechen.

In der histologischen Analyse der Defekte konnten lediglich in dem mit P(AGE/G)HA-SH Hydrogel und Fibringewebekleber behandelten Defekt vereinzelte Gelbruchstücke vorgefunden werden. Obwohl, anders als bei der Studie zur Integration CCT verstärkter P(AGE/G)HA-SH Hydrogele, bei Explantation keine freien Hydrogelkonstrukte in den Gelenken vorgefunden wurden, war bei den CCT verstärkten Hydrogelen mit Sicherheit von einem Verlust der Konstrukte aufgrund mangelnder Fixation auszugehen, da CCT entsprechend durchgeführter Studien des Herstellers innerhalb eines Jahres nur zu 90% durch den Organismus abgebaut werden kann. Hinsichtlich der nicht verstärkten Hydrogelkonstrukte kann das Fehlen von Hydrogelen in den Defekten entweder auf den Abbau der Gele durch wirtseigene Zellen oder aber auf den Verlust der Gele aus dem Defekt zurückzuführen sein.

Da in der histologischen Analyse Bruchstücke der gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele außerhalb der Defekte vorgefunden wurden, erscheint der vollständigen Abbau der Gele im Defekt durch wirtseigene Zellen für diesen Hydrogeltyp eher unwahrscheinlich. Diese Auslegung der Ergebnisse lässt sich zudem mit den Ergebnissen der ektopen Studie zur Degradation porös gedruckter

P(AGE/G)HA-SH Hydrogele in Einklang bringen. In dieser Studie war ebenfalls die geringe mechanische Stabilität der gedruckten Hydrogele auffällig, ein Abbau der gedruckten Hydrogele durch die Wirtszellen konnte nicht detektiert werden. Die mangelnde mechanische Stabilität besonders von Hydrogelen mit natürlichen Grundkomponenten wurde auch in anderen Studien als problematisch erachtet (EL-FIQI et al. 2013, MATYASH et al. 2014, SPILLER et al. 2011). Im vorliegenden Fall ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die mangelnde Stabilität des Hydrogelsystemes an sich, sondern die poröse Struktur der gedruckten P(AGE/G)HA-SH Hydrogele, für deren geringe mechanische Stabilität verantwortlich, was die gut erhaltenen gegossenen P(AGE/G)HA-SH Hydrogele in der ektopen Studie nahelegen. Obwohl das Eindringen von Poren in die Hydrogelkonstrukte die Einwanderung von Wirtszellen in den Defektbereich verbessern könnte (DAI et al. 2016, RAIMONDI et al. 2013), ist aufgrund der deutlich geringeren mechanischen Stabilität porös gedruckter, im Vergleich zu massiven P(AGE/G)HA-SH Hydrogelen, die Verwendung von gedruckten Hydrogelen keine Option für weitere orthotopie Studien, solange ihre mechanische Stabilisierung nicht besser gelingt.

Bei den mit StarPEG-Heparin behandelten Defekten war die geringe Füllung der Defekte verglichen mit den Leerdefekten auffällig. Dies deutet darauf hin, dass die Gele zumindest für einige Zeit im Defekt verblieben, was den Aufbau des Regenerationsgewebes beeinflusste. Denkbar wäre hierbei zum einen, dass die implantierten Hydrogele zunächst durch die Wirtszellen abgebaut wurden, bevor es zum Aufbau eines neuen Regenerationsgewebes kam (TUKMACHEV et al. 2016). In diesem Falle hätten die zellfreien StarPEG-Heparin Hydrogele jedoch keinen positiven Effekt auf die Regeneration der Knorpeldefekte entfaltet sondern verzögerten lediglich die Bildung eines fibrösen Regenerationsgewebes. Eine weitere mögliche Erklärung für das Vorhandensein eines geringer ausgeprägten Regenerationsgewebes wäre, dass bereits wirtseigene Zellen in die Hydrogele eingewandert waren und mit dem Aufbau eines knorpelähnlichen Regenerationsgewebe begonnen hatten, die Fixierung der Hydrogele im Defekt jedoch nach einer gewissen Zeit versagte (BICHARA et al. 2014, VAN SUSANTE et al. 1998). Nach dem Verlust der Konstrukte bildete sich dann ein fibröses Regenerationsgewebe in den Defekten aus, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als in den Leerdefekten, da die Ausbildung des Gewebes erst zu einem späteren Zeitpunkt begann (LEWIS et al. 2009). Dass sowohl der Abbau der Gele durch die wirtseigenen Zellen, als auch die Einwanderung von Wirtszellen in die StarPEG-Heparin Hydrogele mögliche Szenarien sind, wird durch die ektopie Studie zur Biokompatibilität der Gele bestätigt, in welcher es sowohl zum teilweisen Abbau der Gele als auch zur Einwanderung von Wirtszellen in die Hydrogele kam. Welche der beiden möglichen Erklärungen tatsächlich zur geringeren Füllung der mit StarPEG-Heparin Hydrogelen behandelten Defekte mit fibrösem Regenerationsgewebe geführt hat, konnte auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden. Unabhängig davon ist jedoch festzuhalten, dass der Einsatz zellfreier StarPEG-Heparin Hydrogele in Kombination mit den getesteten Fixierungsvarianten nicht zu einer verbesserten Regeneration der Knorpeldefekte beitragen konnte.

Ein möglicher Ansatz für die zukünftige Verbesserung der Fixierung und Integration der Hydrogelkonstrukte wäre beispielsweise die Aufrüstung des Fibringewebeklebers mit MSC oder Chondrozyten (VAHDATI et al. 2012), entsprechend dem Versuchsdesign der ektopen Studie zur Integration von Hydrogelkonstrukten, die im Aufbau einer mineralisierten Knorpelgewebsschicht zwischen Knochenplatte und Konstrukt resultierte. Eine weitere denkbare Option, um die Integration der Konstrukte zur subchondralen Knochenplatte zu verbessern, ist auch die Perforation der

subchondralen Knochenplatte mittels Mikrofrakturierung um die Einwanderung von wirtseigenen Progenitorzellen in den Defektbereich zu fördern (POT et al. 2016). Geht man davon aus, dass die Fixierung der Gele im Defekt gelang, diese jedoch vollständig durch die Wirtszellen abgebaut wurden, wäre die Beladung der Hydrogele mit Zellen eine mögliche Option um unter Verwendung von StarPEG-Heparin Hydrogelen eine Verbesserung der Knorpelregeneration zu erzielen.

## 5.10 Fazit und Ausblick

Die beiden ersten Untersuchungsziele, die Beurteilung der Biokompatibilität und des Potentials der neuartigen Hydrogele die Chondrogenese von Chondrozyten und MSC *in vitro* und *in vivo* zu unterstützen, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit vollständig erreicht werden. Beide untersuchten Hydrogelsysteme sind biokompatibel und unterstützen die Chondrogenese von Chondrozyten und MSC. In Kombination mit der neu entwickelten Press-fit Fixierungsmethode stellen die beiden Hydrogelsysteme daher Tissue Engineering Konstrukte dar, die das Potential aufweisen beim Einsatz in der Therapie von Knorpeldefekten die Regeneration dieser deutlich zu verbessern.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch zu evaluieren, ob ein GDF-5 beladener Gewebekleber die osteochondrale Integration von Hydrogelkonstrukten im chondralen Vollschichtdefekt verbessern kann. Dieses Ziel konnte nur bedingt erreicht werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass GDF-5 sowohl als Mediumszusatz als auch als Zugabe zu einem Fibringewebekleber die Entwicklung von mineralisiertem Knorpelgewebe durch Vorläuferzellen fördert. Auch führte der Einsatz eines GDF-5 beladenen Fibringewebeklebers zu einer verstärkten Verbindung zwischen Knochenplatte und Hydrogelkonstrukten im ektopen Modell. Die Untersuchung der Effekte von GDF-5 auf die Integration im orthotopen Modell scheiterte jedoch an der mangelnden initialen Fixierung der Hydrogelkonstrukte in den chondralen Defekten. Somit kann abschließend lediglich festgehalten werden, dass ein GDF-5 beladener Gewebekleber einen vielversprechenden Ansatz für die Verbesserung der osteochondralen Integration von Tissue Engineering Konstrukten in chondralen Vollschichtdefekten darstellt, der weiter verfolgt werden sollte.

Im Rahmen weiterer Studien im Anschluss an diese Dissertation konnte durch Kombination der neuartigen Hydrogele mit einem Scaffold basierend auf Polycaprolacton eine Press-fit-Lösung zur initialen Fixierung der Konstrukte entwickelt werden. Zur Evaluierung eines potentiellen Effekts des GDF-5 beladenen Gewebeklebers im orthotopen Modell, sollte dieser in Kombination mit der Press-fit-Fixierung eingesetzt werden. Hierbei ist eine vergleichende Studie zwischen einem nicht mit Wachstumsfaktor bestückten Gewebekleber, einem zellfreien aber GDF-5 beladenen Gewebekleber und, aufgrund der guten Ergebnisse im ektopen dreischichtigen Modell, einem GDF-5 beladenen Gewebekleber aufgerüstet mit autologen oder allogenen Progenitorzellen anzustreben, um die Effekte von GDF-5 auf die Ausbildung einer knorpelartigen mineralisierten Zwischenschicht zur Verbesserung der osteochondralen Integration von Hydrogelkonstrukten aussagekräftig analysieren zu können.

## 6 Zusammenfassung

*Verfasserin:* Yvonne Renz

*Titel:* Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 beladener Gewebekleber zur verbesserten Integration von Knorpelersatzmaterialien mit subchondralem Knochen

*Institute:* Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie, des Zentrums für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie des Universitätsklinikums Heidelberg

*Bibliografische Angaben:* 98 Seiten, 65 Abbildungen, 3 Tabellen, 325 Literaturangaben, 2 Anhänge

*Eingereicht im:* Februar 2018

*Schlüsselwörter:* Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (GDF-5), Knorpelregeneration, Tissue Engineering (TE), Hydrogele, Mesenchymale Stroma Zellen (MSC)

### Einleitung

Artikulärer Knorpel weist ein geringes Selbstheilungspotential auf und aktuelle Methoden zur Therapie von Knorpeldefekten resultieren meist im Aufbau fibrösen, mechanisch inferioren Regenerationsgewebes. Deshalb wird stetig versucht neue Therapiemethoden zu entwickeln, die häufig auf TE basieren. Ein Ansatz sind biogedruckte TE Konstrukte, die es ermöglichen durch das „Eindrucken“ vitaler Zellen die komplexen zellulären Strukturen des Knorpelgewebes nachzubilden. Trotz vielsprechender Ergebnisse in vitro, scheitert die langfristige Regeneration von Knorpeldefekten mittels TE jedoch häufig an der mangelnden Fixierung und Integration der Konstrukte in das umliegende Gewebe. Besonders um biogedruckte Hydrogelkonstrukte, für die viele gängigen Fixierungsoptionen ungeeignet sind, für das Knorpel TE nutzbar zu machen, müssen daher neue Fixierungs- und Integrationsmethoden entwickelt werden. Als Ansatz zur Verbesserung der osteochondralen Integration von Knorpelersatzmaterialien wurde im Rahmen dieser Arbeit ein GDF-5 beladener Gewebekleber getestet. GDF-5, ein Knorpelmorphogenetisches Protein, kann die chondrogene Differenzierung sowie die Hypertrophie von Vorläuferzellen fördern. Durch den Einsatz eines GDF-5 beladenen Gewebeklebers sollen in den Defekt einwandernde, wirtseigene Progenitorzellen zur chondrogenen Differenzierung und Mineralisierung angeregt werden, mit dem Ziel eine mineralisierte Knorpelgewebsschicht zwischen der subchondralen Knochenplatte und dem implantierten TE Konstrukt zu generieren und so dessen Integration zu verbessern.

### Ziele der Untersuchungen

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein GDF-5 beladener Gewebekleber über die Generierung einer mineralisierten Knorpelzweischicht die osteochondrale Integration von TE Konstrukten verbessern kann. Hierbei wurde zunächst auch evaluiert, ob zwei neuartige biodruckbare Hydrogelsysteme biokompatibel sind und die Chondrogenese unterstützen können.

### Tiere, Material und Methoden

Als TE Konstrukte wurden ein sternförmiges Polyethylenglycol (StarPEG)-Heparin Hydrogel und ein auf Polyglycidol und Hyaluronsäure basierendes Hydrogel (P(AGE/G)HA-SH) in Kombination mit einem aus Polyethylenoxidterephthalat und Polybutylenterephthalat bestehenden Scaffold (CCT) verwendet. Zur Evaluation ihrer Biokompatibilität wurden die Hydrogele mit und ohne CCT für zwei Wochen subkutan in 5 immunkompetente B6D2F1/Crl Mäuse implantiert und anschließend histologisch untersucht (n=3). Die Adhäsionskraft von Fibrinkleber und BioGlue® wurde in osteochondralen Zylindern aus Knien von Schlachtschweinen getestet. In die Zylinder wurde zentral ein chondraler Vollschichtdefekt (Ø 6mm) gesetzt. Die CCT verstärkten Hydrogelkonstrukte wurden mit den zu

testenden Klebern in den Defekten fixiert und bis zum Versagen des Gewebeklebers mit einer zunehmenden Zugkraft belastet (n=6). Zur Evaluation des Effekts von GDF-5 auf die in vitro Chondrogenese wurden je 0,6 Mio. humane bzw. porcine MSC in 60µl Fibrinhydrogel resuspendiert und für 4 Wochen mit oder ohne Zugabe von 150ng/ml GDF-5 im Medium chondrogen differenziert. Je 6 Konstrukte pro Gruppe wurden anschließend ektop in 12 immundefiziente CB17/Icr-Prkdcscid/IcrCr (SCID) Mäuse implantiert, um deren Mineralisierung in vivo zu beurteilen. Zur Beurteilung der Effekte von GDF-5 auf die Mineralisierung eines Gewebeklebers, wurden dreischichtige Konstrukte, bestehend aus einer Mausschädeldecke, 20µl Fibringewebekleber beladen mit 0,6 Mio. porcinen MSC und mit bzw. ohne Beladung mit 900ng GDF-5, und einem StarPEG-Heparin Hydrogel für 7 Wochen in 5 SCID Mäuse implantiert und anschließend histologisch und via µCT analysiert (n=6). Für die orthotop Studie wurden 4 adulte Göttinger Minipigs (> 24 Monate) verwendet. Es wurden je zwei Vollschichtdefekte (Ø 6mm) pro Kniegelenk in die mediale Femurtrochlea gesetzt und CCT verstärkte P(AGE/G)HA-SH Hydrogele mit Fibrinkleber mit und ohne GDF-5, sowie mit BioGlue® darin fixiert (n=4). Nach 4 Wochen wurde die Trochlea explantiert und histologisch untersucht. Die statistischen Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (Software: SPSS 16.0). Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  gewertet.

### Ergebnisse

Beide Hydrogele sind biokompatibel, durch die Kombination mit CCT wird die Zelleinwanderung in die Gele zusätzlich angeregt. Hinsichtlich der Adhäsionskraft der Gewebekleber konnte festgestellt werden, dass die Klebekraft von Fibringewebekleber stark variiert mit der Art des zu befestigenden Konstrukts. BioGlue® hingegen zeigte für alle Konstruktypen eine konstante, für P(AGE/G)HA-SH und die Positivkontrolle signifikant höhere Adhäsionskraft als Fibrinkleber. Die Behandlung von MSC mit GDF-5 während der in vitro Chondrogenese führte zu einer signifikant erhöhten Alkalischen Phosphatase-Aktivität der Zellen, ohne deren hypertrophe Entwicklung darüber hinaus zu beeinflussen. Zudem wurde die ektop Mineralisierung chondrogen vordifferenzierter MSC-Konstrukte durch die Supplementation von GDF-5 signifikant gesteigert. Im ektopen dreischichtigen Modell resultierte die Bestückung des Gewebeklebers mit GDF-5 in einer verstärkt ausgeprägten knorpelartigen Zwischenschicht mit hochgradiger Mineralisierung. Die Verbindung zwischen Knochenplatte und TE Konstrukt wurde in 4 von 5 Konstruktpaaren durch GDF-5 in der Kleberschicht verstärkt. Im orthotopen Defektmodell reichte die Klebekraft von Fibringewebekleber und BioGlue® nicht aus, um die initiale Fixierung der Konstrukte zu gewährleisten. Dennoch zeigten alle Explantate eine sehr gute Defektfüllung, was darauf hindeutet, dass es bereits früh zum Verlust der Konstrukte kam. BioGlue® verursachte Lysen der subchondralen Knochenplatte, weshalb dieser nicht zur Therapie von Knorpeldefekten eingesetzt werden sollte. Über einen Effekt des GDF-5-haltigen Gewebeklebers im orthotopen Modell kann keine verlässliche Aussage getroffen werden, da die Konstrukte bereits so früh aus den Defekten fielen, dass keine Verbindungsschicht zwischen subchondraler Knochenplatte und TE Konstrukt ausgebildet wurde.

### Schlussfolgerungen

Ein GDF-5 beladener Gewebekleber stellt eine vielversprechende Option zur Verbesserung der osteochondralen Integration von TE Konstrukten dar, ist jedoch nicht in der Lage deren initiale Fixierung sicherzustellen. Der Gewebekleber sollte daher in Kombination mit anderen Fixationsmethoden eingesetzt werden, um die mineralisationsfördernden Effekte des GDF-5 zur Verbesserung der osteochondralen Integration dennoch nutzen zu können.

## 7 Summary

*Author:* Yvonne Renz

*Title:* Growth and differentiation factor 5 augmented tissue glue for improved integration of cartilage replacements into the subchondral bone

*Institutes:* Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine,  
University of Leipzig  
Research Centre for Experimental Orthopaedics, Heidelberg University Hospital

*Bibliography:* 98 pages, 65 figures, 3 tables, 325 references, 2 appendices

*Submitted in:* February 2018

*Key words:* Growth and differentiation factor 5 (GDF-5), cartilage regeneration, Tissue Engineering (TE), hydrogels, mesenchymal stromal cells (MSC)

### Introduction

Cartilage lacks the ability of self-repair and current treatment options often result in mechanically inferior, fibrous tissue. TE is a promising option for an improved treatment of cartilage defects. Hereby, one approach is the use of bio-printed TE constructs, that allow to mimic the complex cellular structures of native articular cartilage via printing viable cells into the constructs. But although many of these constructs display impressive results in vitro, long-term regeneration of cartilage defects often fails because of insufficient fixation and integration of TE constructs into the surrounding host tissue. Especially to make bio-printed hydrogel constructs usable for cartilage TE, eventhought many of the current fixation options are not suitable, it is necessary to invent new methods for construct fixation and construct integration. As one approach to improve osteochondral integration of TE constructs, a GDF-5 augmented tissue glue was analysed in this work. GDF-5 is a member of the Bone morphogenetic protein family and is able to promote chondrogenic differentiation and hypertrophy of progenitor cells. Via using a GDF-5 augmented glue, invading host progenitor cells are supposed to be stimulated to build a mineralized cartilage layer between the subchondral bone plate and the TE constructs, and thus improve osteochondral integration of the constructs.

### Aims of the studies

The main objective of this work was to evaluate if a GDF-5 augmented tissue glue is a promising option to improve osteochondral integration of TE constructs, via generating a cartilage-like mineralized connecting layer between a bone plate and the TE construct. Moreover, this work aimed to analyze the biocompatibility of two different bio-printable hydrogels and their potential to support chondrogenic differentiation.

### Animals, materials and methods

A star-shaped polyethylene glycol (StarPEG)-heparin hydrogel and a hydrogel based on polyglycidol and hyaluronic acid (P(AGE/G)HA-SH), both combined with a scaffold consisting of polyethylenoxide terephthalat and polybutylene terephthalat (CCT), were used as TE constructs. To evaluate their biocompatibility, both hydrogels with and without CCT reinforcement were implanted subcutaneously into immunocompetent mice (n=3 per group; 5 B6D2F1/Crl mice). After two weeks samples were analyzed via histology. For measuring the adhesive strength of fibrin glue and BioGlue® for fixation of the two different hydrogel constructs, osteochondral cylinders were drilled out of porcine knees from the slaughter house. A full-depth chondral defect was set in the middle of these cylinders (Ø 6mm) and the hydrogel constructs were glued into the defects. Pull-out testing was performed by addition of

weight to the construct until the glue failed. Every construct-glue combination was tested six times. To evaluate the effects of GDF-5 on in vitro chondrogenesis of human and porcine MSCs respectively, 0.6 Mio. cells were suspended in 60µl fibrin glue and cultivated for four weeks under chondrogenic conditions (+10ng/ml TGFβ) with and without supplementation of 150ng/µl GDF-5. Afterwards some constructs of each group were implanted subcutaneously into immunodeficient mice to investigate the mineralization of GDF-5 treated constructs in vivo (n=6 per group; 12 CB17/Icr-Prkdcscid/IcrCr (SCID) mice). For evaluating the effects of GDF-5 on the mineralization of a tissue glue, three-layered constructs, consisting of a bone plate (mouse skull cap) as bottom layer, 20µl fibrin glue with 0.6 Mio. pMSCs with or without 900ng GDF-5 augmentation as interlayer, and a StarPEG-Heparin hydrogel as top layer, were implanted subcutaneously into immunodeficient mice (n=6 per group; 5 SCID mice). After 7 weeks, three-layered constructs were analyzed histologically and via µCT. Orthotopic testing was performed in adult Göttingen/ Mini leve minipigs (at least 24 month of age; 4 animals). Two full-size defects per knee (Ø 6mm) were set into the medial trochlea of the femur and treated with fibrin glue with or without 5µg GDF-5 or with BioGlue® in combination with CCT re-enforced P(AGE/G) HA-SH hydrogels (n=4 per group). After 4 weeks histological analysis of the explants was performed to assess construct integration. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney-U testing (Software: SPSS 16.0). Statistical values were adjusted with Bonferroni correction and values of  $p \leq 0,05$  were considered as statistically significant.

### Results

Both types of hydrogels are biocompatible. Via CCT re-enforcement cell invasion into the hydrogels is improved. Regarding the adhesive strength of tissue glues, fibrin glue showed varying results depending on the TE construct to be fixed. BioGlue®, however, displayed a constant high adhesive strength for all constructs, reaching significant higher levels than fibrin glue for P(AGE/G)HA-SH hydrogels and the positive control. GDF-5 treatment during in vitro chondrogenesis resulted in significantly increased alkaline phosphatase-levels of progenitor cells beginning at day 21, without affecting their hypertrophic differentiation any further. Moreover, GDF-5 supplementation during pre-culture lead to a significantly enhanced mineralisation of TE constructs after 2 and 4 weeks in vivo. In a three layered ectopic model GDF-5 augmentation of an MSC-loaded fibrin glue resulted in the formation of a mineralized interzone with a cartilage-like cell morphology between a bone plate and a TE construct. This interzone was more extended and displayed a closer contact to the bone plate in GDF-5 augmented constructs compared to controls in 4 out of 5 pairs. Regarding the orthotopic integration study in minipigs, adhesive strength of all three tissue glues (fibrin glue, GDF-5 augmented fibrin glue, BioGlue®) was insufficient to fixate CCT re-enforced P(AGE/G)HA-SH hydrogel constructs within the cartilage defects. Nevertheless, explants displayed a good defect filling indicating that constructs dropped out of the defects at an early timepoint. Moreover all BioGlue® treated defects showed lyses of the subchondral bone plate prohibiting further usage in cartilage defects. Possible effects of GDF-5 augmented fibrin glue could not be evaluated orthotopically, as the early loss of constructs did probably not allow formation of an interzone between construct and subchondral bone.

### Conclusions and discussion

GDF-5 augmented fibrin glue appears as a promising option to improve the osteochondral integration of TE constructs, but it is not able to guarantee initial fixation of construct within the defects. This bioactivated glue should therefore be used in combination with other fixation methods, to be able to use its mineralisation enhancing features to improve osteochondral integration.

## 8 Literaturverzeichnis

Abbadessa A, Mouser VH, Blokzijl MM, Gawlitta D, Dhert WJ, Hennink WE, et al. A Synthetic Thermosensitive Hydrogel for Cartilage Bioprinting and Its Biofunctionalization with Polysaccharides. *Biomacromolecules*. 2016;17(6):2137-47.

Abelow SP, Guillen P, Ramos T. Arthroscopic Technique for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation for the Treatment of Large Chondral Defects in the Knee and Ankle. *Oper Tech Orthop*. 2006;16(4):257-61.

Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):199-215.

Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):323-35.

Ahmed TA, Hincke MT. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(3):305-29.

Ambrosio L, De Santis R, Nicolais L. Composite hydrogels for implants. *Proc Inst Mech Eng H*. 1998;212(2):93-9.

Anderson DE, Williams RJ, 3rd, DeBerardino TM, Taylor DC, Ma CB, Kane MS, et al. Magnetic Resonance Imaging Characterization and Clinical Outcomes After NeoCart Surgical Therapy as a Primary Reparative Treatment for Knee Cartilage Injuries. *Am J Sports Med*. 2017;45(4):875-83.

Anderson HC, Chacko S, Abbott J, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. VII. Effects of 5-bromodeoxyuridine and prolonged culturing on fine structure of chondrocytes. *Am J Pathol*. 1970;60(2):289-312.

Ap Gwynn I, Wade S, Kaab MJ, Owen GR, Richards RG. Freeze-substitution of rabbit tibial articular cartilage reveals that radial zone collagen fibres are tubules. *J Microsc*. 2000;197(Pt 2):159-72.

Atari M, Chatakun P, Ortiz O, Manes A, Gil-Recio C, Navarro MF, et al. Viability of maxillary bone harvesting by using different osteotomy techniques. A pilot study. *Histol Histopathol*. 2011;26(12):1575-83.

Aznar J. [Measurement of platelet aggregation. Anti-aggregating activity of heparin]. *Hemostase*. 1966;6(5):351-61.

Bai X, Xiao Z, Pan Y, Hu J, Pohl J, Wen J, et al. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(2):453-60.

Bakarich SE, Gorkin R, 3rd, in het Panhuis M, Spinks GM. Three-dimensional printing fiber reinforced hydrogel composites. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(18):15998-6006.

Barbucci R, Magnani A, Rappuoli R, Lamponi S, Consumi M. Immobilisation of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility. *J Inorg Biochem*. 2000;79(1-4):119-25.

Barlic A, Drobnic M, Malicev E, Kregar-Velikonja N. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J Orthop Res*. 2008;26(6):847-53.

Barron V, Merghani K, Shaw G, Coleman CM, Hayes JS, Ansboro S, et al. Evaluation of Cartilage Repair by Mesenchymal Stem Cells Seeded on a PEOT/PBT Scaffold in an Osteochondral Defect. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(9):2069-82.

Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(5):640-5.

Bassleer C, Gysen P, Foidart JM, Bassleer R, Franchimont P. Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1986;22(3 Pt 1):113-9.

Becher C, Laute V, Fickert S, Zinser W, Niemeyer P, John T, et al. Safety of three different product doses in autologous chondrocyte implantation: results of a prospective, randomised, controlled trial. *J Orthop Surg Res*. 2017;12(1):71.

Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plotz W. [New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation]. *MMW Fortschr Med*. 1999;141(45):49-51.

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215-24.

Bernardo ME, Emons JA, Karperien M, Nauta AJ, Willemze R, Roelofs H, et al. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Connect Tissue Res*. 2007;48(3):132-40.

Berninger MT, Wexel G, Rummeny EJ, Imhoff AB, Anton M, Henning TD, et al. Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp*. 2013(75):e4423.

Bettahalli NM, Groen N, Steg H, Unadkat H, de Boer J, van Blitterswijk CA, et al. Development of multilayer constructs for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8(2):106-19.

- Bhardwaj N, Devi D, Mandal BB. Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and stimulating factors. *Macromol Biosci*. 2015;15(2):153-82.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
- Bichara DA, Bodugoz-Sentruk H, Ling D, Malchau E, Bragdon CR, Muratoglu OK. Osteochondral defect repair using a polyvinyl alcohol-polyacrylic acid (PVA-PAAc) hydrogel. *Biomed Mater*. 2014;9(4):045012.
- Boehm AK, Seth M, Mayr KG, Fortier LA. Hsp90 mediates insulin-like growth factor 1 and interleukin-1beta signaling in an age-dependent manner in equine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2335-43.
- Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994;212(1):97-104.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-95.
- Broom ND, Poole CA. Articular cartilage collagen and proteoglycans. Their functional interdependency. *Arthritis Rheum*. 1983;26(9):1111-9.
- Browning MB, Cereceres SN, Luong PT, Cosgriff-Hernandez EM. Determination of the in vivo degradation mechanism of PEGDA hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(12):4244-51.
- Bruckner P, Horler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, et al. Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J Cell Biol*. 1989;109(5):2537-45.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*. 1998;47:477-86.
- Buckwalter JA, Mankin, H. J. Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79A:612-32.
- Bullough PG, Jagannath A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *J Bone Joint Surg Br*. 1983;65(1):72-8.
- Bulpitt P, Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(2):152-69.

Buxton P, Edwards C, Archer CW, Francis-West P. Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S23-30.

Cahill BR. Osteochondritis Dissecans of the Knee: Treatment of Juvenile and Adult Forms. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3(4):237-47.

Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24(2):218-35.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.

Caron MM, Emans PJ, Cremers A, Surtel DA, Coolsen MM, van Rhijn LW, et al. Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(4):604-13.

Chen G, Sato T, Ushida T, Ochiai N, Tateishi T. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng.* 2004;10(3-4):323-30.

Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, et al. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2009;27(11):1432-8.

Chen SS, Falcovitz YH, Schneiderman R, Maroudas A, Sah RL. Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: relationship to fixed charge density. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(6):561-9.

Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2003;11(1):10-5.

Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 1968;50(1):184-97.

Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):105-15.

Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop.* 2007;31(6):773-81.

Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4809-18.

Cicione C, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Diaz-Prado S, Blanco FJ. Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: transforming growth factor-beta superfamily. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(2):195-207.

- Clarke HD, Scott WN. The role of debridement: through small portals. *J Arthroplasty*. 2003;18(3 Suppl 1):10-3.
- Coelho CN, Kosher RA. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev Biol*. 1991;144(1):47-53.
- Coleman CM, Tuan RS. Growth/differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn*. 2003;228(2):208-16.
- Coleman CM, Vaughan EE, Browe DC, Mooney E, Howard L, Barry F. Growth differentiation factor-5 enhances in vitro mesenchymal stromal cell chondrogenesis and hypertrophy. *Stem Cells Dev*. 2013;22(13):1968-76.
- Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop Relat Res*. 1972;82:253-62.
- Cook JL, Hung CT, Kuroki K, Stoker AM, Cook CR, Pfeiffer FM, et al. Animal models of cartilage repair. *Bone Joint Res*. 2014;3(4):89-94.
- Cuellar A, Ruiz-Iban MA, Cuellar R. The Use of All-Arthroscopic Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for the Management of Humeral and Glenoid Chondral Defects in the Shoulder. *Arthrosc Tech*. 2016;5(2):e223-7.
- D'Anchise R, Manta N, Prospero E, Bevilacqua C, Gigante A. Autologous implantation of chondrocytes on a solid collagen scaffold: clinical and histological outcomes after two years of follow-up. *J Orthop Traumatol*. 2005;6(1):36-43.
- Dai XS, Cai YZ. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation addressing focal chondral defect in adolescent knee. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(22):4130-3.
- Dai Y, Gao Z, Ma L, Wang D, Gao C. Cell-Free HA-MA/PLGA Scaffolds with Radially Oriented Pores for In Situ Inductive Regeneration of Full Thickness Cartilage Defects. *Macromol Biosci*. 2016;16(11):1632-42.
- Dashtdar H, Murali MR, Abbas AA, Suhaeb AM, Selvaratnam L, Tay LX, et al. PVA-chitosan composite hydrogel versus alginate beads as a potential mesenchymal stem cell carrier for the treatment of focal cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(5):1368-77.
- Dehne T, Zehbe R, Kruger JP, Petrova A, Valbuena R, Sittinger M, et al. A method to screen and evaluate tissue adhesives for joint repair applications. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13:175.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8(5):309-34.

Detterline AJ, Goldberg S, Bach BR, Jr., Cole BJ. Treatment options for articular cartilage defects of the knee. *Orthop Nurs*. 2005;24(5):361-6; quiz 7-8.

Dexheimer V, Frank S, Richter W. Proliferation as a requirement for in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2160-9.

Dhote V, Skaalure S, Akalp U, Roberts J, Bryant SJ, Vernerey FJ. On the role of hydrogel structure and degradation in controlling the transport of cell-secreted matrix molecules for engineered cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013;19:61-74.

DiBartola AC, Everhart JS, Magnussen RA, Carey JL, Brophy RH, Schmitt LC, et al. Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. *Knee*. 2016;23(3):344-9.

Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci*. 2008;13:4517-28.

Dickhut A, Pelttari K, Janicki P, Wagner W, Eckstein V, Egermann M, et al. Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol*. 2009;219(1):219-26.

Diederichs S, Baral K, Tanner M, Richter W. Interplay between local versus soluble transforming growth factor-beta and fibrin scaffolds: role of cells and impact on human mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(11-12):1140-50.

Diederichs S, Renz Y, Haggmann S, Lotz B, Seebach E, Richter W. Stimulation of a calcified cartilage connecting zone by GDF-5-augmented fibrin hydrogel in a novel layered ectopic in vivo model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017.

Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(8):924-9.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol*. 2006;208(1):77-86.

Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials*. 2005;26(17):3617-29.

Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):216.

Driesang IM, Hunziker EB. Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair. *J Orthop Res.* 2000;18(6):909-11.

Drobnic M, Radosavljevic D, Ravnik D, Pavlovic V, Hribernik M. Comparison of four techniques for the fixation of a collagen scaffold in the human cadaveric knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(4):337-44.

Edwards JC, Wilkinson LS, Jones HM, Soothill P, Henderson KJ, Worrall JG, et al. The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat.* 1994;185 ( Pt 2):355-67.

Efe T, Fuglein A, Heyse TJ, Stein T, Timmesfeld N, Fuchs-Winkelmann S, et al. Fibrin glue does not improve the fixation of press-fitted cell-free collagen gel plugs in an ex vivo cartilage repair model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(2):210-5.

El-Fiqi A, Lee JH, Lee EJ, Kim HW. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering. *Acta Biomater.* 2013;9(12):9508-21.

Emans PJ, Jansen EJ, van Iersel D, Welting TJ, Woodfield TB, Bulstra SK, et al. Tissue-engineered constructs: the effect of scaffold architecture in osteochondral repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(9):751-6.

Enders JT, Otto TJ, Peters HC, Wu J, Hardouin S, Moed BR, et al. A model for studying human articular cartilage integration in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(2):509-14.

Enochson L, Stenberg J, Brittberg M, Lindahl A. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(4):566-77.

Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials.* 2007;28(1):55-65.

Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, Roseti L, De Franceschi L, Marconi E, et al. Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology.* 2006;43(3-4):471-80.

Fan H, Hu Y, Qin L, Li X, Wu H, Lv R. Porous gelatin-chondroitin-hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77(4):785-94.

Federico S, Grillo A, La Rosa G, Giaquinta G, Herzog W. A transversely isotropic, transversely homogeneous microstructural-statistical model of articular cartilage. *J Biomech.* 2005;38(10):2008-18.

Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;857:33-42.

Filova E, Rampichova M, Litvinec A, Drzik M, Mickova A, Buzgo M, et al. A cell-free nanofiber composite scaffold regenerated osteochondral defects in miniature pigs. *Int J Pharm.* 2013;447(1-2):139-49.

Fischer J, Aulmann A, Dexheimer V, Grossner T, Richter W. Intermittent PTHrP(1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2014;23(20):2513-23.

Fischer J, Ortel M, Hagmann S, Hoeflich A, Richter W. Role of PTHrP(1-34) Pulse Frequency Versus Pulse Duration to Enhance Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2673-81.

Fischer L, Boland G, Tuan RS. Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30870-8.

Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Soegaard N, Kim M, et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on Cartilage Repair in a Mini-Pig Model. *Cartilage.* 2016;7(2):174-84.

Flickinger RA. Muscle and cartilage differentiation in small and large explants from the chick embryo limb bud. *Dev Biol.* 1974;41(1):202-8.

Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials.* 2000;21(8):795-801.

Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, et al. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development.* 1999;126(6):1305-15.

Freeman FE, Allen AB, Stevens HY, Guldborg RE, McNamara LM. Effects of in vitro endochondral priming and pre-vascularisation of human MSC cellular aggregates in vivo. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:218.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.

Gaissmaier C, Fritz J, Benz K, Stoop R, Schewe B, Weise K. Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *SFA-Arthroskopie aktuell*. 2003;16:4-14.

Gelse K, Muhle C, Franke O, Park J, Jehle M, Durst K, et al. Cell-based resurfacing of large cartilage defects: long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(2):475-88.

Gelse K, Riedel D, Pachowsky M, Hennig FF, Trattnig S, Welsch GH. Limited integrative repair capacity of native cartilage autografts within cartilage defects in a sheep model. *J Orthop Res*. 2015;33(3):390-7.

Gille J, Behrens P, Schulz AP, Oheim R, Kienast B. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation: A Clinical Follow-Up at 15 Years. *Cartilage*. 2016;7(4):309-15.

Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs*. 1994;47(3):536-66.

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2006;97(1):33-44.

Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim*. 2008;42(1):71-82.

Grad S, Zhou L, Gogolewski S, Alini M. Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(3):571-9.

Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*. 2001;22(17):2417-24.

Gu Y, Chen P, Yang Y, Shi K, Wang Y, Zhu W, et al. Chondrogenesis of myoblasts in biodegradable poly-lactide-co-glycolide scaffolds. *Mol Med Rep*. 2013;7(3):1003-9.

Gudas R, Stankevicius E, Monastyreckiene E, Pranys D, Kalesinskas RJ. Osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint in athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2006;14(9):834-42.

Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev*. 2004;18(19):2404-17.

Haaparanta AM, Jarvinen E, Cengiz IF, Ella V, Kokkonen HT, Kiviranta I, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(4):1129-36.

Haisch A, Loch A, David J, Pruss A, Hansen R, Sittinger M. Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Med Biol Eng Comput.* 2000;38(6):686-9.

Hall AC, Bush PG, Davidson ME, Kempson SA. Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box. *Equine Vet J.* 2003;35(5):425-8.

Hanff G, Sollerman C, Abrahamsson SO, Lundborg G. Repair of osteochondral defects in the rabbit knee with Gore-Tex (expanded polytetrafluoroethylene). An experimental study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1990;24(3):217-23.

Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A Suppl 1:65-72.

Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix.* 1992;12(2):116-29.

Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 1989;3(9):2042-51.

Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol.* 2007;211(3):682-91.

Herberhold C, Feldmann H. Transplantation und Implantation in der Kopf-Hals-Chirurgie. In: Feldmann H, Herberhold C, Hrgs. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, Teil I: Referate.* 1. Aufl., Berlin Heidelberg: Springer; 1992.

Hesse E, Freudenberg U, Niemiets T, Greth C, Weisser M, Hagmann S, et al. Peptide-functionalized starPEG/heparin Hydrogels Direct Mitogenicity, Cell Morphology and Cartilage Matrix Distribution in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 1932-6254.

Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002;18(7):730-4.

Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(1):78-89.

- Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960;46(12):1533-42.
- Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-a(2):185-92.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
- Hotten GC, Matsumoto T, Kimura M, Bechtold RF, Kron R, Ohara T, et al. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors*. 1996;13(1-2):65-74.
- Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med*. 1995;181(2):713-21.
- Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):432-63.
- Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(367 Suppl):S135-46.
- Hunziker EB, Driesang IM, Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Clin Orthop Relat Res*. 2001(391 Suppl):S171-81.
- Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJ, Shintani N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(3):334-50.
- Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(7):564-72.
- Hunziker EB, Stahli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(9):1067-73.
- Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, et al. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage*. 2011;2(2):137-52.
- Hwang SG, Yu SS, Lee SW, Chun JS. Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway. *FEBS Lett*. 2005;579(21):4837-42.

Im GI. Endogenous Cartilage Repair by Recruitment of Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(2):160-71.

Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(10):845-53.

Iwamoto M, Tamamura Y, Koyama E, Komori T, Takeshita N, Williams JA, et al. Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis. *Dev Biol.* 2007;305(1):40-51.

Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14482-6.

Jacobi M, Villa V, Magnussen RA, Neyret P. MACI - a new era? *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2011;3(1):10.

Jadin KD, Wong BL, Bae WC, Li KW, Williamson AK, Schumacher BL, et al. Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3d imaging and analysis. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(9):1109-19.

Jeong CG, Zhang H, Hollister SJ. Three-dimensional polycaprolactone scaffold-conjugated bone morphogenetic protein-2 promotes cartilage regeneration from primary chondrocytes in vitro and in vivo without accelerated endochondral ossification. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(8):2088-96.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238(1):265-72.

Jones SW, Roberts RA, Robbins GR, Perry JL, Kai MP, Chen K, et al. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background. *J Clin Invest.* 2013;123(7):3061-73.

Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134089.

Jung M, Kaszap B, Redohl A, Steck E, Breusch S, Richter W, et al. Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell Transplant.* 2009;18(8):923-32.

Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M, Mayerhofer A, Wurziger LJ. *Histologie.* 6.Aufl., Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2004.

Juppner H. Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol.* 2000;14(7):606-11.

Kaab MJ, Gwynn IA, Notzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat.* 1998;193 ( Pt 1):23-34.

Kan A, Tabin CJ. c-Jun is required for the specification of joint cell fates. *Genes Dev.* 2013;27(5):514-24.

Kang SW, La WG, Kim BS. Open macroporous poly(lactic-co-glycolic Acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2009;20(3):399-409.

Kasten P, Vogel J, Luginbuhl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials.* 2005;26(29):5879-89.

Kawabe N, Yoshinao M. The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop Relat Res.* 1991(268):279-93.

Kawiak J, Moskalewski S, Darzynkiewicz Z. Isolation of chondrocytes from calf cartilage. *Exp Cell Res.* 1965;39(1):59-68.

Kazusa H, Nakasa T, Shibuya H, Ohkawa S, Kamei G, Adachi N, et al. Strong adhesiveness of a new biodegradable hydrogel glue, LYDEX, for use on articular cartilage. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2013;11(3):e180-6.

Kellner K, Lang K, Papadimitriou A, Leser U, Milz S, Schulz MB, et al. Effects of hedgehog proteins on tissue engineering of cartilage in vitro. *Tissue Eng.* 2002;8(4):561-72.

Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater.* 2008;16:26-39.

Kim JI, Lee JH, Choi DS, Won BM, Jung MY, Park J. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by common synthetic antioxidants (tert-butylhydroxyanisol, tert-di-butylhydroxytoluene, and tert-butylhydroquinone) as compared with alpha-tocopherol. *J Food Sci.* 2009;74(5):C362-9.

Kim YS, Choi YJ, Suh DS, Heo DB, Kim YI, Ryu JS, et al. Mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees: is fibrin glue effective as a scaffold? *Am J Sports Med.* 2015;43(1):176-85.

Kleinschmidt K, Ploeger F, Nickel J, Glockenmeier J, Kunz P, Richter W. Enhanced reconstruction of long bone architecture by a growth factor mutant combining positive features of GDF-5 and BMP-2. *Biomaterials.* 2013;34(24):5926-36.

Knecht S, Erggelet C, Endres M, Sittlinger M, Kaps C, Stussi E. Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83(1):50-7.

Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1165-74.

Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(2):165-81.

Krinner A, Zscharnack M, Bader A, Drasdo D, Galle J. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. *Cell Prolif.* 2009;42(4):471-84.

Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:1-13.

Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem.* 1992;25(3):155-63.

Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol.* 1982;93(3):751-7.

Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol.* 1982;93(3):743-50.

Kull S, Martinelli I, Briganti E, Losi P, Spiller D, Tonlorenzi S, et al. Glubran2 surgical glue: in vitro evaluation of adhesive and mechanical properties. *J Surg Res.* 2009;157(1):e15-21.

Kuo YR, Sacks JM, Lee WP, Wu WS, Kueh NS, Yao SF, et al. Porcine heterotopic composite tissue allograft transplantation using a large animal model for preclinical studies. *Chang Gung Med J.* 2006;29(3):268-74.

Lai JY. Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(6):1899-911.

Lai JY. Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross-linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):10970-85.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.

Lewis PB, McCarty LP, 3rd, Yao JQ, Williams JM, Kang R, Cole BJ. Fixation of tissue-engineered human neocartilage constructs with human fibrin in a caprine model. *J Knee Surg.* 2009;22(3):196-204.

Li J, Wang J, Zou Y, Zhang Y, Long D, Lei L, et al. The influence of delayed compressive stress on TGF-beta1-induced chondrogenic differentiation of rat BMSCs through Smad-dependent and Smad-independent pathways. *Biomaterials*. 2012;33(33):8395-405.

Li X, Shah A, Franklin P, Merolli R, Bradley J, Busconi B. Arthroscopic debridement of the osteoarthritic knee combined with hyaluronic acid (Orthovisc) treatment: a case series and review of the literature. *J Orthop Surg Res*. 2008;3:43.

Liao IC, Moutos FT, Estes BT, Zhao X, Guilak F. Composite three-dimensional woven scaffolds with interpenetrating network hydrogels to create functional synthetic articular cartilage. *Adv Funct Mater*. 2013;23(47):5833-9.

Liao J, Qu Y, Chu B, Zhang X, Qian Z. Biodegradable CSMA/PECA/Graphene Porous Hybrid Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Sci Rep*. 2015;5:9879.

Liebich HG. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5.Aufl., Stuttgart: Schattauer; 2004.

Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum*. 1965;8:481-94.

Liu H, Liu J, Qi C, Fang Y, Zhang L, Zhuo R, et al. Thermosensitive injectable in-situ forming carboxymethyl chitin hydrogel for three-dimensional cell culture. *Acta Biomater*. 2016;35:228-37.

Liu X, Sun H, Yan D, Zhang L, Lv X, Liu T, et al. In vivo ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials*. 2010;31(36):9406-14.

Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2188-96.

Lohmander S. Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1988;2(1):37-62.

Longobardi L, Li T, Tagliaferro L, Temple JD, Willcockson HH, Ye P, et al. Synovial joints: from development to homeostasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(1):41-51.

Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res*. 2006;21(4):626-36.

Lubiatowski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 2006;38(1):320-2.

Lui JC, Nilsson O, Baron J. Recent research on the growth plate: Recent insights into the regulation of the growth plate. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):T1-9.

Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4.Aufl., Stuttgart: Thieme; 2012.

Ma Z, Gao C, Gong Y, Ji J, Shen J. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(6):838-47.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9-26.

Madry H, Ochi M, Cucchiaroni M, Pape D, Seil R. Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop.* 2015;2(1):9.

Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9 Suppl A:S6-15.

Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, Kooy FK, Martens DE, Tramper J, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials.* 2004;25(26):5773-80.

Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(3):460-6.

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials.* 2000;21(6):571-80.

Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martinez Avila H, Hagg D, Gatenholm P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules.* 2015;16(5):1489-96.

Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C, Aldrian SM, Vecsei V, et al. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13(6):451-7.

Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther.* 1998;5(8):1098-104.

- Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*. 1993;9(3):318-21.
- Maturavongsadit P, Luckanagul JA, Metavarayuth K, Zhao X, Chen L, Lin Y, et al. Promotion of In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells Using In Situ Hyaluronic Hydrogel Functionalized with Rod-Like Viral Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2016;17(6):1930-8.
- Matyash M, Despang F, Ikonomidou C, Gelinsky M. Swelling and mechanical properties of alginate hydrogels with respect to promotion of neural growth. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(5):401-11.
- Messner K. Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. *J Biomed Mater Res*. 1993;27(12):1527-32.
- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001;128(22):4523-34.
- Mintz BR, Cooper JA, Jr. Hybrid hyaluronic acid hydrogel/poly(varepsilon-caprolactone) scaffold provides mechanically favorable platform for cartilage tissue engineering studies. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(9):2918-26.
- Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, et al. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(4):481-9.
- Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, et al. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2017;21(6):1-294.
- Mitrovic D. Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am J Anat*. 1978;151(4):475-85.
- Moghadam MN, Pioletti DP. Improving hydrogels' toughness by increasing the dissipative properties of their network. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;41:161-7.
- Mollazadeh S, Fazly Bazzaz BS, Kerachian MA. Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related diseases. *J Orthop Surg Res*. 2015;10:15.
- Moran CJ, Ramesh A, Brama PA, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop*. 2016;3(1):1.
- Motavalli M, Akkus O, Mansour JM. Depth-dependent shear behavior of bovine articular cartilage: relationship to structure. *J Anat*. 2014;225(5):519-26.

Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(3):158-66.

Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF-beta1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2015;33(3):762-73.

Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res*. 1991;195(2):492-503.

Narcisi R, Quarto R, Ulivi V, Muraglia A, Molfetta L, Giannoni P. TGF beta-1 administration during ex vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3282-90.

Nazempour A, Van Wie BJ. Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(5):1325-54.

Nehrer S, Minas T. Treatment of articular cartilage defects. *Invest Radiol*. 2000;35(10):639-46.

Nicodemus GD, Bryant SJ. The role of hydrogel structure and dynamic loading on chondrocyte gene expression and matrix formation. *J Biomech*. 2008;41(7):1528-36.

Nicodemus GD, Skaalure SC, Bryant SJ. Gel structure has an impact on pericellular and extracellular matrix deposition, which subsequently alters metabolic activities in chondrocyte-laden PEG hydrogels. *Acta Biomater*. 2011;7(2):492-504.

Niemietz T, Zass G, Hagmann S, Diederichs S, Gotterbarm T, Richter W. Xenogeneic transplantation of articular chondrocytes into full-thickness articular cartilage defects in minipigs: fate of cells and the role of macrophages. *Cell Tissue Res*. 2014;358(3):749-61.

Noel D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Poncelet P, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(1):74-85.

Noort WA, Oerlemans MI, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, et al. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med*. 2012;16(8):1827-39.

Nurminskaya M, Linsenmayer TF. Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn*. 1996;206(3):260-71.

- O'Driscoll SW, Salter RB. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res.* 1986(208):131-40.
- O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. *Anat Embryol (Berl).* 1975;148(1):1-23.
- Ohta Y, Iwamoto M. [Joint morphogenesis and development of permanent articular cartilage]. *Clin Calcium.* 2011;21(6):813-9.
- Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittinger M, Erggelet C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R41.
- Ossendorf C, Steinwachs MR, Kreuz PC, Osterhoff G, Lahm A, Ducommun PP, et al. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the treatment of large and complex cartilage lesions of the knee. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2011;3:11. ISSN: 1528-2511
- Oungoulian SR, Hehir KE, Zhu K, Willis CE, Marinescu AG, Merali N, et al. Effect of glutaraldehyde fixation on the frictional response of immature bovine articular cartilage explants. *J Biomech.* 2014;47(3):694-701.
- Park JS, Yang HJ, Woo DG, Yang HN, Na K, Park KH. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in a scaffold by long-term release of TGF-beta 3 complexed with chondroitin sulfate. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(2):806-16.
- Parmar PA, Chow LW, St-Pierre JP, Horejs CM, Peng YY, Werkmeister JA, et al. Collagen-mimetic peptide-modifiable hydrogels for articular cartilage regeneration. *Biomaterials.* 2015;54:213-25.
- Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3254-66.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
- Platas J, Guillen MI, del Caz MD, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ. Conditioned media from adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1beta in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:357014.
- Ponnurangam S, O'Connell GD, Chernyshova IV, Wood K, Hung CT, Somasundaran P. Beneficial effects of cerium oxide nanoparticles in development of chondrocyte-seeded hydrogel constructs and cellular response to interleukin insults. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(21-22):2908-19.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001(391 Suppl):S26-33.

Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res.* 1987;5(4):509-22.

Popa EG, Carvalho PP, Dias AF, Santos TC, Santo VE, Marques AP, et al. Evaluation of the in vitro and in vivo biocompatibility of carrageenan-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(11):4087-97.

Pot MW, Gonzales VK, Buma P, IntHout J, van Kuppevelt TH, de Vries RB, et al. Improved cartilage regeneration by implantation of acellular biomaterials after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PeerJ.* 2016;4:e2243.

Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):435-44.

Quinn TM, Hauselmann HJ, Shintani N, Hunziker EB. Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(12):1904-12.

Raimondi MT, Eaton SM, Lagana M, Aprile V, Nava MM, Cerullo G, et al. Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4579-84.

Reckers LJ, Fagundes DJ, Cohen M. The ineffectiveness of fibrin glue and cyanoacrylate on fixation of meniscus transplants in rabbits. *Knee.* 2009;16(4):290-4.

Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998;16(3):247-52.

Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(6):1064-8.

Richter W. Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(5):451-6.

Richter W, Diederichs S. Regenerative medicine in orthopaedics. Cell therapy - tissue engineering - in situ regeneration. *Orthopade.* 2009;38(9):859-67; quiz 68-9.

Robert-Koch-Institut (RKI). Themenheft 54" Arthrose" vom 25. Juni 2013.1-38.

Roberts JJ, Bryant SJ. Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development. *Biomaterials*. 2013;34(38):9969-79.

Roberts JJ, Nicodemus GD, Greenwald EC, Bryant SJ. Degradation improves tissue formation in (un)loaded chondrocyte-laden hydrogels. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(10):2725-34.

Rogers BA, Murphy CL, Cannon SR, Briggs TW. Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(12):1670-4.

Ronga M, Grassi FA, Bulgheroni P. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy*. 2004;20(1):79-84.

Rosneck J, Higuera CA, Tadross N, Krebs V, Barsoum WK. Managing knee osteoarthritis before and after arthroplasty. *Cleve Clin J Med*. 2007;74(9):663-71.

Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. 1. Aufl., London: Methuen; 1959.

Rutges JP, Duit RA, Kummer JA, Oner FC, van Rijen MH, Verbout AJ, et al. Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(11):1487-95.

Saris D, Price A, Widuchowski W, Bertrand-Marchand M, Caron J, Drogset JO, et al. Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Two-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am J Sports Med*. 2014;42(6):1384-94.

Schewe F, Fritz J, Weise K; Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2008;up2date3:pp. 77-94.

Schünke M. *Topografie und Funktion des Bewegungssystems: Funktionelle Anatomie*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014.

Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res*. 2005;320(2):269-76.

Shah MR, Kaplan KM, Meislin RJ, Bosco JA, 3rd. Articular cartilage restoration of the knee. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65(1):51-60.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(4):532-53.

Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 20):3428-40.

Siczkowski M, Watt FM. Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage. Isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture. *J Cell Sci.* 1990;97 ( Pt 2):349-60.

Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* 1996;33(2):57-63.

Smith AU. Survival of Frozen Chondrocytes Isolated from Cartilage of Adult Mammals. *Nature.* 1965;205(4973):782-4.

Song JE, Kim AR, Lee CJ, Tripathy N, Yoon KH, Lee D, et al. Effects of purified alginate sponge on the regeneration of chondrocytes: in vitro and in vivo. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2015;26(3):181-95.

Spagnoli A, O'Rear L, Chandler RL, Granero-Molto F, Mortlock DP, Gorska AE, et al. TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol.* 2007;177(6):1105-17.

Spain TL, Agrawal CM, Athanasiou KA. New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng.* 1998;4(4):343-52.

Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17(4):281-99.

Sridhar BV, Brock JL, Silver JS, Leight JL, Randolph MA, Anseth KS. Development of a cellularly degradable PEG hydrogel to promote articular cartilage extracellular matrix deposition. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(5):702-13.

Steadman JR, Miller BS, Karas SG, Schlegel TF, Briggs KK, Hawkins RJ. The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg.* 2003;16(2):83-6.

Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs K. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Tech Orthop.* 1997;7:300-4.

Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev.* 2009;18(7):969-78.

Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, Gilbert F, Ghivizzani SC, Gobel S, et al. Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(4):R168.

- Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S26-31.
- Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat*. 1967;101(Pt 4):753-63.
- Stylli SS, Kumar A, Gonzales M, Kaye AH. The biocompatibility of BioGlue with the cerebral cortex: a pilot study. *J Clin Neurosci*. 2004;11(6):631-5.
- Sun Z, Zhang Y, Yang S, Jia J, Ye S, Chen D, et al. Growth differentiation factor 5 modulation of chondrogenesis of self-assembled constructs involves gap junction-mediated intercellular communication. *Dev Growth Differ*. 2012;54(9):809-17.
- Tansley P, Al-Mulhim F, Lim E, Ladas G, Goldstraw P. A prospective, randomized, controlled trial of the effectiveness of BioGlue in treating alveolar air leaks. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(1):105-12.
- Tekari A, Luginbuehl R, Hofstetter W, Egli RJ. Transforming growth factor beta signaling is essential for the autonomous formation of cartilage-like tissue by expanded chondrocytes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120857.
- Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015;70:48-54.
- Tsurkan MV, Chwalek K, Prokoph S, Zieris A, Levental KR, Freudenberg U, et al. Defined polymer-peptide conjugates to form cell-instructive starPEG-heparin matrices in situ. *Adv Mater*. 2013;25(18):2606-10.
- Tukmachev D, Forostyak S, Koci Z, Zaviskova K, Vackova I, Vyborny K, et al. Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(3-4):306-17.
- Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Control Release*. 2008;127(1):12-21.
- Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(24):4197-211.
- Ustunel I, Demir R. A histochemical study on the enzymatic activity in the proximal epiphysis of the humerus during the prenatal and postnatal periods in rats. *Ann Anat*. 1995;177(1):73-83.
- Vahdati A, Wagner DR. Implant size and mechanical properties influence the failure of the adhesive bond between cartilage implants and native tissue in a finite element analysis. *J Biomech*. 2013;46(9):1554-60.

Vahdati A, Zhao Y, Ovaert TC, Wagner DR. Computational investigation of fibrin mechanical and damage properties at the interface between native cartilage and implant. *J Biomech Eng.* 2012;134(11):111004.

van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(3):223-32.

van Susante JL, Buma P, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Chondrocyte-seeded hydroxyapatite for repair of large articular cartilage defects. A pilot study in the goat. *Biomaterials.* 1998;19(24):2367-74.

van Susante JLC, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, et al. Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials.* 2001;22(17):2359-69.

Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(5):408-19.

Visser J, Gawlitta D, Benders KE, Toma SM, Pourn B, van Weeren PR, et al. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials.* 2015;37:174-82.

Visser R, Arrabal PM, Santos-Ruiz L, Becerra J, Cifuentes M. Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein-6 in vitro and in vivo. *Cytokine.* 2012;58(1):27-33.

von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977;267(5611):531-2.

Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol.* 2015;52(5):842-50.

Weinzweig J, Pantaloni M, Spangenberg A, Marler J, Zienowicz RJ. Osteochondral reconstruction of a non-weight-bearing joint using a high-density porous polyethylene implant. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(7):1547-54.

Weiss-Bilka HE, McGann ME, Meagher MJ, Roeder RK, Wagner DR. Ectopic Models for Endochondral Ossification: Comparing Pellet and Alginate Bead Culture Methods. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;

Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2010;223(1):84-93.

- Wilson EB. The statistical significance of experimental data. *Science*. 1923;58(1493):93-100.
- Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003;48(2):418-29.
- Xu D, Gechtman Z, Hughes A, Collins A, Dodds R, Cui X, et al. Potential involvement of BMP receptor type IB activation in a synergistic effect of chondrogenic promotion between rhTGFbeta3 and rhGDF5 or rhBMP7 in human mesenchymal stem cells. *Growth Factors*. 2006;24(4):268-78.
- Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78(1):1-11.
- Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(3):404-18.
- Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*. 2015;7(2):73-9.
- Yasumoto S, Kondo S, Kato Y. Growth and differentiation of primary chick embryonic chondrocytes on agar plates. *Jpn J Exp Med*. 1980;50(3):221-4.
- Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(1):45-54.
- Yin H, Wang Y, Sun Z, Sun X, Xu Y, Li P, et al. Induction of mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and functional cartilage microtissue formation for in vivo cartilage regeneration by cartilage extracellular matrix-derived particles. *Acta Biomater*. 2016;33:96-109.
- Yin M, Pacifici M. Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev Dyn*. 2001;222(3):522-33.
- Yoon DM, Fisher JP. Effects of exogenous IGF-1 delivery on the early expression of IGF-1 signaling molecules by alginate embedded chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(7):1263-73.
- Yoon HJ, Kim SB, Somaiya D, Noh MJ, Choi KB, Lim CL, et al. Type II collagen and glycosaminoglycan expression induction in primary human chondrocyte by TGF-beta1. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:141.
- Yu FY, Lu SB, Huang LH, Xu WJ, Peng J, Zhao B, et al. Mechanisms of autologous chondrocytes mass transplantation in the repair of cartilage defects of rabbits' knee. *Zhongguo Gu Shang*. 2010;23(9):683-7.

Yuan T, Zhang L, Li K, Fan H, Fan Y, Liang J, et al. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(2):337-44.

Zannettino AC, Paton S, Itescu S, Gronthos S. Comparative assessment of the osteoconductive properties of different biomaterials in vivo seeded with human or ovine mesenchymal stem/stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(12):3579-87.

Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med*. 2010;38(5):924-33.

Zhang C, Cai YZ, Lin XJ. One-Step Cartilage Repair Technique as a Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Defects: Biological Characteristics, Preclinical Application, Surgical Techniques, and Clinical Developments. *Arthroscopy*. 2016;32(7):1444-50.

Zhang M, Powers RM, Jr., Wolfinbarger L, Jr. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J Periodontol*. 1997;68(11):1076-84.

Zhang X, Chen X, Yang T, Zhang N, Dong L, Ma S, et al. The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(4):531-41.

Zhang X, Guo J, Wu G, Zhou Y. Effects of heterodimeric bone morphogenetic protein-2/7 on osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *Cell Prolif*. 2015;48(6):650-60.

Zhang Z, Li L, Yang W, Cao Y, Shi Y, Li X, et al. The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;25(2):309-20.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.



## 9 Anhang

### Anhang 1: Materialien

#### Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
1,9-Dimethylmethylen- Blau (DMMB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercapto-Ethanol (50 mM)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
3,3' Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt
BioGlue®	CryoLife Science Technologies Produktions- und Vertriebs GmbH, Poggersdorf, Österreich
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
Bouin's Fixierlösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM high glucose	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
DMEM low glucose	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
dNTP-Mix [5 mM]	Qiagen GmbH, Hilden
Dried Skim milk	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fast Green	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Fast Red Tablets	Roche, Mannheim, Germany
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämalaun nach Meyer	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Heringssperma DNA	Promega GmbH, Mannheim
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main
Isobutylmethylxanthin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
ITS	Discovery Labware Inc., Bedford, USA

künstlicher Knochenzement (Beracryl®)	Troller Kunststoffe AG, Fuluibach, Schweiz
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Siegma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (100x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim, Germany
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
NBT/BCIP Substratlösung	Roche, Mannheim
Neomount	Merck KGaA, Darmstadt
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Oligo(dT) Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ölrot O	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Paraffin	Leica Mikrosysteme GmbH, Nussloch
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
peqGOLD TriFast	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
peqGold Universal-Agarose	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Peqgreen	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
p-Nitrophenol Standard (10 mM)	Siegma-Aldrich, Taufkirchen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Siegma-Aldrich, Taufkirchen
RNase OUT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen GmbH, Hilden
Rotihistol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese 30 Gellösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sacharrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Safranin O	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
β-Glycerophosphat	Siegma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Tisseel®	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleisheim
Triethanolamid-Hydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Tris base	Merck KGaA, Darmstadt
Tris HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tuerk'sche Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vectabond	Vector Laboratories, Peterborough, United Kindom
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Enzyme und Wachstumsfaktoren

Bezeichnung	Hersteller
bovines Pepsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-2 (FGF-2)	Active Bioscience GmbH, Hamburg
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Omniscrypt Reverse Transkriptase	Qiagen GmbH, Hilden
Protease (Typ 24)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
qPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA
Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase out	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Transformierender Wachstumsfaktor-beta 1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Trypsin/EDTA	Biochrom, Darmstadt
Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5	Biopharm GmbH, Heidelberg

## Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Maus anti-human Kollagen Typ II (Klon II-4C11)	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Maus anti-human Kollagen Typ X (Klon x53)	Quartett, Immunodiagnostika, Biotechnologie + Kosmetik Vertriebs GmbH, Berlin
Schaf anti-Digoxigenin Fab fragments, Peroxidase-konjugiert	Böhringer, Mannheim
Ziege anti-Maus IgG, Biotin-konjugiert	Jackson Immunoresearch European Ltd., Newmarkets
Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert	Jackson Immunoresearch European Ltd., Newmarkets

## Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare Company, Chalfont St. Giles, England
Biopsiestanzen 4mm und 6mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenburg
Deckgläser	Gerhardt Menzel GmbH, Braunschweig
Einwegskalpelle	Feather Safty Razor Co., LTD, Osaka, Japan
Handschuhe unsteril (Alfatex®)	Sänger GmbH, Schrozberg
Kollagenmembran Chondrovide®	Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH, Baden-Baden
Mikrotomklingen (Typ A22)	Feather Safty Razor Co., LTD, Osaka, Japan

Multiwellplatten	Nunc GmbH und Co. KG, Wiesbaden
Nylonsieb (40 µm)	Becton Dickinson and Company Falcon, Franklin Lakes, USA
Objektträger Super Frost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Stripes/Platten	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (RNase frei)	Neptune, San Diego, USA
Reaktionsgefäße 15ml und 50ml	Becton Dickinson and company, Heidelberg
Reaktionsgefäße bis 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Spitzen für Gelpipetten	Gilson International B.V., Limburg
Sterilfilter FP30/0,2 (0,2µm)	Whatman GmbH, Dassel
Steritop Express Sterilfilter (0,22µm)	Merck Millipore, Darmstadt
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Nunc GmbH und Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturplatten 24-Well, 96-Well	Nunc GmbH und Co. KG, Wiesbaden

## Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad Laboratories Inc. , Hercules, USA
PROTEAN® II xi Cell	
ELISA MRX Lesegerät	Dynatech Technologies, Chantilly, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Gelpipetten	Gilson International B.V., Limburg
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
in vivo Micro-CT Skyscan 1076	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
LightCycler®96	Hoffmann- La Roche AG, Basel, Schweiz
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Nanodrop ND-100 Spectrophotometer	Kisker Biotech GbR, Steinfurt
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
pH Meter	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Polytron PT-MR 2100	Kinematica GmbH, Eschbach
Power Supply Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories Inc. , Hercules, USA
Reinstwasseranlage Purelab Option Q DV25	ELGA Labwater, Wien, Österreich
Schlittenmikrotom Jung Histoslide	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
UV-Lampe	Vilber Lourma, Marne la Vallee, Frankreich
VirTis Lyophilisierungsöfen "Wizzard" 2,0	SP Scientific, Gardiner, USA
Vortex	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Wallac 1420 VICTOR2™ Plattenleser	PerkinElmer Life Sciences, Watham, USA
Zellkulturinkubator Thermo Hera cell	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zentrifuge Biofuge fresco	

**Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche, Mannheim
Masson-Goldner Färbekit	Merck KGaA, Darmstadt
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)

**Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems GmbH, München
AxioVision Rel. 4.6.3.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, München
Betriebssystem Windows 7	Microsoft Corporation, Redmond, USA
CTAnalyzer 1.13.2.1	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
CTVol	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
CTVox	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
DataViewer 1.4.4	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA
ImageJ 1.51d	National Institute of Health, Rockville Pike, USA
Magellan V6.6	Tecan AG ,Männedorf, Schweiz
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office PowerPoint 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NRecon® 1.6.8.0	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
Skyscan 1076 in-vivo Micro-CT 2.6.5	Skyscan, Bruker-microCT, Kontich, Belgien
SPSS 16.0	SPSS Inc., Chicago, USA

**Tierhaltungsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Einstreu Mäuse	Sniff GmbH, Soest
Filterhauben	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Gitterdeckel	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Makrolonkäfige	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Minipigfutter	Raiffeisen Kraftfutterwerk GmbH, Kehl
Nagerfutter	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Nagerfutter, UV-bestrahlt	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Nestlets	Sniff GmbH ,Soest
SCID-Maus Inkubatoren	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Tierhäuschen	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg

Tränkeflaschen mit Kappen

Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenber

**OP- Bedarf**

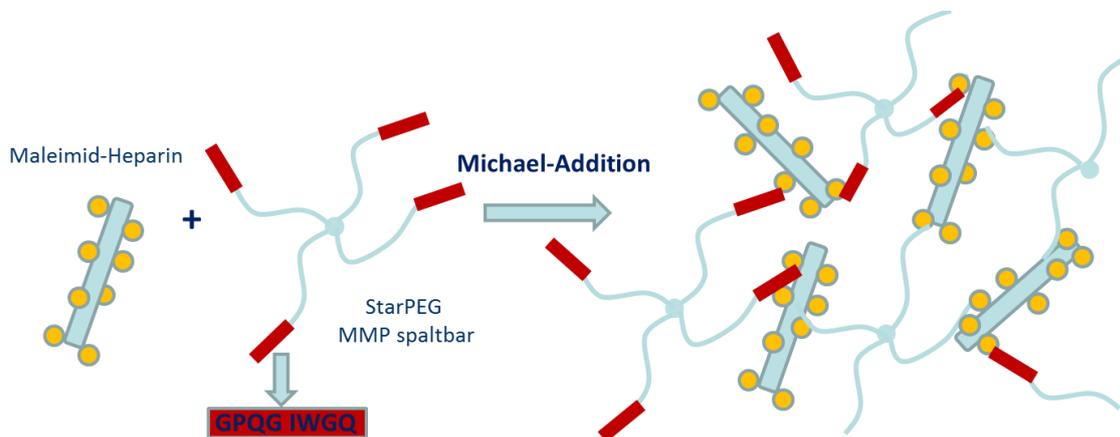
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklavierbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Biopsiestanzen 6mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenburg
Braunol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Braunosan	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Chirurgisches Nahtmaterial	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegkanülen	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Einwegskalpelle	Feather Safty Razor Co., LTD, Osaka, Japan
Einwegspritzen (außer 1ml)	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Einwegspritzen 1ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Foliodrape	PAUL HARTMANN Ges.m.b.H., Neudorf, Österreich
Infrarotlampe	Albrecht Kerbl GmbH, Buchbach
Krankenunterlagen	3M Health Care, Neuss
Mundschutz	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Unterefeldhaus
Narkosegerät "Narkomat"	Heyer Medical AG, Bad Ems
OP-Besteck	Aesculap AG, Tuttlingen
OP-Hauben	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Unterefeldhaus
Schermaschine	Aesculap AG, Tuttlingen
sterile Kompressen (Gazin®)	Lohmann und Rauscher GmbH und Co. KG, Neuwied
sterile OP-Handschuhe (Gammatex®PF)	Ansell Ltd. Tamworth, United Kingdom
sterile OP-Kittel	3M Health Care, Neuss
unsterile Kompressen	PAUL HARTMANN Ges.m.b.H., Neudorf, Österreich
Wärmeplatte	Labotect GmbH Labor-Technik, Göttingen

**Medikamente**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminium-Micronisat-Spray	MEDISTAR Arzneimittelvertriebs GmbH,
Atipamezolhydrochlorid (Alzane®)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Augensalbe (Vidisic®)	Bausch&Lomb GmbH, Berlin
Benzylpenicillin-Procaïn/Dihydrostreptomycin	aniMedica GmbH, Senden
Buprenorphinhydrochlorid (Buprenovet®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Gentamicinsulfat (Gentamicin 50®)	MEDISTAR Arzneimittelvertriebs GmbH
Heparin-Natrium (5000U/ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm

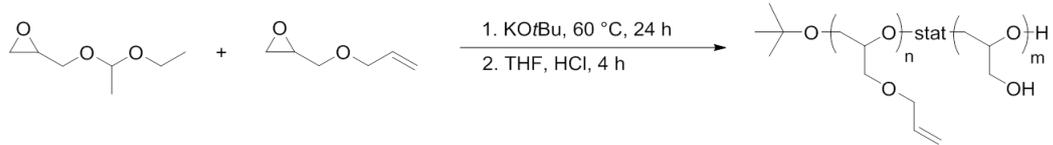
Isofluran	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Ketaminhydrochlorid (Ketamin <sup>®</sup> )	MEDISTAR Arzneimittelvertriebs GmbH,
Ketoprofen (Ketoprosol <sup>®</sup> )	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Medetomidinhydrochlorid (Sedin <sup>®</sup> )	Alvetra GmbH, Neumünster
Midazolam-HCl (Midazolam-hameln <sup>®</sup> )	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
Novaminsulfon	aniMedica GmbH, Senden
Pentobarbital-Natrium (Narcofen <sup>®</sup> )	Merial GmbH, Hallbergmoos
Propofol (Narcofol <sup>®</sup> )	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf

## Anhang 2: Abbildungen

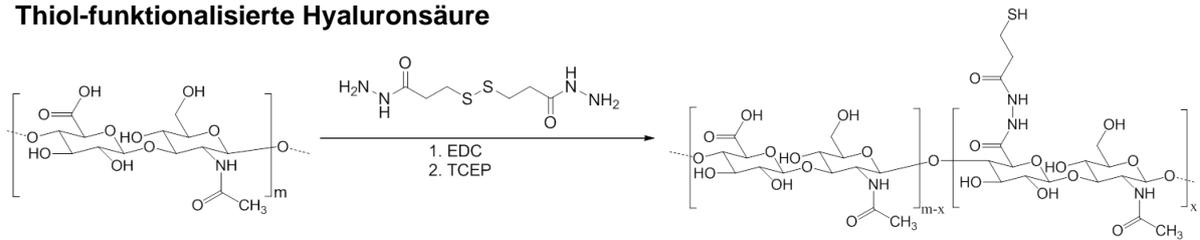


Anhang-Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Herstellung des StarPEG-Heparin Hydrogels.

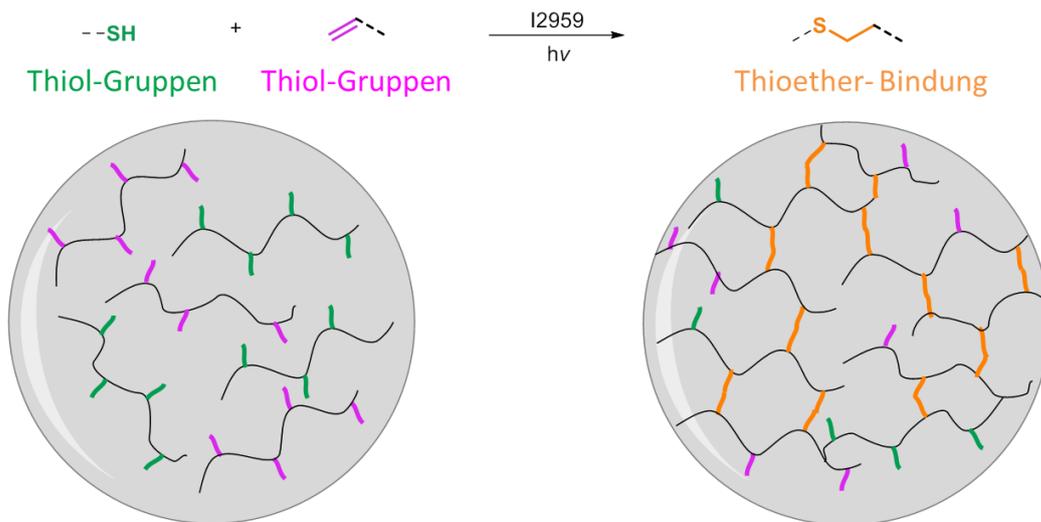
**P(AGE/G)**



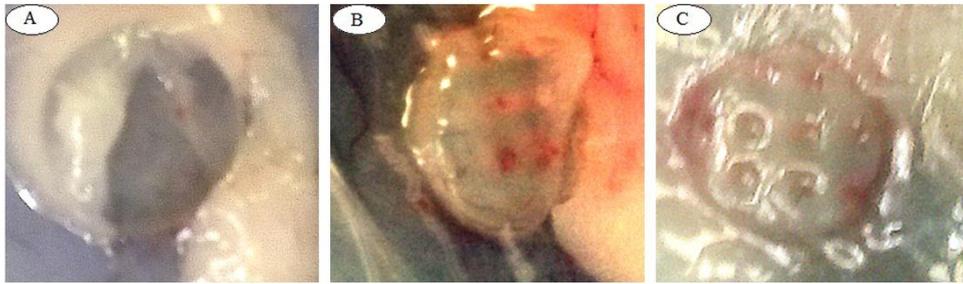
**Thiol-funktionalisierte Hyaluronsäure**



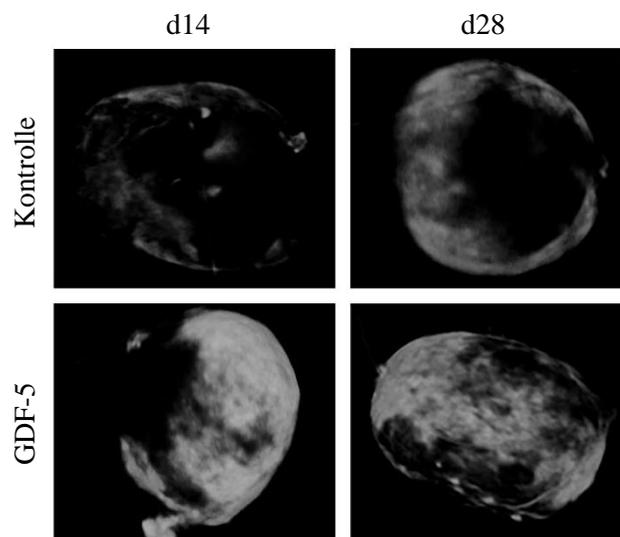
Anhang-Abb. 2: Reaktionsgleichungen zur Herstellung der Grundkomponenten des P(AGE/G)HA-SH Hydrogels.



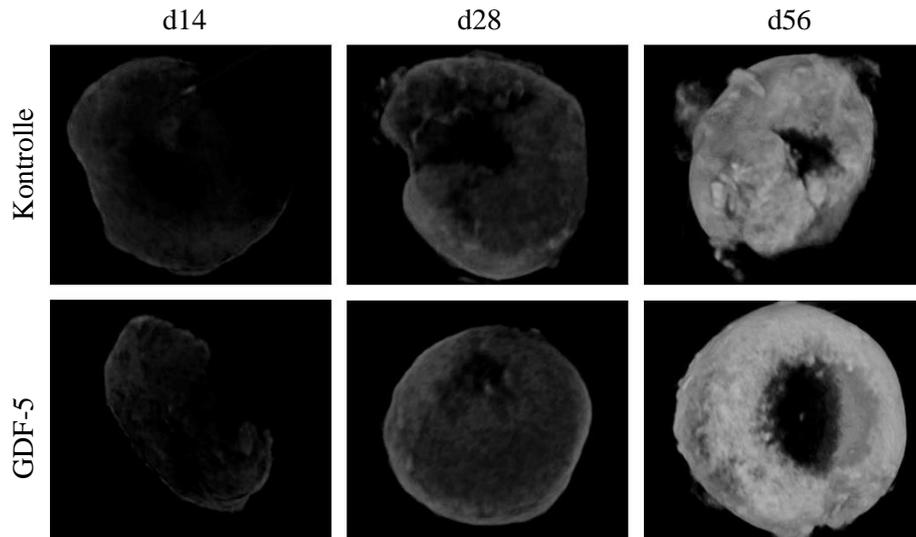
Anhang-Abb. 3: Schematische Darstellung der Gelierungsreaktion des P(AGE/G)HA-SH Hydrogels.



**Anhang-Abb. 4:** Makroskopische Ansicht porös gedruckter und gegossener P(AGE/G)HA-SH Hydrogele bei Explantation an Tag 14 A) gegossenes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; B) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel; C) porös gedrucktes P(AGE/G)HA-SH-Hydrogel mit reduzierter Abbaubarkeit



**Anhang-Abb. 5:** 3D-Rekonstruktionen der chondrogen vordifferenzierten (+10ng/mlTGF $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) hMSC Konstrukte nach 14 und 28 Tagen *in vitro* Kultivierung in osteogenem Medium. Die Konstrukte wurden nach Fixierung mit einer Auflösung von 9 $\mu$ m und einem 0,025mm Titanfilter gescannt. Für die Rekonstruktion wurden Grauwerte zwischen: 0,0 und 0,085 verwendet. (n=2)



**Anhang-Abb. 6:** 3D-Rekonstruktionen der chondrogen vordifferenzierten (+10ng/mlTGF $\beta$ ; +/- 150ng/ml GDF-5) pMSC Konstrukte nach 14 und 28 Tagen *in vitro* Kultivierung in osteogenem Medium. Die Konstrukte wurden nach Fixierung mit einer Auflösung von 9 $\mu$ m und einem 0,025mm Titanfilter gescannt. Für die Rekonstruktion wurden Grauwerte zwischen: 0,0 und 0,085 verwendet (n=3).



**Anhang-Abb. 7:** In situ-Hybridisierung porziner SINE und muriner SINE A/B an einem repräsentativen Kontrollkonstrukt nach 28 Tagen *in vivo*. A) HE-Färbung eines porzinen Knochenbalkens; B) Färbung des Knochenbalkens aus A) auf porzine SINE; C) Färbung des Knochenbalkens aus A) auf murine SINE;

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner Betreuerin am Zentrum für Experimentelle Orthopädie, Frau Prof. Dr. Richter, die mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation geboten hat. Während der vergangenen 3 1/2 Jahre konnte ich mich stets auf ihren fachlichen kompetenten Rat und ihre Unterstützung bei allen auftretenden Problemen verlassen. Unter ihrer Betreuung konnte ich mich sowohl als Wissenschaftlerin als auch persönlich weiterentwickeln, wovon ich auch auf meinem weiteren Lebensweg profitieren werde.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Seeger herzlich für die tierärztliche Betreuung meiner Dissertation und die Beratung bei histologischen Fragestellungen danken.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern des EU-Projekts „HydroZones“ für die stets gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Materialien zur Durchführung meiner Dissertation.

Herzlich möchte ich auch allen meinen Kollegen am Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie in Heidelberg danken. Dank der angenehmen Atmosphäre innerhalb unserer Arbeitsgruppe hat es mir auch in den schwierigeren Phasen meiner Dissertation immer Freude bereitet zur Arbeit zu kommen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Solvig Diederichs für ihren Rat in fachlichen Fragen, Dr. Friederike Bothe und Anne-Kathrin Knauf für die weitere tierärztliche Unterstützung und Benedict Lotz für die viele Stunden, die er mich bei diversen Tier-Operationen unterstützt hat. Speziell möchte ich auch Eliane Hesse danken, die mir zu Beginn meiner Dissertation alle Zellkultur- und molekularbiologischen Methoden vermittelte.

Ein weiteres großes Dankeschön möchte ich Dr. Elisabeth Seebach aussprechen, die mich stets bei der Umsetzung meiner eigenen Ideen unterstützt und bei der Planung meiner Versuchsvorhaben beraten hat. Außerdem möchte ich ihr für die Einweisung in die Arbeit mit dem  $\mu$ CT-Gerät und den zugehörigen Programmen herzlich danken.

Weiterhin danke ich Dr. Sebastián Hagmann für seine Mitwirkung an den Minipig-Operationen, für die er auch bereit war seine Freizeit zu investieren. Auch für seine fachliche Einschätzung meiner Problemstellung als orthopädischer Chirurg möchte ich mich hiermit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich allen meinen Freunden danken, die in der Zeit meiner Promotion immer ein offenes Ohr für mich hatten und des Öfteren Motivationsarbeit leisten mussten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Partner Bogdan Grad, die immer an mich geglaubt haben und mir während meiner Dissertation mit ihrem Verständnis eine große Stütze waren.

Diese Dissertation wurde durch das Projekt „HydroZones“ im Zuge des 7. Forschungsrahmenprogramms der Europäischen Union finanziert.