

Einfluss hydrostatischer Druckbelastung
während der *in vitro* Herstellung von
dreidimensionalen Knorpelimplantaten

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin
genehmigte Dissertation

(urn:nbn:de:gbv:830-tubdoc-8126)

von
Katharina Wiegandt
aus Hamburg

2009

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. habil. Michael Morlock Ph.D.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 28. August 2009

VORWORT

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von August 2005 bis März 2009 während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik (Leitung: Prof. Dr. An-Ping Zeng) der Technischen Universität Hamburg-Harburg. Im Folgenden möchte ich den Personen danken, die mich während dieser Zeit unterstützt und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralf Pörtner für die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsthemas, für die sehr gute Betreuung meiner Dissertation und die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge danken. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Müller für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Michael Morlock für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes meinen Dank aussprechen. Viel Hilfe und wertvolle Anregungen erhielt ich von Frau Dr. Christiane Goepfert und Herrn Dr. Gerd Huber bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Bioprocess- und Biosystemtechnik für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre. Für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bin ich ganz besonders Kerstin Michael, Christiane Goepfert und Oscar Platas Barradas verbunden, mit denen ich in den letzten Jahren das Büro und das Labor geteilt habe.

Wesentlich an der Entwicklung und dem Aufbau des Kolbendruckreaktors waren Jan Sens, Ralf Grajetzki, Eduard Ilinich und die Forschungswerkstatt „Maschinenbau“ der TUHH beteiligt. Für die Hilfe bei der Durchführung der Analytik gilt mein Dank Kerstin Michael, dem Zentrallabor „Chemische Analytik“ der TUHH, Ditte Siemesgelüss und Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Adamietz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Hervorheben möchte ich außerdem die sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomechanik – speziell Elisa Hönig, Gabriela Mielke, Helge Paetzold, Thomas Winkler und Arndt Schilling – und dem Institut für Keramische Hochleistungswerkstoffe – im Einzelnen Rolf Janßen und Daniel Fritsch.

Die Arbeit wurde im Wesentlichen innerhalb des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes „Ingenieurtechnische Aspekte bei der Züchtung von künstlichem Gelenkknorpel“ zusammen mit dem Zentrum für Biomechanik und Skelettbiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) und der Fg. Prozessanalytik und Getreidetechnologie (Universität Hohnheim) durchgeführt.

Mit ihrem Engagement haben zum Gelingen dieser Arbeit ebenfalls Denver Surrao, Mathias Antholz, Moritz Völtzer, Teresa Richter, Leonie Grethe, Anne Reichardt, Mike Attia und Anja Dittmann beigetragen, deren Studien- und Diplomarbeiten ich betreuen durfte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Geschwistern Alena und Konstantin, meinen Eltern Renate und Frank Wiegandt sowie Matthias für die fortwährende Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Hamburg, im November 2009

Katharina Wiegandt

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iii
1 EINLEITUNG	1
2 STAND DES WISSENS	3
2.1 Funktion des Kniegelenkes und des Knorpelgewebes	3
2.1.1 Aufbau und Bewegung des Kniegelenkes	3
2.1.2 Anatomie des hyalinen Gelenkknorpels	6
2.1.3 Biomechanik des Gelenkknorpels	11
2.2 Knorpeldefekte und Therapiemöglichkeiten	16
2.2.1 Aktuelle Therapiemöglichkeiten	17
2.2.2 <i>Tissue Engineering</i> : Ansätze zur Knorpelheilung	19
2.2.3 Wirkung von Druckbelastung auf Chondrozyten	22
2.2.4 Bioreaktoren zum Aufbringen von Druckbelastung	25
2.3 Einflüsse ausgewählter Kultivierungsbedingungen	33
2.3.1 Wachstumsfaktoren	33
2.3.2 Trägermaterialien	34
3 MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Kultivierungsprozess	37
3.1.1 Medien, Zellen und Trägermaterial	37
3.1.2 Herstellung von Knorpel-Konstrukten	39
3.2 Analytik	43
3.2.1 Bestimmung der Glucose- und Laktatkonzentration	43
3.2.2 Biomechanische Analytik	44
3.2.3 Biochemische Analytik	45
3.2.4 Histologische Untersuchungen	46
3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie	48
3.3 Statistische Auswertung	49
3.4 Überblick über die durchgeführten Arbeiten	50
4 VARIATIONEN DES KULTIVIERUNGSPROTOKOLLS	52
4.1 Eigenschaften des nativen Knorpels	52
4.2 Kombinationen der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1	54
4.3 Einfluss des Trägers	60
4.4 Kultivierungsdauer	66

4.5	Diskussion der Variationen am Kultivierungsprotokoll	68
5	EINFLÜSSE AUF DIE REPRODUZIERBARKEIT DES SYSTEMS	77
5.1	Herstellung von Konstrukten unter identischen Bedingungen	78
5.2	Donoren	79
5.3	Porcine Seren	80
5.4	Proliferation	81
5.5	Alginatkultur	82
5.6	Diskussion der Reproduzierbarkeit des Systems	83
6	HYDROSTATISCHER DRUCK WÄHREND DER KULTIVIERUNG	88
6.1	Gasdruckreaktor	88
6.2	Kolbendruckreaktor	97
6.3	Diskussion der hydrostatischen Druckbelastung	107
7	SCHLUSSBEMERKUNGEN	116
8	ANHANG	121
8.1	Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen	121
8.2	Biomechanische und biochemische Parameter ausgewählter Versuche	123
8.3	Inbetriebnahme des Kolbendruckreaktors	126
9	LITERATURVERZEICHNIS	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.	absolut
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
A. dest.	destilliertes Wasser (Aqua dest.)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
AOT	Autologe Osteochondrale Transplantation
ATP	Adenosintriphosphat
Asap	L-Ascorbinsäure-2-phosphat
BMP	Knochenwachstumsfaktor (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
BW	Körpergewicht (<i>Body Weight</i>)
C	Regelung
CCD	<i>Charged-Coupled-Device</i>
COMP	Knorpel-Matrix-Protein (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
E-Modul	Elastizitäts-Modul
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Volumenstrom
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
Glc	Glucose
GLUT	Glucosetransporter
HA	Hydroxylapatit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I	Anzeige
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)
IGFBP	IGF-bindendes Protein (<i>IGF Binding Protein</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Lak	Laktat
k.A.	keine Angabe
k _a	volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LTBP	Latentes TGF- β bindendes Protein (<i>Latent TGF-β Binding Protein</i>)
MACI	Matrixgestütztes Autologes Chondrozytenimplantat (<i>Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implant</i>)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRI	Magnetresonanztomographie (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
n	Anzahl
n.d.	nicht durchgeführt
OA	Arthrose (<i>Osteoarthritis</i>)
OP	Operationssaal
p	p-Wert
P	Passage
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Solution</i>)
PEEK	Polyetheretherketon
PCS	Prozessleitsystem (<i>Process Control System</i>)
PI	Druckanzeige (Manometer)
pO ₂	gelöste Sauerstoffkonzentration
r	Korrelationskoeffizient
R	Registrierung
R _a	Rauhigkeit
RA	Rheumatische Arthritis
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin
Sox9	SR _Y -box 9 (<i>Sex determining region Y-box 9</i>)
t	Zeit
TCP	Tricalciumphosphat
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TUHH	Technische Universität Hamburg-Harburg
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
v/v	<i>Volume per volume</i>
W	Belastung
WF	Wachstumsfaktor
Y _{Lak/Glc}	scheinbarer Ausbeutekoeffizient von Laktat aus Glucose

1 EINLEITUNG

Auf Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems und des Bindegewebes entfielen dem Gesundheitsbericht des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2006 zufolge etwa 11% der Krankheitskosten [1]. Gerade Verletzungen des Gelenkknorpels stellen ein Problem dar, da die Fähigkeit des Knorpels zur Selbstregeneration gering ist [2]. Knorpelschäden schreiten kontinuierlich fort, der Patient leidet an Schmerzen und reduzierten Bewegungsmöglichkeiten, so dass seine Lebensqualität stark eingeschränkt wird. Die am weitesten verbreitete Gelenkerkrankung ist die Arthrose, bei der ein überdurchschnittlicher Verschleiß der Gelenkoberflächen durch beispielsweise Fehlstellung oder Überbelastung der Gelenke entsteht. In Deutschland leiden zurzeit etwa 5 Millionen Menschen unter arthrosebedingten Gelenkschäden, die am häufigsten im Kniegelenk auftreten [1]. Das Neuerkrankungsrisiko steigt mit dem Alter, so dass die Kosten für Behandlungen und Arbeitsausfälle voraussichtlich in den nächsten Jahren durch den demographischen Wandel steigen werden. Da konventionelle Therapien wie beispielsweise das Spülen des Gelenkes oder das Glätten der Gelenkoberfläche meist nur zu einer kurzzeitigen Linderung der Symptome und nicht zu einer Regeneration der Gelenkoberfläche führen [3], wird derzeit nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Eine innovative Technik, die in dem Forschungszweig der regenerativen Medizin eingegliedert ist, ist die Herstellung von Knorpelimplantaten außerhalb des Körpers aus patienteneigenen Zellen mit Methoden des *Tissue Engineering*.

Die regenerative Medizin verfolgt das Ziel, Krankheiten durch die Wiederherstellung funktionsgestörter Gewebe entweder durch Ersatz oder durch die Anregung körpereigener Reparatur- und Regenerationsprozesse zu heilen [4]. Das Gebiet des *Tissue Engineering*, das erst auf eine 15-20-jährige Praxis zurückschauen kann, beschäftigt sich dabei mit der *in vitro* Herstellung oder Erhaltung von funktionellen Geweben auf der Basis von kultivierten Zellen. Inzwischen ist es möglich, fast alle Zelltypen des menschlichen Körpers aus den Geweben zu isolieren und verschiedene artifizielle Gewebe – beispielsweise Haut oder Knochen – im Labor zu generieren [2]. Auch die Gewebezüchtung von Knorpel hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, so dass bereits knorpelähnliches Gewebe aus autologen Zellen *in vitro* mithilfe unterschiedlicher Verfahren hergestellt werden kann. Dennoch kommen die Eigenschaften des kultivierten Knorpels bisher nicht den nativen gleich [5]. Entscheidend für die Funktionalität des Knorpels ist die biomechanische Beschaffenheit, die den dauerhaften Belastungen des Alltags genügen muss.

Derzeit wird unter anderem erforscht, ob durch die Simulation der im Kniegelenk auftretenden Kräfte in speziellen Bioreaktoren bei der Kultivierung eine Verbesserung der Knorpel Eigenschaften erreicht werden kann. Diese Belastungen sind *in situ* maß-

geblich an der Entwicklung und Erhaltung des Gelenkknorpels beteiligt. Das Reaktordesign im *Tissue Engineering* wird als äußerst komplex betrachtet, die Erfahrungen bei der Konstruktion und Handhabung sind noch gering [6]. Neben den allgemeinen Anforderungen an Bioreaktoren wie die Nährstoff- und Gasversorgung, den Abtransport der Metabolite und die Überwachung verschiedener Parameter müssen Bioreaktoren für das *Tissue Engineering* auch die speziellen Eigenschaften der empfindlichen Zell- und Gewebekulturen berücksichtigen und eine physiologische Umgebung für das Gewebe schaffen.

Häufig gehen Knorpelschäden mit einer Verletzung des subchondralen Knochens einher, so dass bei der Behandlung der Defekte auch die Regeneration des Knochens berücksichtigt werden muss. Im Fokus der *Tissue Engineering* Verfahren stehen dabei zurzeit osteochondrale Implantate. Diese biphasischen Konstrukte, die aus Biomaterialien und patienteneigenen Zellen generiert werden, sollen sowohl den defekten Knorpel als auch den darunterliegenden Knochen ersetzen [7, 8]. Die in der vorliegenden Arbeit angefertigten Knorpel-Träger-Konstrukte bestehen aus einem keramischen Trägermaterial als Knochenersatz und einer darauf kultivierten Knorpelschicht. Das Herstellungsverfahren umfasst nach der Vermehrung autologer Chondrozyten eine Redifferenzierungsphase in einem Alginatgel und eine anschließende Kultivierung der redifferenzierten Zellen auf dem Träger. Diese Arbeit ist in einem Projektverbund eingegliedert, an dem Ingenieure, Materialwissenschaftler, Biologen und Mediziner an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) und dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) beteiligt sind [9].

Das Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Eigenschaften des kultivierten Knorpels durch Modifikationen von Parametern in den verschiedenen Phasen des Kultivierungsschemas zu verbessern. Dazu sollte ein bestehendes Protokoll am porcinen Modell weiterentwickelt werden, um neben der Steigerung der Knorpelqualität auch eine Vergleichsgrundlage für Experimente unter Belastung zu schaffen. Von großer Bedeutung waren dabei im Wesentlichen die Wachstumsfaktor-Zusätze und der keramische Träger. Im zweiten Schritt sollte der Einfluss hydrostatischer Druckbelastung während der Kultivierung in zwei verschiedenen Bioreaktoren untersucht werden. Für diese Studien musste ein zweiter Druckreaktor entwickelt werden, mit dem im Vergleich zum bestehenden Reaktor höhere Frequenzen aufgebracht werden konnten. Es sollten der Einfluss der Belastung in den unterschiedlichen Phasen des Protokolls, der Einfluss der Frequenzen und ein geeigneter Belastungszyklus für das vorliegende Kultivierungsschema bestimmt werden.

2 STAND DES WISSENS

Das Kniegelenk muss – wie das Hüft- und Fußgelenk auch – einem Vielfachen des gesamten Körpergewichtes standhalten. Zur Mobilität des menschlichen Körpers trägt daher erheblich seine uneingeschränkte Funktionsfähigkeit bei. Es ist nicht nur das größte, sondern auch eines der komplexesten Gelenke im Körper. Die Knochenenden sind mit einer Schicht aus hyalinem Knorpel überzogen. Daher wird an dieser Stelle nicht auf den elastischen Knorpel, der unter anderem in der Ohrmuschel oder am Kehlkopfskelett vorkommt, und den Faserknorpel, der sich beispielsweise in den Zwischenwirbelscheiben oder den Menisken befindet, eingegangen [10].

In diesem Kapitel werden zunächst die Anatomie und die Biomechanik des Kniegelenkes und des Gelenkknorpels beschrieben (Kapitel 2.1). Es folgt eine Darstellung der aktuellen Möglichkeiten zur Therapie bei Knorpeldefekten, die Ansätze unter Verwendung von *Tissue Engineering* Methoden einschließen (Kapitel 2.2). Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Wirkung von aufgebrachtem Druck – eine Form der Belastung im Gelenkknorpel – auf *in vitro* hergestellte Knorpelimplantate während der Kultivierung. Diesbezüglich werden spezielle Bioreaktoren zum Aufbringen hydrodynamischer und hydrostatischer Druckbelastung beschrieben. Abschließend erfolgt eine Darstellung ausgewählter Faktoren (Wachstumsfaktoren, Träger), die bei der Herstellung von Knorpelgewebe *in vitro* eine Rolle spielen (Kapitel 2.3).

2.1 Funktion des Kniegelenkes und des Knorpelgewebes

Die hohe Belastbarkeit, die das Knorpelgewebe während der täglichen Bewegung der Gelenke gewährleisten muss, ist auf die Zusammensetzung und komplexe Organisation der Matrix zurückzuführen. Daher werden in diesem Abschnitt die Zusammenhänge zwischen den Anforderungen an das Knorpelgewebe, seinem Aufbau und seinen biomechanischen Eigenschaften erläutert.

2.1.1 Aufbau und Bewegung des Kniegelenkes

Anatomie des Kniegelenkes

Der Oberschenkelknochen (Femur), der Unterschenkelknochen (Tibia) und die Kniescheibe (Patella) bilden die knöchernen Strukturen des Kniegelenkes. Das Kniekehlgelenk befindet sich dabei zwischen Femur und Tibia, das Kniescheibengelenk zwischen Femur und Patella (Abbildung 2.1). In der Kniekehle verlaufen die Blutgefäße, die Lymphgefäße und die Nerven.

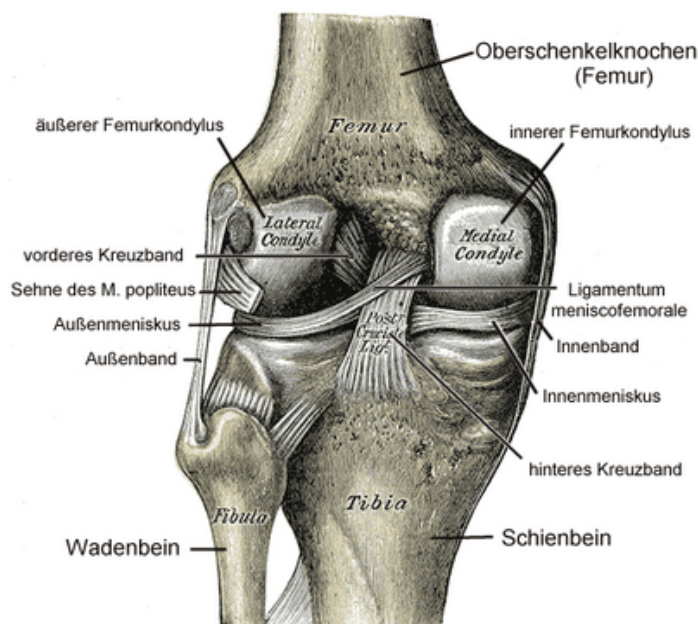


Abbildung 2.1: Anatomie des humanen Kniegelenkes [11].

Im Kniegelenk läuft der Femur in zwei großen Kondylen (*Condylus lateralis femoris* und *Condylus medialis femoris*) aus, zwischen denen an der Vorderseite die sogenannte Patellarinne (*Facies patellaris femoris*) liegt. Die Tibia endet ebenfalls mit zwei Kondylen (*Condylus lateralis tibiae* und *Condylus medialis tibiae*) und wird an der Oberfläche als Schienbeinplateau bezeichnet. Auf der Tibia liegen die zwei Menisken, die die Inkongruenz zwischen den Knochen ausgleichen und somit für eine erhöhte Stabilität und Beweglichkeit des Gelenkes sorgen. Zusätzlich muss das Kniegelenk durch eine Kniekapsel, Bänder, Sehnen und Muskeln stabilisiert werden. Die Kniescheibe ist ein dreieckiger Knochen, der in die Sehne des Oberschenkelmuskels (*Musculus quadriceps femoris*) eingebettet ist. Sie verlängert den Hebelarm des Muskels und schützt die Sehne vor Reibung auf den Kondylen des Femurs. Desweiteren befinden sich Schleimbeutel und Fettkörper am Kniegelenk zum Schutz der Muskeln, Bänder und Knochen [12].

Die Oberflächen der Kondylen des Femurs, der Tibia und die Innenseite der Patella sind mit hyalinem Knorpel beschichtet. Die Dicke des Knorpels wurde auf $2,2 \pm 0,4$ mm am humanen Femur und $3,3 \pm 0,6$ mm an der Patella bestimmt [13].

Bewegungen des Kniegelenkes

In erster Linie ermöglicht das Kniegelenk die Drehbewegungen Flexion und Extension sowie mediale und laterale Rotation. Weiterhin ist im geringen Maße eine Versetzung zwischen Femur und Tibia (medial-lateral, anterior-posterior, Kompression-Zug) und eine Abduktion und Adduktion des Unterschenkels möglich. Unter Normalbedingungen kann eine Beugung bis zu 140° und eine Streckung bis zu 10° durchgeführt werden. Die mediale und laterale Rotation ist abhängig von der Position des Knies.

Bei einer Flexion um 90° ist eine mediale Rotation bis zu 30° und eine laterale Rotation bis zu 40° ausführbar [12].

Das Kniegelenk führt bei der Flexion eine Roll-Gleit-Bewegung aus, da die Länge des Tibiaplateaus im Vergleich zur Gelenkoberfläche (Kreisumfang) des Femurs kleiner ist. Während der ersten 25° -Flexion rollen die Kondylen des Femurs auf dem Tibiaplateau. Im weiteren Verlauf gleitet bei fixiertem Unterschenkel der Femur zeitgleich zur Roll-Bewegung nach vorne (Abbildung 2.2 b). Bei starker Beugung des Kniegelenkes kommen auf 1 mm Abrollbewegung 4 mm Gleitbewegung. Bei einer vollständigen Flexion oder Extension macht die Roll-Bewegung durchschnittlich 56,6% der Bewegung in weiblichen Kniegelenken und 62,6% in männlichen Kniegelenken aus [14]. Vom angewinkelten Bein ausgehend beginnt das Kniegelenk bei der Streckung mit einer Roll-Gleit-Bewegung, die Femurkondylen gleiten nach hinten und schließlich wird einzig die Roll-Bewegung fortgeführt. Dabei beendet die kleinere laterale Kondyle des Femurs zuerst die Gleit-Bewegung, während sich die größere mediale Kondyle weiter posterior bewegt. Bei dieser Schlussrotation wird das Schienbein nach außen gedreht [12, 15, 16]. Während des Beugens und Streckens des Knies gleitet die Patella in der Patellarinne des Femurs. Indessen dreht sie sich um bis zu 11° um ihre vertikale Achse [12].

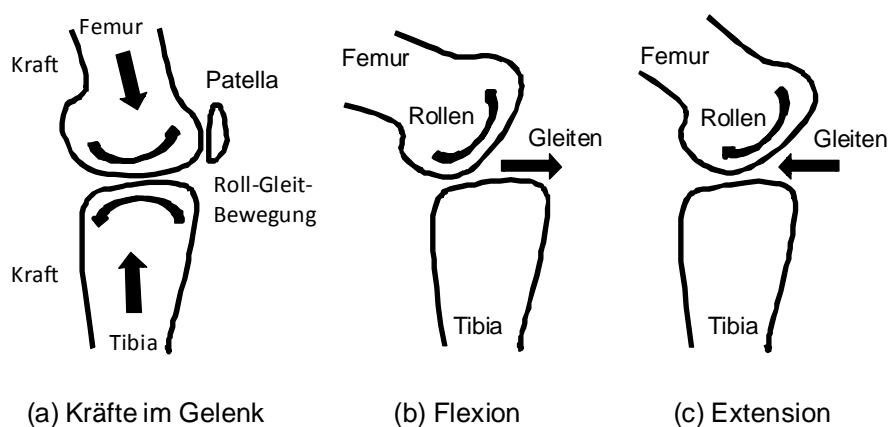


Abbildung 2.2: (a) Kräfte im Kniegelenk, (b) Roll- und Gleit-Bewegung bei Beugung des Kniegelenkes mit fixiertem Unterschenkel, (c) Roll- und Gleit-Bewegung bei Streckung des Kniegelenkes mit fixiertem Unterschenkel [12].

Kräfte im Kniegelenk und Gelenkknorpel

Die Kräfte im Kniegelenk können entweder experimentell oder theoretisch bestimmt werden. Bis heute gestaltet sich die *in vivo* Messung aufgrund der Rückwirkung auf den Menschen als schwierig. Daher wurden in den vergangenen Jahren oftmals Messungen *post mortem* und an Endoprothesen durchgeführt oder biomechanische Modelle erstellt, bei denen die Eingabewerte zum Beispiel aus Röntgen- und MRT-Aufnahmen gewonnen wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Methoden ergaben sich große Abweichungen zwischen den einzelnen Studien – beispielsweise von fast 300%

für Kompressionskräfte beim Gehen [16-21]. Im Folgenden werden daher zur Vergleichbarkeit der Werte untereinander nur die Ergebnisse einzelner Studien berücksichtigt.

Wie die Abbildung 2.2 (a) zeigt, wirken Kräfte auf den Knorpel zum einen als Kompressionskraft, die von Femur und Tibia übertragen werden, und zum anderen als Scherkraft, die auf die oben genannten Roll- und Gleit-Bewegungen zurückzuführen ist. Diese setzen sich aus äußeren Kräften wie der Schwerkraft und der Bodenreaktionskraft und aus inneren Kräften, die durch Muskeln, Sehnen und Bänder übertragen werden, zusammen. Kompressionskräfte für bestimmte alltägliche Bewegungen sind in Tabelle 2.1 angegeben. Sie können Spitzenwerte von bis zu 7xBW (BW – *Body Weight*) beim Aufstehen von einem Stuhl annehmen [19]. In der Literatur wurde bei alltäglichen Bewegungen die nach hinten gerichtete Scherkraft auf 0,4-1,7xBW, die nach vorne gerichtete Scherkraft auf 0,04-0,1xBW bestimmt [22]. Der in der Flüssigkeit des Gewebes entstehende Druck beträgt beim Gehen 4-5 MPa und kann Spitzenwerte von 20 MPa erreichen [20].

Tabelle 2.1: Kräfte im Kniegelenk bei bestimmten Bewegungen (Abkürzung: BW – *Body Weight*, [21]).

Aktivität	Kräfte im Kniegelenk
Gehen	3,0xBW
Treppensteigen (aufwärts)	4,3xBW
Treppensteigen (abwärts)	3,8xBW

2.1.2 Anatomie des hyalinen Gelenkknorpels

Hyalines Knorpelgewebe zählt wie der elastische Knorpel, der Faserknorpel und die Knochen zu den Stützgeweben des menschlichen Körpers. Das Wort „hyalin“ entstammt dem Griechischen (*hyalos* – glasartig, durchsichtiger Stein) und bezieht sich auf das bläuliche, gläserne und durchscheinende Aussehen des Knorpels [23].

Entwicklung des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel entwickelt sich aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe. Ab der fünften Schwangerschaftswoche kann der Prozess der Chondrogenese in humanen Embryos histologisch beobachtet werden. An den Stellen, an denen sich später die Extremitäten bilden, kondensieren und proliferieren mesenchymale Zellen. Im weiteren Verlauf der Extremitätenentwicklung verändern die Zellen ihre Morphologie und sezernieren hyaline extrazelluläre Substanzen [24]. Die Zellen teilen sich und rücken durch die gebildete Matrix auseinander (interstitielles Wachstum), während sie zu Chondroblasten differenzieren. In der neunten Woche sind die knorpeligen Vorläufer der Tibia und des Femurs sichtbar. Aus diesen Strukturen entwickeln sich

durch endochondrale Ossifikation Knochen, beginnend in der dreizehnten Woche nach der Befruchtung. Die Entstehung der Patella ist um etwa eine Woche verschoben, die Menisken werden ab der elften Woche gebildet [25].

Später differenzieren Chondroblasten zu Chondrozyten. Im Normalfall findet nun keine Mitose mehr statt. Zu diesem Zeitpunkt kann Knorpel nur noch begrenzt – ausgehend von der Oberfläche – wachsen (appositionelles Wachstum). Im adulten Organismus kommt hyaliner Knorpel in Gelenken, in den Knorpelspannen der Luftröhre, in den Epiphysenfugen und als Nasen- oder Rippenknorpel vor [10].

Chondrozyten und Chondrone

Knorpel ist ein avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe, dessen einziger Zelltyp Chondrozyten sind [26]. Mit nur 2-10% des Knorpelvolumens sind diese spärlich in der extrazellulären Matrix verteilt [27]. Trotz ihrer geringen Anzahl sind sie für den Erhalt, die Organisation und im geringen Maß auch Reparatur der extrazellulären Matrix verantwortlich [28].

Eine funktionelle Einheit im Knorpelgewebe im anatomischen und mechanischen Sinne ist das sogenannte Chondron (Benninghoff, 1925 [28]). Chondrone bestehen aus einer einzelnen Zelle oder einer isogenen Zellgruppe, die jeweils von einer perizellulären Matrix umgeben sind. Die perizelluläre Matrix wiederum setzt sich aus Glykokalyx und einer umgebenden fibrilären Kapsel zusammen. An das Chondron schließt sich radial die territoriale und letztlich die interterritoriale Matrix an, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung und Struktur voneinander unterscheiden. In der perizellulären Matrix befinden sich fein verwobene Kollagenfasern, während diese in der territorialen Matrix in 10-20 nm dicken Bündeln strahlenförmig vorliegen. Die größten Fasern mit einem Durchmesser von 50-150 nm befinden sich in der interterritorialen Matrix, in der sie – wie im nächsten Abschnitt beschrieben – maßgeblich an der Struktur des hyalinen Knorpels beteiligt sind [29].

Die extrazelluläre Matrix

Neben den Chondrozyten und der interstitiellen Flüssigkeit besteht Knorpelgewebe im Wesentlichen aus den zwei festen Bestandteilen Proteoglykan und Kollagen. Die quantitative Zusammensetzung variiert zwischen verschiedenen Spezies und Individuen. Folgende Verteilung bezogen auf das Feuchtgewicht des Gewebes wurde von Kuettner *et al.* [27] für humanes Knorpelgewebe angegeben:

- 65-80% Wasser
- 10-30% Kollagene
- 5-10% Proteoglykane

Das Wasser, die Hauptkomponente des Knorpels, liegt größtenteils extrazellulär vor und kann sich frei durch das Gewebe bewegen. Nur ein sehr geringer Anteil befindet sich intrazellulär [30]. Die interstitielle Flüssigkeit im Knorpelgewebe enthält Gase, nicht-kollagenene Proteine, anorganische Salze, Lipide, Metabolite, Nährstoffe und Elektrolyte. Im Vergleich zu anderen Geweben ist die Kationen-Konzentration deutlich erhöht und die Anionen-Konzentration erniedrigt. Die Osmolarität erreicht Werte von 310-480 mOsmol·L⁻¹ [31].

Durch den Überschuss an Kationen in der interstitiellen Flüssigkeit kann eine Ladungsneutralität des Gewebes zusammen mit den negativ geladenen Proteoglykanen beibehalten werden [30]. Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern mit kovalent gebundenen sulfatisierten Glykosaminoglykanen (GAG). Gelenkknorpel ist durch das Vorkommen zweier Klassen an Proteoglykanen charakterisiert: den großen aggregierenden Proteoglykanen (Aggrecan) und den kleineren nicht-aggregierenden Proteoglykanen. Aggrecan besteht aus einem Proteinkern von 210 kDa, an den bis zu 100 Chondroitinsulfat- und bis zu 50 Keratansulfatketten gebunden sind. Abbildung 2.3 zeigt, wie sich bis zu 200 Aggrecane über eine nicht-kovalente Wechselwirkung an Hyaluronsäure anlagern können. Die Bindung wird über ein sogenanntes Linkprotein stabilisiert. Zu den nicht-aggregierenden Proteoglykanen gehören dagegen Moleküle wie Decorin, Biglykan oder Fibromodulin, die nicht mit Hyaluronsäure interagieren [27, 32, 33]. Sie haben unter anderem die Aufgabe, Verbindungen zwischen den Bestandteilen des Knorpels herzustellen und somit die extrazelluläre Matrix zu stabilisieren [34].

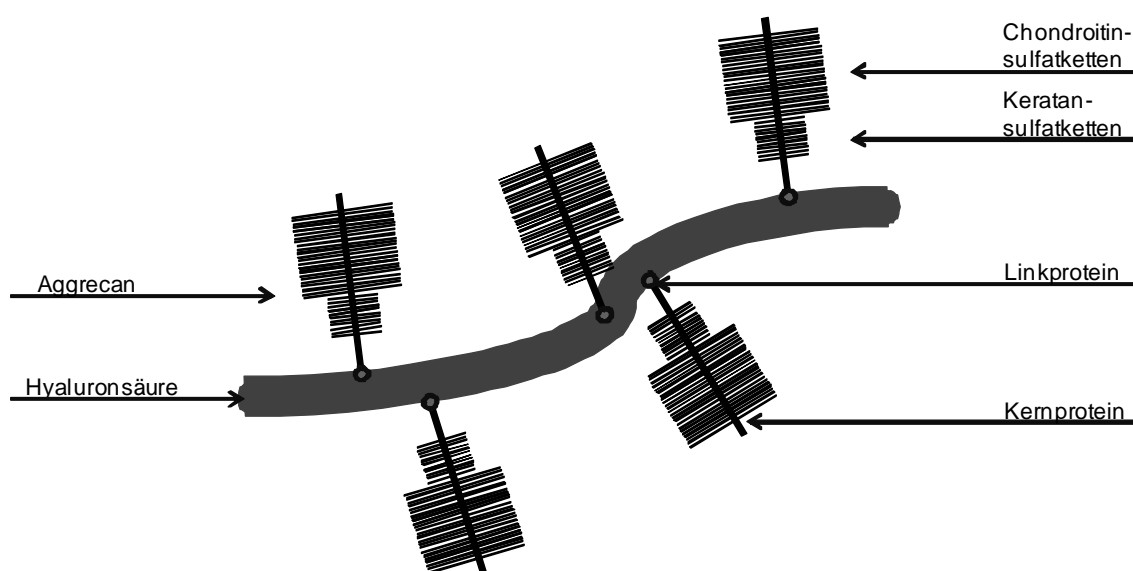


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der aggregierenden Proteoglykane in der extrazellulären Matrix von hyalinem Knorpel. Die Proteoglykane sind von einem Kollagenetzwerk umgeben (modifiziert nach [33]).

Durch die hohe negative Ladungsdichte der Sulfat- und Carboxylgruppen der Glykosaminoglykane und durch den osmotischen Druck (Donnan-Druck), der angesichts der hohen Kationenkonzentration entsteht, wird Wasser in das Gewebe eingelagert. Dem resultierenden Schwelldruck wirkt das Kollagennetzwerk entgegen. Kollagene stellen den größten Proteinanteil im hyalinen Knorpel dar. Sie bestehen aus drei α -Ketten, die aufgrund ihrer Stereochemie jeweils in einer linksgewundenen α -Helix vorliegen. Diese Ketten bilden in ihrer Tertiärstruktur eine rechtsgewundene Superhelix aus, die ihnen im nativen Zustand ihre zugeresistenten Eigenschaften verleiht (Abschnitt 2.1.3). Die Kollagene formen unter physiologischen Bedingungen quervernetzte Fibrillen, die sich wiederum zu dickeren Kollagenfasern zusammenlagern. Mit 80-85% des Gesamtkollagen-Gehaltes bildet Kollagen Typ II das Stützwerk des Kollagennetzwerkes im Gelenkknorpel. Auch Kollagen Typ IX und Typ XI lagern sich in diesem Netzwerk in Form von Fibrillen ein. Dabei wird dem Kollagen Typ IX die Rolle der Quervernetzung zugesprochen. Desweiteren wurden Kollagenfibrillen des Typs VI perizellulär in den Chondronen und des Typs X im hypertrophen Knorpel gefunden [27, 28, 35].

Struktur des Gelenkknorpels

Der heterogen aufgebaute Knorpel kann in die vier Zonen oberflächliche Zone, mittlere Zone (Tangentialzone), tiefe Zone (Radiärzone) und kalzifizierte Zone unterteilt werden (Abbildung 2.4 a) [36]. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Zellmorphologie und in den biochemischen und biomechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix. So sinkt die Wasserkonzentration im Gewebe von 80% in der oberflächlichen Zone auf 65% in der tiefen Zone und die Zellzahl auf die Hälfte, während die Proteoglykan-Konzentration steigt. Die oberflächliche Zone ist die dünnste Zone im Gelenkknorpel. Die Kollagenfasern sind parallel zur Oberfläche angeordnet und die Zellen liegen abgeflacht vor (Abbildung 2.4 b). In der mittleren Zone befinden sich kugelförmige Chondrozyten, denen aufgrund einer höheren Anzahl an Zellorganellen eine größere Bedeutung in der Matrixsynthese zugesprochen wird. Die Kollagenfasern sind ungleichmäßiger angeordnet. Die Zellen der tiefen Zone sind abgerundet und in Säulen übereinander gruppiert (Abbildung 2.4 c). Hier befinden sich die Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche. Abgegrenzt über die *Tidemark* schließt sich die kalzifizierte Zone an. Die kalzifizierte Zone stellt den Übergang von Knorpel zu Knochen dar, die an der *Cementline* über Kollagenfasern fest ineinander verankert sind. Die höhere Festigkeit der kalzifizierten Zone wird durch Einlagerung von Calciumphosphaten erzeugt. Die Chondrozyten liegen abgerundet in einer nicht-kalzifizierten Höhle [28, 32, 37].

Es konnte festgestellt werden, dass fötales equines Knorpelgewebe zunächst homogen vorliegt. Direkt nach der Geburt startete dann die Anpassung an die funktionellen

Anforderungen, die knorpelspezifischen Zonen wurden ausgebildet und die Belastbarkeit des Knorpels stieg [38].

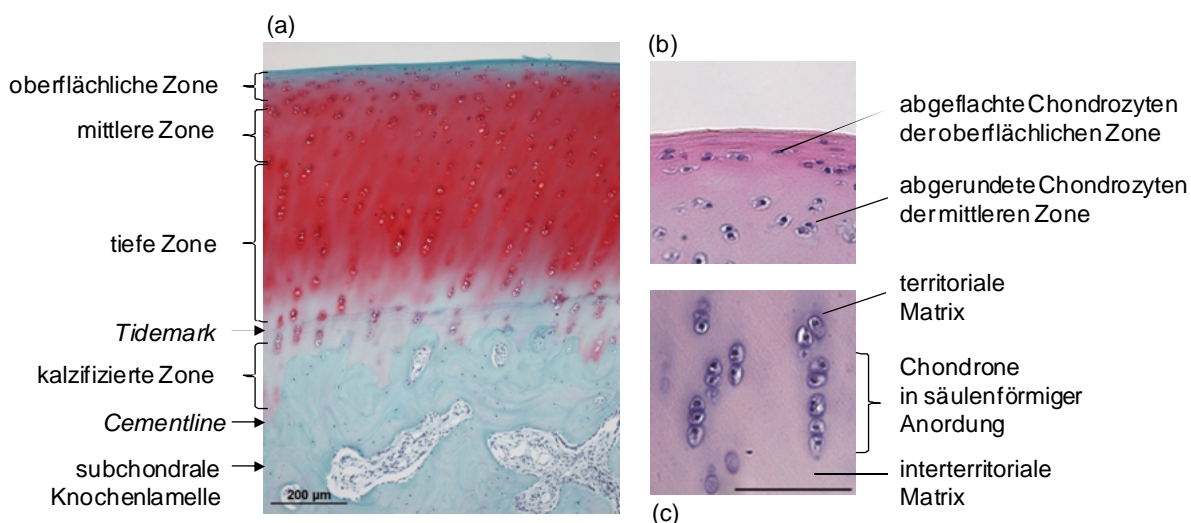


Abbildung 2.4: Aufbau des Gelenkknorpels (*Minipig*): (a) Zonen des Gelenkknorpels (Safranin O-/Fast-Green-Färbung), (b) Anordnung der Chondrone in der oberflächlichen und mittleren Zone, (c) Anordnung der Chondrone in der tiefen Zone (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Skala 200 µm, modifiziert nach [39]).

Physiologie des Gelenkknorpels

Zur Aufrechterhaltung der Funktionen ist ein ständig ausgeglichener Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix durch Chondrozyten im Knorpel unerlässlich. Aufgrund der Avaskularität ist die gelöste Sauerstoffkonzentration im Gewebe gering (4-10% in der Synovialflüssigkeit und an der Knorpeloberfläche und 1% in der tiefen Zone) [20, 40]. Etwa 95% des Metabolismus verlaufen anaerob, so dass große Mengen an Laktat entstehen [41, 42]. Der pH-Wert der extrazellulären Matrix liegt zwischen 6,9 in der tiefen Zone und 7,1-7,3 in der oberflächlichen Zone [31].

Nährstoffe müssen aus der Synovialflüssigkeit oder der subchondralen Region über Diffusion in das Gewebe transportiert werden. Die Synovialflüssigkeit ist eine transparente, alkalische, viskose Flüssigkeit, die von der Innenhaut der Gelenkkapsel (*Membrana synovialis capsulae*) stammt. Im humanen Knie liegen 1-5 mL dieser Flüssigkeit vor, die aus einem Dialysat des Blutplasmas ohne Gerinnungsfaktoren, Erythrozyten und Hämoglobin besteht [34]. Zusätzlich enthält sie Hyaluronsäure und Glykoproteine [20]. Die Ernährung des Knorpels wird durch erzwungene Konvektion unterstützt. Dieser Flüssigkeitsstrom entsteht in Gelenken durch Belastung [31, 32]. Eine nähere Erläuterung dieser Vorgänge folgt in Abschnitt 2.2.3. Desweiteren konnten mittlerweile Gefäße im subchondralen Knochen nachgewiesen werden [36, 43], die teilweise bis in den hyalinen Knorpel reichen. Die Perfusion in diesen Gefäßen kann rechnerisch bis zu 50% des Nährstoff-, Gas- und Wasserhaushaltes des Knorpels bereitstellen.

2.1.3 Biomechanik des Gelenkknorpels

Die Hauptaufgaben des Gelenkknorpels sind die Bereitstellung einer reibungsarmen Oberfläche, so dass ungestörte und schmerzfreie Bewegungen mit geringer Wärmeentwicklung und geringem Materialverlust ermöglicht werden, und die Reduzierung von Belastungen auf den subchondralen Knochen, indem durch Deformation des Knorpels die Kräfte über die Oberfläche verteilt werden [44, 45]. Die biomechanischen Eigenschaften hängen von der Zusammensetzung und Organisation der extrazellulären Matrix ab. Infolgedessen variieren diese in den verschiedenen Zonen und in verschiedene Richtungen stark und der Knorpel zeigt anisotrope Materialeigenschaften. Im Folgenden werden die Vorgänge im Knorpel unter Belastung und die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels beschrieben.

Vorgänge im Gelenkknorpel unter Belastung

In Tabelle 2.2 sind die Kräfte in den verschiedenen knorpelspezifischen Zonen, die *in situ* im Gelenkknorpel auftreten, zusammengefasst und werden im Folgenden erläutert [46].

Tabelle 2.2: Mechanische Umgebung im artikulären Knorpel in den verschiedenen Zonen unter intermittierender Kompressionskraft (schwarz – Druck, blau – Flüssigkeitsstrom, rot – Scherkraft, [46]).

Zone	Mechanische Umgebung der Zellen (schematisch)	Mechanische Umgebung der Zellen
oberflächliche Zone		<ul style="list-style-type: none"> • großer Flüssigkeitsstrom • Flüssigkeitsdruck • hohe Kompression (Verdichtung der Matrix) • Scherkräfte
mittlere Zone		<ul style="list-style-type: none"> • mittlerer Flüssigkeitsstrom • hauptsächlich Flüssigkeitsdruck • mittelmäßige Kompression (Verdichtung der Matrix)
tiefe Zone		<ul style="list-style-type: none"> • geringer Flüssigkeitsstrom • Flüssigkeitsdruck • kleine Kompression (geringe Verdichtung der Matrix)
kalzifizierte Zone		<ul style="list-style-type: none"> • kein Flüssigkeitsstrom • Flüssigkeitsdruck • keine Kompression • Scherkräfte

Kompressionskräfte wirken auf den Knorpel, wenn zwei gegenüberliegende Oberflächen in Kontakt kommen. Im Kniegelenk handelt es sich dabei entweder um den direkten Kontakt zwischen dem Knorpelgewebe des Femurs und der Tibia, zwischen den Menisken und einer Knorpeloberfläche oder um einen dünnen Flüssigkeitsfilm, der sich zwischen den Oberflächen befindet. In der Kontaktzone innerhalb des Knorpels entsteht in der interstitiellen Flüssigkeit Druck. Auf diese Weise werden die aufbrachten Kräfte bis zum subchondralen Knochen transportiert. Bei länger andauernder Kompression fließt durch den Druckgradienten die interstitielle Flüssigkeit aus der tiefen, mittleren und oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels tangential von der Kontaktzone weg (Abbildung 2.5). Die extrazelluläre Matrix bildet einen Widerstand entgegen der Flüssigkeitsbewegung. Die Matrix wird von der Kontaktzone weggedrängt, so dass Spannungen innerhalb des Gewebes entstehen. In der oberflächlichen Zone werden die Proteoglykane zusammengedrückt, die negative Ladungsdichte erhöht sich und die Permeabilität sinkt, so dass die Flüssigkeit nur am Rande der Belastungszone aus dem Knorpel austreten kann. Wie die Abbildung 2.5 zeigt, wölbt sich durch den Flüssigkeitsaustritt und durch die Streckung der Kollagene in der oberflächlichen Zone die Oberfläche des Knorpels am Rand der Belastungszone auf. Dieses hat zur Folge, dass auch senkrecht zur Oberfläche Spannungen im Gewebe auftreten, die den Knorpel vom subchondralen Knochen wegdrücken. Entsprechend dieser Beanspruchungen sind die Kollagenfasern in der tiefen Zone senkrecht angeordnet und reichen bis in die kalzifizierte Zone hinein (siehe Abschnitt 2.1.2) [32, 44]. Durch das Aufbringen von statischen Kräften deformiert sich der Knorpel infolge der Flüssigkeitsbewegung (Kriechen des Knorpels), so dass sich die Kontaktoberfläche vergrößert und sich damit der Druck im Gewebe ändert.



Abbildung 2.5: Darstellung der Flüssigkeitsbewegung in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels unter Kompression (nach [32], mit Genehmigung des Wiley-VCH Verlags).

Wie unter 2.1.1 beschrieben ist eine weitere Form der Belastung auf den Knorpel die Scherkraft, die durch Roll- und Gleit-Bewegungen entsteht. In der oberflächlichen Zone des Knorpels ergeben sich parallel zur Oberfläche Kräfte, die sich als Scherung bis zum subchondralen Knochen fortpflanzen können. Diesen Kräften in der oberflächlichen Zone können die parallel angeordneten Kollagenfasern, die längs der Bewegungsrichtung des Knies gerichtet sind, entgegen wirken. Die Reibung zwischen

den Knorpeloberflächen mit einer Rauigkeit R_a von 1-6 μm wird durch die nicht-newtonsche Synovialflüssigkeit, die einen Film zwischen den Oberflächen bildet, auf einen Wert von $\mu = 0,005-0,01$ für den Reibungskoeffizienten reduziert. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, vermutlich ist das Glykoprotein Lubricin (auch *Superficial Zone Protein*) für die verbesserten Reibeigenschaften verantwortlich [14, 19, 34].

Im Folgenden werden die biomechanischen Eigenschaften und die Auswirkung der im Gelenkknorpel wirkenden Kräfte auf die Matrixbestandteile beschrieben.

Eigenschaften des Gelenkknorpels unter Zug und Scherung

Durch Scherkräfte an der Knorpeloberfläche entstehen Zugspannungen in der oberflächlichen Zone [32]. Der Widerstand des Knorpels gegenüber Zugkräften ist von der Krafrichtung in Bezug auf die Orientierung der Kollagenfasern abhängig. So kann in der oberflächlichen Zone etwa die drei- bis siebenfache Kraft parallel zur Kollagenfaserausrichtung im Vergleich zur normalen Ausübung aufgenommen werden [32, 47]. Wie Abbildung 2.6 zeigt, ist das Verhalten nicht linear. Die anfängliche große Dehnung bei geringer Kraftaufwendung kann durch das Geradeziehen der Spiralstruktur der Kollagenfasern erklärt werden, der sich anschließende lineare Bereich durch das Strecken der Fasern. Der Zugmodul nimmt mit der Tiefe im Knorpel ab (10-4 MPa) [13].

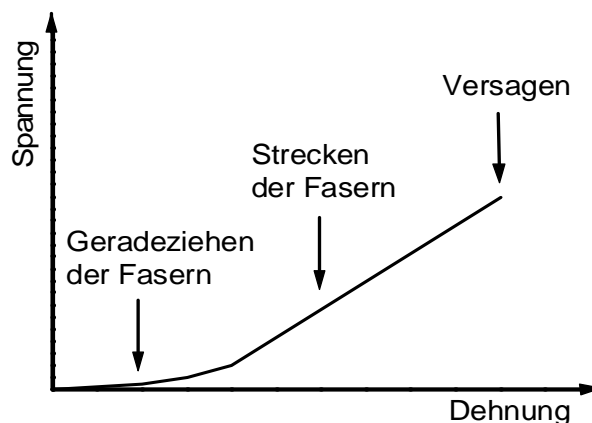


Abbildung 2.6: Spannungs-Dehnungs-Kurve für artikulären Knorpel in der oberflächlichen Zone. Das Verhalten lässt sich anhand der Struktur der Kollagenfasern erklären, die einen großen Teil der aufgebrauchten Scherkräfte aufnehmen (modifiziert nach [19]).

Die Eigenschaften des Knorpels unter Scherung beruhen ebenfalls auf den festen Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Kollagenfasern werden – wie beschrieben – bis zum Gleichgewichtszustand unter Spannung gesetzt und die Proteoglykane so verschoben, dass sie der Deformation entgegenwirken [32]. Das Gleichgewicht ist von den Eigenschaften der Kollagenfasern selbst, dem Grad der Vernetzung und den Wechselwirkungen zwischen Kollagenfasern und Proteoglykanen abhängig [47]. Bei

reiner Scherung entstehen keine Druckgradienten und damit keine Flüssigkeitsbewegung im Gewebe.

Eigenschaften des Gelenkknorpels unter Kompression

Im Wesentlichen sind die Eigenschaften der Proteoglykane, aber auch die des Kollagenetzwerkes für das Verhalten unter Kompression maßgeblich. Aufgrund ihrer negativen Ladungsdichte (*fixed negative charge density*) ziehen die Proteoglykane Kationen und Wasser an [48]. Die Einlagerung von Wasser ins Gewebe wird zusätzlich durch den resultierenden Donnan-Druck unterstützt. Der Schwelldruck beträgt im Ruhezustand ungefähr 0,2 MPa und wird durch die Kollagene im Gleichgewicht gehalten [20]. Mit dem steigenden Proteoglykan-Gehalt und sinkendem Wassergehalt in der tiefen Zone nimmt auch die Steifigkeit im Vergleich zur oberflächlichen und mittleren Zone zu. Im bovinen Knorpel wurde ein Anstieg des E-Moduls von 0,08 MPa in der oberflächlichen Zone bis 2,1 MPa in der tiefen Zone gemessen [49]. Um aber den kurzzeitigen Spitzendrücken von bis zu 20 MPa im Kniegelenk standzuhalten, wird ein großer Anteil der Belastung über die interstitielle Flüssigkeit des Knorpels aufgenommen [13]. Die genauen Vorgänge werden im Folgenden unter Zuhilfenahme der biphasischen Theorie beschrieben [13, 32, 50].

Viskoelastische Eigenschaften des Knorpels

Etlche theoretische Modelle zur Beschreibung des biomechanischen Verhaltens von Knorpel wurden in den letzten 30-40 Jahren erstellt. Die ersten Theorien fassten den Knorpel als isotropes und elastisches Material auf und konnten diesen damit nur im Gleichgewichtszustand darstellen. Im nächsten Schritt wurde die isotrope, biphasische Theorie aufgestellt, die die Zeitabhängigkeit bei der Reaktion von Knorpel auf Belastung beschreiben konnte. Diese Theorie wurde im weiteren Verlauf mit poroviskoelastischen, faserverstärkten poroelastischen oder linear elastischen Modellen ergänzt [50]. Weiterhin wurde die biphasische Theorie auf eine triphasische Theorie erweitert, die zusätzlich Einflüsse der Ladungsdichten, des Donnan-Druckes und des resultierenden Schwelldruckes im Knorpel berücksichtigt.

In dieser Arbeit wird die biphasische, viskoelastische Theorie von Mow *et al.* aus den 80er Jahren beschrieben, die bis heute als Grundlage für verschiedene Simulationen verwendet wird [30, 44, 50, 51]. Dabei wird die feste Phase von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie den Proteoglykanen und Kollagenen gebildet, die flüssige Phase von der frei beweglichen interstitiellen Flüssigkeit (Wasser und gelöste Ionen). Die Inkompessibilität jeder einzelnen Phase wird vorausgesetzt, die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels entstehen infolge der Flüssigkeitsbewegung durch die poröse feste Matrix unter Belastung. Die Flüssigkeitsbewegung wiederum ist abhängig von der Permeabilität (10^{-15} - 10^{-16} $\text{m}^4 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), die bei großer Kompression abnimmt, da

der Verlust der Flüssigkeit aus dem Gewebe und die Komprimierung der Proteoglykane zu einer Verdichtung der Matrix führen. Der Kehrwert des Permeabilitätskoeffizienten gibt den Widerstand der festen Phase gegen die Flüssigkeitsbewegung an, so dass in den Zonen hoher Proteoglykan-Konzentrationen wie in der tiefen Zone die Permeabilität im Vergleich zur oberflächlichen Zone gering ist [32].

Eine mechanische Belastung des Gelenkknorpels wird also auf die feste Matrix und deren Widerstand entgegen des Flüssigkeitsstroms verteilt. Bei schnellen Bewegungen und einer kurzfristigen Lastbeaufschlagung kommt es kaum zu einer Flüssigkeitsbewegung, Flüssigkeitsdruck entsteht im Gewebe, die Dehnung ε in Gleichung 2.1 ist anfangs gering und damit der E-Modul hoch.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (2.1)$$

mit E – E-Modul [MPa]
 σ – Belastung [MPa]
 ε – Dehnung [$\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$].

Park *et al.* bestimmten den Anteil der Lastübernahme durch das Fluid in den ersten 100 Sekunden im humanen Knorpel auf $79 \pm 11\%$ in der oberflächlichen Zone und $69 \pm 15\%$ in der tiefen Zone (Abbildung 2.7) [52]. Bei der sich anschließenden Verformung tritt die Flüssigkeit bis zum Gleichgewichtszustand aus dem Gewebe aus, die Dehnung des Knorpels nimmt zu und der E-Modul sinkt [44]. Der Gleichgewichtszustand ist erreicht, wenn die Lastübernahme durch das Fluid auf 0% gesunken ist, demnach kein Flüssigkeitsstrom im Gewebe mehr auftritt und sich die aufgebrachte Kraft mit den entstandenen Spannungen in der extrazellulären Matrix (osmotischer Druck, Wechselwirkung zwischen den Makromolekülen) im Gleichgewicht befindet [19, 32, 48].

Charakteristisch für den Knorpel als viskoelastisches Material sind also das Kriechen unter konstanter Belastung und das Spannungs-Relaxations-Verhalten unter konstanter Kompression [19, 32]. Als Kriechen wird die zeitverzögerte Verformung des Knorpels unter konstanter Last bezeichnet, die durch den Widerstand der festen Matrix entgegen der Flüssigkeitsströmung verursacht wird (Abbildung 2.8, (1)). Zur Bestimmung des Spannungs-Relaxations-Verhaltens wird der Knorpel um einen bestimmten Prozentsatz komprimiert und die dazu nötige Kraft gemessen. Die Kraft sinkt mit der Zeit, da die Lastübernahme des Fluids aufgrund der Flüssigkeitsbewegung abnimmt. Zunächst findet ein Austritt der Flüssigkeit, dann eine Umverteilung der restlichen Flüssigkeit im Gewebe statt (Abbildung 2.8, (2)).

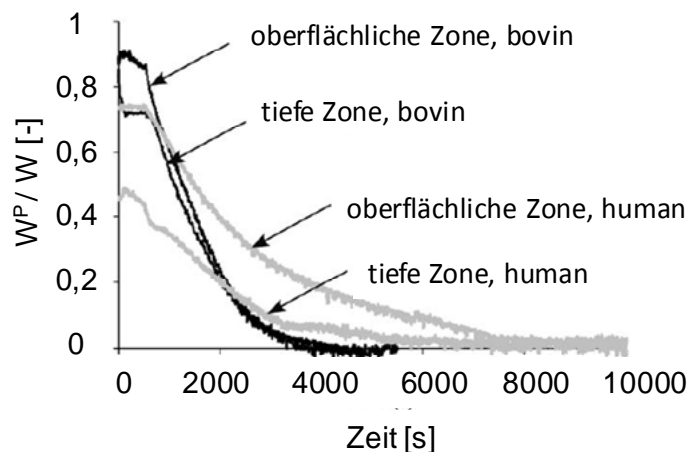


Abbildung 2.7: Lastverteilung zwischen der flüssigen und der festen Phase in Abhängigkeit von der Zeit im humanen und bovinen Gelenkknorpel (Abkürzungen: W^P – Belastung, die über die Flüssigkeit aufgenommen wird, W – Gesamtbelastung, nach [52] mit Genehmigung des Elsevier Verlags).

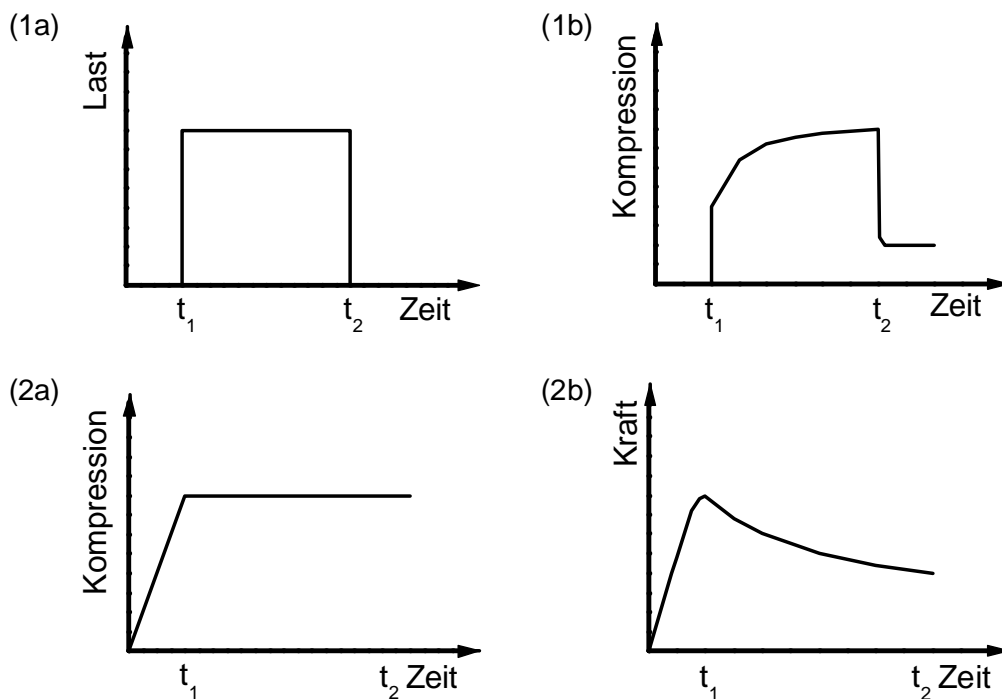


Abbildung 2.8: Oben: Schematische Darstellung des Kriech-Verhaltens von artikulärem Knorpel. Bei konstanter Last (1a) ergibt sich eine zeitverzögerte Verformung des Knorpels (1b). Unten: Schematische Darstellung des Spannungs-Relaxations-Verhaltens von artikulärem Knorpel. Bei konstanter Kompression (2a) wird die Kraft (2b) gemessen (nach [32] mit Genehmigung des Wiley-VHC Verlags).

2.2 Knorpeldefekte und Therapiemöglichkeiten

Gegenstand dieses Kapitels ist die Entstehung von Knorpeldefekten und deren aktuelle Möglichkeiten zur Therapie, die aufgrund des geringen Potentials des Knorpels zur Selbstregeneration ein großes medizinisches Problem darstellen. Derzeit werden vielversprechende Ansätze unter Verwendung von *Tissue Engineering* Methoden er-

forscht, die aktuell aber noch keine vollständig zufriedenstellenden Ergebnisse liefern [53]. Eine Strategie zur Herstellung von osteochondralen Implantaten, die auch dieser Arbeit zugrunde liegt, wurde am UKE entwickelt und an der TUHH weiterverfolgt.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem aus Belastung resultierenden Druck im Gewebe und der Wirkung von aufgebrachtener Druckbelastung auf *in vitro* Knorpel. Daher werden die Reaktionen von Chondrozyten auf Druck und spezielle Bioreaktoren zum Aufbringen hydrodynamischer und hydrostatischer Druckbelastung auf Knorpel-Konstrukte dargestellt.

2.2.1 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Entstehung von Knorpeldefekten

Knorpelschäden können durch traumatische Verletzungen, Tumore oder degenerative Gelenkerkrankungen wie die Arthrose (OA) und rheumatische Arthritis (RA) entstehen. Dabei ist die Arthrose die am weitesten verbreitete Ursache für Knorpeldefekte. In den USA sind etwa 15% der Gesamtbevölkerung und der größte Anteil der Bevölkerung über 60 Jahren betroffen [7, 54, 55]. Es wird prognostiziert, dass im Jahr 2020 über 22% der Gesamtbevölkerung erkrankt sein werden. Die rheumatische Arthritis betrifft etwa 1% der Weltbevölkerung [5].

Die spontane Heilung von Knorpeldefekten ist in der Regel stark begrenzt und Schmerzen und eingeschränkte Bewegungsmöglichkeiten sind die Folge [53, 56]. Kleine Verletzungen an der Knorpeloberfläche (oberflächliche Verletzung) führen zu einem fortschreitenden Verlust an Proteoglykanen und zu Rissen im Kollagenetzwerk, so dass der Defekt in seinen Ausmaßen wächst. Wenn der Knorpel über seine gesamte Höhe beschädigt ist, wird die Verletzung als *Full Thickness* Defekt bezeichnet. Ist der subchondrale Knochen mit Verletzung der Knochenlamelle betroffen (osteochondrale Verletzung), wandern mesenchymale Progenitorzellen aus dem Knochenmark ein und bilden Faserknorpel, der aufgrund des vorrangigen Vorkommens von Kollagen Typ I den Belastungen in den Gelenken nicht standhalten kann [7, 53, 57].

Die Arthrose ist eine chronische nichtentzündliche Gelenkerkrankung, die unter anderem durch Überbelastung (zum Beispiel durch Übergewicht oder Leistungssport), durch Traumata oder Fehlstellung des Gelenkes zu einem überdurchschnittlichen Verschleiß der Gelenkoberflächen führt [1, 3, 58]. Es wird vermutet, dass das häufige Vorkommen von Arthrose im Kniegelenk auf die schnelle evolutionäre Entwicklung der menschlichen Körperhaltung zurückzuführen ist [58]. Desweiteren können bakterielle Infektionen oder neuronale, metabolische und endokrine Erkrankungen eine sogenannte sekundäre Arthrose zur Folge haben.

Bei der rheumatischen Arthritis handelt es sich um eine entzündliche Gelenkerkrankung ausgelöst durch Autoimmunprozesse des Körpers. Charakteristisch für die RA ist die Produktion des inflammatorischen Zytokins IL-1 und von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) durch die Chondrozyten [8].

Therapieansätze zur Behandlung von Knorpeldefekten

Bereits 1743 stellte der Wissenschaftler W. Hunter fest, dass „die Verletzung des Knorpels eine mühselige Krankheit und die Heilung sehr viel schwieriger als bei verletztem Knochen sei“ [3]. Unterteilt werden die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten in konventionelle und Gelenk erhaltende chirurgische Therapien. Eine Endoprothese bietet sich wegen ihrer nicht allzu langen Lebensdauer von 10-20 Jahren erst ab einem Alter von 65 Jahren an [56]. Seitdem hat es also vor allem bei jüngeren Patienten viele verschiedene Versuche gegeben, das geschädigte Knorpelgewebe zu reparieren – mit größtenteils unzureichenden Ergebnissen. Nachfolgend werden einige Beispiele für Therapiemöglichkeiten bei Knorpeldefekten sowie deren Limitierungen aufgeführt.

Konventionelle Therapieansätze umfassen Methoden wie: (a) die Behandlung mit Chondroprotektiva, bei der Glykosamine, Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure verabreicht werden; (b) die arthroskopische *Lavage*, bei der das Gelenk mit einer Kochsalzlösung von Entzündungsfaktoren und Zelldebris freigespült wird; (c) das arthroskopische *Shaving* und *Débridement*, bei denen mechanische Barrieren im Gelenk, zum Beispiel Knorpelstückchen oder Fibrinkoagulate, entfernt werden; (d) die arthroskopische Laserabrasion, bei der Laser zum Abschneiden der erwähnten mechanischen Barrieren verwendet werden. Es muss angemerkt werden, dass diese Techniken nicht zu einer Knorpelregeneration und nur zu einer Reduktion der Symptome für eine gewisse Zeitspanne führen. Daher sind sie nicht für jüngere Patienten angezeigt [3, 53, 59, 60].

Bei großflächigen Knorpelschäden, bei denen die Knochenlamelle nicht beeinträchtigt ist, werden seit den 80er Jahren knochenmarkstimulierende Techniken, die meist zur Faserknorpelsynthese und damit unzureichenden biomechanischen Eigenschaften führen, angewendet. Die folgenden Methoden fördern durch Öffnen der Knochenlamelle das Eintreten von Blut mit mesenchymalen Zellen und Wachstumsfaktoren in den Defekt: (a) bei der nach dem Erfinder benannten Pridie-Bohrung werden mehrere Löcher mit einem Durchmesser von 1,5 mm in den subchondralen Knochen gebohrt; (b) bei der sogenannten Mikrofrakturierung wird der subchondrale Knochen mit konischen Einstichen verletzt, so dass feine Risse zwischen den einzelnen Einstichen entstehen [3, 53].

Desweiteren werden Transplantationsmethoden zur Behandlung von osteochondralen Defekten eingesetzt: (a) die autologe osteochondrale Transplantation (AOT) impliziert die Transplantation eines Knorpel-Knochen-Zylinders aus einer unbelasteten Region des Gelenkes in den ausgebohrten Defekt; (b) die Mosaikplastik – eine Variante der AOT – wird angewendet, um größere Defekte mit mehreren Knorpel-Knochen-Zylindern aufzufüllen; (c) bei der allogenen Transplantation werden Knorpel-Knochen-Zylinder eines Spenders verwendet; (d) desweiteren können auch Materialien aus dem Periost der Tibia und dem Perichondrium des Rippenknorpels transplantiert werden [3, 53, 61]. Bei Anwendung der AOT oder Mosaikplastik entstehen neue Defektstellen an der Spenderstelle, die allogene Transplantation birgt Infektions- und Abstoßungsrisiken und die Transplantation aus dem Periost oder dem Perichondrium führt häufig nur zu einer unvollständigen Heilung des Knorpelgewebes.

Eine restlose Regeneration würde die Bildung einer neuen Gelenkoberfläche verlangen, die im Wesentlichen dem originalen hyalinen Knorpel gleichkommt [59]. Generell ist es bisher aber nicht gelungen, Knorpel vollständig in seiner Struktur und Zusammensetzung zu reparieren, so dass er den biomechanischen Ansprüchen des Alltags dauerhaft genügt. Zurzeit gibt es daher kein allgemein anerkanntes Verfahren, das als Stand der Technik zu bezeichnen wäre. Je nach Art und Größe des Defektes, Zustand des Gelenkes und des Patienten werden verschiedene Therapien gewählt. Beispielsweise liefert die Mikrofrakturierung bei Kindern mit einem Knorpeldefekt, der kleiner als 2 cm^2 ist, gute Ergebnisse. Neue Behandlungsmöglichkeiten bietet die Herstellung von Knorpelimplantaten *in vitro* mit Methoden des *Tissue Engineering*. Häufig werden inzwischen schon bei einem Defekt mit einer Größe von $2,5\text{-}10\text{ cm}^2$ matrixgestützte autologe Chondrozytenimplantate (MACI[®]) verwendet, die im nächsten Abschnitt 2.2.2 „*Tissue Engineering*: Ansätze zur Knorpelheilung“ eingeführt werden. Entzündliche oder genetisch bedingte Gelenkerkrankungen gelten meist als Ausschlusskriterium für Therapien, die auf den Methoden des *Tissue Engineering* beruhen [60]. Ursachen der Erkrankung wie Fehlstellungen der Knochen oder Übergewicht müssen gegebenenfalls parallel behandelt werden.

2.2.2 *Tissue Engineering*: Ansätze zur Knorpelheilung

Die Verwendung von *Tissue Engineering* Methoden zur Rekonstruktion der Gelenkoberfläche hat in den letzten Jahren erfolgversprechende Ergebnisse geliefert. Größtenteils sind die Ansätze aber noch im Entwicklungsstadium, nur wenige Methoden wie beispielsweise der Einsatz eines MACI[®] (siehe unten) befinden sich bereits in der klinischen Anwendung [53, 62].

Knorpel galt bisher aufgrund seiner Avasularität und des Vorkommens eines einzigen Zelltyps als „einfaches Gewebe“, so dass es für *Tissue Engineering* Ansätze vielver-

sprechend erschien. Dennoch haben sich in den letzten Jahren Schwierigkeiten gezeigt: Die Herstellung von Knorpelgewebe im Labor konnte zwar realisiert werden, aber die gewünschten biomechanischen Eigenschaften wurden oftmals nicht erreicht. Dieses lässt sich auf die komplexe Organisation des Gewebes zurückführen [62]. *In vitro* konnte bisher keine ausreichende Ausrichtung der Kollagenfasern und keine dem nativen Knorpel entsprechende Zusammensetzung der verschiedenen Zonen beobachtet werden. Lösungen werden nun unter anderem über die Verwendung von Bioreaktoren zur Aufbringung von Belastung während der Kultivierung (Kapitel 2.2.4) gesucht.

Wie in Tabelle 2.3 dargestellt ist, kann die *in vitro* Herstellung von Knorpelgewebe in verschiedene Entwicklungsstadien eingeteilt werden [8]. Den ersten Versuch im Jahr 1987 haben Brittberg *et al.* [63] mit der Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) unternommen. Bei der ACT werden autologe Chondrozyten entnommen, *in vitro* vermehrt und unter einem Periostlappen implantiert. Inzwischen zeigen Ergebnisse aus einer 20-jährigen Anwendung, dass bei 80% der Patienten, deren Defekt zur Behandlung vorgegebene Indikationen erfüllen musste, eine subjektive und objektive Verbesserung zu verzeichnen war. Eine Weiterentwicklung der ACT stellt die Verwendung eines MACI[®] (*Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implant*, zum Beispiel von Genzyme, Australien) dar, das zusammen mit Zellen und fallweise mit Wachstumsfaktoren implantiert wird. Auf diese Weise soll – wie bei der ACT – *in vivo* eine Regeneration des Gewebes eingeleitet werden, die nach der Implantation jedoch nur noch begrenzt beeinflussbar ist. In der zweiten Generation werden zurzeit osteochondrale Implantate entwickelt, bei denen die Differenzierung der Zellen und die Bereitstellung der biomechanischen Funktionalität des Implantats bereits *in vitro* erfolgen sollen. In Zukunft wird angestrebt, Trägermaterialien und bioaktive Faktoren so gezielt in den Defekt einzusetzen, dass eine Regeneration *in vivo* stimuliert wird (3. Generation). Dieses setzt allerdings ein umfassendes Verständnis der Prozesse im Knorpelgewebe voraus, die zurzeit aber noch nicht ausreichend erforscht sind.

Tabelle 2.3: Entwicklungsschritte der *in vitro* Herstellung von Knorpelgewebe [8].

	1. Generation (heute)	2. Generation (in der Entwicklung)	3. Generation (Zukunft)
Ansatz	Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)	3D-Konstrukte, osteochondrale Implantate	<i>In vivo</i> Regeneration
Komponenten	Periostlappen	Biomaterial, bioaktive Faktoren	Biomaterial, bioaktive Faktoren

Mehrere Arbeitsgruppen [64-66] beschäftigen sich damit, patienteneigene Zellen mit einem dreidimensionalen Trägermaterial zu einem osteochondralen Implantat zu kombinieren. Anstatt einen Knorpel-Knochen-Zylinder wie bei der AOT aus einer unbe-

lasteten Zone des Gelenkes zu entnehmen und damit eine neue Defektstelle zu erzeugen, werden die zwei Gewebephasen *in vitro* konstruiert. Allgemein bieten sich dafür, wie in Abbildung 2.9 dargestellt ist, vier verschiedene Strategien an: (a) es wird ein Träger für die Knochenphase, aber kein Träger für die Knorpelphase verwendet; (b) es werden verschiedene Träger für die Knochen- und Knorpelphase eingesetzt, die erst bei der Transplantation verbunden werden; (c) es wird nur ein Träger, der sich aber in der Struktur und/oder Zusammensetzung für die Knochen- und Knorpelphase unterscheidet, verwendet; (d) es wird ein homogener Träger für beide Phasen benutzt.

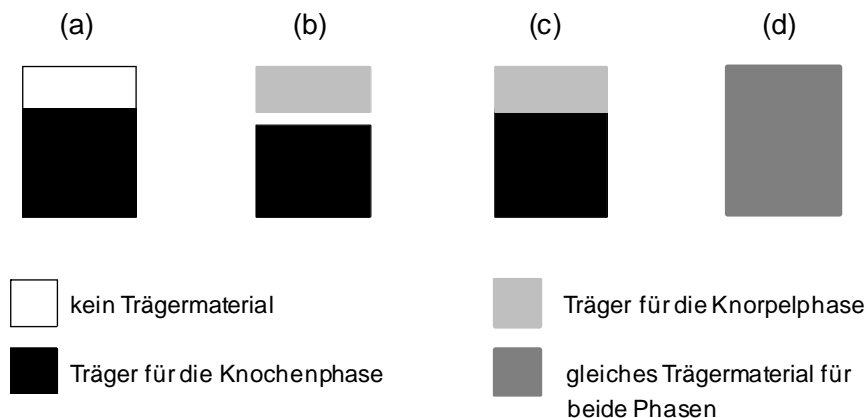


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung verschiedener Kultivierungsstrategien zur Herstellung von osteochondralen Implantaten (modifiziert nach [64]).

Das Kultivierungsprinzip, auf dem diese Arbeit basiert, lässt sich in die zweite Generation der osteochondralen Implantate eingliedern. Das Konzept in Abbildung 2.10 wurde am UKE von Prof. Dr. N. Meenen (ehemals Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie), Priv.-Doz. Dr. P. Adamietz und Dr. C. Goepfert (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie) entwickelt [9, 67, 68]. Die osteochondralen Implantate bestehen aus einem keramischen Träger als Knochenersatzmaterial, auf dem eine Schicht Knorpel ohne Träger kultiviert werden soll (Strategie (a) in Abbildung 2.9). Das Konzept kombiniert die Vorteile der AOT und ACT, indem ein dreidimensionales Knorpel-Konstrukt aus einer autologen Biopsie entsteht. Die *in vitro* Herstellung der Implantate soll kontrollierte Proliferations-, Differenzierungs- und Matrixproduktionsphasen erlauben [3].

Zunächst wird arthroskopisch eine Biopsie aus dem verletzten Knorpel entnommen (Abbildung 2.10). Nach einer enzymatischen Isolierung werden die Chondrozyten bis zum Vorliegen einer ausreichenden Zellzahl in einer Monolayerkultur vermehrt (Schritt a). Dann wird ein Teil der dedifferenzierten Zellen auf dem Trägermaterial zur Bildung einer Zellschicht kultiviert (Schritt b), der andere Teil wird in einem Alginatgel einer Redifferenzierung unterzogen (Schritt c). Abschließend erfolgt eine Hochdichte-Zellkultur der aus dem Alginatgel gelösten Chondrozyten auf dem

zellbeschichteten Träger, aus der das Knorpel-Träger-Konstrukt zur Implantation in den Defekt hervorgeht (Schritt d).

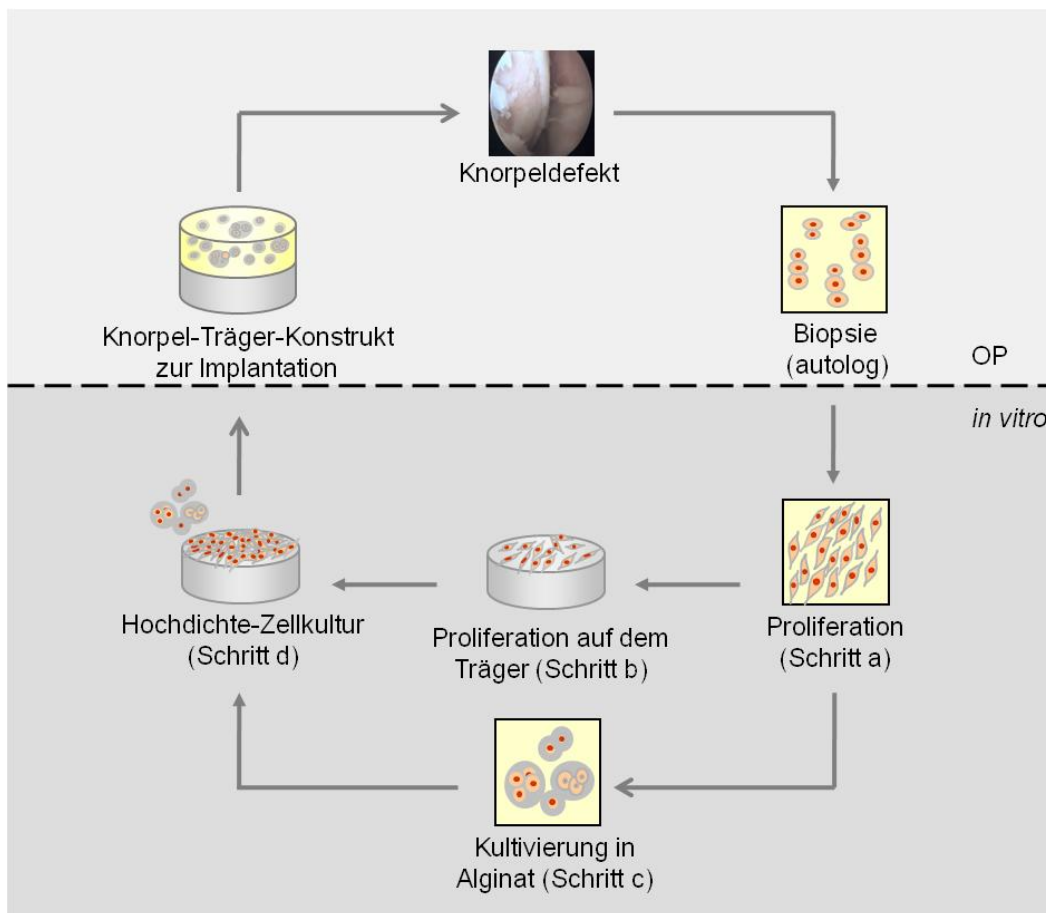


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des verwendeten Konzeptes zur Herstellung von osteochondralen Implantaten (nach Meenen, Adamietz, Goepfert *et al.*).

Das Prinzip wurde bereits erfolgreich im Tierversuch am *Minipig* getestet [9]. Nach 26 Wochen Standzeit wurden 7 von 12 Punkten des *ICRS-Score* Systems [69] erreicht, nach 52 Wochen 9 von 12 Punkten. Jedoch werden in dem verwendeten Bewertungssystem die mechanischen Eigenschaften des Knorpelersatzes nicht berücksichtigt, die in dem Tierversuch als unzureichend eingestuft wurden [9]. Es fand keine Resorption und keine Umgestaltung des verwendeten Calciumphosphat-Trägers (Calcibon[®], Biomet Deutschland) *in vivo* statt, so dass dieser nicht ausreichend in den Knochen integriert werden konnte.

2.2.3 Wirkung von Druckbelastung auf Chondrozyten

Der durch Belastung hervorgerufene Flüssigkeitsstrom ist wesentlich für die Funktionalität des Gewebes. Neben der bereits beschriebenen Aufnahme von Kräften, der Kontrolle der Deformation des Knorpels und der Bereitstellung eines Gleitmittels zwischen den Gelenkoberflächen spielt er eine wichtige Rolle bei der Wirkung der Druck-

belastung auf Chondrozyten im Knorpelgewebe. Auf dem Strom basieren Transportprozesse, indem Nährstoffe und Gase in den Gelenkknorpel hinein und Metabolite hinaus gelangen (siehe: Ernährung des Knorpels durch Belastung). Desweiteren überträgt er Druck und Deformationskräfte auf die Chondrozyten zur Stimulation bestimmter intrazellulärer Prozesse (siehe: Reaktion der Chondrozyten auf Kräfte) [30].

Ernährung des Knorpels durch Belastung

Die Proteoglykane bilden ein Porennetzwerk mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 25-75 Å [19, 30]. In mehreren Studien wurde festgestellt, dass kleinere Moleküle wie beispielweise Glucose oder Laktat über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und dem subchondralen Knochen in den Knorpel hinein oder hinaus gelangen können [30, 70]. Größere Moleküle wie Albumin oder Wachstumsfaktoren dagegen müssen über einen konvektiven Strom in den Knorpel dringen [20]. Dabei wird angenommen, dass die dazu benötigte Lastbeaufschlagung dynamisch erfolgen muss, da eine konstante Belastung zum Verlust von interstitieller Flüssigkeit führt. Zusätzlich wird dadurch die Aufnahme und Abgabe kleinerer Moleküle beschleunigt. Im Gegensatz zu der Reaktion der Zellen auf konstante Kräfte konnte *in vitro* tatsächlich festgestellt werden, dass eine dynamische Belastung zu einer erhöhten Matrixsynthese der Zellen führt [71].

Reaktion der Chondrozyten auf Kräfte

Die komplexe Reaktion der Zellen auf mechanische Belastung und auf die resultierende Veränderung der extrazellulären Umgebung ist bis heute nicht ausreichend verstanden [72]. Es wird aber davon ausgegangen, dass die Belastung für den gesunden Knorpel unerlässlich ist. Auch ist nicht vollständig geklärt, in wieweit und auf welchen Wegen mechanische Belastung *in vivo* die Expression von Genen beeinflusst. Als Gene, deren Transkription bei mechanischer Stimulierung der Zellen verstärkt oder erniedrigt wird, sind die der extrazellulären Matrix-Proteine (Kollagen, Proteoglykane, COMP etc.), der den Zellzyklus regulierende Wachstumsproteine (Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen), der Zytokine (IL-1, -4, -6), der Wachstumsfaktoren (TFG- β s, BMPs etc.), der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und angiogenen Faktoren (VEGF) bekannt [46]. Diverse Studien haben einzelne Mechanismen untersucht, von denen nun eine Auswahl vorgestellt wird, um das Wesentliche zu umreißen.

Da Chondrozyten in der extrazellulären Matrix eingebettet vorliegen, sind die Kräfte auf diese Zellen und deren Deformation direkt abhängig vom Verhalten des umliegenden Gewebes. Aufgrund der Anisotropie der Matrix entstehen in den spezifischen Zonen verschiedene Kräfte und Veränderungen in der Matrix, die damit auch in unterschiedlicher Weise Reaktionen der Zellen hervorrufen. Die Unterschiede in den knor-

pelspezifischen Zonen wurden bereits im Kapitel 2.2.2 diskutiert. Desweiteren ist der Druck im Bereich der Belastung am größten, während Scherkräfte auf die Zellen in den Randbereichen bei erhöhtem Flüssigkeitsstrom ansteigen. Aus den Zusammensetzungen der Zonen und den unterschiedlichen Belastungen in diesen wurde abgeleitet, dass Kompression und der damit verbundene Flüssigkeitsstrom zu einem erniedrigten Proteoglykan-Gehalt und einem fibrösen Phänotyp, Druck zu einer erhöhten Matrixproduktion und Scherkräfte zu Zellteilungen und einer erhöhten Matrixproduktion führen können [46].

Im Gleichgewicht tritt kein Flüssigkeitsstrom auf, so dass dann die Deformation die Reaktion der Zellen bestimmt. Bei einer Kompression des Gelenkknorpels eines Hundes um 15% wurde eine Reduktion der Zellhöhe um 26% in der oberflächlichen Zone, 19% in der mittleren Zone und 20% in der tiefen Zone und eine Reduktion des Zellvolumens um 22%, 16% und 17% gemessen [51]. Bei der Deformation einer Zelle verformen sich zunächst das Zytoskelett und schließlich die Zellorganellen [73]. Durch die Verdichtung der Matrix steigt die extrazelluläre Ladungsdichte und die Zellen geben aufgrund des erhöhten elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran Wasser ab. Dabei verlieren nicht nur das Zytoplasma, sondern auch der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien Wasser. Der Golgi-Apparat hingegen kann sein Volumen halten [74]. Es ist möglich, dass die Verformung der Zellorganellen und des Zytoskeletts entweder direkt einen Einfluss auf die Translation von Genen (veränderte Verfügbarkeit von Ribosomen, veränderter Transport von Amino- und Nukleinsäuren) hat und/oder Signalkaskaden aktiviert [72, 74]. Der Wasserverlust in den Zellen hat eine erhöhte intrazelluläre Ionenkonzentration zur Folge. Dieses kann unter anderem die Aktivität von Transportproteinen in der Zellmembran beispielsweise zum Austausch von Ionen regulieren [75]. Außerdem fällt der extrazelluläre pH-Wert, so dass der intrazelluläre pH-Wert beeinflusst wird. Die Aktivitäten von Enzymen in den Zellen können durch die Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenkonzentration steigen oder sinken.

Abbildung 2.11 zeigt den Effekt hydrostatischer Belastung auf einige Ionenkanäle von Chondrozyten. Die mit ATP getriebene $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe wird durch hydrostatischen Druck inhibiert, der Na^+xH^+ -Transporter aktiviert, während bei Hypertonie das $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transportsystem angeregt wird. So fanden Bowning *et al.* [75] einen Anstieg der Na^+ -Konzentration in den Zellen nach 30 Sekunden hoher hydrostatischer Belastung (30 MPa). Zusätzlich wurden Calcium-Ionen, ein *Second Messenger* zur intrazellulären Signaltransduktion, aus den intrazellulären Speichern freigesetzt, später wurde die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration über den Transport der Ionen in die Zelle aufrecht erhalten. Desweiteren wird bei unphysiologisch hoher hydrostatischer Belastung der Glucosetransporter (GLUT) inhibiert und es wird angenommen, dass dadurch die

Glykolyse und damit die ATP-Produktion herabgesetzt wird. ATP ist für die Matrixsynthese erforderlich [40].

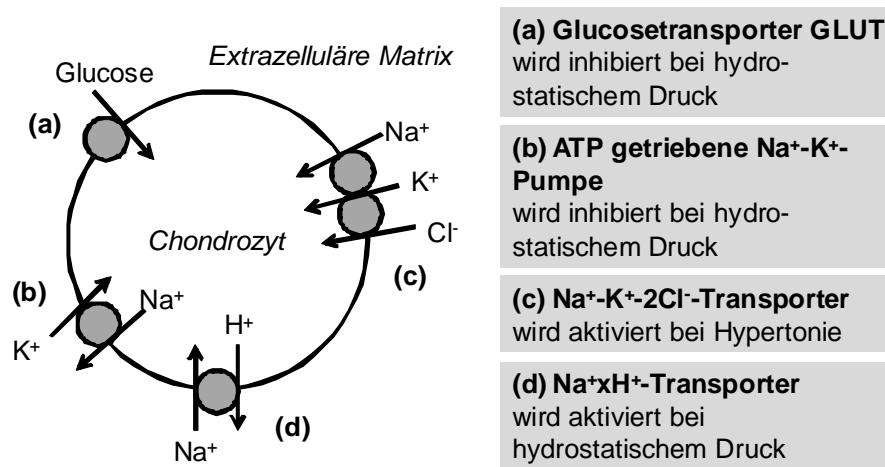


Abbildung 2.11: Einfluss von hydrostatischer Belastung auf Membrantransporter in Chondrozyten, bei denen eine mechanische Stimulierung gezeigt werden konnte (modifiziert nach [75]).

Als weitere Signalübertragungswege zwischen der Zelle und ihrer Umgebung sind Integrine bekannt [76]. Integrine sind transmembrane Glykoproteine. Eine genauere Beschreibung folgt im Abschnitt 2.3.2. Bei extrazellulären Signalen werden über Integrine Signaltransduktionen durch Kaskaden im Zytoplasma in Gang gesetzt [76, 78]. Es konnte gezeigt werden, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrine über eine Dehnung der Membran, induziert durch Scherung und Flüssigkeitsströme, aktiviert werden.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte aktivieren oder inhibieren also letztendlich Signalkaskaden, die möglicherweise chondrozytenspezifische Transkriptionsfaktoren wie Sox9 regulieren [77, 79]. Bisher konnte beispielsweise gezeigt werden, dass über den TGF- $\beta 3$ -Signaltransduktionsweg Informationen für eine erhöhte GAG-Synthese und Proliferationsrate nach dynamischer Kompression vermittelt werden [73]. Desweiteren konnten Studien nachweisen [80, 81], dass Scherstress die Proliferation von Monolayerkulturen zum Teil über den TGF- $\beta 1$ -Signalweg fördert und Kompression die Expression von BMP-3 reduziert.

2.2.4 Bioreaktoren zum Aufbringen von Druckbelastung

Aufgrund dieses substanziellen Einflusses mechanischer Belastung bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Knorpels *in vivo* werden seit einigen Jahren große Anstrengungen unternommen, Knorpel-Konstrukte *in vitro* eben diesen Kräften auszusetzen, um die Qualität des kultivierten Knorpels – vor allem die biomechanischen Eigenschaften – noch vor der Implantation zu steigern.

Mithilfe der Belastung durch Bioreaktoren wird versucht, die Produktion der extrazellulären Matrix und durch Ausrichtung dieser Matrixbestandteile den E-Modul zu

steigern. Desweiteren sollen durch die Standardisierung und Automatisierung die Reproduzierbarkeit erhöht und Produktionskosten gesenkt werden [82]. Die entwickelten Bioreaktoren (Abbildung 2.12) lassen sich nach der Art der aufgetragenen Kräfte in vier Gruppen einteilen [83]:

- Druck
- direkte Kompression
- hohe Scherkräfte
- niedrige Scherkräfte

Zusätzlich zur mechanischen Stimulation in Anlehnung an die Bedingungen *in vivo* sollten Bioreaktoren auch die Nährstoff- und Gasversorgung, den Abtransport von Metaboliten und die Überwachung der pO_2 -Konzentration, des pH-Wertes und der Temperatur gewährleisten. Kultivierungen können in Einschnitt- und Zweischnittprozessen durchgeführt werden. Bei Zweischnittprozessen wird die mechanische Belastung in einem Bioreaktor aufgebracht und anschließend werden die Konstrukte in Kulturgefäße zur statischen Kultivierung in den Inkubator umgesetzt. Dieses bringt ein erhöhtes Kontaminationsrisiko und eine geringere Reproduzierbarkeit mit sich [83].

Um die Belastungsmuster im Knie zu simulieren, müssen die Wirkungsprinzipien der Reaktortypen für die Herstellung von Knorpel-Konstrukten *in vitro* kombiniert werden. Die Zuordnung der beobachteten Effekte auf die einzelnen Anteile der komplexen Belastung ist dann jedoch nicht möglich, weshalb mit den isolierten Belastungsarten zunächst Grundlagenuntersuchungen durchgeführt werden [84]. Allgemein wird das Reaktordesign im *Tissue Engineering* als äußerst komplex beurteilt, Erfahrungen bei der Konstruktion und Handhabung dieser Reaktoren bestehen noch nicht lange [85]. Noch im Jahr 2003 schrieben Darling *et al.* [83], dass Reaktoren vor allem für direkte Kompression nur im Zweischnittprozess existieren. Inzwischen konnten Reaktoren, unter anderem am Institut für Biomechanik der Technischen Universität Hamburg-Harburg konstruiert werden, die direkte Kompression und Scherung in einem Einschnittverfahren realisieren [86]. Zum Erzeugen hoher Scherkräfte wurden Spinnerflaschen oder Reaktoren nach dem Prinzip der direkten Perfusion entwickelt, zum Erzeugen niedriger Scherkräfte der sogenannte *Rotating-Wall*-Bioreaktor (Abbildung 2.12) [83, 84]. In diesem Abschnitt werden – der Themenstellung dieser Arbeit entsprechend – nur Reaktoren zum Aufbringen hydrostatischer und hydrodynamischer Belastung ausführlicher beschrieben.

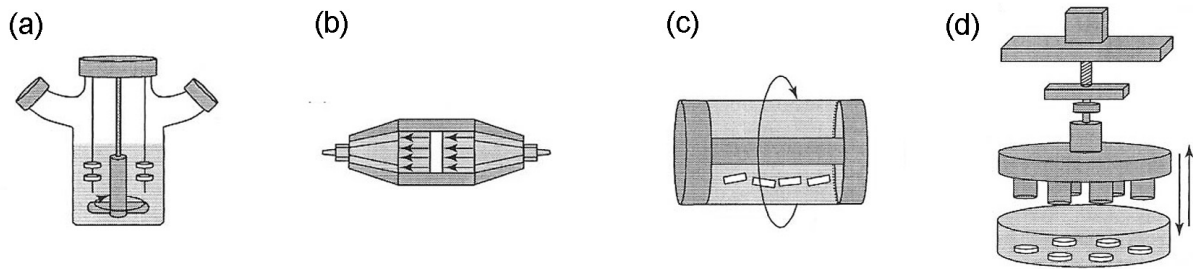


Abbildung 2.12: Bioreaktoren für die mechanische Belastung von Knorpelgewebe *in vitro*: (a) Spinnerflasche für hohe Scherkräfte, (b) Perfusionsreaktor für hohe Scherkräfte, (c) *Rotating-Wall*-Reaktor für niedrige Scherkräfte, (d) Reaktor für direkte Kompression ([82] mit Genehmigung des Elsevier Verlags).

Im Wesentlichen existieren vier verschiedene Reaktorprinzipien zum Aufbringen von hydrostatischem oder hydrodynamischem Druck auf Knorpelimplantate oder kultivierten Knorpel (Tabelle 2.4). Diese werden in Abbildung 2.13 dargestellt. Reaktoren nach dem Prinzip (a) bestehen aus einem mit Wasser gefüllten Druckkessel. Die Kulturen befinden sich in Petrischalen, kleinen Reaktionsgefäßen oder Beuteln, die mit Medium gefüllt und mit einer meist semipermeable Membran verschlossen werden. Ein Nachteil entsteht bei einer längeren Kultivierungsdauer, da kein festgesetzter Gasaustausch stattfindet. Daher werden in diversen Studien die Gefäße nach jeder Belastung unter undefinierten Bedingungen in einen Inkubator umgesetzt. Dieses führt zu einer Erhöhung des Kontaminationsrisikos. Anderenfalls sind aber die Konzentrationen der gelösten Gase und damit auch der pH-Wert über den Kultivierungszeitraum nicht konstant.

Der Reaktor (b), in dem sich ausschließlich Medium und keine Gasphase befindet, läuft nach dem semikontinuierlichen Perfusionsprinzip. Die Begasung des Mediums findet außerhalb des Reaktors statt und die benötigten Gase werden über Perfusion zu den Zellen geleitet. Zum Aufbringen des Druckes wird die Mediumperfusion gestoppt und der Druck über die Flüssigkeit im Reaktor, zum Beispiel mithilfe eines beweglichen Kolbens, aufgebaut. Dieses Prinzip eignet sich für eine längere Kultivierungszeit von Implantaten, jedoch nicht für Kultivierungen von *in vitro* generiertem Knorpel, bei der die Gabe von Wachstumsfaktoren vorgesehen ist (siehe Abschnitt 2.3.1). Wachstumsfaktoren sind bei 37°C nur einige Stunden stabil [87] und müssen daher innerhalb von ein paar Tagen erneut zugesetzt werden. Dieses führt bei den großen Mediummengen im Perfusionssystem zu sehr hohen Kosten. Desweiteren wird der Effekt des Druckes durch eine fluiddynamische Belastung überlagert.

Das Prinzip (c) sieht einen Druckaufbau über die Gasphase vor. Es gibt die Möglichkeit, den Druck über einströmendes vorkomprimiertes Gas oder über einen beweglichen Kolben zu erhöhen.

Im Reaktor (d) wird der Druck direkt über die Flüssigkeitsphase beispielsweise mithilfe eines Kolbens aufgebracht. Ohne Begasung ist abermals keine längere Kultivierung unter konstanten Bedingungen möglich und ein Umsetzen der Proben erforderlich.

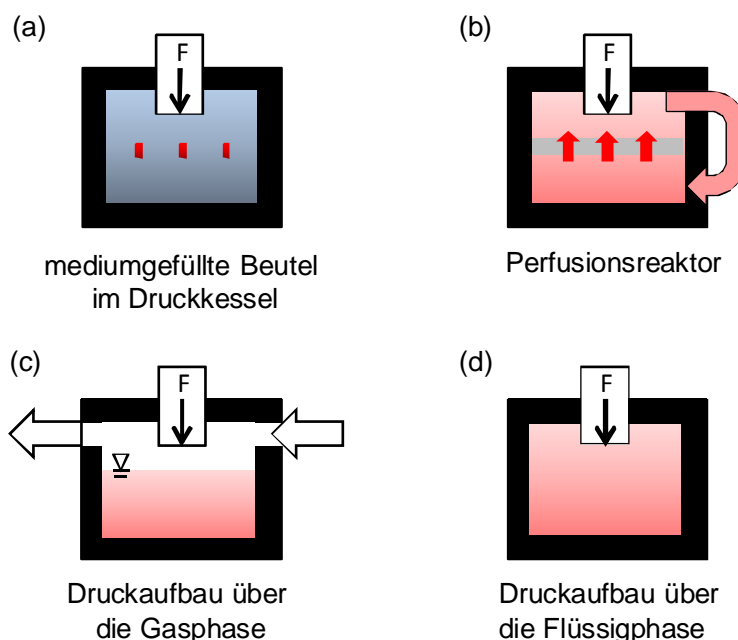


Abbildung 2.13: Reaktorprinzipien zur Lastbeaufschlagung von Knorpelgewebe mit hydrostatischem oder hydrodynamischem Druck.

Die Tabelle 2.4 zeigt, dass bereits mehrere Arbeitsgruppen den Einfluss von Druckbelastung auf Chondrozyten untersucht haben. Studien, die mit Stammzellen, Progenitorzellen oder Zelllinien durchgeführt wurden, sind hier nicht berücksichtigt. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist nicht gegeben, da sehr unterschiedliche Kultivierungsbedingungen gewählt wurden. Die Tabelle zeigt die Verwendung von Zellen in verschiedenen Passagen und verschiedener Spezies, Drücke zwischen 0,04 MPa und 50 MPa und Frequenzen von 0 Hz (konstanter Druck) bis zu 1 Hz, verschiedene Belastungsdauern sowie die Kultivierung von Explantaten, Monolayerkulturen und Kultivierungen in Gelen, Schwämmen oder Vliesen. Darüber hinaus sind in der Darstellung der Tabelle Einflüsse wie die Kultivierungszeit vor und nach der Belastung, die Medienzusammensetzung (Serum, Wachstumsfaktoren etc.), die Zelldichte oder die Sauerstoffkonzentration in der Zuluft unberücksichtigt geblieben. Desweiteren wurden unterschiedliche Methoden zur Analytik gewählt, die nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Beispielsweise wurde in der Studie von Toyoda *et. al.* [88] eine Erhöhung der mRNA für Aggrecan um das Vierfache gemessen. Dahingegen erhöhte sich die Einlagerung von [³⁵S]-Sulfat nur um 10%. Im Allgemeinen wird angenommen, dass bei kleinen Amplituden (0,01-0,5 MPa) konstante Belastung oder niedrige Frequenzen zum Erfolg führen, während bei höheren Drücken (bis zu 10 MPa) auch höhere Frequenzen (> 0,1 Hz) nötig sind [89]. Unphysiologisch hohe Drücke wirken sich

negativ auf die Matrixsynthese aus. Trotzdem hängt die Reaktion der Zellen von ihrer Umgebung und den Kultivierungsbedingungen ab, so dass für jeden Zellkulturansatz zur Herstellung von Knorpel *in vitro* Belastungszyklen erneut abgestimmt werden müssen.

2.3 Einflüsse ausgewählter Kultivierungsbedingungen

Neben der mechanischen Stimulierung von *in vitro* generiertem Knorpelgewebe üben auch Wachstumsfaktoren und die Oberflächenstruktur von Biomaterialien Einflüsse auf die Qualität des Gewebes aus. Dieses Kapitel gibt eine kurze Einführung in diese beiden Themen.

2.3.1 Wachstumsfaktoren

Notwendigkeit von Wachstumsfaktoren

Der Ausgangspunkt für Methoden der Gewebezüchtung zur Knorpelregeneration ist eine Biopsie, deren Größe erfahrungsgemäß zwischen $0,01-4,4 \cdot 10^6$ Zellen liegt [63]. Um Knorpel *in vitro* zu generieren, werden in fast allen Fällen deutlich höhere Zellzahlen benötigt, so dass eine Vermehrung der Zellen unerlässlich ist. Die Folge einer Expansion von Chondrozyten über mehrere Passagen (Subkultivierungsschritte) ist eine Dedifferenzierung der Zellen, so dass sie nur noch kleine Mengen oder keine Proteoglykane und Kollagene vom Typ II synthetisieren und eine den Fibroblasten ähnliche Morphologie annehmen [108, 109]. Für die Chondrogenese bei der Herstellung von Knorpelgewebe ist daher zunächst eine Redifferenzierung der expandierten Zellen erforderlich, die beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, eine dreidimensionale Anordnung und Morphologie der Chondrozyten – wie in einem Alginategel – und physiologische Belastung stimuliert werden kann [109-112].

Wachstumsfaktoren sind hormonähnliche Botenstoffe, die anders als Hormone nicht auf dem endokrinen, sondern auf dem para- und autokrinen Weg wirken. Sie geben die Signale anderer Körperzellen über entsprechende Rezeptoren in der Zellmembran weiter. Derzeit sind diverse, aber nicht alle Wachstumsfaktorfamilien identifiziert [3]. Auch vom Knorpelgewebe selbst werden Wachstumsfaktoren synthetisiert und im Gewebe gespeichert. Studien zur Charakterisierung und Wirkung von Wachstumsfaktoren während der Herstellung von Knorpelgewebe *in vitro* zeigten, dass vor allem die zusätzliche Gabe vom *Insulin-like Growth Factor* (IGF-I) und vom *Transforming Growth Factor* (TGF- β 1) geeignet ist. Die Ergebnisse der Studien differieren dennoch sehr stark und lassen sich vermutlich, wie auch bei den abweichenden Effekten der Belastung, auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, Spezies und Alter der Donoren, Wachstumsfaktor-Konzentrationen, die Gabe von Serum oder den

Tabelle 2.4: Zusammenfassung der Literaturrecherche zum Einfluss von hydrostatischem und hydrodynamischem Druck auf die Aktivität von Chondrozyten. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis aus der Qualität unter Druckbelastung zur Qualität unter unbelasteten Bedingungen.

Zellen	Kultur	Reaktor	Amplitude	Frequenz	Zeit	Analytik	Proteoglykane	Kollagen II	Gesamtkollagen	E-Modul	Referenz
ovine, adult	Explantat	a	5 MPa 50 MPa 0,1-50 MPa 0,1-50 MPa	konstanter Druck	2 h 2 h 2 h 20 s	B	~1,4x ~0,2x Maximum bei 5 MPa (~1,4x), >15 MPa negativ, Maximum bei 5-10 MPa (~1,5x), 40-50 MPa negativ	n.d.	~1,3x ~0,4x Maximum bei 5 MPa (~1,25x), >15 MPa negativ, Maximum bei 5-10 MPa (~1,5x), 40-50 MPa negativ	n.d.	Hall <i>et al.</i> 1991 [90]
bovine, P0, adult	Monolayer	a	5 MPa	0,0167 Hz 0,05 Hz 0,25 Hz 0,5 Hz 0,0167 Hz 0,05 Hz 0,25 Hz 0,5 Hz	1,5 h 20 h	B	~1x ~0,7x ~0,5x ~0,8x ~0,8x ~1x ~1,2x ~1,2x	n.d.	n.d.	n.d.	Parkkinen <i>et al.</i> 1993 [91]
bovine, P0	Explantat		5 MPa	0,0167 Hz 0,05 Hz 0,25 Hz 0,5 Hz	1,5 h		~1,1x ~1,1x ~0,9x ~1,2x				
bovine, P0, adult	Monolayer	a	5 MPa 30 MPa	0,017 Hz 0,25 Hz 0,5 Hz konstant	20 h 20 h	B	~0,8x ~1x ~1,1x ~0,6x	n.d.	n.d.	n.d.	Lammi <i>et al.</i> 1994 [92]
bovine, P0, adult	Monolayer	d	10 MPa 10 MPa	1 Hz konstant	4 h 4 h	A/B	A: ~1,3x B: ~1,7x A: ~1x	A: ~1,4x A: ~1x	n.d.	n.d.	Smith <i>et al.</i> 1996 [93]
equine, P3, juvenil	PGA-Netz	b	3,44 MPa 6,87 MPa 3,44 MPa 6,87 MPa	5/15 s an/aus	20 min jede 4 h, 5 Wochen	C	~3,2x ~5x ~2x ~1,3x	n.d.	~1x ~1,8x ~3x ~7x	n.d.	Carver <i>et al.</i> 1998 [94]

bovin, P1,	Monolayer Alginategel	c	0,2 MPa	30/2 min an/aus	8 h/d, 3 Wochen	E	n.d.	0% pos. ~0,2x	n.d.	n.d.	Domm <i>et al.</i> 2000 [95]
bovin, P0, adult	Pellet Monolayer	a	10 MPa	1 Hz	4 h 4 h/d, 4 d	A	~20x	~2x ~9x	n.d.	n.d.	Smith <i>et al.</i> 2000 [96]
bovin, P0, adult	Monolayer	c	0,2 MPa	0,1 Hz 30/2 min an/aus 2/30 min an/aus	10 h/d, 6 d	D	n.d.	k.A. ~1x k.A. ~0,7x	~1,2x ~1,6x ~0,7x	n.d.	Hansen <i>et al.</i> 2001 [89]
bovin, P0, adult	Agarosegel	a	5 MPa	1 Hz konstant	4 h 4 h	B A B	~1,1x ~4x ~1,1x	n.d. ~1,5x ~1,1x	n.d.	n.d.	Toyoda <i>et al.</i> 2003 [88]
human, P0, OA	Kollagen I/III-Mem- bran	c	0,2 MPa	30/2 min an/aus	8 d	B	~2x	n.d.	~1,1x	n.d.	Scherer <i>et al.</i> 2004 [97]
human, P0	Monolayer	a	1 MPa 5 MPa 10 MPa 1 MPa 5 MPa 10 MPa	1 Hz	4 h/d, 1d 4 h/d, 4 d	A	~1x ~1,3x ~1,5x ~1,4x ~1,8x ~1,9x	~1x ~1x ~1x ~1,2x ~1,6x ~1,7x	n.d.	n.d.	Smith <i>et al.</i> 2004 [98]
porcin, P0	Pellet Alginategel	a*	4 MPa	1 Hz	1, 5 h/d, 7 d	C/B	~2x ~0,9x	n.d. n.d.	~2,5x ~1,6x	n.d.	Elder <i>et al.</i> 2005 [99]
bovin, P0, juvenil	Pellet	a*	10 MPa	1 Hz	4 h/d, 5 d/Woche, 8 Wochen	C	~1,4x	n.d.	~1,2x	Aggregat- Modul ~0,9x	Hu <i>et al.</i> 2006 [100]
porcin, P3, adult	Knorpel- Träger- Konstrukt	c	0,3 MPa	1 min an/aus	6 h/d, 21 d	C	~1,4x	n.d.	n.d.	~1,3x	Heyland <i>et al.</i> 2006 [101]
human, P0, OA	Kollagen I- Gel	c	40 kPa	0,0125 Hz	2 Wochen	C A	~1,4x ~1,6x	n.d.	n.d.	n.d.	Gavenis <i>et al.</i> 2007 [102]
bovin, P0, juvenil	Kollagen- schwamm	b	2,8 MPa	0,015 Hz konstant	15 d	C B C B	~2,7x ~1,4x ~3,1x ~1,3x	n.d.	n.d.	n.d.	Mizuno <i>et al.</i> 2007 [103]
bovin, P3,	Pellet	a**	5 MPa	0,5 Hz	4 h/d, 4 d	A	~5x	~4x	n.d.	n.d.	Kawaniski <i>et al.</i> 2007 [104]
bovin, P0, juvenil	Pellet	a*	1 MPa	konstant 0,1 Hz 1 Hz	1 h/d, 5 d	C	~1x ~1,2x ~1x	~1x ~1,2x ~1,2x	n.d.	~1,2x ~0,9x ~1,5x	Elder <i>et al.</i> 2008 [105]

			5 MPa	konstant 0,1 Hz			~1,3x ~1,1x	~1,3x ~0,9x		~2x ~1,4x	
			10 MPa	1 Hz konstant 0,1 Hz 1 Hz			~1x ~1,3x ~1,2x ~1,5x	~0,9x ~1,5x ~0,9x ~0,8x		~1,2x ~1,9x ~1,6x ~1,6x	
bovin, P2, juvenil	Polyester- urethan- schaum	a	10 MPa	0,33 Hz	4 h/d, 3 d	E	n.d.	~2,3x	n.d.	n.d.	Candiani <i>et al.</i> 2008 [106]
bovin, P0, juvenil	Pellet	a*	10 MPa	konstant	1 h/d, 5 d	C	~1,2x	n.d.	~1,4x	1,6x	Elder <i>et al.</i> 2008 [107]

Reaktor

- a Die Kulturen befinden sich in mit Medium gefüllten Beuteln, Petrischalen, Reaktionsgefäßen etc., die in einen mit Wasser gefüllten Reaktor gelegt werden. Die Belastung wird über die Flüssigkeit aufgebracht.
- b Semikontinuierliches Perfusionssystem: Die Flüssigkeit wird außerhalb des Reaktors mit Gasen angereichert. Die Belastung wird über die Flüssigkeit aufgebracht.
- c Der Druck wird über die Gasphase aufgebracht.
- d Der Druck wird über das Medium aufgebracht (Kolben).

Analytik

- A Bestimmung der mRNA
- B Bestimmung der Einlagerung von [³⁵S]-Sulfat (Proteoglykane) oder [3H]-Prolin (Gesamtkollagen)
- C Photometrische Bestimmung der Produkte
- D ELISA
- E Bestimmung mithilfe von Antikörpern.

(Abkürzungen: * Nach der Belastung werden die Zellen aus dem Reaktor genommen und im Inkubator kultiviert. ** pO₂ und pCO₂ werden kontrolliert; konstant – konstanter, nicht intermittierender Druck; OA – osteoarthrotisch; n.d. – nicht durchgeführt; k.A. – keine Angabe; P – Passage).

Differenzierungsstatus der Zellen zurückführen [113, 114]. Daher müssen die Kombinationen der Wachstumsfaktoren für jeden Zellkulturansatz und in jeder Kultivierungsphase erneut optimiert werden.

Wirkung des Insulin-like Growth Factor I

IGF-I und IGF-II zählen zu den insulinähnlichen Wachstumsfaktoren, die eine hohe Sequenzmorphologie zum Proinsulin aufweisen [115]. Humanes IGF-I (7,5 kDa, 67 Aminosäuren) wird hauptsächlich von der Leber gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben. Im Allgemeinen wirkt dieser Wachstumsfaktor mitogen und ist damit an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt.

Im Knorpelgewebe liegt IGF-I als Komplex mit einem IGF-bindenden Protein (IGFBP) in der territorialen Matrix vor [116]. Deutlich messbar ist eine erhöhte Expression von IGF-I während der Heilung von Knorpeldefekten und in arthrotischen Gelenken [112]. IGF-I kann als einer der wichtigsten anabolen Faktoren für Chondrozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bezeichnet werden. Er stimuliert sowohl die Proliferation dieser Zellen als auch die Matrixsynthese, speziell die Synthese von Proteoglykanen [108, 111, 114, 117].

Wirkung des Transforming Growth Factor Beta 1

TGF- β 1 gehört wie auch die *Bone Morphogenic Proteins* (BMP), die Inhibine und Aktivine zur *Transforming Growth Factor Beta Superfamily*. Zum größten Teil kommt TGF- β 1 (26 kDa, 225 Aminosäuren als Homodimer) in Blutplättchen, Knochen und Knorpel vor. Er spielt eine Rolle während der Differenzierung, Morphogenese, Proliferation, Apoptose und Migration von Zellen [118].

Im Knorpel wird TGF- β 1 größtenteils in latenter Form in Verbindung mit einem *Latent TGF- β Binding Protein* (LTBP) gespeichert. Das Zusetzen von TGF- β 1 zur Knorpelkultur hat widersprüchliche Effekte gezeigt, die sich vermutlich – wie oben beschrieben – auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückführen lassen. Dieser Faktor hat in bisherigen Versuchen beispielsweise das Zellwachstum und die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen Typ II stimuliert oder auch inhibiert [111].

Desweiteren beobachteten Tsukazaki *et al.*, dass TGF- β 1 mit IGF-I synergistisch wirken kann. Dieses resultiert in einer Veränderung der auto- und parakrinen Signalkette des IGFs, so dass die Kombination dieser Faktoren im Vergleich zur Anwendung jedes einzelnen Faktors eine andere Wirkung hat [114, 116].

2.3.2 Trägermaterialien

Notwendigkeit von Trägermaterialien

Die Verwendung von *in vitro* generiertem Knorpelgewebe wird häufig durch die schlechte Fixierung auf dem subchondralen Knochen nach der Implantation limitiert [9, 119]. Es wurden Kultivierungsprinzipien entwickelt, die dieses Problem lösen, indem eine Knorpelschicht direkt auf einem Trägermaterial kultiviert wird. Während der Implantation wird die Defektstelle ausgebohrt und der Träger mit dem darauf liegenden Knorpelgewebe in den Knochen eingesetzt. Eine Integration des Trägers in den Knochen durch die umgebenden Zellen soll die Verankerung im Gelenk gewährleisten [9].

Hydroxylapatit als Trägermaterial

In erster Linie bieten sich für die Herstellung von osteochondralen Implantaten Knochenersatzmaterialien an, die bereits in der Klinik eingesetzt werden. Hydroxylapatit zählt zur Klasse der Calciumphosphate mit der Strukturformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [120]. Als Knochenersatzmaterial werden HA biokompatible, bioaktive, osteokonduktive und in einigen Literaturstellen sogar osteoinduktive Eigenschaften zugesprochen [65, 120]. In Wirbeltieren bildet HA die Hauptkomponente im mineralischen Teil des Knochens und der Zähne [121]. Infolge seines großen natürlichen Vorkommens in Lebewesen wird es derzeit in der Klinik als Knochenersatzmaterial oder als Beschichtung für Hüftprothesen verwendet [122, 123].

Oberflächenbeschaffenheit des Trägers

Auch *in vitro* ist das Problem der Haftung zwischen Trägermaterial und dem kultivierten Knorpel nicht gelöst, denn die Verbindung muss den im Kniegelenk wirkenden Kräften, besonders den hohen Scherkräften von 0,4x bis 1,7xBW standhalten [122]. Es ist bekannt, dass verschiedene Eigenschaften des Trägermaterials die Anheftung von Zellen und die Gewebebildung beeinflussen. Dazu zählen chemische und physikalische Faktoren wie die Zusammensetzung, die Partikelgröße oder die Oberflächenstruktur [121-124]. Nach der Auffassung einiger Autoren kann der optimalen Oberflächentopographie bei der Kultivierung von Zellen ein ebenso großes Gewicht wie der chemischen Zusammensetzung des Materials zugesprochen werden [128, 134]. Obwohl sich einige Studien bereits mit dieser Fragestellung beschäftigt haben, ist kaum etwas darüber bekannt, wie Chondrozyten auf unterschiedliche Topographien, vor allem auf unterschiedliche Hydroxylapatit-Strukturen reagieren [128, 129].

Schon die Feststellung, dass Prothesen mit einer rauen Oberfläche *in vivo* effektiver im Knochen fixiert werden können als Implantate mit einer glatten Oberfläche, liefert Hinweise auf einen Einfluss der Oberflächenstruktur auf das Einwachsen von Biomaterialien in das umliegende Gewebe [129, 130]. In *in vitro* Studien konnte gezeigt

werden, dass Zellen auf eine veränderte Oberflächenstruktur beispielsweise mit einer verbesserten Anheftung, Beschleunigung der Zellmigration oder Ausrichtung, veränderten Morphologie, veränderten Kontaktinhibierung, der Aktivierung der Phagozytose oder Veränderung der Genexpression reagieren [128, 129]. Teilweise können diese Effekte durch die selektive Adsorption und Anordnung von Proteinen (beispielsweise Fibronectin, Vitronectin), die für die Anheftungsvorgänge von Zellen erforderlich sind, abhängig von der Oberfläche erklärt werden [123, 131, 132]. Weiterhin spielen die Oberflächenenergie und die Benetzungseigenschaften eine große Rolle [132]. Diese Faktoren beeinflussen neben der Anheftung auch die Morphologie der Zellen, die Bindungskräfte zwischen Zellen und Biomaterial und damit die im Folgenden erklärten Vorgänge.

Die Adhäsion von Zellen an ein Substrat verläuft in vier Schritten [78]. Zunächst lagert sich eine Schicht aus Makromolekülen (Serumproteine, Wachstumsfaktoren etc.) aus dem Medium auf dem Biomaterial ab. Die Anheftung der Zellen in den ersten Sekunden ist physikalischen Ursprungs (1. Schritt). Schon nach einigen Minuten können die Zellen nicht mehr durch leichte Scherkräfte von der Oberfläche gelöst werden und beginnen mit der Spreitung (2. Schritt). Das Zytoskelett organisiert die Aktinfasern in Bündeln (3. Schritt) und die Zelle bildet zur mechanischen Verankerung an den Träger die sogenannten Fokalkontakte (*Focal Adhesions*) aus, die nicht aus einer einzigen Bindung, sondern aus Protein-Clustern (Integrine) für eine höhere Stabilität bestehen (4. Schritt) [78, 133].

Wie Abbildung 2.14 zeigt, kommt der Kontakt über Integrine in der Zellmembran zustande, die an spezifische Liganden von extrazellulären Makromoleküle, meist eine RGD-Aminosäurefrequenz (Arginin-Glycin-Asparagin), binden und damit intrazelluläre Prozesse in Gang setzen [78, 132].

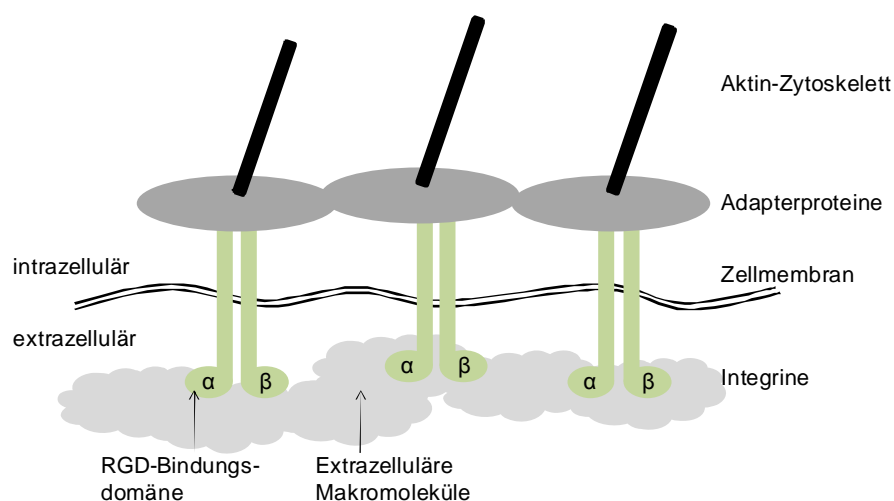


Abbildung 2.14: Signalfortpflanzung von der Umgebung der Zelle zum Zellkern (modifiziert nach [135]).

In der Zelle lagern sich Adapter-Proteine (Talin, Vinculin, Paxillin etc.) an die nunmehr gestreckten Integrine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, und schaffen damit eine Verbindung zwischen den Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett. Durch die auf diese Weise ausgelöste Umstrukturierung des Zytoskeletts und durch Signalmoleküle gelangen dann die Informationen aus der Umgebung zum Zellkern, um dort durch die Expression von Genen beispielsweise die Differenzierung, Proliferation oder Matrixsynthese zu stimulieren [78, 133, 134].

3 MATERIAL UND METHODEN

Die Fragestellungen und Durchführungen der einzelnen Versuche werden zur besseren Verständlichkeit begleitend in den Kapiteln 4-6 dargestellt. Dieser Abschnitt erläutert die standardmäßig verwendeten Verfahren wie den Kultivierungsprozess zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten und die Analytik zur Bestimmung der Qualität des kultivierten Knorpels. Zum Schluss wird ein Überblick über die durchgeführten Arbeiten gegeben.

3.1 Kultivierungsprozess

Im Folgenden wird das Standardprotokoll zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten erläutert. Dieses Protokoll war Ausgangspunkt aller Untersuchungen, für die jeweiligen Versuche wurden nur einzelne Parameter variiert.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden steril unter einer Sterilarbeitsbank mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind im Anhang unter Kapitel 8.1 beschrieben. Die Kultivierungen fanden im Inkubator (CB120, Binder, Tuttlingen) bei 37°C unter 5%iger O₂- und 5%iger CO₂-Atmosphäre statt. Der reduzierte Sauerstoffpartialdruck – in Anlehnung an die physiologischen Werte des nativen Gelenkknorpels – lieferte in vorangegangenen Studien [136, 137] eine verbesserte Matrixsynthese. 5% CO₂ in der Begasungsluft wurden aufgrund des eingesetzten Carbonatpuffers im Medium gewählt. Die Analytik beruht auf zum Teil erweiterten Standardmethoden aus der Literatur oder auf Herstellerangaben der verwendeten Geräte.

3.1.1 Medien, Zellen und Trägermaterial

Medien

Als Medium wurde das gebrauchsfertige *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, PAA Laboratories, Cölbe) verwendet. Standardmäßig wurden dem Medium 25 mmol·L⁻¹ HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Carl Roth, Karlsruhe) als Puffer und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 Units·mL⁻¹ Penicillin, 100 µg·mL⁻¹ Streptomycin, PAA Laboratories) als Schutz vor bakteriellen Kontaminationen zugesetzt.

Als „Proliferationsmedium“ wird im Folgenden das beschriebene Medium versetzt mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS Gold, PAA Laboratories) bezeichnet. Zusätzlich wurden 10 ng·mL⁻¹ *Fibroblast Growth Factor basic* (human FGF basic/FGF-2, Cell-Concepts, Umkirch) bei jedem Mediumwechsel zur Stimulation der Proliferation zugegeben.

Zur Herstellung des „Chondrogenesemediums“ für die Alginat- und Knorpelkultur wurde 10% (v/v) Schweineserum (Porcines Serum, Invitrogen oder PAA Laboratories) in DME-Medium verwendet. Als Zusatz wurden $0,28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Ascorbinsäure-2-phosphat (Asap, Sigma-Aldrich, Taufkirch) und $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cystein (Sigma-Aldrich) bei jedem Mediumwechsel beigelegt.

Bei der Bestimmung des Wachstumsfaktor-Zusatzes zur Unterstützung der Redifferenzierung und Matrixbildung während der Alginat- und Knorpelkultur (Kapitel 4.2.1) wurden verschiedene Kombinationen aus $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-I, human, CellConcepts) und $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Transforming Growth Factor β 1* (TGF- β 1, human, CellConcepts) getestet. Eine genaue Auflistung dieser Kombinationen ist unter Kapitel 4.2 angegeben. Bei allen weiteren Untersuchungen wurden in der Alginatkultur standardmäßig $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 und $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IGF-I zugegeben, in der Knorpelkultur keine Wachstumsfaktoren.

Zellen (Gewinnung von Chondrozyten)

In der vorliegenden Arbeit wurden porcine Chondrozyten verschiedener Tiere verwendet, die aus den Kniegelenken von Hausschweinen durch eine enzymatische Dissoziation gewonnen wurden. Die Kniegelenke der 4-6 Monate alten Hausschweine wurden von einem örtlichen Schlachter (Schlachthof Ernst, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Nach der Zellisolierung schloss sich ein Subkultivierungsschritt in Zellkulturflaschen an, um die Zellen bis zum Versuchsstart in der ersten Passage einzufrieren.

24 Stunden *post mortem* wurde das Knie unter sterilen Bedingungen geöffnet und Knorpelgewebe mit einem Skalpell vom Femur präpariert. Die Knorpelchips wurden fein zerkleinert, in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und nacheinander in verschiedenen Enzymlösungen bei 37°C inkubiert: Hyaluronidase Typ III-Lösung (15 Minuten), Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, PAA Laboratories, 45 Minuten), Kollagenase Typ 1a-Lösung (über Nacht).

Bei vollständigem Verdau am nächsten Tag wurde die Zellzahl mithilfe von Trypanblau (PAA Laboratories) in einer Neubauerzählkammer ($0,1 \text{ mm}$ Tiefe, $0,0025 \text{ mm}^2$, Marienfeld, Lauda-Königshofen) am Lichtmikroskop (Diaphot, Nikon, Düsseldorf) bestimmt. Die Chondrozyten wurden bei $120\cdot\text{g}$ zentrifugiert und in frischem Proliferationsmedium mit $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ FGF-2 mit einer Zelldichte von $8,5\cdot 10^3 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ in herkömmliche Zellkulturflaschen (Carl Roth) ausgesät. Während der Proliferation wurde das Medium zweimal pro Woche erneuert.

Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin/EDTA vom Boden gelöst. Das Enzym wurde mit Proliferationsmedium inaktiviert und die Zellen bei $120\cdot\text{g}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium mit einer Zell-

dichte von $3\text{-}5 \cdot 10^6$ Zellen·mL⁻¹ suspendiert und bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren (Kryokonservierung in Passage 1).

Trägermaterial

Für die Herstellung der Konstrukte wurde ein Träger der Firma Zellwerk GmbH (Sponceram HA[®], Eichstätt) mit einem Durchmesser von 4,55 mm und einer Höhe von 2 mm verwendet. Der Träger bestand aus Hydroxylapatit und wurde generell unbehandelt verwendet.

Eine Ausnahme bildete die Untersuchung zum Einfluss der Oberflächenstruktur während der Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten (Kapitel 4.3). Dazu wurde die Oberfläche durch Schleifen mit Papier (glatte Cellulose) oder Tintenstrahldruckpapier (raues Polymer) von D. Fritsch und Dr. R. Janßen am Institut für Keramische Hochleistungswerkstoffe modifiziert. Damit standen drei verschiedenen Oberflächenstrukturen (unbehandelt, mit Papier geschliffen, mit Folie geschliffen) zur Verfügung. Anschließend wurde die Oberflächenstruktur mithilfe eines Mikroskops (InfiniteFocus, Alicona, Grambach, Österreich) und einer *Charged-Coupled-Device*-Kamera (CCD-Kamera) charakterisiert, mit denen eine dreidimensionale Aufnahme (Auflösung: 10 nm in z-Richtung, 1-2 µm in x-y-Richtung) generiert werden konnte. Die Aufnahmen und eine Beschreibung der Oberflächen sind im Kapitel 4.3 dargestellt.

3.1.2 Herstellung von Knorpel-Konstrukten

Das Kultivierungsprinzip zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten gliederte sich in vier Schritte (Abbildung 3.1):

- (a) Die isolierten Chondrozyten wurden vermehrt, bis eine definierte Zellzahl vorlag (Passage 3).
- (b) Die vermehrten Chondrozyten wurden auf dem Trägermaterial zur Bildung einer Zellschicht für zwei Wochen kultiviert (Zellbeschichtung).
- (c) Parallel zum zweiten Schritt wurden Zellen zwei Wochen in einem Alginatgel zur Stimulierung der Redifferenzierung eingeschlossen (Alginatkultur).
- (d) Die redifferenzierten Chondrozyten wurden aus dem Alginatgel gelöst und auf den mit Zellen beschichteten Träger zentrifugiert. Die Knorpel-Träger-Konstrukte wurden für drei Wochen kultiviert (Knorpelkultur).

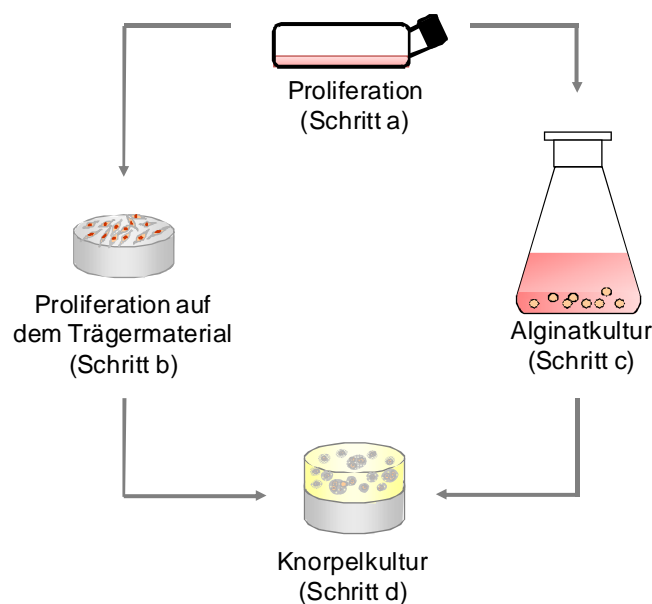


Abbildung 3.1: Kultivierungsschema zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten (basierend auf Nagel-Heyer *et al.* [67, 68]).

Die Durchführung der einzelnen Schritte wird nachfolgend ausführlich beschrieben:

Schritt a: Proliferation

Zunächst mussten die Zellen vermehrt werden, bis eine ausreichende Zellzahl vorlag. Mit dem hier zugrunde liegenden Kultivierungsschema konnte beispielsweise mit einer Biopsie von $1 \cdot 10^6$ Zellen (siehe Abschnitt 2.3.1) nach drei Subkultivierungsschritten eine Zellzahl erreicht werden, die eine Defektfläche von etwa 5 cm^2 im Knie mit Knorpel-Träger-Konstrukten auffüllen kann.

In den Versuchen wurde die Proliferation in Passage 1 gestartet, da die Vitalität von Zellen, die in Passage 1 im Vergleich zur Passage 0 eingefroren wurden, höher ist. Dementsprechend musste die Proliferation für die Herstellung von sechs Konstrukten mit $1 \cdot 10^6$ Zellen in der Passage 1 gestartet werden. Dazu wurden tiefgefrorene porcine Chondrozyten (Abschnitt 3.1.1) aufgetaut, in Proliferationsmedium gegeben und zentrifugiert ($120 \cdot g$, 8 Minuten). Mit frischem Proliferationsmedium wurde eine Zelldichte von $5,7 \cdot 10^3 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ eingestellt und in Zellkulturflaschen ausgesät. Zweimal pro Woche erfolgte ein Austausch des Mediums. Nach sieben Tagen wurden die Zellen im subkonfluenten Zustand mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden gelöst und erneut in Zellkulturflaschen ausgesät (Passage 2). Dazu wurde die dreifache Wachstumsfläche gewählt. Nach weiteren sieben Tagen befanden sich die Zellen im konfluenten Zustand und standen damit für die Kultivierung im Alginatgel und auf dem Träger zur Verfügung. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Waschpuffer suspendiert (Passage 3).

Schritt b: Kultivierung auf dem Trägermaterial

Vor der Kultivierung wurde der Träger in PBS zur Befeuchtung und Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 gelegt. Nach 24 Stunden wurde der Träger in einen Teller mit zylindrischer Hülse aus PEEK (Polyetheretherketon) mit einem Volumen von 0,5 mL gelegt, der wiederum in Zentrifugenröhrchen gestellt wurde, und autoklaviert (Abbildung 3.2).

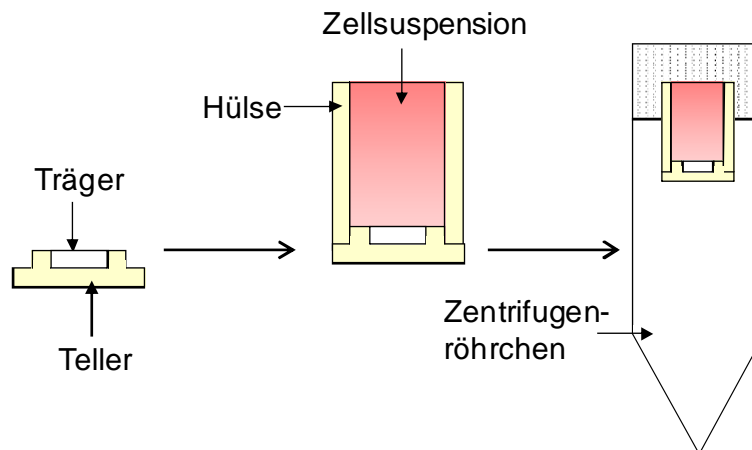


Abbildung 3.2: Träger-Hülsen-System zur Herstellung der Zellbeschichtung (Schritt b) und der Knorpel-Träger-Konstrukte (Schritt d).

Zur Besiedelung der Träger durch Sedimentation wurden $2 \cdot 10^5$ der in Schritt a vermehrten Zellen in 0,5 mL Proliferationsmedium mit FGF-2 in die Hülsen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium getauscht, nach insgesamt 48 Stunden wurde die Hülse entfernt und der Teller mit dem besiedelten Träger in eine 12-Well-Platte umgesetzt. Während der nun folgenden zwölf-tägigen Kultivierung wurde zweimal pro Woche das Medium (3 mL je Well) getauscht.

Schritt c: Kultivierung im Alginatgel

Parallel zu Schritt b wurden Zellen in einem Alginatgel immobilisiert. Die Kultivierung in einem dreidimensionalen System unterstützt durch das Fehlen eines Substrates und die daraus resultierende runde Zellmorphologie die Redifferenzierung von expandierten Chondrozyten, so dass die Zellen mit der Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen beginnen.

Für die Herstellung von sechs Konstrukten wurden $15 \cdot 10^6$ Zellen aus Schritt a in einer gepufferten Alginatlösung mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ suspendiert. Durch eine Kanüle mit einem Innendurchmesser von 1 mm wurde die Zellsuspension in einen mit 150 mL Calciumpuffer gefüllten Erlenmeyerkolben getropft. Beim Eintauchen der Tropfen in den Calciumpuffer bildeten sich sofort Alginatkügelchen mit einem Durchmesser von 2-3 mm. Nach einer 20-minütigen Aushärtezeit wurden diese zweimal in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit ChondrogenesemEDIUM

(doppeltes Alginatvolumen) überschichtet. Mit Ausnahme der Testung der Wachstumsfaktor-Zusätze wurde der Alginatkultur $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 und $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IGF-I zugefügt. Während der zweiwöchigen Kultivierung wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

Schritt d: Kultivierung der Knorpel-Träger-Konstrukte

Zur Elution der redifferenzierten Zellen und der zellassozierten Matrix wurde die Alginatkultur in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 Minuten bei 37°C in Citratpuffer (fünffaches Alginatvolumen) inkubiert. Die eluierten Chondrone wurden zentrifugiert und in Waschpuffer suspendiert. Zur Zellzählung wurden $200 \mu\text{L}$ der Zellsuspension mit $200 \mu\text{L}$ Kollagenase Typ 1a-Lösung versetzt. Nach 30 Minuten lagen die Zellen vereinzelt vor und die Zellzahl konnte mithilfe von Trypanblau in der Neubauerzählkammer bestimmt werden.

Inzwischen wurden die Teller aus der Trägerkultivierung (Schritt b) mit zylindrischen Hülsen mit einem Volumen von $1,5 \text{ mL}$ versehen und in die Zentrifugenröhrchen überführt (Abbildung 3.2). Je Träger wurden $1,8 \cdot 10^6$ der eluierten Chondrozyten in $300 \mu\text{L}$ Chondrogenesemedium in die Hülsen gefüllt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 60-g konnten weitere $1,2 \text{ mL}$ Chondrogenesemedium in die Hülsen gegeben werden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, nach 48 Stunden konnten die Hülsen entfernt und die Knorpel-Träger-Konstrukte in mit Agarose (1% in A. dest.) beschichtete 12-Well-Platten mit je 3 mL Medium umgesetzt werden (Abbildung 3.3). Während der sich anschließenden 19-tägigen Kultivierung wurde alle zwei bis drei Tage das Medium ersetzt.

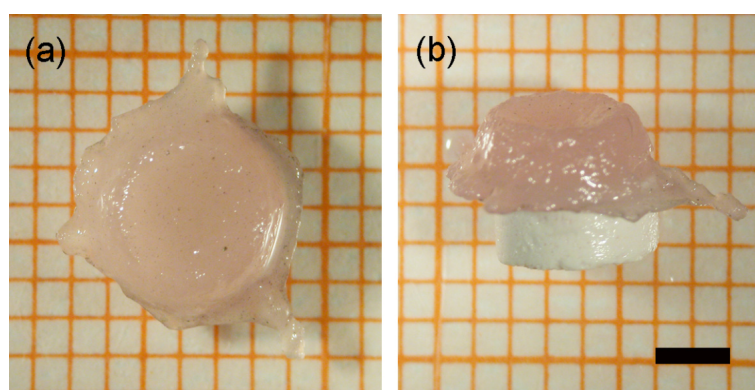


Abbildung 3.3: Makroskopische Aufnahme eines Knorpel-Träger-Konstruktes: (a) Draufsicht, (b) Seitenansicht (Skala 2 mm).

Zur Herstellung von Knorpel-Konstrukten ohne Verwendung eines Trägermaterials entfiel Schritt b. Nach der Elution der redifferenzierten Chondrozyten aus dem Alginatgel wurden $1,8 \cdot 10^6$ Zellen in 3 mL Chondrogenesemedium in Falcon-Röhrchen mit einem Volumen von 50 mL (Carl Roth) zentrifugiert. 48 Stunden später konnten die

Konstrukte ebenfalls in mit Agarose beschichtete 12-Well-Platten überführt werden. Nach Versuchsende wurde die unter Kapitel 3.2 beschriebene Analytik durchgeführt.

3.2 Analytik

Während der Kultivierung konnte die Entwicklung der Zellen und Konstrukte nur mithilfe der Glucose- und Laktatkonzentrationen und optischer Kontrollen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden.

Die Redifferenzierung der Zellen nach Abschluss der Alginatkultur wurde über die Bestimmung des GAG/DNA-Verhältnisses (4 Proben mit je $1 \cdot 10^6$ Zellen) und über Immunfärbungen gegen Kollagen Typ I und II auf sogenannten *Cytospins* (Abschnitt 3.2.4) untersucht. Dabei weist ein hoher Anteil an Kollagen Typ II produzierenden Zellen auf eine erfolgreiche Redifferenzierung hin. Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop (REM) und am Mikroskop (InfiniteFocus, Alicona) wurden von den unbesiedelten und zellbeschichteten Trägern angefertigt.

Standardmäßig umfasste die Analytik am Ende jeder Kultivierung von Knorpel-Konstrukten die Bestimmung der physikalischen und biomechanischen Parameter (Höhe, Feuchtgewicht und E-Modul), der biochemischen Parameter (GAG-Gehalt, DNA-Gehalt) und immunhistologische Untersuchungen (Färbung gegen Kollagen Typ I und Typ II, Safranin O-Färbung von Glykosaminoglykanen). Der E-Modul ist ein wichtiges Maß für die Steifigkeit und spielt daher eine große Rolle zur Funktionalität des Gewebes. Der GAG-Gehalt gilt als Dimension für die gebildeten Proteoglykane. Als weiterer Parameter wurde das Verhältnis aus GAG und DNA bestimmt, da damit eine Aussage über die synthetisierten Proteoglykane je Zelle getroffen werden konnte.

3.2.1 Bestimmung der Glucose- und Laktatkonzentration

Mediumproben für die Bestimmung von Glucose- und Laktatkonzentrationen wurden bei jedem Mediumwechsel während der Kultivierung des Alginatgels und der Knorpel-Konstrukte genommen. Die Proben wurden bei $10000 \cdot g$ zentrifugiert, um Zellen und Zellreste zu entfernen. Die Bestimmung erfolgte dann mithilfe eines Analysators (YSI 7100 MBS, Yellow Springs Instruments, Langenfeld) auf Basis einer enzymatischen Umsetzung.

Zur Auswertung der metabolischen Aktivität der Zellen wurden die Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten berechnet:

$$q = \frac{(c_2 - c_1) \cdot V}{(t_2 - t_1)} \quad (3.1)$$

- mit q – Glucoseverbrauchs- bzw. Laktatbildungsrate [$\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}$]
 c – Glucose- bzw. Laktatkonzentration [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]
 t – Zeit [h].

Die scheinbare Ausbeute $Y_{\text{Glc/Lak}}$ von Laktat aus Glucose beim Zellstoffwechsel wird aus dem Verhältnis zwischen Laktatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate bestimmt [138]:

$$Y_{\text{Lak/Glc}} = \frac{q_{\text{Lak}}}{q_{\text{Glc}}} \quad (3.2)$$

3.2.2 Biomechanische Analytik

Die biomechanische Analytik wurde direkt nach Versuchsende an den Knorpel-Konstrukten durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Probe je Versuchsbedingung als Vorbereitung auf die Anfertigung von histologischen Schnitten in Formalin (4% in PBS) fixiert. Die restlichen Knorpel-Konstrukte wurden für die GAG- und DNA-Analyse verwendet.

Masse

Zunächst wurde die Masse der Knorpel-Konstrukte mithilfe einer Feinwaage (MC1, Sartorius) bestimmt. Die Träger wurden bereits vor Versuchsbeginn im feuchten Zustand gewogen. Aus der Differenz zwischen der Masse des Knorpel-Träger-Konstruktes und des Trägers konnte dann die feuchte Masse des Knorpels berechnet werden.

Höhe

Die Bestimmung der Höhe und des E-Moduls wurden an einer Materialprüfvorrichtung (Zwicki 1120, Zwick/Roell, Ulm) durchgeführt. Der kultivierte Knorpel wurde davor mithilfe einer Pinzette vom Träger gezogen. Dabei wurde die Haftung subjektiv ermittelt. Als „schlechte“ Haftung wurde Knorpelgewebe, das sehr leicht vom Träger gelöst werden konnte, bezeichnet. Desweiteren wurde die Haftung in „gut“ und „sehr gut“ eingeteilt. Dabei erhielt nur das Gewebe die Beurteilung „sehr gut“, in dem nach dem Abziehen Stückchen des Trägers zurückblieben. Der Knorpel wurde dann mit einer Stanze (Biopsy Punch, Stiefel, Offenbach am Main) auf einen Kreisdurchmesser von 3,6 mm gebracht.

Während der Messung befanden sich die Proben in einer mit PBS gefüllten Wanne. Die Knorpeldicke wurde zwischen zwei Stempeln mit polierten Oberflächen ermittelt. Dabei wurde der Abstand der Stempel so lange verringert, bis eine Kraft von 0,05 N auf den oberen Stempel wirkte. Der Abstand der Stempel entspricht der Knorpelhöhe.

E-Modul

Die Bestimmung des E-Moduls wurde nach einem Versuchsprotokoll durchgeführt, das auf einer Veröffentlichung von Korhonen *et al.* [139] basiert und an der TUHH modifiziert wurde [86]. Die Proben wurden zwischen den zwei Stempeln mit einer Vorkraft von $F = 0,05 \text{ N}$ belastet. In einem Spannungs-Relaxations-Test wurde der Knorpel in fünf Schritten um jeweils 4% seiner Höhe komprimiert und die Kraft gemessen. Sobald der Kraftabfall weniger als $0,002 \text{ N} \cdot \text{min}^{-1}$ maß, wurde die nächste Stufe angefahren. Aus der Steigung des resultierenden Spannungs-Dehnungs-Diagramms konnte der E-Modul bestimmt werden.

3.2.3 Biochemische Analytik

Für die Beurteilung der Ergebnisse wurde die Gesamtmenge an DNA, GAG und Hydroxyprolin auf die feuchte Masse der Konstrukte bezogen.

DNA

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben wurde nach einer von Buschmann *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt [140]. Als Vorbereitung auf die GAG- und DNA-Messung wurden die Chondrone nach der Elution aus dem Alginatgel in Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert (250·g, 5 Minuten) und der Überstand entfernt. Die Probe wurde anschließend bei -20°C bis zur Messung tiefgefroren. Knorpel-Konstrukte wurden nach dem Ablösen vom Träger ebenfalls gewaschen und eingefroren.

Vor der Messung mussten die Proben in einer Papainlösung über Nacht bei 60°C unter Schütteln (Thermo Mixer compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert werden. Bei vollständigem Verdau wurden die Proben am nächsten Tag im Verhältnis 1:5 mit Verdünnungspuffer gemischt. Mithilfe eines Pipettier-Roboters (Megaflex, Tecan, Crailsheim) wurden $100 \mu\text{L}$ der Proben achtmal schrittweise in einer 96-Well-Platte im Verhältnis 1:2 mit Ansatzpuffer verdünnt, so dass letztendlich $100 \mu\text{L}$ Volumen in jedem Well vorlagen. Anschließend wurden in jedes Well $100 \mu\text{L}$ der Bisbenzimid-Gebrauchslösung pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln konnte die Fluoreszenz-Messung der Platten in einem *Multilabelcounter* (Victor 1420, Perkin Elmer, Rodgau-Jüdesheim) durchgeführt werden. Die Exzitation erfolgte bei 355 nm, die Emission bei 450 nm. Als Standard wurde DNA aus Kalbsthymus verwendet.

Zur Auswertung wurden zunächst die Mittelwerte der Doppelbestimmungen berechnet. Mittels linearer Regression konnte die Steigung der Proben und über die Steigung der Standardgerade schließlich die Konzentration ermittelt werden.

GAG

Die GAG-Konzentration wurde ebenfalls in den verdauten Proben gemessen. Dazu wurden 10-100 μL in einer *Well* einer 96-Well-Platte vorgelegt und mit destilliertem Wasser auf insgesamt 200 μL aufgefüllt. Es folgte eine siebenfache serielle Verdünnung in 1:2-Schritten. 150 μL einer Farbstofflösung aus 1,9-dimethyl-Methylenblau wurde je *Well* zugegeben und nach 30 Sekunden konnte die Extinktion bei 525 nm an dem *Multilabelcounter* gemessen werden. Als Standard diente Chondroitinsulfat. Die Auswertung wurde – wie oben beschrieben – anhand der Steigungen durchgeführt.

Hydroxyprolin

Die quantitative Bestimmung des Kollagen-Gesamtgehaltes erfolgte über die Bestimmung der kollagentypischen Aminosäure Hydroxyprolin. Für die Messung wurden 100 μL der Proben aus dem Papain-Verdau in 900 μL HCl (6,6 M, Carl Roth) gegeben und bei 110°C 16 Stunden aufgeschlossen [141]. Anschließend wurden 200 μL dieser Lösung bei 60°C über Nacht getrocknet. Das weitere Vorgehen fand im Zentrallabor „Chemische Analytik“ der TUHH statt. Der Trocknungsrückstand wurde in 100 μL destilliertem Wasser gelöst, mit 3% iger Perchlorsäure (VWR International, Darmstadt) gefällt und bei 1600·g für 3 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand wurden 200 μL Boratpuffer zugegeben. Die Derivatisierung von 10 μL der Probe wurde mit 9-Fluorenylchloroformiat durchgeführt, die Rückderivatisierung des überschüssigen FMOCs mit 1-Adamantanammoniumchlorid. Die Produkte wurden mittels HPLC aufgetrennt. Die Messung wurde fluorometrisch mit einer Anregungswellenlänge von 263 nm und einer Emissionswellenlänge von 313 nm durchgeführt.

3.2.4 Histologische Untersuchungen

Immunfluoreszenzfärbung von Cytospins gegen Kollagen Typ I und Typ II

Cytospins wurden direkt nach der Elution der Zellen aus dem Alginatgel angefertigt. Die Zellen wurden in Waschpuffer gewaschen und mit einer Zelldichte von 10000 Zellen in 200 μL Waschpuffer mithilfe einer Cytokammer (Fläche 0,79 cm^2) auf silanisierte Objektträger (HistoBond, Marienfeld) zentrifugiert (120·g, 5 Minuten). Nach dem Trocknen wurden die *Cytospins* bei -80°C gelagert.

Serienmäßig folgte nun eine Färbung mithilfe von Antikörpern gegen Kollagen Typ I und Typ II. Die Waschschritte der Färbungen wurden mit PBS durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen mit Aceton auf dem Objektträger fixiert. Die Blockierung der unspezifischen Bindungen erfolgte durch die Zugabe von porcinem Serum (10% in PBS, PAA Laboratories). Nach 30 Minuten wurden die primären Antikörper mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Kollagen Typ I: clone I-8H5 oder Kollagen Typ II: clone II-4C11, Acris Antibodies, Herford) in Antikörperver-

dünnungsmedium (Dako Cytomation, Hamburg) zugegeben und auf den Objektträgern über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit Antikörperverdünnungsmedium überschichtet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger gewaschen und der sekundäre Fluoreszenzantikörper (*Goat anti-mouse* FITC, Southern Biotechnology, Biozol, Eching) für 1 Stunde hinzugefügt. Nach erneutem Waschen folgte eine 15-minütige Färbung der Zellkerne mit 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (Dapi, 100 ng·mL⁻¹ in Methanol, Sigma-Aldrich) bei 37°C. Die *Cytospins* wurden nochmals gewaschen und mit *Mounting Medium* für Fluoreszenz (Dako Cytomation) und einem Deckglas bedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon eclipse 80i, Nikon) mithilfe der Software NIS-Elements AR. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einer Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Emission bei 515-545 nm aufgenommen. Für die Dapi-Färbung musste mit einer Anregung der Wellenlänge von 360 nm und einer Emission bei 450-460 nm gearbeitet werden. Anschließend wurden die beiden Bilder überlagert und mit einem Makro ausgewertet [142]. Es wurde angenommen, dass Zellen, die in Kollagen-positiv gefärbten Bereichen zu finden waren, auch Kollagen produzierten. Das Makro zählte die Gesamtzellzahl und die Zellen, die in den gefärbten Bereichen lagen.

Färbungen der Zellkerne auf den Trägeroberflächen

Zur Bestimmung der Zellzahl auf den Trägern nach dem Schritt b im Protokoll wurden die Zellkerne mit 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid angefärbt. Dazu wurden die Träger nach der Kultivierung mit Zellen in Formalin (4% in PBS) fixiert. Zur Färbung wurden die Träger zunächst gewaschen und dann für 15 Minuten bei 37°C in der Dapi-Lösung (100 ng·mL⁻¹ in Methanol) inkubiert. Nach einem erneuten Waschritt konnten die Zellkerne unter dem oben genannten Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregung bei einer Wellenlänge von 360 nm und einer Emission bei 450-460 nm gezählt werden.

Immunfärbung von histologischen Schnitten gegen Kollagen Typ I und Typ II

Zur Anfertigung von histologischen Schnitten mussten die Knorpel-Konstrukte zunächst vom Träger entfernt und in Paraffin (Paraplast, Carl Roth) eingeschlossen werden. Dazu wurden die in Formalin fixierten Knorpel-Konstrukte in PBS gewaschen und in Einbettkassetten (Carl Roth) verpackt. Es folgte eine Entwässerung über eine aufsteigende Isopropanolreihe (50-100% in A. dest.) für jeweils 15 Minuten. Anschließend wurden die Einbettkassetten für weitere 15 Minuten in eine Paraffin-Isopropanol-Mischung (Mischverhältnis 1:2) gelegt. Nach 48 Stunden in geschmolzenem Paraffin bei 62°C, in denen einmal das Paraffin gewechselt wurde, konnte das Knorpelgewebe in Paraffin eingegossen und gekühlt werden.

Mit einem Mikrotom (Schlittenmikrotom SM 200R, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden 5 µm dünne Schnitte angefertigt, in 42°C warmem Wasser gestreckt und auf Objektträger (HistoBond, Marienfeld) aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet.

Zur Färbung mussten die Schnitte anfangs in Xylol entparaffiniert (2 x 15 Minuten), durch eine absteigende Ethanolreihe (100-50% in A. dest.) hydratisiert und nach einer kurzen Überführung in destilliertes Wasser mit PBS gewaschen werden. Zur Entfernung der Glykosaminoglykane wurden die Schnitte mit einer Hyaluronidase Typ III-Lösung für 4 Stunden bei 37°C in einer Feuchtekkammer demaskiert. Nach einem Waschschrift schloss sich eine 30-minütige Blockierung unspezifischer Bindungen mit porcinem Serum (10% in PBS) an. Über Nacht wurden die Schnitte – wie oben beschrieben – mit den primären Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger gewaschen und mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (5 µg·mL⁻¹, *Goat anti-mouse*, [IgG (H+L)-biotin], Southern Biotech) für 1 Stunde bedeckt. Für die Färbung wurde nach einem erneuten Waschschrift ein Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Komplex (Linaris, Wertheim-Bettingen) eingesetzt. Nach 30 Minuten musste die Lösung durch Waschen entfernt werden. Schließlich wurde die Färbelösung auf die Schnitte gegeben (30 Minuten). Die Objektträger wurden zweimal für 10 Minuten mit Leitungswasser gewaschen und in destilliertes Wasser überführt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Histologien 20 Sekunden mit Hämalaun (1:4 in A. dest., Carl Roth) behandelt und anschließend 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Die gefärbten Schnitte wurden dann mit *Permanent Mounting Medium* (Dako Cytomation) und später mit Histokitt (Carl Roth) und einem Deckgläschen bedeckt. Die Aufnahmen wurden am oben genannten Mikroskop angefertigt.

Färbung der Glykosaminoglykane mit Safranin O

Für die Safranin O-Färbung wurden ebenfalls Schnitte der Gewebeprouben auf Objektträgern verwendet. Auch hier war es erforderlich, die Schnitte in Xylol zu entparaffinieren und in einer absteigenden Ethanolreihe (100-50%) zu rehydratisieren. Nach der Überführung in demineralisiertes Wasser wurden die Objektträger für 3 Minuten in eine *Fast Green*-Lösung getaucht. Anschließend wurden sie 15 Minuten in 1%iger Essigsäure gespült und 5 Minuten in Safranin O-Lösung gefärbt. Es folgte eine Dehydratisierung mit 96%igem und absolutem Ethanol. Nach einem zweimaligen Schritt in Xylol (jeweils 10 Minuten) konnten die gefärbten Schnitte mit Histokitt und einem Deckgläschen bedeckt werden.

3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop wurden von den Trägern mit und ohne Zellen vorgenommen. Bei der Untersuchung verschiedener Trägeroberflächenstrukturen wurden die Träger nach der zweiwöchigen Kultivierung (Schritt b) mit Chondrozyten mindestens für eine Nacht in Glutaraldehyd (5%ig in PBS, Sigma-Aldrich) fixiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20-80% Ethanol in PBS) entwässert. Die Träger wurden dann über Nacht in 100%igem Ethanol aufbewahrt. Anschließend musste das Ethanol schrittweise gegen n-Amylacetat (Carl Roth) ausgetauscht werden. Dazu wurden die Proben für 2 Stunden in ein Ethanol-Amylacetat-Gemisch (Mischverhältnis 1:2) und bis zur Kritischen-Punkt-Trocknung, mindestens jedoch über Nacht, in 100%iges n-Amylacetat gelegt.

Bei der Kritischen-Punkt-Trocknung wird n-Amylacetat gegen CO_2 ausgetauscht. Die Proben wurden in die mit n-Amylacetat gefüllte Druckkammer des Gerätes (Balzers, Liechtenstein) eingebracht. Anschließend wurde flüssiges CO_2 (Linde, Pullach) bis zu einem Druck von 5 MPa in die Druckkammer geleitet. Nachdem der Druck in der Kammer siebenmal auf einen Druck von 2,5 MPa reduziert worden war, wurde die Temperatur auf 40°C erhöht, so dass der Druck auf etwa 8,5 MPa stieg. Zum Schluss wurde die Temperatur auf 45°C geregelt und der Druck auf Umgebungsdruck reduziert.

Vor den Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop mussten die getrockneten Träger mit Leit-Tabs auf REM-Probenhalter (Plano, Wetzlar) geklebt und die Oberflächen mit Leit-Kohlenstoff mit den Probenhaltern verbunden werden. Die Proben wurden dann mit Gold besputtert. Folgende Einstellungen am Sputtergerät (Sputter Coater S150B, Edwards, Kirchheim) führten zu einer Schichtdicke von etwa 15 nm: Zeit 100 Sekunden, Stromstärke 15 mA, Arbeitsabstand 35 mm. Zur Aufnahme der Bilder wurde das Rasterelektronenmikroskop (Leo 1530, Zeiss, Oberkochen) verwendet. Es wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV und einem Arbeitsabstand von 7-12 mm gearbeitet.

3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde das Programm NCSS (Version NCSS 2001 and PASS Trial) eingesetzt. Zunächst wurden die Mittelwerte berechnet und eine Normalverteilung der Werte nach Kolmogorov-Smirnov überprüft. Der Mittelwertvergleich von mehreren Stichproben erfolgte dann mit einer Varianzanalyse (*One-way ANOVA*). Zunächst musste hierzu die Homogenität der Varianzen überprüft werden. Dazu wurde der Test nach Levene verwendet. Bei Normalverteilung und

Homogenität der Varianzen kam anschließend der *Tukey-Kramer Multiple-Comparison-Test* zum Einsatz. Waren diese Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert unterhalb einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ als signifikant betrachtet.

Für Korrelationsanalysen zwischen Merkmalen wurden Parameter nach Pearson mit dem Programm SPSS (Version SPSS 15.0 für Windows) auf signifikante lineare Zusammenhänge untersucht. Hier galt ebenfalls $\alpha = 0,05$.

3.4 Überblick über die durchgeführten Arbeiten

Zur Verbesserung der Knorpelqualität wurde zunächst auf Basis des vorhandenen Kultivierungsschemas eine Anpassung bestimmter Parameter (Wachstumsfaktoren, Träger, Kultivierungsdauer) im Protokoll vorgenommen. Im zweiten Schritt wurde ausgehend vom optimierten Standardprotokoll der Einfluss von hydrostatischer Druckbelastung während der Kultivierung der Knorpel-Konstrukte untersucht. Die folgenden Absätze beschreiben die genauen Inhalte dieser Arbeitsabschnitte.

Abbildung 3.4 veranschaulicht anhand eines Konstruktes, welche Parameter im Protokoll in dieser Arbeit variiert oder untersucht wurden, um die Qualität der Knorpel-Träger-Konstrukte zu verbessern und den Effekt hydrostatischer Druckbelastung zu bestimmen. Als Ausgangspunkt wurden im Kapitel 4 „Variationen des Kultivierungsprotokolls“ zunächst die Eigenschaften des nativen porcinen Knorpels als Vergleich zum *in vitro* generiertem Knorpelgewebe dargestellt. Dazu wurden der E-Modul, die Glykosaminoglykan (GAG)- und DNA-Gehalte nach Lokalisation im Kniegelenk bestimmt. Zur Anfertigung des Standardprotokolls wurden verschiedene Kombinationen von Wachstumsfaktor-Zusätzen aus IGF-I und TGF- β 1 während der Alginat- und Knorpelkultur im Medium getestet. Nach der Festlegung dieser konnten Untersuchungen zum Einfluss des verwendeten keramischen Trägers (Trägermaterial, Oberflächenstruktur, Zellbeschichtung) und zur Kultivierungsdauer in der Knorpelkultur durchgeführt werden. Im Kapitel 5 „Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit des Systems“ werden die Versuche unter dem Gesichtspunkt der Reproduzierbarkeit zusammengefasst.

Im Kapitel 6 „Hydrostatischer Druck während der Kultivierung“ wurde nach Abschluss der Arbeiten am Kultivierungsprotokoll der Effekt von hydrostatischem Druck untersucht. Dazu wurden mittels eines bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Bioreaktors (Gasdruckreaktor) die Auswirkung der Belastung in den verschiedenen Phasen des Kultivierungsschemas und die Bedeutung der Belastungsdauer auf die Matrixsynthese erforscht. Nach Festlegung der Belastungszyklen war es erforderlich, einen

neuen Druckreaktor (Kolbendruckreaktor) zu konstruieren, mit dem Experimente unter höheren Frequenzen durchgeführt werden konnten.

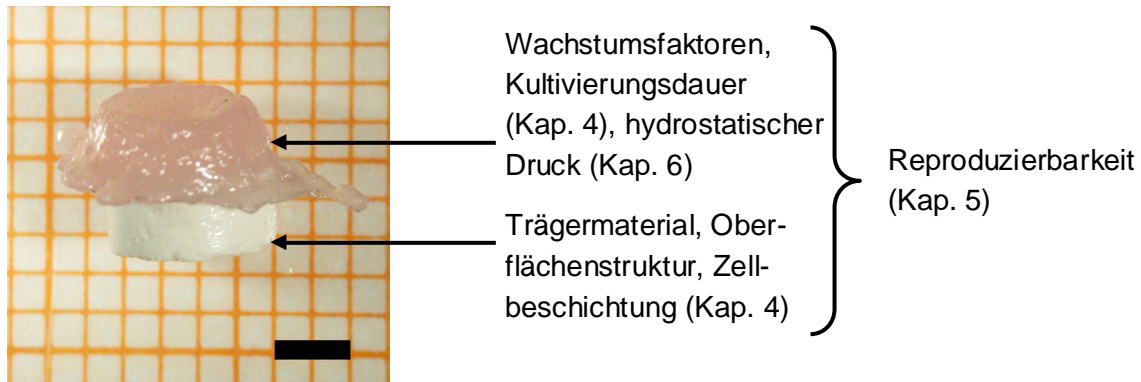


Abbildung 3.4: Übersicht über die Untersuchungen am Herstellungsverfahren von Knorpel-Träger-Konstrukten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (Skala 2 mm).

Obwohl nach jeder Kultivierung der Konstrukte die biomechanischen Parameter Masse, Höhe und E-Modul und die biochemischen Parameter GAG- und DNA-Gehalt bezogen auf das Feuchtgewicht des Knorpelgewebes bestimmt und histologische Untersuchungen (Färbungen gegen Kollagen Typ I und II, Färbung mit Safranin O) angefertigt wurden, wird in den folgenden Kapiteln in der Regel nur der E-Modul und der massebezogene GAG-Gehalt angegeben. Diese Eigenschaften spielen eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Knorpelgewebes, die vor der Implantation gewährleistet werden soll. Im Normalfall überschreitet aber die Höhe des Knorpels auf den Trägern einen ausreichenden Wert von 1 mm [141]. Der massebezogene DNA-Gehalt liegt mit durchschnittlich $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ nur 10% über dem nativen Niveau. Die histologischen Aufnahmen werden nur bei Besonderheiten oder großen Unterschieden zwischen den Versuchsbedingungen abgebildet. Während Kollagen Typ I nicht im nativen Gelenknorpel vorkommt, tritt Kollagen Typ II in großen Mengen auf und erhöht durch intermolekulare Vernetzung die biomechanische Qualität des Gewebes [108].

4 VARIATIONEN DES KULTIVIERUNGSPROTOKOLLS

Ziel dieses Kapitels war die Aufstellung eines optimierten Standardprotokolls zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten, auf dem die weiteren Versuche basieren sollten. Bei *Tissue Engineering* Methoden zur Knorpelregeneration werden drei Komponenten als wesentlich betrachtet: Zellen, bioaktive Faktoren und Biomaterialien [53, 57, 143]. Als Zellmodell wurden in dieser Arbeit ausschließlich porcine Chondrozyten verwendet, aber auch die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen oder Progenitorzellen aus dem Periost und Perichondrium ist denkbar [53, 144]. Es wird mit einer Bestimmung der Eigenschaften des nativen Knorpels als Vergleich für den kultivierten Knorpel begonnen, der aus unterschiedlichen Zonen im Gelenk entnommen wurde. Im Anschluss wird auf den Einsatz geeigneter Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Phasen des Protokolls eingegangen. Aus diesen Ergebnissen wurde das Standardprotokoll angefertigt. Letztendlich wurden der Einfluss des Trägers und der Verlauf der Knorpelqualität über die Kultivierungsdauer in der Knorpelkultur für das neue Protokoll bestimmt.

4.1 Eigenschaften des nativen Knorpels

Im Rahmen dieses Projektes wurden die mechanischen und biochemischen Eigenschaften von nativem porcinem Knorpel bestimmt [145, 146]. Knorpelproben wurden 24 Stunden *post mortem* mithilfe einer Stanze ($d = 3,6 \text{ mm}$) aus verschiedenen Zonen der Gelenke (Tabelle 4.1) von sieben Knien entnommen. Die Bereiche „belastet“ und „unbelastet“ wurden anhand der Lokalisation an den Femurkondylen festgelegt. Eine Entnahme im Bereich der Kondylen der Tibia war aufgrund der geringen Knorpelhöhe nicht durchführbar. Je Zone wurden sechs Proben ausgestanzt, von denen jeweils drei für die E-Modul-Messung und für die GAG- und DNA-Bestimmung verwendet wurden. Die Messungen wurden nicht an denselben Gewebeproben, sondern an im Kniegelenk nebeneinander liegenden Proben durchgeführt, um eine Beeinflussung der GAG-Analyse durch die E-Modul-Bestimmung auszuschließen.

Tabelle 4.1: Entnahmezonen für die Bestimmung der nativen Eigenschaften von porcinem Knorpel.

Entnahmezone	medial belasteter Bereich	medial unbelasteter Bereich	lateral belasteter Bereich	lateral unbelasteter Bereich	belastungs-unabhängiger Bereich
Femurkondyle	6 Proben	6 Proben	6 Proben	6 Proben	-
Patellarinne	-	-	-	-	6 Proben
Patella	-	-	-	-	6 Proben

Die Abbildung 4.1 stellt die Parameter geordnet nach den Entnahmezonen Patella, Patellarinne und Femurkondylen gemittelt über die sieben Knie dar. Die Patella weist etwas höhere Werte für den E-Modul, GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis auf und geringere Werte für die Mittelwerte der DNA-Gehalte. Desweiteren wurde eine *Two-way* ANOVA bezüglich der Entnahmezonen an den Femurkondylen (belastet – unbelastet, medial – lateral) durchgeführt. Nur im GAG-Gehalt zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den unbelasteten und belasteten Zonen insgesamt, der unbelasteten und belasteten Zonen auf der medialen Seite und zwischen den belasteten Zonen der medialen und lateralen Seite (Abbildung 4.2). Zwischen dem E-Modul und dem GAG-Gehalt ($r = -0,092$, $p = 0,316$) beziehungsweise dem E-Modul und dem GAG/DNA-Verhältnis ($r = 0,076$, $p = 0,406$) konnten keine linearen Korrelationen nach Pearson festgestellt werden.

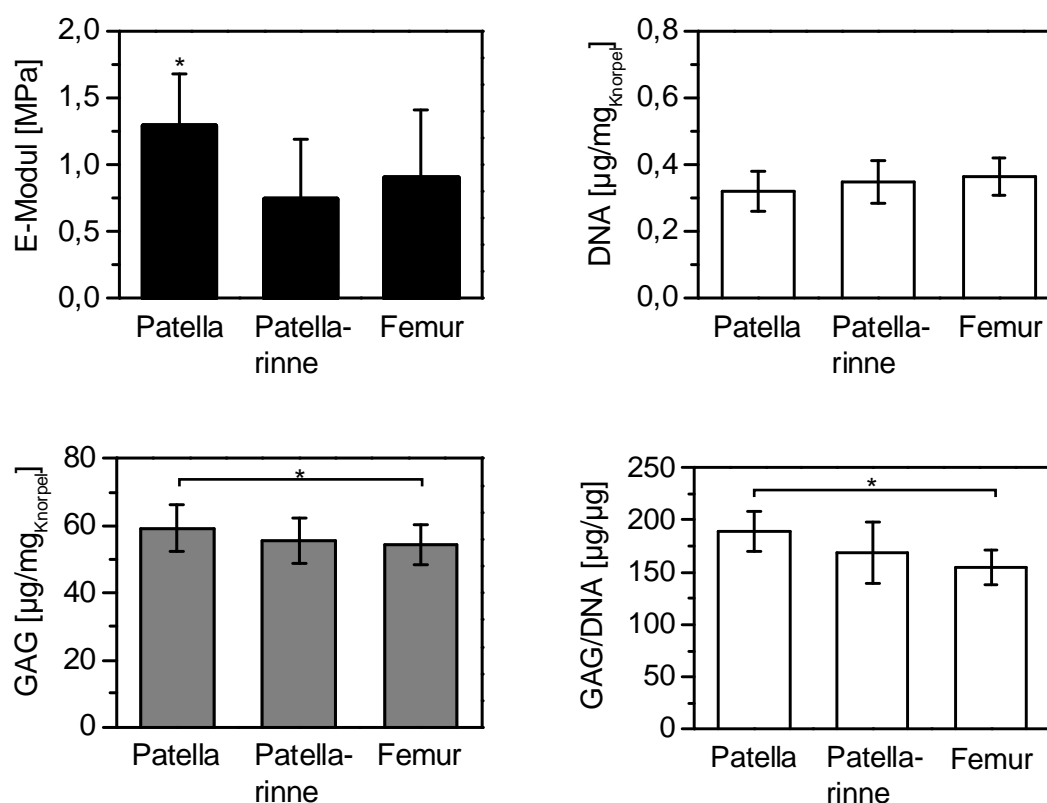


Abbildung 4.1: Mechanische und biochemische Eigenschaften vom nativen porcinen Knorpel aus dem Kniegelenk nach der Entnahmezone Patella, Patellarinne und Femurkondylen ($n = 15$ für die Patella und Patellarinne, $n = 84$ für die Femurkondylen, $\alpha = 0,05$).

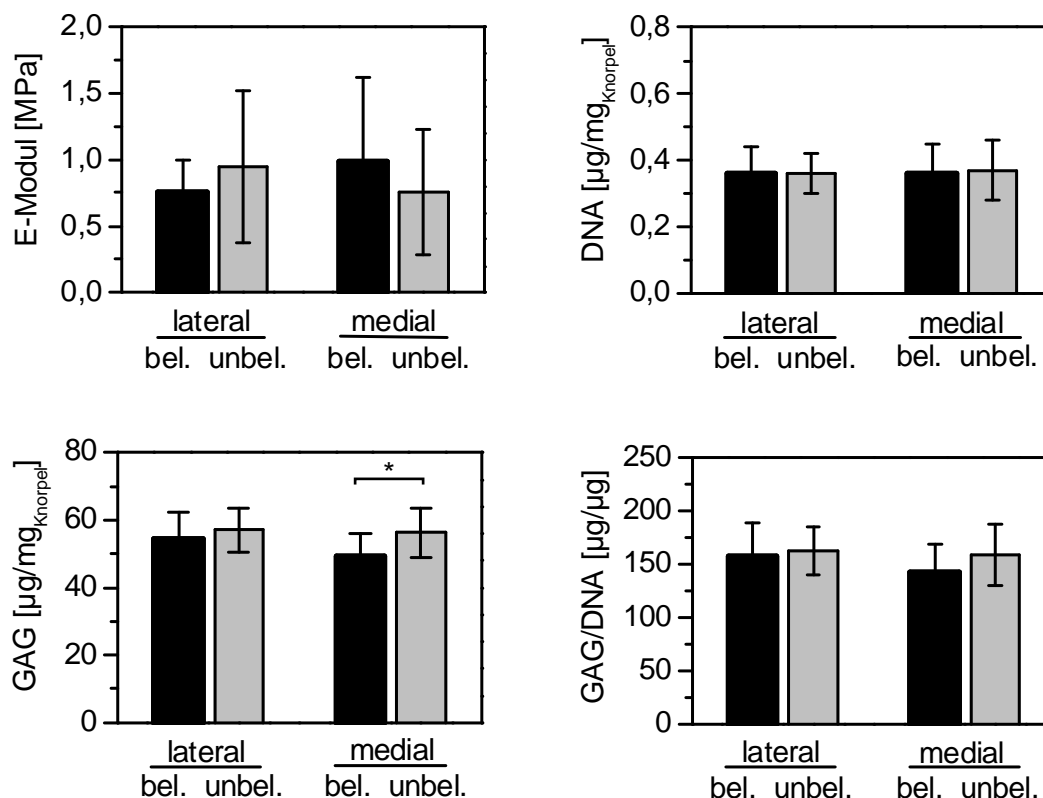


Abbildung 4.2: Mechanische und biochemische Eigenschaften vom nativen porcinen Knorpel aus dem Kniegelenk nach der Lage an den Femurkondylen: lateral belastet und unbelastet, medial belastet und unbelastet (Abkürzungen: bel. – belastet, unbel. – unbelastet, n = 21 je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

4.2 Kombinationen der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1

Erfahrungsgemäß können Wachstumsfaktoren die Redifferenzierung von expandierten dedifferenzierten Chondrozyten und die Knorpelbildung *in vitro* fördern (Kapitel 2.3). Durch diese Studie sollte eine geeignete Kombination von Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Phasen des Protokolls bestimmt werden, die zu einer möglichst großen Verbesserung der Knorpelqualität führt.

Zur Beurteilung der Wachstumsfaktor-Zusätze wurden sowohl Alginatkulturen als auch Knorpel-Konstrukte angefertigt und analysiert. Tabelle 4.2 stellt die getesteten Kombinationen während der Alginatkultur und der Knorpelkultur dar. Die Auswahl der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 basierte dabei auf der Arbeit von Dr. C. Goepfert [39]. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 als einzelner Zusatz und die Verbindung von IGF-I und TGF- β 1 während der Knorpelkultur nicht geeignet sind. Hier erfolgte die Kultivierung im Alginatgel daher entweder ohne Wachstumsfaktoren, mit $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IGF-I oder einer Kombination aus $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IGF-I und $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β 1. Die Knorpel-Konstrukte wurden schließlich ohne Wachstumsfaktoren oder mit $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IGF-I kultiviert.

Tabelle 4.2: Versuchsdesign zur Bestimmung der Wachstumsfaktor-Zusätze in der Alginate- und Knorpelkultur.

Nr.	Alginatekultur	Knorpelkultur
1.	ohne Wachstumsfaktoren	ohne Wachstumsfaktoren
2.		100 ng·mL ⁻¹ IGF-I
3.	100 ng·mL ⁻¹ IGF-I	ohne Wachstumsfaktoren
4.		100 ng·mL ⁻¹ IGF-I
5.	100 ng·mL ⁻¹ IGF-I &	ohne Wachstumsfaktoren
6.	10 ng·mL ⁻¹ TGF-β1	100 ng·mL ⁻¹ IGF-I

Alginatekultur

Um den Status der Redifferenzierung der Zellen unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren nach der Alginatekultur zu bestimmen, wurden der Prozentsatz an Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen anhand von immunhistologisch gefärbten *Cytospins* sowie das GAG/DNA-Verhältnis bestimmt (Abbildung 4.3).

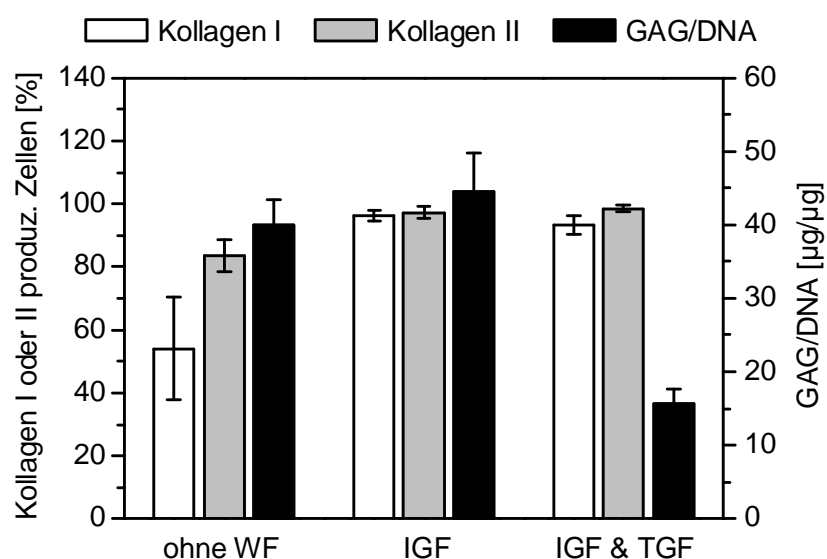


Abbildung 4.3: Anzahl der Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatekultur unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren (Abkürzung: WF – Wachstumsfaktoren, 1 Ansatz, n = 4 je Bedingung).

Es konnten keine statistischen Verfahren zur Überprüfung von Signifikanzen angewendet werden, da die hier aufgeführten Standardabweichungen lediglich durch eine wiederholte Probenahme aus demselben Ansatz entstanden. Die Abbildung 4.3 zeigt, dass die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zu weniger Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen führte als die anderen gewählten Zusätze. Nicht nur der Prozentsatz der Kollagen Typ II produzierenden Zellen stieg auf nahezu 100% unter

Gabe von IGF-I oder IGF-I und TGF- β 1, sondern auch der Kollagen Typ I-Prozentsatz. Das niedrigste GAG/DNA-Verhältnis wurde bei der Kultivierung mit IGF-I und TGF- β 1 beobachtet. Im Vergleich zu den anderen beiden Kulturen mit über $40 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ wurde hier nur ein Wert von $15,7 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ erreicht.

Knorpel-Konstrukte

Aus den Zellen der unterschiedlichen Alginkulturen wurden Knorpel-Konstrukte mit und ohne Träger angefertigt. Die Konstrukte, die während der Alginkultur ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, nahmen eine unregelmäßige Form an (Abbildung 4.4 und 4.5, jeweils Bild (1) und (2)). Die Gabe von IGF-I während der Alginkultur ergab sehr weichen und instabilen Knorpel, so dass nach drei Wochen auf den Trägern durch den Zellverlust während der Mediumwechsel nur noch sehr wenig Gewebe vorhanden war. Wegen der geringen Höhe und Masse dieser Konstrukte war eine biomechanische Auswertung nicht möglich und die biochemischen Ergebnisse unterlagen größeren Streuungen (Abbildung 4.6 und 4.7). Die größten Konstrukte und die gleichmäßigste Form konnten unter der Gabe von IGF-I und TGF- β 1 während der Alginkultur erreicht werden (Abbildung 4.4 und 4.5, jeweils Bild (5) und (6)).

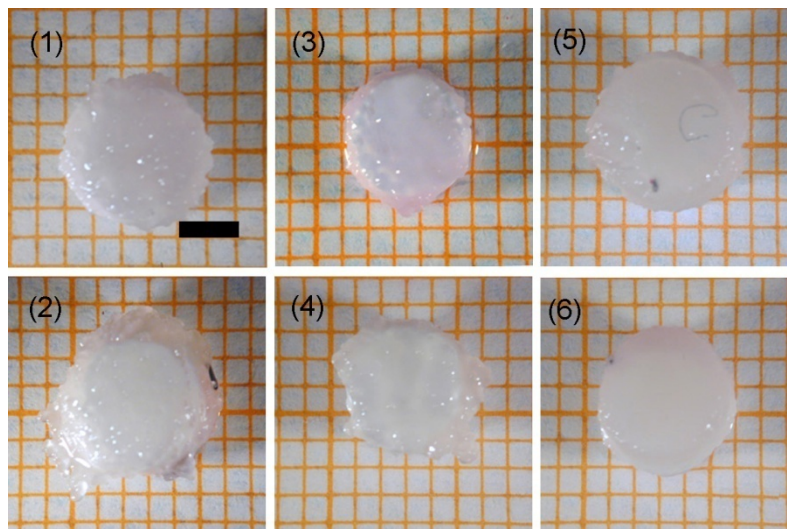


Abbildung 4.4: Aufnahmen der Knorpel-Träger-Konstrukte unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren: (1) Alginkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (2) Alginkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: IGF-I, (3) Alginkultur: IGF-I, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (4) Alginkultur: IGF-I, Knorpelkultur: IGF-I, (5) Alginkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (6) Alginkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: IGF-I (Skala 2 mm).

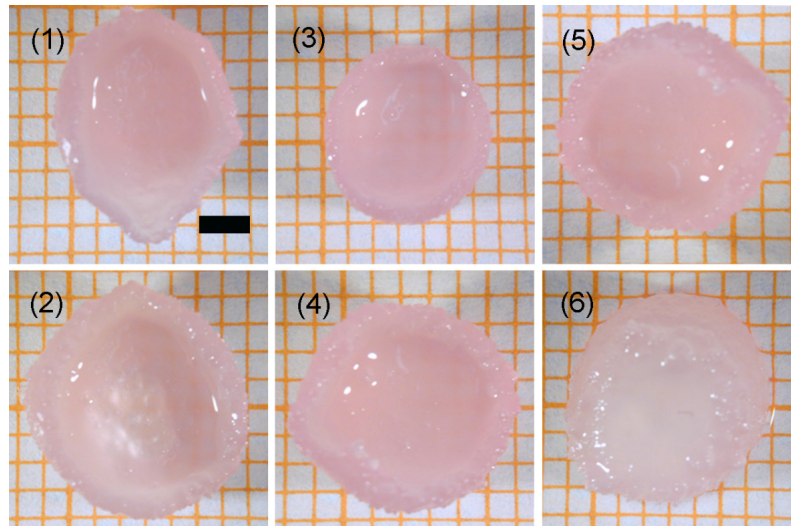


Abbildung 4.5: Aufnahmen der Knorpel-Konstrukte ohne Träger unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren: (1) Alginatkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (2) Alginatkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: IGF-I, (3) Alginatkultur: IGF-I, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (4) Alginatkultur: IGF-I, Knorpelkultur: IGF-I, (5) Alginatkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (6) Alginatkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: IGF-I (Skala 2 mm).

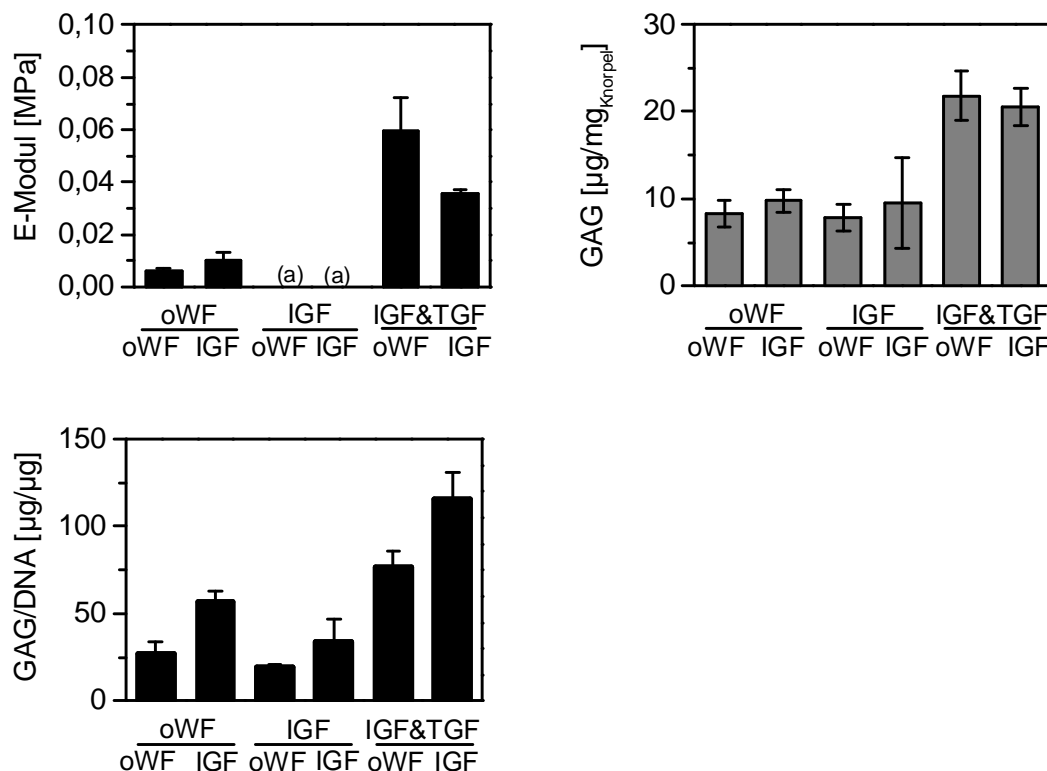


Abbildung 4.6: E-Modul, GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis der Knorpel-Träger-Konstrukte unter der Gabe verschiedener Wachstumsfaktoren während der Alginatkultur (obere Beschriftung) und der Knorpelkultur (untere Beschriftung). (a) Die E-Module waren aufgrund des geringen Gewebematerials nicht messbar. Signifikanzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet (Abkürzung: oWF – ohne Wachstumsfaktoren, n = 3 für den E-Modul, n = 5 für den GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis je Bedingung).

Beim Vergleich der E-Module stellte sich heraus, dass durch die Gabe von IGF-I und TGF- β 1 während der Alginatphase jeweils die signifikant höchsten Werte erreicht wurden (Abbildung 4.6 und 4.7, $p < 0,001$). Den höchsten E-Modul von 0,0595 MPa zeigten die Knorpel-Träger-Konstrukte, denen keine Wachstumsfaktoren während der Knorpelkultur zugesetzt wurden (Knorpel-Konstrukten ohne Träger: $E = 0,0345$ MPa mit IGF-I während der Knorpelkultur). Ein ähnliches Bild zeichnete sich für die Parameter GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis ab: Der Mediumzusatz von IGF-I und TGF- β 1 während der Alginatkultur ergab die signifikant höchsten Werte. Die höchsten GAG-Gehalte konnten dabei jeweils ohne Wachstumsfaktoren während der Knorpelkultur beobachtet werden (Konstrukte mit Träger: $21,58 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, $p < 0,001$, Konstrukte ohne Träger: $25,28 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, $p < 0,001$). Das höchste GAG/DNA-Verhältnis für die Kulturen mit Träger von $116,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ wurde unter Zusatz von IGF-I gefunden ($p < 0,0101$), ohne Träger von $102,2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren ($p < 0,001$).

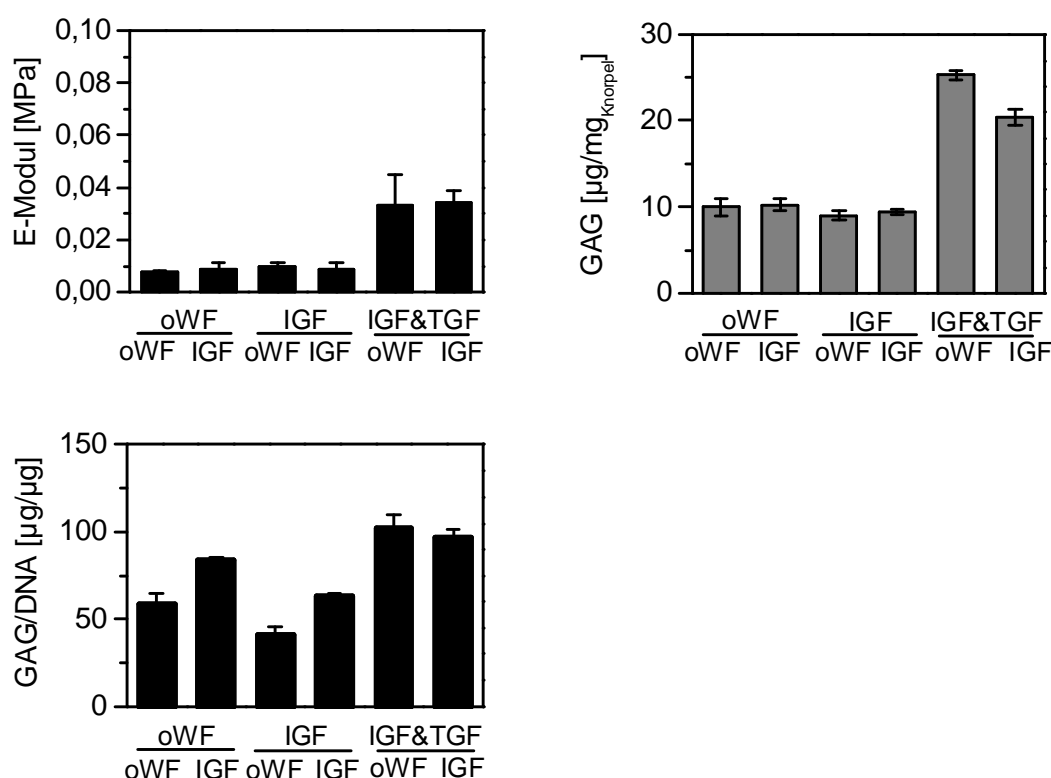


Abbildung 4.7: E-Modul, GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis der Knorpel-Konstrukte ohne Träger unter der Gabe verschiedener Wachstumsfaktoren während der Alginatkultur (obere Beschriftung) und der Knorpelkultur (untere Beschriftung). Signifikanzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet (Abkürzung: oWF – ohne Wachstumsfaktoren, $n = 3$ für den E-Modul, $n = 4-5$ für den GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis je Bedingung).

In Tabelle 4.3 wurden die Hydroxyprolin-Gehalte als Maß für das Gesamtkollagen der Konstrukte angegeben, die in der Alginatkultur mit IGF-I und TGF- β 1 und in der Knorpelkultur ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Zwischen den Konstrukten

mit und ohne Träger ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,41$). Die nativen Werte des Hydroxyprolin-Gehaltes lagen bei $14,97 \pm 2,56 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ und in Bezug auf den DNA-Gehalt bei $86,20 \pm 20,25 \mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ ($n = 3$), so dass bis zu der nativen Zusammensetzung eine Steigerung des Hydroxyprolin-Gehaltes um das Neunfache und der zellbezogenen Hydroxyprolin-Menge um das 13,7fache erforderlich ist.

Tabelle 4.3: Hydroxyprolin-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte und der Knorpel-Konstrukte, die während der Alginatkultur mit IGF-I und TGF- β 1 und in der Knorpelkultur ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Die Menge an Hydroxyprolin wurde auf die feuchte Masse des Knorpels bzw. auf die DNA-Menge bezogen und ins Verhältnis zu den nativen Werten (Angabe in Prozent) gesetzt ($n = 4$ je Bedingung).

	Hydroxyprolin [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Hydroxyprolin [%]	Hydroxyprolin/ DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	Hydroxyprolin/ DNA [%]
mit Träger	$1,71 \pm 0,26$	$11,40 \pm 1,72$	$6,02 \pm 0,35$	$6,99 \pm 1,17$
ohne Träger	$1,63 \pm 0,07$	$10,86 \pm 0,46$	$6,57 \pm 0,35$	$7,62 \pm 0,41$

Die Konstrukte unter Einfluss von IGF-I während der Alginatphase konnten aufgrund der Instabilität und geringen Größe nicht vollständig untersucht werden. Deshalb zeigt die Abbildung 4.8 nur histologische Färbungen der anderen Kultivierungsbedingungen. Unter jeder Versuchsbedingung konnte eine stärkere Färbung gegen Kollagen Typ II als gegen Kollagen Typ I beobachtet werden. Wenn die Kultivierung im Alginatgel ohne Wachstumsfaktoren erfolgte, führte dieses am Ende der Knorpelkultur zu löchrigem Gewebe (Abbildung 4.8, Bild (1) und (2)). Unter Verwendung von IGF-I und TGF- β 1 dagegen ergab sich ein homogenes Gewebe mit gleichmäßig verteilten Zellen (Abbildung 4.8, Bild (5) und (6)).

Aufgrund des höchsten E-Moduls von 0,0595 MPa (Knorpel-Träger-Konstrukte, Abbildung 4.6) wurden die im Folgenden hergestellten Konstrukte ebenfalls mit den Zusätzen IGF-I und TGF- β 1 in der Alginatkultur und ohne Wachstumsfaktoren in der Knorpelkultur kultiviert.

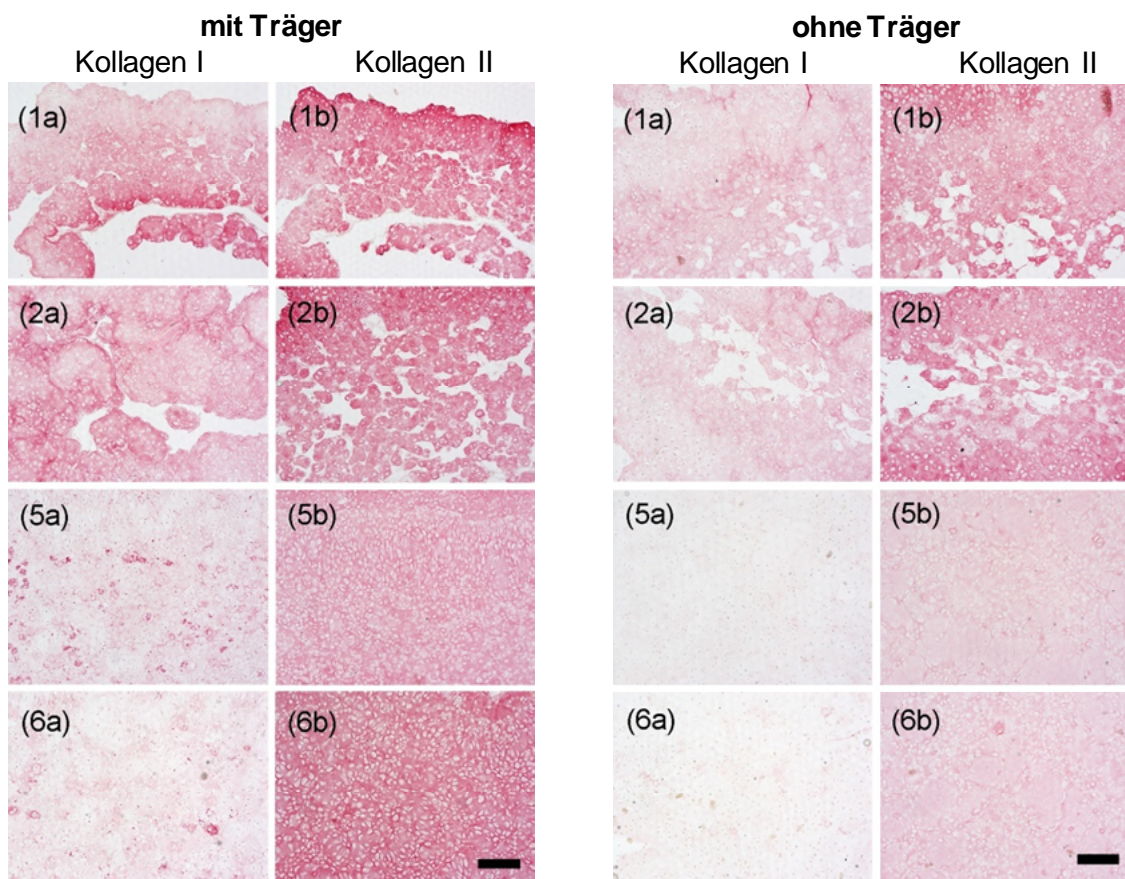


Abbildung 4.8: Immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (jeweils linke Spalte) und Typ II (jeweils rechte Spalte) von Knorpel-Träger-Konstrukten und Knorpel-Konstrukten ohne Träger unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren: (1) Alginatkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (2) Alginatkultur: ohne Wachstumsfaktoren, Knorpelkultur: IGF-I, (5) Alginatkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: ohne Wachstumsfaktoren, (6) Alginatkultur: IGF-I & TGF- β 1, Knorpelkultur: IGF-I (Skala 200 μ m).

4.3 Einfluss des Trägers

Der Träger hat einen großen Einfluss auf die Knorpelbildung und damit auf den Erfolg der Kultivierung. Auch wurde oftmals nur eine schwache Haftung zwischen Trägermaterial und dem kultivierten Knorpel erreicht, die später aber den im Kniegelenk wirkenden Kräften standhalten muss. Gemäß der Literatur aus Abschnitt 2.3.2 spielt nicht nur die chemische Zusammensetzung eines Biomaterials, sondern auch dessen Oberflächenbeschaffenheit eine Rolle. Da die Reaktion der Zellen aber je nach Zelltyp und verwendetem Trägermaterial variiert, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zum Einfluss des Trägermaterials und der Oberflächenstruktur der Hydroxylapatit-Träger auf die Qualität und Haftung des kultivierten Knorpelgewebes eingebunden. In früheren Studien des UKE konnte beobachtet werden, dass eine Zellbeschichtung des Trägers (Schritt b im Protokoll) die Haftung zwischen den aus dem Alginategel gelösten Zellen und dem damals verwendeten Träger (Calcibon[®], Biomet Deutschland) deutlich verbesserte (Dr. Goepfert, persönliche Mitteilung). Im letzten

Abschnitt dieses Kapitels wurde die Notwendigkeit und der Effekt dieser Zellbeschichtung erneut untersucht, da im Vergleich zum ursprünglichen Protokoll des UKE Kultivierungsbedingungen, der Träger und das Tiermodell vom *Minipig* zum Hauschwein geändert wurden.

Einfluss des Trägermaterials

Zunächst wird der Einfluss der Kultivierung mit einem Träger im Vergleich zur Kultivierung ohne Träger auf die Knorpel Eigenschaften dargestellt. Die Konstrukte wurden nach dem unter 3.1.2 beschriebenen Standardprotokoll angefertigt. Um festzustellen, ob der Träger lediglich durch sein Material einen Effekt auf die Knorpelqualität hat, wurden Konstrukte ohne Träger hergestellt, bei denen ein Träger während der Knorpelkultur in das Kultivierungsmedium zugefügt wurde (Bezeichnung: mit beigelegtem Träger).

Wie in der Abbildung 4.9 zu sehen ist, waren sowohl der E-Modul als auch der GAG-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte im Vergleich zu den Konstrukten ohne Träger signifikant um 71% ($p = 0,003$) beziehungsweise um 54% ($p < 0,001$) niedriger. Mit beigelegtem Träger zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im E-Modul ($p = 0,503$) und GAG-Gehalt ($p = 0,162$) im Vergleich zu den trägerlosen Konstrukten. Die Safranin O- und immunhistologischen Färbungen gegen Kollagen Typ I und II in Abbildung 4.10 zeigen gleichmäßiges Gewebe ohne Löcher. Die Intensitäten der Färbungen unterscheiden sich in allen Fällen nicht sichtbar.

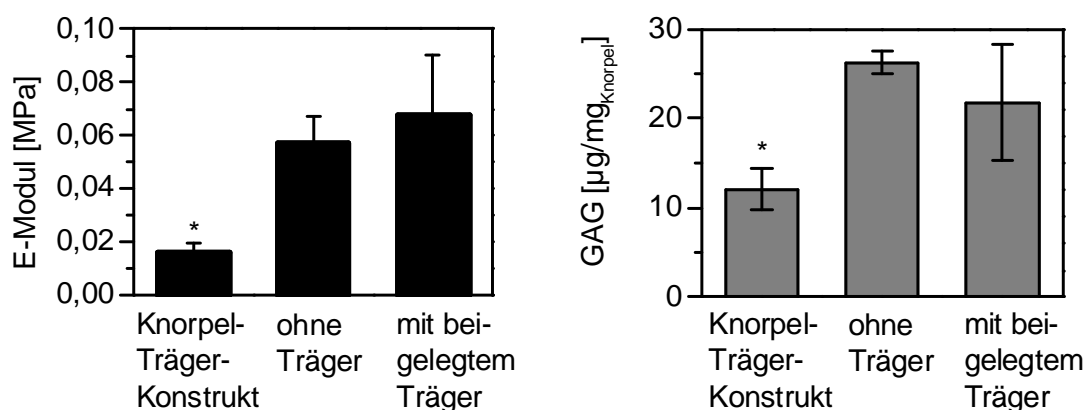


Abbildung 4.9: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Träger-Konstrukten, Knorpel-Konstrukten ohne Träger und Knorpel-Konstrukten mit beigelegtem Träger. Knorpel-Konstrukte mit beigelegtem Träger wurden ohne Träger angefertigt und mit einem zusammen kultiviert ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 3-5$ für den GAG-Gehalt, $\alpha = 0,05$).

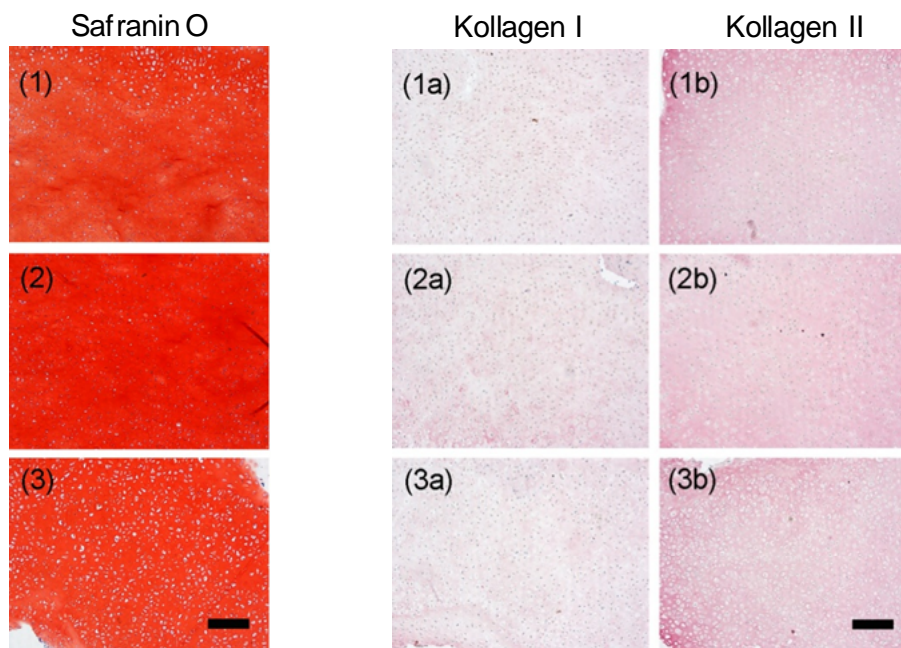


Abbildung 4.10: Safranin O-Färbung zur Visualisierung der Glykosaminoglykane und immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (linke Spalte) und Typ II (rechte Spalte) für: (1) Knorpel-Träger-Konstrukte, (2) Knorpel-Konstrukte ohne Träger, (3) Knorpel-Konstrukte mit beigelegtem Träger (Skala 200 μm).

Einfluss der Oberflächenstruktur

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde ermittelt, ob eine Modifikation der Trägeroberfläche die Haftung zwischen Knorpel und Biomaterial und die Knorpelqualität beeinflussen [147]. Zunächst wurden die Zellbesiedelung und das Zellwachstum auf den modifizierten Topographien des Sponceram HA[®]-Trägers (Schritt b im Protokoll). Im Anschluss wurden Knorpel-Träger-Konstrukte auf den Oberflächen der Träger nach dem Standardprotokoll angefertigt.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bei 1000facher Vergrößerung in Abbildung 4.12 im Bild (1) zeigt eine ungeordnete Struktur des Trägers aus gestreckten Agglomeraten mit einer Länge zwischen 2 μm und 10 μm . Die Übersicht des Trägers in Abbildung 4.11 lässt eine inhomogene Oberfläche mit Ausbrüchen mit einem Durchmesser zwischen 40-80 μm und Rillen mit einer Breite von 5-20 μm erkennen, die vermutlich während des Herstellungsprozesses entstanden sind. Durch das Schleifen mit Papier konnten die Rillen entfernt werden, die Oberfläche erscheint glatt und nur die Defektstellen blieben sichtbar. Das Schleifen mit Folie erzeugte tiefere Rillen in eine Richtung, so dass der Oberfläche eine Strukturierung gegeben wurde (Kapitel 3.1.1).

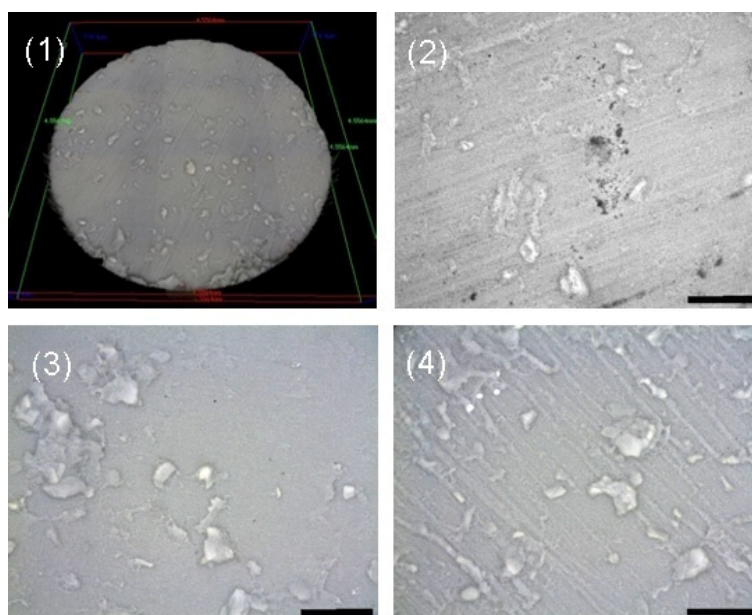


Abbildung 4.11: Aufnahmen mithilfe eines Mikroskops (InfiniteFocus, Alicona) und einer *Charge-Coupled-Device*-Kamera: (1) Übersicht des Hydroxylapatit-Trägers (Sponceram HA[®], Zellwerk, Skala 4,5 mm), (2) Oberfläche des unbehandelten Trägers, (3) Oberfläche des mit Papier geschliffenen Trägers, (4) Oberfläche des mit Folie geschliffenen Trägers (Skala 200 μm).

Nach einer zweiwöchigen Kultivierung von Chondrozyten (Schritt b im Protokoll) zeigten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.12 eine geschlossene Zellecke auf dem unbehandelten Träger. Dagegen sind deutlich weniger Zellen auf den veränderten Topographien sichtbar ($n = 2$).

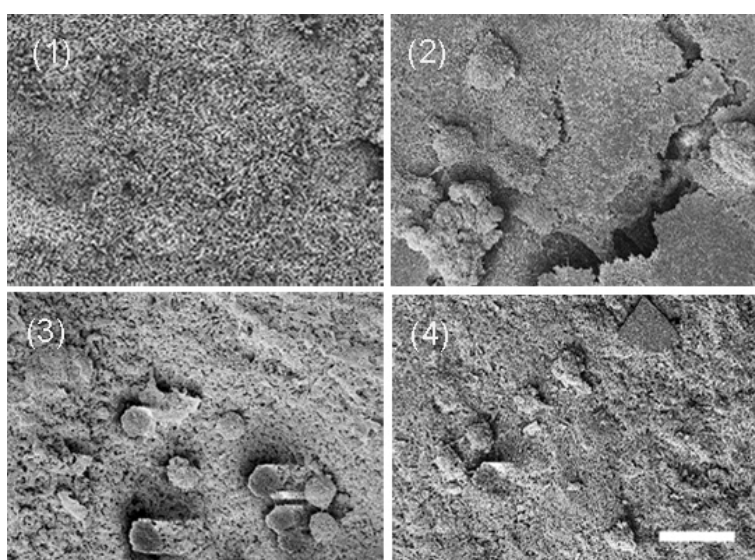


Abbildung 4.12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Trägers: (1) ohne Zellen, unbehandelte Oberfläche, (2) mit Zellen, unbehandelte Oberfläche, (3) mit Zellen, Oberfläche geschliffen mit Papier, (4) mit Zellen, Oberfläche geschliffen mit Folie (Skala 20 μm).

Nach der Bewertung der Zellbesiedelung wurden Knorpel-Träger-Konstrukte auf den drei Oberflächen angefertigt. Es konnten weder für den E-Modul noch für die biochemischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den drei Strukturen beobachtet werden (Abbildung 4.13). Die Mittelwerte der mechanischen und physikali-

schen Eigenschaften des Gewebes auf den unbehandelten Oberflächen sind zwar niedriger, jedoch konnte nur eine Signifikanz für die Höhe der Konstrukte festgestellt werden, die um durchschnittlich 57% höher auf den veränderten Oberflächen war (Tabelle 8.9 im Anhang 8.2, $p = 0,045$).

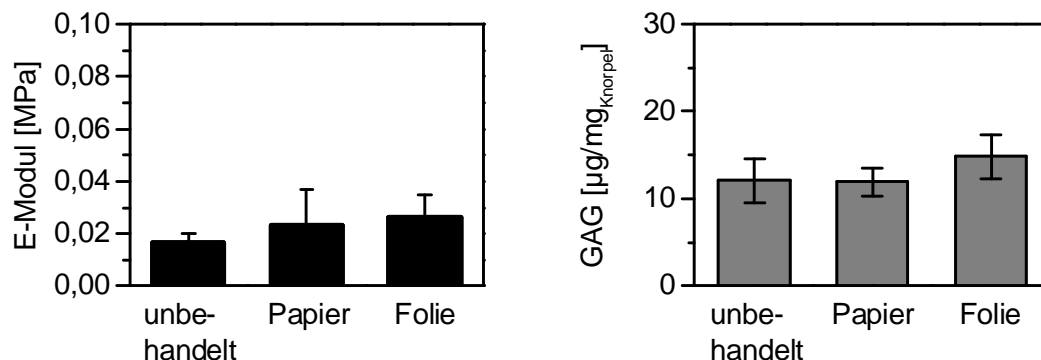


Abbildung 4.13: E-Modul und GAG-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte auf unbehandelten Trägern, mit Papier geschliffenen Trägern und mit Folie geschliffenen Trägern ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 5$ für den GAG-Gehalt je Bedingung).

Die histologischen Untersuchungen in Abbildung 4.14 zeigen für alle Bedingungen ein lückenloses, aber inhomogenes Gewebe. Auffällig ist, dass die Konstrukte, die auf den unbehandelten Trägern kultiviert wurden, eine ungleichmäßige Verteilung der Kollagene und Glykosaminoglykane aufwiesen. Die Färbung gegen Kollagen Typ II war in allen Fällen ausgeprägter als gegen Kollagen Typ I.

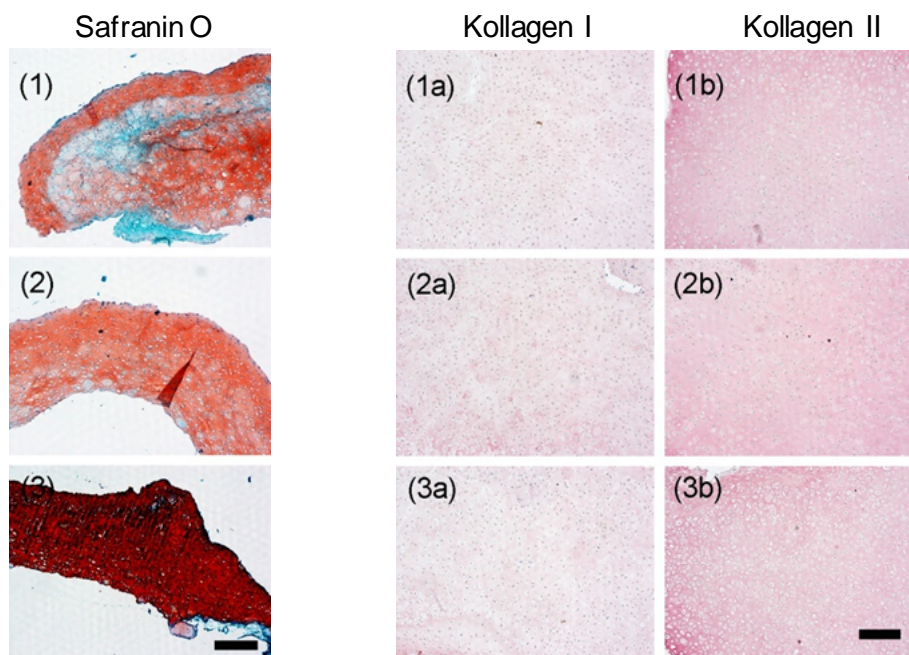


Abbildung 4.14: Safranin O-Färbung zur Visualisierung der Glykosaminoglykane und immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (linke Spalte) und Typ II (rechte Spalte) von Knorpel-Träger-Konstrukten: (1) auf unbehandelten Oberflächen, (2) auf mit Papier geschliffenen Oberflächen, (3) auf mit Folie geschliffenen Oberflächen (Skala 200 μm).

Nach der Kultivierung wurde die Haftung der Knorpel auf den Trägern mit der unter 3.2.2 beschriebenen Methode bestimmt, bei der das Knorpelgewebe mithilfe einer Pinzette vom Träger gelöst wurde. Es ergab sich eine schlechtere Haftung auf den veränderten Oberflächen im Vergleich zum unbehandelten Träger: Eine schlechte bis gar keine Haftung wurde auf den unbehandelten Oberflächen bei einem Träger und auf den mit Papier oder mit Folie geschliffenen Oberflächen bei vier Trägern von jeweils insgesamt sechs angefertigten Konstrukten beobachtet.

Anschließend wurden die auf den Trägern zurückgebliebenen Zellen durch eine Dapi-Färbung sichtbar gemacht und die Zellzahl am Mikroskop bestimmt. Es befanden sich mit $31,8 \cdot 10^3 \pm 6,1 \cdot 10^3$ Zellen pro Träger signifikant größere Zellmengen ($p < 0,001$, $n = 3$) auf dem unbehandelten Träger als auf dem mit Papier geschliffenen Träger ($6,4 \cdot 10^3 \pm 4,3 \cdot 10^3$ Zellen pro Träger) und dem mit Folie geschliffenen Träger ($5,2 \cdot 10^3 \pm 2,4 \cdot 10^3$ Zellen pro Träger).

Notwendigkeit der Zellbeschichtung (Schritt b) vor der Knorpelkultur

Im letzten Abschnitt zur Untersuchung des Trägers wurde die Notwendigkeit der Zellbeschichtung vor der Knorpelkultur am neuen Protokoll bestimmt.

In den Abbildungen 4.15 und 4.16 wird der Einfluss der Zellbeschichtung auf die Qualität der Knorpel-Träger-Konstrukte verglichen. Bei keinem der dargestellten Parameter konnte ein Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen beobachtet werden. In den histologischen Untersuchungen dagegen wurden leichte Abweichungen sichtbar. Während die Safranin O-Färbung der Glykosaminoglykane in den Konstrukten mit vorheriger Zellbeschichtung eine etwas stärkere Intensität aufwies, zeigten die Konstrukte ohne Zellschicht eine stärkere Färbung gegen Kollagen Typ II. Während des Abziehens der Knorpelstückchen vom Träger konnten keine Unterschiede in der Stärke der Haftung festgestellt werden.

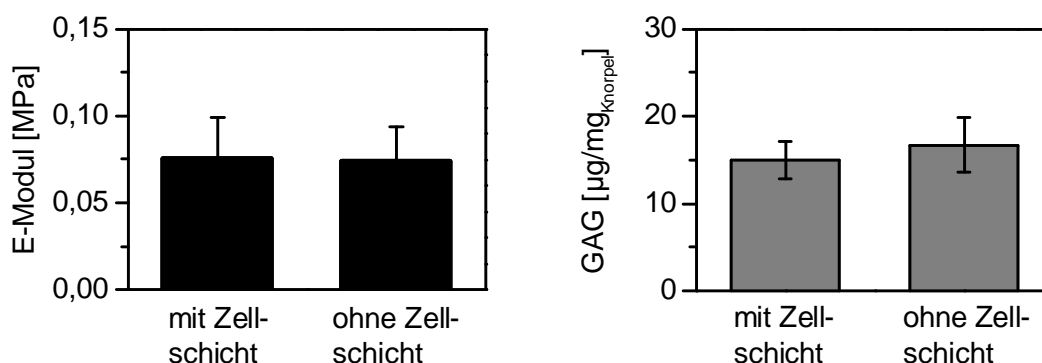


Abbildung 4.15: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Träger-Konstrukten. Dabei haben die Träger entweder – wie im Standardprotokoll vorgesehen – vor der Knorpelkultivierung eine Zellbeschichtung (Schritt b, mit Zellschicht) erhalten oder kamen erst direkt in der Knorpelkultur zum Einsatz (ohne Zellschicht), ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 4$ für den GAG-Gehalt je Bedingung).

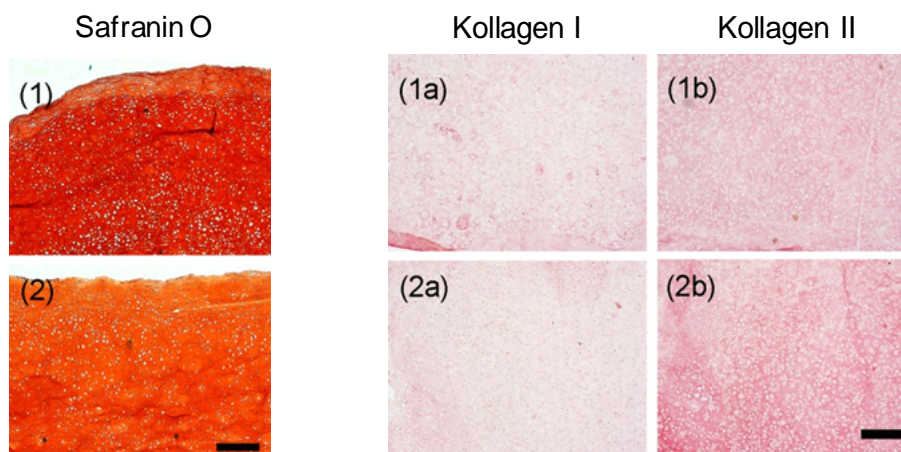


Abbildung 4.16: Safranin O-Färbung zur Visualisierung der Glykosaminoglykane und immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (linke Spalte) und Typ II (rechte Spalte) von Knorpel-Träger-Konstrukten: (1) mit vorherig aufgebracht Zellschicht, (2) ohne Zellschicht (Skala 200 µm).

4.4 Kultivierungsdauer

Nach der Festlegung des neuen Wachstumsfaktor-Zusatzes (Abschnitt 4.2) war es von Interesse, den Verlauf der Knorpelqualität über einen längeren Zeitraum und damit die optimale Kultivierungsdauer in der Knorpelkultur zu bestimmen. Für diese Studie wurden die Proliferations- und Alginatphase nach dem Standardprotokoll angefertigt. Während der sich anschließenden Knorpelkultur wurden für insgesamt fünf Wochen jede Woche sechs Konstrukte entnommen und analysiert.

Bei der Kultivierung mit einem Träger (Abbildung 4.17 und 4.18) zeigten sich nur geringe Parameterveränderungen über den Zeitraum. Die Mittelwerte der E-Module, der GAG-Gehalte und der GAG/DNA-Verhältnisse erschienen nach einer zweiwöchigen Kultivierung höher als die anderen entsprechenden Werte zu sein. Die E-Module unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,177$). Der GAG-Gehalt der zweiten Woche konnte als signifikant größer als der der ersten, vierten und fünften Woche bewertet werden ($p = 0,004$), während der DNA-Gehalt der ersten Woche signifikant höher als der der vierten und fünften Woche war ($p = 0,004$).

Ein deutlicheres Bild ergab sich in der Kultivierung ohne Träger (Abbildung 4.17 und 4.18). Über den gesamten Zeitraum nahm die Masse der Konstrukte signifikant zu. Der E-Modul und der GAG-Gehalt erreichten nach einer dreiwöchigen Kultivierung ein Maximum. Dabei war der E-Modul der dritten Woche signifikant höher gegenüber der ersten, zweiten und fünften Woche ($p < 0,001$), der GAG-Gehalt der dritten Woche gegenüber der ersten und fünften Woche ($p = 0,002$). Der DNA-Gehalt nahm über die Zeit signifikant ab ($p < 0,001$), da die Zellen vermutlich durch die gebildete extrazelluläre Matrix auseinanderrückten. Dadurch stieg das GAG/DNA-Verhältnis kontinuierlich signifikant an ($p < 0,001$).

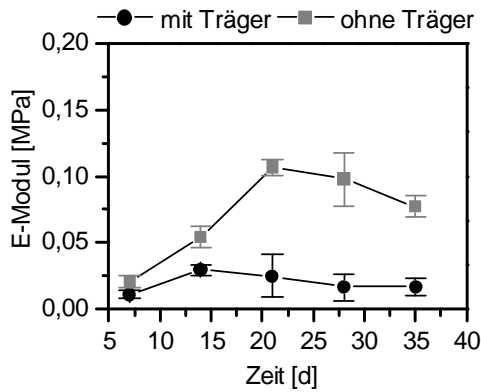
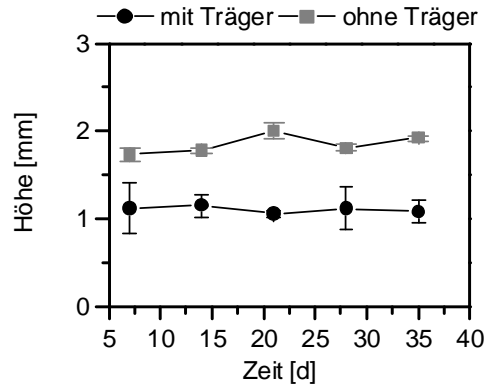
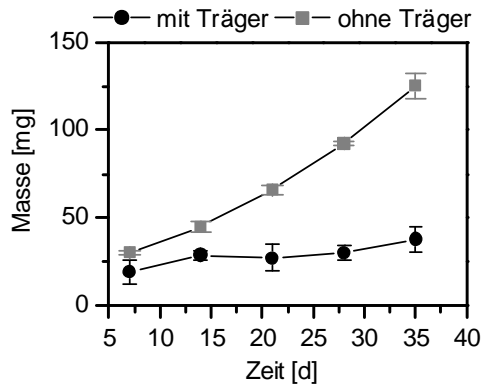


Abbildung 4.17: Masse, Höhe und E-Modul von Knorpel-Träger-Konstrukten und Knorpel-Konstrukten ohne Träger über einen Kultivierungszeitraum von 1-5 Wochen in der Knorpelkultur. Signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet ($n = 3$ für den E-Modul und die Höhe, $n = 5$ für die Masse je Bedingung).

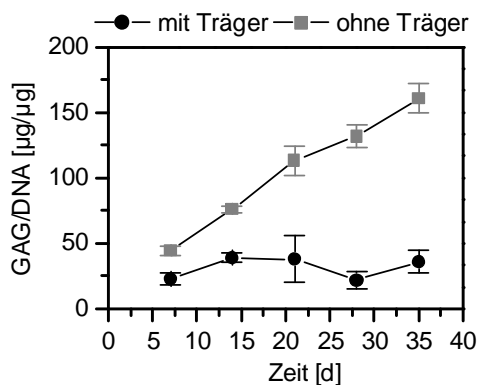
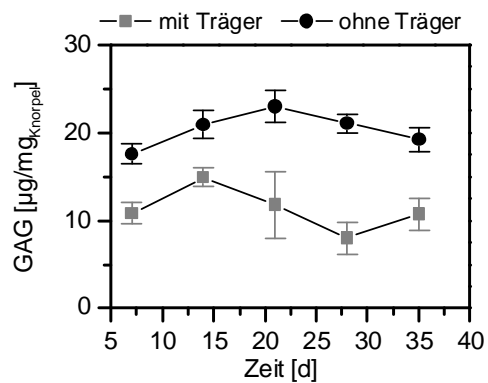
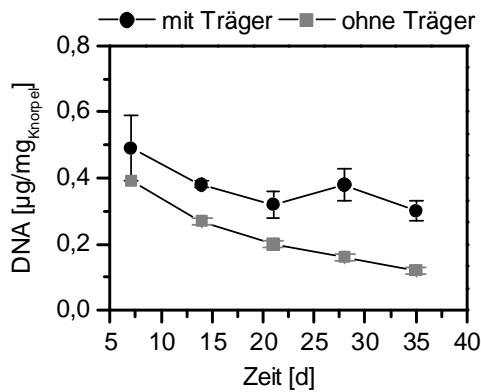


Abbildung 4.18: DNA-, GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis von Knorpel-Träger-Konstrukten und Knorpel-Konstrukten ohne Träger über einen Kultivierungszeitraum von 1-5 Wochen in der Knorpelkultur. Signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet ($n = 4-5$ je Bedingung).

Wenn nicht die massebezogenen, sondern die absoluten Mengen an gebildeter DNA betrachtet werden, wird ein leichter Anstieg der DNA über die Kultivierungsdauer sowohl mit als auch ohne Träger sichtbar (mit Träger: von $9,05 \pm 1,39 \mu\text{g}$ auf $11,58 \pm 1,62 \mu\text{g}$, ohne Träger: von $11,70 \pm 0,44 \mu\text{g}$ auf $14,57 \mu\text{g} \pm 0,54 \mu\text{g}$). Die absolute Menge an Glykosaminoglykanen unterlag Schwankungen in der Kultivierung der Knorpel-Träger-Konstrukte. Dennoch ist eine insgesamt steigende Tendenz zu erkennen (Tabelle 4.4). Währenddessen nahm in der Kultivierung der Konstrukte ohne Träger die Menge stetig zu.

Tabelle 4.4: Absolute DNA- und GAG-Mengen von Knorpel-Träger-Konstrukten und Knorpel-Konstrukten ohne Träger in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer während der Knorpelkultur (n = 4-5 je Bedingung).

Bedingung Zeit	Knorpel-Träger-Konstrukte		Knorpel-Konstrukte ohne Träger	
	DNA [μg]	GAG [μg]	DNA [μg]	GAG [μg]
1 Woche	$9,05 \pm 1,39$	$207,7 \pm 55,4$	$11,70 \pm 0,44$	$523,2 \pm 17,7$
2 Wochen	$10,61 \pm 0,44$	$399,9 \pm 22,9$	$13,02 \pm 0,45$	$994,6 \pm 61,7$
3 Wochen	$9,52 \pm 1,53$	$362,3 \pm 182,4$	$13,50 \pm 0,47$	$1568,5 \pm 84,5$
4 Wochen	$10,80 \pm 2,32$	$236,8 \pm 91,1$	$15,62 \pm 0,26$	$2005,4 \pm 124,4$
5 Wochen	$11,58 \pm 1,62$	$415,9 \pm 107,1$	$14,50 \pm 0,54$	$2339,5 \pm 134,8$

4.5 Diskussion der Variationen am Kultivierungsprotokoll

Eigenschaften des nativen Knorpels

Wie in den Abbildungen 4.1 und 4.2 zu sehen ist, zeigten sich signifikante Unterschiede in den Eigenschaften des nativen Gewebes zwischen den verschiedenen Bereichen im Gelenk. Der Knorpel der Patella besitzt ein um 20% höheres GAG/DNA-Verhältnis und einen um 10% höheren GAG-Gehalt als der Knorpel des Femurs. Auch wenn diese Unterschiede nicht sehr groß sind, ist es möglich, dass damit auch die Eigenschaften der Chondrozyten zwischen den verschiedenen Zonen im Gelenk variieren. Im Vergleich dazu fanden Froimson *et al.* [148] ein um 19% höheren Proteoglykan-Gehalt in der humane Patellarinne gegenüber der Patella selbst. Desweiteren beobachteten Lyyra *et al.* [148] einen signifikant höheren E-Modul des Knorpels aus dem Femur im Vergleich zur Patella. Dieses konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die Ursachen dieser Abweichungen konnten nicht identifiziert werden.

Für die Herstellung der Knorpel-Träger-Konstrukte wurden aufgrund der gezeigten Unterschiede zwischen den Entnahmezonen nur Zellen vom Femur der Schweine isoliert. Der Femur wurde ausgewählt, da das Konzept der Knorpel-Träger-Konstrukte in erster Linie die Regeneration dieser Zone vorsieht. Als Vergleichswerte für den kulti-

vierten Knorpel wurde daher der Durchschnitt der Eigenschaften über die sieben Knie des vom Femur präparierten Knorpels in Tabelle 4.5 berechnet.

Tabelle 4.5: Eigenschaften des porcinen nativen Knorpels am Femur (Femurkondylen und Patellarinne) als Vergleichswerte für das kultivierte Knorpelgewebe (n = 105 je Parameter).

E-Modul [MPa]	DNA-Gehalt [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{Knorpel}}^{-1}$]	GAG-Gehalt [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{Knorpel}}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
0,8710 ± 0,5089	0,36 ± 0,09	54,2 ± 9,0	156,3 ± 33,1

Mit einem spezifischen DNA-Gehalt von 6,05 pg pro Zelle [60] für porcine Chondrozyten beträgt die Zellularität $59,5 \cdot 10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{g}_{\text{Knorpel}}^{-1}$. Gegenüber den Angaben für humanen Knorpel aus der Literatur, in denen der GAG-Gehalt bei durchschnittlich $20 \mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{Knorpel}}^{-1}$, die Zellularität bei $30,5 \cdot 10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{g}_{\text{Knorpel}}^{-1}$ und das GAG/DNA-Verhältnis bei etwa $90 \mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ liegen [149], sind die Werte für porcinen Knorpel deutlich höher. Der E-Modul des humanen Knorpels wurde von Lyyra *et al.* [48] auf etwa 0,7 MPa für den Femur bestimmt und liegt damit kaum unterhalb der hier gemessenen Werte für porcines Gewebe.

Es konnten keine großen Abstufungen zwischen den belasteten und unbelasteten Zonen des Femurs beobachtet werden. Mehrere Autoren [149, 150] beschrieben jedoch in den belasteten Zonen des humanen Gelenkes deutlich höhere GAG-Gehalte und GAG/DNA-Verhältnisse. Desweiteren konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem E-Modul und dem GAG-Gehalt oder dem GAG/DNA-Verhältnis aufgestellt werden, obwohl den Glykosaminoglykanen durch ihre elektrochemischen Eigenschaften ein bedeutender Teil der Lastübernahme bei Kompressionskräften zugesprochen wird [33]. Bezüglich der Korrelation zwischen E-Modul und dem Glykosaminoglykan-Gehalt von nativem Knorpelgewebe decken sich aber auch die Ergebnisse anderer Autoren nicht. Während Kempson *et al.* [151] eine Zunahme der biomechanischen Eigenschaften mit dem GAG-Gehalt fanden, konnten Franz *et al.* [152] diesen Zusammenhang nicht feststellen. Diese Verhältnisse hängen sehr stark von der Art der Bestimmung der biomechanischen Eigenschaften ab. Beispielsweise wurden in den verschiedenen Studien entweder der Schubmodul, der Kriechmodul oder aber der E-Modul auf statische oder dynamische Weise gemessen. Die mechanischen Eigenschaften des Knorpels sind nicht nur vom GAG-Gehalt abhängig, sondern auch von dem Verhältnis aus Kollagenen und Glykosaminoglykanen sowie dem Aufbau der Matrix.

Einfluss von Wachstumsfaktoren

Für die Herstellung von osteochondralen Implantaten aus körpereigenen Zellen ist in den meisten Fällen eine Expansion der Zellen unvermeidlich, die schon bei der Entwicklung entsprechender Verfahren nicht vernachlässigt werden kann. Bei der Ver-

wendung des oben beschriebenen Kultivierungsprinzips müssen die Chondrozyten um den Faktor 50 bis 100 vermehrt werden. Während der drei dafür erforderlichen Subkultivierungsschritte dedifferenzieren die Zellen (Kapitel 2.3.1). Die Redifferenzierung, die durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren unterstützt werden kann, erfolgte dreidimensional in einem Alginatgel. Die anschließende Kultivierung der Knorpel-Konstrukte (Knorpelkultur) ist vornehmlich zur Knorpelbildung gedacht. Ziel dieser Studie war es, die passende Kombination der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 für diese Phasen des Kultivierungsprotokolls zu bestimmen.

Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass das Gewebe, das aus der Alginatkultur mit dem Zusatz IGF-I stammte, nicht brauchbar war, obwohl dieser Zusatz zu einem hohen GAG/DNA-Verhältnis von $44,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ nach der Alginatkultur führte und nahezu alle Zellen Kollagen Typ II produzierten. Nach der Zentrifugation auf den Träger blieb es weich und instabil, so dass die mechanischen Analysen am Ende der Kultivierung nicht durchgeführt werden konnten. Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [109, 112, 117] ergaben, dass die Matrixsynthese durch IGF-I stimuliert und vor allem große Mengen an Proteoglykanen gebildet werden. Möglicherweise war das Kollagennetzwerk im Verhältnis zur Glykosaminoglykan-Menge nicht hinreichend ausgebildet, um das Gewebe als Pellet auf den Trägern zusammen zu halten. Die Konstrukte ohne Träger konnten zwar bis zum Ende problemlos kultiviert werden, erreichten aber trotzdem nur ein geringen E-Modul (Abbildung 4.6). Infolgedessen demonstrieren die Daten, dass trotz der hohen Produktion an Glykosaminoglykanen in der Alginatkultur keine qualitativ hochwertigen Konstrukte erzielt werden konnten. Aus diesen Gründen sind in Tabelle 4.6 nur die Ergebnisse der Kultivierungen ohne Wachstumsfaktoren und mit IGF-I und TGF- β 1 während der Alginatkultur für die folgende Diskussion zusammengefasst.

Die Kultivierungen, die in der Alginatkultur ohne Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden, resultierten vorwiegend in ungleichmäßigen Konstrukten sowohl bei Verwendung eines Trägers als auch ohne Träger. Der E-Modul mit durchschnittlich $0,008 \text{ MPa}$ erreichte nur 1% des nativen Wertes. Im Gegensatz dazu wurden die signifikant höchsten E-Module, Glykosaminoglykan-Gehalte und GAG/DNA-Verhältnisse aus dem Alginatgel mit IGF-I und TGF- β 1 gewonnen, obwohl in der Alginatkultur nur $15,7 \mu\text{g GAG pro } \mu\text{g DNA}$ gebildet wurden. Das betraf sowohl die Kultivierung mit als auch ohne Träger.

Letztendlich wurde im Standardprotokoll die Verwendung von IGF-I und TGF- β 1 während der Alginatkultur und die wachstumsfaktorfreie Kultivierung während der Knorpelkultur festgelegt, da hier zwar nicht die höchsten GAG/DNA-Verhältnisse, aber der höchste E-Modul erreicht wurde und die implantierten Konstrukte im Gelenk hohen biomechanischen Anforderungen genügen müssen. Diese Knorpel-Träger-

Konstrukte wiesen einen E-Modul von 7%, einen GAG-Gehalt von 40% und ein GAG/DNA-Verhältnis von 50% des nativen Niveaus auf. Im Vergleich dazu erreichten die Konstrukte ohne Träger, die wegen der Vergleichbarkeit zu den Knorpel-Träger-Konstrukten im weiteren Verlauf auch unter dem genannten Wachstumsfaktor-Zusatz kultiviert wurden, 4% des nativen E-Moduls, 47% des nativen GAG-Gehaltes und 66% des nativen GAG/DNA-Verhältnisses. Bezugnehmend auf die beschriebenen Ergebnisse näherten sich die Konstrukte zwar durch die Gabe von Wachstumsfaktoren dem GAG-Gehalt, aber nicht der Steifigkeit des nativen Gewebes. Dieses lässt sich unter anderem auf das unzureichend ausgebildete Kollagennetzwerk zurückführen. Der Hydroxyprolin-Gehalt als Maß für das Gesamtkollagen betrug nur 11% vom nativen Knorpel. Es kommt hinzu, dass der Kollagen Typ I-Anteil im kultivierten Gewebe im Vergleich zum nativen Knorpel deutlich erhöht war, wie anhand der immunhistologischen Färbungen festgestellt wurde. Die Färbungen (Abbildung 4.8) zeigten dennoch ein homogenes Gewebe ohne Löcher, in dem sowohl Glykosaminoglykane als auch Kollagen Typ II nachgewiesen werden konnten. Jedoch ist keine Einteilung in die knorpelspezifischen Zonen erkennbar und die Chondrozyten sind – anders als im nativen Gewebe (Abbildung 2.4) – einzeln verteilt.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse bei der Kultivierung von Knorpel-Konstrukten unter verschiedenen Wachstumsfaktor-Zusätzen (Abkürzung: WF – Wachstumsfaktoren, n = 3 für den E-Modul und die Höhe, n = 4-5 für die Masse, den DNA-Gehalt, GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis je Bedingung).

	Alginate/ Knorpel- kultur	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
mit Träger	ohne WF/ ohne WF	24,7 $\pm 3,6$	0,4 $\pm 0,0$	6,4 $\pm 1,0$	0,34 $\pm 0,13$	8,4 $\pm 1,6$	26,6 $\pm 7,0$
	ohne WF/ IGF-I	56,3 $\pm 15,0$	1,1 $\pm 0,1$	9,8 $\pm 0,3$	0,17 $\pm 0,02$	9,8 $\pm 1,3$	56,6 $\pm 6,6$
	IGF&TGF/ ohne WF	44,8 $\pm 7,5$	1,1 $\pm 0,0$	59,5 $\pm 1,3$	0,29 $\pm 0,02$	21,9 $\pm 2,8$	76,9 $\pm 8,6$
	IGF&TGF/ IGF-I	76,9 $\pm 13,0$	1,1 $\pm 0,0$	35,7 $\pm 1,0$	0,18 $\pm 0,02$	20,6 $\pm 2,1$	116,1 $\pm 15,4$
ohne Träger	ohne WF/ ohne WF	94,9 $\pm 6,2$	0,9 $\pm 0,1$	7,4 $\pm 1,0$	0,17 $\pm 0,02$	10,0 $\pm 1,0$	58,9 $\pm 5,8$
	ohne WF/ IGF-I	147,2 $\pm 0,9$	1,1 $\pm 0,0$	8,6 $\pm 3,0$	0,12 $\pm 0,01$	10,3 $\pm 0,7$	83,5 $\pm 2,0$
	IGF&TGF ohne WF	102,2 $\pm 7,3$	1,8 $\pm 0,0$	33,1 $\pm 1,2$	0,25 $\pm 0,02$	25,3 $\pm 0,6$	102,2 $\pm 7,3$
	IGF&TGF/ IGF-I	99,7 $\pm 3,1$	1,7 $\pm 0,1$	34,2 $\pm 5,0$	0,21 $\pm 0,04$	20,5 $\pm 1,0$	96,6 $\pm 4,4$

In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass die genannten Phasen sich gegenseitig beeinflussen, so dass für die Bestimmung der Wachstumsfaktor-Zusätze immer die Kombination der beiden Schritte berücksichtigt werden muss. Die Betrachtung der einzelnen Schritte führt zu anderen Schlussfolgerungen, so dass auch in folgenden Versuchen, die die Wachstumsfaktoren betreffen, dieses Versuchsdesign beibehalten werden muss. Außerdem wurde festgestellt, dass die Zellen während der Alginat- und der Knorpelkultur unterschiedlich auf die Wachstumsfaktoren reagieren, da das Verhalten der Zellen vom Differenzierungszustand abhängig sein kann.

Einfluss des Trägers

Oftmals stellt eine nicht ausreichende Fixierung von *in vitro* Knorpelgewebe nach der Implantation in das Gelenk ein Problem dar. Daher beruht das vorliegende Prinzip auf der Herstellung von osteochondralen Implantaten, die aus einem keramischen Träger zur Verankerung in den subchondralen Knochen und einer kultivierten Knorpelschicht bestehen. Grundsätzlich sind auch die Anforderungen an die Haftung zwischen Träger und Knorpel sehr hoch, da die Verbindung den hohen Kräften im Kniegelenk standhalten muss. In einer vorangegangenen Studie [39, 153, 154] wurden Träger basierend auf Hydroxylapatit mit einer mikroporösen Struktur aus einer Reihe von chemisch und strukturell unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien ausgewählt.

Wie die Versuche der letzten Jahre [155] gezeigt haben, verschlechtert der Träger die Qualität des Knorpelgewebes deutlich. In Abbildung 4.9 ist dieser Sachverhalt dokumentiert. Der E-Modul und der GAG-Gehalt waren nach der Kultivierung auf dem Träger um 71% beziehungsweise um 54% im Vergleich zur trägerlosen Herstellung niedriger. Für diese Tatsache sind verschiedene Gründe denkbar, die durch die unter 4.3 beschriebenen Versuche am zuvor ausgewählten Träger Sponceram HA[®] weiter untersucht wurden.

Es ist möglich, dass die Haltevorrichtung (Abbildung 3.2) und der Träger die Nährstoff- und Gasdiffusion von der unteren Seite aus zu dem kultivierten Knorpel begrenzen (Annahme 1). Dieses kann zu einer Unterversorgung des Knorpelgewebes führen. Die Konstrukte ohne Träger schwimmen dagegen frei im Medium und werden gleichmäßig versorgt. Die histologischen Untersuchungen der Knorpel-Träger-Konstrukte in Abbildung 4.10 weisen jedoch kein löchriges Gewebe auf. Daraus kann gefolgert werden, dass ausreichend Nährstoffe bei den Zellen ankommen, so dass diese den Stoffwechsel aufrecht erhalten können und nicht absterben. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Limitierung Effekte auf die Zellen hat und damit die Qualität der extrazellulären Matrix beeinflusst. Neben der schlechten Versorgung mit Nährstoffen wie Glucose oder Aminosäuren werden eventuell Stoffwechselprodukte wie Laktat und CO₂ nur schleppend abtransportiert. Dieses

würde zu einer lokalen Senkung des pH-Wertes im Knorpel führen, so dass beispielsweise über die daraus resultierende lokale Abnahme des osmotischen Druckes Reaktionen der Zellen hervorgerufen werden [156].

Der Herstellungsprozess der Knorpel-Träger-Konstrukte wirkt sich negativ aus (Annahme 2). Das Zentrifugieren der aus dem Alginatgel gelösten Zellen in dem Hülsen- und Teller-System resultierte in einem Verlust der Zellsuspension von $22,6 \pm 28,2\%$ ($n = 18$). Dieses entspricht durchschnittlich $4 \cdot 10^5$ Zellen, die bei der Bildung des Pellets auf dem Träger verloren wurden. Das Knorpelgewebe ohne Träger dagegen wurde in einem Falcon-Röhrchen angefertigt und nach zwei Tagen in eine 12-Well-Platte umgesetzt, so dass kein Zellverlust auftrat.

Möglicherweise hat die chemische Zusammensetzung des Trägermaterials einen Einfluss auf die Zellen (Annahme 3). Eine Zusammensetzung, die keine negative oder gar toxische Wirkung auf die Zellen hat, ist selbstverständlich eine Voraussetzung im *Tissue Engineering*. Die oben erwähnte Studie zur Auswahl des Trägermaterials hatte aber gezeigt, dass sogar verschiedene Calciumphosphate als Trägermaterialien, die sich bezüglich ihrer Zusammensetzung im molaren Ca:P-Verhältnis voneinander unterscheiden, einen Einfluss auf die Knorpelqualität haben [153, 154]. So war das GAG/DNA-Verhältnis des Knorpelgewebes auf Hydroxylapatit-Trägern im Vergleich zu Trägern aus β -TCP (Tricalciumphosphat) höher. Reines Hydroxylapatit, das in großen Mengen natürlich im menschlichen Körper vorkommt, weist eine ausgezeichnete Bioverträglichkeit auf. Um auszuschließen, dass eventuelle Verunreinigungen durch den Herstellungsprozess, die in Abbildung 4.11 auf der Oberfläche des Trägers sichtbar sind, einen negativen Einfluss haben, wurden Knorpel-Konstrukte, die wie beschrieben in einem Falcon-Röhrchen hergestellt wurden, zusammen mit Trägern kultiviert. Durch diese Form der Kultivierung ergaben sich keine Unterschiede in den physikalischen, biomechanischen und biochemischen Parametern (Tabelle 8.10 im Anhang 8.2), so dass das Trägermaterial selbst keinen entsprechenden Effekt hat. Jedoch konnte ein negativer Einfluss des Trägers auf den pH-Wert festgestellt werden. Der pH-Wert von PBS erhöhte sich durch die Anwesenheit eines Trägers über Nacht von 7,4 auf 7,8. Während der Kultivierung im Inkubator konnte aufgrund des HEPES- und Carbonat-Puffers keine Zunahme des pH-Wertes im Medium beobachtet werden. Jedoch ist eine lokale Erhöhung nahe dem Träger, die nicht gemessen werden kann, nicht auszuschließen. Dieser Effekt wurde in der erwähnten Trägertestung nicht beobachtet und ist daher vermutlich chargenabhängig.

Die Oberflächenstruktur des Trägers könnte einen Einfluss auf die Knorpelqualität haben (Annahme 4). Studien zur Reaktion von Zellen auf die physikalischen Strukturen von Biomaterialien umfassen Untersuchungen zur Partikelgröße, Porosität und Oberflächentopographie [128, 157, 158]. Bei der vorliegenden Studie zum Einfluss der

Oberflächenstruktur sollte ein Überblick geschaffen werden, ob durch modifizierte Oberflächentopographien die Haftung und die Qualität der Konstrukte verändert werden. Um einen zusätzlichen Einfluss des Trägermaterials auszuschließen, wurden ausnahmslos die Träger Sponceram HA[®] der Firma Zellwerk einer Charge verwendet. Diese konnten aufgrund ihrer geringen Stabilität nur durch einfaches Schleifen mit Papier und Folie bearbeitet werden.

Im ersten Schritt wurden Chondrozyten in einer Monolayer auf die Träger ausgesät (Schritt b des Protokolls). Nach zwei Wochen war auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.12) eine geschlossene Zellschicht auf den unbehandelten Trägern sichtbar, während sich deutlich weniger Zellen auf der Oberfläche der behandelten Träger befanden. Eine Zellzählung auf den unbehandelten Trägern mithilfe einer Dapi-Färbung ergab $2,9 \cdot 10^5 \pm 0,4 \cdot 10^5$ Zellen pro Träger ($n = 4$). Mit einer Anfangszellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen fand also trotz der beobachteten geschlossenen Zellschicht nur ein geringes Wachstum statt, während demzufolge auf den behandelten Trägeroberflächen die ausgesäten Zellen abstarben oder nicht adhären konnten. Daraus kann abgeleitet werden, dass Chondrozyten unter den beschriebenen Bedingungen raue und inhomogene Oberflächen zur Adhäsion bevorzugen. Die Ergebnisse anderer Studien bezüglich der Adhäsion und Proliferation erscheinen widersprüchlich. Während Boyan *et al.* [129] weniger Chondrozyten aus der Wachstumsfuge und dem Epiphysenknorpel auf rauen im Vergleich zu glatten Titan-Oberflächen fanden, beobachteten Deligianni *et al.* [124] einen Anstieg der Zelladhäsion und Proliferation von Knochenmarkstammzellen auf raueren Oberflächen aus Hydroxylapatit. Die variierenden Ergebnisse kamen möglicherweise durch unterschiedliche Biomaterialien, Größenordnungen der Rauigkeit, Zelltypen, Spezies und Alter der Donoren, Differenzierungsstadien oder Kultivierungsbedingungen zustande.

Im Anschluss wurden Knorpel-Träger-Konstrukte auf den verschiedenen Oberflächen angefertigt. Die Haftung des Knorpels auf den modifizierten Strukturen war weniger stark als auf den unbehandelten Oberflächen. Dieses kann mit den Ergebnissen aus der Zellvermehrung vereinbart werden, bei denen auf den unbehandelten Oberflächen eine höhere Anzahl an Zellen gefunden werden konnte. Desweiteren blieben nach der Trennung des Knorpels vom Träger mehr als fünfmal so viele Zellen auf dem unbehandelten Träger im Vergleich zu den modifizierten Topographien zurück. Möglicherweise hafteten die Zellen auf dieser Oberfläche stark, so dass die untersten Zellschichten beim Abziehen des Gewebes auf dem Träger hängen blieben.

Die Mittelwerte der Höhen, Massen und E-Module des Knorpels auf den unbehandelten Trägern erreichten etwas niedrigere Werte im Vergleich zu den modifizierten Oberflächen, allerdings bestand nur eine signifikante Differenz in der Höhe. Die histologischen Färbungen zeigten eine ungleichmäßigere Verteilung von Kollagenen und

Glykosaminoglykanen im Gewebe, das auf den unbehandelten Oberflächen kultiviert wurde (Tabelle 4.7). In den Grenzschichten zum Träger selbst war unter keiner Versuchsbedingung eine Abstufung zum restlichen Gewebe sichtbar, so dass die Unterschiede in den Parametern im gesamten Gewebe bestanden.

Tabelle 4.7: Qualitative Zusammenfassung der Eigenschaften der kultivierten Knorpel-Träger-Konstrukte unter Verwendung verschiedener Trägeroberflächen (Abkürzungen: + – positive Ergebnisse, - – negative Ergebnisse, +/- – keine Unterschiede, ++ – signifikant höhere Ergebnisse).

Oberflächen-modifikation	unbehandelter Träger	Träger geschliffen mit Papier	Träger geschliffen mit Folie
Oberflächenstruktur	rau und inhomogen	glatt	strukturiert
Proliferation (Monolayer)	+	-	-
Haftung	+	-	-
Biomechanische Parameter	-	+	+
Biochemische Parameter	+/-	+/-	+/-
Histologie	-	+	+
Zellzahl nach Trennung Knorpel/Träger	++	-	-

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Modifizierung der Oberfläche zu kleinen Veränderungen in der physikalischen Qualität der Konstrukte, in der Verteilung von Kollagenen und Glykosaminoglykanen, in der Haftung zwischen Knorpel und Träger und in der Adhäsion und/oder Proliferation von Chondrozyten führte. Diese Studie lieferte erste Ergebnisse zum Einfluss der Oberflächenstruktur von Sponceram HA[®] auf die Knorpelbildung der Konstrukte. Zur Interpretation der Effekte und Verbesserung der Knorpelqualität *in vitro* durch die Oberflächentopographie werden jedoch weiterführende Versuche benötigt.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wurden die Notwendigkeit und der Einfluss der Zellbeschichtung, die ursprünglich zur Verbesserung der Haftung zwischen Träger und Knorpel eingeführt wurde, nach den Veränderungen im Kultivierungsprotokoll erneut untersucht. Das unphysiologische Wachstum in einer Monolayer auf der Oberfläche des Biomaterials könnte zu einer weiter fortschreitenden Dedifferenzierung der sedimentierten Zellen führen. Dedifferenzierte Zellen wiederum geben möglicherweise in der sich anschließenden Knorpelkultur Signale an die aus dem Alginategel gelösten Zellen weiter, die sich negativ auf die Redifferenzierung und die Knorpelbildung auswirken können. Aus diesen Gründen wird empfohlen, den Schritt b aus dem Protokoll

zu streichen. In Abbildung 4.15 und 4.16 sind keine deutlichen Abweichungen zwischen den Kultivierungen mit und ohne Zellbeschichtung sichtbar. Da auch keine Unterschiede in der Haftung zwischen Träger und Knorpel bestanden, ist eine Zellbeschichtung in diesem Stadium der Arbeiten nicht erforderlich. Dennoch wurde in den folgenden Versuchen der Schritt b weiterhin durchgeführt, da die Abschaffung eine grundlegende Änderung im Standardprotokoll bedeutet hätte, so dass keine Vergleichbarkeit zu den vorherigen Versuchen gegeben wäre.

Einfluss der Kultivierungsdauer

Das Protokoll schreibt eine dreiwöchige Kultivierung der Konstrukte in der Knorpelkultur vor. Mit der Verbesserung der Knorpelqualität der letzten Jahre ist jedoch nicht mehr sichergestellt, ob es sich bei diesem Kultivierungszeitraum um eine optimale Ausschöpfung des derzeitigen Protokolls handelt. Die *in vitro* Züchtung vor der Implantation soll in Bezug auf klinische Anwendungen so kurz wie möglich gehalten werden. Damit würden sich auch der Aufwand und die Kosten in der Forschung beträchtlich verringern. Zusätzlich kann die zeitliche Entwicklung des Knorpelgewebes Anhaltspunkte für Variationen anderer Parameter im Kultivierungsprotokoll schaffen.

Die Qualität der Knorpel-Träger-Konstrukte zeigte keine starken Veränderungen über den Kultivierungszeitraum. Der E-Modul und der GAG-Gehalt wiesen schon nach einer zweiwöchigen Kultivierung ein wenig prägnantes Maximum auf, so dass eine längere Kultivierungsdauer über die vorgeschriebenen drei Wochen hinaus nicht sinnvoll erscheint.

In ähnlicher, aber ausgeprägterer Weise verhielten sich dagegen die Knorpel-Konstrukte ohne Träger. Die Masse und das GAG/DNA-Verhältnis stiegen über die gesamte Dauer von fünf Wochen an, während der GAG-Gehalt und der E-Modul nach drei Wochen ein Maximum erreichten und anschließend wieder deutlich abnahmen. Der DNA-Gehalt sank über den gesamten Zeitraum, jedoch nicht die absolute DNA-Menge im Knorpel, so dass nicht von einem Absterben der Zellen ausgegangen werden kann.

5 EINFLÜSSE AUF DIE REPRODUZIERBARKEIT DES SYSTEMS

Aufgrund der hohen Abweichungen in den Niveaus der mechanischen und biochemischen Parameter der Knorpel-Konstrukte, die bei nacheinander durchgeführten Versuchen unter identischen Bedingungen auftraten, kann auf eine unzureichende Reproduzierbarkeit des Verfahrens geschlossen werden. Die Ergebnisse der oben dargestellten Studien stammten jeweils aus einem Experiment, um den Sachverhalt der beobachteten Phänomene sicherzustellen und falsche Schlussfolgerungen durch gegebenenfalls versuchsabhängige Schwankungen auszuschließen. Parallel zu jedem Versuch wurden Kontrollkultivierungen durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen abzuschätzen. In diesem Kapitel wird zunächst die schwache Reproduzierbarkeit dargestellt und schließlich wurden Faktoren untersucht, von denen ein Einfluss auf die Reproduzierbarkeit erwartet wurde.

Die Knorpel-Konstrukte zur Kontrolle wurden im Inkubator nach dem Standardprotokoll angefertigt. Es wurden jeweils Konstrukte ohne Träger hergestellt, da größere Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen bei der Kultivierung mit einem Träger beobachtet wurden. Zusätzlich zum Einfluss des Trägers selbst wirkte sich der Herstellungsprozess der Knorpel-Träger-Konstrukte negativ auf die Reproduzierbarkeit aus (Kapitel 4.5). Desweiteren entstanden nicht nur Schwankungen im Niveau des E-Moduls, des GAG-Gehaltes und des GAG/DNA-Verhältnisses, sondern zum Teil wendete sich auch das Verhältnis dieser Parameter zwischen der Kultivierung mit und ohne Träger. Die in Kapitel 4.3 geschilderten Ergebnisse zur Untersuchung des Trägereinflusses zeigten eine signifikante Abnahme der Knorpelqualität von Knorpel-Träger-Konstrukten im Vergleich zu dem trägerlosen Knorpelgewebe. In 70% (insgesamt 25% signifikant, $\alpha = 0,05$) aller Versuchsansätze waren die Mittelwerte der E-Module der Knorpel-Konstrukte ohne Träger höher als die der Konstrukte mit Träger, in 15% bestand kein nennenswerter Unterschied, aber in 15% (insgesamt 8% signifikant, $\alpha = 0,05$) waren die Mittelwerte der E-Module der Knorpel-Träger-Konstrukte höher als die der Kultivierung ohne Träger ($n = 12$). Bezüglich des GAG-Gehaltes dagegen war ein höheres Niveau in 77% (insgesamt 58% signifikant, $\alpha = 0,05$) der Versuche bei den Knorpel-Konstrukten festzustellen. An dieser Stelle war in keinem Fall der GAG-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte höher als der der Knorpel-Konstrukte.

5.1 Herstellung von Konstrukten unter identischen Bedingungen

An dieser Stelle werden die ansatzabhängigen Unterschiede zwischen den Kultivierungen aufgezeigt. Die Versuche wurden nacheinander unter identischen Bedingungen mit Zellen desselben Donors durchgeführt.

Am Ende der Alginatkultur sind Unterschiede in den Prozentsätzen der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen und im GAG/DNA-Verhältnis zwischen den Ansätzen sichtbar (Abbildung 5.1). In diesem Fall war eine Beurteilung nach statistischen Methoden nicht möglich, da die eingezeichneten Standardabweichungen in Abbildung 5.1 auf mehrmaligen Probenahmen aus demselben Ansatz beruhen. Größere Schwankungen fallen vor allem im GAG/DNA-Verhältnis auf, die Zellen aus Ansatz (3) und (4) produzierten deutlich mehr Glykosaminoglykane als die der anderen Versuche. Die Abweichungen in der Anzahl an Kollagen produzierenden Zellen lassen sich möglicherweise auf die Auswertungen oder Färbungen zurückführen, da diese nicht zeitgleich erfolgt waren.

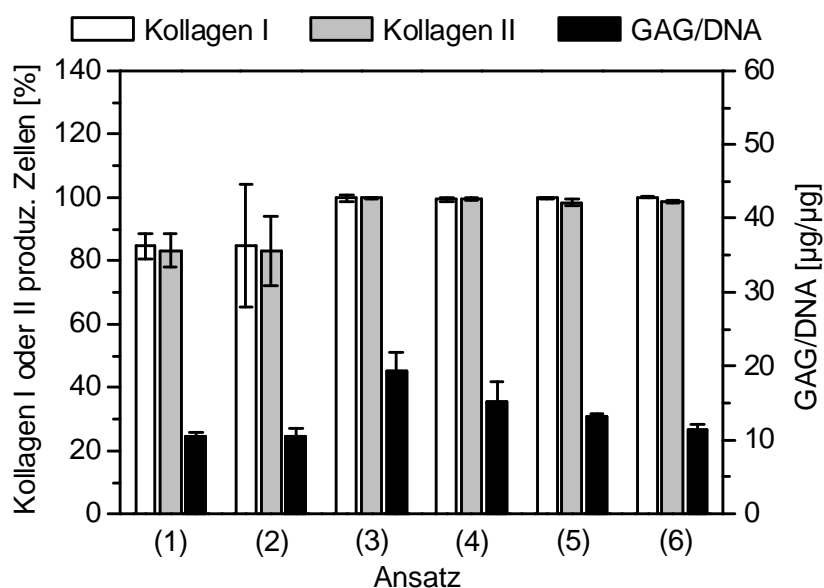


Abbildung 5.1: Anzahl der Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatkultur, die jeweils unter identischen Bedingungen und mit Zellen desselben Donors durchgeführt wurden ($n = 4$ je Ansatz).

Größere Differenzen zwischen den Versuchsansätzen sind am Ende der Knorpelkultur erkennbar (Abbildung 5.2). Auffällig sind die gemessenen E-Module aus den Ansätzen (5) und (6), die um 58% voneinander abweichen ($p = 0,001$). Die Unterschiede in den GAG-Gehalten dagegen sind aufgrund der großen Streuung nicht signifikant ($p = 0,183$). Letztendlich ergab sich eine durchschnittliche Abweichung aller E-Module um 40,5% und der GAG-Gehalte um 21,5%.

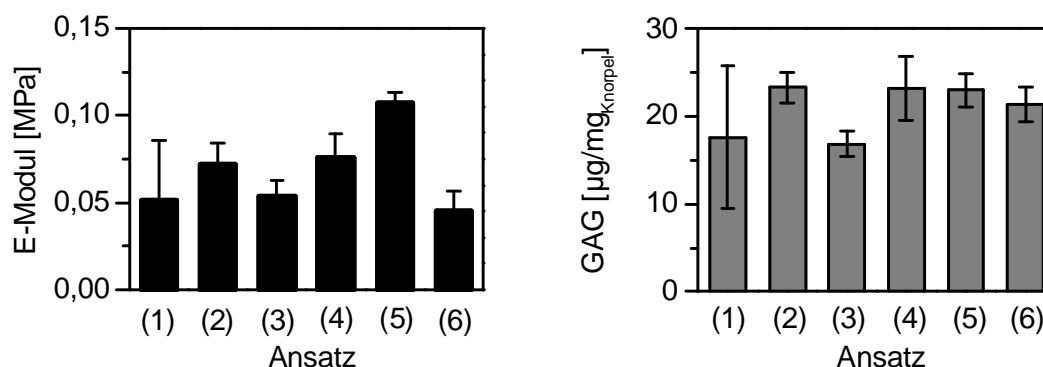


Abbildung 5.2: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Konstrukten ohne Träger verschiedener Ansätze, die unter identischen Bedingungen aus Zellen desselben Donors hergestellt wurden. Signifikante Unterschiede sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 4-8$ für den GAG-Gehalt je Ansatz).

5.2 Donoren

Desweiteren wurde die Bedeutung des Donors auf die resultierende Knorpelqualität untersucht. Da schon zwischen den einzelnen Ansätzen unter identischen Bedingungen große Abweichungen bestanden, wurden hier nun jeweils mindestens vier Ansätze je Donor zusammengefasst. Anderenfalls könnten bei der Darstellung eines einzelnen Versuches Unterschiede fälschlicherweise auf den Donor zurückgeführt werden.

Trotzdem wurden auch hier signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Donoren offensichtlich. Bei der Darstellung der Ergebnisse aus der Alginatkultur in Abbildung 5.3 fallen zunächst aber kaum Differenzen auf.

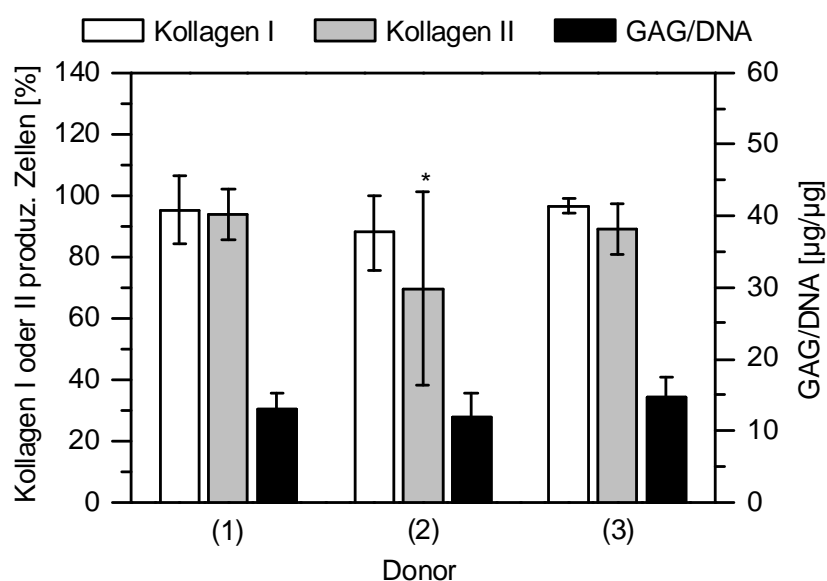


Abbildung 5.3: Anzahl der Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatkultur, die unter identischen Bedingungen und mit Zellen der Donoren (1) bis (3) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse jedes Donors stammen aus 6, 4 bzw. 4 Ansätzen ($\alpha = 0,05$).

Abbildung 5.4 dagegen zeigt ein signifikant niedrigeres E-Modul ($p < 0,001$) und einen signifikant niedrigeren GAG-Gehalt ($p = 0,003$) für die Zellen des dritten Donors. Auch im GAG/DNA-Verhältnis ergab sich eine signifikante Differenz: Donor (1) besaß ein signifikant höheres GAG/DNA-Verhältnis als Donor (3) (Tabelle 8.11 im Anhang 8.2, $p = 0,037$). Die DNA-Gehalte dagegen unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,547$).

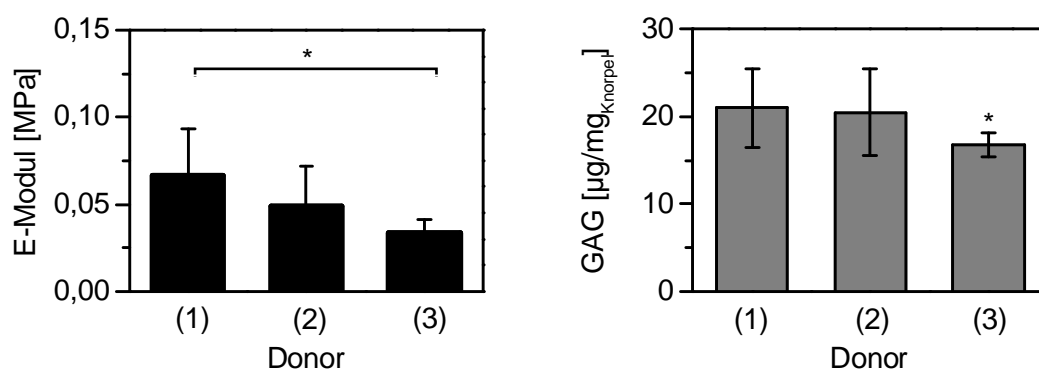


Abbildung 5.4: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die unter identischen Bedingungen und mit Zellen der Donoren (1) bis (3) hergestellt wurden. Die Ergebnisse jedes Donors stammen aus 6, 4 bzw. 4 Ansätzen ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 5$ für den GAG-Gehalt je Ansatz, $\alpha = 0,05$).

5.3 Porcine Seren

In den Abschnitten 5.1 und 5.2 sind die Abweichungen zwischen wiederholten Versuchen dargestellt. Die Reproduzierbarkeit wird zusätzlich neben anderen Faktoren durch die Wahl des Serums während der Alginate- und Knorpelkultur beeinflusst. Die Chargen des porcinen Serums sind – im Gegensatz zu dem fötalem Kälberserum im Proliferationsmedium – nicht standardisiert und besitzen unterschiedliche Zusammensetzungen. Die unter 5.1 und 5.2 dargestellten Ergebnisse wurden jedoch unter Verwendung des gleichen porcinen Serums (Serum 2, Invitrogen) angefertigt. Zur Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher Seren wurden Knorpel-Konstrukte mit drei verschiedenen porcinen Seren während der Alginate- und der Knorpelkultur hergestellt.

Nach Ende der Alginatekultur haben sich keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl der kollagenbildenden Zellen und im GAG/DNA-Verhältnis gezeigt (Tabelle 5.1). In Abbildung 5.5 sind die E-Module und GAG-Gehalte von Knorpel-Konstrukten dargestellt, die mit drei verschiedenen porcinen Seren in der Alginate- und Knorpelkultur hergestellt wurden. Die Verwendung des dritten Serums hob sich im E-Modul von den anderen beiden ab. Signifikante Unterschiede waren jedoch nur in der Höhe ($p = 0,015$), Masse ($p < 0,001$) und im GAG/DNA-Verhältnis ($p < 0,001$) zu finden (Tabelle 8.12 im Anhang 8.2).

Tabelle 5.1: Anzahl der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatkultur, in der die Zellen mit drei verschiedenen porcinen Seren kultiviert wurden (1 Ansatz, n = 4 je Bedingung).

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Einteilung der Seren	LOT A07229-234, PAA Laboratories	LOT 5084244D, Invitrogen	LOT 5614735D, Invitrogen
Kollagen Typ I [%]	99,8 ± 0,3	99,5 ± 0,5	95,2 ± 4,0
Kollagen Typ II [%]	99,5 ± 0,6	99,7 ± 0,6	92,5 ± 12,0
GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	15,9 ± 3,0	16,7 ± 1,4	18,3 ± 2,1

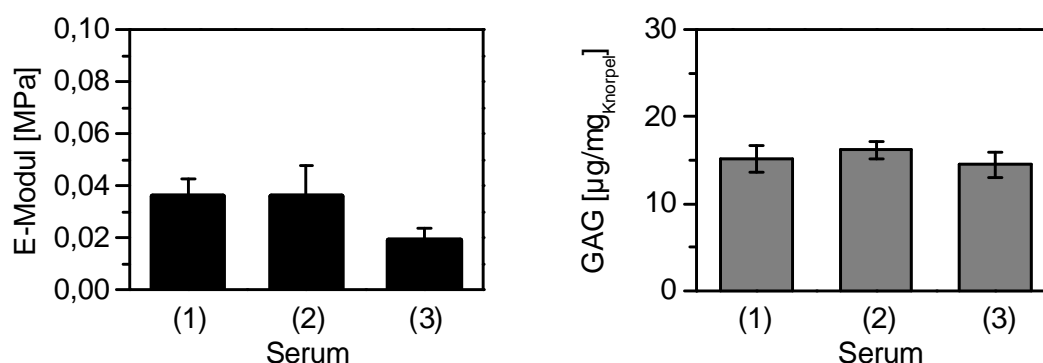


Abbildung 5.5: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die in der Knorpelkultur mit verschiedenen porcinen Seren kultiviert wurden (n = 3 je Bedingung).

5.4 Proliferation

Abweichungen in den Kultivierungsbedingungen, die die Reproduzierbarkeit beeinflussen, können schon während der Proliferation der Zellen auftreten. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Chondrozyten bei unphysiologisch vielen Zell-Zell-Kontakten mit einer Umstellung ihres Metabolismus reagieren [159]. Desweiteren spielt eventuell der Zeitpunkt der Gabe von FGF-2, das Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert, während der Proliferation eine Rolle.

Daher wurde die Qualität von Alginatkulturen untersucht, die mit Zellen aus verschiedenen Expansionskulturen unter verschiedenen Bedingungen angefertigt wurden [160]. Die Zellen wurden bis zur dritten Passage vermehrt. Die Ernte zur Herstellung der Alginatkultur erfolgte dann entweder bei vollständiger Konfluenz oder bei 80%iger Subkonfluenz. Einem Teil der Zellen wurde noch einmal zwei Tage vor der Ernte FGF-2 zugesetzt. Die anderen Zellen erhielten fünf Tage zuvor die letzte FGF-2-Ration.

Eine statistische Analyse der in Abbildung 5.6 dargestellten Daten konnte durchgeführt werden, da diese aus jeweils drei parallel angefertigten Kulturen stammten. Die Ergebnisse zeigten einen Einfluss der Kultivierungsbedingungen während der Pro-

liferation auf die Redifferenzierung im Alginatgel. Die Anzahl der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen wurde durch die Verwendung der Zellen aus der konfluenten Expansionskultur erhöht. Die zusätzliche Gabe von FGF-2 zwei Tage vor der Ernte steigerte jeweils das GAG/DNA-Verhältnis in der Alginatkultur.

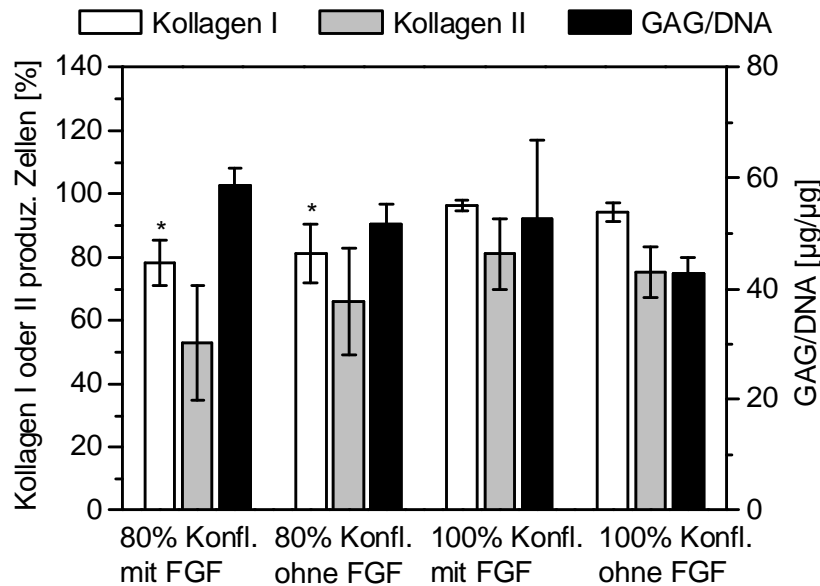


Abbildung 5.6: Anzahl der Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatkultur, deren Zellen unter verschiedenen Bedingungen vermehrt wurden. Die Zellen wurden nach der Proliferation entweder bei 80%iger oder 100%iger Konfluenz abgeerntet (Abkürzung: Konfl. – Konfluenz). Dabei erfolgte die letzte Gabe FGF-2 entweder 2 Tage (mit FGF) oder 5 Tage (ohne FGF) vor der Ernte (n = 3 je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

5.5 Alginatkultur

Um einen Effekt der Größe der Alginatkügelchen auf die Reproduzierbarkeit zu prüfen, wurden Alginatkulturen mit einem Durchmesser von 2-3 mm und im Vergleich von 5-6 mm angefertigt. Für die Herstellung der kleinen Kügelchen wurde die beschriebene Tropfvorrichtung verwendet, für die der großen Kügelchen eine Pipette mit speziell angefertigten Spitzen (100-1000 µl, Eppendorf).

Abbildung 5.7 zufolge unterschieden sich die Kulturen weder durch die Anteile an Kollagen Typ I ($p = 0,885$) und II ($p = 0,313$) produzierenden Zellen noch im GAG/DNA-Verhältnis ($p = 0,32$). Da jeweils drei Kulturen angesetzt wurden, war eine statistische Auswertung möglich, die keine signifikanten Unterschiede lieferte.

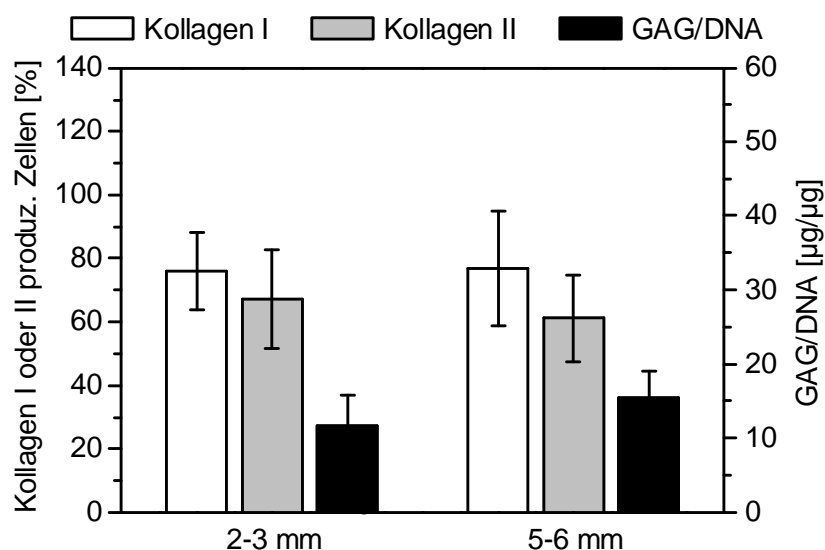


Abbildung 5.7: Anzahl der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis von Alginatkulturen, deren Kügelchen verschieden große Durchmesser besaßen (n = 3 je Bedingung).

5.6 Diskussion der Reproduzierbarkeit des Systems

Wie im Kapitel 5.1 dargestellt worden ist, bestanden auffallende Abweichungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuche, obwohl angestrebt wurde, diese unter identischen Bedingungen durchzuführen. Während in den Alginatkulturen nur sehr geringe Schwankungen sichtbar waren, wies vor allem der E-Modul mit bis zu 58% die größten Unterschiede auf. Für den Einsatz in der Klinik und die weitere Entwicklung in der Forschung werden jedoch gleichbleibende Qualitätsstandards gefordert, die derzeit bei der Herstellung dieser Knorpel-Träger-Konstrukte nicht gewährleistet werden können. In der folgenden Diskussion werden einzelne Aspekte bezüglich der Reproduzierbarkeit näher beleuchtet.

Es kann ausgeschlossen werden, dass die schlechte Reproduzierbarkeit durch Ungenauigkeiten bei der E-Modul- und GAG-Messung entstand. Die Bestimmung des E-Moduls an der Standardprüfmaschine Zwicki führte bei wiederholten Messungen der gleichen Probe nur zu einer Abweichung von maximal 5%. Bei der GAG-Messung wurde bei jeder Messung mit denselben Geräten zunächst ein Standard im linearen Bereich vermessen, über den der GAG-Gehalt der Proben bestimmt wurde.

Neben den Unterschieden durch unbekannte Faktoren, die bei der Kultivierung von Zellen desselben Schweins unter identischen Bedingungen (Kapitel 5.1) sichtbar wurden, spielten auch der Donor und das gewählte porcine Serum eine Rolle. Abbildung 5.3 zeigt, dass die analysierten Parameter der Alginatkultur keine Abhängigkeit vom gewählten Donor aufwiesen. Dennoch entstanden aus Zellen des dritten Donors Kon-

strukture minderer Qualität im Vergleich zu den anderen beiden (Abbildung 5.4). Die Unterschiede sowohl im E-Modul (42%) als auch im GAG-Gehalt (19%) waren signifikant. Auch die nativen Werte der Knorpel aus den sieben Schweineknieen aus Abschnitt 4.1, die im Einzelnen in Tabelle 8.13 im Anhang 8.2 dargestellt sind, zeigten untereinander signifikante Unterschiede in den gemessenen Parametern. Die größten Differenzen zwischen den Knieen betragen 64% für den E-Modul, 25% für den GAG-Gehalt, 67% für den DNA-Gehalt und 28% für das GAG/DNA-Verhältnis und lagen damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Schwankungen zwischen den kultivierten Knorpelgeweben der oben abgebildeten Donoren. Desweiteren wurden Konstrukte mit drei verschiedenen porcinen Seren in der Alginat- und Knorpelkultur angefertigt. Hier waren bei der Verwendung des ersten und zweiten Serums die mechanischen und biochemischen Parameter im Vergleich zum dritten Serum höher. In dieser Arbeit wurde vorwiegend das zweite Serum verwendet. Nur die Versuche im Kapitel 6 wurden mit dem dritten Serum und zum Teil mit Zellen des dritten Donors durchgeführt. Die Kombination resultierte in niedrigen E-Modulen. Der Effekt auf den E-Modul war größer als auf den GAG-Gehalt, so dass angenommen wird, dass auch der Kollagenanteil und der Grad der Vernetzung der extrazellulären Makromoleküle durch die Wahl des Serums und des Donors beeinflusst wurde.

Es wird davon ausgegangen, dass die Zellen schon während des Auftauens und der Expansionsphase unterschiedliche Signale erhalten und darauf reagieren. Abbildung 5.6 zur Untersuchung der Proliferation unterstützt diese Aussage. Zellen, denen zu verschiedenen Zeitpunkten FGF-2 gegeben wurde, wurden bei 80%iger Subkonfluenz oder vollständiger Konfluenz zur Anfertigung einer Alginatkultur abgeerntet. Die Alginatkulturen bildeten ungleiche Mengen an Kollagen Typ I, Typ II und Glykosaminoglykanen. Letztendlich wurde im Standardprotokoll festgelegt, dass die Ernte der Zellen erst bei Konfluenz erfolgen sollte, da ein vergleichsweise hoher Anteil an Zellen Kollagene produzierte. Darüber hinaus kann die vollständige Konfluenz durch eine lichtmikroskopische Überwachung leichter abgeschätzt werden als eine 80%ige Subkonfluenz, so dass eine bessere Reproduzierbarkeit erwartet wurde. Die Gabe von FGF-2 zwei Tage vor dem Ablösen resultierte in einem höheren GAG/DNA-Verhältnis.

Dagegen kann nach Abbildung 5.7 kein Einfluss des Durchmessers der Alginatkügelchen festgestellt werden. Es bestand die Vermutung, dass beispielsweise Stofftransportlimitierungen durch größere Kügelchen einen Effekt auf die Redifferenzierung und Matrixbildung der eingeschlossenen Zellen ausüben. Die beiden Alginatkulturen mit einem Kugeldurchmesser von 2-3 mm oder 5-6 mm zeigten keine Unterschiede im Prozentsatz der kollagenbildenden Zellen und im GAG/DNA-Verhältnis, so dass eine

Überprüfung des Kugeldurchmessers zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit nach der Herstellung der Alginatkultur nicht erforderlich ist.

Insgesamt lassen sich kaum Unterschiede am Ende der Alginatkulturen erkennen, so dass die gewählten Parameter der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis für Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Gesamtsystems nicht ausreichen. Desweiteren korrelierte das GAG/DNA-Verhältnis aus 15 Alginatkulturen nicht mit den Eigenschaften des nachfolgend kultivierten Knorpels (Korrelation-Koeffizient nach Pearson), so dass mit den untersuchten Parametern der Zellen, die aus dem Alginatgel gelöst wurden, keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Knorpelkultivierung getroffen werden kann.

Abschließend wurden in Tabelle 5.2 Korrelationen zwischen den gemessenen Parametern nach Pearson bestimmt. Die Konstrukte wurden in 15 Versuchen ohne Träger unter identischen Bedingungen – abgesehen vom Donor und vom porcinen Serum – angefertigt. Entgegen den nativen Werten (Kapitel 4.1) konnte beim *in vitro* Knorpelgewebe eine signifikante lineare Abhängigkeit zwischen dem E-Modul und dem GAG-Gehalt ($r = 0,725$, $p = 0,002$) festgestellt werden. Im nativen Knorpel ist der E-Modul nicht nur vom GAG-Gehalt abhängig, sondern auch vom Kollagenanteil, von der Ausrichtung der Makromoleküle und der knorpelspezifischen Organisation. Dieser Aufbau konnte im kultivierten Gewebe bisher nicht beobachtet werden, so dass für die Höhe des E-Moduls vermutlich zum größten Teil die Zusammensetzung wie der GAG- und Kollagen-Gehalt verantwortlich ist. Neben den histologischen Untersuchungen des kultivierten Knorpels wurde zum Teil eine quantitative Bestimmung der Kollagene durchgeführt. Dabei enthielt der native Knorpel aber die neunfache Menge an Hydroxyprolin im Vergleich zum kultivierten Knorpel (vgl. Kapitel 4.2). Die Differenz des Kollagen-Gehaltes zum nativen Knorpel ist damit deutlich größer als im GAG-Gehalt, der bei den entsprechenden Konstrukten bei 47% des nativen Niveaus lag, so dass *in vitro* im Verhältnis mehr Glykosaminoglykane als Kollagene gebildet wurden.

Eine weitere positive Korrelation zwischen der Masse und der absoluten DNA-Menge ($r = 0,601$, $p = 0,018$) sowie zwischen der Masse und der absoluten GAG-Menge ($r = 0,768$, $p = 0,001$) wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten [39, 67] beobachtet und kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Entgegen der Studie von Nagel-Heyer *et al.* [67] wurde aber keine Korrelation zwischen der DNA- und der GAG-Menge gefunden. Auch im nativen Gewebe konnte nur eine sehr schwache und daher nicht relevante Korrelation zwischen dem GAG- und DNA-Gehalt ($r = 0,218$, $p = 0,014$) berechnet werden. Dieser Sachverhalt ist allerdings vor allem im *in vitro* Knorpel nicht erstaunlich, da die Produktion der extrazellulären Matrix von diversen, größtenteils zurzeit nicht bekannten Faktoren abhängt und nicht nur von der Zellzahl. Tabelle 5.2 zeigt allerdings eine negative signifikante Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt und

der absoluten GAG-Menge ($r = -0,601$, $p = 0,016$). Das kann bedeuten, dass es sich negativ auf die GAG-Synthese auswirkt, wenn die Zellen unphysiologisch nah beieinander liegen. Eine andere mögliche Interpretation ist, dass die Zellen nah beieinander liegen, da sie aus einem anderen Grund nur wenige Glykosaminoglykane produzieren und damit nicht weiter auseinander wandern können.

Tabelle 5.2: Korrelationen zwischen metabolischen, physikalischen, mechanischen und biochemischen Parametern von Knorpel-Konstrukten aus 15 Versuchen (* – signifikant mit $\alpha = 0,05$).

		Masse [mg]	E-Modul [MPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	DNA _{abs.} [μg]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG _{abs.} [μg]	GAG/ DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
$q_{\text{Glc,abs}}$ [$\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}$]	r	0,076	-0,750	0,021	0,064	-0,393	-0,173	-0,209
	p	0,787	*0,010	0,941	0,820	0,147	0,537	0,455
q_{Glc} [mmol· h ⁻¹ ·Zelle ⁻¹]	r	-0,425	-0,248	-0,424	-0,847	0,052	-0,292	0,362
	p	0,114	0,373	0,115	*< 0,01	0,885	0,291	0,185
$q_{\text{Lak,abs.}}$ [mmol·h ⁻¹]	r	-0,492	0,271	-0,069	0,284	0,002	0,170	0,041
	p	0,315	0,325	0,868	0,305	0,996	0,545	0,886
q_{Lak} [mmol· h ⁻¹ ·Zelle ⁻¹]	r	-0,359	0,269	-0,482	-0,788	0,293	-0,118	0,519
	p	0,118	0,333	0,068	*< 0,01	0,289	0,676	*0,048
Masse [mg]	r		-0,053	-0,492	0,601	-0,038	0,768	0,338
	p		0,851	0,063	*0,018	0,892	*0,001	0,217
E-Modul [MPa]	r			-0,120	-0,121	0,725	0,411	0,400
	p			0,667	0,669	*0,002	0,128	0,140
DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	r				0,392	-0,326	-0,601	0,903
	p				0,149	0,235	*0,016	*< 0,01
DNA _{abs.} [μg]	r					-0,331	0,248	-0,481
	p					0,228	0,374	0,070
GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	r						0,603	0,631
	p						*0,017	*0,012
GAG _{abs.} [μg]	r							0,698
	p							*0,004

Daneben fällt die negative lineare Korrelation zwischen der Glucoseverbrauchsrate und dem E-Modul auf, für die keine Erklärung oder Bestätigungen in Studien anderen Arbeitsgruppen gefunden werden konnte. Die zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate, also die Stoffwechselraten pro Zelle, nahmen bei einer erhöhten absoluten DNA-Menge ab. Schneider *et al.* [161] fanden einen Zusammenhang zwischen der Glucoseaufnahmerate und der zur Verfügung stehenden Glucosemenge bei Chondrozyten. Es wurden bei gleicher Zellzahl bei jeder gewählten Glucosekonzentration ($5,6\text{-}25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) etwa 30% der Glucose umgesetzt, so dass bei niedrigen Konzentrationen der Verbrauch pro Zelle sank. In dieser Arbeit stand bei einer hohen

Zellzahl im Konstrukt weniger Glucose pro Zelle im Vergleich zu kleinen Zellzahlen zur Verfügung. Der Glucoseverbrauch pro Zelle war in den Kulturen mit hoher DNA-Menge geringer, obwohl noch ausreichend Glucose im Medium vorhanden war ($> 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Weitere Schlussfolgerungen aus den Stoffwechselraten können nicht gezogen werden, da die Zusammenhänge zwischen diesen und dem Wachstum, der Matrixbildung und der Speicherung in den Zellen nicht bekannt sind.

Die Ergebnisse dieses Kapitels haben gezeigt, dass bisher nur wenige Zusammenhänge und Wechselwirkungen in der Gewebekultur verstanden sind. Diese Vorgänge sollten in Zukunft untersucht werden, um damit die Kultivierungsbedingungen entsprechend zu verbessern. Die Bestimmung der Ursachen für die schwache Reproduzierbarkeit und eine Steigerung dieser sind dringend erforderlich.

6 HYDROSTATISCHER DRUCK WÄHREND DER KULTIVIERUNG

Die Bewegung und die Belastung des Kniegelenkes *in situ* tragen wesentlich zur Entwicklung und Aufrechterhaltung gesunden Knorpels bei. Es ist somit denkbar, dass auch das Aufbringen von Kräften *in vitro* die Bildung einer höherwertigen extrazellulären Matrix fördert. Es entsteht neben Scherkräften, Kompressionskräften und einer Flüssigkeitsbewegung Druck im Gelenkknorpel. Dabei übernimmt der Druck einen großen Anteil der schnell aufgebrauchten Kräfte. Mit diesem Kapitel soll der Einfluss von hydrostatischem Druck während der Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten bestimmt werden.

Das Standardprotokoll bildete die Grundlage für die Kultivierungen unter Druckbeaufschlagung. Im Folgenden wird jeweils ein Vergleich zwischen den statischen, unbelasteten Konstrukten in dem Inkubator und den belasteten Konstrukten in den Druckreaktoren vorgenommen. Zu Beginn werden die Kultivierungen im bereits vorhandenen Druckreaktor (Gasdruckreaktor) beschrieben. Dieser Reaktor wurde in einer vorangegangenen Arbeit [141] entwickelt und hier weiter verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Steuerung des Reaktors mithilfe von Dipl.-Ing. R. Grajetzki (Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik) auf das im Institut vorhandene Prozessleitsystem (*Process Control System*, PCS, PC Worx 3, Phoenix Contact, Blomberg) umgestellt. Dadurch wurde es möglich, die Auswirkung der Belastung während der verschiedenen Phasen des Protokolls und die Belastungsdauer zu untersuchen.

Im Körper entstehen durch die verschiedenen Bewegungen des Kniegelenkes unterschiedliche Geschwindigkeiten der Lastbeaufschlagung. Es ist aus der Literatur bekannt, dass auch die *in vitro* verwendeten Frequenzen einen Einfluss auf die Reaktion der Zellen haben. Die Effekte weichen jedoch aufgrund der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen und Druckamplituden voneinander ab, so dass die Geschwindigkeit der Lastbeaufschlagung für jedes Kultivierungsverfahren erneut untersucht werden muss. Daher wurde ein zweiter Druckreaktor (Kolbendruckreaktor) konstruiert, mit dem unterschiedliche Frequenzen auf die Knorpel-Konstrukte aufgebracht werden konnten.

6.1 Gasdruckreaktor

Funktionsprinzip des Bioreaktors

Der Gasdruckreaktor besteht aus einer Belastungskammer, die die gleichzeitige Kultivierung von sechs Knorpel-Konstrukten ermöglicht (Abbildung 6.1). Die Gasver-

sorgung wird über das Prozessleitsystem gesteuert. Die Massendurchflussregler stellen aus Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Luft ein Gasgemisch mit einer Zusammensetzung von 5% CO₂ und 5% O₂ her. Das Gas wird über ein Befeuchtungsgefäß und einen Sterilfilter (Sartorius, Göttingen) in die Belastungskammer geleitet. Über einen weiteren Sterilfilter gelangt das Abgas durch ein Magnetventil (stromlos geöffnet, Buschjost Norgren, Bad Oeynhausen) in die Atmosphäre. Zum Druckaufbau schließt das Auslassventil, während die Gaszufuhr hoch geregelt wird. Die Höhe des erreichten Druckes wird dabei über den Gasvolumenstrom und den Gasvordruck bestimmt. Zur Entlastung öffnet das Auslassventil und die Massendurchflussregler werden herunter geregelt. Die Belastungskammer und das Befeuchtungsgefäß wurden aus PEEK gefertigt.

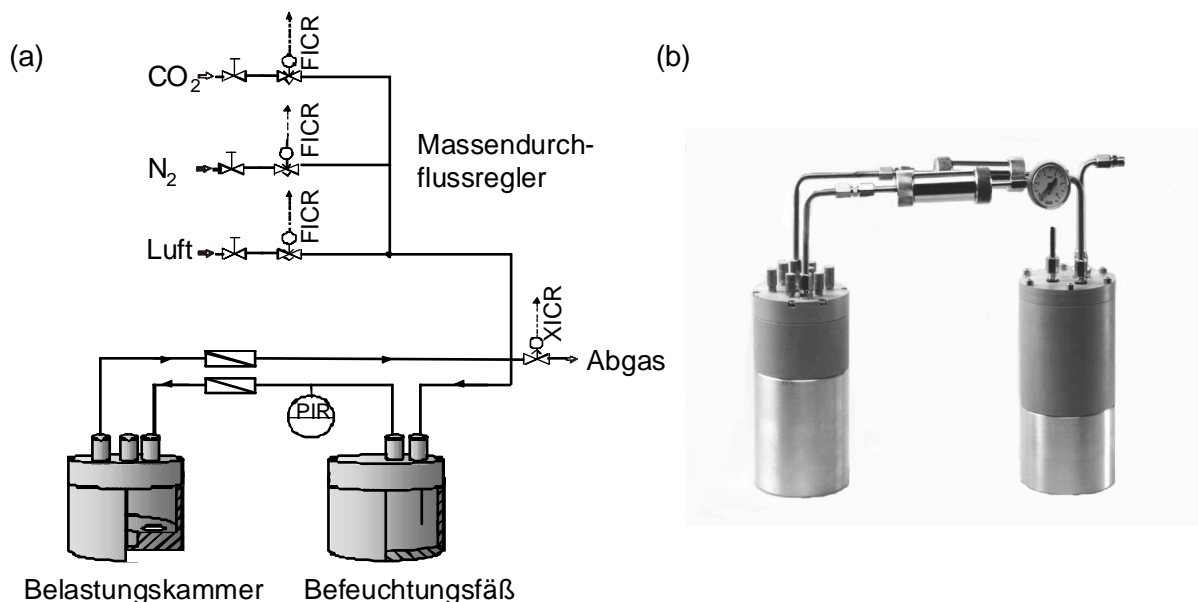


Abbildung 6.1: Gasdruckreaktor: (a) Schematischer Aufbau des Reaktors mit Peripherie, (b) Aufnahme des Reaktors mit angeschlossenen Befeuchtungsgefäß.

Kultivierungsbedingungen

Der Bioreaktor befand sich während der Kultivierung in einem Wärmeschrank (WB120, Mytrom) bei 37°C. Die Gaszusammensetzung wurde täglich mithilfe eines Abgasanalysators (Binos 100 2M, Rosemount, Wessling) kontrolliert.

Die Kulturen wurden für 6 Stunden am Tag mit einer intermittierenden Belastung beaufschlagt. Innerhalb einer Minute wurde der Überdruck von 0,3 MPa mit einer Begasungsrate von 50 L·h⁻¹ aufgebaut. In der nachfolgenden Entlastungsphase wurde eine Minute mit der niedrigen Begasungsrate von 5 L·h⁻¹ begast. Der Druckverlauf ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

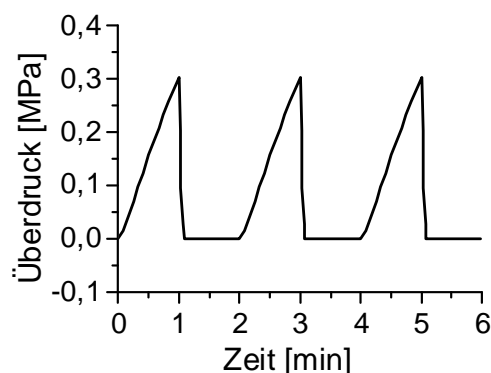


Abbildung 6.2: Druckverlauf in der Belastungsphase des Gasdruckreaktors.

Die Alginkulturen wurden direkt nach der Herstellung in den Bioreaktor gesetzt und zwei Wochen parallel zu den unbelasteten Kulturen im Erlenmeyerkolben kultiviert. Aufgrund der Verdunstung des Mediums durch die hohen Gasvolumenströme wurde hier ein höheres Medium-Alginat-Verhältnis gewählt als bei den unbelasteten Kulturen, so dass sich in jeder Vertiefung 2 mL Alginat und 6 mL Medium befanden. Alle anderen Bedingungen (Mediumwechsel, Wachstumsfaktor-Zusätze etc.) entsprachen der unbelasteten Kultur im Inkubator.

Die Knorpel-Konstrukte wurden zunächst zwei Wochen in einer 12-Well-Platte im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden diese mithilfe einer sterilen Pinzette in den Reaktor überführt. Auch hier wurde ein höheres Mediumvolumen von 6 mL je Probe aus den oben genannten Gründen gewählt. Nach dem Standardprotokoll wurden die Konstrukte nun eine Woche im Reaktor kultiviert.

Kultivierung ohne Belastung im Gasdruckreaktor

Anfangs wurde eine Kultivierung ohne Belastung im Gasdruckreaktor durchgeführt, um den Einfluss des Reaktors auf die Kultivierung im Vergleich zur Inkubatorkultivierung in einer 12-Well-Platte festzustellen. Aus den Alginkulturen aus dem Reaktor oder Inkubator wurden Knorpel-Konstrukte ohne Träger angefertigt, die in der Knorpelkultur entweder im Reaktor oder im Inkubator kultiviert wurden, so dass vier Kombinationen von Konstrukten analysiert wurden: (1) Alginatkultur: Inkubator, Knorpelkultur: Inkubator, (2) Alginatkultur: Inkubator, Knorpelkultur: Reaktor, (3) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Inkubator, und (4) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Reaktor. Da nur ein Reaktor zur Verfügung stand, war es in den nachfolgenden Versuchen nicht möglich, die Kontrollkultivierungen ohne Belastung im Reaktor durchzuführen.

Die Kultivierung des Alginatgels im Reaktor resultierte in einem leicht erhöhten GAG/DNA-Verhältnis und einer vernachlässigbaren Erniedrigung des Kollagen I-Gehaltes im Rahmen der sonst beobachteten Schwankungen (Abbildung 6.3). Signifi-

konzniveaus werden nicht angegeben, da die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Einzelwerten eines einzelnen Ansatzes stammen.

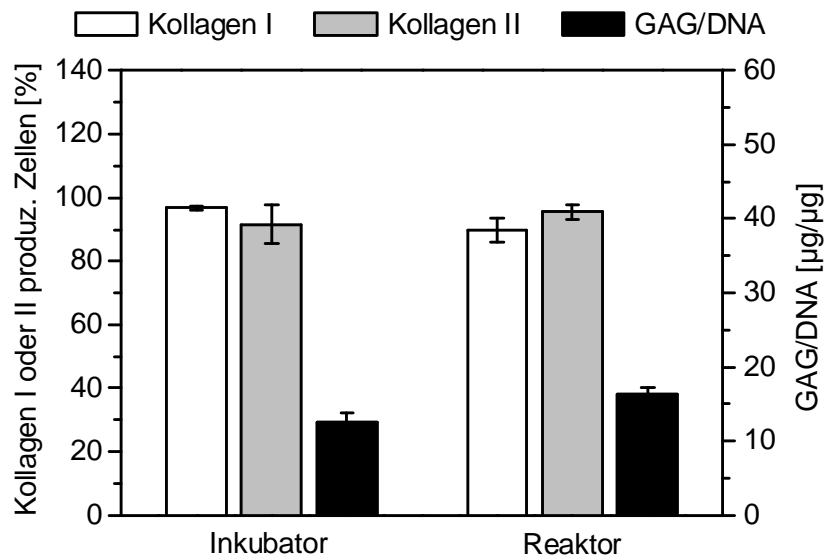


Abbildung 6.3: Anzahl der Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis von Alginatkulturen, die im Inkubator oder im Gasdruckreaktor ohne Belastung kultiviert wurden (1 Ansatz, n = 4 je Bedingung).

Wie in der Abbildung 6.4 erkennbar ist, haben sich keine signifikanten Unterschiede im E-Modul ($p = 0,913$) und im GAG-Gehalt ($p = 0,346$) ergeben. Demgegenüber wurde im GAG/DNA-Verhältnis ein um 26% signifikant niedrigeres Verhältnis (Tabelle 8.14 im Anhang 8.2, $p = 0,002$) der Konstrukte bestimmt, die während einer der Phasen im Reaktor kultiviert wurden im Vergleich zum Inkubator. Diese Unterschiede entstanden hauptsächlich durch Differenzen im DNA-Gehalt.

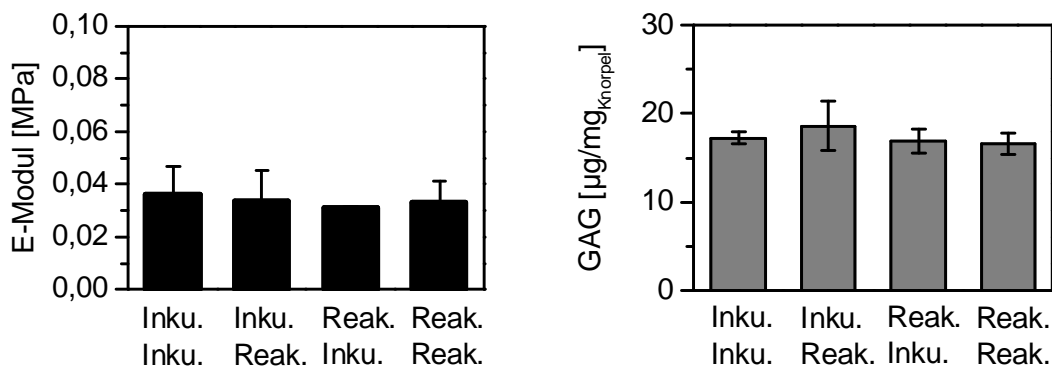


Abbildung 6.4: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die während der verschiedenen Kultivierungsphasen (Bezeichnungen: oben – Alginatkultur, unten – Knorpelkultur) entweder im Inkubator oder im Gasdruckreaktor ohne Belastung kultiviert wurden (Abkürzungen: Inku. – Inkubator, Reak. – Reaktor, n = 3 für den E-Modul, n = 3 bzw. 5 für den GAG-Gehalt für den Reaktor bzw. für den Inkubator).

Einfluss von Belastung in den verschiedenen Kultivierungsphasen

Für das Kultivierungsverfahren zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten war nicht bekannt, in welchen Phasen des Protokolls und für welchen Zeitraum hydrostatischer Druck angebracht ist. Der Differenzierungsstatus der Zellen und die Belastungsdauer können jedoch einen wesentlichen Einfluss auf den Erfolg der Druckbeaufschlagung haben [162]. Daher wurde im ersten Schritt der Effekt von Druckbelastung während der Phasen Alginate- und Knorpelkultur studiert. Anschließend wurde die Belastungsdauer in der Knorpelkultur untersucht. Dazu wurden die Konstrukte zunächst 2 Wochen statisch im Inkubator kultiviert und schließlich einer ein-, zwei- oder dreiwöchigen Belastung ausgesetzt, damit es vor der Kultivierung im Reaktor zu einer Ausbildung der extrazellulären Matrix und einer Anhaftung des Gewebes an den Träger kommen konnte.

In der Abbildung 6.5 werden die Kultivierungen im Alginategel im Inkubator und im Reaktor unter Druckbelastung verglichen. Das GAG/DNA-Verhältnis war um fast 50% ($12,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ zu $6,3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) und der Mittelwert des Prozentsatzes an Kollagen II produzierenden Zellen um 22% (93,6% zu 73,3%) niedriger unter Belastung.

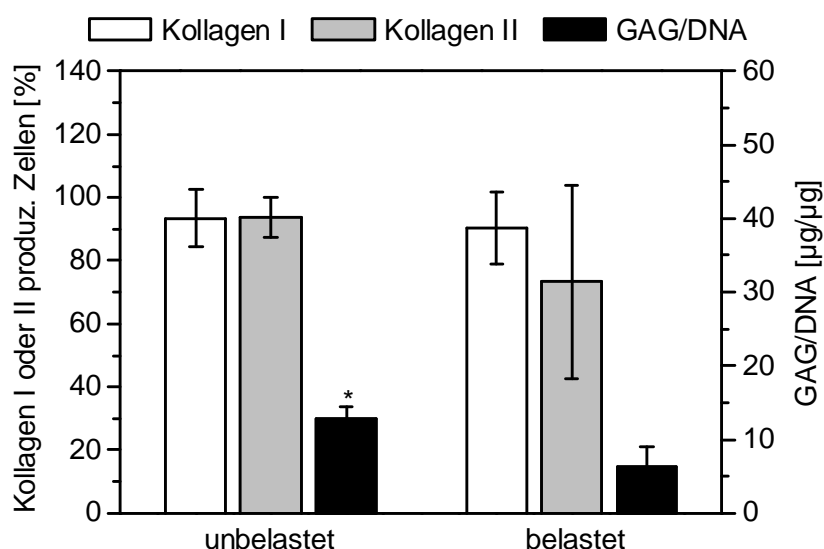


Abbildung 6.5: Anzahl der Kollagen Typ I und Typ II produzierenden Zellen und das GAG/DNA-Verhältnis nach der Alginatekultur, die unbelastet im Inkubator oder belastet im Gasdruckreaktor (1 Minute an/aus für $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 14 d) kultiviert wurde ($n = 6$ je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

Durch die Kombination aus unbelasteten und belasteten Alginate- und Knorpelkulturen ergaben sich in jedem Versuch vier verschiedene Kultivierungsbedingungen, die zur besseren Übersichtlichkeit in Tabelle 6.1 dargestellt sind. Die Ergebnisse aus der ein-, zwei- und dreiwöchigen Belastung stammen aus nacheinander durchgeführten Versuchen, so dass für die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sechs Versuche (3x mit Träger, 3x ohne Träger) angesetzt wurden. Der Einfluss der Belastungsdauer wird erst

im nächsten Abschnitt diskutiert, an dieser Stelle soll die Wirkung während der Phasen Alginat- und Knorpelkultur bestimmt werden. Abbildung 6.6 zeigt die Änderungen des E-Moduls und des GAG-Gehaltes der belasteten Konstrukte (Belastung 2-4) bezogen auf die unbelasteten Konstrukte im Inkubator (Belastung 1), die jeweils über die gleiche Zeitdauer wie die Belastungen 2-4 kultiviert wurden. Unbelastete Kontrollen nach dem Standardprotokoll mit einer Kultivierungsdauer von drei Wochen in der Knorpelkultur wurden zu jedem Versuch parallel durchgeführt. Zwischen diesen Kontrollen haben sich signifikante Unterschiede ergeben (Tabelle 8.16 im Anhang 8.2), so dass ein Vergleich der absoluten Werte zwischen den Versuchen nicht durchführbar war. Ein Vergleich trotz der unvermeidlichen Schwankungen zwischen den verschiedenen Ansätzen wurde ermöglicht, indem die Werte auf den Wert der unbelasteten Vergleichskultivierung normiert wurden (Abbildung 6.6 und 6.7).

Tabelle 6.1: Kombinationen der aufgetragenen Druckbelastungen in den verschiedenen Phasen des Protokolls im Gasdruckreaktor. Die unbelastete Kultivierung wurde im Inkubator durchgeführt.

Kombinationen	Alginatkultur		Knorpelkultur	
	Kultivierungsbedingung		Kultivierungsbedingung	
Belastung 1	unbelastet	2 Wochen: Inkubator	unbelastet	3-5 Wochen: Inkubator
Belastung 2	unbelastet	2 Wochen: Inkubator	belastet	2 Wochen Inkubator, dann 1-3 Wochen: 6 h·d ⁻¹ ; 1/120 Hz; 0,3 MPa
Belastung 3	belastet	2 Wochen: 6 h·d ⁻¹ ; 1/120 Hz; 0,3 MPa	unbelastet	3-5 Wochen: Inkubator
Belastung 4	belastet	2 Wochen: 6 h·d ⁻¹ ; 1/120 Hz; 0,3 MPa	belastet	2 Wochen Inkubator, dann 1-3 Wochen: 6 h·d ⁻¹ ; 1/120 Hz; 0,3 MPa

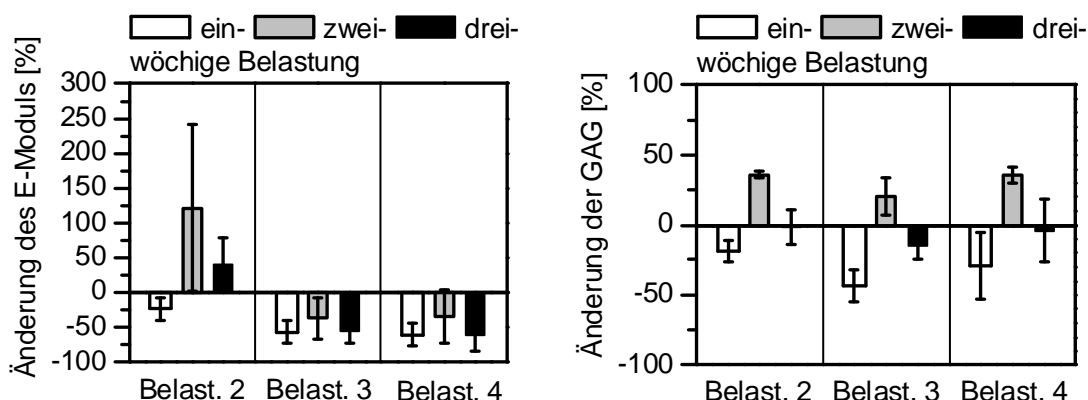


Abbildung 6.6: Änderungen der E-Module und GAG-Gehalte von Knorpel-Träger-Konstrukten nach einer ein-, zwei- oder dreiwöchigen Belastung in der Knorpelkultur bezogen auf die unbelasteten Kontrollen: (Belastung 2) Alginatkultur: Inkubator, Knorpelkultur: Reaktor, (Belastung 3) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Inkubator, (Belastung 4) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Reaktor (n = 3 für den E-Modul, n = 3 bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Reaktor bzw. Inkubator je Bedingung).

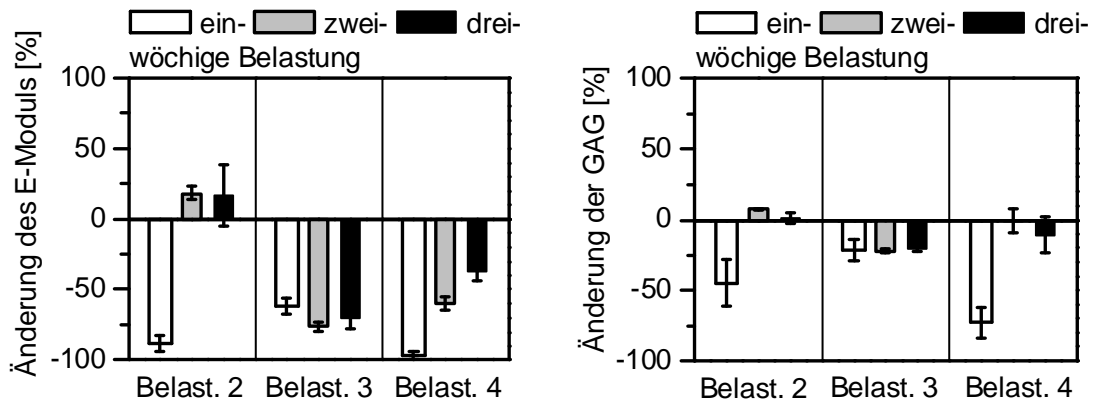


Abbildung 6.7: Änderungen der E-Module und GAG-Gehalte von Knorpel-Konstrukten ohne Träger nach einer ein-, zwei- oder dreiwöchigen Belastung in der Knorpelkultur bezogen auf die unbelasteten Kontrollen: (Belastung 2) Alginatkultur: Inkubator, Knorpelkultur: Reaktor, (Belastung 3) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Inkubator, (Belastung 4) Alginatkultur: Reaktor, Knorpelkultur: Reaktor (n = 3 für den E-Modul, n = 3 bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Reaktor bzw. Inkubator je Bedingung).

In nahezu allen Versuchen waren die E-Module und GAG-Gehalte geringer, sobald die Zellen in der Alginatkultur einer Belastung ausgesetzt waren (Belastung 3-4, Abbildung 6.6 und 6.7). Eine Ausnahme bildete der GAG-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte, der sich bei einer zweiwöchigen Kultivierungsdauer steigerte [163]. Der negative Einfluss war unabhängig von der Belastungsdauer und der Art der Kultivierung in der Knorpelkultur.

Dagegen konnte zum Teil eine Verbesserung der Qualität bei Konstrukten, die nicht während der Alginatkultur und nur in der Knorpelkultur belastet wurden (Belastung 2), erreicht werden. Diese Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt genauer dargestellt.

Einfluss der Belastungsdauer in der Knorpelkultur

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Belastungsdauer betrachtet, die zwischen 1-3 Wochen während der Knorpelkultur variiert wurde. Da die Belastung während der Alginatkultur im Allgemeinen zu einer schlechteren Qualität der Knorpel-Konstrukte führte, werden in Tabelle 6.2 nur die absoluten Werte der unbelasteten Kultivierung im Inkubator und der Belastung in der Knorpelkultur (Belastung 2) dargestellt.

Wie auch in den Abbildungen 6.6 und 6.7 sichtbar kann durch eine zweiwöchige Belastung in der Knorpelkultur die Qualität des Knorpels verbessert werden. Der E-Modul der Knorpel-Träger-Konstrukte war um 122% höher, während der der Knorpel-Konstrukte um 18% stieg. Der GAG-Gehalt der Knorpel-Träger-Konstrukte war um 36% und der Knorpel-Konstrukte um 7% höher. Jedoch war aufgrund der großen Streuungen nur der Unterschied der GAG-Gehalte der Knorpel-Träger-Konstrukte unter einer zweiwöchigen Belastung im Vergleich zur unbelasteten Kultivierung signifikant ($p = 0,041$).

Tabelle 6.2: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter der Knorpel-Träger- und Knorpel-Konstrukte ohne Träger im Vergleich zwischen der unbelasteten und der belasteten Kultivierung in der Knorpelkultur in Abhängigkeit der Kultivierungs- bzw. Belastungsdauer (Abkürzungen: unbel. – unbelastet, bel. – belastet, n = 3 für den E-Modul, n = 3 bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Reaktor bzw. Inkubator je Bedingung).

Belastungsform		Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
mit Träger							
einwöchige Belastung	unbel.	36,2±3,4	1,3 ± 0,3	50,7 ±27,3	0,49±0,05	17,1 ±5,1	35,4 ±12,1
	bel.	32,7±2,8	1,2 ± 0,2	38,9 ±8,1	0,40±0,03	13,9 ±1,3	34,9 ±2,8
zweiwöchige Belastung	unbel.	41,9±4,6	1,9 ± 0,2	57,0 ±40,9	0,40±0,08	15,2 ±3,5	40,8 ±18,4
	bel.	34,8±5,2	1,6 ± 0,1	126,3 ±68,5	0,42±0,02	20,7 ±0,4	49,9 ±2,8
dreiwöchige Belastung	unbel.	61,1±14,2	2,0 ± 0,2	51,7 ±16,5	0,34±0,05	18,6 ±3,4	54,2 ±7,7
	bel.	66,6±8,2	1,8 ± 0,2	72,8 ±19,8	0,31±0,03	18,3 ±2,3	58,5 ±2,2
ohne Träger							
einwöchige Belastung	unbel.	53,0±3,1	1,9 ± 0,1	75,7 ±13,9	0,22±0,01	23,2 ±3,7	105,3 ±15,8
	bel.	40,4±2,1	1,7 ± 0,1	9,1 ±4,2	0,31±0,03	12,8 ±3,9	40,9 ±1,6
zweiwöchige Belastung	unbel.	92,4±1,4	1,8 ± 0,1	97,8 ±20,1	0,16±0,01	21,1 ±1,1	131,9 ±8,5
	bel.	91,2±2,8	2,0 ± 0,0	115,7 ±4,4	0,19±0,02	22,6 ±0,0	117,7 ±12,1
dreiwöchige Belastung	unbel.	116,0±4,9	2,5 ± 0,0	78,3 ±5,8	0,14±0,01	19,6 ±0,8	144,6 ±11,0
	Bel.	117,5±3,0	2,5 ± 0,1	90,0 ±17,6	0,18±0,01	19,8 ±0,7	113,0 ±5,0

Neuer Belastungszyklus als Resultat aus den vorangegangenen Versuchen

Wie die vorangegangenen Ergebnisse gezeigt haben, wirkte sich eine längere Belastung im Vergleich zur einwöchigen Belastung positiv aus. Jedoch summierte sich damit die Kultivierungsdauer in der Knorpelkultur auf 4-5 Wochen. Da im Kapitel 4.4 beobachtet werden konnte, dass die optimale Kultivierungsdauer bei 2-3 Wochen liegt, wurde ein neuer Belastungszyklus gewählt. Die Konstrukte sollten möglichst schnell nach der Elution aus dem Alginatgel in den Reaktor gesetzt werden und die Kultivierungsdauer sollte drei Wochen nicht überschreiten.

In diesem Versuch wurde die Alginatkultur unbelastet im Inkubator kultiviert. Die Konstrukte wurden dann entweder im Reaktor unter Druckbelastung oder zum Vergleich unbelastet im Inkubator angefertigt. Die Überführung der Konstrukte in den Reaktor wurde am fünften Tag der Knorpelkultur durchgeführt, so dass die Konstrukte für 16 Tage der Belastung ($6\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 1 Minute an/aus, 0,3 MPa) ausgesetzt waren. Es wurden Konstrukte mit Träger und ohne Träger parallel angefertigt.

Das frühere Aufbringen einer Druckbelastung während der Knorpelkultur resultierte in einem signifikant höheren E-Modul ($p = 0,008$) und höherem GAG-Gehalt ($p = 0,004$) sowohl bei der Kultivierung mit Träger als auch ohne Träger (Abbildung 6.8). Auch das GAG/DNA-Verhältnis konnte durch die Belastung angehoben werden: für die Kultivierung mit Träger von $21,9 \pm 4,7 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ auf $29,8 \pm 9,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ und für die Kultivierung ohne Träger von $42,3 \pm 6,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ auf $65,2 \pm 3,9 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ (signifikant, $p = 0,002$). Im Allgemeinen waren die Werte für den E-Modul und den GAG-Gehalt dieses Versuches vergleichsweise niedrig. Dieses lässt sich auf das verwendete Serum und den Donor zurückführen (Kapitel 5.2/5.3).

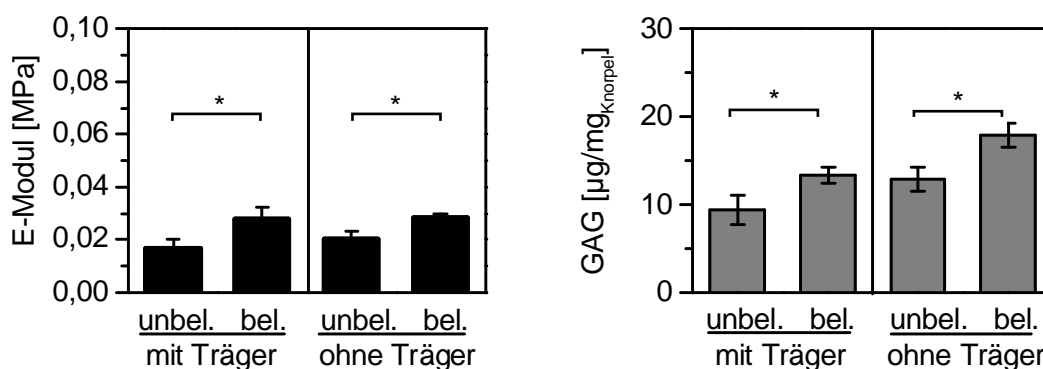


Abbildung 6.8: E-Modul und GAG-Gehalt der Knorpel-Konstrukte mit und ohne Träger nach einer 16-tägigen Belastungsphase im Gasdruckreaktor im Vergleich zur unbelasteten Kultivierung im Inkubator (Abkürzungen: unbel. – unbelastet, bel. – belastet, $n = 3$ für den E-Modul, $n = 3$ bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Reaktor bzw. Inkubator je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

Die Färbungen gegen Kollagen Typ I und II wiesen keine deutlichen Unterschiede auf (Abbildung 6.9), lediglich die Kollagen I-Färbung des unbelasteten Knorpel-Träger-Konstruktes wirkt intensiver. Die Safranin O-Färbung des unbelasteten Knorpels mit Träger dagegen verfügte über eine sehr schwache Verteilung der Glykosaminoglykane, während die übrigen Konstrukte gleichmäßig rot gefärbt wurden.

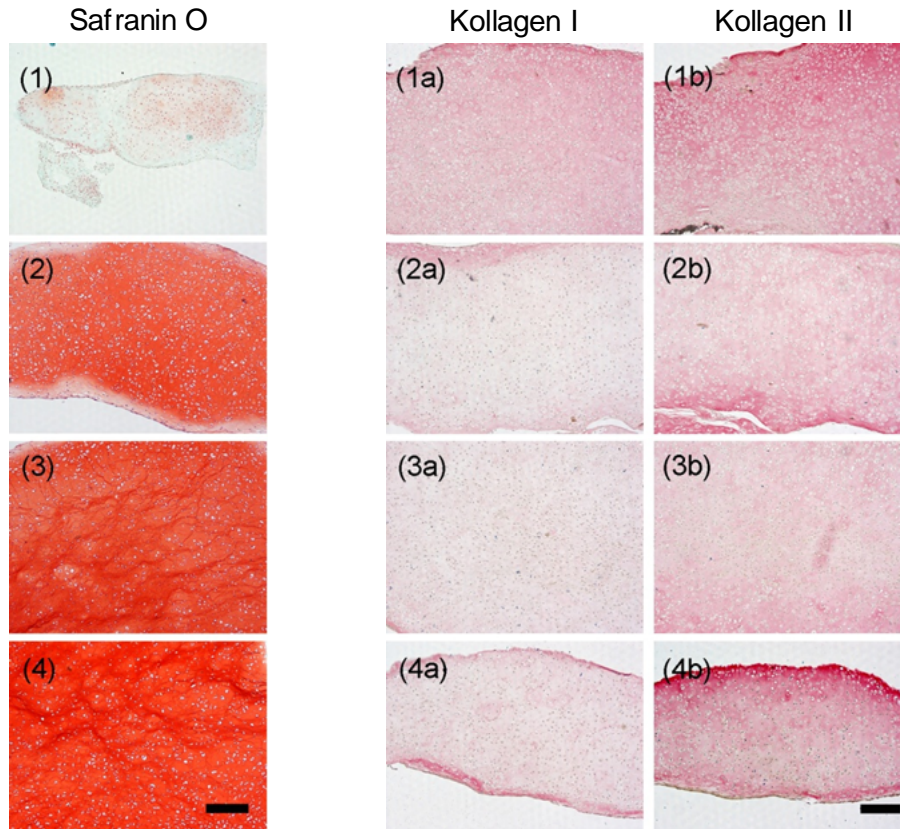


Abbildung 6.9: Safranin O-Färbung zur Visualisierung der Glykosaminoglykane und immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (linke Spalte) und Typ II (rechte Spalte) nach einer 16-tägigen Belastungsphase im Gasdruckreaktor im Vergleich zur unbelasteten Kultivierung im Inkubator: (1) mit Träger, unbelastet im Inkubator, (2) mit Träger, belastet im Gasdruckreaktor, (3) ohne Träger, unbelastet im Inkubator, (4) ohne Träger, belastet im Gasdruckreaktor (Skala 200 μm).

6.2 Kolbendruckreaktor

Funktionsweise des Reaktors

Mit dem Gasdruckreaktor konnten Frequenzen bis 1/120 Hz (1 Minute an/aus) aufgebracht werden. Es wird aber vermutet, dass höhere Frequenzen als im Gasdruckreaktor zur Aufrechterhaltung des Knorpels benötigt werden, da schon beim Gehen Frequenzen bis zu 1 Hz herrschen. Daher wurde ein zweiter Druckreaktor (Kolbendruckreaktor) nach folgenden Anforderungen konstruiert:

- Frequenz $f \leq 1 \text{ Hz}$
- Druck $p \leq 1 \text{ MPa}$
- Temperatur $T = 37^\circ\text{C}$
- Platz für 10 Konstrukte (Abmessungen durch Haltevorrichtungen der Träger vorgegeben)
- Das Mediumvolumen muss mindestens 30 mL für 10 Konstrukte betragen. Dieses Volumen sollte aber aufgrund der hohen Kosten für das Medium und die Zusätze nicht deutlich überschritten werden.

- Es muss eine Mediumhöhe von mindestens 1 mm über den Knorpeln für den gesamten Kultivierungszeitraum gewährleistet werden. Trotzdem sollte die Höhe nicht mehr als 2-3 mm betragen, damit keine Transportlimitierungen der Gase zu den Zellen bestehen.
- Es wird eine Oberflächenbegasung mit 5% O₂, 5% CO₂ und 90% N₂ gefordert, so dass es nicht zu einer Sauerstofflimitierung und zu keiner Verschiebung des pH-Wertes kommt. Eine Blasenbegasung oder ein Einbau eines Rührers ist bei Reaktoren für das *Tissue Engineering* aufgrund der hohen Scherkräfte nicht möglich. Das Gas muss vor dem Eingang in den Reaktor befeuchtet werden.
- Eine Sterilität über mehrere Wochen muss gewährleistet sein.
- Der Reaktor muss unter der Sterilarbeitsbank geöffnet werden können, um das Zellmaterial in den Reaktor zu setzen. Ein Tausch des Mediums im Reaktor soll alle zwei bis drei Tage gegebenenfalls durch eine Öffnung im Deckel bewerkstelligt werden.
- Die Abmessungen müssen so gewählt werden, dass der Reaktor in den Autoklav und unter die Sterilarbeitsbank gestellt werden kann.
- Die verwendeten Materialien müssen autoklavierbar sein und den korrosiven Eigenschaften durch die feuchte Umgebung und das Medium standhalten. Zusätzlich müssen alle Materialien, die mit dem Medium und den Konstrukten in Kontakt kommen, bioverträglich sein.
- Der Reaktor soll an das im Institut vorhandene Prozessleitsystem angeschlossen werden, damit Belastungs- und Ruhephasen automatisch ablaufen. Die Anforderungen an die Steuerung des Reaktors werden später erläutert. Der Druck im Reaktor soll mithilfe eines Drucksensors aufgezeichnet werden.

Für die Konstruktion dieses Reaktors wurde das Prinzip der Druckaufbringung über die Gasphase gewählt (Prinzip (c), Kapitel 2.2.4), so dass sich im Reaktor sowohl eine Gas- als auch eine Flüssigkeitsphase befinden. Das Aufbringen über die Flüssigkeitsphase (Prinzipien (a) und (d)) kam nicht in Frage, da für eine längere Kultivierung, wie sie das Protokoll zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten vorsieht, ein Umsetzen der Proben nach der Belastung in den Inkubator erforderlich wäre. Aufgrund des erhöhten Kontaminationsrisikos und des Umsetzvorganges unter undefinierten Bedingungen bei den Prinzipien (a) und (d) wurde ein Prozess im Einschrittverfahren verlangt. Kultivierungen im Perfusionsreaktor (Prinzip (b)) würden zu einer Überlagerung von Effekten aus hydrostatischem Druck und einem Flüssigkeitsstrom führen. Desweiteren würden die Prozesskosten aufgrund der benötigten Wachstumsfaktoren stark ansteigen.

Um die großen Gasvolumenströme wie im Gasdruckreaktor zu vermeiden und die Beaufschlagung mit Druck flexibler zu gestalten, wurde der Druckaufbau über einen

Kolben realisiert. Wie in Abbildung 6.10 dargestellt ist, befinden sich die Konstrukte in einer Belastungskammer. Die zehn Plätze für die Konstrukte sind kreisförmig um den Druckteller angeordnet, der mit dem Kolben über eine bewegliche Silikon-Membran zur Abdichtung der Belastungskammer verbunden ist. Die Begasung erfolgt über eine Oberflächenbegasung durch zwei Magnetventile (2/2-Wege Typ 210, Fluid Concept, Karlsdorf-Neuthard). Das Gas stammt aus einer vorgefertigten Gasmischung (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂), wird durch ein Rotameter (Krohne, Hamburg) auf einen Durchfluss von 0,2 L·h⁻¹ eingestellt und über einen Sterilfilter (Midisart[®] 2000, Sartorius, Göttingen) in ein mit Wasser gefülltes Gefäß zur Befeuchtung geleitet. Als Motor wurde ein pneumatischer Druckzylinder (Kolbendurchmesser 100 mm, Hub 10 mm, Airtec, Kronberg) gewählt. Er überträgt seine Kraft auf direktem Weg auf den Kolben. Vor dem Druckzylinder befinden sich ein Drossel- und ein weiteres Magnetventil (3/2-Wege Typ M-04, Airtec). Die Führung des Kolbens wird über ein eingepresstes Gleitlager (Iglidur A290, Igus, Köln) gewährleistet. Die Reaktorteile, die mit Medium und Zellen in Kontakt kommen, sind aus dem bioverträglichen Stahl 1.4435 (X2CrNiMo18-14-3, Stappert Spezial-Stahl Handel, Ahrensburg) gefertigt, die übrigen Teile aus dem Stahl 1.4404 (X2CrNiMo17-12-2), der gewöhnlich in der Lebensmittelindustrie zum Einsatz kommt. Der Drucksensor (Miniaturdrucksensor, Messbereich 20 bar, Burster, Gernsbach) wurde in den Deckel des Reaktors eingelassen. Einzelheiten zur Konstruktion können der Arbeit von Attia *et al.* [164] entnommen werden.

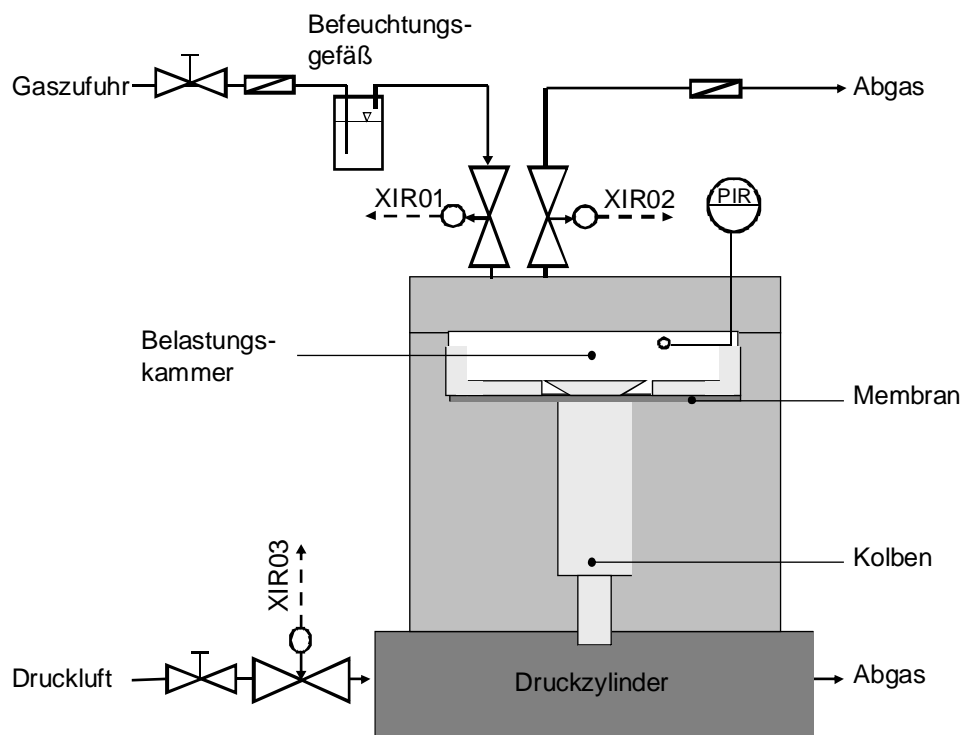


Abbildung 6.10: Schematische Darstellung des Kolbendruckreaktors.

Zum Druckaufbau werden die Magnetventile der Begasung geschlossen und das Ventil des pneumatischen Motors geöffnet, so dass der Kolben nach oben gedrückt wird. Über die resultierende Volumenverkleinerung in der Belastungskammer wird ein Druck aufgebaut, der vom Vordruck des Druckzylinders abhängt. Die Geschwindigkeit des Druckaufbaus wird über das vor den Druckzylinder geschaltete Drosselventil eingestellt.

Die Steuerung des Reaktors wurde von Dipl.-Ing. R. Grajetzki mithilfe des bereits erwähnten Prozessleitsystems erstellt. Dazu mussten die Komponenten Magnetventil V_{Motor} (stromlos geschlossen), die Magnetventile V_{ein} und V_{aus} (stromlos geöffnet) und der Drucksensor mit Verstärker (Typ 9243, Burster) in das System integriert werden. Abbildung 6.11 veranschaulicht den Ablauf der Zyklen, die durch die Steuerung realisiert werden sollte.

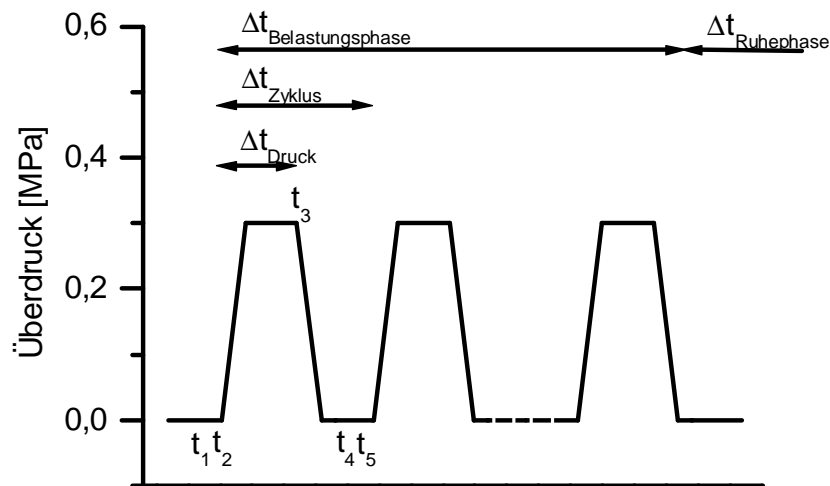


Abbildung 6.11: Anforderungen an das Prozessleitsystem zur Steuerung des Kolbendruckreaktors.

Auch bei der Steuerung dieses Reaktors sollte eine Ruhe- und eine Belastungsphase unterschieden werden. Während der Ruhephase sind die Magnetventile der Begasung geöffnet. Während der Belastungsphase werden über den gesamten Zeitraum die eingestellten Belastungszyklen wiederholt. Zum Druckaufbau schließen zunächst nacheinander das Eingangs- und das Ausgangsventil der Begasung zum Zeitpunkt t_1 . Zum Zeitpunkt t_2 wird dann das Magnetventil des pneumatischen Motors geöffnet. Über die Zeit Δt_{Druck} wird der Druck gehalten und schließlich am Punkt t_3 durch Öffnen des Ventils V_{Motor} auf Umgebungsdruck reduziert. Zum Zeitpunkt t_4 öffnet zunächst das Ausgangsventil der Begasung und dann zum Zeitpunkt t_5 das Eingangsventil. Nach Ablauf eines Zyklus Δt_{Zyklus} beginnt der Druckaufbau erneut.

Nach der Fertigstellung des Reaktors (Abbildung 6.12) wurde dieser in Betrieb genommen. Der genaue Verlauf der Inbetriebnahme befindet sich im Anhang (Kapitel

8.3). Dabei wurden die Dichtigkeit des Reaktors, die Sterilität, die Temperatur, der pH-Wert und die Steuerung überprüft und gegebenenfalls angepasst, so dass im Anschluss der Kolbendruckreaktor für die Kultivierungen von Knorpel-Träger-Konstrukten zur Verfügung stand.

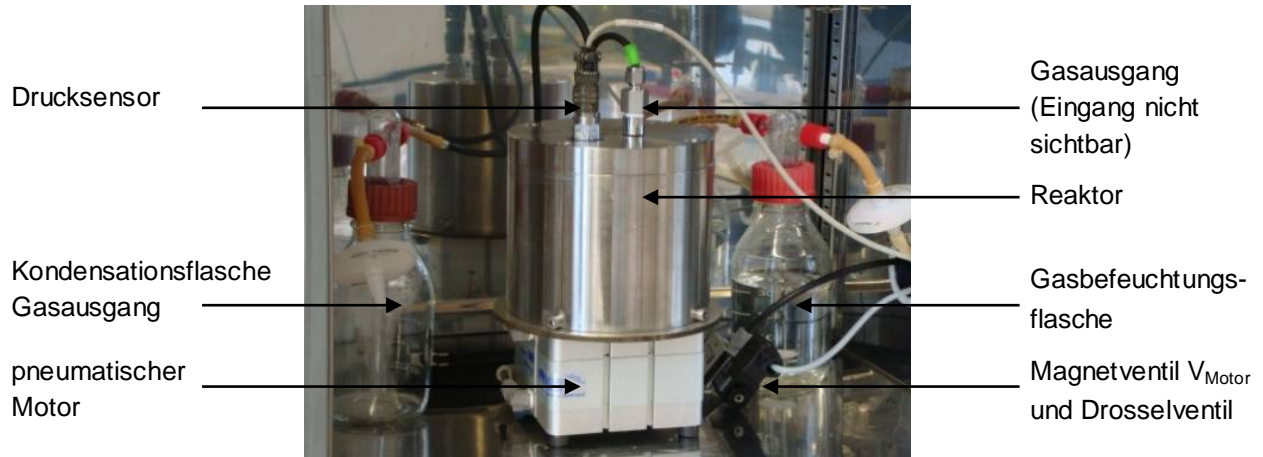


Abbildung 6.12: Aufnahme des Kolbendruckreaktors mit Peripherie.

Kultivierungsbedingungen

Dieser Bioreaktor befand sich ebenfalls während der Kultivierung in einem Wärmeschrank bei 37°C. Zur Begasung wurde ein vorgefertigtes Gasgemisch aus 5% O₂, 5% CO₂ und 90% N₂ (Air Liquide, Düsseldorf) eingesetzt. Der Überdruck betrug 0,3 MPa und wurde für eine Stunde am Tag an fünf Tagen in der Woche für insgesamt 16 Tage mit unterschiedlichen Frequenzen auf die Knorpel-Konstrukte aufgebracht. Eine Kultivierung der Alginatkultur im Kolbendruckreaktor fand nicht statt.

In der Abbildung 6.13 ist ein Belastungszyklus dargestellt, der in einem nachfolgenden Versuch verwendet wurde. Der Druck wird im Gegensatz zum Gasdruckreaktor innerhalb kurzer Zeit aufgebaut und für eine Minute gehalten. Es ist über die Einstellung des Drosselventils aber auch möglich, den Druck langsam aufzubauen. Als Vergleich zum Gasdruckreaktor wurde die Frequenz 1 Minute an/aus gewählt. Im Anschluss wurden schnellere Zyklen (30 Sekunden an/aus, 15 Sekunden an/aus) verwendet.

Bei jedem Versuch befanden sich 10 Konstrukte und 50 mL Medium in der Belastungskammer. Alle 2-3 Tage wurden 30 mL des Mediums ersetzt und Ascorbinsäure-2-phosphat und Cystein für das gesamte Volumen zugegeben, da eine Stabilität dieser Stoffe bei 37°C über mehrere Tage nicht gewährleistet ist.

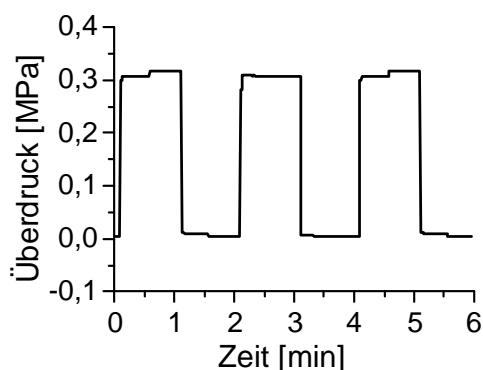


Abbildung 6.13: Druckverlauf in der Belastungsphase des Kolbendruckreaktors (Zyklus: 1 Minute an/aus).

Kontrollkultivierungen zum Kolbendruckreaktor

Da im Kolbendruckreaktor nur eine Belastungskammer für die Kultivierung mit und ohne Träger vorhanden ist, mussten auch die Kultivierungen der Konstrukte mit und ohne Träger im Inkubator zusammen erfolgen. Dazu wurde anstatt einer 12-Well-Platte eine 6-Well-Platte verwendet. In jedes Well wurde ein Knorpel-Träger- und ein Knorpel-Konstrukt mit insgesamt 10 mL Medium gesetzt. Bei jedem Mediumwechsel wurden 6 mL Medium getauscht und Ascorbinsäure-2-phosphat und Cystein für das gesamte Volumen zugesetzt. Damit ergab sich das gleiche Verhältnis aus getauschtem und nicht getauschtem Medium wie im Reaktor. Es konnte eine Abweichung der Knorpelqualität in den 6-Well-Platten im Vergleich zu den 12-Well-Platten beobachtet werden, in denen sich jedes Konstrukt einzeln in einem Well befand. In Tabelle 6.3 sind die Änderungen der Parameter Masse, Höhe, E-Modul, DNA-Gehalt, GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis der gemeinsam kultivierten Knorpel-Konstrukte in Bezug auf die Mittelwerte der einzeln kultivierten Konstrukte angegeben. In den 6-Well-Platten bei der Kultivierung von Konstrukten mit und ohne Träger waren mit Ausnahme der Masse alle Werte der Knorpel-Träger-Konstrukte erhöht. Die gemessenen Kenngrößen der Konstrukte ohne Träger dagegen waren niedriger.

Tabelle 6.3: Änderungen der in 6-Well-Platten kultivierten Knorpel-Konstrukte (jeweils ein Konstrukt mit Träger und ein Konstrukt ohne Träger) bezogen auf die entsprechenden einzeln kultivierten Konstrukte (4 Versuche, n = 3 für den E-Modul, n = 4 für den GAG-Gehalt je Versuch).

	Masse [%]	Höhe [%]	E-Modul [%]	DNA [%]	GAG [%]	GAG/DNA [%]
mit Träger	-9,7 ± 6,0	12,6 ± 26,4	41,3 ± 10,1	22,3 ± 28,1	27,8 ± 47,9	13,7 ± 74,2
ohne Träger	-13,8 ± 6,0	-9,4 ± 7,1	-27,2 ± 7,2	6,78 ± 19,7	-19,4 ± 5,1	-19,6 ± 16,8

Kultivierung ohne Belastung im Kolbendruckreaktor

Auch für den Kolbendruckreaktor wurde anfangs eine Kultivierung ohne Belastung im Druckreaktor durchgeführt, um den Einfluss des Reaktors auf die Kultivierung im Vergleich zur Inkubator Kultivierung festzustellen. Die Kultivierungen wurden nach dem neuen Belastungsprotokoll durchgeführt. Demzufolge befand sich die Alginatkultur im Inkubator und die Konstrukte wurden am fünften Tag der Knorpelkultur für 16 Tage in den Reaktor gesetzt. Es wurden Konstrukte mit und ohne Träger angefertigt.

Im Kolbendruckreaktor ergab sich ohne Belastung eine geminderte Knorpelqualität der Knorpel-Träger-Konstrukte im Vergleich zur Inkubator Kultivierung. Signifikant niedrigere E-Module konnten beobachtet werden ($p = 0,012$, Abbildung 6.14). Im GAG-Gehalt ($p = 0,306$) und GAG/DNA-Verhältnis ($p = 0,202$, Tabelle 8.15 im Anhang 8.2) zeigten sich dagegen keine Unterschiede. Die im Vergleich zu den anderen Kapiteln allgemein niedrigen Werte der E-Module und GAG-Gehalte kommen vermutlich durch den verwendeten Donor und den Wechsel des porcinen Serums (Serum 3) zustande (Abschnitt 5.2 und 5.3).

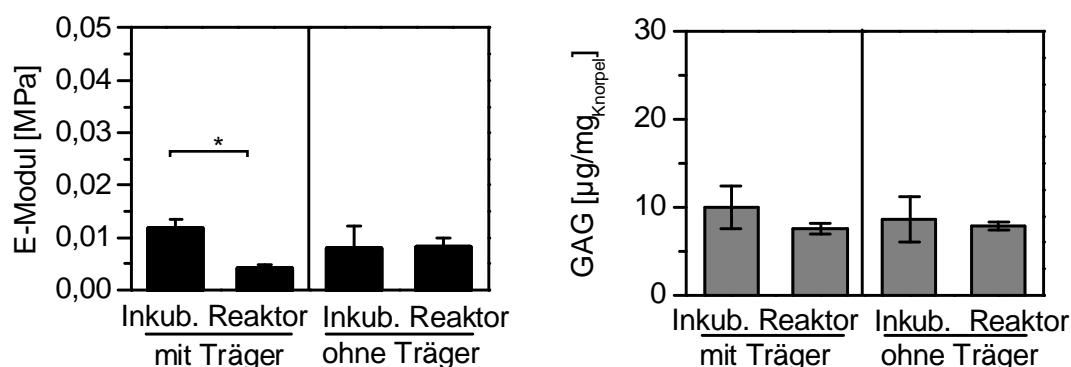


Abbildung 6.14: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Träger-Konstrukten und Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die entweder im Inkubator oder im Kolbendruckreaktor ohne Belastung kultiviert wurden (Abkürzung: Inkub. – Inkubator, $n = 3$ für den E-Modul, $n = 5$ für den GAG-Gehalt je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

Vergleich der Reaktoren

Um einen Vergleich zwischen den beiden Reaktoren zu schaffen, wurden Knorpel-Konstrukte mit und ohne Träger angefertigt und während der Knorpelkultur mit einer Druckbelastung von 0,3 MPa und 1 Minute an/aus in den Druckreaktoren für 16 Tage beaufschlagt. Aufgrund der Betriebsweise des Kolbendruckreaktors (siehe Anhang 8.3) musste die Belastungszeit auf eine Stunde am Tag für fünf Tage pro Woche reduziert werden. Die Konstrukte wurden dem neuen Belastungszyklus zufolge am fünften Tag nach der Herstellung in die Reaktoren gesetzt und verblieben dort bis zur Vollendung der dritten Woche. Als Vergleich zum Gasdruckreaktor wurden im

Inkubator Konstrukte einzeln in 12-Well-Platten kultiviert, während als Vergleich zum Kolbendruckreaktor jeweils ein Konstrukt mit Träger und ein Konstrukt ohne Träger zusammen in 6-Well-Platten kultiviert wurden. Für alle Versuchsbedingungen wurden Konstrukte mit und ohne Träger angefertigt.

Die Abbildungen 6.15 und 6.16 zeigen den Verlauf der Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate während der Knorpelkultur im Vergleich zur jeweiligen unbelasteten Kultivierung im Inkubator. Die Glucoseverbrauchsrate befand sich bei allen Bedingungen in der gleichen Größenordnung. Die Laktatbildungsrate dagegen war in den beiden unbelasteten Kultivierungen höher, so dass sich ein Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lac}/\text{Glc}}$ von $1,8 \pm 0,3 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ für die Kultivierungen im Inkubator und ein Koeffizient von $1,2 \pm 0,3 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ für den Gasdruckreaktor und $1,6 \pm 0,8 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ für den Kolbendruckreaktor ergaben.

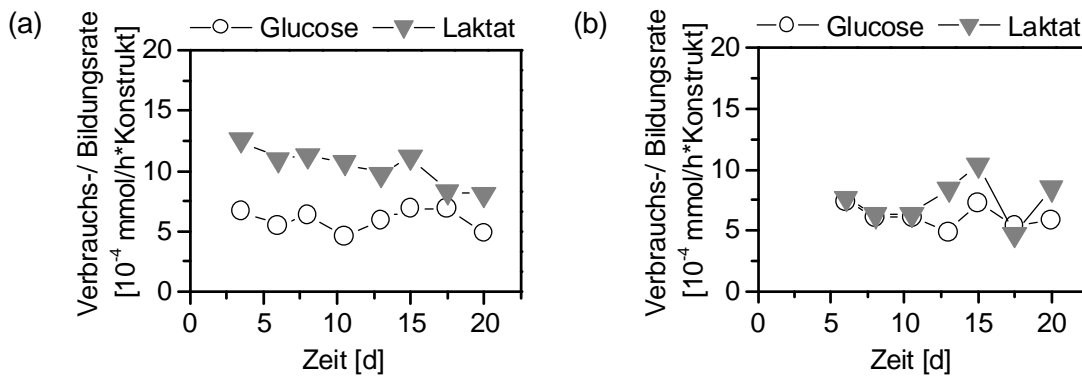


Abbildung 6.15: Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate der Konstrukte in der Knorpelkultur: (a) unbelastet in der 12-Well-Platte, (b) belastet im Gasdruckreaktor.

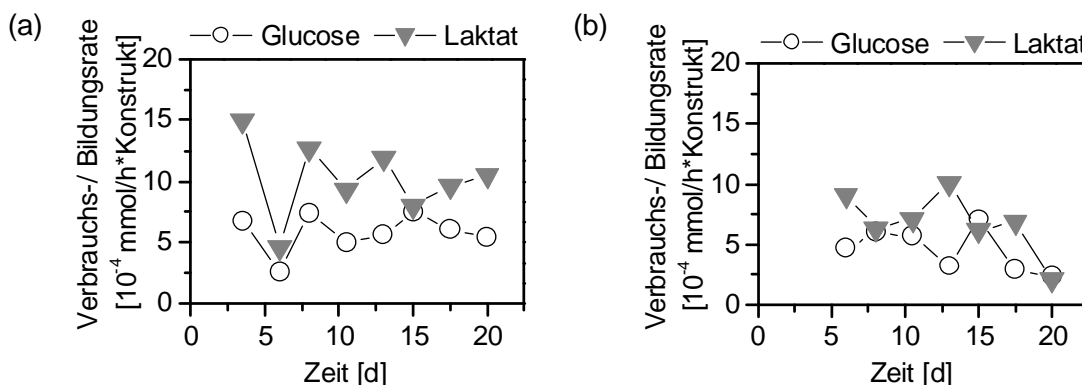


Abbildung 6.16: Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate der Konstrukte in der Knorpelkultur: (a) unbelastet in der 6-Well-Platte, (b) belastet im Kolbendruckreaktor.

Wie die Abbildungen 6.17 und 6.18 zeigen, waren die Niveaus der E-Module und der GAG-Gehalte der Konstrukte, die unter Belastung in den Reaktoren kultiviert wurden, niedriger als die der unbelasteten. Die einzige Steigerung konnte in den Mittelwerten des E-Moduls der Knorpel-Träger-Konstrukte durch die Kultivierung im Gasdruck-

reaktor erreicht werden. In dem vorangegangenen Versuch (Abbildung 6.8) im Gasdruckreaktor nach dem neuen Belastungszyklus wurden dagegen die Eigenschaften des Knorpels, der sechs Stunden am Tag unter Druckzyklen kultiviert wurde, im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle signifikant verbessert. Diese Unterschiede werden im Kapitel 6.3 diskutiert.

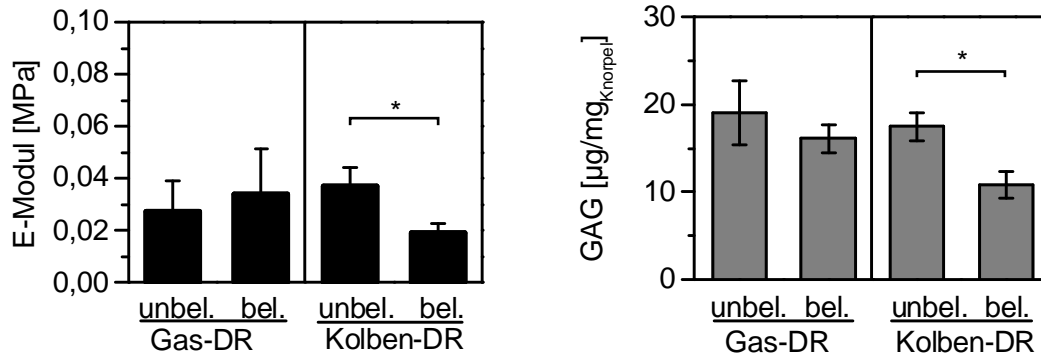


Abbildung 6.17: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Träger-Konstrukten nach der Belastung in den Druckreaktoren. Die unbelasteten Kontrollkultivierungen im Inkubator zum Gasdruckreaktor fanden in 12-Well-Platten, zum Kolbendruckreaktor in 6-Well-Platten statt (Gas-DR – Gasdruckreaktor, Kolben-DR – Kolbendruckreaktor, $n = 3$ für den E-Modul, $n = 3$ bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Gasdruckreaktor bzw. im Inkubator und Kolbendruckreaktor je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

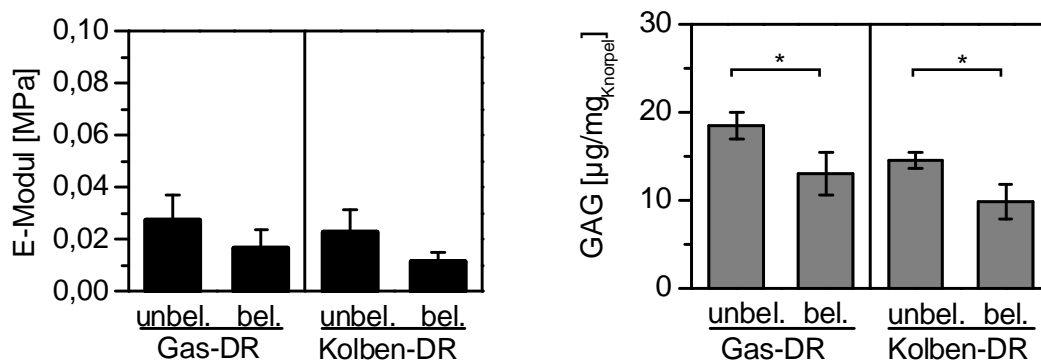


Abbildung 6.18: E-Modul und GAG-Gehalt von Knorpel-Konstrukten ohne Träger nach der Belastung in den Druckreaktoren. Die unbelasteten Kontrollkultivierungen im Inkubator zum Gasdruckreaktor fanden in 12-Well-Platten, zum Kolbendruckreaktor in 6-Well-Platten statt (Gas-DR – Gasdruckreaktor, Kolben-DR – Kolbendruckreaktor, $n = 3$ für den E-Modul, $n = 3$ bzw. 5 für den GAG-Gehalt im Gasdruckreaktor bzw. im Inkubator und Kolbendruckreaktor je Bedingung, $\alpha = 0,05$).

Die immunhistologischen Färbungen gegen Kollagen Typ I und II (Abbildung 6.19) zeigen für alle Kultivierungsbedingungen ein gleichmäßiges Gewebe. Die Intensität der Färbung gegen Kollagen Typ I war in den Geweben, die in den Druckreaktoren kultiviert wurden, sowohl für Knorpel-Träger-Konstrukte als auch für Knorpel-Konstrukte gegenüber den Kultivierungen im Inkubator stärker.

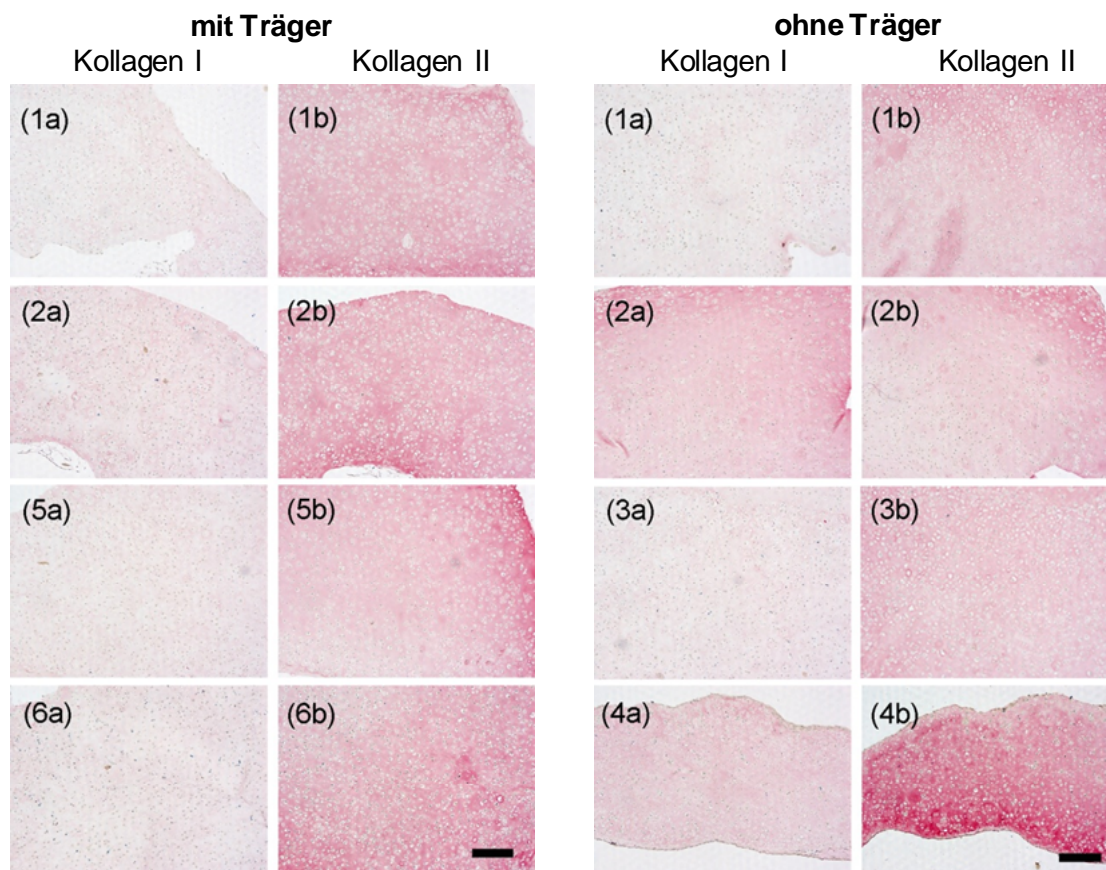


Abbildung 6.19: Immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I (jeweils linke Spalte) und Typ II (jeweils rechte Spalte) von Knorpel-Träger-Konstrukten: (1) unbelastet im Inkubator, 12-Well-Platte, (2) belastet im Gasdruckreaktor, (3) unbelastet im Inkubator, 6-Well-Platte, (4) belastet im Kolbendruckreaktor (Skala 200 µm).

Einfluss verschiedener Frequenzen auf die Knorpelbildung

Zur Untersuchung des Einflusses der Frequenzen auf die Knorpelbildung wurden in drei nacheinander durchgeführten Versuchen Konstrukte mit den Zyklen 1 Minute an/aus (1/120 Hz), 30 Sekunden an/aus (1/60 Hz) und 15 Sekunden an/aus (1/30 Hz) im Kolbendruckreaktor belastet. Jeweils fünf Knorpel-Träger-Konstrukte und fünf Konstrukte ohne Träger wurden am fünften Tag nach der Herstellung für eine Stunde am Tag an fünf Tagen in der Woche für eine Dauer von 16 Tagen belastet. Um den Effekt der Frequenzen unabhängig von den Qualitätsschwankungen in den einzelnen Versuchen darzustellen, wurden in Abbildung 6.20 die E-Module, GAG-Gehalte und GAG/DNA-Verhältnisse auf die Mittelwerte der unbelasteten Kontrollgruppen (Tabelle 8.16 im Anhang 8.2) normiert.

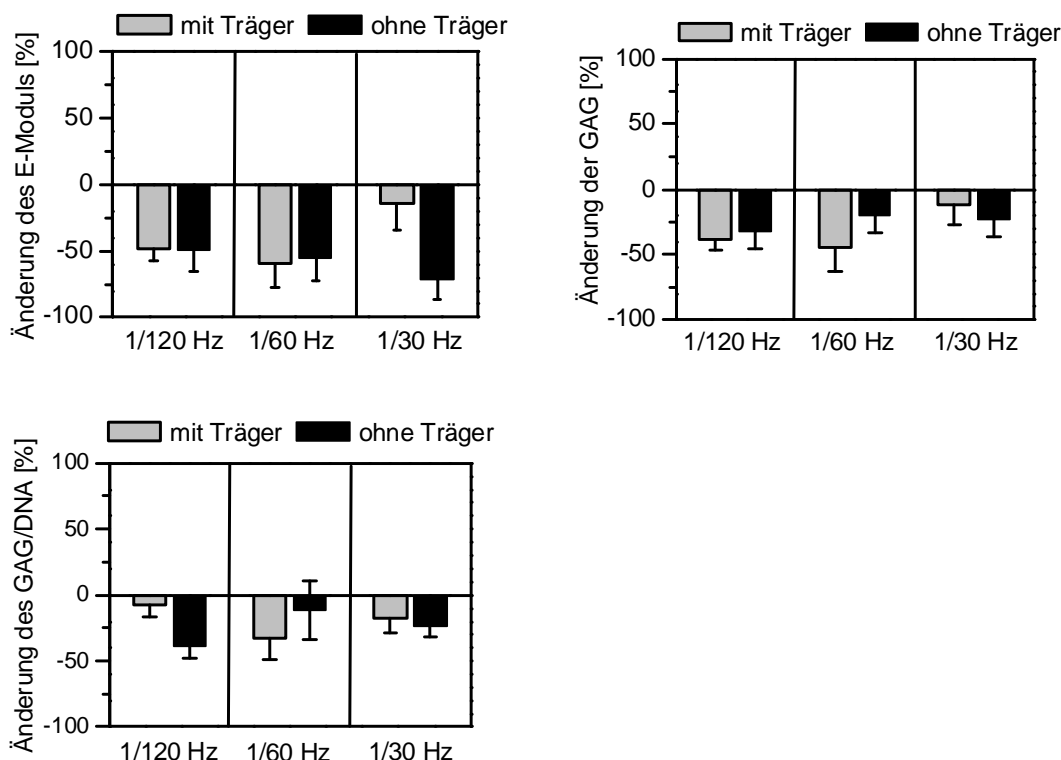


Abbildung 6.20: Änderungen der E-Module, der GAG-Gehalte und der GAG/DNA-Verhältnisse der im Kolbendruckreaktor belasteten Konstrukte unter verschiedenen Frequenzen (1 Minute an/aus, 30 Sekunden an/aus, 15 Sekunden an/aus) bezogen auf die im Inkubator unbelastet kultivierten Konstrukte. Die Belastung wurde für eine Stunde am Tag für 16 Tage durchgeführt (n = 3 für den E-Modul, n = 4-5 für den GAG-Gehalt je Bedingung).

Unter jedem Belastungszyklus konnten niedrigere Niveaus für alle dargestellten Parameter unter Belastung beobachtet werden. Die höchsten Abnahmen von bis zu 70% zeigten sich anhand des E-Moduls. Aufgrund dieser Daten können keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Frequenzen festgestellt werden.

6.3 Diskussion der hydrostatischen Druckbelastung

Belastung in den Kultivierungsphasen Alginat- und Knorpelkultur

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt im Kultivierungsprotokoll und für welche Dauer eine Belastung durch hydrostatischen Druck angebracht ist. Daher wurde die Druckbelastung sowohl in der Alginat- als auch in der Knorpelkultur im Gasdruckreaktor getestet. Die Belastung des Alginatgels mit einem Druck von 0,3 MPa und einer Frequenz von 1 Minute an/aus resultierte in Knorpel-Konstrukten mit einer deutlich schlechteren Qualität im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen. Schon am Ende der zweiwöchigen Alginatkultur wurden ein um 50% niedrigeres GAG/DNA-Verhältnis und ein um 22% niedrigerer Anteil an Kollagen Typ II produzierenden Zellen gemessen. Die biomechanischen und biochemischen Parameter des generierten Knorpelgewebes waren schließlich um bis zu 97% kleiner.

Diese Ergebnisse wurden unabhängig von der Art der Kultivierung – unbelastet oder belastet – in der Knorpelkultur festgestellt. Eine Druckbeaufschlagung in dieser Form ist daher in der Alginatkultur des beschriebenen Kultivierungsprotokolls nachteilig und wurde in weiteren Experimenten nicht mehr ausgeführt.

In Abschnitt 2.2.4 wurde bereits erläutert, dass Gegenüberstellungen zu anderen Gruppen aufgrund der Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen, Reaktoren und analytischen Methoden kaum durchführbar sind. Zum Vergleich kann daher nur eine Studie mit ähnlichen Parametern herangezogen werden. Domm *et al.* [95] fanden nach einer dreiwöchigen Kultivierung dedifferenzierter boviner Chondrozyten in einem Alginatgel unter Belastung (30 Minuten Belastung pro Tag bei 0,2 MPa) ebenfalls einen deutlich geringeren Kollagen Typ II-Anteil als bei den unbelasteten Kontrollkultivierungen.

Belastungsperioden in der Knorpelkultur

In der Knorpelkultur war zunächst vorgesehen, die Konstrukte zwei Wochen im Inkubator zu kultivieren, um die Haftung auf dem Träger und eine anfängliche Knorpelbildung zu gewährleisten. Im Anschluss schrieb das Standardprotokoll eine weitere Kultivierungswoche vor, die unter Belastung ausgeführt wurde (Gasdruckreaktor, 1 Minute an/aus, $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 0,3 MPa). Dabei ergab sich ein deutlich niedrigeres Niveau der gemessenen Parameter der belasteten Konstrukte im Vergleich zu den unbelasteten. Insgesamt fiel die Reaktion des Knorpelgewebes auf den Trägern geringer aus als die Reaktion der Konstrukte ohne Träger.

Es wurde vermutet, dass eine einwöchige Kultivierung unter Belastung nicht ausreicht, um deutliche Änderungen der Parameter zu erkennen. Mehrere Studien [90, 91, 93] zeigten zwar schon nach einer kurzen Belastungsphase von mehreren Minuten bis zu Stunden mit hydrostatischem Druck eine Erhöhung der mRNA-Konzentration von Proteoglykanen und Kollagenen oder der Einlagerung von [^{35}S]-Sulfat (Proteoglykane) und [3H]-Prolin (Gesamtkollagen). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass eine messbare Steigerung der Endprodukte, die hier durch die Glykosaminoglykan-Mengen im Gewebe und die histologischen Untersuchungen bestimmt wurden, einige Tage oder Wochen in Anspruch nimmt. Eingängige Studien zu dem Kultivierungsverlauf unter Belastung und eine Abhängigkeit einer Qualitätssteigerung von der Zeit konnten kaum gefunden werden. Zu erwähnen ist eine Studie von Carver *et al.* [94], bei der ein vergleichsweise großer Anstieg um das Fünffache der Proteoglykan-Menge von *in vitro* Knorpel in einem Perfusionsdruckreaktor nach fünf Wochen erreicht wurde. Bei einer Druckbelastung von 3,4 MPa fand der größte Anstieg im GAG-Gehalt zwischen der dritten und vierten Woche im Reaktor statt. Andere Arbeiten aus Tabelle 2.4 (Kapitel 2.2.4) über kürzere Zeiträume konnten oftmals nur Ver-

besserungen von 10-100% aufweisen. Desweiteren zeigten Smith *et al.* [96], dass die Menge an Aggrecan-mRNA über einen Zeitraum von vier Tagen unter Belastung im Vergleich zu einem Tag Belastung steigt. Daher wurde in dieser Arbeit eine Beobachtung der Knorpelqualität über einen Kultivierungszeitraum von 1-3 Wochen unter Belastung aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der Zeitpunkt, zu dem die Belastung aufgebracht wird, ausschlaggebend für den Erfolg ist.

Die Druckbeaufschlagung im Gasdruckreaktor wurde in der Knorpelkultur nach einer zweiwöchigen unbelasteten Kultivierung im Inkubator gestartet. Die Ergebnisse in den Abbildungen 6.6 und 6.7 zeigen, dass die zweiwöchige Belastung die Qualität der Konstrukte in den meisten Fällen verbesserte, auch wenn dieses aufgrund der großen Streuungen nicht signifikant war. Es konnten höhere Mittelwerte der E-Module der Knorpel-Träger-Konstrukte um 122%, der Knorpel-Konstrukte um 18%, der GAG-Gehalte der Knorpel-Träger-Konstrukte um 36% und der Knorpel-Konstrukte um 7% im Vergleich zu den unbelasteten Konstrukten erreicht werden. Demgegenüber zeigte die Versuchsreihe aus Kapitel 4.4 zur Bestimmung einer optimalen Kultivierungsdauer, dass nach drei Wochen in der Knorpelkultur der E-Modul und der GAG-Gehalt der Knorpel-Konstrukte abnahmen. Bei Knorpel-Träger-Konstrukten trat dieses Verhalten bereits in abgeschwächter Form nach zwei Wochen auf. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass eine längere Druckbelastung positiv ist, aber eine dreiwöchige Kultivierung nicht überschritten werden sollte. Im Protokoll zur hydrostatischen Druckbeaufschlagung wurde daher festgelegt, dass die Konstrukte bereits fünf Tage nach der Herstellung in den Reaktor gesetzt und dort für 16 Tage belastet werden sollten. Die Ergebnisse dieses neuen Protokolls wiesen nun signifikante Verbesserungen des E-Moduls und des GAG-Gehaltes auf. Die Differenzen zu den unbelasteten Knorpel-Träger-Konstrukten betragen 70% für den E-Modul und 42% für den GAG-Gehalt. Aber auch in Tabelle 2.4 wurde deutlich, dass die Beaufschlagung von Knorpelkulturen mit Druck oft nur zu kleineren Verbesserungen zwischen 10 und 100% oder sogar zu einer Abnahme der Knorpelqualität führte.

Konzept des Kolbendruckreaktors

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Kolbendruckreaktor können Frequenzen bis 0,25 Hz und Drücke bis 1 MPa auf die Knorpel-Konstrukte aufgebracht werden. Es wird nicht angenommen, dass zur Steigerung der Qualität der Knorpel-Konstrukte die Größenordnungen während des Gehens (4-5 MPa und 1 Hz) benötigt werden, da sich der Knorpel erst im Entwicklungsstadium befindet.

Da im Kolbendruckreaktor nur eine Kultivierungskammer für die Konstrukte mit und ohne Träger vorhanden war, wurde auch im Inkubator jeweils ein Konstrukt mit und ein Konstrukt ohne Träger zusammen in einem *Well* einer 6-Well-Platten kultiviert.

Als Resultat ergab sich ein erniedrigtes Niveau der Parameter der trägerlosen Konstrukte im Vergleich zu der alleinigen Kultivierung in einer 12-Well-Platte. Demgegenüber erhöhten sich die Eigenschaften der Knorpel-Träger-Konstrukte. In vorangegangenen Arbeiten (Dr. C. Goepfert, persönliche Mitteilung) wurde beobachtet, dass sich die Knorpelqualität der Konstrukte verschlechterte, sobald die Zellen zusätzlich zu dem Knorpel-Konstrukt in einer Monolayer auf den Boden der *Multiwell*-Platten wuchsen. Zur Verhinderung der Anhaftung von Zellen auf den Oberflächen der Platten wurden daher die *Wells* mit 1%iger Agarose vor der Kultivierung beschichtet. Wie auch bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Phänomen wird vermutet, dass die Zellen sich gegenseitig im Wachstum und der Knorpelbildung durch parakrine Signalmoleküle beeinflussen.

Vergleich der Reaktoren

Da die Reaktoren auf unterschiedlichen Prinzipien des Druckaufbaus beruhen, wurde zunächst ein Vergleich zwischen den Reaktoren durchgeführt. Dieser Versuch wurde bei 0,3 MPa Überdruck mit einem Zyklus 1 Minute an/aus für eine Stunde am Tag ab dem fünften Tag nach der Herstellung der Knorpelkultur durchgeführt. Während die Qualität (E-Modul, GAG-Gehalt, immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I und II) der Konstrukte durch die Kultivierung im Kolbendruckreaktor größtenteils gemindert wurde, war die Differenz der Parameter durch die Kultivierung im Gasdruckreaktor kleiner. Der E-Modul der Knorpel-Träger-Konstrukte wurde sogar leicht angehoben. Trotzdem zeigte sich nicht ein vergleichbares positives Bild wie im vorherigen Versuch der Belastung nach dem neuen Belastungszyklus, bei dem ein signifikant höherer E-Modul und höherer GAG-Gehalt erreicht werden konnten (Abbildung 6.8). Vermutlich ist die gewählte Belastungsdauer von einer Stunde am Tag zu kurz, da zuvor eine Dauer von sechs Stunden am Tag gewählt wurde.

Die negativen Effekte im Kolbendruckreaktor und die Unterschiede zwischen den beiden Reaktoren können möglicherweise anhand der gelösten Sauerstoffkonzentrationen (pO_2) im Medium erklärt werden. In der 23-stündigen Ruhephase stellte sich die Konzentration jeweils auf etwa 70% der Luftsättigung ein. Während der einstündigen Belastung jedoch erhöhte sich die gelöste Sauerstoffkonzentration im Kolbendruckreaktor um durchschnittlich 23%, während sie im Gasdruckreaktor in etwa gleich blieb oder sogar leicht (maximal um 6%) reduziert wurde (*offline* Messungen mithilfe einer Sauerstoffsonde der Firma PreSens, Regensburg). In einem vorangegangenen Versuch [136] konnte bei der Kultivierung von Knorpel-Träger-Konstrukten gezeigt werden, dass eine Senkung des Sauerstoffpartialdruckes von 10% auf 5% im Inkubator während der Knorpelkultur zu signifikant höheren GAG/DNA-Verhältnissen (von $17,8 \pm 1,9 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ auf $24,8 \pm 3,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$, $\alpha = 0,05$), aber zu keiner Veränderung des E-Moduls führte. Die Erhöhung der gelösten Sauerstoffkonzentration im Kolbendruck-

reaktor hat demnach sehr wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die biochemische Zusammensetzung und die biomechanischen Eigenschaften. Eine signifikante Abnahme des E-Moduls wurde aber auch schon nach einer Kultivierung im Kolbendruckreaktor ohne Belastung gemessen.

Durch den Überdruck in den Reaktoren erhöht sich nach dem Henry'schen Gesetz die Löslichkeit der Gase im Medium (Gleichung 4.1, [165]). Die Kultivierungen in den Reaktoren unterschieden sich bei gleicher Druckamplitude aber in der Geschwindigkeit des Druckaufbaus. Während im Gasdruckreaktor innerhalb von einer Minute ein Überdruck von 0,3 MPa aufgebaut wurde und anschließend sofort wieder abfiel, wurde der Überdruck im Kolbendruckreaktor innerhalb von fünf Sekunden erreicht und für weitere 55 Sekunden gehalten. Der Stoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase ist abhängig vom treibenden Konzentrationsgefälle in der Flüssigkeit (Gleichung 4.2, [166]), das wiederum vom Partialdruck in der Gasphase abhängig ist.

$$p_i = H \cdot c_i \quad (4.1)$$

mit p_i – Partialdruck [bar]
 H – Henry'sche Konstante [$L \cdot \text{bar} \cdot \text{mol}^{-1}$]
 c_i – Konzentration in der Flüssigphase [$\text{mol} \cdot L^{-1}$].

$$\frac{dc}{dt} = k_1 a \cdot (c_i^* - c_i) \quad (4.2)$$

mit dc/dt – Stoffübergang [$\text{mol} \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$]
 $k_1 a$ – volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient [s^{-1}]
 c_i^* – Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche [$\text{mol} \cdot L^{-1}$]
 c_i – tatsächliche Konzentration in der Flüssigphase [$\text{mol} \cdot L^{-1}$].

Im Kolbendruckreaktor war der Sauerstoffgradient durchschnittlich größer, da über einen längeren Zeitraum ein Überdruck von 0,3 MPa bestand, so dass der Stoffaustausch während der Druckphase höher als im Gasdruckreaktor war. Die Abbildung 6.21 (a) zeigt sogar, dass bei einer Startkonzentration von 70% der Luftsättigung der Überdruck im Gasdruckreaktor nicht ausreicht, um die Sauerstoffkonzentration im Medium zu erhöhen; sie nimmt sogar leicht bis zu einer Zeit von 44 Sekunden ab. Die Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche c_i^* erhöht sich über den Belastungszeitraum (rote Gerade), da der Druck im Reaktor gesteigert wird. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 6.21 (b) die Gleichgewichtskonzentration im Kolbendruckreaktor konstant. Innerhalb von einer Minute erhöht sich die Sauerstoffkonzentration auf 76%. Da der Sauerstoff in den kurzen Phasen ohne Belastung nicht vollständig wieder entweichen kann, steigt die Konzentration innerhalb einer Stunde bei 30 Zyklen weiter an. Bei einem absoluten Druck von 0,4 MPa und einer Begasung von 5% O_2 kann die

gelöste Sauerstoffkonzentration auf maximal 95% erhöht werden. Die Berechnungen erfolgten nur näherungsweise, da der Stoffübergangskoeffizient für gerührte Reaktoren bestimmt wurde [167], aber in den vorliegenden Druckreaktoren nicht von einer gleichmäßigen Durchmischung der Gas- und Flüssigphase ausgegangen werden kann. Aufgrund dieser niedrigen Gasübergänge wird innerhalb der 23-stündigen Ruhephase im Reaktor auch kein Gleichgewicht zu einem Sauerstoffpartialdruck von 5% erreicht.

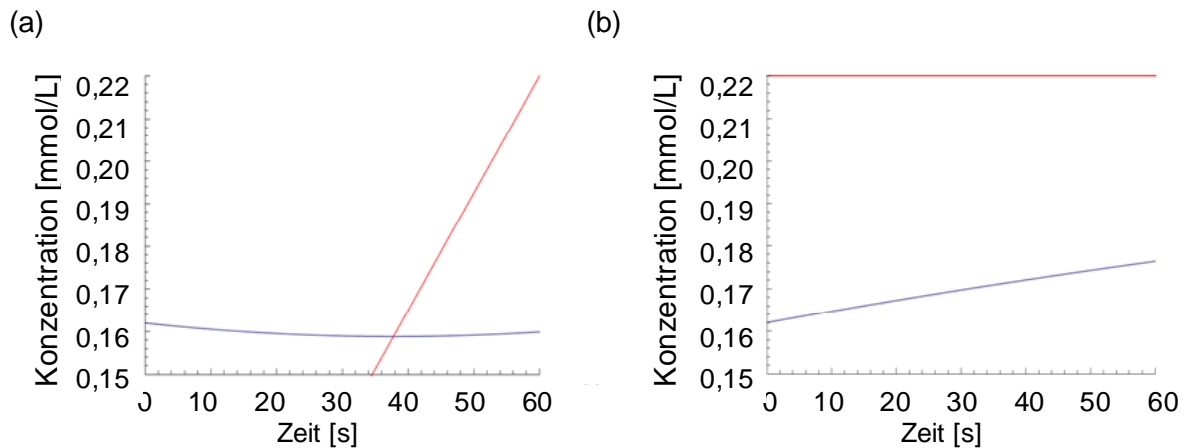


Abbildung 6.21: Gelöste Sauerstoffkonzentrationen im (a) Gasdruckreaktor und (b) Kolbendruckreaktor (blaue Kurve – Sauerstoffkonzentration, rote Gerade – Gleichgewichtskonzentration). Berechnung mithilfe des Programms Mathematica (Version 7) mit einer Startkonzentration von 70% der Luftsättigung, $H = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ [141] und $k_1 = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ [167].

Parallel zu den Messungen der Sauerstoffkonzentrationen im Medium der Reaktoren wurden auch die Konzentrationen im Medium des Inkubators bestimmt. Es traten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der 6-Well- und der 12-Well-Platte auf. Jeweils zwei Tage, nachdem das Medium getauscht wurde, betrug die gelöste Sauerstoffkonzentration vor dem erneuten Wechsel etwa 75% bezüglich der Luftsättigung. Die Sauerstoffkonzentration des frischen Mediums lag bei 100%, so dass die Zellen über den gesamten Zeitraum bei einer gelösten Sauerstoffkonzentration von 75-100% kultiviert wurden. Im Gleichgewicht mit einer Begasungsluft, die 5% Sauerstoff enthält, sollte der $p\text{O}_2$ nur 23% der Luftsättigung betragen. Die Berechnung mit den oben aufgeführten Gleichungen ergab, dass die Sauerstoffkonzentration sich schon nach 21 Minuten in der 12-Well-Platte und nach 29 Minuten in der 6-Well-Platte bis auf 5% der Gleichgewichtskonzentration genähert haben sollte. Die deutlich längeren experimentell bestimmten Zeiten lassen sich erneut auf die schlechte Durchmischung der Gas- und der Flüssigphase zurückführen. Hinzu kommt, dass sich nach dem Mediumwechsel unter der Sterilarbeitsbank Luft in den *Multiwell*-Platten befand. Es kann nicht abgeschätzt werden, in welchem Zeitraum die Luft in den Platten durch die Gasmischung im Inkubator ausgetauscht wird. Die Kontrolle der Sauerstoffkonzentration über die Begasungsluft ist also nicht geeignet, da durch den langsamen Stoffübergang innerhalb von zwei Tagen zwischen dem Mediumwechsel kein

Gleichgewicht erreicht wird. Malda *et al.* [168] kontrollierten bei ihren Versuchen den gelösten Sauerstoffgehalt im Medium und fanden bei 5% der Luftsättigung die beste Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten. Zum einen kann durch die reduzierte Sauerstoffkonzentration eine positive Signalwirkung auf die Zellen ausgeübt werden, zum anderen können sich hohe Sauerstoffkonzentrationen von 100% durch die Bildung freier Radikale, die Proteine, Lipide und DNA zerstören, toxisch auswirken (Oxidativer Stress). Wie bereits unter 2.1.2 erwähnt herrscht auch im nativen Gewebe im Kniegelenk nur eine Sättigung von 1-10%. Im weiteren Verlauf des Projektes sollte eine Reduktion der gelösten Sauerstoffkonzentration – beispielsweise durch Entgasung des Mediums mit Stickstoff – getestet werden, um eine mögliche Verbesserung zu erreichen. Wegen des langsamen Gasübergangs im Inkubator könnte auch die Verwendung von Bioreaktoren vorteilhaft sein.

Frequenzen

In Tabelle 2.4 wurden drei Studien [91, 92, 105] dargestellt, die sich mit dem Einfluss der Frequenzen bei der Druckbelastung von Chondrozyten beschäftigt haben. In den Arbeiten von Parkkinen *et al.* und Lammi *et al.* wurden Monolayer-Kulturen boviner Zellen mit Frequenzen zwischen 0,017 Hz (1/60 Hz) und 0,5 Hz (1/2 Hz) belastet. In beiden Fällen zeigte sich eine gesteigerte Einlagerung von [³⁵S]-Sulfat erst ab einer Geschwindigkeit von 0,25 Hz (1/4 Hz). Elder *et al.* untersuchten den Effekt der Frequenz zwischen 0,1-1 Hz bei bovinen Pelletkulturen und fanden bei 1 MPa und 5 MPa zwar eine Verbesserung der Knorpel Eigenschaften im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen, aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den aufgetragenen Frequenzen. Bei 10 MPa dagegen wurde eine signifikante Zunahme des Glykosaminoglykangehaltes bei 1 Hz im Vergleich zu niedrigeren Frequenzen beobachtet. Die Druckamplitude, die Kulturen, die Mediumzusammensetzung und auch das Reaktorprinzip haben aber einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die Wirkung des aufgetragenen Druckes auf die Chondrozyten, so dass die Geschwindigkeit der Druckzyklen auch für die Knorpel-Konstrukte dieser Arbeit getestet werden musste.

Es wurden die Frequenzen 1/120 Hz (0,083 Hz, 1 Minute an/aus), 1/60 Hz (0,017 Hz, 30 Sekunden an/aus) und 1/30 Hz (0,033 Hz, 15 Sekunden an/aus) bei einer Druckamplitude von 0,3 MPa gewählt. In der Abbildung 6.20 ist bei allen Frequenzen eine deutlich schlechtere Knorpelqualität zu erkennen. Zwischen den einzelnen Frequenzen konnte kein klarer Unterschied beobachtet werden. Vermutlich wurde der Effekt der Druckbelastung durch den der steigenden Sauerstoffkonzentration überlagert. Anhand dieser Versuchsreihe kann daher keine Aussage über einen Einfluss verschiedener Frequenzen gemacht werden.

Sobald jedoch die hohen Sauerstoffkonzentrationen im Medium auch im Reaktor reduziert werden können, sollte erneut Druck mit verschiedenen Frequenzen aufgebracht werden. Es wird vermutet, dass die Geschwindigkeit, mit der Knorpel-Konstrukte belastet werden, eine große Rolle spielt, da *in vivo* größtenteils hydrodynamische Drücke im Gelenkknorpel auftreten.

Beurteilung der Druckbelastung in Bioreaktoren

Die genauen Mechanismen im Knorpel und die Reaktionen der Zellen auf die unterschiedlichen Belastungsformen sind derzeit nicht ausreichend bekannt. Es existieren zwar mehrere Studien zur hydrostatischen Druckbelastung von Chondrozyten *in vitro* (Tabelle 2.4), jedoch wurden bisher nur wenige 3D-Kulturen über einen längeren Zeitraum untersucht und es wurden selten sowohl biochemische als auch biomechanische Parameter der Konstrukte bestimmt. Desweiteren werden häufig mehrere Effekte durch den verwendeten Reaktor – wie eine zusätzliche Mediumströmung – vermischt. Viele der beschriebenen Ergebnisse können daher nicht nur auf den hydrostatischen Druck zurückgeführt werden, sondern werden durch andere Einflüsse überlagert.

In dieser Arbeit wurde bei der Kultivierung im Gasdruckreaktor ohne Lastbeaufschlagung, die den Einfluss des Reaktors selbst darstellen, ein um 26% niedrigeres GAG/DNA-Verhältnis von Konstrukten ohne Träger im Vergleich zur Inkubatorkultur, aber keine signifikanten Änderungen des E-Moduls und des GAG-Gehaltes beobachtet. Dagegen wurde im Kolbendruckreaktor ein um 64% signifikant niedrigeres E-Modul bei Knorpel-Träger-Konstrukten aus dem Reaktor gemessen. Diese negativen Auswirkungen der Kultivierung in den Reaktoren vermischten sich in den Versuchen unter Druckbeaufschlagung wahrscheinlich mit dem Einfluss der Belastung auf das Knorpelgewebe.

Schon anhand der metabolischen Parameter Glucoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate konnte ein Einfluss der Belastung auf das Knorpelgewebe beobachtet werden. Im Vergleich zu den statischen Kulturen im Inkubator wurde in den Reaktoren weniger Laktat gebildet und der Ausbeutekoeffizient dadurch von $1,8 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf $1,2 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ für den Gasdruckreaktor und auf $1,6 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ für den Kolbendruckreaktor gesenkt (Abbildung 6.15 und 6.16). Es ist bekannt, dass der Metabolismus von Chondrozyten auch unter aeroben Bedingungen meist nahe dem anaeroben Verhältnis von 2 für den Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lac/Glc}}$ abläuft. In Bioreaktoren jedoch wurden bereits Werte zwischen 1,6-1,7 für den Ausbeutekoeffizienten festgestellt, so dass hier zu einem größeren Anteil der aerobe Stoffwechselweg genutzt wird [169].

Die durch Druckbelastung im Gasdruckreaktor erreichten höheren E-Module (Abbildung 6.8) lassen sich vermutlich auf eine verbesserte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zurückführen. Höhere GAG-Gehalte konnten festgestellt werden, der

Kollagenanteil wurde nicht bestimmt. Bisher konnte ein Einfluss auf die Aktivität von Ionenkanälen von Chondrozyten durch hydrostatischen Druck nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.3) [75]. Es ist aber nicht möglich, mit dieser Art der Belastung eine Ausrichtung der Kollagenfasern und die Einteilung des Gewebes in die knorpelspezifischen Zonen zu erreichen, da hydrostatischer Druck von allen Seiten mit der gleichen Größe wirkt. Während einer hydrostatischen Belastung wird das Gewebe bis mindestens 12 MPa nicht deformiert und auch die festen Bestandteile in der extrazellulären Matrix und der interstitiellen Flüssigkeit sind inkompressibel, so dass keine Flüssigkeitsverschiebung und damit keine anderen Kräfte außer der Druckbelastung auftreten [170]. Desweiteren verändern sich auch die Ionenkonzentration und der pH-Wert der extrazellulären Matrix nicht, so dass kein elektrochemischer Gradient über die Zellmembranen entsteht. Dem Gewebe wird also keine Richtung wie durch die mechanische Belastung im Kniegelenk vorgegeben. Um die spezielle Organisation im Knorpel zu erreichen, muss das Gewebe mit mechanischen Kräften belastet werden, so dass Kompression und Flüssigkeitsströmungen entstehen. Diese Anordnung ist für eine Zunahme des E-Moduls bis hin zu nativen Werten unerlässlich. Zur optimalen Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten ist einzig hydrostatischer Druck vermutlich nicht ausreichend. Dennoch ist die Erforschung von reinem hydrostatischem Druck wichtig, um die Reaktion der Zellen unabhängig von den anderen Kräften zu verstehen und im Anschluss aus der Kombination von den Belastungsformen die bestmögliche Umgebung für die Kultivierung *in vitro* zu schaffen.

Mithilfe der Belastung kann möglicherweise die zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren reduziert werden. Diese Annahme beruht auf einer Studie [105], in der ein synergistischer Effekt von hydrostatischem Druck und Wachstumsfaktoren auf die Knorpelbildung gezeigt werden konnte. So wurde beobachtet, dass die Kombination aus hydrostatischem Druck, BMP-2 und IGF-I die Qualität der Konstrukte im Vergleich zur Belastung ohne Wachstumsfaktoren senkt. Es wurde diskutiert, dass durch Druck Signalkaskaden anderer Wachstumsfaktoren innerhalb der Zelle ausgelöst wurden. Dadurch können Kombinationen entstehen, die negative Effekte auf die Syntheseleistung der Zellen haben. Die Identifizierung dieser Signaltransduktionswege wäre sinnvoll, um mit einer angemessenen Kombination aus hydrostatischem Druck und Wachstumsfaktoren eine weitere Optimierung zu erreichen. Möglicherweise könnte mit einer anderen Wachstumsfaktor-Kombination auch die Redifferenzierung der Zellen in der Alginatkultur verbessert werden.

7 SCHLUSSBEMERKUNGEN

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse von konventionellen Methoden zur Behandlung von Knorpeldefekten wird nach innovativen Therapiemöglichkeiten gesucht, mit denen Gelenkoberflächen wiederhergestellt werden können. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Konzept werden aus körpereigenen Zellen *in vitro* Knorpel-Träger-Konstrukte für osteochondrale Defekte im Kniegelenk hergestellt, die nach Ausbohrung des Defektes implantiert werden sollen. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch Variationen der Wachstumsfaktoren, des Trägers und der Kultivierungsdauer im beschriebenen Protokoll eine Verbesserung der Knorpelqualität zu erreichen, um im Anschluss den Effekt hydrostatischer Druckbelastung während der Kultivierung von Knorpel-Träger-Konstrukten mithilfe speziell angefertigter Bioreaktoren am porcinen Modell zu untersuchen.

Nach der Bestimmung der Wachstumsfaktor-Zusätze während der Alginat- und Knorpelkultur und der optimalen Kultivierungsdauer in der Knorpelkultur wurde ein Standardprotokoll festgelegt, auf dem alle weiteren Versuche basierten. Die Wahl von IGF-I und TGF- β 1 während der Alginatkultur und die Kultivierung ohne Wachstumsfaktoren in der dreiwöchigen Knorpelkultur führten zu einem E-Modul von 7% und einem Glykosaminoglykan-Gehalt von 40% des nativen Niveaus für die Knorpel-Träger-Konstrukte. Laufend werden in der Forschung neue Wachstumsfaktoren identifiziert und charakterisiert, durch deren Gabe eine weitere Verbesserung der Knorpelqualität denkbar wäre. Die gewählten Kombinationen sind nicht ohne Weiteres auf andere Zellen beispielsweise humane Chondrozyten oder Progenitorzellen übertragbar.

Die Verwendung eines keramischen Trägers führte bei der Kultivierung der Konstrukte zu Schwierigkeiten. Das Herstellungsverfahren mit der Kombination aus Teller und Hülsen resultierte schon während der Zentrifugation der redifferenzierten Chondrozyten auf die Träger in einem Zellverlust von durchschnittlich 23% und ist damit in der bestehenden Form nicht optimal. Desweiteren ist der Träger mechanisch kaum belastbar. Generell war die Knorpelqualität bei Verwendung eines Trägers beträchtlich niedriger als ohne Träger (71% im E-Modul und 54% im GAG-Gehalt). Die Ursache konnte nicht eindeutig bestimmt werden, möglich sind ein Nährstoffmangel im Inneren des kultivierten Knorpels durch Stofftransportlimitierungen vom Träger aus oder eine lokale pH-Wert-Änderung am Träger. Das Trägermaterial Hydroxylapatit selbst hatte in den Versuchen keine Effekte. Hydroxylapatit kommt natürlich in großen Mengen im Knochen vor und steht damit auch *in vivo* im direkten Kontakt zum Knorpel. Eine der durchgeführten Studien beschäftigte sich mit dem Einfluss der Oberflächenstruktur des Trägers. Im

Wesentlichen wurden eine Veränderung der Adhäsion und Proliferation der Chondrozyten auf den verschiedenen Hydroxylapatit-Strukturen und eine Veränderung in der Stärke der Haftung zwischen dem Träger und dem Knorpelgewebe beobachtet. Insgesamt verdeutlichen die Arbeiten aus diesem Abschnitt, dass eine Anpassung der Trägereigenschaften auf das angewendete Konzept dringend erforderlich ist.

Da für den Einsatz in der Klinik gleichbleibende Qualitätsstandards gefordert werden, wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens untersucht. Nacheinander durchgeführte Experimente unter identischen Bedingungen zeigten signifikante Abweichungen um bis zu 58% in der Höhe des E-Moduls. Zusätzlich beeinflussten der Donor und das verwendete porcine Serum die Knorpelqualität signifikant. In der klinischen Anwendung von *Tissue Engineering* Methoden bezüglich des Knorpels werden meistens sowohl autologe Zellen als auch autologes Serum verwendet, so dass auch hier keine festgelegte Qualität der Knorpel-Träger-Konstrukte gewährleistet werden kann. Für die Forschung wäre eine serumfreie Kultivierung sinnvoll, um einen Wechsel des Serums alle 1-2 Jahre und die damit verbundenen Qualitätsschwankungen zu vermeiden. Die analysierten Eigenschaften der Alginatkultur (GAG/DNA-Verhältnis, Prozentsatz an Kollagen Typ I und II produzierenden Zellen) wiesen geringere Schwankungen auf, so dass aus diesen Parametern nicht der Erfolg der Kultivierung abgeleitet werden kann. Trotz der gezeigten Fortschritte der letzten Jahre existieren generell viele unbekannte Faktoren, die Zellreaktionen auslösen und derzeit nicht kontrolliert werden können. Eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens ist in Zukunft wichtig.

Im Zuge der genannten Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit konnte eine lineare Korrelation ($r = 0,725$, $p = 0,002$) zwischen dem Glykosaminoglykan-Gehalt und dem E-Modul von kultiviertem Knorpel festgestellt werden. Glykosaminoglykane wirken bei länger andauernder Belastung durch ihre elektrochemischen Eigenschaften Kompressionskräften entgegen. Dennoch konnten diese Zusammenhänge nicht im nativen Gewebe festgestellt werden, in dem der E-Modul neben dem GAG-Gehalt vom speziellen Aufbau des Knorpels und der Wechselwirkung der Makromoleküle (Proteoglykane und Kollagene) abhängig ist. Bisher konnte die knorpelspezifische Organisation im *in vitro* Gewebe nicht beobachtet werden und der Hydroxyprolin-Gehalt als Maß für das Gesamtkollagen betrug nur 11% des nativen Niveaus.

Es wird erwartet, dass durch eine physiologische Belastung während der Kultivierung von Knorpelgewebe sowohl eine erhöhte Matrixproduktion als auch eine Ausrichtung der Matrixbestandteile und damit Steigerung des E-Moduls erreicht werden kann. Um keine Überschneidung verschiedener Effekte zu erhalten, wurde in dieser Arbeit nur die Auswirkung von hydrostatischem Druck untersucht, der bei der anfänglichen Aufbringung von Kräften einen großen Teil der Last übernimmt. Mit den Versuchen im

Gasdruckreaktor konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Belastung eine wichtige Rolle spielt. Bei der Druckbelastung in der Knorpelkultur konnte eine Steigerung der gemessenen Parameter um bis zu 70% durch einen frühen Beginn und eine längere Zeitdauer erreicht werden. Die Redifferenzierung der Zellen in einem Alginatgel wurde dagegen nicht durch die Belastung unterstützt. Die Wirkung des Druckes ist also – wie auch der Einfluss von Wachstumsfaktoren – vom Differenzierungsstatus der Zellen abhängig. Eine Belastung von nur einer Stunde am Tag lieferte im Gegensatz zu einer sechsständigen Belastung keine Verbesserung der Knorpelqualität. Schließlich konnte ein Belastungsprotokoll in der Knorpelkultur (1 Minute an/aus, $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 0,3 MPa, ab Tag 5 für 16 Tage) festgelegt werden, mit dem eine Verbesserung der Knorpelqualität im Gasdruckreaktor erreicht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zweiter Druckreaktor konstruiert, um den Einfluss höherer Frequenzen zu untersuchen. Der Gasdruckreaktor ist auf eine Frequenz von 1 Minute an/aus (1/120 Hz) und eine Druckamplitude von 0,3 MPa limitiert, während der neue Kolbendruckreaktor eine Geschwindigkeit von 1/4 Hz und einen Druck von 1 MPa erreichen kann. Die ersten Versuche in diesem Reaktor resultierten in deutlich verschlechterten Knorpel Eigenschaften im Vergleich zur Inkubator kultivierung. Vermutlich lässt sich diese Reaktion der Zellen auf die hohe gelöste Sauerstoffkonzentration im Medium des Reaktors zurückführen, die infolge der unter Druck erhöhten Löslichkeit von Gasen um durchschnittlich 23% während der Belastungsphasen anstieg. Eine Begasung ist aufgrund der relativ langen Kultivierungsdauer von 16 Tagen im Reaktor erforderlich. Diese erfolgte innerhalb des Reaktors, um eine externe Begasung und damit erforderliche Perfusion des Mediums zu vermeiden, die möglicherweise dem auch bei Belastung vorkommenden Flüssigkeitsstrom im Knorpel ähnelt und damit Zellreaktionen auslöst. Vermutlich durch den Effekt der erhöhten Sauerstoffkonzentration überlagert konnte kein Einfluss verschiedener Frequenzen während der Druckbelastung festgestellt werden. Nach der Reduktion der Sauerstoffkonzentration im Medium sollten unterschiedliche Frequenzen und Drücke aufgebracht werden, da aufgrund der Gegebenheiten im Kniegelenk diesen Größen eine Bedeutung zugesprochen wird.

In den letzten Jahren haben sich Bioreaktoren auf dem Gebiet des *Tissue Engineering* etabliert, um wissenschaftliche Fragestellungen über die Funktionalität von Zellen und Geweben zu beantworten, indem sie eine physiologische Umgebung für die Kulturen bieten [154]. Da das Verständnis für diese Vorgänge noch nicht hinreichend erforscht ist, werden derzeit Prozessparameter meist ungezielt gewählt. Erste Ansätze zur Bestimmung der Kultivierungsbedingungen können über das Modellieren der Gegebenheiten im nativen Knorpel bei Belastung und der tatsächlich im Reaktor auftretenden Kräfte innerhalb der Konstrukte gewonnen werden. Mit der Beantwortung dieser

Fragen kann die Modellierung bei der Weiterentwicklung und Optimierung der bestehenden Reaktoren helfen. Desweiteren können Untersuchungen der Zellreaktionen auf molekularbiologischer Ebene Hinweise auf erfolgsversprechende Belastungszyklen liefern.

Bezüglich des Druckes im Gelenkknorpel ist unter anderem bekannt, dass Ionenkanäle auf hydrostatische Belastung reagieren. Viele Signaltransduktionswege, die bei Druck aktiviert oder inhibiert werden, sind aber noch nicht identifiziert und auch Wechselwirkungen zwischen anderen Kultivierungsbedingungen wie zwischen den Wachstumsfaktor-Zusätzen und der Belastung sind noch ungeklärt. *In situ* überlagern sich Belastungen aus Druck, Kompressions-, Scher- und Zugkräften und einem Flüssigkeitsfluss, die vermutlich auch *in vitro* kombiniert werden müssen, um die erwünschten Resultate zu erzielen. Nach der Erforschung der einzelnen Belastungsformen sowohl in Bezug auf die Zellreaktionen im Einzelnen als auch auf die Eigenschaften der Knorpel-Träger-Konstrukte kann eine geeignete Verbindung der Kräfte abgeschätzt werden.

Insgesamt konnten also seit Beginn der Forschung zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten durch Modifikationen am Protokoll deutliche Verbesserungen der biochemischen und biomechanischen Parameter (E-Modul, GAG-Gehalt und GAG/DNA-Verhältnis) erreicht werden. In Abbildung 7.1 wird dieser Fortschritt im Vergleich zu den nativen Parametern gezeigt. Der Startpunkt sind Werte aus dem Jahr 2004 [141]. Der E-Modul wurde nicht nach dem aktuellen Messprotokoll bestimmt und kann daher nicht mit den heutigen Werten verglichen werden. Zum Jahr 2005 wurden die Sauerstoffkonzentrationen in der Gasphase der Alginate- und Knorpelkultur auf 5% erniedrigt und anstatt der Zellen vom *Minipig* wurden nun Zellen des Hausschweins verwendet [136]. Die zuletzt dargestellten Werte zeigen schließlich die Verbesserung durch die Einführung des Standardprotokolls (2006), das nach den Variationen im Protokoll aus Kapitel 4 festgelegt wurde.

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Jahr 2004 konnten alle Parameter signifikant gesteigert werden. Während sich der GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis nahezu vervierfacht haben, maß der E-Modul 2006 den siebenfachen Wert im Vergleich zum Jahr 2005. Neben der Einführung des Standardprotokolls spielt vermutlich die Umstellung des Donors auf das deutlich jüngere Hausschwein mit einem Alter von 4-6 Monaten bei der Zellisolierung im Vergleich zum *Minipig* mit einem mittleren Alter von 27 Monaten eine Rolle [39]. In einem vorangegangenen Versuch [136] konnte ein signifikanter Einfluss auf das GAG/DNA-Verhältnis ($\alpha = 0,05$) durch die Umstellung belegt werden, das mit Zellen des Hausschweins um 40% höhere Werte erzielte.

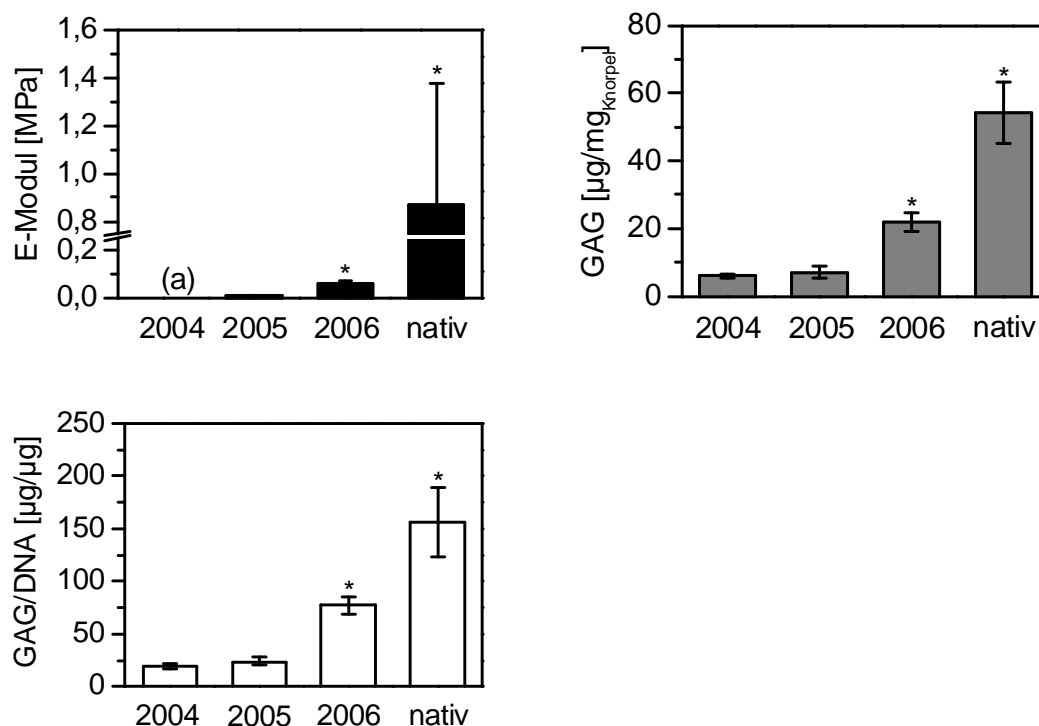


Abbildung 7.1: Fortschritte der Knorpel-Qualität von Knorpel-Träger-Konstrukten von 2004 bis 2006 im Vergleich zu den nativen Eigenschaften anhand der E-Module, GAG-Gehalte und GAG/DNA-Verhältnisse. Jahr 2004: Daten von Dr. S. Nagel-Heyer [141], Jahr 2005: Daten von Dipl.-Ing. J. Heyland [136], Jahr 2006: eigene Daten. (a) Der E-Modul aus dem Jahr 2004 wurde nicht nach dem aktuellen Messprotokoll bestimmt und kann daher nicht mit den heutigen Werten verglichen werden. Die Daten stammen jeweils aus einem Versuch ($n = 3$ für den E-Modul, $n = 4$ bzw. 5 für den GAG-Gehalt für die Daten aus dem Jahr 2004 und 2005 bzw. aus dem Jahr 2006, $\alpha = 0,05$).

Der E-Modul, der GAG-Gehalt und das GAG/DNA-Verhältnis der Konstrukte in Abbildung 7.1, die nach dem Standardprotokoll angefertigt wurden, betragen nun 7%, 40% und 50% der entsprechenden nativen Werte. Es ist nicht bekannt, in wieweit die Parameter der Konstrukte den Eigenschaften des nativen Knorpels vor der Implantation gleichkommen müssen, da eine Reifung des kultivierten Gewebes *in vivo* erfolgen kann [39, 63, 64]. Dennoch sollte vor allem eine Steigerung des noch niedrigen E-Moduls – möglicherweise durch das Aufbringen verschiedener Kombinationen der Belastungsarten während der Kultivierung – angestrebt werden, um die Funktionalität der Knorpel-Träger-Konstrukte vor der Implantation zu erhöhen. Zu erwähnen ist außerdem die Tatsache, dass die dargestellte Verbesserung der Knorpelqualität für porcine Chondrozyten erreicht wurde, während die Übertragung und Anpassung des humanen Systems noch bevorsteht.

8 ANHANG

8.1 Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen

Tabelle 8.1: Lösungen zur Gewinnung von Chondrozyten.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
PBS	8,0 g·L ⁻¹ NaCl 0,2 g·L ⁻¹ KCl 0,2 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0,75 g·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O in A. dest.	Carl Roth
Hyaluronidase Typ III	1 mg·mL ⁻¹ Hyaluronidase Typ III (<i>from sheep</i>) in PBS	Carl Roth
Trypsin/EDTA	0,5 mg·mL ⁻¹ Trypsin 0,22 mg·mL ⁻¹ EDTA in PBS	PAA Laboratories
Kollagenase Typ 1a	0,5 mg·mL ⁻¹ Kollagenase Typ 1a in PBS/Proliferationsmedium	Sigma Aldrich
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) in FCS	Carl Roth/ PAA Laboratories

Tabelle 8.2: Lösungen zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Waschpuffer	150 mM NaCl 25 mM HEPES	Carl Roth
Alginate-Stammlösung	24 g·L ⁻¹ Alginate in A. dest.	Sigma Aldrich
Alginate-Gebrauchslösung	Alginate-Stammlösung 1:2 in 300 mM NaCl 50 mM HEPES	Sigma Aldrich/ Carl Roth
Calciumpuffer	100 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 25 mM HEPES	Carl Roth
Citratpuffer	150 mM NaCl 55 mM Tri-Natriumcitrat Dihydrat 25 mM HEPES	Carl Roth

Tabelle 8.3: Lösungen zum Papain-Verdau.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Papain-Stammlösung	10 mg·mL ⁻¹ Papain	Roche
Papain-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ 5 µM EDTA in A. dest., pH=6,0	Carl Roth
Papainlösung (je Probe)	500 µL Papain-Puffer 5 µL Mercaptoethanol 2,5 µL Papain-Lösung	Carl Roth

Tabelle 8.4: Lösungen zur DNA-Analyse.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Standard-Stammlösung	25 µg·mL ⁻¹ Kalbsthymus DNA	Roche
Standard-Gebrauchslösung	5 µg·mL ⁻¹ aus der Stammlösung in Verdünnungspuffer	Roche/Carl Roth
Verdünnungspuffer	2,5 M NaCl 18 mM Tri-Natriumcitrat in A.dest, pH=7,0	Carl Roth
Ansatzpuffer	2,5 M NaCl 15 mM Tri-Natriumcitrat in A.dest, pH=7,0	Carl Roth
Bisbenzimid-Stammlösung	1 mg·mL ⁻¹ Bisbenzimid in A.dest.	Hoechst
Bisbenzimid-Gebrauchslösung	2 µg·mL ⁻¹ Bisbenzimid in Ansatzpuffer	Hoechst

Tabelle 8.5: Lösungen zur GAG-Analyse.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Standard-Stammlösung	5 mg·mL ⁻¹ Chondroitinsulfat in A. dest. (Chondroitinsulfat C, <i>sodium salt, from shark cartilage</i>)	Sigma-Aldrich
Standard-Gebrauchslösung	20 µg·mL ⁻¹ aus der Stammlösung in A. dest.	Sigma-Aldrich
Farbstofflösung	27,2 mg·L ⁻¹ 1,9-dimethyl-Methylenblau 5,168 g·L ⁻¹ Glycin 4,03 g·L ⁻¹ NaCl 32,2 mL·L ⁻¹ HCl (1 M)	Serva

Tabelle 8.6: Lösungen zur Hydroxyprolin-Analyse.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Boratpuffer	30,9 g·L ⁻¹ Borsäure, pH=7,7	VWR International
FMOC	0,776 g·L ⁻¹ in Aceton	VWR International
Adamantanammoniumchlorid	7,5 g·L ⁻¹ in Aceton-Wasser (3:1)	VWR International

Tabelle 8.7: Lösungen zur Immunfärbung gegen Kollagen Typ I und II.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Hyaluronidase Typ III	1 mg·mL ⁻¹ Hyaluronidase Typ III (<i>from sheep</i>) in 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , pH=5,5-5,6	Carl Roth
Tris/NaCl-Puffer	6,05 g·L ⁻¹ Tris 8,5 g·L ⁻¹ NaCl, pH=8,24 mit HCl	Carl Roth
Natriumnitrit-Lösung	40 g·L ⁻¹ Natriumnitrit in A. dest.	VWR International
Neufuchsin-Lösung	50 g·L ⁻¹ Neufuchsin in 2 M HCl	Sigma-Aldrich
Naphtol-AS-BI-Phosphat-Lösung	33 g·L ⁻¹ Naphtol-AS-BI-Phosphat in Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Färbelösung	7,5 mL Natriumnitrit-Lösung, 0,3 mL Neufuchsin-Lösung, 150 mL Tris/NaCl-Puffer, 750 µL Naphtol-AS-BI-Phosphat-Lösung	

Tabelle 8.8: Lösungen zur Färbung mit Safranin O.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Safranin O-Lösung	2 g·L ⁻¹ Safranin O in 1%iger Essigsäure	Sigma-Aldrich
<i>Fast Green</i> -Lösung	0,2 g·L ⁻¹ <i>Fast Green</i> in A. dest.	Sigma-Aldrich

8.2 Biomechanische und biochemische Parameter ausgewählter Versuche

Tabelle 8.9: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Träger-Konstrukten auf unbehandelten Trägern, mit Papier geschliffenen Trägern und mit Folie geschliffenen Trägern (n = 3 für den E-Modul, n = 5 für die übrigen Parameter).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [µg·mg ⁻¹]	GAG [µg·mg ⁻¹]	GAG/DNA [µg·µg ⁻¹]
unbehandelter Träger	18,6 ± 5,6	0,7 ± 0,3	16,2 ± 4,1	0,41 ± 0,05	12,1 ± 2,5	29,9 ± 8,0
mit Papier geschl. Träger	23,3 ± 2,8	1,2 ± 0,2	23,1 ± 13,6	0,47 ± 0,06	11,9 ± 1,6	26,0 ± 7,2
mit Folie geschl. Träger	21,5 ± 3,3	1,0 ± 0,1	26,4 ± 10,1	0,44 ± 0,05	14,8 ± 2,5	34,5 ± 7,3

Tabelle 8.10: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Träger-Konstrukten, Knorpel-Konstrukten ohne Träger und Knorpel-Konstrukten mit beigelegtem Träger. Knorpel-Konstrukte mit beigelegtem Träger wurden ohne Träger angefertigt und mit einem zusammen kultiviert (n = 3 für den E-Modul, n = 3 bzw. 5 für die übrigen Parameter für die Bedingung „mit beigelegtem Träger“ bzw. für die anderen Bedingungen).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Knorpel-Träger-Konstrukt	18,6 ± 4,3	0,70 ± 0,21	16,2 ± 3,3	0,41 ± 0,04	12,1 ± 2,3	29,9 ± 7,2
ohne Träger	37,0 ± 2,2	1,74 ± 0,06	57,3 ± 9,9	0,29 ± 0,06	26,3 ± 1,3	92,0 ± 1,3
mit beigelegtem Träger	34,2 ± 2,4	1,76 ± 0,13	67,7 ± 22,4	0,21 ± 0,08	21,6 ± 6,5	104,5 ± 9,3

Tabelle 8.11: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die unter identischen Bedingungen mit der Zellen der Donoren (1) bis (3) kultiviert wurden. Die Ergebnisse jedes Donors stammen jeweils aus 6, 4 bzw. 4 Ansätzen (n = 3 für den E-Modul, n = 3-5 für die übrigen Parameter je Ansatz).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Donor (1)	67,3 ± 15,0	2,2 ± 0,2	66,6 ± 26,8	0,23 ± 0,04	21,0 ± 4,5	96,5 ± 26,5
Donor (2)	62,2 ± 22,9	2,1 ± 0,6	49,0 ± 22,8	0,24 ± 0,06	20,5 ± 5,0	83,4 ± 20,9
Donor (3)	61,2 ± 7,2	2,2 ± 0,1	33,5 ± 8,0	0,23 ± 0,06	16,8 ± 1,4	79,1 ± 20,1

Tabelle 8.12: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die unter identischen Bedingungen mit verschiedenen porcinen Seren kultiviert wurden (n = 3 je Bedingung).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Serum (1)	95,3 ± 6,1	2,6 ± 0,1	36,2 ± 6,7	0,15 ± 0,02	15,2 ± 1,5	99,1 ± 5,0
Serum (2)	71,8 ± 4,6	2,3 ± 0,1	36,1 ± 11,5	0,24 ± 0,11	16,2 ± 1,0	67,6 ± 3,0
Serum (3)	61,2 ± 6,3	2,1 ± 0,1	19,0 ± 4,7	0,26 ± 0,03	14,5 ± 1,4	55,3 ± 2,4

Tabelle 8.13: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von nativem porcinem Knorpel der Knie (1) bis (7) (n = 18 je Knie).

	E-Modul [MPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Knie (1)	1,1502 ± 0,5371	0,35 ± 0,07	57,4 ± 8,8	169,7 ± 48,7
Knie (2)	0,4090 ± 0,3527	0,38 ± 0,06	65,3 ± 9,2	175,1 ± 22,1
Knie (3)	0,8527 ± 0,3592	0,33 ± 0,06	55,4 ± 6,4	169,3 ± 24,7
Knie (4)	0,8484 ± 0,3716	0,36 ± 0,09	50,5 ± 7,3	150,4 ± 41,8
Knie (5)	1,0143 ± 0,3930	0,35 ± 0,07	51,8 ± 9,3	154,6 ± 38,2
Knie (6)	0,8242 ± 0,5006	0,27 ± 0,04	48,8 ± 6,6	148,5 ± 33,3
Knie (7)	1,1512 ± 0,6192	0,45 ± 0,09	59,4 ± 5,7	136,4 ± 30,7

Tabelle 8.14: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die während der verschiedenen Kultivierungsphasen entweder im Inkubator oder im Gasdruckreaktor ohne Belastung kultiviert wurden (n = 3 für den E-Modul und die Höhe, n = 3-5 für die übrigen Parameter je Bedingung).

Alginate-kultur	Knorpel-kultur	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Inkubator	Inkubator	60,0 ± 2,4	2,3 ± 0,1	36,0±10,5	0,17±0,10	17,2 ± 0,7	101,5 ± 8,4
Inkubator	Reaktor	61,4 ± 2,0	2,2 ± 0,1	33,3±11,8	0,25±0,04	18,6 ± 2,8	73,4 ± 3,6
Reaktor	Inkubator	49,2 ± 2,7	1,9 ± 0,1	30,9±0,1	0,21±0,01	16,9 ± 1,3	79,2 ± 7,3
Reaktor	Reaktor	56,5 ± 4,3	1,9 ± 0,0	32,9±0,8	0,23±0,05	16,5 ± 1,2	72,2 ± 10,4

Tabelle 8.15: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter von Knorpel-Konstrukten ohne Träger, die während der verschiedenen Kultivierungsphasen entweder im Inkubator oder im Kolbendruckreaktor ohne Belastung kultiviert wurden (n = 3 für den E-Modul und die Höhe, n = 3-5 für die übrigen Parameter je Bedingung).

Kultivierungs-bedingung		Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Inkubator	mit	35,8 ± 3,4	1,7 ± 0,1	11,6 ± 1,8	0,34 ± 0,08	10,0 ± 2,4	31,0 ± 13,0
Reaktor	Träger	35,1 ± 2,2	1,2 ± 0,0	4,2 ± 0,6	0,27 ± 0,03	7,6 ± 0,6	28,2 ± 1,8
Inkubator	ohne	56,6 ± 2,9	2,0 ± 0,2	7,7 ± 4,7	0,22 ± 0,03	8,6 ± 2,6	38,4 ± 7,6
Reaktor	Träger	54,3 ± 2,1	1,9 ± 0,2	8,1 ± 1,8	0,21 ± 0,02	7,9 ± 0,4	37,9 ± 3,2

Tabelle 8.16: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter der Kontrollen der Versuche zur Belastungsdauer. Die Kontrollen wurden ohne Träger für 3 Wochen in der Knorpelkultur nach dem Standardprotokoll mit Zellen desselben Donors kultiviert (n = 3 für den E-Modul und die Höhe, n = 3-5 für die übrigen Parameter je Bedingung).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Versuch (1)	56,0 ± 16,2	2,3 ± 0,1	51,6 ± 34,4	0,28 ± 0,06	17,6 ± 8,1	65,1 ± 34,0
Versuch (2)	76,0 ± 6,2	2,2 ± 0,1	72,1 ± 11,7	0,20 ± 0,02	23,4 ± 1,8	117,2 ± 15,1
Versuch (3)	90,7 ± 8,3	2,3 ± 0,2	53,1 ± 9,2	0,25 ± 0,02	16,9 ± 1,5	68,0 ± 5,5
Versuch (4)	53,0 ± 2,9	1,9 ± 0,1	75,7 ± 13,9	0,22 ± 0,01	23,2 ± 3,7	105,3 ± 15,8
Versuch (5)	66,0 ± 2,8	2,0 ± 0,1	106,8 ± 6,4	0,20 ± 0,01	23,0 ± 1,9	113,3 ± 11,3
Versuch (6)	70,3 ± 4,9	2,4 ± 0,2	45,3 ± 11,1	0,20 ± 0,02	21,4 ± 2,0	109,2 ± 9,0

Tabelle 8.17: Physikalische, biomechanische und biochemische Parameter der Kontrollen der Versuche zum Einfluss der Frequenz bei der Druckbelastung. Die Kontrollen wurden ohne Träger für 3 Wochen in der Knorpelkultur mit Zellen desselben Donors nach dem Standardprotokoll kultiviert (n = 3 für den E-Modul und die Höhe, n = 3-5 für die übrigen Parameter je Bedingung).

	Masse [mg]	Höhe [mm]	E-Modul [kPa]	DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	GAG/DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]
Versuch (1)	68,2 ± 5,7	2,4 ± 0,2	27,5 ± 9,4	0,23 ± 0,05	18,4 ± 1,5	83,7 ± 23,1
Versuch (2)	80,0 ± 3,1	2,9 ± 0,1	27,1 ± 4,2	0,21 ± 0,01	19,8 ± 3,5	92,9 ± 3,5
Versuch (3)	75,7 ± 1,7	2,6 ± 0,1	39,9 ± 5,0	0,16 ± 0,01	19,6 ± 0,6	121,5 ± 2,8

8.3 Inbetriebnahme des Kolbendruckreaktors

In diesem Abschnitt werden der Verlauf der Inbetriebnahme und die Testung des Kolbendruckreaktors beschrieben, die vor der Kultivierung durchgeführt werden mussten.

Nach der Fertigung der Einzelteile durch die TUHH-eigene Werkstatt und der Fertigstellung des Kolbendruckreaktors wurden zunächst die Dichtigkeit bis 1 MPa und die Steuerung des Reaktors getestet und angepasst. Abbildung 8.1 bildet die Oberfläche der Steuerung ab. Der obere Verlauf zeigt die verschiedenen Zustände an, der untere zeichnet den Druckverlauf auf. Es stellte sich heraus, dass es nötig war, den Druckabbau über das Drosselventil auf etwa 5 Sekunden zu verlangsamen, falls zwischen den einzelnen Druckamplituden eine Begasung erwünscht ist. Anderenfalls kam es innerhalb der Belastungskammer zu einer Blasenbildung, die über die Begasungsluft ausgetragen wurden. Dieses resultierte in einem Mediumverlust.

Zurzeit können Frequenzen bis 0,25 Hz (1/4 Hz) aufgebracht werden. Höhere Frequenzen können zwar durch den Motor ausgeführt werden, jedoch müsste das Prozessleitsystem dieser Geschwindigkeit angepasst werden, das dann maximal jede Sekunde einen Messwert des Drucksensors abnehmen kann.

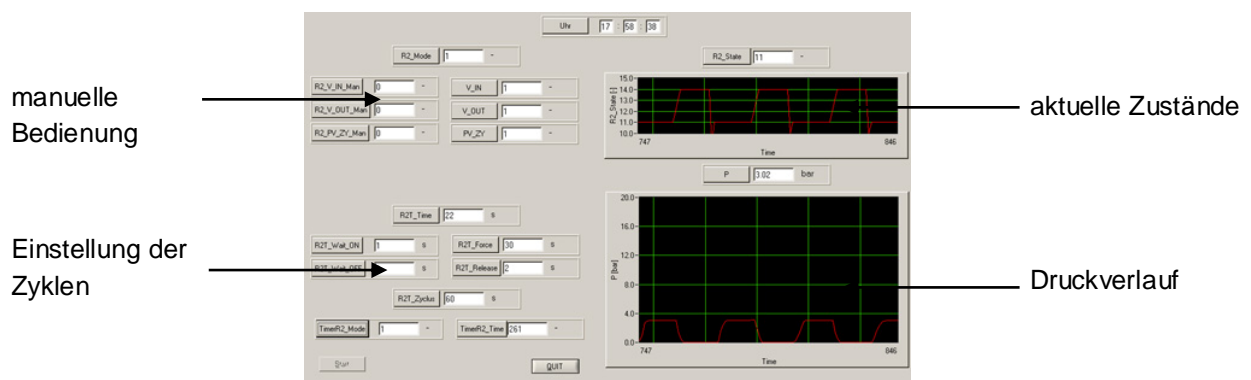


Abbildung 8.1: Oberfläche der Steuerung des Kolbendruckreaktors.

Der Reaktor konnte unter sterilen Bedingungen (Autoklav, Sterilarbeitsbank) gehandhabt werden und innerhalb einer dreiwöchigen Inkubation bei 37°C unter Versuchsbedingungen traten keine Kontaminationen auf (Kontrolle unter dem Lichtmikroskop). Desweiteren war eine Kontrolle des pH-Wertes erforderlich, um sicherzustellen, dass sich dieser durch die Erhöhung des Gasdruckes nicht verschiebt. Der pH-Wert war über den gesamten Zeitraum – auch im direkten Anschluss an die Belastungsphasen – stabil und lag zwischen 7,4 und 7,5.

Die Temperatur des Mediums überschreitet die vorgegebene Temperatur von 37°C nicht (Temperaturmessfühler, Testo 925, Testo, Lenzkirch). Trotz kurzer Belastungsintervalle von nur 4 Minuten je 15 Minuten und einer äußeren Kühlung erwärmten sich die Magnetventile jedoch während der Belastung kurzzeitig auf etwa 39°C.

Obwohl dieses keinen Einfluss auf die Temperatur des Mediums in der Belastungskammer hatte, reagierten kleine Mediummengen in den Ventilen, so dass ein Absterben des kultivierten Knorpelgewebes zu beobachten war. Dieser Vorgang wurde anhand einer Monolayerkultur quantifiziert. Im Vergleich zu einer Kultivierung im Reaktor, bei der die Ventile nicht geschaltet wurden, reduzierte sich die Zellzahl in einem Versuch ohne Druckbeaufschlagung durch das Schalten der Ventile über Nacht um 74%. Dieses rein technische Problem wird im weiteren Verlauf der Arbeiten durch entsprechende Ventile – beispielsweise durch pneumatische Ventile – gelöst werden können.

Für die ersten Versuche im Reaktor im Kapitel 6.2 wurden deshalb die Magnetventile ausgebaut und für die Belastungszyklen die Öffnungen für die Begasung durch autoklavierte Schrauben verschlossen. Da zwischen den Belastungszyklen nun keine Begasung möglich war, wurde die Belastungszeit auf eine Stunde am Tag reduziert.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. Lange und T. Ziese, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, Robert-Koch-Institut, 2006.
- [2] W. Minuth, R. Strehl und K. Schumacher, *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*, Wiley-VHC Verlag, 2003.
- [3] J. Petersen, A. Ruecker, D. von Stechow, P. Adamietz, R. Pörtner, J. Rueger und N. Meenen, „Present and future therapies of articular cartilage defects“, *Eur. J. Trauma.*, Vol. 1, S. 1-10, 2003.
- [4] M. Krukemeyer, I. Alldinger und H. Spiegel, *Chirurgische Forschung*, Thieme Verlag, 2005.
- [5] M. Risbud und M. Sittinger, „Tissue engineering: implications in the treatment of organ and tissue defects“, *Biogerontology*, Vol. 2, S. 117-125, 2001.
- [6] R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano und P. Czermak, *Cell and tissue reaction engineering*, Springer Verlag, 2009.
- [7] J. Mano und R. Reis, „Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches“, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, Vol. 1, S. 261-273, 2007.
- [8] M. Risbud und M. Sittinger, „Tissue engineering: advances in *in vitro* cartilage generation“, *Trends Biotechnol.*, Vol. 20 (8), S. 351-356, 2002.
- [9] J. Petersen, P. Ueblacker, C. Goepfert, P. Adamietz, K. Baumbach, A. Stork, J. Rueger, R. Pörtner, M. Amling und N. Meenen, „Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model“, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, Vol. 19, S. 271-280, 2008.
- [10] K. Mörike und E. Betz, *Biologie des Menschen*, Quelle&Meyer Verlag, 1991.
- [11] lizenzfreie Abbildung der Webseite <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray348.png>, 19.05.2009.
- [12] C. Norkin und P. Levangie, *Joint Structure & Function*, F. A. Davis Company, 1992.
- [13] G. Ateshian und C. Hung, „Patellofemoral joint biomechanics and tissue engineering“, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, Vol. 81, S. 81-90, 2005.
- [14] J. Hollman, R. Densinger, L. Van Dillen und M. Matava, „Gender differences in surface rolling and gliding kinematics of the knee“, *Clin. Orth. Rel. Res.*, Vol. 413, S. 208-221, 2003.
- [15] A. Menschik, *Biometrie: Das Konstruktionsprinzip des Kniegelenks, des Hüftgelenks, der Beinlänge und der Körpergröße*, Springer Verlag, 1987.
- [16] K. Küspert, *Kräfte im Kniegelenk bei Normal- und Fehlstellungen der Beine und Simulation chirurgischer Eingriffe*, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2000.

- [17] R. Komistek, T. Kane, M. Mahfouz, J. Ochoa und D. Dennis, „Knee mechanics: a review of past and present techniques to determine *in vivo* loads”, *J. Biomech.*, Vol. 38, S. 215-228, 2005.
- [18] P. Simkin, „A biography of the chondrocyte”, *Ann. Rheum. Dis.*, Vol. 67, S. 1064-1068, 2008.
- [19] V. Mow und W. Hayes, *Basic orthopaedic biomechanics*, Raven Press, 1991.
- [20] J. Urban, „The chondrocyte: a cell under pressure”, *J. Rheumatol.*, Vol. 33, S. 901-908, 1994.
- [21] D. Kettelkamp, R. Johnson, G. Smidt, E. Chao und M. Walker, „An electrogoniometric study of knee motion to normal gait”, *J. Bone Joint Surg.*, Vol. 52, S. 775-790, 1970.
- [22] J. Uvehammer, „Knee joint kinematics, fixation and function related to joint area design in total knee arthroplasty”, *Acta Orthop. Scand.*, Vol. 72 (2), S. 213, 2001.
- [23] H. Imhof, I. Sulzbacher, S. Grampp, C. Czerny, S. Youssefzadeh und F. Kainberger, „Subchondral bone and cartilage disease – a rediscovered functional unit“, *Invest. Radiol.*, Vol. 35 (10), S. 581-588, 2000.
- [24] T. Glenister, „An embryological view of cartilage”, *J. Anat.*, Vol. 122 (2), S. 323-330, 1976.
- [25] J. Merida-Velasco, I. Sanchez-Montesinos, J. Espin-Ferra, J. Rodriguez-Vazquez, J. Merida-Velasco und J. Jimenez-Collado, „Development of the human knee joint”, *Anat. Rec.*, Vol. 248, S. 269-278, 1997.
- [26] C. Chung und J. Burdick, „Engineering cartilage tissue“, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, Vol. 60, S. 243-262, 2008.
- [27] K. Kuettner, M. Aydelotte und E. Thonar, „Articular cartilage matrix and structure: a minireview“, *J. Rheum.*, Vol. 18, S. 46-48, 1991.
- [28] C. Poole, „Articular cartilage chondrons: form, function and failure”, *J. Anat.*, Vol. 191, S. 1-13, 1997.
- [29] A. Benninghoff und D. Drenckhahn, *Anatomie – Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, Urban&Fischer Verlag, 2008.
- [30] V. Mow, M. Holmest und W. Lai, „Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage”, *J. Biomech.*, Vol. 17 (5), S. 377-394, 1984.
- [31] A. Hall, E. Horwitz und R. Wilkins, „The cellular physiology of articular cartilage“, *Exp. Physiol.*, Vol. 85, S. 535-545, 1996.
- [32] B. Nigg und W. Herzog, *Biomechanics of the musculo-skeletal system*, Wiley-VHC Verlag, 1994.
- [33] P. Roughley und E. Lee, „Cartilage proteoglycans: structure and potential functions”, *MRT*, Vol. 28, S. 385-397, 1994.
- [34] F. van den Berg und J. Cabri, *Angewandte Physiologie – Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen*, Thieme Verlag, 2003.

- [35] M. Cremer, E. Rosloniec und A. Kang, „The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role of the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease“, *J. Mol. Med.*, Vol. 76, S. 275-288, 1998.
- [36] H. Imhof, I. Sulzbacher, S. Grampp, C. Czerny, S. Youssefzadeh und F. Kainberger, „Subchondral bone and cartilage disease – a rediscovered functional unit“, *Invest. Radiol.*, Vol. 35 (10), S. 581-588, 2000.
- [37] A. Yeh, M. Hammer-Wilson, D. van Sickle, H. Benton, A. Zoumi, B. Tromberg und G. Peavy, „Nonlinear optical microscopy of articular cartilage“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 13, S. 345-352, 2005.
- [38] H. Brommer, P. Brama, M. Laasanen, H. Helminen, P. van Weeren und J. Jurvelin, „Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis“, *Equine Vet. J.*, Vol. 37, S. 148-158, 2005.
- [39] C. Goepfert, *Knorpelherstellung aus Chondrozyten und mesenchymalen Vorläuferzellen für die Behandlung von Gelenkflächendefekten*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [40] R. Lee, R. Wilkins, S. Razaq und J. Urban, „The effect of mechanical stress on cartilage energy metabolism“, *Biorheology*, Vol. 39, S. 133-143, 2002.
- [41] R. Stockwell, „Cartilage failure in osteoarthritis: relevance of normal structure and function“, *Clin. Anatom.*, Vol. 4, S. 161-191, 1991.
- [42] E. Hunziker, T. Quinn und H. Häuselmann, „Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 20, S. 564-572, 2002.
- [43] T. Nakano, J. Thompson, R. Chrisopherson und F. Aherne, „Blood flow distribution in hind limb bones and joint cartilage from young growing pigs“, *Can. J. Vet. Res.*, Vol. 50, S. 96-100, 1986.
- [44] M. Adams, „The mechanical environment of chondrocytes in articular cartilage“, *Biorheology*, Vol. 43, S. 537-545, 2006.
- [45] M. Raidmondi, F. Boschetti, L. Falcone, G. Fiore, A. Remuzzi, E. Marinoni, M. Marazzi und R. Pietrabissa, „Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment“, *Biomechan. Model. Mechanobiol.*, Vol. 1, S. 69-82, 2002.
- [46] D. Carter, G. Beaupre, M. Wong, R. Smith, T. Andriacchi und D. Schurman, „The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration“, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Vol. 427, S. 69-77, 2004.
- [47] A. Oloyede und N. Broom, „The biomechanics of cartilage load-carriage“, *Connect. Tissue Res.*, Vol. 34 (2), S. 119-143, 1996.
- [48] T. Lyyra, I. Kiviranta, U. Väätäinen, H. Helminen und J. Jurvelin, „In vivo characterization of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 48 (4), S. 482-487, 1999.

- [49] J. Wu und W. Herzog, „Elastic anisotropy of articular cartilage is associated with the microstructures of collagen fibers and chondrocytes“, *J. Biomech.*, Vol. 35, S. 931-942, 2002.
- [50] M. Laasanen, J. Töyräs, R. Korhonen, J. Rieppo, S. Saarakkala, M. Nieminen, J. Hirvonen und J. Jurvelin, „Biomechanical properties of knee articular cartilage“, *Biorheology*, Vol. 40, S. 133-140, 2003.
- [51] V. Mow, N. Bachrach, L. Setton und F. Guilak, *Cell Mechanics and Cellular Engineering*, Springer Verlag, 1994.
- [52] S. Park, R. Krishnan, S. Nicoll und G. Ateshian, „Cartilage interstitial fluid load support in unconfined compression“, *J. Biomech.*, Vol. 36 (12), S. 1785-1796, 2003.
- [53] E. Hunziker, „Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current state status and prospects“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 10, S. 432-463, 2002.
- [54] R. Schulz und A. Bader, „Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes“, *Eur. Biophys. J.*, Vol. 36, S. 539-568, 2007.
- [55] C. van Donkelaar und R. Schulz, „Review on patents for mechanical stimulation of articular cartilage tissue engineering“, *Recent Pat. Biomed. Eng.*, Vol. 2, S. 1-12, 2008.
- [56] S. O'Driscoll, „The healing and regeneration of articular cartilage“, *J. Bone Joint Surg.*, Vol. 80 (12), S. 1795-1812, 1998.
- [57] Y. Fung, *Introduction to bioengineering*, World Scientific Pub, 2001.
- [58] S. Treppo, H. Koepp, E. Quan, A. Cole, K. Kuettner und A. Grodzinsky, „Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs“, *J. Orth. Res.*, Vol. 18, S. 739-748, 2000.
- [59] V. Bobic, „Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen“, *Orthopäde*, Vol. 28, S. 19-25, 1999.
- [60] P. Behrens, U. Bosch, J. Bruns, C. Erggelet, S. Esenwein, C. Gaissmaier, T. Krackhardt, J. Löhnert, S. Marlovits, N. Meenen, J. Mollenhauer, S. Nehrer, F. Niethard, U. Nöth, C. Perka, W. Richter, D. Schäfer, U. Schneider, M. Steinwachs und K. Weise, „Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation“, *Z. Orthop.*, Vol. 142, S. 529-539, 2004.
- [61] L. Hangody und P. Füles, „Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints“, *J. Bone Joint Surg.*, Vol. 85, S. 25-32, 2003.
- [62] B. Sharma and J. Elisseeff, „Engineering structurally organized cartilage and bone tissues“, *ABME*, Vol. 32 (1), S. 148-159, 2004.

- [63] M. Brittberg, „Autologous chondrocyte implantation – technique and long-term follow-up“, *Int. J. Care Injured*, Vol. 3951, S. 40-49, 2008.
- [64] I. Martin, S. Miot, A. Barbero, M. Jakob und D. Wendt, „Osteochondral tissue engineering“, *J. Biomech.*, Vol. 40, S. 750-765, 2007.
- [65] R. Kandel, M. Gryn timer, R. Pillar, J. Lee, J. Wang, S. Waldman, P. Zalzal und M. Hurtig, „Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model“, *Biomaterials*, Vol. 27, S. 4120-4131, 2006.
- [66] C. Teixeira, Y. Nemelivsky, C. Karkia und R. Legeros, „Biphasic calcium phosphate: a scaffold for growth plate chondrocyte maturation“, *Tissue Eng.*, Vol. 8, S. 2283-2289, 2006.
- [67] S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, M. Morlock und R. Pörtner, „Relationship between physical, biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered cartilage-carrier-constructs“, *Biotechn. Letters*, Vol. 27, S. 187-192, 2005.
- [68] S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, F. Feyerabend, J. Petersen, P. Adamietz, N. Meenen und R. Pörtner, „Bioreactor cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs“, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Vol. 27, S. 271-280, 2005.
- [69] P. Mainl-Varlet, T. Aigner, M. Brittberg, P. Bullough, A. Hollander, E. Hunziker, R. Kandel, S. Nehrer, K. Pritzker, S. Roberts und E. Stauffer, „Histological assessment of cartilage repair“, *J. Bone Joint Surg.*, Vol. 85, S. 45-57, 2003.
- [70] K. Arkill und C. Winlove, „Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 16, S. 708-714, 2008.
- [71] R. Wilkins, J. Browning und J. Urban, „Chondrocyte regulation by mechanical load“, *Biorheology*, Vol. 37, S. 67-74, 2000.
- [72] M. Knight, Z. Bomzon, E. Kimmel, A. Sharma, D. Lee und D. Bader, „Chondrocyte deformation induces mitochondrial distortion and heterogenous intracellular strain fields“, *Biomech. Model. Mechanobiol.*, Vol. 5, S. 180-191, 2006.
- [73] C. Lee, *Topics in tissue engineering*, E-book, 2006.
- [74] J. Szafranski, A. Grodzinsky, E. Burger, V. Gaschen, H. Hung und E. Hunziker, „Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 12, S. 937-946, 2004.
- [75] J. Browning, K. Saunders, J. Urban und R. Wilkins, „The influence and interactions of hydrostatic and osmotic pressures on the intracellular milieu of chondrocytes“, *Biorheology*, Vol. 41, S. 299-308, 2004.
- [76] C. Heath, „The effect of physical forces on cartilage tissue engineering“, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, Vol. 17, S. 533-551, 2000.

- [77] T. Chowdhury, R. Appleby, D. Salter, D. Bader und D. Lee, „Integrin-mediated mechanotransduction in IL-1 β stimulated chondrocytes”, Vol. 5, S. 192-201, 2006.
- [78] R. Lebaron und K. Athanasiou, „Extracellular matrix adhesion peptides: functional applications in orthopaedic materials”, *Tissue Eng.*, Vol. 6, S. 85-103, 2000.
- [79] K. Mio, J. Kirkham und W. Bonass, „Possible role of extracellular signal-regulated kinase pathway in regulation of Sox9 mRNA expression in chondrocytes under hydrostatic pressure”, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 104 (6), S. 506-509, 2007.
- [80] P. Malaviya und R. Nerem, „Fluid-induced shear stress stimulates chondrocytes proliferation partially mediated via TGF- β 1”, *Tissue Eng.*, Vol. 8 (4), S. 581-590, 2002.
- [81] P. Aspenberg, N. Basic, M. Tägli und S. Vukicevic, „Reduced expression of BMP-3 due to mechanical loading”, *Acta Orthop. Scand.*, Vol. 71 (6), S. 558-562, 2000.
- [82] I. Martin, D. Wendt und M. Heberer, „The role of bioreactors in tissue engineering“, *Trends Biotechnol.*, Vol. 22 (2), S. 80-86, 2004.
- [83] E. Darling und K. Athanasiou, „Articular cartilage bioreactors and bioprocesses“, *Tissue Eng.*, Vol. 9 (1), S. 9-26, 2003.
- [84] H. Chen und Y. Hu, „Bioreactors for tissue engineering“, *Biotechn. Lett.*, Vol. 28, S. 1415-1423, 2006.
- [85] A. Ratcliffe und L. Niklason, „Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 961, S. 210-215, 2002.
- [86] E. Ilinich, *Kultivierung und Analyse von Knorpel-Träger-Konstrukten in einem neuartigen Bioreaktor*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [87] V. Lutz, *Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und Redifferenzierung von humanen Chondrozyten*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2005.
- [88] T. Toyoda, B. Seedhom, J. Yao, J. Kirham, S. Brookes und W. Bonass, „Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose”, *Arthritis Res.*, Vol. 48 (10), S. 2865-2872, 2003.
- [89] U. Hansen, M. Schünke, C. Domm, N. Ioannidis, J. Hassenpflug, T. Gerke und B. Kurz, „Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering“, *J. Biomech.*, Vol. 34, S. 941-949, 2001.
- [90] A. Hall, J. Urban und K. Gohl, „The effects of hydrostatic pressure and matrix synthesis in articular cartilage“, *J. Orthop. Res.*, Vol. 9, S. 1-10, 1991.

- [91] J. Parkkinen, J. Ikonen, M. Lammi, J. Laakkonen, M. Tammi und H. Helminen, „Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 300 (1), S. 458-465, 1993.
- [92] M. Lammi, R. Inkinen, J. Parkkinen, T. Häkkinen, M. Jortikka, L. Nelimarkka, H. Järveläinen und M. Tammi, „Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic pressure“, *Biochem. J.*, Vol. 304, S. 723-730, 1994.
- [93] R. Smith, S. Rusk, B. Ellison, P. Wessells, K. Tsuchiya, D. Carter, W. Caler, L. Sandell und D. Schurman, „*In vitro* stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure“, *J. Orthop. Res.*, Vol. 14, S. 53-60, 1996.
- [94] A. Carver und C. Heath, „Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure“, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 62 (2), S. 166-173, 1999.
- [95] C. Domm, J. Fay, M. Schünke und B. Kurz, „Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur“, *Orthopäde*, Vol. 29, S. 91-99, 2000.
- [96] R. Smith, J. Lin, M. Trindade, J. Shida, G. Kajiyama, T. Vu, A. Hoffman, M. van der Meulen, S. Goodman, D. Schurman und D. Carter, „Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression“, *J. Rehabil. Res. Dev.*, Vol. 37 (2), S. 153-161, 2000.
- [97] K. Scherer, M. Schünke, R. Selckau, J. Hassenpflug und B. Kurz, „The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro“, *Biorheology*, Vol. 41, S. 323-333, 2004.
- [98] R. Smith, D. Carter und D. Schurmann, „Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism“, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Vol. 427, S. 89-95, 2004.
- [99] S. Elder, S. Sanders, W. McCulley, M. Marr, J. Shim und K. Hasty, „Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture“, *J. Orthop. Res.*, Vol. 24 (4), S. 740-747, 2006.
- [100] J. Hu und K. Athanasiou, „The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs“, *Tissue Eng.*, Vol. 12 (5), 2006.
- [101] J. Heyland, K. Wiegandt, C. Goepfert, S. Nagel-Heyer, E. Ilinich, U. Schumacher und R. Pörtner, „Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure“, *Biotechnol. Lett.*, Vol. 28, S. 1641-1648, 2006.
- [102] K. Gavenis, A. Kremer, M. Walter, D. Hollander, U. Schneider und B. Schmidt-Rohlfing, „Effects of cyclic hydrostatic pressure on the metabolism of human osteoarthritic chondrocytes cultivated in a collagen gel“, *Artif. Organs.*, Vol. 31 (2), S. 91-98, 2007.

- [103] S. Mizuno, „A novel method for assessing effects of hydrostatic fluid pressure on intracellular calcium: a study with bovine articular chondrocytes”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, Vol. 288 (2), S. 329-373, 2005.
- [104] M. Kawanishi, A. Oura, K. Furukawa, T. Fukubayashi, K. Nakamura, T. Tateishi und T. Ushida, „Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes enhanced by cyclic hydrostatic pressure under a gas-controlled systems”, Vol. 13 (5), S. 957-964, 2007.
- [105] B. Elder und K. Athanasiou, „Synergistic and additive effects of hydrostatic pressure and growth factors on tissue formation“, *PLoS ONE*, Vol. 3 (6), S. 1-8, 2008.
- [106] G. Candiani, M. Raimondy, R. Aurora, K. Lagana und G. Dubini, „Chondrocyte response to high regimens of cyclic hydrostatic pressure in 3-dimensional engineered constructs”, *Int. J. Artif. Organs*, Vol. 31 (6), S. 490-499, 2008.
- [107] B. Elder und K. Athanasiou, „Effects of temporal hydrostatic pressure on tissue-engineered bovine articular cartilage constructs“, *Tissue Eng.*, Vol. 14, S. 1-8, 2008.
- [108] M. Pei, J. Seidel, G. Vunjak-Novakovic und L. Freed, „Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 294, S. 149-154, 2002.
- [109] M. Jakob, O. Demarteau, D. Schäfer, B. Hintermann, W. Dick, M. Heberer und I. Martin, „Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhances chondrogenesis and cartilaginous tissue formation“, *J. Cell. Biochem.*, Vol. 81, S. 368-377, 2001.
- [110] K. Benz, S. Breit, M. Lukoschek, H. Mau und W. Richter, „Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 293, S. 284-292, 2002.
- [111] T. Blunk, A. Sieminski, K. Gooch, D. Courter, A. Hollander, A. Nahir, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic und L. Freed, „Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage”, *Tissue Eng.*, Vol. 8 (1), S. 73-84, 2002.
- [112] R. Mauck, S. Nicoll, S. Seyhan, G. Athesian und C. Hung, „Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering”, *Tissue Eng.*, Vol. 9 (4), S. 597-611, 2003.
- [113] P. Guerne, A. Sublet und M. Lotz, „Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts“, *J. Cell. Physiol.*, Vol. 158, S. 476-484, 1994.
- [114] P. Yaeger, T. Masi, J. Buck de Ortiz, F. Binette, R. Tubo und J. McPherson, „Synergistic action of transforming growth factor- β and insulin like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes“, *Exp. Cell Res.*, Vol. 237, S. 318-325, 1997.
- [115] G. Walsh, *Biopharmaceuticals – biochemistry and biotechnology*, Wiley-VHC Verlag, 2004.

- [116] T. Tsukazaki, T. Usa, T. Matsumoto, H. Enomoto, A. Ohtsuru, H. Namba, K. Iwasaki und S. Yamashita, „Effect of transforming growth factor- β on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes”, *Exp. Cell Res.*, Vol. 215, S. 9-16, 1994.
- [117] G. Van Osch, W. Van den Berg, E. Hunziker und H. Häuselmann, „Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes“, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 6 (3), S. 187-95, 1998.
- [118] D. Frenz, W. Liu, J. Williams, V. Hatcher, V. Galinovic-Schwartz, K. Flanders und T. van de Water, „Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta“, *Development*, Vol. 120, S. 415-424, 1994.
- [119] S. Waldman, M. Gryn timer, R. Pilliasa und R. Kandel, „Characterization of cartilaginous tissue formed on calcium polyphosphate substrates *in vitro*“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 62, S. 323-330, 2002.
- [120] E. Wintermantel und S. Ha, *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, Springer Verlag, 2002.
- [121] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner Verlag, 2003.
- [122] C. Rodrigues, P. Serricella, A. Linhares, R. Guerdes, R. Borojevic, M. Rossi, M. Duarte und M. Farina, „Characterization of a bovine collagen-hydroxylapatite composite scaffold for bone tissue engineering“, *Biomaterials*, Vol. 24, S. 4987-4997, 2003.
- [123] Z. Schwartz, G. Braun, D. Kohavi, B. Brooks, D. Amir, J. Sela und B. Boyan, „Effects of hydroxylapatite implants on primary mineralization during rat tibial healing: biochemical and morphometric analyses“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 27, S. 1029-1038, 1993.
- [124] D. Deligianni, N. Katsala, P. Koutsoukos und Y. Missirlis, „Effect of surface roughness of hydroxylapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength“, *Biomaterials*, Vol. 22, S. 87-96, 2001.
- [125] K. Allan, R. Pilliar, J. Wang, M. Gryn timer und R. Kandel, „Formation of bi-phasic constructs containing cartilage with a calcified zone interface“, *Tissue Eng.*, Vol. 13, S. 167-177, 2007.
- [126] Z. Schwartz, J. Martin, D. Dean, J. Simpson, D. Cochran und B. Boyan, „Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 30, S. 145-155, 1997.
- [127] D. Hamilton, M. Riehle, R. Rappuolo, W. Monaghan, R. Barbucci und A. Curtis, „The response of primary articular chondrocytes to micrometric surface topography and sulphated hyaluronic acid-based matrices“, *Cell Biol. Inter.*, Vol. 29, S. 605-615, 2005.

- [128] A. Curtis und C. Wilkinson, „Reactions of cells to topography”, *J. Biomater.*, Vol. 9, S. 1313-1329, 1998.
- [129] B. Boyan, J. Lincks, C. Lohmann, V. Sylvia, D. Cochran, C. Blanchard, D. Dean und Z. Schwartz, „Effect of surface roughness and composition on osteochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state”, *J. Orthop. Res.*, Vol. 17, S. 446-457, 1999.
- [130] M. Jarchon, „Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics“, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, Vol. 157, S. 259-278, 1981.
- [131] B. Annaz, K. Hing, M. Kayser, T. Buckland und L. di Silvio, „Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study”, *J. Microsc.*, Vol. 215, S. 100-110, 2004.
- [132] B. Boyan, T. Hummert, D. Dean und Z. Schwartz, „Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response”, *Biomaterials*, Vol. 17, S. 137-146, 1996.
- [133] C. Selhuber, „Biological adhesion of nanopatterned substrates studied with force spectroscopy and microinterferometry”, Dissertation, Universität Heidelberg, 2006.
- [134] E. dos Santos, M. Farina und G. Soares, „Surface energy of hydroxylapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, Vol. 19, S. 2307-2316, 2008.
- [135] S. Mitra, D. Hanson und D. Schlaepfer, „Focal adhesion kinase: in command and control of focal motility”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, S. 56-68, 2005.
- [136] J. Heyland, *The influence of oxygen concentration and cyclic loading on in vitro engineered articular cartilage during the cultivation of chondrocytes*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2006.
- [137] S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz, N. Meenen und R. Pörtner, „Cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs under reduced oxygen tension”, *J. Biotechn.*, Vol. 121 (4), S. 486-497, 2006.
- [138] B. Frahm, *Adaptive, modellgestützte Prozessführung von Suspensionskulturen tierischer Zellen*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2003.
- [139] R. Korhonen, M. Laasanen, J. Toyras, J. Rieppo, J. Hirvonen, H. Helminen und J. Jurvelin, „Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation”, *J. Biomech.*, Vol. 35, S. 903-909, 2002.
- [140] M. Buschmann, Y. Gluzband, A. Grodzinski, J. Kimura und E. Hunziger, „Chondrocytes in agarose culture synthesis a mechanically functional extracellular matrix”, *J. Orthop. Res.*, Vol. 10, S. 745-758, 1992.
- [141] S. Nagel-Heyer, *Ingenieurtechnische Aspekte bei der Herstellung von dreidimensionalen Knorpel-Träger-Konstrukten*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2004.

- [142] C. Goepfert, V. Lutz, S. Lünse, K. Wiegandt, M. Kammal, K. Püschel und R. Pörtner., „Redifferentiation capacity of human articular chondrocytes (HAC) expanded on microcarriers”, *Cytotherapy*, Vol. 8, S. 29, 2006.
- [143] L. Griffith and G. Naughton, „Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities”, *Science*, Vol. 295, S. 1009-1014, 2002.
- [144] C. Kuo, W. L. R. Mauck und R. Tuan, „Cartilage tissue engineering: its potential and uses“, *Curr. Opin. Rheumatol.*, Vol. 18, S. 64-73, 2006.
- [145] L. Hufschmidt, *Untersuchung von nativem Schweineknorpel hinsichtlich des Zusammenhangs von biochemischen und biomechanischen Eigenschaften*, Bachelor-Arbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2008.
- [146] H. Paetzold, *Der Einfluss mechanischer Belastung auf biomechanische, strukturelle und biochemische Eigenschaften gezüchteter Knorpelimplantate*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2009.
- [147] T. Richter, *Einfluss der Oberflächenstruktur von Kalziumphosphat-Trägern auf die Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [148] M. Froimson, R. Ratcliffe, T. Gardner und V. Mow, „Differences in patello femoral joint cartilage and material properties and their significance to the etiology of cartilage surface fibrillation”, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 5, S. 377-386, 1997.
- [149] B. Rogers, C. Murphy, S. Cannon und T. Briggs, „Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage”, *J. Bone Joint Surg.*, Vol. 88, S. 1670-1674, 2006.
- [150] S. Slowman und K. Brandt, „Composition and glycosaminoglycan content metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites”, *Arthritis Rheum.*, Vol. 29 (1), S. 88-94, 1986.
- [151] C. Kempson, H. Muir, S. Swanson und M. Freeman, „Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head”, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 215, S. 70-77, 1970.
- [152] T. Franz, E. Hasler, R. Hagg, C. Weiler, R. Jakob und P. Mainil-Varlet, „In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint”, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 9, S. 582-592, 2001.
- [153] R. Böer, *Optimierung von Teilsystemen bei der Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2004.
- [154] C. Kasper, M. van Griensven und R. Pörtner, *Bioreactor systems for tissue engineers*, Springer Verlag, 2009.
- [155] K. Wiegandt, C. Goepfert, T. Richter, D. Fritsch, R. Janssen und R. Pörtner, „In vitro generation of cartilage-carrier-constructs with different surface structures“, *Open Biomed. Eng. J.*, Vol. 2, S. 64-70, 2008.

- [156] D. Luppá, „Biochemie und Pathochemie des hyaline Gelenkknorpels“, *KCS*, Vol. 1 (12), S. 29-39, 2000.
- [157] O. Gauthier, J. Bouler, E. Aguado, P. Pilet und G. Daculsi, „Macroporous bi-phasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth“, *Biomaterials*, Vol. 19, S. 133-139, 1998.
- [158] C. Spiteri, R. Pilliar und R. Kandel, „Substrate porosity enhances chondrocyte attachment, spreading, and cartilage tissue formation *in vitro*“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 74, S. 676-683, 2006.
- [159] T. Takahashi, T. Ogasawara, Y. Asawa, Y. Mori, E. Uchinuma, T. Takato und K. Hoshi, „Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture“, *Tissue Eng.*, Vol. 13 (7), 2007.
- [160] M. Antholz, *Der Effekt intermittierender hydrostatischer Belastung auf die Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [161] N. Schneider, A. Mouithys-Mickalad, J. Lejeune, C. Duyckaerts, F. Sluse, G. Deby-Dupont und D. Serteyn, „Oxygen consumption of equine articular chondrocytes: Influence of applied oxygen tension and glucose concentration during culture“, *Cell Biol. Int.*, Vol. 31 (9), S. 878-886, 2007.
- [162] O. Demarteau, D. Wendt, A. Braccini, M. Jakob, D. Schäfer, M. Heberer und I. Martin, „Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 310 (2), S. 580-588, 2003.
- [163] A. Reichardt, *Einfluss der Kultivierungsdauer unter zyklischem hydrostatischem Druck bei der Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten*, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [164] M. Attia, *Konstruktion eines Bioreaktors unter besonderer Berücksichtigung der sterilen Handhabung von tierischen Zellen*, Studienarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.
- [165] P. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag, 2001.
- [166] P. Grassmann und F. Widmer, *Einführung in die thermische Verfahrenstechnik*, de Gruyter Verlag, 1974.
- [167] R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano und P. Czermak, *Cell and tissue reaction engineering*, Springer Verlag, 2009.
- [168] J. Malda, *Cartilage tissue engineering – the relevance of oxygen*, PhD Thesis, University of Twente, Niederlande, 2004.
- [169] B. Sengers, H. Heywood, D. Lee, C. Oomens und D. Bader, „Nutrient utilization by ovine articular chondrocytes: a combined experimental and theoretical approach“, *Trans. ASME*, Vol. 127, S. 758-766, 2005.

- [170] N. Bachrach, V. Mow und F. Guilak, „Incompressibility of solid matrix of articular cartilage under high hydrostatic pressures“, *J. Biomech.*, Vol. 31, S. 445-451, 1998.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katharina Wiegandt
Geburtsdatum: 06.04.1980
Geburtsort: Hamburg

Schul Ausbildung

08/1986 – 07/1990 Grundschule Am Aalfang, Ahrensburg
08/1990 – 06/1999 Stormarnschule, Ahrensburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1999 – 09/2001 Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (Vordiplom)
10/2001 – 07/2005 Studium der Biotechnologie-Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg
Abschluss: Diplom-Ingenieurin

Auslandsaufenthalte:

08/1999 – 09/1999 Grundpraktikum bei „Isopad Ltd“, Weston-super-Mare (England)
08/2002 – 12/2002 Auslandssemester an Lunds Tekniska Högskola (Schweden)

Berufstätigkeit

08/2005 – 03/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg
seit 05/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Keramische Hochleistungswerkstoffe der Technischen Universität Hamburg-Harburg