

Entwicklung eines Implantats zur Reparatur von
Gelenkknorpeldefekten auf der Basis von
modifizierter bakterieller Nanocellulose (BNC)
- *in vitro*-Analysen im bovinen Knorpelstanzenmodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Johanna Böttcher, geb. Sterner

geboren am 09.01.1988 in Mühlhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne, AG Experimentelle Rheumatologie, Lehrstuhl für Orthopädie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Dr. dent. Bernd W. Sigusch, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Michael Sittinger, AG Tissue Engineering, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Universitätsmedizin Berlin Campus Charité Mitte

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.01.2019

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. Dest.	Destilliertes Wasser
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AMIC	Autologe Matrix-Induzierte Chondrogenese
AP	Alkalische Phosphatase
BC	Bakterielle Cellulose
BMP	(engl.) <i>bone morphogenetic protein</i>
BNC	Bakterielle Nanocellulose
BSA	(engl.) <i>bovine serum albumin</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	(engl.) <i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CS	Chondroitinsulfat
DAB	Diaminobenzidin
DMB	Dimethylenblau
DMEM/F12	(engl.) <i>Dulbecco`s modified eagle medium/ Nutrient mixture F-12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(engl.) <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DS	Dermatansulfat
3D	dreidimensional
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	(engl.) <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix

FCS	(engl.) <i>fetal calf serum</i>
FGF	(engl.) <i>fibroblast growth factor</i>
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
GAG	Glucosaminoglykan
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
H/E	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	(engl.) <i>horseradisch peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGF	(engl.) <i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
Kol-1	Kollagen Typ I
Kol-2	Kollagen Typ II
Kol-10	Kollagen Typ X
KS	Keratansulfat
Lig.	(lat.) <i>Ligamentum</i>
Ligg.	(lat., plural) <i>Ligamenta</i>
MACT	Matrix-gestützte autologe Chondrozytentransplantation
MF	Mikrofrakturierung
MPZ	Mesenchymale Progenitorzellen
mRNA	(engl.) <i>messenger RNA</i>
MSC	(engl.) <i>mesenchymal stem cells</i>

MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
OA	Osteoarthrose
OATS	Osteochondrales autologes Transplantationssystem
PBS	(engl.) <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	(engl.) <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	(engl.) <i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
PG	Proteoglykan
PGA	Polyglycolid
PLGA	Polylactic-co-glycolid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	(engl.) <i>ribonucleid acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	(engl.) <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SEM	(engl.) <i>standard error of the mean</i>
SD	(engl.) <i>standard deviation</i>
TBS	(engl.) <i>Tris-buffered saline</i>
TE	(engl.) <i>Tissue engineering</i>
TEP	Totalendoprothese
TGF- β 1	(engl.) <i>transforming growth factor beta 1</i>
U	(engl.) <i>units</i>

ü.N.	über Nacht
ZB	zellbesiedelter Ansatz
ZF-	zellfreier Ansatz, <i>ohne</i> initiale Serum-Inkubation des Implantats
ZF+	zellfreier Ansatz, <i>mit</i> initialer Serum-Inkubation des Implantats

Verwendete SI-Einheiten

°C	Grad Celsius	m	Meter
d	Tag	min	Minute
g	Gramm	M	molar
N	Newton	h	Stunde
s	Sekunde	l	Liter

Verwendete Präfixe

c	zenti	m	milli
k	kilo	n	nano
μ	mikro	p	piko

Hilfsmaßeinheiten

%	Prozent
% v/v	Volumenprozent

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schematische Darstellung eines Aggrekan-Aggregats in der extrazellulären Matrix.	5
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Architektur des hyalinen Gelenkknorpels.	7
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Knorpelregeneration durch Implantation eines Biomaterials nach Knochenmarkstimulation (AMIC).	13
Abb. 4:	Überblick über die verschiedenen biomedizinischen Applikationsmöglichkeiten von bakterieller Nanocellulose (BNC).	20
Abb. 5:	Eröffnung eines Rinderkniegelenks und Präparation von bovinem Knorpelmaterial zur anschließenden Chondrozytenisolierung.	28
Abb. 6:	Präparation von bovinem Knorpelmaterial zur Stanzengewinnung.	31
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Herstellung 3D-lasermodifizierter BNC-Zylinder.	33
Abb. 8:	Fertiggestellte BNC-Zylinder nach Aufreinigung (ca. 500 Stück).	34
Abb. 9:	Vorbehandlung der 3D-modifizierten BNC-Zylinder zur anschließenden Verwendung in den verschiedenen Kultivierungs-Ansätzen (schematische Darstellung).	36
Abb. 10:	Herstellung und Einbettung der Knorpel-BNC-Konstrukte.	38
Abb. 11:	Übersicht des Versuchsdesigns der Kultivierung boviner Knorpelstanzen mit 3D-modifizierten BNC-Implantaten.	40
Abb. 12:	Ausdrückvorgang mit der Universalprüfmaschine „Zwicki“ (Fa. Zwick, Ulm).	47
Abb. 13:	Lichtmikroskopische Darstellung des Knorpelring-Gewebes im Kulturverlauf.	51
Abb. 14:	Darstellung der Erosion und oberflächlichen Zellbesiedlung des Knorpelrings.	52
Abb. 15:	Semiquantitative Analyse der Erosion des Knorpelrings im Kulturverlauf.	53
Abb. 16:	Darstellung der oberflächlichen Zellbesiedlung des Knorpels und des BNC-Implantats im Kulturverlauf.	54
Abb. 17:	Oberflächliche Zellbesiedlung des initial zellfreien BNC-Implantats (ZF+).	54
Abb. 18:	Semiquantitative Analyse der oberflächlichen BNC-Besiedlung im Kulturverlauf.	55
Abb. 19:	Darstellung der dreidimensionalen Zellbesiedlung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.	56
Abb. 20:	Darstellung dreidimensional zellbesiedelter BNC-Implantate (ZB).	57
Abb. 21:	Semiquantitative Analyse der dreidimensionalen BNC-Besiedlung im Kulturverlauf.	57

Abb. 22:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche boviner Knorpelstanzen nach einer Kultur von zwei Wochen (B+C) im Vergleich zu frischem Knorpel (A).	59
Abb. 23:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche nach einer Kultur von zwei Wochen.	59
Abb. 24:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche und der Migration von Chondrozyten auf den Knorpelring im Kulturverlauf.	60
Abb. 25:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts.	62
Abb. 26:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der oberflächlichen und dreidimensionalen BNC-Besiedlung initial zellbesiedelter Implantate (ZB) im Kulturverlauf.	63
Abb. 27:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der oberflächlichen und dreidimensionalen BNC-Besiedlung initial zellfreier Implantate (ZF-/ZF+) im Kulturverlauf.	65
Abb. 28:	Darstellung der Oberflächenmorphologie eines initial zellfreien BNC-Implantats nach einer Kultur von 12 Wochen im bovinen Regenerationsmodell.	65
Abb. 29:	Lichtmikroskopische Darstellung des Proteoglykangehalts im Knorpel-BNC-Konstrukt im Verlauf der <i>in vitro</i> Kultur.	67
Abb. 30:	Histologische Darstellung der Proteoglykan-Neosynthese im Knorpel-BNC-Regenerat.	67
Abb. 31:	Immunhistochemische Darstellung von Aggrekan in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.	69
Abb. 32:	Zentrale Aggrekan-Einlagerung eines zellbesiedelten BNC-Implantats nach 12 Wochen Kultur.	70
Abb. 33:	Semiquantitative Analyse der Aggrekan-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.	70
Abb. 34:	Immunhistochemische Darstellung des Kollagen II-Gehalts in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.	71
Abb. 35:	Semiquantitative Analyse der Kollagen II-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.	73
Abb. 36:	Immunhistochemische Darstellung des Kollagen-I-Gehalts in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.	74
Abb. 37:	Semiquantitative Analyse des Kollagen I-Gehalts des Knorpelrings im Kulturverlauf.	75
Abb. 38:	Immunhistochemische Darstellung des Kollagen-I-Gehalts in frischem Knorpel (A) und der Kollagen I-Synthese durch mobilisierte bzw. allogene besiedelte Chondrozyten (B-D).	76
Abb. 39:	Semiquantitative Analyse der Kollagen I-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.	76
Abb. 40:	Messung der Auspresskraft in N im Knorpel-BNC-Regenerat im Kulturverlauf.	78

Abb. 41:	Semiquantitative Analyse der Aggrekan-Beladung des Knorpelrings im Kulturverlauf.	131
Abb. 42:	Semiquantitative Analyse der Kollagen II-Beladung des Knorpelrings im Kulturverlauf.	131
Abb. 43:	Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF-)-Ansatz.	132
Abb. 44:	Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz.	133
Abb. 45:	Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz.	134
Abb. 46:	Vergrößerte Darstellung des Knorpelrings im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF-)-Ansatz.	135
Abb. 47:	Vergrößerte Darstellung des Knorpelrings im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz.	136
Abb. 48:	Vergrößerte Darstellung des Knorpelrings im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz.	137
Abb. 49:	Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF-)-Ansatz.	138
Abb. 50:	Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz.	139
Abb. 51:	Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz.	140
Abb. 52:	Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen I und Kollagen II einer bovinen Knorpel-Knochen-Probe aus der Patella.	141

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Übersicht über die zur immunhistochemischen Darstellung verwendeten Primär-/ Sekundär-Antikörper-Kombinationen mit den zugehörigen Isotypkontrollen und Verdünnungsmedien	43
Tab. 2:	Protokolle der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen im Überblick.	130

IV. INHALTSVERZEICHNIS

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III. TABELLENVERZEICHNIS	VIII
IV. INHALTSVERZEICHNIS	IX
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels	3
2.2 Gelenkknorpeldefekte	7
2.3 Hintergründe und Indikationsstellung für die operative Behandlung von Gelenkknorpeldefekten	9
2.4 Aktuelle Konzepte zur operativen Therapie von Gelenkknorpeldefekten	10
2.4.1 Allgemeine arthroskopische Verfahren	11
2.4.2 Knochenmarkstimulierende Verfahren	11
2.4.3 Rekonstruktive Verfahren (Knorpel-Knochen-Transplantation)	13
2.4.4 Zellbasierte Verfahren	14
2.5 Tissue Engineering	17
2.6 Bakterielle Nanocellulose (BNC)	18
2.6.1 Eigenschaften und Anwendungsbereiche der bakteriellen Nanocellulose	18
2.6.2 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose als innovative Knorpelersatzmatrix	21
3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT	22
4 MATERIAL UND METHODEN	23
4.1 Ausführliche Liste der verwendeten Geräte	23
4.2 Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel	24
4.3 Ausführliche Liste der verwendeten Medien und Lösungen	26
4.4 Gewinnung bovinen Knorpelmaterials	27
4.4.1 Präparation bovinen Knorpelmaterials zur Chondrozytenisolierung	27
4.4.2 Isolierung und Kultivierung boviner Chondrozyten	28
4.4.3 Präparation bovinen Knorpelmaterials zur Stanzengewinnung	30
4.5 Implantatherstellung und Vorbehandlung	31
4.5.1 Herstellung 3D-lasermodifizierter BNC-Zylinder	31
4.5.2 Zellfreie 3D-modifizierte BNC-Zylinder	34

4.5.3	Zellbesiedlung 3D-modifizierter BNC-Zylinder	35
4.6	In vitro-Regenerationsassay mit 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose	36
4.6.1	Vorbereitung der Multiwellplatten	36
4.6.2	Herstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte	37
4.6.3	<i>In vitro</i> - Kultivierung	38
4.7	Histologische Analysen	41
4.7.1	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Regenerate für histologische und immunhistochemische Analysen	41
4.7.2	Histologische Färbungen	41
4.7.3	Immunhistochemische Färbungen	42
4.8	Gradeinteilungen der histologischen und immunhistochemischen Färbungen für die anschließende semiquantitative Auswertung	44
4.9	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für rasterelektronenmikroskopische Analysen	45
4.10	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Proben für molekularbiologische Analysen	45
4.11	Funktionelle Analysen	46
4.11.1	Vorbereitung der Knorpel-BNC-Proben für Ausdrückversuche und biomechanische Testung	46
4.12	Auswertung, statistische Analysen und graphische Darstellung	47
5	ERGEBNISSE	49
5.1	Histologische Darstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf (Hämatoxylin/ Eosin - Färbung)	49
5.1.1	Oberflächliche Erosion und Besiedlung des Knorpelrings	49
5.1.2	Oberflächliche Besiedlung des BNC-Implantats	53
5.1.3	Dreidimensionale Besiedlung des BNC-Implantats	56
5.2	Morphologie der Knorpel-BNC-Regenerate in der Rasterelektronenmikroskopie	58
5.3	Histologische Darstellung des Proteoglykangehalts der Knorpel-BNC-Konstrukte (Safranin-O/Lichtgrün – Färbung)	66
5.4	Immunhistochemische Analysen im <i>in vitro</i> Regenerationsassay	68
5.4.1	Aggrekan	68
5.4.2	Kollagen II	71
5.4.3	Kollagen I	73
5.5	Biomechanische Untersuchung mittels „Push-out-Tests“	77

6	DISKUSSION	79
6.1	<i>In vitro</i>-Langzeitkultivierung im bovinen Knorpelstanzenmodell	80
6.1.1	Auswirkungen der Langzeitkulturbedingungen im untersuchten Assay	82
6.1.2	Bedeutung des Serums im untersuchten Assay	89
6.2	3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose als potentielle Leitstruktur in der Therapie von Knorpeldefekten	92
6.2.1	Eignung von 3D-modifizierter BNC als zellbesiedeltes Knorpelimplantat	94
6.2.2	Eignung von 3D-modifizierter BNC als zellfreies Knorpelimplantat	95
6.3	Charakterisierung der <i>in situ</i> Integration im Knorpelregenerationsmodell anhand von „Push-out Tests“	97
6.4	Wahl der Untersuchungsmethoden	100
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	102
8	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	104
9	ANHANG	130

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

1 ZUSAMMENFASSUNG

Schäden des hyalinen Gelenkknorpels zeigen nur eine geringe Regenerationsfähigkeit und führen daher zu deutlichen Funktionseinbußen des Betroffenen und sehr häufig zur Entwicklung einer Arthrose. Die zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen solcher Knorpeldefekte sind bis heute limitiert. Auch die experimentelle Forschung zur Knorpelregeneration mittels Tissue Engineering hat bisher noch keine tragfähigen Konzepte zur langfristigen Wiederherstellung eines voll funktionsfähigen Knorpels erbracht.

Die AG „Experimentelle Rheumatologie“ am Universitätsklinikum Jena untersucht daher innovative Knorpelersatzmaterialien (u.a. bakterielle Nanocellulose; BNC). Dazu wurde ein bovines Knorpelstanzenmodell etabliert, in dem die *in vitro* Regeneration fokaler Knorpeldefekte unter Einsatz verschiedener Implantatmaterialien mit oder ohne bioaktive Zusatz-Faktoren analysiert werden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Prüfung der Eigenschaften eines 3D-modifizierten BNC-Implantats mit Laserperforationen als potentiell Biomaterial für die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Außerdem wurde der Einfluss einer Serumbeladung (Zusatz eines „bioaktiven Faktors“) bzw. einer vorherigen Zellbesiedlung der BNC auf die Regeneration des Knorpels in dem bovinen Knorpelstanzenmodell analysiert.

Hierzu wurden Knorpelstanzen von gesunden Kniegelenken adulter Rinder entnommen und mit einem zentralen Defekt versehen. In diese Knorpelringe wurden 3D-modifizierte BNC-Zylinder nach einer entsprechenden Vorbehandlung [zellfrei ohne Serumbeladung (ZF-), zellfrei mit Serumbeladung (ZF+) bzw. zellbesiedelt (ZB)] passgenau implantiert und die Knorpel-BNC-Konstrukte *in vitro* über bis zu 12 Wochen kultiviert. Anschließend wurden mittels histologischer, immunhistochemischer und rasterelektronenmikroskopischer Verfahren die Homöostase und Zellvitalität im Knorpelring sowie die Besiedlung und Syntheseaktivität von Chondrozyten auf dem BNC-Regenerat untersucht [insbesondere das Vorkommen Knorpel-spezifischer Matrixmoleküle (Proteoglykane, Aggrecan, Kollagen Typ II) bzw. Dedifferenzierungsmarker (Kollagen Typ I)]. Außerdem wurde die *in situ* Integration des BNC-Implantats in den umliegenden Knorpelring anhand von Ausdrückversuchen des Implantats untersucht („Push out-Tests“).

Eine über die gesamte Kultur erhaltene Kernfärbung (d.h. Zellvitalität) sowie ein konstanter Kollagen II- und Aggrecan-Gehalt im Knorpelring belegten einerseits die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und damit die prinzipielle Eignung des neu etablierten bovinen

Knorpelstanzenmodells für eine Kultivierungsdauer von bis zu 12 Wochen. Andererseits wiesen ein beginnender Verlust der Knorpelintegrität oberflächennaher Knorpelschichten, eine geringe Kollagen I-Anreicherung im Knorpelring sowie vereinzelt auftretende avitale Chondrozyten auf der BNC nach 12 Wochen Kultur auf die zeitlichen Grenzen des Modells hin.

Die 3D-modifizierten BNC-Implantate wiesen in allen Gruppen eine enorme oberflächliche und erstmals auch erfolgreiche dreidimensionale Zellbesiedlung auf. Außerdem zeigte sich ein im Kulturverlauf signifikant zunehmender Aggrekan- und Kollagen Typ II Matrix-Gehalt bei lediglich geringfügig gesteigertem, niedrigen Kollagen Typ I Gehalt in Peripherie und Zentrum des Implantats. Die Auspresskraft für das BNC-Implantat nahm in den Gruppen ZF+ und ZB im Kulturverlauf zu. Insgesamt zeigten die Gruppen ZF-, ZF+ und ZB in fast allen Analysen vergleichbare Ergebnisse, mit Ausnahme der dreidimensionalen Zellbesiedlung des BNC-Implantats, bei der die *initial zellbesiedelten* Implantate (ZB) im Vergleich zu den *zellfreien* Implantaten (ZF- und ZF+) eine frühere und im Kulturverlauf stets höhere Besiedlung aufwiesen.

Mit der Langzeitkultur der Knorpel-BNC-Konstrukte in dem neu angepassten bovinen Knorpelstanzenmodell wurden also die frühen Stadien der endogenen Knorpelregeneration veranschaulicht und äußerst positive Resultate im Hinblick auf die Besiedlung und das regenerative Potenzial von 3D-modifizierter BNC gewonnen. Außerdem bestätigen die vorliegenden Ergebnisse erneut die hohe Biokompatibilität von 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose. Dieses Material erscheint daher als Knorpelimplantat zur Unterstützung der Heilung fokaler Knorpeldefekte durchaus geeignet. Dabei wäre nach einer Bestätigung der Resultate *in vivo* auch die klinische Verwendung eines zellfreien anstelle eines zellbesiedelten Implantats (wie bei der matrix-assoziierten Chondrozyten-Transplantation; MACT) denkbar. Darüber hinaus ließe sich der zellfreie Ansatz auch mit knochenmarkstimulierenden Verfahren (im Rahmen einer Autologen Matrix-Assoziierten Chondrogenese; AMIC) kombinieren, um eine verbesserte *in situ* Zellbesiedlung zu ermöglichen.

2 EINLEITUNG

2.1 Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel überzieht die gegenüberliegenden Enden synovialer Gelenke und sorgt für ein nahezu reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Flächen. Er stellt ein viskoelastisches Gewebe dar und ist bis zu einem gewissen Grad durch Druck-, Zug- und Biegunskräfte komprimier- und dehnbar (Buckwalter und Mankin 1998). Punktförmig auftretender mechanischer Stress wird durch den hyalinen Knorpel optimal auf den subchondralen Knochen verteilt und minimiert (Wong und Hunziker 1998).

Reifer Gelenkknorpel ist ein hypozelluläres, aneurales, alymphatisches und avaskuläres Bindegewebe. Es ist druckelastisch, zugfest und zu reversibler Deformation fähig (Huber et al. 2000). Hyaliner Knorpel besteht wie jedes Bindegewebe aus Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM), die die mechanischen Eigenschaften des Gewebes vorgibt (Martinek 2003). Da der Knorpel aufgrund des Fehlens von Blutgefäßen nur im geringem Maß mit Sauerstoff versorgt wird, ist sein Stoffwechsel vorwiegend anaerob (Putz 2008). Die Nährstoffversorgung und Elimination von Stoffwechselprodukten erfolgt *per diffusionem* durch die EZM über den subchondralen Kapillarplexus und/ oder über die Synovialflüssigkeit (Rudert und Wirth 1998, Wong und Hunziker 1998).

Der Anteil der zellulären Komponente am ausgewachsenen Gelenkknorpel entspricht je nach Literatur ca. 1 – 10 % des Gewebevolumens (Wong und Hunziker 1998, Hunziker et al. 2002, Stockwell 1978). Dabei lassen sich Chondroblasten und Chondrozyten unterscheiden. Die postmitotischen Chondrozyten (als spezifischer Zelltyp des reifen Knorpelgewebes) sind alleinige Produktionsstätte der EZM. Sie steuern den Erhalt des Gewebevolumens durch Synthese und Organisation von Matrixbestandteilen und greifen durch Sekretion verschiedener Metalloproteinasen (und deren Inhibitoren) sowie Endozytose und anschließende lysosomale Degradation regulierend in den Abbau dieser Bestandteile ein (Muir 1995, Drenckhahn 2003). Reifer Gelenkknorpel kann somit einem dynamischen System zugeordnet werden, dessen Zellen auf Änderungen in der Zusammensetzung der EZM reagieren können, um die Integrität der Gewebematrix zu wahren (Dijkgraaf et al. 1995). Die Morphologie, Anordnung und Verteilung der Knorpelzellen im Gewebe ist nicht homogen. Aus postmitotischen Chondrozyten gebildete Zellgruppen werden als Chondrone bezeichnet (Benninghoff 1925). Sie bilden zusammen mit der umgebenen Matrix die Territorien. Der

Bereich zwischen den Territorien, der den größten Anteil in der regionalen Gliederung der EZM ausmacht, wird Interterritorium genannt (Poole 1997).

Circa 90 – 99% des hyalinen Gelenkknorpels bestehen aus einer hochorganisierten extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM besteht größtenteils aus Wasser und Ionen (ca. 80%) und zu ca. 20% aus organischen Matrixmolekülen (Mow et al. 1984). Zum organischen Anteil zählen die Kollagene und andere nicht-fibrilläre Matrixmoleküle wie Proteoglykane und verschiedene Glykoproteine. Unter den Kollagenen, die ca. 80% der soliden EZM ausmachen, bildet **Kollagen Typ II** mit ca. 90% den Hauptteil des kollagenen Fasergerüsts im hyalinen Knorpel (Benninghoff 1925). Weiterhin existieren zu einem geringen Anteil (ca. 10%) die Kollagentypen VI, IX, X und XI (Kuettner 1992). Die einzelnen Kollagentypen unterscheiden sich durch Art und Aufbau ihrer alpha-Ketten sowie ihrer Möglichkeit, Fasergeflechte auszubilden (Petrides 1998). Die Fibrillen des Kollagen Typ II verlaufen arkadenförmig in einem dreidimensionalen Netzwerk durch den gesamten Gelenkknorpel (Benninghoff 1925) und sind maßgeblich für die Stabilität des Knorpels bei einwirkenden Zug- und Scherkräften verantwortlich. Während die Kollagen-Typen VI (Keene et al. 1988, Poole et al. 1992), IX (Wu et al. 1992, Hagg et al. 1998) und XI (Mendler et al. 1989) zur Stabilisierung des Fibrillen-Netzwerkes und zur Zell-Matrix-Interaktion beitragen sollen, wird dem Kollagen Typ X (Kol-10) eine wichtige Rolle in der Mineralisation des Knorpels zugeschrieben (Gannon et al. 1991). Im gesunden, reifen Gelenkknorpel kommt Kol-10 ausschließlich in der Zone des kalzifizierten Knorpels vor (Kuettner 1992). Es wird von hypertrophen Chondrozyten sezerniert und perizellulär deponiert (Schmid und Linsenmayer 1985, Poole et al. 1989). Aufgrund seiner vermehrten Synthese bei osteoarthrotischen Veränderungen und des Vorkommens im Bereich von Zellclustern hypertrophierter Chondrozyten, die als unspezifische Reaktion auf Knorpelläsionen auch in oberflächlichen Knorpelschichten zu finden sind, gilt Kollagen Typ X als Marker für degenerative Gelenkknorpelveränderungen (von der Mark et al. 1992, Kuettner 1992). Darüber hinaus lassen sich im hyalinen Gelenkknorpel sehr geringe Mengen von Kollagen Typ I, III, V und XIV nachweisen (Eyre 2002, Wachsmuth et al. 2006).

Kollagen Typ I (Kol-1) ist im ausgewachsenen Gelenkknorpel nicht oder lediglich als eine dünne oberflächliche Lage zu finden (Wachsmuth et al. 2006, Gregory et al. 2001). Es ist wesentlicher Bestandteil von fibrösem (Knorpel-)Gewebe wie Discus intervertebralis oder Meniscus sowie von Synovia, Knochen, Haut und Sehnen. Da Kol-1 vermehrt in OA-Knorpel nachgewiesen wurde (Nerlich et al. 1993, Gay et al. 1976) und die gesteigerte Kol-1-Synthese

bzw. der „Switch“ von der Kollagen II- zur Kollagen I-Synthese insbesondere von Chondrozyten in Monolayerkulturen mehrfach beobachtet wurde (Gay et al. 1976, Aulhouse et al. 1989, Miosge et al. 2004), gilt dieser Kollagen-Typ als Marker für degenerative Prozesse im ausgewachsenen Gelenkknorpel.

Der nicht-fibrilläre, solide Anteil der extrazellulären Matrix besteht aus Proteoglykanen (PG). PG sind Glykoproteine aus einem fadenförmigen, zentralen Kernprotein (*core protein*), an das kovalent mehrere Seitenketten aus Glykosaminoglykanen (GAG) gebunden sind. Die Glykosaminoglykane sind lineare Polysaccharide aus repetitiven Disaccharideinheiten. Im hyalinen Knorpel kommen vorrangig drei Arten von GAG vor: Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat (Kheir und Shaw 2009).

Neben den kleinen Proteoglykanen wie Biglykan, Dekorin, Fibromodulin und Perlekan stellt **Aggrekan** das größte und mengenmäßig am häufigsten vorkommende Proteoglykan im hyalinen Gelenkknorpel dar. Ein Aggrekanmolekül besitzt ein filiformes Kernprotein, an das flaschenbürstenartig angeordnete GAG-Seitenketten (Keratansulfat und Chondroitinsulfat) angegliedert sind (Hardingham und Muir 1974 ; Abb. 1). Mehrere dieser Moleküle sind über ein Bindeprotein (Link-Protein) an Hyaluronsäure gebunden und bilden auf diese Weise große polyanionische Aggrekan-Aggregate (Heinegard 2009, Aigner und McKenna 2002).

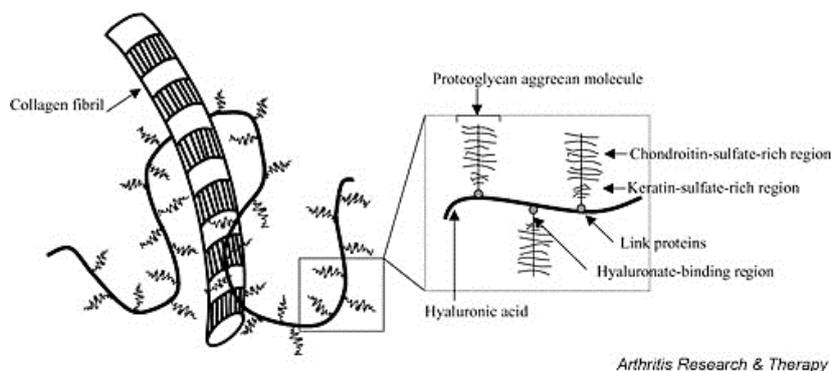


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Aggrekan-Aggregats in der extrazellulären Matrix. Entnommen aus (Moreland 2003).

Die polyanionischen Eigenschaften werden u.a. durch die Sulfatgruppen der GAG-Seitenketten bedingt und bewirken neben einer gegenseitigen Abstoßung eine hohe Bindungskapazität für Kationen (z.B. Natrium) und in Folge dessen für Wasser. Dem durch die Wasserbindung entstehenden Quelldruck wirkt das starre Netzwerk der Kollagenfibrillen entgegen. Auf diese Weise wird ein hoher hydrostatischer Druck aufgebaut, dem die formgebenden und spezifischen funktionellen Eigenschaften des Knorpels zugeschrieben werden (Putz 2008).

Der hyaline Gelenkknorpel lässt sich je nach Kollagenverteilung, Organisation und Aktivität der Chondrozyten sowie Proteoglykangehalt in vier verschiedene oberflächenparallele Zonen unterteilen (Abb. 2; Poole et al. 2001, Benninghoff 1925, Buckwalter et al. 1994).

Zone I) Die **Tangentialfaserzone** (auch **Superfizialzone** genannt) ist ca. 200µm dick (Eyre 2002). Hier sind die Chondrozyten abgeflacht, spindelförmig und parallel zur Oberfläche angeordnet. Sie befinden sich einzeln liegend in einem dichten Netzwerk aus ebenfalls parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen, die in dieser Schicht den dünnsten Durchmesser aufweisen. Der Anteil an Proteoglykanen ist relativ gering, der Wasseranteil am höchsten. Durch die oberflächenparallele Anordnung der Kollagenfasern gilt die superfizielle Knorpelschicht als Zone mit der höchsten Zugfestigkeit im hyalinen Gelenkknorpel (Kempson et al. 1973). Das dichte Fasernetzwerk stellt außerdem eine Barriere für die Diffusion von Makromolekülen (z.B. Antikörper) dar, wodurch der Gelenkknorpel in einem gewissen Ausmaß vom Immunsystem abgeschirmt wird (Buckwalter und Mankin 1998). Der Tangentialfaserzone ist eine dünne Flüssigkeitsmembran aus Lubricin und Hyaluronsäure aufgelagert, die sog. Lamina splendens (Chan et al. 2010, MacConaill 1951), die die reibungsarme Gleitbewegung im synovialen Gelenk gewährleistet (Kumar et al. 2001).

Zone II) Die **Transitional- oder Übergangszone** zeichnet sich durch einen deutlich höheren Gehalt an EZM und geringere Zelldichte aus. Die Kollagenfasern sind im Vergleich zur Superfizialzone dicker und erscheinen unregelmäßig bzw. netzartig angeordnet (Poole et al. 2001). Die Chondrozyten sind oval bis rund und zumeist senkrecht zur Oberfläche angeordnet. Sie liegen in einer proteoglykanreichen Matrix mit geringem Wasser- und Kollagengehalt.

Zone III) In der **Radialzone** sind die Chondrozyten sowie Kollagenfibrillen radial zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die Zelldichte ist noch geringer als in der Transitionalzone. Die Chondrozyten sind zumeist rund und in Säulen arrangiert. Die PG-Konzentration und Kollagenfaserdurchmesser sind in dieser Zone am größten, der Kollagengehalt am geringsten (Poole et al. 2001). Die Kollagenfibrillen tauchen in der Tiefe der Radialzone senkrecht in die sog. „tidemark“ ein. Diese stellt im ausgewachsenen Gelenkknorpel eine wenige µm dicke Grenzlinie dar, die den nicht-mineralisierten vom mineralisierten Knorpel trennt (Gilmore und Palfrey 1987) und als basophile Linie in lichtmikroskopischen Darstellungen imponiert.

Zone IV) Die tiefste Schicht des Knorpels stellt die **Zone des kalzifizierten Knorpels** dar. Sie bildet den Übergang des hyalinen Gelenkknorpels zum subchondralen Knochen, in dem

die senkrecht einstrahlenden Kollagenfasern fest verankert sind. Die Zellen dieser Zone sind hypertroph, produzieren Kol-10 und sind somit für die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix verantwortlich (Poole et al. 2001). Die EZM ist charakterisiert durch senkrecht verlaufende, dicke Kollagenfasern und das Fehlen von Proteoglykanen (Huber et al. 2000). Die Chondrozyten sind insgesamt rund, kleiner und metabolisch kaum aktiv (Martinek 2003).

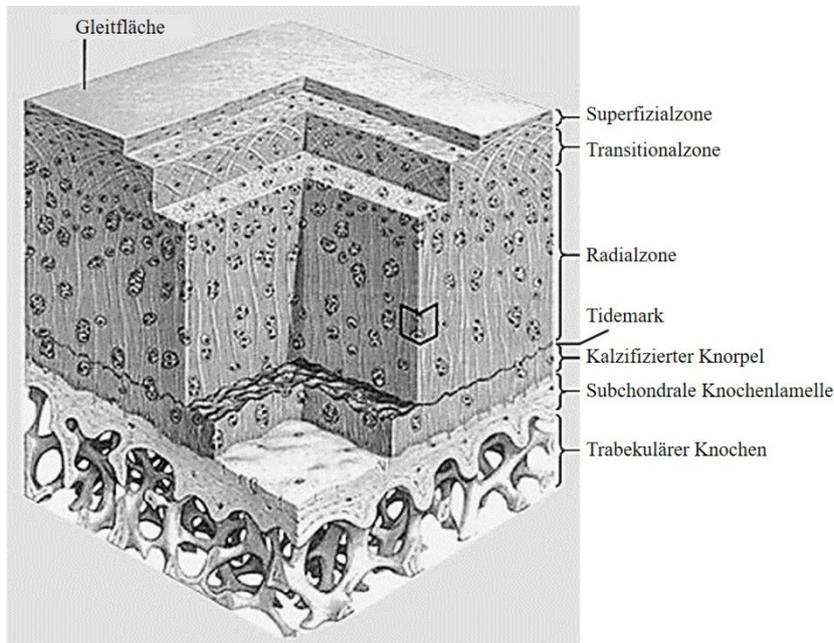


Abb. 2: Schematische Darstellung der Architektur des hyalinen Gelenkknorpels.
Modifiziert nach (Kheir und Shaw 2009).

2.2 Gelenkknorpeldefekte

Schäden des Gelenkknorpels entstehen häufig durch mechanische Überbeanspruchung bzw. Traumata und im Rahmen der primären Arthrose. Metabolische Störungen des subchondralen Knochens wie Osteonekrose oder Osteochondrosis dissecans können ebenfalls seltene Ursachen sein. Beim Erwachsenen heilen Gelenkknorpeldefekte nicht spontan und können in eine sekundäre Arthrose münden (Madry et al. 2011, Mankin 1982). Im Rahmen dieses Pathomechanismus spielt die geringe Zelldichte und Avaskularität des hyalinen Knorpelgewebes eine große Rolle. Die mangelnde Antwort der Chondrozyten auf eine Gewebeverletzung ist wohl auch durch deren feste Einmauerung in die EZM bedingt. Diese Fixierung erschwert die sofortige Migration und Zellproliferation, wodurch die Regeneration nur eingeschränkt vollzogen werden kann (Khan et al. 2008). Dagegen zeigen isolierte Knorpelzellen durchaus eine potentielle Regenerationsfähigkeit (Gaissmaier et al. 2007).

Der spätere Verlauf eines Knorpelschadens wird grundsätzlich durch unterschiedliche Parameter wie Größe, Tiefe und Lokalisation des Defekts, begleitende biomechanische

Veränderungen wie Bandverletzungen oder Achsfehlstellung sowie das Aktivitätsniveau und Patientenalter beeinflusst (Buckwalter 2002, Lotz und Kraus 2010, Gaissmaier et al. 2003b).

Im Allgemeinen werden 2 Arten von Gelenkknorpelverletzungen unterschieden: oberflächliche, rein chondrale Läsionen und tiefe, bis in den subchondralen Knochen reichende osteochondrale Defekte (Noyes und Stabler 1989, Wirth und Rudert 1996).

Oberflächliche Knorpelschäden müssen nicht zwangsläufig zu einer frühzeitigen Arthrose führen (Buckwalter 2002), sie zeigen jedoch auch keine ausreichende Heilungstendenz (Thompson 1975, Convery et al. 1972). Am Rand der Knorpeldefekte bilden sich ähnlich wie bei der Arthrose mitotisch aktive Chondrozyten, die in sog. „Zellclustern“ proliferieren (Imhoff et al. 1999b). Diese sind metabolisch sehr aktiv und es kommt initial zu einer verstärkten Synthese von Matrixkomponenten. Die vermehrte Syntheserate ist jedoch zeitlich begrenzt und die Matrixproduktion scheint nicht auszureichen, um eine Reparatur des Defektes zu gewährleisten (Buckwalter 1998, Mankin 1982). Dabei führen insbesondere Schädigungen des Knorpels ab 3 mm Größe zu einem bleibenden Defekt (Convery et al. 1972). Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer chronisch fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels mit einem daraus resultierenden Funktionsverlust des Gelenkes (Maletius und Aigner 1999).

Bei den tiefen **osteochondralen Gelenkknorpeldefekten** findet sich ein anderes Reaktionsmuster. Unter Beteiligung des subchondralen Knochens kommt es durch Eröffnung ossärer Blutgefäße zur lokalen Einblutung und Ausbildung eines Fibrinkoagels in der Defektzone. Im weiteren Verlauf wandern multipotente mesenchymale Stammzellen (MSZ) aus dem Knochenmark ein, die das Fibringerinnsel durchsetzen und zu Chondrozyten differenzieren, wonach die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen einsetzt (Buckwalter 1998, Shapiro et al. 1993). Das entstandene Reparaturgewebe verliert jedoch über die Zeit PG und es entsteht eine fibroartilaginäre Narbe, die gegenüber dem nativen Knorpel strukturell und biomechanisch deutlich minderwertig ist (Mitchell und Shepard 1976). Eine vollständige Rekonstruktion des knöchernen Anteils im Defekt ist möglich, die Integration des chondralen Anteils des Reparaturgewebes zum angrenzenden, gesunden Knorpel scheint jedoch nicht auszureichen. Hier treten Scherkräfte zwischen Reparations- und Knorpelgewebe auf, die zu degenerativen Veränderungen und der Entstehung einer Arthrose führen (Shapiro et al. 1993).

2.3 Hintergründe und Indikationsstellung für die operative Behandlung von Gelenkknorpeldefekten

Hyaliner Gelenkknorpel ist für Verletzungen extrem anfällig und besitzt eine nur sehr begrenzte Reparaturkapazität. Daher münden Gelenkknorpelverletzungen sehr häufig in eine vorzeitige Knorpeldegeneration (Vaquero und Forriol 2012).

Nach Sellards et al. leiden 10 bis 12% aller Individuen an Knorpelverletzungen (Sellards et al. 2002). In mehreren Studien wurde im Rahmen von Kniegelenks-Arthroskopien eine hohe Prävalenz (> 55%) von Knorpelläsionen nachgewiesen (Curl et al. 1997, Hjelle et al. 2002), wobei das Vorkommen rein fokaler Defekte mit 4% (Curl et al. 1997) bis zu 28% (Hjelle et al. 2002) angegeben wurde. Umschriebene Knorpeldefekte mit normalem angrenzenden Knorpel entstehen oft als Folge eines Traumas (Madry et al. 2010, Madry 2005) und wurden bei Patienten mit traumatischen Knieverletzungen in 16% der Fälle diagnostiziert (Hardaker et al. 1990). Problematisch ist, dass traumatische Gelenkknorpeldefekte im weiteren Verlauf häufig zu einer Arthrose führen (Buckwalter und Brown 2004, Lotz 2010, Messner und Maletius 1996) und somit gerade für den jungen, sportlich aktiven Patienten eine große Gefahr darstellen. In der Literatur wird das Risiko für die Entstehung einer Arthrose nach posttraumatischer Knorpelverletzung bei Jugendlichen mit 2,9% (Gelber et al. 2000) und bei Erwachsenen mit 7,4% (Wilder et al. 2002) angegeben. Brown et al. schätzt sogar, dass ca. 12% aller symptomatischen Arthrosen posttraumatischer Genese sind (Brown et al. 2006).

Gelenkpathologien äußern sich durch Schmerzen und Funktionsstörungen. Dies führt häufig zu Bewegungseinbußen, Behinderungen und Einschränkungen im Alltag und damit zu einem erheblichen Verlust an Lebensqualität für die Betroffenen. Neben den persönlichen Belastungen verursachen arthrotische Erkrankungen aufgrund einer starken Inanspruchnahme von Leistungen des Gesundheitssystems beträchtliche volkswirtschaftliche Kosten sowie erhebliche indirekte Kosten aufgrund eines hohen Anteils von Invalidität, Arbeitsunfähigkeit und Frühberentungen (Robert-Koch-Institut 2013). Unter diesem Aspekt haben in den vergangenen Jahren in vielen EU-Staaten Hüft- und Kniegelenkoperationen deutlich zugenommen (RKI/DSTATIS 2015). Im Jahr 2014 wurden in Deutschland pro 100000 Einwohner 197 Knieendoprothesen durchgeführt (OECD/EU 2016). Anzumerken ist, dass die Ergebnisse des endoprothetischen Gelenkersatzes bei posttraumatischen Gonarthrosen erheblich schlechter als bei der Versorgung primärer Arthrosen sind (Matziolis und Windisch 2014). Die Komplikationsrate wird in der Literatur zwischen 20 und 60% angegeben, wobei am häufigsten Infektionen, Frühlockerungen und Bewegungseinschränkungen beschrieben

sind (Weiss et al. 2003, Wu et al. 2005, Lonner et al. 1999). Besonders für jüngere Patienten ist ein künstlicher Gelenkersatz als sehr kritisch anzusehen, da dieser mit einer Häufigkeit von ca. 13% nach 10 Jahren funktionell versagt (Labek et al. 2011). Hieraus entstehen aufwendige und kostenintensive Revisionseingriffe (Mittelmeier et al. 2012).

Aufgrund dieser Faktoren besteht bis heute eine große Nachfrage nach innovativen, gelenkerhaltenden (operativen) Therapieverfahren, durch die die Funktion des Gelenkknorpels und damit die Lebensqualität des Betroffenen wiederhergestellt und eine vorzeitige Arthroseentstehung verhindert werden kann. Die Arbeitsgruppe um Wildner schätzte bereits vor einigen Jahren, dass von jährlich 3400 Patienten mit fokalen Knorpeldefekten im Laufe des weiteren Lebens ca. 2000 Gelenkersatzoperationen notwendig werden und dass diese durch eine Behandlung mit regenerativen Verfahren, wie z.B. einer ACT, auf 1000 halbiert werden könnten (Wildner et al. 2000).

Die Indikation zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte erfordert im Vorfeld eine präzise Diagnostik und komplette Evaluation des Gelenks (Vaquero und Forriol 2012). Neben klinischer Untersuchung und konventionellem Röntgen erfolgt zumeist ein MRT, das in der bildgebenden Diagnostik von Kniebinnenschäden als Goldstandard anzusehen ist (Weißberger M et al. 2014). Daneben gilt die diagnostische Arthroskopie als Verfahren der Wahl, um die Lokalisation, Größe und Tiefe eines fokalen Knorpeldefekts beurteilen und eine mögliche Therapie einleiten zu können (Marlovits und Vécsei 2000, Behrens et al. 2004, Fritz et al. 2006). Hiernach erfolgt die klinische Einteilung der Knorpelschäden nach Outerbridge (Outerbridge 1961), wobei vier Schweregrade unterschieden werden. Eine weitere Klassifikationsmöglichkeit liefert der ICRS-Score (International Cartilage Repair Society; Brittberg und Winalski 2003). Operativ therapiebedürftig sind symptomatische Knorpelschäden des Grades III und IV (Behrens et al. 2004).

2.4 Aktuelle Konzepte zur operativen Therapie von Gelenkknorpeldefekten

Die operativen Behandlungsmethoden können im Allgemeinen in reparative (markraumeröffnende Verfahren), rekonstruktive (Füllung des Defekts mit autologen osteochondralen Transplantaten) und regenerative Ansätze (zellbasierte Verfahren; Techniken des „Tissue engineering“) eingeteilt werden (Forriol 2009, Vaquero und Forriol 2012).

Aktuell werden zur operativen Therapie von fokalen Gelenkknorpeldefekten markraumeröffnende Verfahren (Mikrofrakturierung), osteochondrale Transplantate (OATS) und die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) angewendet (Madry et al. 2011). Dabei

ist die Wahl der Behandlungsmethode abhängig von folgenden Parametern: Ätiologie der Knorpelverletzung, patientenspezifische Ziele (Schmerzreduktion, Funktionsverbesserung), Patientenalter, BMI, Aktivitätsniveau, Beinachse, Begleitpathologien (Band- bzw. Meniskusverletzungen), Defektgröße und -Lage sowie BegleitleSIONen („kissing-lesions“) (Vaquero und Forriol 2012, Madry et al. 2011).

2.4.1 Allgemeine arthroskopische Verfahren

Zu den allgemeinen arthroskopischen Therapieverfahren zählen **Lavage** (Gelenkspülung), **Debridement** (Abtragung erkrankten Gewebes) oder **Shaving** (Knorpelglättung), die unter dem Begriff der „Gelenktoilette“ zusammengefasst werden. Es werden ausgefaserte Knorpelfragmente abgetragen und der Knorpel somit geglättet, um die Übertragung von Scherkräften auf intakte Knorpelareale zu verhindern (Kirkley et al. 2008, Moseley et al. 2002). Zudem sollten freie Bruchstücke oder instabile, zerstörte Anteile von Gelenkknorpel und Meniskus entfernt werden (Basad 2013), da diese Partikel die Inflammation der Synovia stimulieren und dadurch proteolytische Enzyme im Gelenk freigesetzt werden. Diese schwächen durch katabole Reaktionen die Regenerationsfähigkeit von Proteoglykanen und Kollagenen, mit der Folge einer reaktiven Kollagenolyse, Matrixzerstörung und somit Degeneration (Evans et al. 1984). Die arthroskopische Lavage, Debridement und Knorpelglättung stellen rein symptomatische Verfahren dar (Anders et al. 2001, Burkart et al. 2001), können aber eine Verbesserung der Gelenkfunktion bewirken (Hunt et al. 2002). Sie weisen kurzfristige Erfolgsraten von bis zu 80% und mittelfristig zufriedenstellende Ergebnisse von 50% auf (über 5 Jahre; Anders et al. 2001). Nach Anwendung der arthroskopischen Verfahren bei einem vollschichtigen Knorpelschaden wird langfristig jedoch keine Beschwerdefreiheit erreicht (Marlovits und Vécsei 2000). Es wird weder ein Regeneratgewebe gebildet noch wird die weitere Arthroseentwicklung beeinflusst (Werner et al. 2003). Besonders der Nutzen der Gelenklavage wird in Studienergebnissen angezweifelt (Reichenbach et al. 2010).

2.4.2 Knochenmarkstimulierende Verfahren

Neben der bereits 1959 beschriebenen **Pridie-Technik**, bei der kleine Löcher in den subchondralen Knochen gebohrt wurden (Pridie 1959) und der **Abrasionsarthroplastik** (Johnson 1986), hat sich inzwischen die von Steadman et al. eingeführte **Mikrofrakturierung** (MF) mit deutlich verkleinerten Perforationen (Steadman et al. 1999) zu einem häufig durchgeführten klinischen Standardverfahren entwickelt. Es handelt sich um einen einfachen, minimalinvasiven, kostengünstigen, einstufigen Eingriff mit geringer

Komplikationsrate (Richter und Diederichs 2009). Bei den knochenmarkstimulierenden Verfahren werden intraossäre Blutgefäße eröffnet, mit lokaler Einblutung und Bildung eines Blutkoagels am Defektgrund, dem sog. „Super Clot“. Darin enthaltene mesenchymale Stammzellen differenzieren anschließend und bewirken die Bildung von Faserknorpel (Burkart et al. 2001, Shapiro et al. 1993). Dieses Knorpelregeneratgewebe enthält jedoch vorwiegend Kollagen Typ 1 und weist im Vergleich zum hyalinen Knorpel eine deutlich geringere Belastbarkeit auf (Steinwachs et al. 1999, Peterson et al. 2002). Außerdem kommt es zu einer vermehrten subchondralen Knochenbildung mit Ausdünnung des darüberliegenden Reparaturknorpels sowie zur Bildung intraläsionaler Osteophyten (Gomoll et al. 2010b, Mithoefer et al. 2009, Cole et al. 2011). Langfristig ist der gebildete Faserknorpel den mechanischen Anforderungen nicht gewachsen, sodass sich bei entsprechender Defektgröße eine Arthrose ausbildet (Imhoff et al. 1999b). Allerdings scheint eine Diskrepanz zwischen dem histologischen Ergebnis und der Klinik zu bestehen (Anders et al. 2001, Friedman et al. 1984, Johnson 2001), da bis zu 77 % der Patienten nach MF über 2-5 Jahre insgesamt gute bis exzellente Resultate hinsichtlich der klinischen Befundverbesserung zeigten (Steadman et al. 1999, Passler 2000, Knutsen et al. 2007, Mithoefer et al. 2005).

Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Schrumpfung des Blutklots im Defekt die Gefahr der unvollständigen Füllung bzw. des Verlustes des Reparaturgewebes aus der Läsion besteht (Richter und Diederichs 2009). Um das zu verhindern, wurde die Mikrofrakturierung (MF) zu einer matrixbasierten Technik weiterentwickelt, wobei der perforierte Defekt durch ein Biomaterial überdeckt wird (Steinwachs et al. 2008). Diese Technik der sog. **Autologen Matrix-Induzierten Chondrogenese** (AMIC) soll eine bessere Anreicherung des Blutkoagels in der Defektzone bewirken (siehe Abb. 3). Die Defektauflagen sollen ein Ausschwemmen der Blutprodukte und mesenchymalen Stammzellen (MSC) in die Synovialflüssigkeit verhindern und dadurch die lokale Chondrogenese fördern (Vaquero und Forriol 2012). Das AMIC-Verfahren könnte somit die Limitationen der MF (Erhalt von Faserknorpel) überwinden und eine verbesserte *in situ* Regeneration bewirken (Gaissmaier et al. 2007). Überdies können die Implantate zusätzlich mit chondro- oder osteoinduktiven Stimuli versehen werden (sog. „smart biomaterials“; siehe Abb. 3). Derzeit befinden sich verschiedene zellfreie Implantatmaterialien in klinischer Anwendung, z.B. Chitosan (**BST-CarGel®**, Piramal Healthcare Ltd., Kanada; Hoemann et al. 2005), Hyaluronsäure-basierte Matrices (**HyaloFast®**, Anica Therapeutics S.r.l, Italien) oder PGA-Hyaluronsäure-Vliese (**Chondrotissue®**, BioTissue AG, Schweiz; Erggelet et al. 2009) sowie Bilayer-Kollagenmembranen (**AMIC®** bzw. **Chondro-Gide®**, Geistlich Biomaterials, Deutschland)

oder auch zellfreie Kollagen-Gele (CaReS-1S®, Arthro Kinetics Biotechnology GmbH, Österreich). Erste Studien zum klinischen Einsatz einer Kollagenmembran belegten eine Verbesserung der klinischen Ergebnisse zum Zeitpunkt 3 Jahre nach der Operation (Gille et al. 2010). In weiteren experimentellen und klinischen Studien wurde eine signifikant verbesserte Knorpelregeneration nach MF und Implantation zellfreier Matrices im Vergleich zur alleinigen MF ohne Matrixeinsatz gezeigt (Pot et al. 2016) bzw. eine deutliche Verbesserung des klinischen und histologischen Outcome über 5 Jahre dokumentiert (Shive et al. 2015). Langzeitstudien hierzu stehen allerdings noch aus.

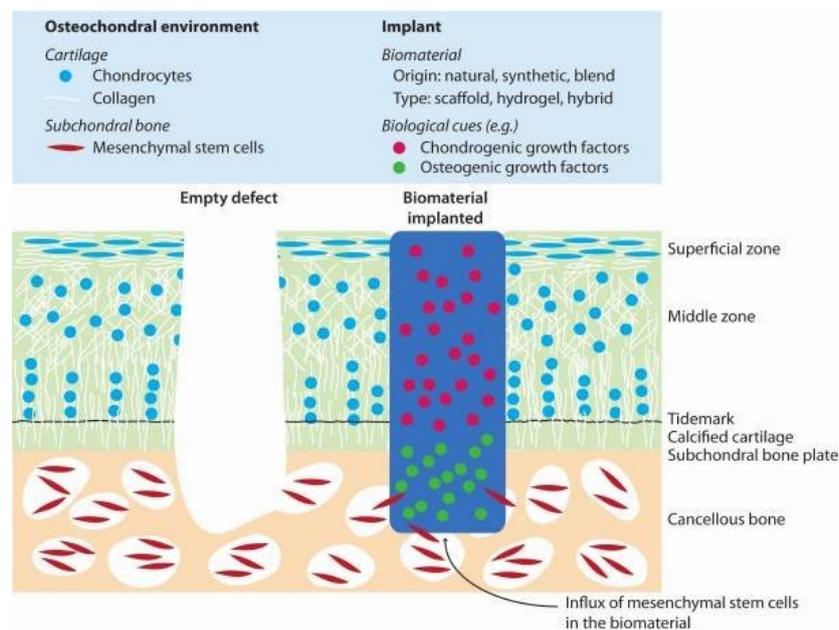


Abb. 3: Schematische Darstellung der Knorpelregeneration durch Implantation eines Biomaterials nach Knochenmarkstimulation (AMIC).

Das (zellfreie) Implantat bietet eine Leitschiene für die *in situ* Regeneration des Knorpels durch Infiltration von mesenchymalen Stammzellen aus dem darunterliegenden Knochenmark. Entnommen aus (Pot et al. 2016).

2.4.3 Rekonstruktive Verfahren (Knorpel-Knochen-Transplantation)

Die Transplantation osteochondraler Segmente zählt als rekonstruktive Operationsmethode zu den bislang einzigen Verfahren, um einen bestehenden Gelenkknorpeldefekt mit sofort belastbarem Reparaturgewebe aus intaktem hyalinen Knorpel zu decken (Werner et al. 2003, Bobic 1999, Hangody und Fules 2003). Diese Methode wird bei fokalen chondralen oder osteochondralen Defekten mit einem Durchmesser von 2 cm (Bobic 1999) bis max. 3 cm (Imhoff et al. 1999b) angewendet. Hierbei werden mittels verschieden großer Hohlmeißel Knorpel-Knochen-Zylinder aus einer weniger belasteten Zone des Gelenks entnommen und in sog. „Press-fit-Technik“ in den Defektbereich implantiert. Der Defekt kann dabei in arthroskopischer oder offener Operationstechnik mit einem oder mehreren Zylindern gedeckt werden (Bös 2003). Seit der ursprünglich von Wagner beschriebenen **osteochondralen**

Transplantation (OCT) (Wagner 1964) reichen die Verfahrenstechniken gegenwärtig vom Einsatz einzelner **osteocondraler autologer Transplantationssysteme (OATS)** über die **Mosaikplastik** (Entnahme vieler kleiner Zylinder, Hangody et al. 1998) bis hin zu „**Mega-OATS**“ (Agneskirchner et al. 2002) bzw. den **dorsalen Kondylentransfer** bei größeren Defektflächen (Imhoff et al. 1999a). Da autologe Spenderzylinder nur begrenzt zur Verfügung stehen (Bobic 1999), werden insbesondere für größere und komplizierte Läsionen die Transplantate auch aus tiefgefrorenem oder frischem Spendergewebe herangezogen (sog. „**Allografts**“) und seit den 1990er Jahren vor allem in den USA erfolgreich angewendet (Lattermann und Brucker 2012).

Abhängig vom Ausmaß und der Lokalisation der Verletzung zeigt die Behandlung mit OATS bei Nachuntersuchungszeiten von bis zu 12 Jahren bei 70 bis 90% der Patienten gute bis sehr gute klinische Resultate (Hangody et al. 1998, Laprell und Petersen 2001, Horas et al. 2003, Garrett 1986, Ghazavi et al. 1997). Auch im Vergleich zur MF soll die OCT ein besseres frühfunktionelles Ergebnis aufweisen (3 Jahre; Gudas et al. 2005). Allerdings wurde in experimentellen Studien zwar ein vollständiges Einwachsen der Transplantate im knöchernen Anteil, jedoch eine unzureichende Integration der Knorpelplatte mit dem umgebenden Knorpel anhand der Bildung einer faserknorpeligen Narbe beschrieben (Hangody et al. 1998, Siebert et al. 2001). Neben Limitationen wie Verfügbarkeit geeigneter Spenderareale, gestörte Integrität der Zylinder und Gefahr einer inkongruenten Knorpeloberfläche (Martinek und Imhoff 2003, Spahn 2007), werden bei der OCT häufig noch weitere Komplikationen beschrieben, z.B. Infektionen, Hämarthrose, abgebrochene Knorpelkappen sowie Schmerzen und Krepitationen im Bereich der Entnahmestellen und daraus resultierende Reizkniebeschwerden (Hangody und Fules 2003, Bös 2003, Imhoff und Oetl 1999). Allografts sind außerdem wegen der kurzen Überlebenszeit schlecht verfügbar und zeigen ein erhöhtes Risiko für Immunreaktionen und Krankheitsübertragungen (Vaquero und Forriol 2012). Aufgrund der Gefahr der Stufenbildung und Zylinder-Dislokation wird bei größeren Defekten ($\varnothing > 1,5 \text{ cm}$) eher die MACT oder auch die ACT ($\varnothing \text{ ca. } 4,66 \text{ cm}^2$) anstelle der Mosaikplastik empfohlen (Pape et al. 2010, Aurich et al. 2007, Ochs et al. 2011, Bentley et al. 2003).

2.4.4 Zellbasierte Verfahren

Die **autologe Chondrozytentransplantation (ACT)**, engl.: „autologous chondrocyte transplantation“ oder **ACI**; „autologous chondrocyte implantation“), die 1994 durch die schwedische Arbeitsgruppe um Peterson und Brittberg eingeführt wurde (Brittberg et al.

1994), stellt mittlerweile ein anerkanntes, zelltherapeutisches Verfahren zur Behandlung von vollschichtigen Knorpelschäden dar (Niemeyer et al. 2013, Richter und Diederichs 2009).

Bei der **klassischen ACT** werden Chondrozyten in einer ersten Arthroskopie per Knorpelbiopsie isoliert, in Zellkultur vermehrt und anschließend in einer zweiten arthroskopischen oder offenen Operation in das zuvor debridierte und mit einem Periostlappen abgedeckte Defektareal injiziert (Brittberg et al. 2003). Der Periostlappen soll dabei neben dem wasserdichten Verschluss und mechanischen Schutz auch durch die in ihm enthaltenen mesenchymalen Stammzellen und Wachstumsfaktoren die lokale Chondrogenese unterstützen (Peterson et al. 2000, O'Driscoll und Fitzsimmons 2001). Der Periostlappen (**ACI-P**) wurde inzwischen durch eine resorbierbare Kollagenauflage (**ACI-C**) ersetzt (Bentley et al. 2003, Haddo et al. 2004), um die operativ aufwendige Periostgewinnung und das Risiko einer Transplantathypertrophie zu vermeiden (Bartlett et al. 2005).

Hauptindikationen zur Durchführung einer ACT sind gegenwärtig vollschichtige, symptomatische, große Knorpeldefekte des Kniegelenks von 3 bis zu 10 cm² (Behrens et al. 2004, Niemeyer et al. 2010, Gomoll et al. 2010a). Außerdem kommen kleinere Knorpeldefekte in Frage, bei denen andere Therapieverfahren versagt haben (Niemeyer et al. 2013, Madry und Pape 2008). Überdies zeigten erste Studien bereits gute Ergebnisse für den Einsatz bei beginnenden degenerativen Gelenkknorpelschäden (Minas 2001). Aktuell ist die ACT jedoch nicht zur Arthrosebehandlung indiziert (Behrens et al. 2004, Nehrer et al. 2009).

In verschiedenen Studien konnte eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität der Patienten nach einer ACT nachgewiesen werden (Minas 1998). Abhängig von der Art und Lokalisation des Defekts zeigten Langzeitstudien von bis zu 11 Jahren gute bis sehr gute klinische Ergebnisse (z.B. 90% bei einer ACT im Bereich der Femurkondylen; Peterson et al. 2002). Diese Erfolgsraten scheinen mittlerweile sogar über einen Zeitraum von bis zu 20 Jahren stabil zu sein (Peterson et al. 2010). Auch andere Autoren berichteten über ähnlich vielversprechende Ergebnisse sowohl im mittelfristigen Verlauf (Roberts et al. 2003, Micheli et al. 2001, Richardson et al. 1999) als auch im Langzeitverlauf, wobei überwiegend gute bis sehr gute klinische Erfolgsquoten von über 70% beschrieben sind (Erggelet et al. 2000, Micheli et al. 2001, Henderson et al. 2005, Moseley et al. 2010). Insgesamt gilt die klassische ACT im direkten Vergleich mit anderen Verfahren wie der Mikrofrakturierung oder der OCT als überlegen (Fu et al. 2005, Bentley et al. 2003, Horas et al. 2003, Vavken und Samartzis 2010). Die Ergebnisse der ACT sind allerdings schlechter, wenn die Integrität der subchondralen Platte z.B. durch Voroperationen (Mikrofrakturierung) gestört ist (Minas et al.

2009). Insgesamt wurde das nach einer ACT gebildete Regeneratgewebe als hyalinartig eingestuft (Peterson et al. 2010). Dieses entspricht jedoch histologisch, biochemisch und biomechanisch noch nicht vollständig dem nativen Gelenkknorpel (Steinwachs et al. 1999).

Die Nachteile des zelltherapeutischen Therapieansatzes sind die zusätzliche Operation zur Entnahme von Knorpelgewebe, das Setzen eines künstlichen Knorpeldefekts mit fraglicher Morbidität der Spenderregion, die aufwendige Zellisolation und -Kultivierung (Werner et al. 2003, Lee et al. 2000) sowie die Dedifferenzierung der Knorpelzellen in Monolayerkulturen (von der Mark et al. 1977, Glowacki et al. 1983). Überdies wurden bei der **ACI-P** zum Teil degenerative Veränderungen bzw. Transplantathypertrophien beschrieben (Peterson et al. 2000, Micheli et al. 2001, Minas und Peterson 1999, Ueno et al. 2001), die eventuell operativ revidiert werden müssen (Henderson et al. 2004). Außerdem besteht nach der Patch-Aufnaht die Gefahr der Delamination, Leckage sowie ungleichmäßigen Zellverteilung im Regenerat (Bartlett et al. 2005, Sohn et al. 2002). Bei nicht erhaltenem Containment (Fehlen einer stabilen Knorpelschulter um den Defekt) lässt sich der (Periost-) Patch nur schwer oder gar nicht über den Defekt nähen (Gaissmaier et al. 2003a, Fritz et al. 2005), mit einem negativen Einfluss auf das postoperative Ergebnis (Andereya et al. 2004).

Um diese Probleme zu umgehen, wurde die ACT zu einem trägergekoppelten Verfahren weiterentwickelt (Andereya et al. 2006). Bei dieser sog. **matrixassoziierten Chondrozyten-Transplantation (MACT)** werden die isolierten Chondrozyten auf verschiedene Trägermaterialien ausgesät, *in vitro* kultiviert und anschließend implantiert (Gaissmaier et al. 2003a, Brittberg 2010, Behrens et al. 2004). Durch die MACT wurde das Auftreten einer Transplantathypertrophie und die Delamination des Periostlappens deutlich reduziert (< 1%; Harris et al. 2011). Außerdem ist eine arthroskopische Transplantation der zellbeladenen Konstrukte möglich, was zu einer deutlichen Vereinfachung der Methode und Verkürzung der Operationszeit sowie zu einer erheblichen Reduktion von Komorbiditäten führt (Erggelet et al. 2003, Marcacci et al. 2002). Studien zeigten bislang gute bis exzellente Ergebnisse nach Anwendung der MACT, jedoch fanden sich noch keine eindeutigen Unterschiede im klinischen und histologischen Outcome im Vergleich zur klassischen ACT (Bartlett et al. 2005, Manfredini et al. 2007, Iwasa et al. 2009). In den Matrices konnte auch noch keine optimale Zellverteilung und Zelldichte erreicht werden, die eine vielversprechende Zelldifferenzierung und Bildung kartilaginärer Matrix fördert (Iwasa et al. 2009).

2.5 Tissue Engineering

Die verschiedenen, interdisziplinären Teilschritte für die Entwicklung eines bioartifiziellen Implantats werden unter dem Begriff „**Tissue Engineering**“ (TE, Gewebezüchtung) zusammengefasst (Gaissmaier et al. 2003a). TE ist definiert als „die Regeneration biologischer Gewebe unter Verwendung von Zellen mit Hilfe unterstützender Trägerstrukturen und/ oder Biomolekülen“ (*Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices*, SCMPMD 2001). Für die Herstellung einer funktionsfähigen Knorpelmatrix, die idealerweise mit dem gesunden Defekt-Knorpel fusioniert und ähnliche biomechanische Eigenschaften wie hyaliner Gelenknorpel aufweist (Weise et al. 2000), sind ausreichend vitale, knorpelbildende Zellen in einem phänotypisch stabilem Funktionszustand nötig (Freed et al. 1999). Da der Phänotyp vor allem durch Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst wird, ist zusätzlich eine mechanisch stabile Primärmatrix erforderlich, die den Differenzierungszustand aufrechterhält. Daher ist gerade die Eigenschaft des Trägermaterials ein entscheidender Faktor für die spätere Regeneratqualität *in vivo* (Hunziker 2002).

Die meisten bisher entwickelten Trägermaterialien sind Membran- oder Vlies-Strukturen., Hydrogele oder komplexere, mehrphasische Trägermaterialien (Gaissmaier et al. 2007). Aktuell werden unterschiedliche Matrices als durchaus vielversprechend angesehen. Dazu zählen z.B. BioSeed®-C (BioTissue Technologies GmbH, Freiburg, Deutschland), ein auf Polyglycolsäure basierendes, resorbierbares, zellbesiedeltes Stützgewebe mit hoher Formstabilität (Kreuz et al. 2009), Chondro-Gide® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz), eine zellbeladene Bilayer-Kollagen-Membran (Haddo et al. 2004) oder MACI® (Vericel Corp, Cambridge/ MA, USA), eine Kollagen I/III-Membran (Bartlett et al. 2005). Bei MACI® wurde die Verteilung der Chondrozyten aufgrund des relativ dichten Materials jedoch als schlecht eingestuft (Nuernberger et al. 2011). Dagegen soll Hyalofast® (Anica Therapeutics S.r.l., Padova, Italien), ein Vlies aus Hyaluronsäurefasern, eine gleichmäßigere Zellverteilung ermöglichen. Bei dem neuartigen Kollagen-I-Gel CaReS-2S® (Arthro Kinetics Biotechnology GmbH, Krems, Österreich) werden die Chondrozyten bereits beim Herstellungsprozess mit dem Hydrogel vermischt und somit eine sehr gute Zellverteilung erreicht (Schneider und Andereya 2003). Desweiteren besitzt der Kollagen-I/ Chondroitinsulfat-Schwamm Novocart®-3D (TETEC AG, Reutlingen, Deutschland) eine wie ein Kammersystem aufgebaute Leitstruktur, die eine säulenartige Anordnung der Zellen ermöglicht (Gaissmaier et al. 2003a). In vergleichenden Analysen wurden bei CaReS® und Novocart®-3D die beste Verteilung der Zellen und der höchste chondrozytäre

Differenzierungsgrad innerhalb des Scaffolds gefunden (Nuernberger et al. 2011, Albrecht et al. 2011), was sich in guten histologischen Ergebnissen mit einer *in vitro* und *in vivo* Bildung hyalinartigen Gewebes widerspiegelte (Gaissmaier et al. 2003a, Schneider et al. 2011a). Mittlerweile können einige klinische Studien einen deutlichen Nutzen der Biomaterialien (i.R.d. MACT-Technik) hinsichtlich einer Verbesserung des klinischen Outcomes nachweisen (Schneider et al. 2011b, Behrens et al. 2006, Nehrer et al. 2006, Kon et al. 2013). Andere vergleichende Studien lieferten jedoch z.T. zweifelhafte funktionelle, histologische oder auch biomechanische Ergebnisse und konnten insgesamt noch keinen eindeutigen Vorteil der MACT gegenüber der klassischen ACT finden (Panagopoulos et al. 2012, Bartlett et al. 2005, Iwasa et al. 2009). Ergebnisse von Langzeitstudien stehen bisher noch aus.

2.6 Bakterielle Nanocellulose (BNC)

Bakterielle Nanocellulose (BNC) ist in der Natur weit verbreitet und wird als Biofilm durch Fermentation von Zuckern und pflanzlichen Kohlenhydraten von aeroben, nicht pathogenen Essigsäurebakterien der Gattung *Gluconacetobacter*, speziell *G. xylinum* gebildet (Klemm et al. 2011). Die Erstbeschreibung lieferte A.J. Brown im Jahre 1886 (Brown 1886). Unter Laborbedingungen werden die Stäbchenbakterien in Glucose-haltigen Nährmedien kultiviert (Hestrin und Schramm 1954). Die Cellulosemembran wird dabei an der Übergangszone zwischen Medium und Luft gebildet und weist ein sehr feinstrukturiertes, dreidimensionales Netzwerk mit einem Faserdurchmesser von 20 bis 100 nm auf (Klemm et al. 2011, Jonas und Farah 1998). Durch die Änderung der Kulturbedingungen, des Bakterienstamms oder der Kultivierungsform (statisch/dynamisch) können unterschiedliche Netzwerk-Strukturen und Formationen während der Biosynthese hergestellt werden (Heßler 2008). Daneben können während der Synthese durch Zugabe verschiedener Zusatzstoffe bzw. postprozeptionell durch kontrollierte Beladung mit synthetischen Polymeren, Nanopartikeln oder bioaktiven Substanzen die funktionellen Eigenschaften der BNC gesteuert werden (Heßler und Klemm 2009, Kramer et al. 2006). Außerdem kann das Cellulosegerüst *in situ* durch Einsatz von entfernbaren „Platzhaltern“ oder *ex situ* durch Laserbehandlung mit Poren versehen werden, die z.B. das Einwachsen von Zellen erleichtern (Petersen und Gatenholm 2011, Ahrem et al. 2014). Durch diese vielseitigen Modifikationsmöglichkeiten besitzt bakterielle Nanocellulose ein enorm breitgefächertes Anwendungs-Potential.

2.6.1 Eigenschaften und Anwendungsbereiche der bakteriellen Nanocellulose

Bakteriell synthetisierte Nanocellulose (BNC) zeichnet sich durch ein hoch-gequollenes Nanofaser-Netzwerk mit einem charakteristischen Porensystem, einer hohen Reinheit sowie

einer enormen Wasseraufnahmefähigkeit aus. Wie die Pflanzencellulose bestehen Nanocellulose-Fasern aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Polysaccharid-Einheiten, sind jedoch ca. 100-mal dünner. Durch den hohen Kristallisations- und Polymerisationsgrad besitzen BNC-Fasern eine außerordentliche Zugfestigkeit, die vergleichbar mit der von Aramid-Fasern ist, die z.B. Bestandteil ballistischer Schutzwesten sind (Klemm et al. 2006, Klemm et al. 2011). BNC besteht aus etwa 1% Cellulose und 99% Wasser. Die hohe Wasserbindungsfähigkeit macht das Hydrogel sehr formstabil gegenüber Kompression. Im Gegensatz zu pflanzlicher Cellulose ist BNC frei von kontaminierenden Substanzen (z.B. Lignin, Hemicellulose oder Pektin). Außerdem ist die enorme Temperaturbeständigkeit (bis zu 300°C) und damit einfache und kostengünstige Sterilisierbarkeit von großem Vorteil für medizinische Anwendungen (Klemm et al. 2011).

In der Lebensmittelindustrie wird BNC als Inhaltsstoff von Nahrungsergänzungsmitteln verwendet (Shi et al. 2014). Sie ist unverdaulich, gut sättigend und kann Verdauungsenzyme hemmen, die Gallensäuresekretion und Darmperistaltik steigern sowie den Triglyceridspiegel senken (Klemm et al. 2006). Neben den technischen Anwendungsmöglichkeiten, z.B. als Lautsprechermembran, Filterbestandteil für Dialysen oder Verpackungsmaterial (Klemm et al. 2006, Ammon et al. 1995, Cacicedo et al. 2016) wird BNC auch in der Kosmetikindustrie, z.B. in feuchtigkeitsspendenden Gesichtsmasken eingesetzt (z.B. NanoMasque®, FZMB GmbH, Bad Langensalza, Deutschland; Abb. 4, F).

BNC gilt als biokompatibel (Helenius et al. 2006, Torres et al. 2012). Sie besitzt die Fähigkeit zur Gewebsintegration, weist ähnliche mechanische Eigenschaften wie Weichgewebe auf und zeigte bislang weder genotoxisches oder zelltoxisches noch thrombogenes oder hämolytisches Potenzial (Petersen und Gatenholm 2011, Klemm et al. 2011). Darüber hinaus wurden in Tierexperimenten nach Implantation verschiedener BNC-basierter Materialien keine Fremdkörperreaktionen oder chronische Entzündungen bzw. fehlende oder nur geringe inflammatorische Reaktionen beobachtet. Die Implantate zeigten außerdem eine stabile biomechanische Festigkeit bei entsprechender Elastizität (Lang et al. 2015). Das „Kollagen-ähnliche“ Nanofasernetzwerk imitiert die EZM verschiedener Gewebe und die Nanofibrillen stellen eine Leitschiene für Zellen zur Adhäsion, Proliferation und Matrixsynthese dar. Aufgrund dieser Eigenschaften wird bakterielle Nanocellulose als attraktives Material für das Tissue Engineering und den medizinischen Einsatz angesehen (Czaja et al. 2007, Petersen und Gatenholm 2011).

Mittlerweile gibt es eine große Vielfalt an BNC-basierten Materialien für **biomedizinische Applikationen** (Abb. 4; de Oliveira Barud et al. 2016). Zu den ersten klinisch genutzten Medizinprodukten zählen neben Implantaten für parodontale Erkrankungen (Gengiflex®, Fibrocel Produtos Bioteχνologicos, Brasilien; Novaes und Novaes 1992), insbesondere Wundauflagen zur Behandlung von Verbrennungen, Dekubitus und chronischen Ulzera oder als temporärer Hautersatz z.B. nach Spalthauttransplantationen (Czaja et al. 2006, Serafica et al. 2004, Portal et al. 2009), z.B. Cuticell® Epigraft (BSN medical GmbH, Deutschland; Abb. 4, H) oder Suprasorb® X (Lohmann und Rauscher GmbH & Co. KG, Deutschland). Daneben gibt es Wundauflagen mit antimikrobiellen Wirkstoffen (z.B. Suprasorb® X + PHMB, Lohmann und Rauscher GmbH & Co. KG oder CELMAT®, Bowil Biotech, Polen). Mittlerweile existiert sogar ein BNC-Vlies zur Rekonstruktion von Dura-Defekten (SYNTHECEL®; DePuy Synthes, USA; Rosen et al. 2011). Überdies weisen künstlich hergestellte Blutgefäße aus BNC gute rheologische Eigenschaften auf und werden in der mikrochirurgischen Gefäßrekonstruktion angewendet (Abb. 4, D+E; BASYC®, Bacterial-Synthesized Cellulose, Jenpolymer Materials Ltd. & Co KG, Deutschland; Klemm et al. 2001, Wippermann et al. 2009, Scherner et al. 2014).

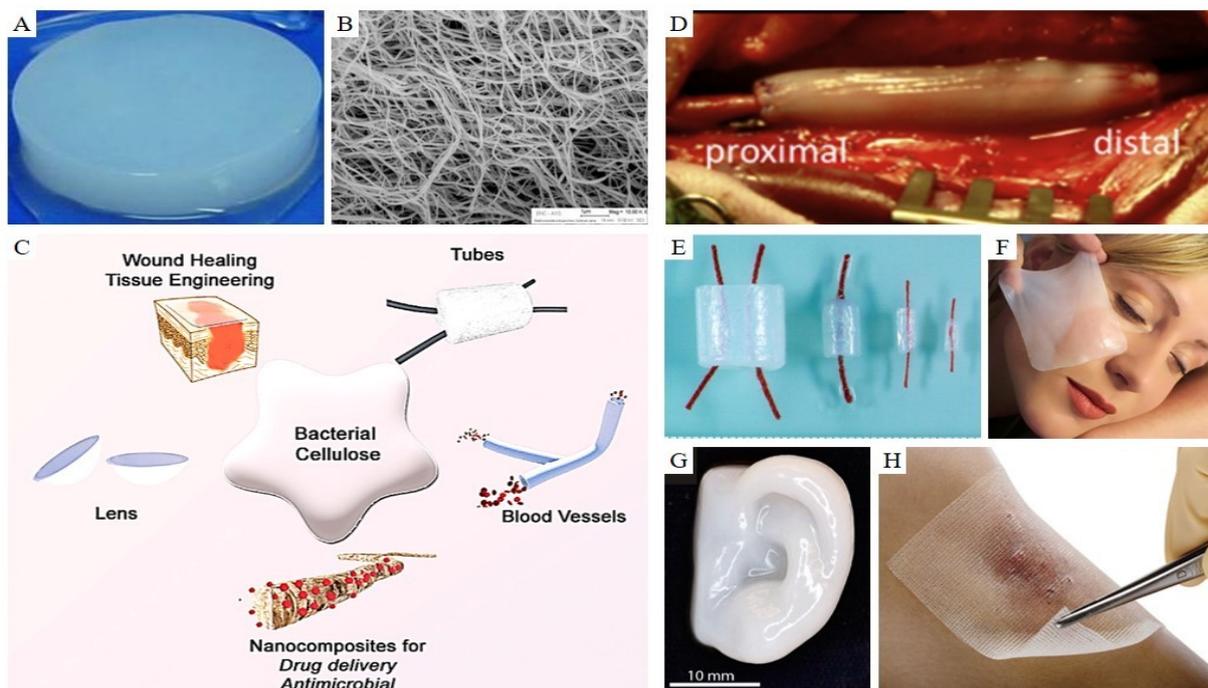


Abb. 4: Überblick über die verschiedenen biomedizinischen Applikationsmöglichkeiten von bakterieller Nanocellulose (BNC).

(A) BNC-Hydrogel und (B) rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Nanofasernetzwerks (Polymet Jena e.V.); (C) schematische Darstellung der verschiedenen Applikationsformen von BNC (de Oliveira Barud et al. 2016); (D) kleinkalibriges Gefäßinterponat der A. carotis im Schaf (Scherner et al. 2014) (E) BASYC®-Tubes für mikrochirurgische Anwendungen (Klemm et al. 2001), (F) hydratisierende Gesichtsmaske (Nanomasque®, fzm GmbH, Deutschland); (G) 3D Bioprinting der Ohrmuschel auf BNC-Basis (Markstedt et al. 2015); (H) CutiCell® Epigraft Wundauflagen (BSN medical, Deutschland).

Letztlich wird BNC als universelles Implantat- oder Kompositmaterial für Knochen- und Bindegewebsdefekte eingesetzt (Grande et al. 2009, Saska et al. 2011). Die biomechanischen Eigenschaften scheinen auch besonders für Meniskus-Rekonstruktionen geeignet (Bodin et al. 2007, Martinez et al. 2012). BNC gilt darüber hinaus als ideales Knorpelersatzgewebe, wie es bereits mehrfach in der Literatur dokumentiert wurde (Svensson et al. 2005, Muller et al. 2006, Andersson et al. 2010, Lopes et al. 2011, Gama 2013).

2.6.2 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose als innovative Knorpelersatzmatrix

Trotz erheblicher Entwicklungsfortschritte erfüllen die momentan zur Verfügung stehenden Matrices zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpelschäden noch nicht alle an sie gestellten Anforderungen. Neben der noch unzureichenden Regeneratqualität und fraglichen mechanischen Stabilität einiger Biomaterialien kann auch ihre Resorbierbarkeit ein entscheidendes Problem sein. Eine asynchrone Geschwindigkeit zwischen Implantatabbau und Knorpelaufbau birgt die Gefahr, ein substanziiell und funktionell minderwertiges, instabiles Regeneratgewebe zu erhalten. Überdies können toxische Abbauprodukte entstehen, die möglicherweise eine Inflammation oder enzymatische Degradation des Reparaturgewebes triggern oder zur inkompletten Integration in den Knorpeldefekt beitragen können.

Die AG Experimentelle Rheumatologie beschäftigte sich daher innerhalb des BMBF-Verbundprojektes „BioInside“ (Bioaktive Implantate zur Reparatur und Regeneration von Defekten des Weichgewebes) mit Experimenten zur Förderung der Regeneration von Knorpeldefekten unter Verwendung eines nichtresorbierbaren Implantates aus bakterieller Nanocellulose (BNC), z.T. unter Zusatz bioaktiver Stoffe. Durch die Nichtresorbierbarkeit des Materials wird ein dauerhaft stützendes Trägergerüst für die Bildung ausreichender Mengen an Regeneratgewebe zur Verfügung gestellt und damit die Auffüllung des Knorpeldefekts mit vollwertigem Knorpelgewebe ermöglicht. Bisherige *in vitro* Untersuchungen ließen einen großen Nutzen dieses zellfreien Trägermaterials hinsichtlich der Förderung der endogenen Knorpelregeneration erkennen, was anhand der Proliferation und chondrozytären Differenzierung von aus dem Knorpel mobilisierten und auf dem BNC-Implantat adhären Zellen belegt werden konnte (Svensson et al. 2005, Linss 2012, Pretzel et al. 2013). Bislang fand jedoch keine dreidimensionale Zellbesiedlung des Cellulosegerüsts statt, weshalb auch die Einlagerung von Matrixbestandteilen im Zentrum des Knorpeldefekts fehlte. Dieses Problem konnte durch die dreidimensionale Modifikation des BNC-Implantats erfolgreich gelöst (Ahrem et al. 2014) und im Rahmen des verbesserten bovinen Knorpelstanzenmodells in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden.

3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Der hyaline Gelenkknorpel besitzt ein begrenztes Selbstheilungspotential, so dass es im Falle einer Schädigung nur selten zu einer wirksamen Reparatur bzw. vollständigen Regeneration kommt. Stattdessen führen degenerativ oder traumatisch bedingte Gelenkknorpeldefekte oft zu einem fortschreitenden Krankheitsbild mit komplettem Verlust des Gelenkknorpels und allen sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Arthrosepatienten (Schmerzen bei der Ausübung alltäglicher Handlungen, gefährdete Sicherung der sozialen Teilhabe, Arbeitsplatzverlust, erforderliche Rehabilitations-Aufenthalte).

Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten ist daher die Entwicklung von hochwertigen Knorpelersatzmaterialien, einerseits zur Förderung der *in situ* Regeneration substanzieller Knorpeldefekte, andererseits zur *ex vivo* Herstellung eines vollwertigen, implantierbaren Gewebersatzes („Tissue Engineering“). Artifizuell hergestellte Matrices sollen die Heilung des Defekts fördern und so die biologischen und biomechanischen Funktionen des Knorpelgewebes wiederherstellen. Dadurch soll ein weiteres Fortschreiten degenerativer Prozesse im angrenzenden Gewebe verhindert und die Wiederherstellung von gesundem, funktionstüchtigem Gelenkknorpel bewirkt werden. Dabei besitzen die bisher angewendeten operativen Methoden zur Therapie von Gelenkknorpeldefekten Vor- und Nachteile durch eine hohe Invasivität des Eingriffs, eine oft zweizeitige Operation sowie ein häufig unbefriedigendes klinisches und histologisches Ergebnis.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines bioaktiven Implantats zur Deckung und Reparatur von Gelenkknorpeldefekten auf der Basis von bakterieller Nanocellulose in einem bereits etablierten *in vitro* Modell (bovines Knorpelstanzenmodell) aus der AG Experimentelle Rheumatologie des Universitätsklinikums Jena. Neben der strukturellen, dreidimensionalen Modifikation des BNC-Implantats (a) wurde auch die Kultivierungszeit von 8 auf 12 Wochen ausgedehnt (b), um die Regeneration von (künstlich generierten) Knorpeldefekten zu optimieren und in einem größeren Zeitfenster beurteilen zu können. Dabei sollte der Einfluss von Serum als rekrutierenden und proliferationsfördernden Faktor analysiert (c) und mögliche Auswirkungen der allogenen Zellbesiedlung des BNC-Implantats (d) auf die Knorpelregeneration erfasst werden.

Das Konzept der *in vitro* Regeneration von Gelenkknorpeldefekten mithilfe von modifizierter bakterieller Nanocellulose diente dabei zur Untersuchung der prinzipiellen Eignung der Implantat-Typen (zellfreie bzw. zellbesiedelte 3D-modifizierte BNC) als Knorpelersatzmatrix und sollte grundlegende Ergebnisse für anschließende *in vivo*-Testungen liefern.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Ausführliche Liste der verwendeten Geräte

Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	Biopsiestanzen
BINDER, Tuttlingen, Deutschland	Wärmeschrank
Biometra GmbH Göttingen, Deutschland	Mini-Hybridisierungsöfen mit Rotor (1993)
Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland	Pipettierhilfe „accu-jet“
Canon GmbH, Krefeld, Deutschland	Digitalkamera Canon PowerShot A640
EM Technologies Ltd., Ashford, England	EMITECH K500 Sputter-Coater EMITECH K850 Kritischpunkttrockner
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Multikanalpipette Transferpipetten (verschiedene Größen) Zentrifuge „5810R“ Mikrozentrifuge „5415D“ „MiniSpin“-Zentrifuge
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Magnetrührer „MR 3001“ Taumeltisch „Polymax 1040“ Thermoschüttler „Unimax 1010“
Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland	Trockenschrank T6120
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland	HERAcell® Brutschrank für Zell- und Gewebeulturen
Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Wasserbad Trockenschrank ULE 500
Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland	MP 220 pH-Meter
Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland	HM 355 S Rotationsmikrotom HM 500 M Kryostat-Mikrotom
Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA	Cellometer® Auto T4
Philips Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	XL-30 ESEM Rasterelektronenmikroskop
Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Waagen „KB BA 100“/„BP 211D“/„BL 600“

Schubert & Weiss GmbH, München, Deutschland	steriles Sektionsbesteck (Skalpell, chirurgische/ anatomische Pinzette, spitze Schere)
Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA	Vortexer „Vortex Genie 2“
Scotsman Ice System - Frimont S.P.A., Mailand, Italien	Flockeneisbereiter AF80
Systemc GmbH, Wettenberg, Deutschland	Autoklav Systemc V-120
Thermo Shandon Electron Corporation, Waltham, MA, USA	Gewebeeinbettautomat „Citadel 1000“
Wheaton Science Product, Millville, NJ, USA	Spinnerflasche
Zeiss AG, Jena, Deutschland	Mikroskop „Axiophot“ Mikroskop „Axiovert 25“ Digitalkamera „AxioCam HRc“ Software „AxioVision 3.1 + 4.0“

4.2 Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel

Acris, Bad Nauheim, Deutschland	monoklonaler Maus-anti-Human/Bovine - Kollagen I-Antikörper monoklonaler Maus-anti-Human/Bovine - Kollagen II-Antikörper
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	ITS™ Premix Universal Culture Supplement 15 ml/50 ml Röhrechen (BD Falcon™) 6-, 24- und 48-Loch-Mikrotiterplatten Zellkulturflaschen 75-225 cm ² (BD Falcon™) Zellkulturschalen (verschiedene Größen)
Biowhittaker, Walkersville, MN, USA	Fötale Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert)
DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Dako Pen HRP-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-AK (Sekundäntikörper) Kaninchenserum Maus IgG1-Antikörper Proteinase K Ziegenserum AP-konjugierter Ziege-anti-Maus-AK (Sekundäntikörper)
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Reaktionsgefäße (0,5 - 2ml)
Fresenius Kabi Deutschland,	Ampuwa - Aqua inject.

Bad Homburg, Deutschland	NaCl-Spül-Lösung, 0,9 %
GeneTex Inc., Irvine, CA, USA	monoklonaler Maus-anti-Human/Bovin - Aggrekan-Antikörper
Gibco Invitrogen Corp., Karlsruhe, Deutschland	DMEM/Nutmix F12 (1:1) Gentamycin (50 µg/ml) Trypsin Versene
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	sterile Einmalpipetten „Cellstar™“
Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland	Eosin-Lösung Hämatoxylin-Lösung (nach Mayer) Lichtgrün-Lösung Safranin-O-Lösung
Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland	Deckgläschen 24 x 50 mm Objektträger Silan-beschichtet Adhäsionsobjektträger SuperFrost® Plus
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Ameisensäure Aquatex® Guanidiniumhydrochlorid Hemacolor® (Eosin-Lösung) Kanadabalsam <i>para</i> -Formaldehyd Tween 20
Miles Inc., Elkhart, IN, USA	Tissue Tek Formen Cryomold® (1x1 cm)
Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland	Amicon Ultra 0,5 ml Zentrifugalfilter- einheiten MWCO 3000
QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	Proteinase K RNeasy Micro Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Kollagenase P
Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Azeton Äthanol, reinst (96%) Dimethylsulfoxid (DMSO) Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) Xylol
Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande	Tissue Tek® O.C.T.™ Einbettmedium Tissue Tek® III Unikasetten
Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	HRP-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-AK (Sekundäntikörper)

**Sigma-Aldrich AG,
Taufkirchen, Deutschland**

Agarose (Low melting point Agarose)
Chondroitinase ABC
Pepsin
Pronase E
Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten
Sigma Fast™ FastRed TR/Naphtol AS-MX-
Tabletten

4.3 Ausführliche Liste der verwendeten Medien und Lösungen

Chondrozytenmedium:	DMEM/F12 + 5% FCS (v/v; hitzeinaktiviert) + Gentamycin (100 µg/ml)
Glutaraldehyd-Lösung (2 %)	92 ml 0,2 M Cacodylat-Pufferlösung, pH 7.2 (42,806 g Cacodylatsalz in 1000 ml Wasser) + 8 ml 25%-ige Glutaraldehydlösung
Lysis-Puffer für RNA-Isolation:	RLT-Puffer (aus RNeasy® MicroKit) + 1% Mercaptoethanol
Medium für Knorpelstanzenassay:	DMEM/F12 + 5% FCS (v/v; hitzeinaktiviert) + Gentamycin (100 µg/ml) + ITS-Supplement (1:1000 verdünnt) (entspricht 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Selensäure)
„Vorkultur“-Medium der zellfreien Knorpel-BNC-Proben:	DMEM/F12 + Gentamycin (100 µg/ml) + ITS-Supplement (1:1000 verdünnt) (entspricht 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Selensäure)
Phosphate-buffered saline (PBS):	137 mM NaCl; 2,68 mM KCL; 8,09 mM Na ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Tris-buffered saline (TBS):	0,05 M Tris-HCL, 0,15 M NaCl, pH 7,6
Trypsin-Lösung (0,25% v/v):	Trypsin (2,5%) 1:10 in Versene verdünnt

4.4 Gewinnung bovinen Knorpelmaterials

4.4.1 Präparation bovinen Knorpelmaterials zur Chondrozytenisolierung

Das gesamte in diesem Versuchsvorhaben verwendete bovine Knorpelmaterial stammte aus den Kniegelenken von zwei- bis dreijährigen Rindern der Rasse „Schwarzbunte“, die wöchentlich von der ortsansässigen Agrargenossenschaftsfleischerei Buchheim Crossen e.G. in Walpernhain bezogen wurden.

Zur späteren Isolierung boviner Chondrozyten wurde das gesamte Knorpelmaterial aus einem gesunden Knie eines adulten Tieres entnommen. Nachdem kontaminationsgefährdende Probleme wie eine eröffnete Gelenkhöhle oder beschädigte Gelenkstrukturen makroskopisch und palpatorisch weitgehend ausgeschlossen werden konnten, wurde der distale Femurschaft zunächst von Muskelgewebe befreit, fest in einem Kettenschraubstock eingespannt (Abb. 5, A) und das gesamte Präparationsgebiet sorgfältig mit 70%-igem, unvergälltem Ethanol benetzt. Dann wurde das Kniegelenk unter sterilen Bedingungen eröffnet (Abb. 5, A-C).

Zuerst wurden die lateralen Bandstrukturen (*Ligg. collaterale laterale et mediale*) längs inzidiert und danach das femoral anhaftende Weichgewebe (distale Anteile des M. quadriceps femoris) quer inzidiert (Abb. 5, B). Anschließend wurde die freipräparierte Gelenkkapsel auf Höhe des *Recessus suprapatellaris* inzidiert, woraufhin synoviale Flüssigkeit austrat. Nach fortlaufender Durchtrennung der Gelenkkapsel entlang der *Trochlea ossis femoris* mit Durchtrennung der *Ligg. femoropatellare mediale et laterale* konnte schließlich die Patella gelockert und mitsamt dem umgebenden Gewebe in tibialer Richtung vom Gelenkspalt abgehoben (Abb. 5, C) und durch finale Inzision der Ligamenta patellae (*Ligg. patellae mediale, laterale et intermedium*) abgelöst werden. Überschüssige Strukturen von Menisken und Kreuzbändern wurden weitestgehend entfernt und somit die *Facies patellaris femoris* für die folgende Knorpelabtragung frei zugänglich präpariert.

Dann wurden mittels eines Skalpell Knorpelflocken von der Oberfläche der *Facies patellaris femoris* abgetragen (Abb. 5, D), wobei die Randbereiche sowie der mittlere Bezirk der Gelenkfläche ausgespart blieben (Abb. 5, E). Damit sollte eine Kontamination mit synovialen Fibroblasten oder der Erwerb minderwertigen, fibrösen Knorpelgewebes verhindert und schließlich rein nativer, hyaliner Knorpel geerntet werden. Die Gewebeflocken wurden in sterilem PBS aufgefangen (Abb. 5, F), abzüglich dieser Pufferlösung gewogen und anschließend einem Verdauungsprozess unterzogen.

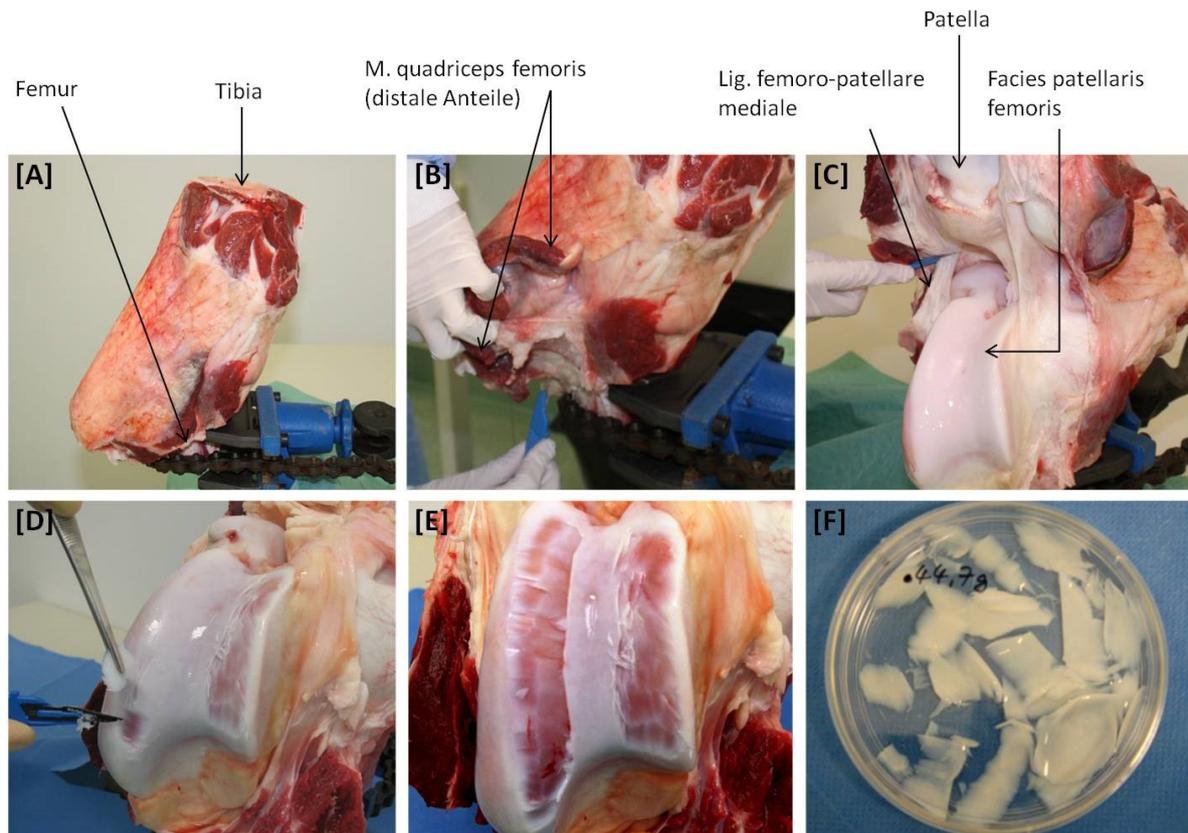


Abb. 5: Eröffnung eines Rinderkniegelenks und Präparation von bovinem Knorpelmaterial zur anschließenden Chondrozytenisolierung.

[A] Das mit einem Weichteilmantel umgebene Kniegelenk wurde am distalen Femur eingespannt; [B] Längs- und Querinzision des Weichgewebes am distalen M. Quadrizeps-Ansatz sowie Inzision der Gelenkkapsel im Bereich des Recessus suprapatellaris; [C] fortlaufende Eröffnung der Gelenkkapsel entlang der Trochlea und Anheben der Patella; [D] Abschälen des Knorpels von der subchondralen Knochenplatte der freigelegten Facies patellaris femoris unter Aussparung der mittleren und seitlichen Bereiche [E]; Lagern der geernteten Knorpelstücke in sterilem PBS [F].

4.4.2 Isolierung und Kultivierung boviner Chondrozyten

Um eine ausreichende Menge an bovinen Chondrozyten für die spätere Implantatbesiedlung zu erhalten, mussten die geernteten Knorpelgewebeproben einer sorgfältigen Zellisolation und anschließenden Monolayer-Kultivierung unterzogen werden.

Unter der sterilen Werkbank wurden die mehrfach in PBS gewaschenen Knorpelflocken zunächst unter Verwendung von Pinzette, Schere und Skalpell zerkleinert und in ein Verdaugefäß (Spinnerflasche) überführt. Für den ersten Verdauungsschritt wurde serumfreies Medium (DMEM/F12) mit 1 mg/ml Pronase E versetzt, steril filtriert und darin das Knorpelmaterial für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dem anschließenden Absaugen des Mediums wurden die Gewebestücke dreimal gewaschen, um das Enzym restlos zu entfernen. Im zweiten Schritt erfolgte ein Verdauung der Knorpelflocken über Nacht (ü. N.) in

serumhaltigem Medium (DMEM/F12 + 5% FCS) unter Einsatz von Kollagenase P (0,1 mg/ml).

Alle Verdauschritte wurden unter kontinuierlicher Durchmischung mittels Magnetrührer im Inkubator durchgeführt. Sie dienten dem Aufschluss von Matrixproteinen und somit dem erfolgreichen Lösen der Chondrozyten aus ihrem festen Gewebeverband.

Die entstandene milchig-trübe Lösung wurde am nächsten Tag in ein 50 ml Röhrchen (BD Falcon™) überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde vorsichtig vom Überstand befreit und wiederholt mit PBS gewaschen. Nach der 3. Waschung und Zentrifugation wurde das Zellmaterial schließlich in Chondrozytenmedium resuspendiert. Insgesamt 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau (Lebend-/Todbestimmung) versetzt, mittels Pipette in eine Einmalzählkammer gefüllt und die erhaltene Zahl lebender Zellen mit Hilfe eines Cellometers® automatisch bestimmt. Aus 3,8 g geernteten Knorpelflocken wurde letztlich eine Ausbeute von 4×10^7 Zellen erzielt. Schließlich wurden die Chondrozyten in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² in Kulturflaschen ausgesät, über 24 h primär adhärent und dann unter Zugabe von Chondrozytenmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator weiter kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche.

Nach 5 bis 6 Tagen konnte die Primärkultur der Knorpelzellen (P0) bei einer Konfluenz von ca. 95% passagiert bzw. asserviert werden. Mittels einer Trypsinlösung (0,25% v/v in Versene verdünnt) wurden dabei die zuvor mehrfach mit PBS gewaschenen Zellkulturen vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Neben dem mikroskopischen Ausschluss adhärenter Zellen zeigte sich auch makroskopisch nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min die Bildung eines „weißen Schleiers“ als Ausdruck gelöster Zellen innerhalb der Enzymlösung. Dann wurde das in der Lösung befindliche Enzym durch Zugabe einer 10%-igen FCS/PBS-Lösung neutralisiert. Das gesamte zellhaltige Gemisch wurde anschließend mittels Glaspipette aspiriert und nach Überführung in ein 50 ml Reagenzgefäß (BD Falcon™) zentrifugiert. Nach einem dreifachen Waschschrift in FCS/PBS-Lösung unter zwischenzeitig dreiminütigem Zentrifugieren bei 1200 rpm und 24°C erfolgte die Resuspension des Zellpellets in FCS mit 10% DMSO. In dieser Lösung konnte die Primärkultur in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung für die bevorstehenden Implantatbesiedlungen kryokonserviert werden.

4.4.3 Präparation bovinen Knorpelmaterials zur Stanzengewinnung

Die Präparation der insgesamt 28 Rinderkniegelenke, die zur Gewinnung der erforderlichen Knorpelstanzen benötigt wurden, erfolgte stets am Tag der Schlachtung (siehe Abb. 5, A-C). Aufgrund der im Vergleich zu anderen Bereichen des Kniegelenks relativ planen, gut überschaubaren und erfahrungsgemäß meist intakten Gesamtfläche erwies sich die *Facies patellaris femoris* als eine geeignete Region zur Entnahme zahlreicher Knorpelstanzen. Unter Verwendung verschiedener steriler Metallstanzen und eines chirurgischen Messers wurden bovine Knorpelstanzen mit einem definierten Außendurchmesser von 6 mm und einem zentralen Defekt von 2 mm Durchmesser sowie einer Höhe von ca. 1-1,5 mm wie folgt gewonnen (Abb. 6):

In den hyalinen Knorpel wurden - wiederum unter Aussparung der Randbereiche und der mittleren Zone der *Facies patellaris femoris* - zunächst mittels einer Metallstanze kreisrunde Defekte mit einem Durchmesser von 6 mm vorgestempelt (Abb. 6, A). In deren Mitte wurde danach mittels einer Stanze mit einem Durchmesser von 2 mm ein weiterer Defekt eingebracht (Abb. 6, B). Unter Einsatz eines Skalpell ließ sich anschließend der hyaline Knorpel von der kalzifizierten Knorpelschicht lösen (Abb. 6, C). Nun konnten die zentralen Defekte mit Hilfe der zuletzt verwendeten Stanze (Ø 2 mm) endgültig ausgestanzt und die Knorpelstanzen in der größeren Stanze (Ø 6 mm) aufgenommen werden (Abb. 6, D, E). Um ein Eintrocknen des Knorpelgewebes während der Präparation zu verhindern, wurde die Oberfläche stets mit steriler Kochsalzspüllösung befeuchtet. Mit dieser Methode konnten insgesamt 60 bis 70 Knorpelstanzen pro Rinderknie gewonnen werden. Diese wurden in Knorpelmedium ohne FCS (DMEM/ F12) überführt (Abb. 6, F) und bis zur weiteren Verarbeitung für maximal 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt. Die strikte Einhaltung eines möglichst zeitigen Kultivierungsbeginns nach Präparation sollte dabei sowohl die Kontaminationsgefahr minimieren als auch Gewebeveränderungen durch den abrupten Milieuwechsel begrenzen.

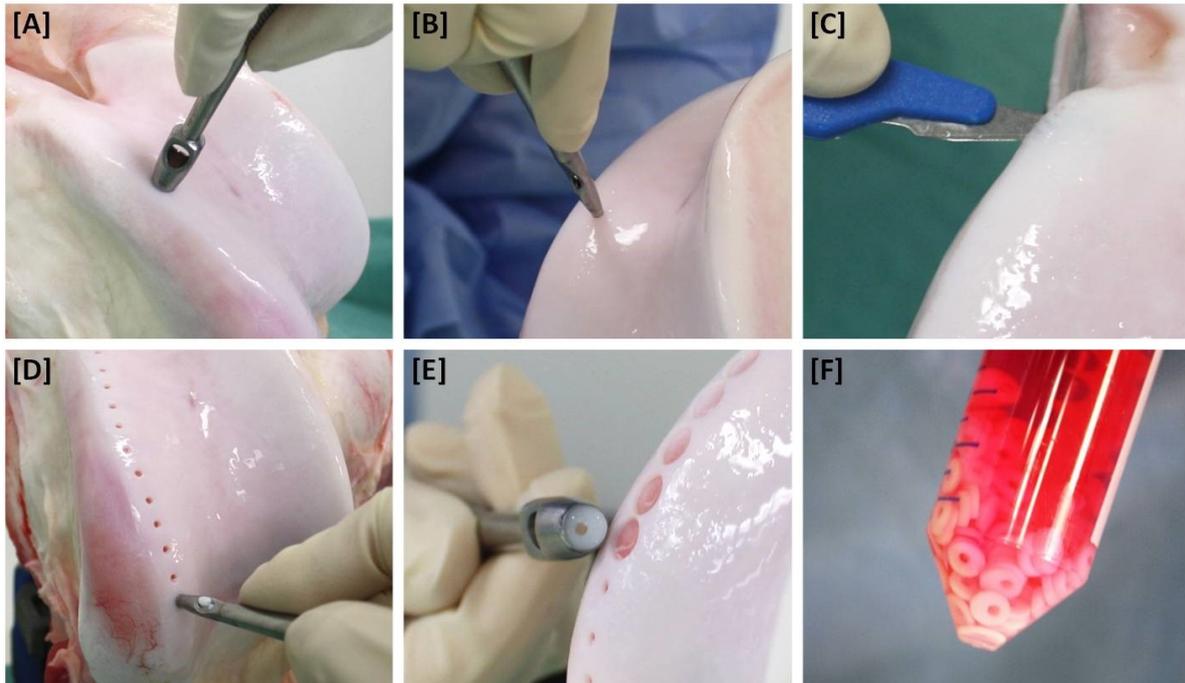


Abb. 6: Präparation von bovinem Knorpelmaterial zur Stanzenengewinnung.

Im Bereich der Facies patellaris femoris wurden mittels einer Biopsiestanze (\varnothing 6 mm) kreisrunde Scheiben in den hyalinen Knorpel vorgestanzt [A] und in deren Mitte jeweils ein Defekt (\varnothing 2 mm) mit einer weiteren Metallstanze gesetzt [B]. In einer Tiefe von 1 – 1,5 mm wurde anschließend der hyaline Knorpel mittels Skalpell von der kalzifizierten Knorpelschicht gelöst [C]. Zum Entfernen der Defektzylinder wurde wiederum die kleine Metallstanze verwendet [D]. Zuletzt wurden die Knorpelscheiben mittels der 6 mm - Biopsiestanze aufgenommen [E] und bis zur weiteren Verarbeitung in sterilem Medium (DMEM/F12 + ITS-Supplement) asserviert [F].

4.5 Implantatherstellung und Vorbehandlung

4.5.1 Herstellung 3D-lasermodifizierter BNC-Zylinder

Die Herstellung und Modifizierung der eigens für das *In vitro*-Modell benötigten BNC-Implantate erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG und der Günter-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH (beide in Jena ansässig).

Das von der Firma Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG zur Verfügung gestellte Biomaterial aus bakterieller Nanocellulose fand bereits in vielen Experimenten der AG *Experimentelle Rheumatologie* Verwendung und sollte nun auch in diesem Vorhaben als Knorpelersatzmatrix für die nachfolgende Modifikation und Kultivierung dienen. Um eine ausreichende Anzahl von passgenau 3D-modifizierten BNC-Implantaten (in dieser Arbeit fortan ebenfalls als „Inserts“ bezeichnet) für die Defektfüllung der Knorpelstanzen zu erhalten, wurden vorab etliche BNC-Hydrogele bereitgestellt, die unter statischer Kultivierung in 6 Well-Platten synthetisiert worden waren. Diese kreisrunden Cellulose-Vliese maßen im Durchmesser 35

mm und erreichten über eine Kultivierungszeit von zwei Wochen in einem Glucose-haltigem Nährmedium (Schramm & Hestrin) eine Materialhöhe von 5,5 – 6,5 mm. Der anschließende Zuschnitt des BNC-Materials in Form von dreidimensional perforierten Zylindern erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Günter-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH. Mit Hilfe eines Scanner-gekoppelten CO₂-Puls-Laser-Systems (Rofin SCx10; Rofin Laser GmbH, Hamburg, Deutschland); (Scanner: Laser Design GmbH; custom design) konnten in Größe und Form definierte, modifizierte BNC-Inserts wie folgt hergestellt werden (siehe hierzu schematische Darstellung in Abb. 7):

In das auf einem festen Agarosebett gelagerte BNC-Vlies wurden in einem Bereich von 24 x 24 mm senkrecht zur Oberfläche verlaufende und das gesamte Hydrogel durchdringende kreisrunde Kanäle mit einem mittleren Durchmesser von 200 µm und einem Kanalabstand von 600 µm generiert. Aufgrund der möglichen Korrosion von Glas unter der durch den Laserstrahl entstehenden Hitze musste ein verformbares und zugleich stabiles Material zur Lagerung der BNC herangezogen werden, wobei Agarose eine geeignete Substanz darstellte.

Der anfangs rasterförmigen Laserperforation folgte eine fortlaufende Lasereinstellung, mit der 3 x 3 Quader mit einer Grundfläche von je 8 x 8 mm zugeschnitten wurden, um letztlich 9 eindimensional kanalisierte, 8 x 8 x 5,5 – 6,5 mm messende Quader zu erhalten. Um eine weitere vertikal verlaufende Laserperforation zu ermöglichen, mussten die Quader zunächst mittels Pinzette manuell aufgestellt werden. Nach nochmaligem Wenden der Quader gelang schließlich die Kanalisierung des Cellulose-Materials in der dritten Raumdimension. Die aufgestellte BNC-Matrix zeigte dabei auch nach der 3. Perforation eine solide Konsistenz und kontinuierliche Stabilität. Im Folgenden galt es, aus den dreidimensional kanalisierten BNC-Quadern definierte Zylinder mit einer Höhe von 2 mm und einem Durchmesser von 2,7 mm anzufertigen. Dazu wurden zunächst zwei längs verlaufende Schnitte in einem Abstand von 2 mm mittig der noch hochkant gestellten Quader gezogen. Von den so entstandenen drei quadratischen Scheiben mussten die äußeren aufgrund von Deformationen entfernt werden. Diese Verformungen entstehen natürlicherweise durch die hitzebedingten Einwirkungen des abgegebenen Laserstrahls im Sinne eines „Ausbrennens“ des Gewebes und Verkochens des enthaltenen Wassers. Durch den allseitig lasergestützten Zuschnitt wurde außerdem gewährleistet, dass die durch die Kultivierung vorgegebene natürliche obere und untere Oberfläche des BNC-Hydrogels nicht in den finalen Proben enthalten war. Aus der schließlich flach auf das Agarosegel gelegten, allseits laserbehandelten BNC-Scheibe konnten in einem letzten Schritt 4 kreisrunde Zylinder mit einem Durchmesser von 2,7 mm und einer

Höhe von 2 mm lasergestützt ausgeschnitten werden. Mittels einer feinen Pinzette wurden diese Zylinder in PBS aufgefangen und anschließend für 20 Minuten in einer 2 M NaOH-Lösung bei 121°C in einem Autoklav aufgereinigt, um residente Erreger und laserbedingte Verunreinigungen zu beseitigen. Danach erfolgten mehrere Waschschrte in pyrogen-freiem Wasser bis zum Erreichen eines neutralen pH-Werts und anschließend die Lagerung der Inserts bis zur weiteren Verwendung.

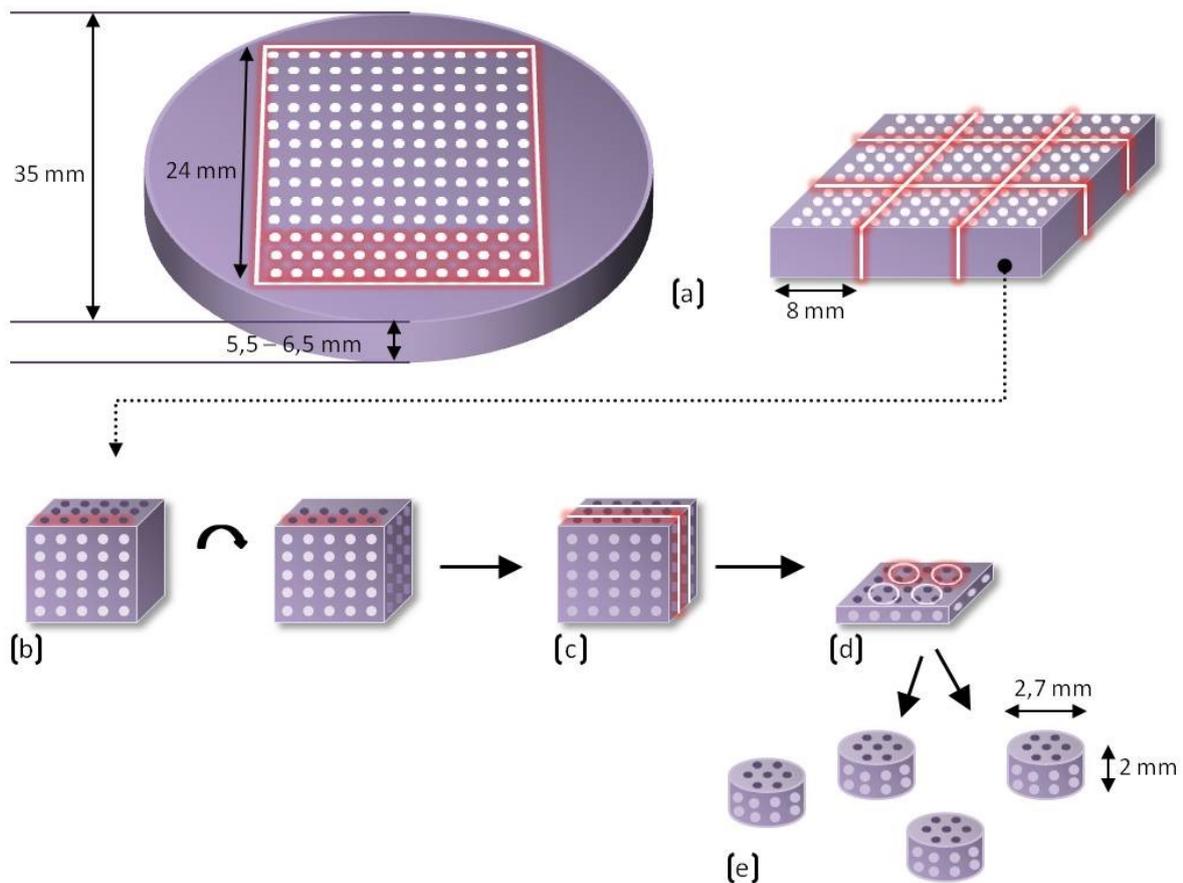


Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung 3D-lasermodifizierter BNC-Zylinder.

a) Aus dem nativen Gerüst von zuvor in 6 Well-Platten kultivierten BNC-Vliesen ($\text{\O} 35 \text{ mm}$) mit einer Materialstärke von 5,5 - 6,5 mm wurden innerhalb eines 24 x 24 mm großen Bereichs senkrecht verlaufende Hohlräume ($\text{\O} 200 \text{ }\mu\text{m}$) lasergestützt generiert und anschließend 3 x 3 Quader mit einer Grundfläche von je 8 x 8 mm ausgeschnitten; b) Aufrichten und Wenden der erhaltenen Quader, um jeweils die lasergestützte Perforation in der zweiten und dritten Ebene durchzuführen; c) mittels zweier Längsschnitte wurde eine quadratische Scheibe von 2 mm Höhe aus der Mitte des dreidimensional perforierten Quaders gewonnen; d) Ausschneiden von vier kreisförmigen Zylindern aus der Scheibe; e) Herauslösen von allseitig lasermodifizierten BNC-Zylindern mit definierten Maßen ($\text{\O} 2,7 \text{ mm}$, $h = 2 \text{ mm}$) und anschließende Reinigung. Aus einem in einer 6 Well-Platte biosynthetisierten BNC-Hydrogel ließen sich somit 36 Zylinder herstellen.



Abb. 8: Fertiggestellte BNC-Zylinder nach Aufreinigung (ca. 500 Stück).

Mit freundlicher Unterstützung der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG sowie der Günther-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH.

4.5.2 Zellfreie 3D-modifizierte BNC-Zylinder

Ein Großteil der modifizierten BNC-Zylinder wurde für bovine Knorpelstanzen eingesetzt, in deren Defekte *zellfreie*, modifizierte BNC-Implantate eingebracht wurden. Hierbei sollte der Einfluss von Serum auf die Regenerationsergebnisse untersucht werden, so dass eine Aufteilung in zwei zellfreie Ansätze erforderlich war, wobei die Implantate einerseits *mit Serum* und andererseits *ohne Serum* vorinkubiert und anschließend implantiert wurden.

Für den „serumfreien“ Ansatz (ZF-) wurden zellfreie Inserts vor der geplanten Implantation zunächst für 24 h in FCS-freiem Knorpelmedium (DMEM/F12, Gentamycin 1 %, ITS-Supplement 1:1000) bei Raumtemperatur äquilibriert. Dieser Vorgang diente dem Auswaschen der H₂O-Lagerlösung aus der Nanocellulose (Abb. 9, linke Säule). In Vorbereitung auf den „serumhaltigen“ Ansatz (ZF+) wurden vor jedem Präparationstermin jeweils 60 BNC-Zylinder in ein 15 ml Röhrchen (BD Falcon™) überführt, das mit 100%igem FCS (hitzeinaktiviert) gefüllt war (Abb. 9, mittlere Säule). Die Inkubation begann ebenfalls 24 Stunden vor Probenanfertigung und erfolgte bei Raumtemperatur unter ständigen Schwenkbewegungen mittels Taumeltisch. Somit konnte eine optimale Beladung des Nanocellulose-Gerüsts mit FCS gewährleistet werden. Nach Vorbereitung der 3D-modifizierten BNC-Implantate erfolgte am nächsten Tag unter strikter Einhaltung der Sterilität die Anfertigung der Knorpel-BNC-Regenerate entsprechend dem *In vitro*-Modell.

4.5.3 Zellbesiedlung 3D-modifizierter BNC-Zylinder

Die Besiedlung der 3D-modifizierten BNC-Zylinder mit bovinen Chondrozyten und die sich daran anschließende Auffüllung von Knorpeldefekten boviner Knorpelimplantate erfolgten in Anlehnung an die klinisch genutzte, matrixgestützte allogene Zelltransplantation.

Als Quelle boviner Chondrozyten diente hierbei ein gesundes adultes Rinderknie, dessen Knorpelmaterial gemäß 4.4.1 gewonnen und gemäß 4.4.2 zur Zellisolierung genutzt wurde. Die in Flüssigstickstoff unter Frostschutz asservierten Knorpelzellen standen dann nach dem Auftauen der Zellen in mehreren Chargen für das folgende *in-vitro*-Modell zur Verfügung.

Um eine optimale Besiedlung der modifizierten BNC-Zylinder zu gewährleisten, galt es zunächst vor der eigentlichen Knorpel-BNC-Kultivierung eine hinreichende Menge von bovinen Zellen zu erhalten (mindestens $1,2 \times 10^7$). Somit wurden bereits 10 Tage vor Kulturansatz die Chondrozyten einer Zellcharge aufgetaut, in Monolayer kultiviert und nach der insgesamt 2. Passage für die Besiedlung der modifizierten BNC-Zylinder eingesetzt.

Für eine Versuchsreihe des „zellbesiedelten“ Ansatzes (ZB) wurden 120 modifizierte BNC-Implantate herangezogen. Ähnlich der Vorgehensweise zur Vorbereitung des *zellfreien Ansatzes mit Serumvorinkubation* musste die H₂O-Lagerlösung zunächst gegen FCS ausgetauscht werden (Abb. 9, rechte Säule). Dafür wurden die BNC-Zylinder 2 Tage vor Implantation für 24 h unter Schwenkbewegungen und bei Raumtemperatur in einem Falcon™-Röhrchen mit 30 ml 100%-igem FCS äquilibriert. Anschließend wurden jeweils 20 Inserts in ein Kryoröhrchen deponiert und 2 ml einer Chondrozytensuspension mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml hinzugefügt. Alle 6 Kryoröhrchen wurden dann gut verschlossen für 2 h auf einen Rotor montiert und bei 37°C fortlaufend kreisenden Bewegungen ausgesetzt (ca. 10 Umdrehungen pro Minute). Die somit unter Luftverschluss dynamisch besiedelten BNC-Inserts wurden anschließend unter der sterilen Werkbank vorsichtig in einer mit Agarose beschichteten Petrischale aufgefangen. Nach Zugabe der überschüssigen Zellsuspension aus den sechs Kryoröhrchen erfolgte nun eine statische Besiedlung über Nacht (22 h) bei 37°C und 5% CO₂. Am nächsten Tag konnten -nach mikroskopischer Überprüfung des Besiedlungserfolgs- die dreidimensional-zellbesiedelten BNC-Zylinder für die anschließende Implantation in bovine Knorpelstanzen eingesetzt werden.

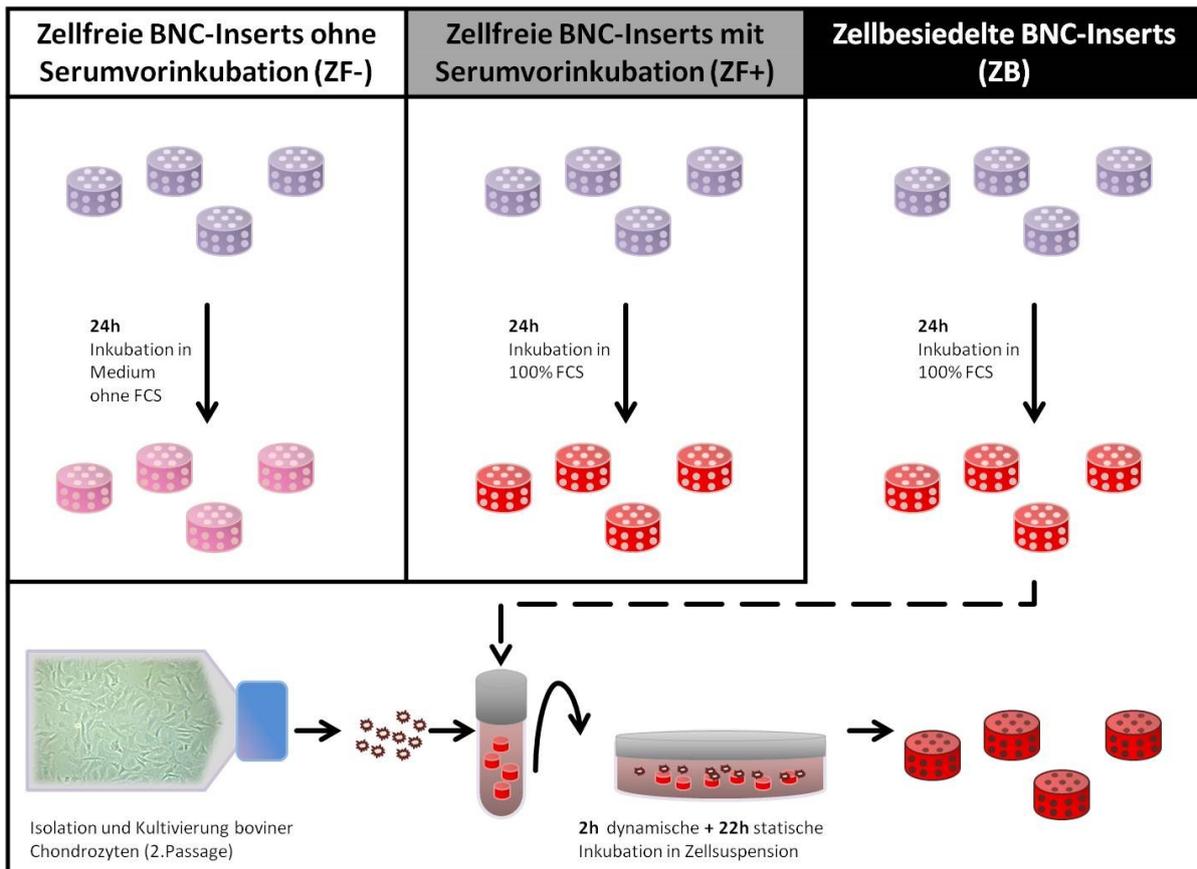


Abb. 9: Vorbehandlung der 3D-modifizierten BNC-Zylinder zur anschließenden Verwendung in den verschiedenen Kultivierungs-Ansätzen (schematische Darstellung).

Für den Ansatz mit zellfreien, nicht serumhaltigen Implantaten (**ZF-**) wurden die BNC-Zylinder über 24 h in serumfreiem Kulturmedium gelagert. Die zellfreien, mit Serum beladenen BNC-Inserts des zweiten Ansatzes (**ZF+**) wurden für 24 h in 100% FCS inkubiert. Für den dritten Ansatz (**ZB**) mussten die BNC-Proben zunächst ebenso für 24 h in 100% Serum überführt werden. Hiernach erfolgte die dreidimensionale Besiedlung mittels einer Zellsuspension aus bovinen Chondrozyten (1×10^6 Zellen/ml) in einer anfangs dynamischen Phase für 2 h gefolgt von einer statischen Besiedlungsphase über weitere 22 h.

4.6 In vitro-Regenerationsassay mit 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose

4.6.1 Vorbereitung der Multiwellplatten

Die Vorbereitung der für die Knorpel-BNC-Konstrukte benötigten 48-Loch-Platten entsprach einem in der AG Experimentelle Rheumatologie für das Knorpelstanzenmodell etablierten Protokoll (Linss 2012). Insgesamt 300 ml einer 2%-igen heißen Agaroseflüssigkeit (bestehend aus PBS und DMEM im Verhältnis 1:2) wurden mittels Multipipette in je ein Loch einer 48-Well-Platte gegeben. Nach dem Auflegen eines passgenauen Lochdeckels konnte nun ein Stanzenbrett zentral in die noch heiße Flüssigkeit eingetaucht und bis zur vollständigen Polymerisation der Agarose arretiert werden. Die Metallstifte dienten auf diese Weise als eine Art Stempel zur Bildung von zylinderförmigen Aussparungen im Agarosebett, die einen Durchmesser von 6 mm aufwiesen. Um ein Eintrocknen der Agarose zu umgehen,

wurden die Platten innerhalb weniger Stunden mit den Knorpelstanzen bestückt und mit Medium gefüllt.

4.6.2 Herstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte

Die Herstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte erfolgte etappenweise jeweils am Tag der Rinderschlachtung. Dabei konnte aus den 60 bis 70 gewonnenen Knorpelstanzen pro Knie ein Zeitpunkt für die beiden **zellfreien Ansätze (ZF-, ZF+)** angefertigt werden. Die parallele Bestückung der aus einem Knie präparierten Knorpelstanzen mit sowohl serumbeladenen als auch serumfreien BNC-Implantaten sollte eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Ansätze innerhalb eines Zeitpunktes bezwecken. Somit war es für die zellfreien Ansätze unumgänglich, mehrere Rinderkniegelenke von verschiedenen adulten Tieren für die Anfertigung einer Versuchsreihe, bestehend aus insgesamt 6 Zeitpunkten, heranzuziehen.

Um konstante Ausgangswerte in Hinblick auf die besiedelten BNC-Zylinder zu garantieren (Verwendung ausschließlich einer Zellcharge), wurde für eine Versuchsreihe des **zellhaltigen Ansatzes (ZB)** ein Knorpelstanzenpool aus den zwei Kniegelenken eines Rindes herangezogen und somit die Proben für alle Zeitpunkte gleichzeitig bestückt. Die Präparation der Knorpelstanzen sowie die Herstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte wurde unmittelbar postmortem in einem Zeitraum von maximal 10 h nach der Schlachtung durchgeführt.

Unter der sterilen Werkbank erfolgte die Bestückung der Knorpelstanzen mit 3D-lasermodifizierten BNC-Zylindern, die speziell für das *in-vitro*-Modell entsprechend 4.5.1 angefertigt und gemäß 4.5.2 und 4.5.3 für die Einteilung in drei Ansätze vorbereitet wurden (Abb. 10). Mittels feiner steriler Pinzetten konnten die Inserts (Durchmesser 2,7 mm) exakt in den 2 mm großen Defekt einpasst werden. Dabei ermöglichte der größere Durchmesser der wasserhaltigen Implantatzylinder eine bessere initiale Haftung innerhalb des Knorpelringes, wobei Voruntersuchungen belegten, dass auch nach vollständigem Requellen des Cellulosegerüsts im Knorpeldefekt die dreidimensional verlaufenden Kanäle stets offenblieben. Die angefertigten Knorpel-BNC-Konstrukte wurden jeweils vorsichtig in die vorgefertigten Agarosezylinder einer 48-Loch-Platte gesetzt und mit Hilfe einer Pinzette stempelähnlich am Boden der Vertiefung arretiert (Abb. 10, B). Schließlich konnte nach Zugabe von 800 µl Knorpelmedium pro Well (Abb. 10, C) die *in vitro* - Kultivierung entsprechend des Versuchsdesigns beginnen.

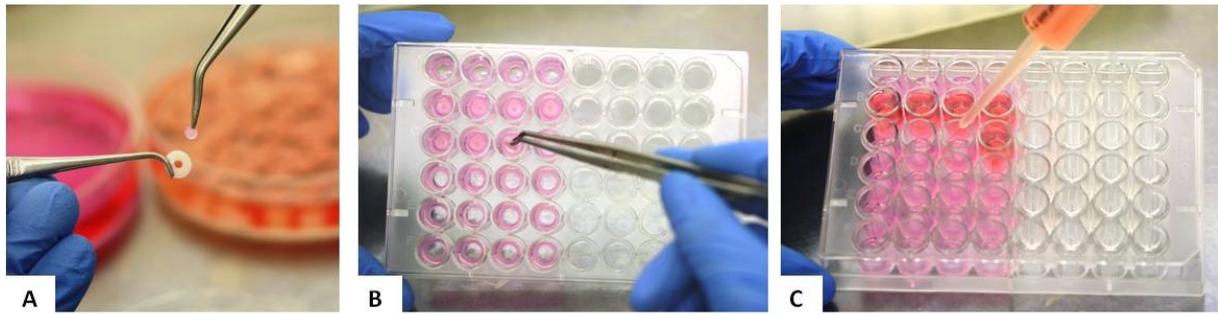


Abb. 10: Herstellung und Einbettung der Knorpel-BNC-Konstrukte.

Die modifizierten BNC-Zylinder wurden nach entsprechender Vorbehandlung mittels Pinzette in die Defekte der bovinen Knorpelstanzen eingepasst (A). Die Knorpel-BNC-Konstrukte wurden anschließend jeweils passgenau auf dem Boden von Agarose-Aussparungen (\varnothing 6 mm) einer 48 Well-Platte platziert (B) und diese anschließend mit Kulturmedium gefüllt (C). Hiernach erfolgte die *in vitro* - Kultivierung entsprechend des Versuchsdesigns.

4.6.3 *In vitro* - Kultivierung

Nach Vorbild des in der AG etablierten Knorpelregenerationsmodells (Pretzel et al. 2013) wurden die präparierten Knorpel-BNC-Proben über 2, 4, 8 und 12 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Um optimale Kulturbedingungen und somit eine ausreichende Nährstoffversorgung des Knorpelgewebes zu garantieren, wurde alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Knorpelmediums vorgenommen (DMEM/F12 Nutmix, ergänzt um 5% FCS, 1% Gentamycin und ITS-Supplement 1:1000). Verbrauchtes Medium wurde dabei vorsichtig mittels Pipette aspiriert, in Reaktionsgefäßen aufgefangen und bei -20°C für weitere Analysen gelagert.

Zellfreie, serumhaltige (ZF+) und zellfreie, serumfreie (ZF-) 3D-modifizierte BNC-Inserts:

Im Falle der beiden zellfreien Ansätze wurden die Proben während einer **Vorkultur von 96 h** zunächst in FCS-freiem Medium kultiviert. Dieses Vorgehen sollte einen möglichen induktiven Effekt der serumbeladenen Implantate auf die initiale Rekrutierung boviner Chondrozyten unter Ausschluss einer eventuell maskierenden Wirkung des Nährmediums belegen. Wie in Abb. 11 dargestellt, erhielten beide Ansätze nach dieser initialen „Starving-Periode“ dann bis zum Ende der Kultivierungszeit vollwertiges, 5% FCS-haltiges Kulturmedium. Pro Zeitpunkt wurden insgesamt 44 Knorpelstanzen aus einem Rinderknie präpariert, von denen 16 Proben mit BNC-Inserts ohne Serumvorinkubation bestückt (**ZF-**) und 28 Proben mit serumbeladenen BNC-Implantaten versehen wurden (**ZF+**). Diese ungleiche Verteilung beruhte darauf, dass die (ZF-)-Proben nicht für die anschließenden biomechanischen Tests vorgesehen waren. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden sowohl von dem „serumfreien“ Ansatz (**ZF-**) (Abb. 11, linke Spalte) als auch von dem „serumhaltigen“ Ansatz (**ZF+**) (Abb. 11, mittlere Spalte) 4 Proben für histologische und

immunhistochemische und je 2 Proben für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen herangezogen. Weitere 10 Knorpel-BNC-Regenerate pro Ansatz dienten späteren molekularbiologischen Untersuchungen nach der RNA-Isolierung. Die übrigen 12 Knorpelstanzen aus dem **zellfreien, serumhaltigen Ansatz (ZF+)** wurden für biomechanische Tests nach einer Kulturdauer von 0, 4, 8 und 12 Wochen verwendet. Insgesamt wurden für eine Versuchsreihe 208 Knorpelstanzen mit zellfreien, 3D-modifizierten BNC-Implantaten, aufgeteilt in 80 Proben für den **(ZF-)**-Ansatz und 128 Proben für den **(ZF+)**-Ansatz, bestückt und über Zeiträume von 0, 2, 4, 8 und 12 Wochen kultiviert.

Zellbesiedelte 3D-modifizierte BNC-Inserts (ZB):

Für eine Versuchsreihe des **zellhaltigen Ansatzes (ZB)** wurden insgesamt 114 Knorpelstanzen, die aus den beiden Kniegelenken eines Tieres gepoolt wurden, mit dreidimensional zellbesiedelten BNC-Inserts bestückt. Zur Untersuchung des „Nullpunktes“ wurden direkt nach Anfertigung der Konstrukte 12 Proben für die sich unmittelbar anschließenden biomechanischen Tests sowie 2 weitere Proben für histologische Untersuchungen entnommen. Weiterhin wurde die überschüssige Zellsuspension nach statischer und dynamischer Implantat-Besiedlung aufgefangen und unter Frostschutz im Flüssigstickstoff für spätere molekularbiologische Untersuchungen aufbewahrt. Da nach 2 Wochen keine biomechanischen Tests stattfanden, wurde für diesen Zeitpunkt die Probenzahl auf insgesamt 16 Knorpel-BNC-Regenerate begrenzt, wovon 10 Proben für molekularbiologische und weitere 6 Proben für histologische Analysen verwendet wurden. Für die restlichen Zeitpunkte (4, 10 und 12 Wochen) wurden jeweils insgesamt 28 bovine Knorpelregenerate kultiviert. Hiervon wurden nach Ende des jeweiligen Kultivierungszeitraums 12 Proben für Ausdrückversuche, 6 Knorpel-BNC-Regenerate für bildgebende (Histologie, IHC, REM) und 10 Proben für molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Da die Chondrozyten den Kultivierungsbedingungen in FCS-freiem Nährmedium nicht standhalten würden, wurde in diesem Ansatz auf eine Vorkultur von 96 h verzichtet und alle Proben sofort mit FCS-haltigem Kulturmedium inkubiert (Vgl. Abb. 11, rechte Spalte). Der Nullpunkt begann somit bereits ab dem Zeitpunkt der Implantierung der zellbesiedelten, 3D-modifizierten BNC-Inserts in den Defekt der frisch entnommenen Knorpelstanze.

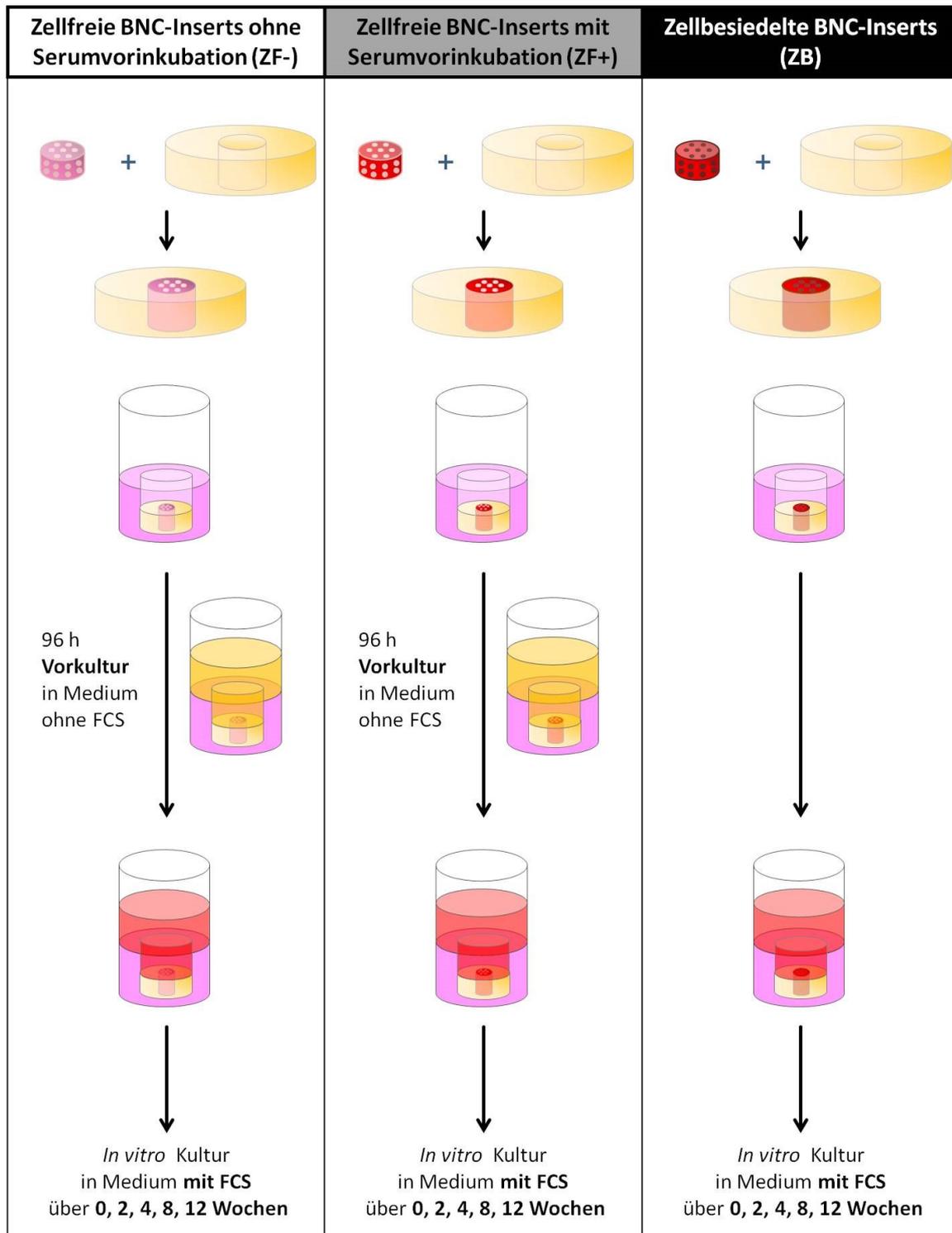


Abb. 11: Übersicht des Versuchsdesigns der Kultivierung boviner Knorpelstanzen mit 3D-modifizierten BNC-Implantaten.

Im Hinblick auf mögliche Effekte der Seruminkubation bzw. artifiziiellen Zellbesiedlung wurden die Knorpel-BNC-Proben entsprechend der initialen Vorbehandlung des Implantats in drei Ansätzen kultiviert. Die zellfreien, nativen (ZF-) und die zellfreien, serumbeladenen BNC-Zylinder (ZF+) wurden zunächst während einer Vorkultur von 96 h unter Verwendung von FCS-freiem Nährmedium kultiviert. Hiernach erfolgte der Beginn der Langzeitkultivierung über 2 bis 12 Wochen unter Hinzugabe eines mit FCS angereicherten Nährmediums (DMEM/ F12 + 5% FCS + 1% Gentamycin + ITS-Supplement 1:1000). Da die Chondrozyten der zellbesiedelten BNC-Implantate einer solchen Hungerperiode nicht standhalten würden, erfolgte in diesem Ansatz (ZB) die sofortige Applikation vollwertigen Nährmediums mit anschließender Kultivierung über 2 bis 12 Wochen.

4.7 Histologische Analysen

4.7.1 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Regenerate für histologische und immunhistochemische Analysen

Am Ende der jeweiligen Kultivierungszeit wurden 4 Proben pro Ansatz zur histologischen und immunhistochemischen Analyse der Knorpel-BNC-Regenerate herangezogen. Unter Verwendung eines Spatels und einer feinen Pinzette erfolgte zunächst die vorsichtige Entnahme des kompletten Agarosezylinders aus der Lochplatte, der anschließend an den Seitenrändern mittels Skalpell geteilt werden konnte. Die Knorpelstanze konnte daraufhin gut herausgelöst und in eine 6%-ige *Para*-Formaldehyd-Lösung (PFA) überführt werden. Nach einer 48-stündigen Fixierung bei Raumtemperatur erfolgte die automatische Paraffin-Einbettung mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten („Citadel 1000“, Thermo Shandon Electron Corporation). Dabei wurden die Gewebeproben zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50%, 70%, 2x 96% und 2x 100% im stündlichen Wechsel entwässert und anschließend für 2 x 4 Stunden in Xylol inkubiert. Dann wurden die Proben für zweimal 3 h in ein 60°C heißes Paraffinbad überführt. Nach dem Ausgießen der Knorpel-BNC-Konstrukte mit flüssigem Paraffin in TissueTek-Unikassetten mussten diese bis zur weiteren Verarbeitung für mindestens 30 min bei -20°C abkühlen.

Die gehärteten Paraffin-Blöcke wurden daraufhin in ein Rotationsmikrotom eingespannt und 6 µm dicke Gewebeschnitte aus dem Knorpelstanzenpräparat angefertigt. Jeweils zwei solcher Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgeschmolzen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Um die Schnittpräparate für nachfolgende Färbeprozesse verwenden zu können, wurden sie zuerst entparaffiniert. Bei Raumtemperatur wurden die zu färbenden Objektträger zunächst für 2 x 15 min in reines Xylol überführt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 96%, 70% und 50%, jeweils ca. 10 min). Zuletzt wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten in *Aqua dest.* gewaschen und standen nun für histologische sowie immunhistochemische Färbungen zur Verfügung.

4.7.2 Histologische Färbungen

Als standardmäßig in der lichtmikroskopischen Darstellung von hyalinem Knorpelgewebe angewandte Färbemethoden gelten sowohl die HE- (Hämatoxylin/Eosin) als auch die Safranin-O/Lichtgrün-Färbungen. Die Kombination aus Hämatoxylin und Eosin erlaubt eine allgemeine Übersichtsfärbung zur Beurteilung von biologischen Gewebestrukturen. Zur histologischen Darstellung des Proteoglykan-Gehalts in hyalinem Knorpel ist die Safranin-O-Färbung als Methode der Wahl anzusehen. Der Farbstoff Safranin-O lagert sich dabei an

Glukosaminoglykane an und führt zu einer Rotfärbung des histologischen Präparates. Durch die relativ sensitive Detektion kann hiermit der absolute Proteoglykangehalt des Knorpelgewebes abgeschätzt, jedoch nicht für genaue, quantitative Auswertungen genutzt werden. Aufgrund der Kombination mit Lichtgrün werden Bereiche mit fehlendem Proteoglykan blaugrün dargestellt und somit degenerative Veränderungen im Knorpelgewebe sichtbar gemacht.

Für die HE-Färbung wurden die Objektträger zunächst für 10 min bei RT in eine Hamatoxylin-Lösung getaucht, anschließend unter fließendem Leitungswasser gewaschen und darin für weitere 10 min gebläut. Nach einer dreiminütigen Gegenfärbung in einer Eosin-Lösung konnten die gewaschenen Schnitte schließlich mittels eines Xylol-löslichen Eindeckmediums (Kanadabalsam) luftbläschenfrei unter einem Deckglas versiegelt werden.

In einem ähnlichen Vorgang wurden für die Safranin-O-Färbung die Gewebeschnitte 10 min in der entsprechenden Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Nach einer 15-minütigen Gegenfärbung mit Lichtgrün konnten die Proben ebenfalls mittels Kanadabalsam eingedeckt werden.

Im weiteren Verlauf wurden die gefärbten Schnitte vor der lichtmikroskopischen Beurteilung circa 12 h getrocknet.

4.7.3 Immunhistochemische Färbungen

Die semiquantitative Analyse der Knorpel-BNC-Regenerate bezüglich ihres Gehalts an knorpelspezifischen Matrixbestandteilen und Dedifferenzierungsmarkern erfolgte mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen für Aggrekan, Kollagen 2 und Kollagen 1.

Um eine möglichst gute Haftung des Präparates an den Objektträger zu ermöglichen, wurden die stets frisch angefertigten und bei 37°C gelagerten Paraffinschnitte zunächst für eine Stunde bei 60°C angeschmolzen und anschließend für mindestens eine weitere Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. In Glasküvetten erfolgte nun das Entparaffinieren und Rehydrieren (siehe 4.7.1) bis zum dreimaligen Waschen in Aqua. dest. Mittels eines Fettstiftes (DAKO-Pen) wurden die Schnittproben umrahmt und für mind. 5 min in TBS gelagert. Die Fettstift-Umrandung sollte ein Auslaufen der später aufzubringenden Lösungen von den Schnittpräparaten verhindern. Die so vorbereiteten Präparate wurden anschließend einem Verdauungsschritt unterzogen. Der partielle Andau des Knorpelgewebes diente dabei der Demaskierung des zu detektierenden Matrixproteins. Im Fall von Kollagen 1 und Kollagen 2 erfolgte demgemäß die Behandlung mit Proteinase K, die 1:50 in einer 0,05 M Tris-HCL-

Lösung verdünnt wurde (pH 7,5). Auf jede Probe wurden dabei etwa 100 µl der Enzymlösung gegeben und nach einer Inkubation von maximal 15 min bei Raumtemperatur durch dreimaliges Waschen mit TBS wieder entfernt. Für das Antigen-Retrieval von Aggrekan wurden die Schnitte für 90 min bei 37°C mit Chondroitinase ABC (0,25 U/ml) inkubiert. Um ein Austrocknen der Proben während der Verdauzeit zu verhindern, wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer gelagert. Anschließend erfolgte auch hier das dreimalige Waschen in TBS für jeweils 2 min. Nach Absättigung der endogenen Peroxidase durch 10-minütige Inkubation in einer 0,5%-igen H₂O₂/Methanol-Lösung galt es, unspezifische Bindungsstellen des Probenmaterials zu blockieren. Entsprechend wurden die für die Kollagen-Detektion herangezogenen Schnitte mit je 100 µl von 25% BSA/TBS inkubiert. Daneben wurde im Rahmen der Aggrekan-Darstellung eine 10%-ige Kaninchenserum/TBS-Lösung als Blockier-Medium eingesetzt. Nach 30 min wurden die Seren von den Objektträgern abgekippt und im Folgenden die ungewaschenen Proben mit je 50 µl Primär-Antikörper bzw. Isotypkontrolle bedeckt (Tab. 1 mit Angabe der Verdünnungsmedien). Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Tab. 1: Übersicht über die zur immunhistochemischen Darstellung verwendeten Primär-/ Sekundär-Antikörper-Kombinationen mit den zugehörigen Isotypkontrollen und Verdünnungsmedien

Antigen	Primär-AK	Klon	Isotyp	Sekundär-AK	Verdünnungsmedium
Kollagen I	Kaninchen Anti-human/bovin Kol 1 (1 µg/ml)	polyklonal	Kaninchen IgG ₁	Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP	Bovines Serumalbumin/ TBS
Kollagen II	Maus Anti-human/bovin Kol 2 _{a1} (1 µg/ml)	II-4C11	Maus IgG ₁	Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	Bovines Serumalbumin/ TBS
Aggrekan	Maus Anti-human/bovin Aggrekan (0,1 µg/ml)	MA85A95	Maus IgG ₁	Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	Kaninchenserum/ TBS

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zur Entfernung ungebundener AK zunächst dreifach mit TBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die einstündige Inkubation der Proben bei RT mit jeweils 50 µl eines spezifischen HRP-konjugierten Sekundär-Antikörpers. Nach drei weiteren Waschschrritten konnte nun das Substrat Diaminobenzidin (DAB) auf die Antikörper-markierten Proben gegeben werden. Die *horseradish-peroxidase* (HRP) katalysierte dabei den enzymatischen Umsatz des Substrats, was eine braune Farbreaktion im Bereich der Antigen-präsentierenden Stellen zur Folge hatte. Die sichtbare Farbentwicklung wurde nach 3 - 5 min durch Eintauchen der Objektträger in eine mit TBS gefüllten Küvette gestoppt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Nach mehrmaligem Waschen und anschließendem Bläuen für 5 min in Leitungswasser wurden die

Schnitte zuletzt mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium Aquatex® überdeckt und luftdicht unter einem Deckgläschen fixiert (Übersicht der Protokolle im Anhang Seite 130, Tab. 2).

Anhand der erhaltenen immunhistochemischen Färbungen war es nun möglich, den Gehalt bzw. die Neubildung der Matrixbestandteile Aggrekan, Kollagen 1 und Kollagen 2 in den Knorpel-BNC-Regeneraten für die jeweiligen Zeitpunkte zu bestimmen.

4.8 Gradeinteilungen der histologischen und immunhistochemischen Färbungen für die anschließende semiquantitative Auswertung

Im Anschluss an die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden die Knorpel-BNC-Konstrukte lichtmikroskopisch untersucht und hinsichtlich verschiedener Gesichtspunkte beurteilt (Erosionsgrad des Knorpelrings, oberflächliche bzw. dreidimensionale Zellbesiedlung des BNC-Implantats, Proteinbeladung des Knorpelrings bzw. des BNC-Implantats mit Aggrekan, Kollagen I oder Kollagen II). Diese Charakteristika sollten danach unter Verwendung eines „Notenschlüssels“ vergleichbar und somit innerhalb einer semiquantitativen Analyse auswertbar gemacht werden. Hierbei wurde in Anlehnung an vorangehende Arbeiten (Vgl. Dissertation Linss 2012) ein Dreipunktescore (0-3) für jeden untersuchten Parameter bestimmt. Die Auswertung der oberflächlichen Knorpelerosion sowie der oberflächlichen bzw. dreidimensionalen Zellbesiedlung des BNC-Implantats im Kulturverlauf erfolgte anhand der H/E-Färbungen:

Erosionsgrad des Knorpelrings: 0 = Knorpeloberfläche glatt; 1 = aufgeraute Lamina splendens; 2 = mäßige Delamination mit Auflockerung der oberflächlichen Matrix; 3 = massive Erosion mit Abtragung der oberflächlichen Matrix.

Oberflächliche Zellbesiedlung des BNC-Implantats: 0 = BNC völlig frei von Zellen, 1 = Adhärenz vereinzelter Zellen (bis 5), 2 = vermehrte Adhärenz von Zellen (6-20), 3 = streckenhafte BNC - Besiedlung, auch mehrlagig.

Dreidimensionale Zellbesiedlung des BNC-Implantats: 0 = keine Besiedlung innerhalb der Kanäle sichtbar, 1 = schwache Besiedlung (vereinzelt Zellen innerhalb des BNC-Inserts oder randständige Kanäle besiedelt), 2 = mäßige Besiedlung (vermehrte dreidimensionale Besiedlung auch zentral gelegener Kanäle), 3 = das gesamte Implantat durchdringende Zellbesiedlung.

Unter Auswertung der immunhistochemischen Färbung (braun, DAB) konnte der Grad der Proteinbeladung von Aggrekan, Kollagen II bzw. Kollagen I sowohl im Knorpelring als auch

im BNC-Implantat bestimmt werden. Als Referenz (maximale DAB-Entwicklung) diente hierbei für Aggrekan und Kollagen II Frischknorpel, für Kollagen I wurde die DAB-vermittelte Braunfärbung von Knochen als maximale Proteinbeladung bemessen.

Proteinbeladung des BNC-Implantats bzw. des Knorpelrings: 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = starke DAB-Entwicklung (+++).

4.9 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für rasterelektronenmikroskopische Analysen

Je zwei Knorpel-BNC-Regenerate pro Ansatz wurden nach dem jeweiligen Kultivierungszeitpunkt entsprechend 4.7.1 aus dem Agarosezylinder entnommen und für die nachfolgenden rasterelektronenmikroskopischen Analysen vorbereitet. Die Proben wurden zunächst für 72 h in einer 2%-igen Glutaraldehydlösung (in 0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,2) bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Cacodylatpuffer erfolgte anschließend die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96% und 100% Ethanol). Schließlich wurden die Proben in reines Aceton überführt und in luftdicht-verschließbaren Gefäßen bis zur weiteren Verwendung gelagert.

In unmittelbarer Vorbereitung auf die REM-Untersuchungen wurde das Aceton zunächst mittels eines Kritischpunkttrockners gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht und anschließend durch vorsichtige Erhöhung der Kammertemperatur bis auf 37°C in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Diese Prozedur ermöglichte eine strukturschonende Trocknung des Knorpel-BNC-Regenerates. Anschließend wurden die Proben mittels Klebetabs auf Aluminiumtellern fixiert und in einem „Sputter coater“ mit einer 20-40 nm dicken Goldschicht imprägniert. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops ließ sich danach die Oberflächenmorphologie der Knorpel-BNC-Regenerate evaluieren.

4.10 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Proben für molekularbiologische Analysen

Die in dieser Arbeit präparierten und kultivierten Knorpel-BNC-Regenerate und die bei jedem Mediumwechsel gewonnenen Mediumüberstände wurden außerdem für molekularbiologische Untersuchungen herangezogen. Dabei sollte einerseits die Ko-Kultur hinsichtlich der momentanen chondrozytären Syntheseaktivität auf mRNA-Ebene analysiert und zum anderen der Proteingehalt im Mediumüberstand unter Verwendung von ELISA-Tests quantifiziert werden. Wie oben beschrieben wurden dafür alle aspirierten Medienüberstände in Falcon-Röhrchen aufgefangen und getrennt nach Kulturansatz bei -20°C gelagert. Zur

Quantifizierung der momentanen Syntheseaktivität der Chondrozyten und vergleichenden Betrachtung hinsichtlich Veränderungen des mRNA-Expressionsmusters über den Kultivierungszeitraum dient die PCR-Untersuchung. Hierbei sollte eine differenzierte Analyse der Syntheseaktivität von Chondrozyten aus unterschiedlichen Bereichen des Knorpel-BNC-Regenerats erfolgen. Dementsprechend wurden die Knorpelzellen drei Zonen zugeordnet und getrennt asserviert: im Knorpelgewebe befindliche (a), auf die Knorpeloberfläche migrierte (b) und auf bzw. im BNC-Implantat vorkommende Knorpelzellen (c). Hierzu wurden unter strenger Einhaltung der Sterilität von jedem Zeitpunkt 10 Proben herangezogen und vorsichtig aus den Agarosezylindern gelöst. Die BNC-Implantate wurden zunächst mittels Pinzette aus dem Knorpelring entnommen und in ein RNase freies Eppendorf-Gefäß mit 300 µl RLT-Lysepuffer überführt und anschließend kurz (ca. 30 s) mittels Vortexgerät gemischt. Die Knorpelringe wurden ebenso in ein RNase-freies Gefäß gegeben. Nach Zugabe von 600 µl RLT-Lysepuffer wurden diese dann eine Minute mit einem Vortexgerät geschüttelt. Dies diente dem Lösen der auf die Außenseite der Knorpelringe migrierten Chondrozyten. Die Knorpelstanzen wurden anschließend aus dem „Zell-Lysat“ entnommen und in einem neuen Gefäß platziert. Alle drei Proben mussten hiernach sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden, um residente RNAsen zu inhibieren und die vorhandene RNA zu konservieren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die in dieser Arbeit hergestellten und kultivierten Knorpel-BNC-Regenerate wurden mit Hilfe von Herrn Tobias Fiedler aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind bereits in der Bachelorarbeit *„Eignung von bakterieller Nanocellulose als Knorpelersatzmaterial – molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen im in vitro Knorpelstanzenmodell“*, Tobias Fiedler, Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik dargestellt (Fiedler 2014).

4.11 Funktionelle Analysen

4.11.1 Vorbereitung der Knorpel-BNC-Proben für Ausdrückversuche und biomechanische Testung

Zur vergleichenden Betrachtung des **zellbesiedelten (ZB)** bzw. **zellfreien, serumbeladenen Ansatzes (ZF+)** hinsichtlich einer lateralen Anheftung des BNC-Implantats im Knorpeldefekt wurden funktionelle Analysen mittels Push-out-Tests vorgenommen. Hierzu wurden aus den beiden genannten Kultivierungsansätzen jeweils 12 Proben nach einer Kultivierungszeit von 0, 4, 8 und 12 Wochen herangezogen.

Die folgende Testung wurde mit Unterstützung durch die Abteilung für Biomechanik der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München (TUM) durchgeführt. Diese entwickelte eine Prüfmethode für die mechanische Charakterisierung von viskoelastischem Gewebe (Föhr et al. 2012). Von insgesamt 10 Replikaten wurden Ausdrückversuche mit Hilfe der statischen Universalprüfmaschine „Zwicki“ (Fa. Zwick, Ulm, Deutschland) vorgenommen. Dabei wurde mit einem Metallstempel (\varnothing 1,8 mm) und einer Geschwindigkeit von 5 mm/min das BNC-Insert aus dem zuvor fixierten Knorpelring gedrückt (Abb. 12) und die dabei auftretenden Kräfte über den zurückgelegten Weg gemessen (Kraft-Weg-Diagramm). Anschließend wurde der Stempel noch einmal durch die leere Knorpelstanze gefahren, um den Anteil einer möglichen Reibung am Defektrand zu ermitteln. Die aus dieser Leermessung ermittelte Maximalkraft ($F_{\max, \text{ leer}}$) wurde nun von der zuerst gemessenen Maximalkraft beim Durchdrücken des Implantats ($F_{\max, \text{ Insert}}$) subtrahiert und das Ergebnis als resultierende Maximalkraft ($F_{\max, \text{ res}}$) für die nachfolgenden Auswertungen verwendet. Die Ergebnisse gaben nun Aufschluss darüber, inwiefern ein Einwachsen des Implantats in den Knorpelring im Sinne einer *in situ* Integration stattgefunden hat.

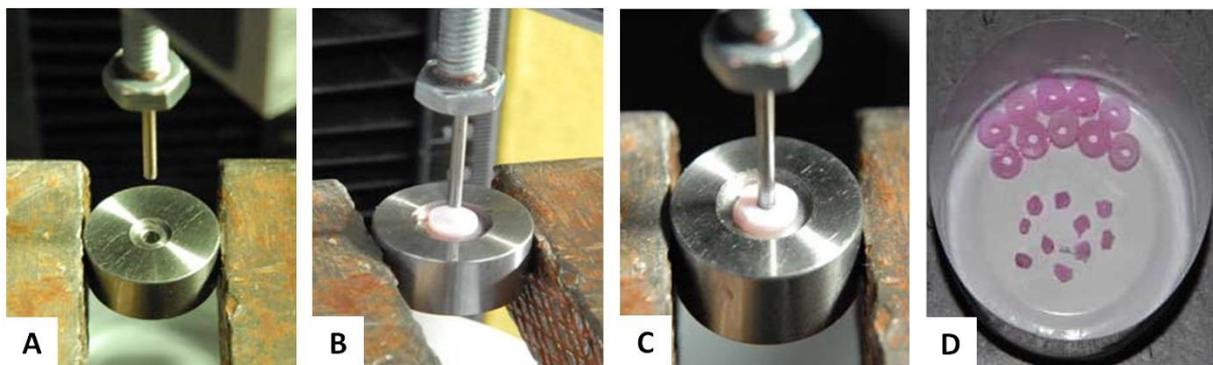


Abb. 12: Ausdrückvorgang mit der Universalprüfmaschine „Zwicki“ (Fa. Zwick, Ulm). (A) Metallstift (\varnothing 1,8 mm) und Auflageplatte ohne Probe; (B-C) Auspressvorgang, bei dem der Metallstift das Insert aus dem Knorpelring drückt; (D) Auffangschale mit Knorpelstanzen und ausgestanzten Implantaten. Mit freundlicher Genehmigung der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München.

4.12 Auswertung, statistische Analysen und graphische Darstellung

Die Mikroskop-basierte, semiquantitative Auswertung der verschiedenen histologischen bzw. immunhistochemischen-Färbungen erfolgte anhand eines Dreipunktescores. Dazu flossen jeweils drei Replikate in eine Bewertung ein. In der biomechanischen Analyse wurden pro Zeitpunkt jeweils 10 Replikate getestet und zusammengefasst. Letztendlich wurden Knorpel-BNC-Proben aus 4 Versuchsreihen ($n = 4$) hinsichtlich ihrer histologischen, immunhistochemischen und biomechanischen Eigenschaften nach einer Langzeit-*in-vitro*-Kultivierung von bis zu 12 Wochen untersucht. Hierbei wurden drei Ansätze (zellfreie mit

Serum (**ZF+**), zellfreie ohne Serum (**ZF-**) und zellbesiedelte (**ZB**) 3D-modifizierte BNC-Implantate) vergleichend betrachtet.

Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte (mean) \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics Version 22.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA). Dabei wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zur Prüfung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen eingesetzt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei $p \leq 0.05$ angenommen. Die Anfertigung der Diagramme erfolgte unter Verwendung von Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

5 ERGEBNISSE

Für dieses Versuchsvorhaben wurden bovine Knorpelimplantate mit einem zentralen Defekt versehen und mit 3D-modifizierten BNC-Implantaten bestückt, die zuvor entweder nativ belassen (ohne Vorinkubation, **ZF-**), mit Serum inkubiert (**ZF+**) oder mit bovinen Chondrozyten besiedelt (**ZB**) wurden (für Details siehe 4.). Diese drei Ansätze wurden im Anschluss an eine Kultivierung von 2, 4, 8 und 12 Wochen im *in vitro* Regenerationsassay unter histologischen, immunhistologischen und rasterelektronmikroskopischen Gesichtspunkten untersucht. Zudem wurden biomechanische Tests durchgeführt.

Die folgenden Ergebnisse wurden u.a. nach semiquantitativer Auswertung graphisch dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass bei den zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) die sehr frühen Zeitpunkte („frisch“ und „Nullpunkt“) aufgrund der dazwischenliegenden viertägigen Vorkultur in serumfreiem Medium, separat untersucht wurden. Dagegen wurde bei dem zellbesiedelten Ansatz (**ZB**) der Kultivierungs-Beginn mit frischen Knorpelringen zum „Nullpunkt“ festgelegt und unterscheidet sich daher methodisch von den beiden zellfreien Ansätzen. Da bei den zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) in keiner der erfolgten Analysen (Erosionsgrad der Knorpeloberfläche, Grad der Besiedlung der Implantatoberfläche bzw. der dreidimensionalen Besiedlung, Proteinbeladung des Knorpelrings bzw. des Implantats) ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten „frisch“ und „Nullpunkt“ nachzuweisen war, wurde in den jeweiligen Abbildungen bewusst auf die Darstellung des Zeitpunktes „frisch“ verzichtet.

5.1 Histologische Darstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf (Hämatoxylin/ Eosin - Färbung)

Die lichtmikroskopische Darstellung der über bis zu 12 Wochen kultivierten Knorpel-BNC-Regenerate diente zum einen der Beurteilung von Zellvitalität, Knorpelintegrität und Struktur des Knorpelring-Gewebes und zum anderen der Betrachtung des Migrationsverhaltens der Chondrozyten. Dabei lag ein besonderer Fokus auf der dreidimensionalen Besiedelbarkeit des Nanocelluloseimplantats. Hierzu wurden Übersichtsfärbungen mittels H/E vorgenommen. Außerdem konnten durch Färbungen mit Safranin-O/Lichtgrün Aussagen zum Proteoglykangehalt und möglichen degenerativen Prozesse getroffen werden (siehe 5.3).

5.1.1 Oberflächliche Erosion und Besiedlung des Knorpelrings

Eine positive Kernfärbung und somit erhaltene Zellvitalität wurde zu allen Zeitpunkten (2-12 Wochen) nachgewiesen, ein Befund, der prinzipiell für eine ausreichende

Nährstoffversorgung der Gewebekultur während des langen Kultivierungszeitraums spricht. Jedoch ließen sich insbesondere nach 8 und 12 Wochen Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie und Zellanordnung im Knorpelgewebe detektieren. Zeigte sich in den frühen Kulturzeitpunkten (bis 4 Wochen) eine geordnete Zellschichtung und homogen gefärbte Matrix im gesamten Vertikalschnitt des Knorpelgewebes, so schien die Gewebsarchitektur nach 8 und insbesondere nach 12 Wochen ungeordnet und z.T. aufgehoben (Vgl. Abb. 13). Diese Veränderungen fanden sich besonders in den oberflächlichen und (in geringerem Ausmaß) in den mittleren Zonen des Knorpels. Die Knorpelintegrität der tieferen Gewebsschichten schien dagegen über den gesamten Kulturzeitraum hinweg erhalten.

Unter Betrachtung der Integrität und oberflächlichen Erosion des bovinen Knorpelrings im Verlauf der Langzeitkultivierung war nach Auswertung lichtmikroskopischer Übersichtsaufnahmen kein eindeutiger Unterschied zwischen den drei Ansätzen (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**) erkennbar. Überdies führte die 4-tägige Vorkultur der beiden zellfreien Ansätze (**ZF-**, **ZF+**) zu keinen offensichtlichen histologischen Veränderungen.

Während der frisch präparierte und der nach 4 Tagen Vorinkubation aus serumfreien Medium entnommene Knorpel eine intakte, glatte Oberfläche aufwies, zeigte sich lichtmikroskopisch bereits nach 2 Wochen Kultur eine Ablösung der obersten Lamina mit direkt im Grenzbereich zur Umgebung befindlichen oder der Knorpeloberfläche aufliegenden Chondrozyten. Nach 4 Wochen konnten außerdem bereits vereinzelte minimale Aufhellungen der Matrix direkt an der Knorpeloberfläche gefunden werden, was als Folge eines Auswaschens von Matrixbestandteilen bei Schädigung bzw. gänzlichem Verlust der Lamina splendens und der sich daran anschließenden Degradation der superfiziellen Schicht interpretiert werden kann. Das Knorpelgewebe präsentierte sich in den frühen Kultivierungszeitpunkten stets intakt mit einem planen oberen Grenzbereich, erhaltener homogener Knorpelmatrix und typischer Zellanordnung. Im Gegensatz dazu boten die Langzeitgewebekulturen nach 8 und 12 Wochen ein unruhiges Bild mit z.T. aufgeworfener, mehrfach gewölbter Oberfläche, irregulärer Zellanordnung sowie inhomogener Matrixanfärbung der oberen Gewebsschichten im Sinne einer Degradation (Abb. 13 und Abb. 14).

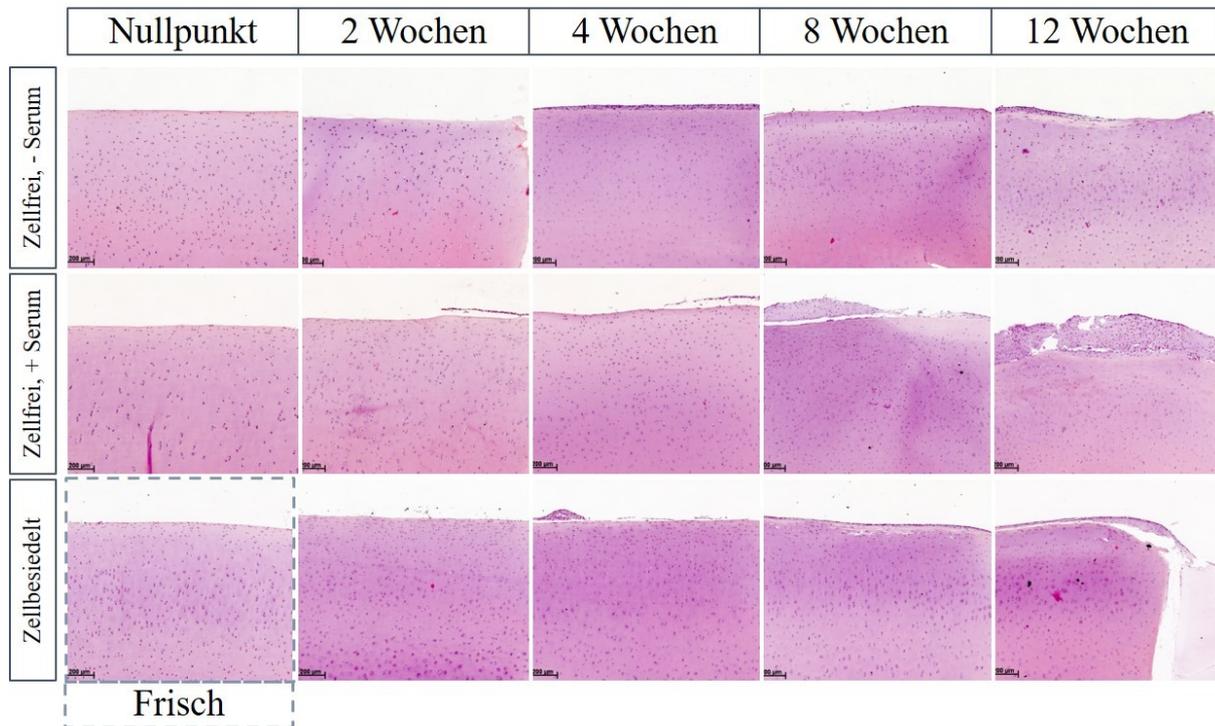


Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung des Knorpelring-Gewebes im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Vertikalschnitte von bovinen Knorpelimplantaten, die in einer Gewebe-Ko-Kultur mit zellfreien (+/- Serum-Vorinkubation) bzw. mit zellbesiedelten, 3D-modifizierten BNC-Implantaten bestückt wurden, nach *in vitro*-Kultur über 0, 2, 4, 8 und 12 Wochen im Vergleich zu einer frischen Knorpel-Probe. H/E-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

Daneben waren in den oberflächennahen Knorpelzonen im Kulturverlauf vermehrt Zellanhäufungen mit hyperplastischen Chondrozyten zu erkennen (Abb. 14, C). Weiterhin fanden sich auf der Knorpeloberfläche zunehmend mobilisierte Chondrozyten, die im Kulturverlauf mehrlagige Zellrasen bildeten. Dabei wurden z.T. massive Zellhaufen auf den Knorpelimplantaten beobachtet. Die mobilisierten, anfangs dicht gedrängten, spindelförmigen Zellen (Abb. 14, A) wiesen im weiteren Kulturverlauf knorpelgewebstypische Merkmale auf, z.B. weit auseinander stehende, rund-ovale Chondrozyten mit einer homogen geformten Interzellularsubstanz in der H/E-Färbung (Abb. 14, B+C). Diese dem Phänotyp des hyalinen Knorpels stark ähnelnden Schichten standen häufig im engen Kontakt zur Knorpeloberfläche und wiesen z.T. eine verschwommene Grenze zum Knorpel auf. Im Gegensatz zu zellbesiedelten Regionen wurde an Stellen des Knorpelgewebes ohne aufgelagerte Zellen eine deutliche Aufhellung der oberflächlichen Matrix beobachtet (Abb. 14, B).

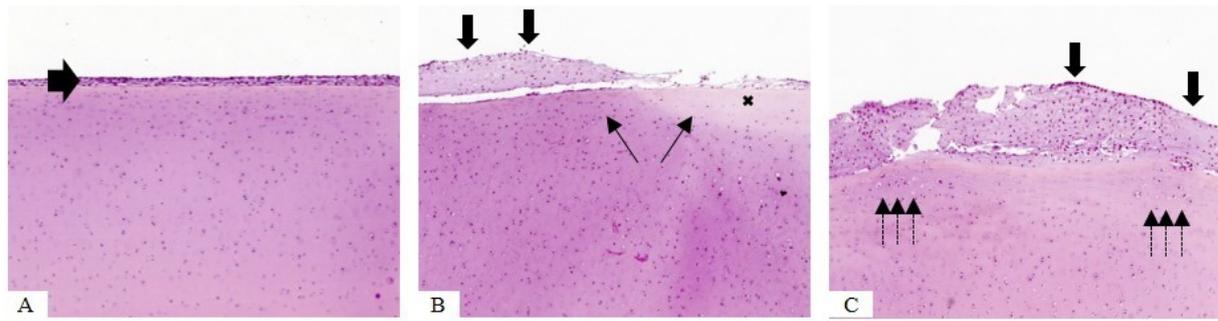


Abb. 14: Darstellung der Erosion und oberflächlichen Zellbesiedlung des Knorpelrings.

Dargestellt sind Auswahlbilder von bovinen Knorpelstanzen nach *in vitro*-Kultivierung von 4 (A), 8 (B) und 12 Wochen (C) aus den Ansätzen ZF- (A) bzw. ZF+ (B+C). Neben einer flächigen Adhärenz ausgewanderter Chondrozyten auf der Knorpeloberfläche (A, dicker Pfeil) finden sich auch zunehmend mehrschichtige Zellauflagen mit Bildung „kartilaginären“ Gewebes (B+C, dicke Pfeile). Der Übergang des Zellbetts zum Knorpelgewebe scheint dabei z. T. fließend (C). Demaskiertes Knorpelgewebe stellt sich zur Oberfläche hin zellärmer und heller dar (Kreuz in B). Interessanterweise zeigen Bereiche ohne oder mit lediglich lückenhaften Zellauflagerungen eine deutliche Erblässung (schräge Pfeile in B). Die gestrichelten Pfeile in (C) zeigen auf Zellcluster mit proliferierenden Chondrozyten. HE-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

In der semiquantitativen Analyse wurde ebenfalls eine Zunahme der oberflächlichen Erosion des Knorpels im Kulturverlauf evaluiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kultivierungsansätzen (**ZF-**, **ZF+**, **ZB**) war nicht festzustellen (Abb. 15).

Bei den Knorpelstanzen, die mit zellfreien, *ohne* Serum inkubierten Implantaten (**ZF-**) bestückt wurden, zeigte sich bereits nach 4 Wochen ein signifikanter Anstieg des Knorpelerosionsgrades und anschließend eine scheinbar stabile Phase bis zum Zeitpunkt 8 Wochen. Nach 12 Wochen war hier wiederum eine Steigerung des Erosionsgrades erkennbar. Die zellfreien, *mit* Serum vorinkubierten Proben (**ZF+**) zeigten dagegen erst nach 8 Wochen und damit später als die anderen beiden Ansätze einen signifikanten Anstieg des Erosionsgrades im Vergleich zum Nullpunkt, erreichten jedoch insgesamt bis zum Zeitpunkt 12 Wochen ein vergleichbar hohes Niveau. Bei den Regeneraten, die mit zellbesiedelten Implantaten bestückt wurden (**ZB**) war eine signifikante Zunahme der oberflächlichen Erosion nach 4 und 8 Wochen zu verzeichnen. Bis zum Ende des Kultivierungszeitraumes verblieb der Grad der Erosion anschließend auf dem 8-Wochen-Niveau.

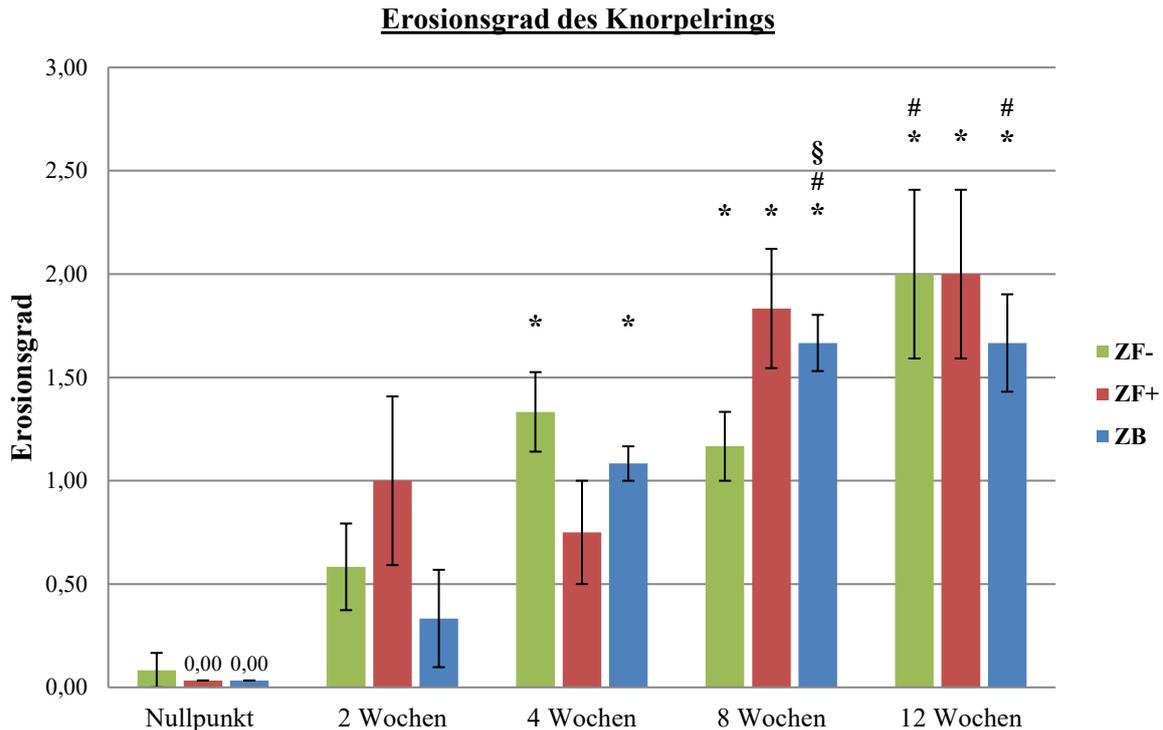


Abb. 15: Semiquantitative Analyse der Erosion des Knorpelrings im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = Knorpeloberfläche glatt; 1 = aufgeraute Lamina splendens; 2 = mäßige Delamination mit Auflockerung der oberflächlichen Matrix; 3 = massive Erosion mit Abtragung der oberflächlichen Matrix. Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, #) vs. 2 Wochen, §) vs. 4 Wochen.

5.1.2 Oberflächliche Besiedlung des BNC-Implantats

Im Zuge der fortschreitenden Erosion und der zunehmenden Zellbesiedlung der Oberfläche des Knorpelrings zeigten sich auch vermehrt mobilisierte Chondrozyten auf der Oberfläche und innerhalb des BNC-Implantats, insbesondere bei den zellfreien Ansätzen (Abb. 16). So konnten bereits nach 2 Wochen vereinzelt mobilisierte Zellen auf der Cellulose der initial zellfreien Implantate beobachtet werden, wobei die BNC-Proben *mit* Serumvorinkubation (ZF+) gegenüber den (ZF-)-Proben zu diesem Zeitpunkt eine scheinbar höhere Besiedlung aufwiesen (s.u.). Im Verlauf der *in vitro* Kultur wurde anhand der H/E-Übersichtsfärbungen eine deutliche Zunahme der oberflächlichen BNC-Besiedlung beobachtet, die nach Ablauf der 12 Wochen keinen eindeutigen Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB) zeigte (Abb. 16). Dabei bildeten die auf die BNC-Oberfläche migrierten Chondrozyten im Verlauf einen zunehmend dichten, zum Teil die komplette Implantatoberfläche überdeckenden Zellrasen. Hierbei wurden auf dem BNC-Implantat mehrlagige Zellanhäufungen mit Bildung eines chondrozytär-runden Phänotyps und der Ausbildung von Interzellulärschubstanz beobachtet (Abb. 17; Vgl. mit Abb. 14, Seite 52).

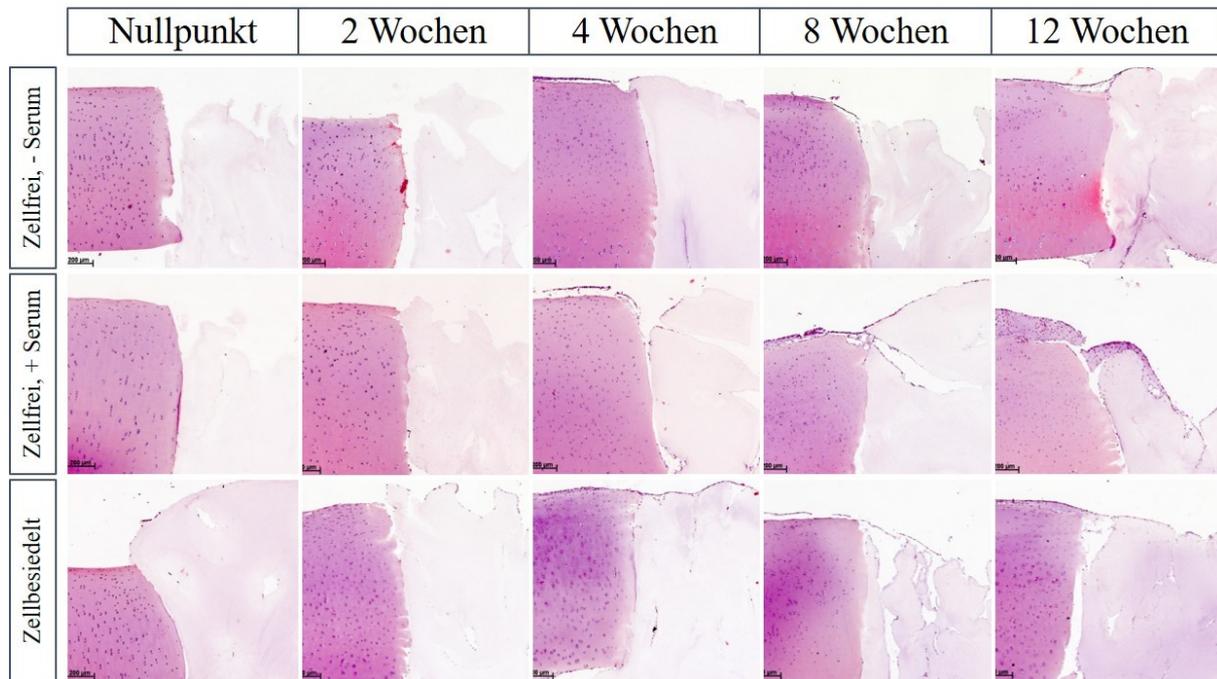


Abb. 16: Darstellung der oberflächlichen Zellbesiedlung des Knorpels und des BNC-Implantats im Kulturverlauf.

Vergleichende Betrachtung von Vertikalschnitten aus den drei Kultivierungsansätzen. Es zeigt sich eine zunehmende oberflächliche Implantatbesiedlung im Kulturverlauf von 0 bis 12 Wochen. Daneben ist auch eine zunehmende Zellbesiedlung der Kanalstrukturen zu erkennen. HE-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

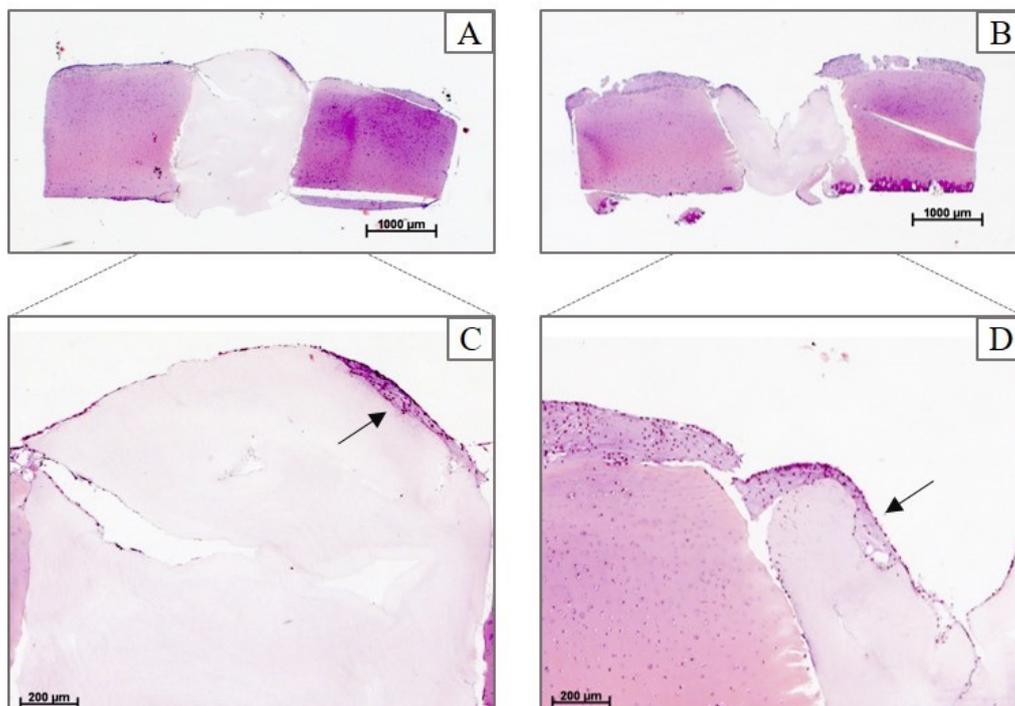


Abb. 17: Oberflächliche Zellbesiedlung des initial zellfreien BNC-Implantats (ZF+).

Dargestellt sind Auswahlbilder boviner Knorpelimplantate nach Ko-Kultur mit 3D-modifizierter, zellfreier BNC nach 8 (A) und 12 Wochen (B). (C+D) stellen Ausschnittsvergrößerungen der darüberliegenden Vertikalschnitte dar. Hier präsentiert sich ein das gesamte Implantat bedeckender, „Zellmantel“ (C). Die Pfeile deuten auf die lokale Bildung von hyalinartigem Knorpelgewebe auf dem Cellulose-Implantat (C+D). HE-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerungen: 12,5x (A+B), 40x (C+D).

In der semiquantitativen Analyse fand sich bei den Proben, die zuvor *nicht* mit Serum inkubiert wurden (**ZF-**) ein erster signifikanter Anstieg der oberflächlichen BNC-Besiedlung bereits nach 4 Wochen. Darauf folgte eine signifikante Zunahme der auf die BNC-Oberfläche migrierten Chondrozyten bis zum Kultivierungsende mit Erreichen eines Maximums nach 12 Wochen (Abb. 18). Der (**ZF+**)-Ansatz war mit dem (**ZF-**)-Ansatz bezüglich der Migration von knorpelständigen Chondrozyten auf das BNC-Implantat absolut vergleichbar (Abb. 18).

Die zellbesiedelten Implantate (**ZB**) zeigten im Vergleich zu den zellfreien Ansätzen eine deutlich frühere Besiedlung der Implantatoberfläche bereits zum Nullpunkt, die im weiteren Kulturverlauf signifikant zunahm. Nach Erreichen eines sehr frühen Maximums nach bereits 4 Wochen fand sich ein gleichförmig hohes Plateau bis zum Ende der Langzeitkultur. Durch diese signifikant stärkere Besiedlung der Implantatoberfläche zu Kulturbeginn ($p \leq 0,05$ ZB vs. ZF-/ZF+ zum Nullpunkt; $p \leq 0,05$ ZB vs. ZF- nach 4 Wochen, Abb. 18) wurde hier insgesamt ein Vorteil der initial zellbesiedelten Implantate (**ZB**) im Vergleich zu den zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) nachgewiesen (Abb. 18).

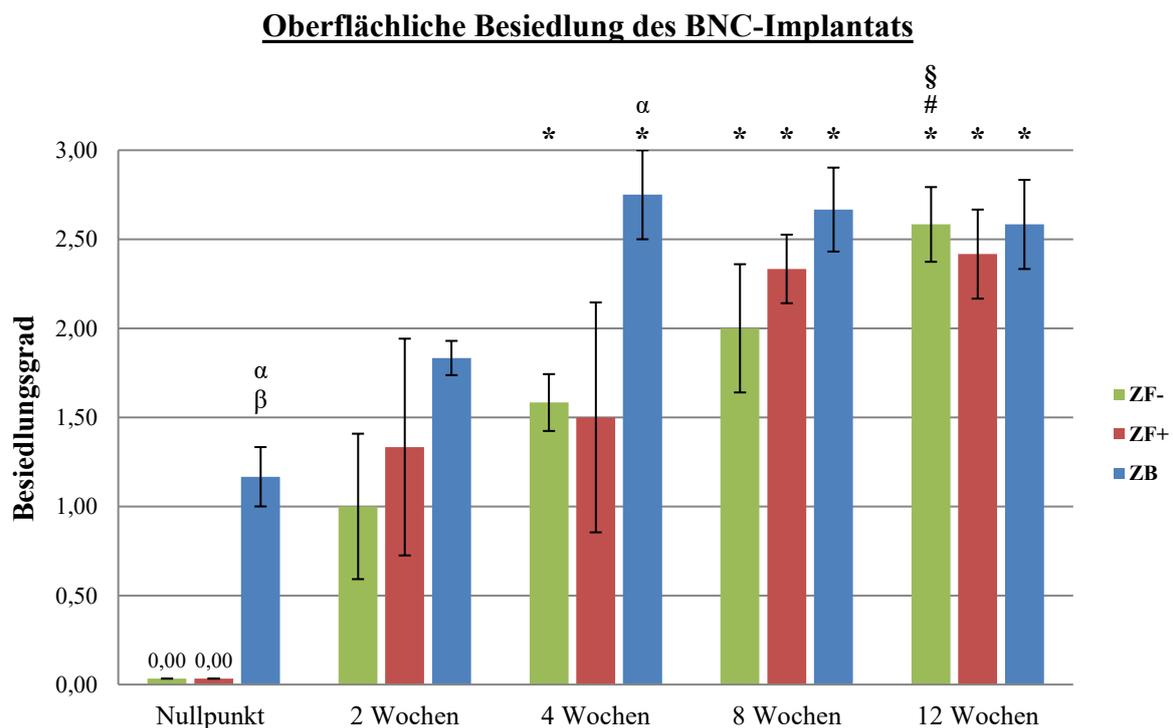


Abb. 18: Semiquantitative Analyse der oberflächlichen BNC-Besiedlung im Kulturverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ($n=4$); 0 = BNC völlig frei von Zellen, 1 = Adhärenz einzelner Zellen (bis 5), 2 = vermehrte Adhärenz von Zellen (6-20), 3 = streckenhafte BNC - Besiedlung, auch mehrlagig. Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, #) vs. 2 Wochen, §) vs. 4 Wochen, α) vs. ZF-, β) vs. ZF+.

5.1.3 Dreidimensionale Besiedlung des BNC-Implantats

Neben der Zelladhärenz auf der Oberfläche des BNC-Gerüsts wurde in der H/E-Färbung auch eine dreidimensionale Besiedlung des BNC-Implantats nachgewiesen. So wurden in den randständigen Kanalstrukturen bei den initial zellfreien Implantaten (**ZF-**, **ZF+**) bereits nach 2 Wochen vereinzelt adhärenz Zellen detektiert (Abb. 19). Hiernach fand sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer eine zunehmende dreidimensionale Besiedlung des initial zellfreien BNC-Implantats (Abb. 19, Vgl. Abb. 21). Dabei wurde bei den serumvorinkubierten Proben (**ZF+**) ein früherer signifikanter Anstieg des dreidimensionalen Besiedlungsgrades im Vergleich zu (**ZF-**) nachgewiesen (8 bzw. 12 Wochen; Vgl. Abb. 21). Zwischen den zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) war insgesamt kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der dreidimensionalen Zellmigration im Kulturverlauf zu beobachten.

Bei dem (**ZB**)-Ansatz wurde erwartungsgemäß direkt nach der initialen Zellbeladung eine sehr hohe dreidimensionale Besiedlung des BNC-Implantats erreicht (Abb. 19; Abb. 20, A). Hierbei war der dreidimensionale Besiedlungsgrad nach 0 und 2 Wochen signifikant höher als bei den zellfreien Proben (**ZF-**, **ZF+**) und zeigte noch nach 4 Wochen eine signifikante Überlegenheit im Vgl. zu (**ZF-**) (Abb. 21). Bis zum Ende der Langzeitkultur verblieb die dreidimensionale Implantatbesiedlung des zellbesiedelten Ansatzes (**ZB**) auf dem anfänglichen Niveau.

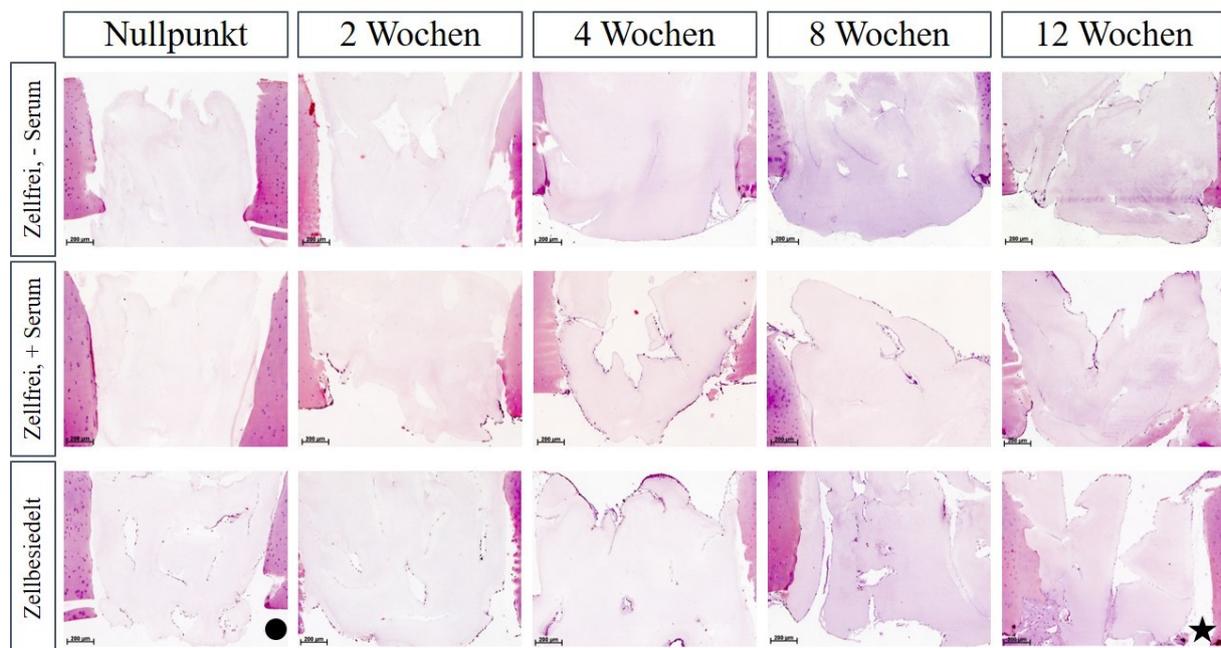


Abb. 19: Darstellung der dreidimensionalen Zellbesiedlung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.

Fokussierte Darstellung des 3D-modifizierten BNC-Implantats. Bei dem zellbesiedelten Ansatz (3. Zeile) findet sich in den Kanalstrukturen bereits zum Nullpunkt eine positive Kernfärbung. Die mit einem Kreis oder Stern markierten Vertikalschnitte sind in Abb. 20 nochmals vergrößert dargestellt. HE-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

Auf der Basis des durchgehend hohen Besiedlungsniveaus der **ZB**-Proben ließen sich insbesondere nach 12 Wochen lokale Veränderungen von Zellorganisation und Zellstruktur erkennen. So wurde vereinzelt im Bereich der zentralen Kanäle innerhalb der BNC (und damit in deutlicher Entfernung zum Defektrand) knorpelähnliches Gewebe mit hoher Zelldichte und homogen gefärbter Interzellulärsubstanz nachgewiesen (Abb. 20, B+C).

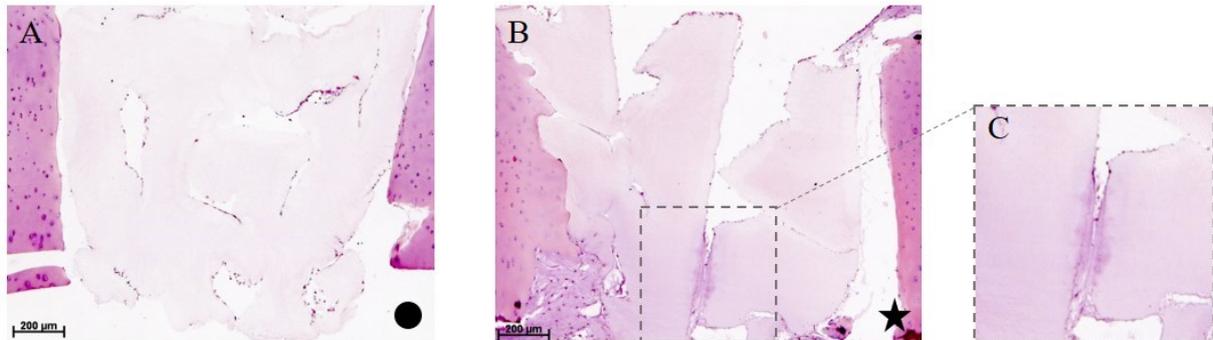


Abb. 20: Darstellung dreidimensional zellbesiedelter BNC-Implantate (ZB).

(Vergrößerungen aus Abb. 19). A) Nachweis einer dreidimensionalen Zellansammlung direkt nach statischer und dynamischer Besiedlung des 3D-modifizierten BNC-Inserts. B) Zellbesiedeltes Implantat nach 12 Wochen *in vitro* Kultur. In der Ausschnittvergrößerung (C) zeigt sich die Ablagerung einer knorpelähnlichen Substanz entlang des zellbesiedelten Kanals. HE-Färbung. Originalvergrößerungen: 40x.

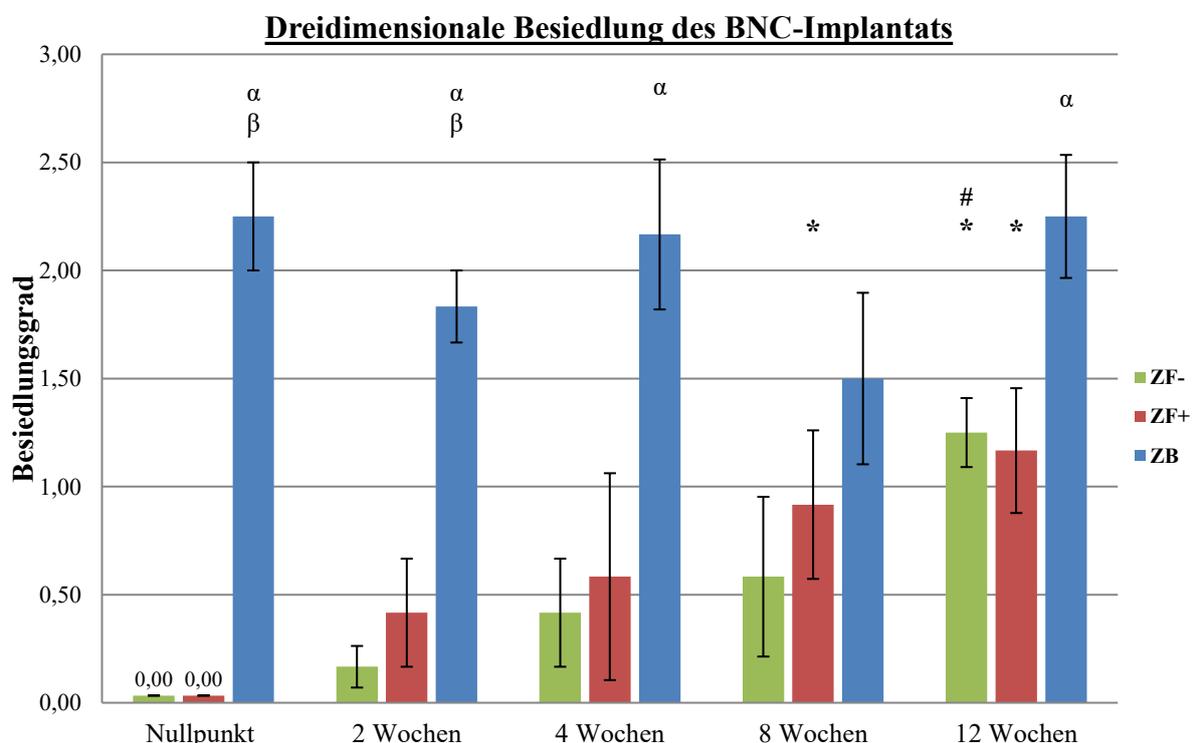


Abb. 21: Semiquantitative Analyse der dreidimensionalen BNC-Besiedlung im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = keine Besiedlung innerhalb der Kanäle sichtbar, 1 = schwache Besiedlung (vereinzelt Zellen innerhalb des BNC-Inserts oder randständige Kanäle besiedelt), 2 = mäßig (vermehrte dreidimensionale Besiedlung auch zentral gelegener Kanäle), 3 = das gesamte Implantat durchdringende Zellbesiedlung. Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, #) vs. 2 Wochen, α) vs. ZF-, β) vs. ZF+.

5.2 Morphologie der Knorpel-BNC-Regenerate in der Rasterelektronenmikroskopie

Zur detaillierten Darstellung der Morphologie des bovinen Knorpelrings mit den BNC-Implantaten sowie von ausgewanderten bzw. auf die Oberfläche der BNC migrierten Chondrozyten eignet sich insbesondere die rasterelektronenmikroskopische Analyse (REM). Im vorliegenden Experiment wurden aus den jeweiligen Ansätzen über den Kulturverlauf mehrere Stichproben ausgewählt und mittels REM qualitativ untersucht. Im Allgemeinen konnte die REM-Untersuchung der Knorpel-BNC-Regenerate die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analysen bestätigen und insbesondere die Veränderungen der Zellmorphologie, -proliferation und -migration im Kulturverlauf verdeutlichen.

Veränderungen des Knorpelrings

Bezüglich der Erosion der Knorpeloberfläche im Verlauf der Langzeitkultivierung ließen sich wiederum keine Unterschiede zwischen den drei Ansätzen (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**) erkennen. Daneben zeigten sich bei den zellfreien Implantat-Typen (**ZF-**, **ZF+**) keine Unterschiede hinsichtlich der initialen Freisetzung und des Migrationsverhaltens knorpelständiger Chondrozyten sowie der zunehmenden Besiedlung des BNC-Implantats.

Frischer Knorpel wies erwartungsgemäß eine glatte Oberfläche auf (Abb. 22, A). Bereits nach zwei Wochen zeigten sich jedoch gewisse Unregelmäßigkeiten der Knorpeloberfläche mit teilweiseem Verlust der glatten Mukoproteinschicht (Lamina splendens), wodurch darunterliegende Kollagenfibrillen demaskiert und sichtbar gemacht wurden. In diesem Fasergerüst bildeten sich z.T. deutliche „Hügel“, die über die Knorpelzebene hinausragten (Abb. 23). Dies spricht am ehesten für von Kollagenfasern ummantelte Chondrozyten, die sich aus dem einst festen Gefüge der EZM zu lösen beginnen. Daneben wurden vereinzelt Aufbrüche des oberflächlichen Kollagengerüsts mit darunter liegenden leeren Chondrozytenhöhlen gefunden. Dieser punktuelle Faserkollaps kann als ursächlich für die Freisetzung und Mobilisation von Knorpelzellen aus ihren einst fest in der Matrix verankerten Chondrozytenhöhlen bewertet werden (Abb. 22, B).

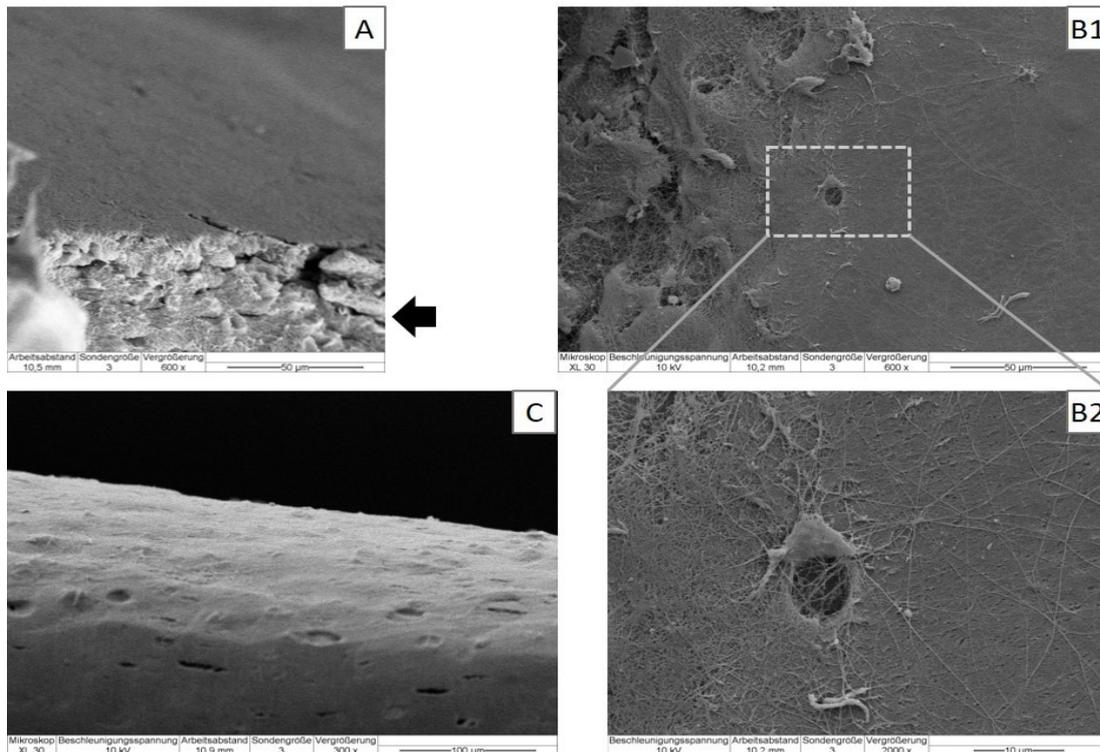


Abb. 22: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche boviner Knorpelstanzen nach einer Kultur von zwei Wochen (B+C) im Vergleich zu frischem Knorpel (A).

(A): Glatte Oberfläche einer frisch entnommenen bovinen Knorpelstanze; der Pfeil deutet auf den Defektrand. (B1): Aufsicht auf Knorpeloberfläche nach 2 Wochen Kultur mit Nähe zum Defektrand (links im Bild). Hier zeigt sich eine geöffnete, leere Chondrozytenhöhle, die unter (B2) nochmals vergrößert dargestellt ist. (C): Seitliche Sicht auf eine Knorpeloberfläche nach 2-wöchiger Kultur. Originalvergrößerungen: (A) und (B1) 600x, (B2) 2000x, (C) 300x.

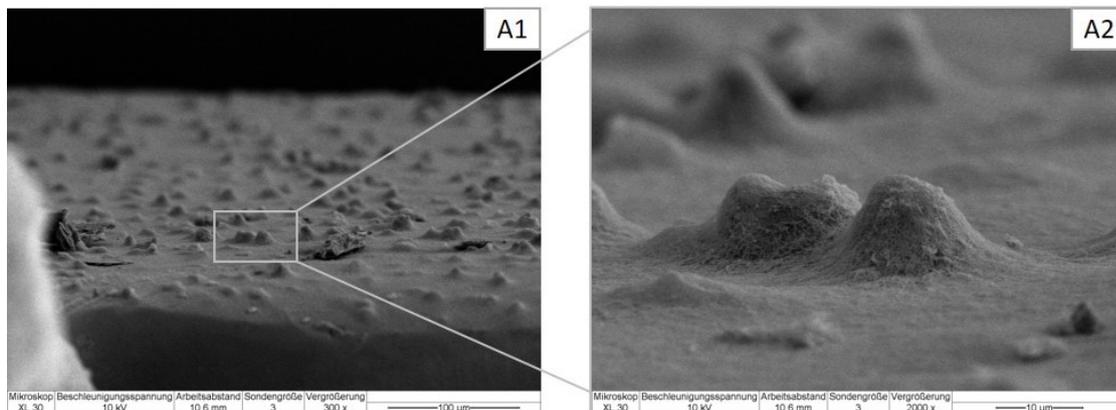


Abb. 23: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche nach einer Kultur von zwei Wochen.

Dargestellt ist die Knorpeloberfläche nach 2-wöchiger Gewebekultur in seitlicher Aufsicht (A1). Diese „Hügellandschaft“ scheint durch Chondrozyten gebildet zu sein, die nur noch von einer dünnen EZM-Schicht ummantelt sind. Ausschnittvergrößerung in (A2). Originalvergrößerungen: (A1) 300x, (A2) 2000x.

Weiterhin wurden in den 2-Wochen-Stichproben der beiden **zellfreien Ansätze (ZF- und ZF+)** bereits vereinzelt und in den darauffolgenden Kulturzeitpunkten zunehmend mobilisierte Chondrozyten auf der Knorpeloberfläche detektiert. Dabei zeigten die

freigesetzten Zellen in frühen Kulturzeitpunkten entweder einen sphärischen oder einen spindelförmigen Phänotyp. Im weiteren Kulturverlauf dominierte der fibroblastenartige Phänotyp. Die Chondrozyten mit ihren weiten Zellausläufern bildeten dabei flächige, auf der Knorpeloberfläche aufliegende Zellrasen mit Monolayer-artigem Erscheinungsbild (Abb. 24, B1+B2). Nach 8 Wochen war dieser Zellrasen so dicht, dass eine Abgrenzung einzelner Zellen nicht mehr möglich war. Anhand der Ausbildung einer solchen dichten Zellmasse muss nach genauer Betrachtung der REM-Aufnahmen vermutet werden, dass die dem Knorpel aufliegenden Chondrozyten lokal EZM bildeten und somit eine „Remaskierung“ der oberflächlichen Knorpelschicht bewirkten (Abb. 24, C1+C2). Nach 12-wöchiger Kultur nahmen die dem Knorpel aufliegenden Zellen wieder einen rund-ovalen Typ an (Abb. 24, D2). Dieser erneute Übergang in den chondrozyttypischen, sphärischen Phänotyp wurde besonders an Stellen beobachtet, an denen eine hohe Zelldichte vorherrschte (wie z.B. am Knorpelring-Implantat-Übergang). Allerdings ließen sich nach einer Kultivierungsdauer von 12 Wochen auch wieder vermehrt Lücken im einst den Knorpelring komplett bedeckenden Zellrasen detektieren. Insgesamt zeigten sich auf der Oberfläche der Knorpelringe nach Ablauf der Langzeitkultur häufig ungeordnete und instabil wirkende Gewebe- und Zellformation, was auf eine Degeneration hindeutet (Vgl. D2 in Abb. 26, Seite 63).

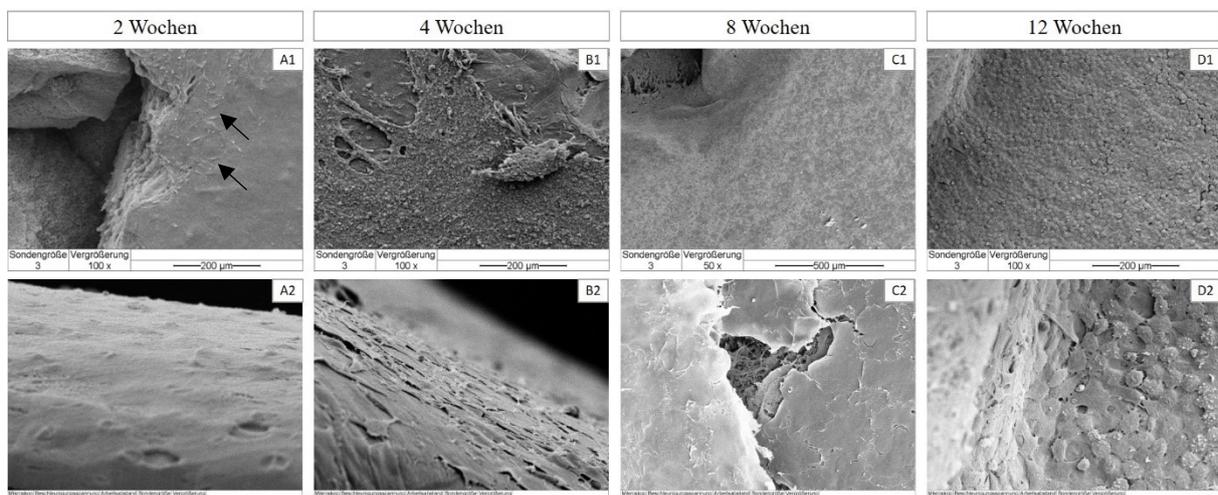


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche und der Migration von Chondrozyten auf den Knorpelring im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Auswahlbilder von initial zellfreien Proben (ZF-, ZF+) zur Veranschaulichung des Wuchsbildes ausgewanderte und auf der Knorpeloberfläche proliferierender Chondrozyten im Kulturverlauf von 2 bis 12 Wochen. Während nach 2 Wochen bereits einzelne ausgewanderte Zellen zu erkennen sind (A1, Pfeile), scheint nach 4 Wochen auf der Knorpeloberfläche eine massive lokale Zellmigration -und proliferation mit Ausbildung eines deutlichen Zellrasens ähnlich einer Monolayer-Kultur stattgefunden zu haben (B1+B2). Dieser Zellrasen formte im weiteren Verlauf eine dichte, den gesamten Knorpel überdeckende Masse aus flachen, stark konfluierenden und kaum abgrenzbaren Chondrozyten (C1+C2). Nach 12 Wochen zeigten die dicht gedrängten Zellen erneut einen sphärischen Phänotyp (D1+D2). In der unteren Zeile sind Vergrößerungen zur genaueren Beurteilung der Knorpeloberfläche (A2) bzw. der Zellmorphologie (B2-D2) pro Zeitpunkt abgebildet. Originalvergrößerungen: (A1, B1, D1) 100x, (C1) 50x, (A2-D2) 600x.

Im Unterschied zu den zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) fiel bei den initial zellbeladenen Proben (**ZB**) nach 2 Wochen eine erheblich stärkere Zellbesiedlung der Knorpeloberfläche auf (Vgl. Abb. 26, Seite 63). Durch diese sehr frühe fast lückenlose Zellauflagerung konnte die Knorpeloberflächenmorphologie mittels der REM-Untersuchung in den frühen Kulturzeitpunkten nicht genau untersucht werden. Jedoch ist mit Bezugnahme auf die lichtmikroskopischen Analysen auch hier von einem Verlust der oberflächlichen Mukoproteinschicht und zunehmenden Erosion im Kulturverlauf auszugehen. Die initial zellbeladenen Knorpel-BNC-Konstrukte (**ZB**) ähneln hinsichtlich der oberflächlichen Zellbesiedlung und Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit des Knorpelrings (Wölbung der Knorpeloberfläche, Lücken im aufliegendem Zellrasen, z.T. pyknisch-avitale Zellen neben ungeordneten Zellhaufen als Zeichen degradierender Prozesse) in den späten Kultivierungszeitpunkten den Proben der zellfreien Ansätze (Vgl. Abb. 26, Seite 63).

Beschaffenheit und Besiedlung des BNC-Implantats

Das dreidimensional perforierte BNC-Gerüst präsentierte sich in den REM-Untersuchungen als eine Art grobporiger Schwamm, dessen Kanalstrukturen nach passgenauer Implantation in den Knorpeldefekt stets geöffnet blieben. In einigen (insbesondere in den frühen Zeitpunkten) untersuchten Proben wies das Implantat einen geringen Spalt zum Knorpeldefektrand auf, was als Artefakt auszulegen ist (Abb. 25, A). Dieser ist höchstwahrscheinlich durch die zur Vorbereitung auf die REM-Untersuchung durchgeführte Kritischpunkttrocknung bedingt, die zu einer diskreten Schrumpfung des BNC-Gerüsts führte. Der direkte Kontakt des Implantats zum Knorpeldefektrand wurde nur selten durch randständige Kanäle unterbrochen (Abb. 25, B). Außerdem zeigte sich erneut die beeindruckende morphologische Ähnlichkeit der Nanocellulose mit dem Kollagengerüst des Knorpels (Abb. 25, C1+C2).

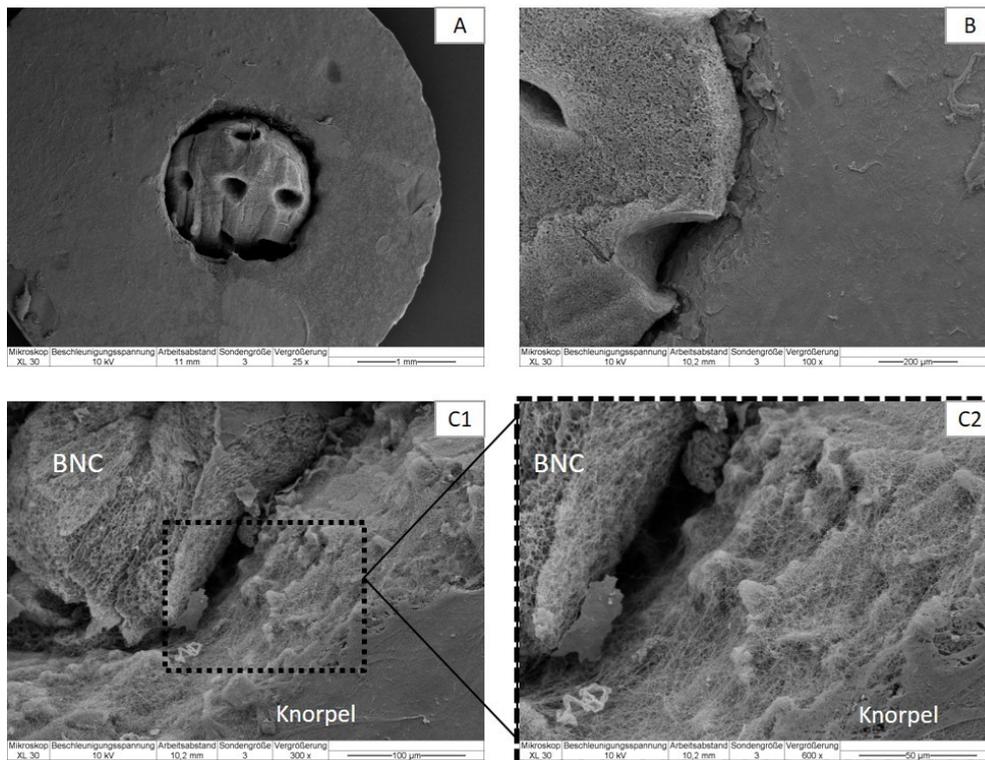


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts.

Knorpelstanze nach Implantation eines zellfreien, dreidimensional modifizierten BNC-Inserts (A). Es konnte ein ausreichender Knorpel-Implantat-Kontakt hergestellt werden (B). Die Ausschnittvergrößerung im Bereich des Defektrandes aus (C1) soll die strukturelle Ähnlichkeit von BNC (links) und dem kollagenen Fasergerüst des Gelenkknorpels verdeutlichen (C2). Originalvergrößerungen: (A) 25x, (B) 100x, (C1) 300x, (C2) 600x.

Während in den REM-Analysen der initial zellfreien Implantate (**ZF-**, **ZF+**) nach 2 Wochen noch keine Knorpelzellen auf der Oberfläche des Cellulosegerüsts zu finden waren, konnten bei den initial zellbesiedelten Proben (**ZB**) bereits eine deutliche oberflächliche sowie dreidimensionale Besiedlung des Implantats nachgewiesen werden. Die Chondrozyten formten hierbei sowohl einen sphärischen als auch spindelförmigen bis fibrozytär-flachen Phänotyp mit weiten Ausläufern und engem Zell-Zell-Kontakt. Es zeigten sich über die gesamte BNC-Oberfläche fleckförmig verstreute Zellrasen (Abb. 26, 1. Spalte). Im weiteren Kulturverlauf der (**ZB**)-Proben präsentierte sich der Zellrasen mit flach aufliegenden Chondrozyten auf dem BNC-Gerüst als konfluierende „Membran“, die sich auch innerhalb der Kanäle fortsetzte. Zum Teil erschienen die Zellen bereits nach 4 Wochen kaum noch voneinander abgrenzbar, was für eine lokale Matrixneubildung und damit einhergehenden flächendeckenden Überlagerung (Maskierung) der Nanocellulosefasern spricht. Das BNC-Insert erschien nach 4 und insbesondere 8 Wochen regelrecht in den Knorpeldefekt eingemauert, zu erkennen an den fast verschwommenen Defekträndern (Abb. 26, 3. Spalte). Interessanterweise wurden durch die starke Zunahme der oberflächlichen BNC-Zellbesiedlung im Kulturverlauf auch einzelne Laserkanäle des Implantats überwuchert, zu

erkennen an einem als dünne Zellschicht imponierenden „Deckel“ (Abb. 26, D1). Schließlich zeigte sich am Ende der 12 Wochen eine fast komplette Integration des Implantats im Gewebsdefekt. Ein vollständiger Einbau im Sinne einer den gesamten Defekt ausfüllenden kartilaginären Oberfläche war allerdings nicht festzustellen. Stattdessen wurden insbesondere nach 12 Wochen neben den zunehmend ungeordneten Zellansammlungen auch vereinzelt avitale Chondrozyten mit pyknischen Zellkörpern auf der BNC entdeckt (Abb. 26, D3).

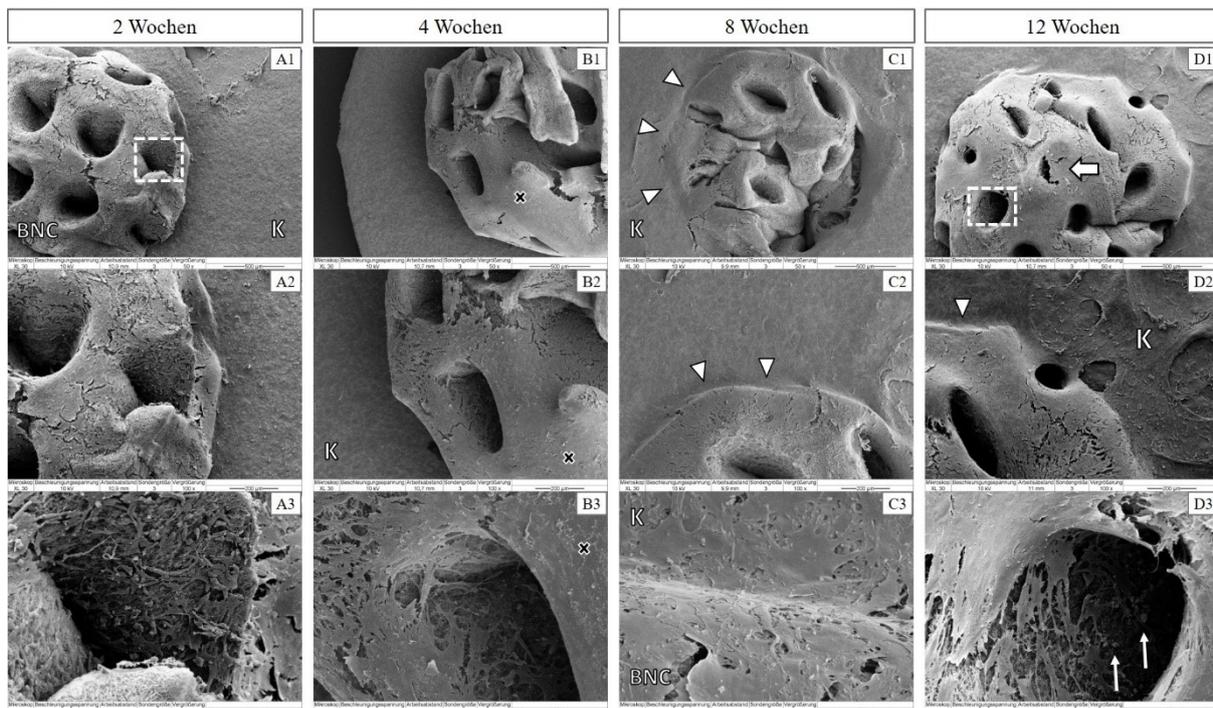


Abb. 26: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der oberflächlichen und dreidimensionalen BNC-Besiedlung initial zellbesiedelter Implantate (ZB) im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Knorpel-BNC-Kokulturen zur Veranschaulichung der Integration der initial zellbesiedelten 3D-modifizierten Implantate in den Knorpeldefekt nach *in vitro*-Kultur von 2 bis 12 Wochen. Zur genaueren Beurteilung des Wachstumsmusters und Zellmorphologie sind in den unteren Zeilen Ausschnittvergrößerungen A2-D3 abgebildet. „K“=Knorpeloberfläche (meist durch aufliegenden Zellrasen verdeckt). „BNC“=Implantat. Die Kreuze in (B1-3) zeigen auf den stark konfluierenden, scheinbar EZM bildenden Zellrasen auf dem BNC-Material. In den 8- und 12-Wochen-Kulturen ist eine deutliche „Integration“ des Implantats in den Knorpeldefekt erkennbar (Dreiecke deuten auf den Knorpel-BNC-Übergang). Der dicke Pfeil in (D1) zeigt auf einen überwachsenen Kanaleingang. Die Knorpeloberfläche der nach 12 Wochen untersuchten Gewebekulturen weist neben einer massiven, aber z.T. lückenhaften Zellbesiedlung eine unruhige Oberfläche als Zeichen einer möglichen fortgeschrittenen Erosion auf (D2). Weiße Pfeile in (D3) zeigen auf pyknische, avitale Chondrozyten im Kanal. Originalvergrößerungen: A1-D1) 50x, A2-D2) 100x, A3-D3) 300x.

Zwischen den beiden zellfreien Ansätze (ZF+, ZF-) ließ sich hinsichtlich der oberflächlichen bzw. dreidimensionalen BNC-Besiedlung kein Unterschied in den REM-Untersuchungen feststellen. Trotz des fehlenden Nachweises einer frühen BNC-Besiedlung nach 2 Wochen war nach 4 Wochen bereits eine deutliche Zellmigration zu erkennen. So zeigte sich hier eine vom Defektrand ausgehende, gürtelförmige Besiedlung des angrenzenden BNC-Gerüsts (Abb. 27, B1-3). Hierbei präsentierten sich auf dem Knorpelrand aufliegende, flache

Zellkörper, die mit ihren langen zytoplasmatischen Ausläufern netzartig in Richtung BNC-Implantat zu greifen schienen und dort gezielt adhärirten (Abb. 27, B3). Im weiteren Kulturverlauf fand sich ein fast die gesamte Fläche des Implantats überwachsender Zellrasen mit zunehmender dreidimensionaler Besiedlung der Kanalstrukturen. Der Zellrasen bildete eine undurchsichtige Platte aus, wobei auch hier die Bildung von EZM zu vermuten ist (Abb. 27, C1-C3). Das BNC-Insert ließ sich bereits nach 8 Wochen kaum noch vom Defektrand abgrenzen, was für eine gute Integration und gleichmäßige Defektabdeckung spricht. Nach 12 Wochen konnte wiederum ein Überwachsen von einzelnen Kanälen mit einem dünnen Zellrasen nachgewiesen werden (Abb. 27, D1-D3). Bei genauer Betrachtung dieses „Deckels“ fiel ein feinstrukturiertes Netzwerk auf, ähnlich der fibrilliären Gestaltung von Kollagenfasern (Abb. 28). Dieses Bild bestätigt die zuvor beschriebene Neubildung von extrazellulärer Matrix, ausgehend von den auf die Oberfläche der BNC migrierten Chondrozyten. Zudem fanden sich wiederum in den über 12 Wochen kultivierten Proben vereinzelt avitale Zellen sowohl auf der BNC-Oberfläche als auch innerhalb der Kanäle (Abb. 27, D3). Insgesamt ließen sich jedoch in der Mehrheit vitale Chondrozyten mit abgeflachten Zellkörper bzw. - insbesondere nach 12 Wochen- erneut rund-ovale Zellen mit einem chondrozytären Phänotyp nachweisen.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass die Besiedlung und Integration des Implantats in den Gewebsdefekt der initial zellfreien Proben (**ZF-**, **ZF+**) spätestens nach 8 Wochen den Befunden der initial zellbesiedelten Proben (**ZB**) entsprach (Vgl. Abb. 26 und Abb. 27)

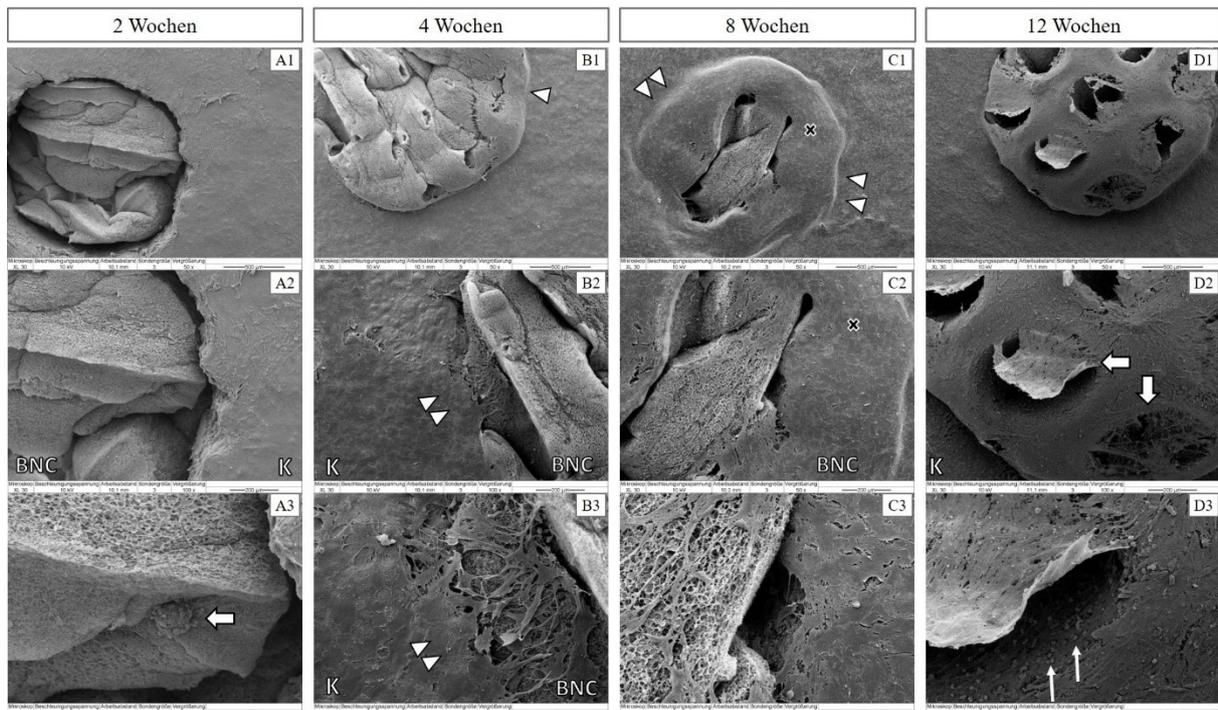


Abb. 27: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der oberflächlichen und dreidimensionalen BNC-Besiedlung initial zellfreier Implantate (ZF-/ZF+) im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Knorpel-BNC-Kokulturen bezüglich der Integration der initial zellfreien 3D-modifizierten Implantate in den Knorpeldefekt nach *in vitro*-Kultur von 2 bis 12 Wochen. Zur genaueren Beurteilung des Wachstumsmusters und der Zellmorphologie sind in A2-D3 Ausschnittvergrößerungen abgebildet. „K“=Knorpeloberfläche. „BNC“=Implantat. Die „Integration“ des Implantats in den Knorpeldefekt ist bereits in den 4-Wochen- und noch deutlicher in den 8-Wochen-Proben erkennbar (Dreiecke deuten auf den Knorpel-BNC-Übergang). In (B3) sind die fingerförmigen Ausläufer ausgewanderter Chondrozyten zu erkennen. Die Kreuze in der 8 Wochen-Kultur weisen auf den konfluierenden, EZM-bildenden Zellrasen auf dem BNC-Material hin. Dicke Pfeile in (D2) weisen auf überwachsene Kanaleingänge. Weiße Pfeile in (D3) zeigen auf avitale Chondrozyten im Kanaleingang. Originalvergrößerungen: A1-D1) 50x, A2-D2) 100x, A3-D3) 300x.

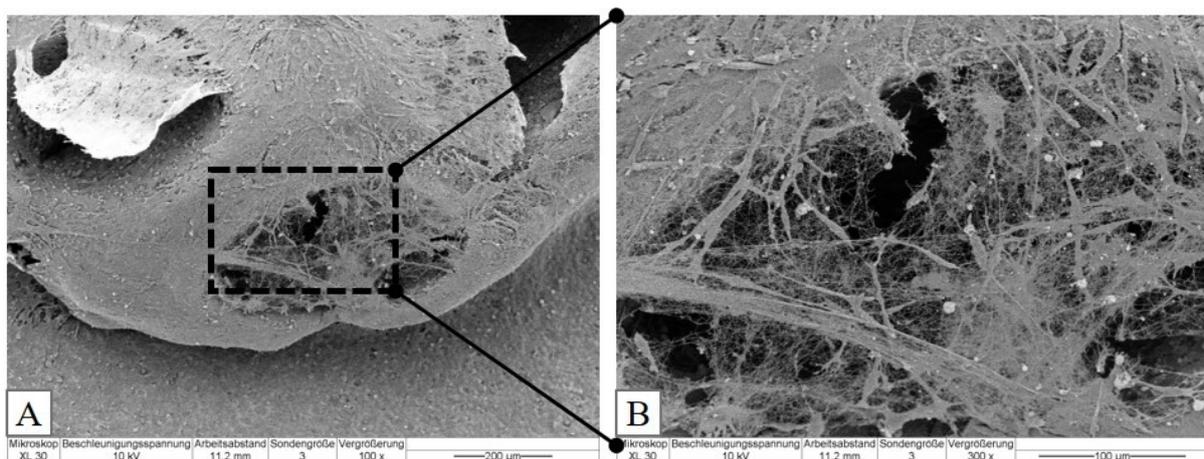


Abb. 28: Darstellung der Oberflächenmorphologie eines initial zellfreien BNC-Implantats nach einer Kultur von 12 Wochen im bovinen Regenerationsmodell.

Nachweis einer EZM-Bildung mit schleierhafter Überdeckung des Kanaleingangs (B), ausgehend von auf das Implantat migrierten Chondrozyten. Originalvergrößerungen: A) 100x, B) 300x.

5.3 Histologische Darstellung des Proteoglykangehalts der Knorpel-BNC-Konstrukte (Safranin-O/Lichtgrün – Färbung)

Für die fokussierte Betrachtung der Matrixhomöostase und Matrixsynthese im kultivierten Knorpel-BNC-Regenerat wurden neben der HE-Übersichtsdarstellung weitere Paraffinschnitte mit Safranin-O/Lichtgrün gefärbt. Diese Methode dient dem lichtmikroskopischen Nachweis von Proteoglykanen (PG). PG besitzen negativ geladene Gruppen, woran sich der Farbstoff anlagert und entsprechend proteoglykanhaltige Bereiche orange-rot darstellt. Lichtgrün lagert sich wiederum an Kollagene an, sobald diese durch Verlust von Proteoglykanen zugänglich werden. Grün gefärbte Bereiche kennzeichnen somit degenerative Prozesse durch Verlust von PG. Dabei ist jedoch aufgrund der niedrigen Detektionssensitivität für geringe PG-Verluste eine semiquantitative Analyse nur begrenzt aussagefähig, weshalb die folgenden Ergebnisse deskriptiven Charakter besitzen.

Über den gesamten Kulturverlauf von 12 Wochen zeigte sich ausnahmslos eine intensive Rotfärbung des Knorpels ohne Nachweis demaskierter Bereiche, was für eine gute Knorpelhomöostase und somit eine ausreichende Nährstoffversorgung der Knorpelimplantate während der gesamten *in vitro* Langzeitkultivierung spricht (Abb. 29). Lediglich schmale oberflächliche Bereiche des Knorpels erschienen im Kulturverlauf zunehmend blasser, was wahrscheinlich auf die Oberflächenerosion des Explantats zurückzuführen ist. Die Defektränder zeigten schon in frühen Kultivierungsstadien einen ausgebleichten Saum, wahrscheinlich durch das Auswaschen von Matrixbestandteilen nach initialer mechanischer Defektsetzung. Insgesamt waren bei dieser histologischen Darstellung im Kulturverlauf keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Kultivierungsansätzen erkennbar.

Interessanterweise fanden sich in den Bereichen ausgewanderter Zellen auf der Knorpeloberfläche bzw. der BNC-Oberfläche z.T. rote Farbreaktionen als Nachweis einer extrakartilaginären Proteoglykaneubildung. Dieses Phänomen wurde bei einzelnen (**ZF+**)- und (**ZB**)-Proben beobachtet (Abb. 29 und Abb. 30), aber nicht bei den (**ZF-**)-Proben.

Außerdem wurden in dieser Arbeit insbesondere bei den zellbesiedelten Proben (**ZB**) erstmals auch PG-Einlagerungen im Bereich zellbesiedelter Kanalstrukturen im Zentrum des BNC-Gerüsts detektiert (Abb. 30, C).

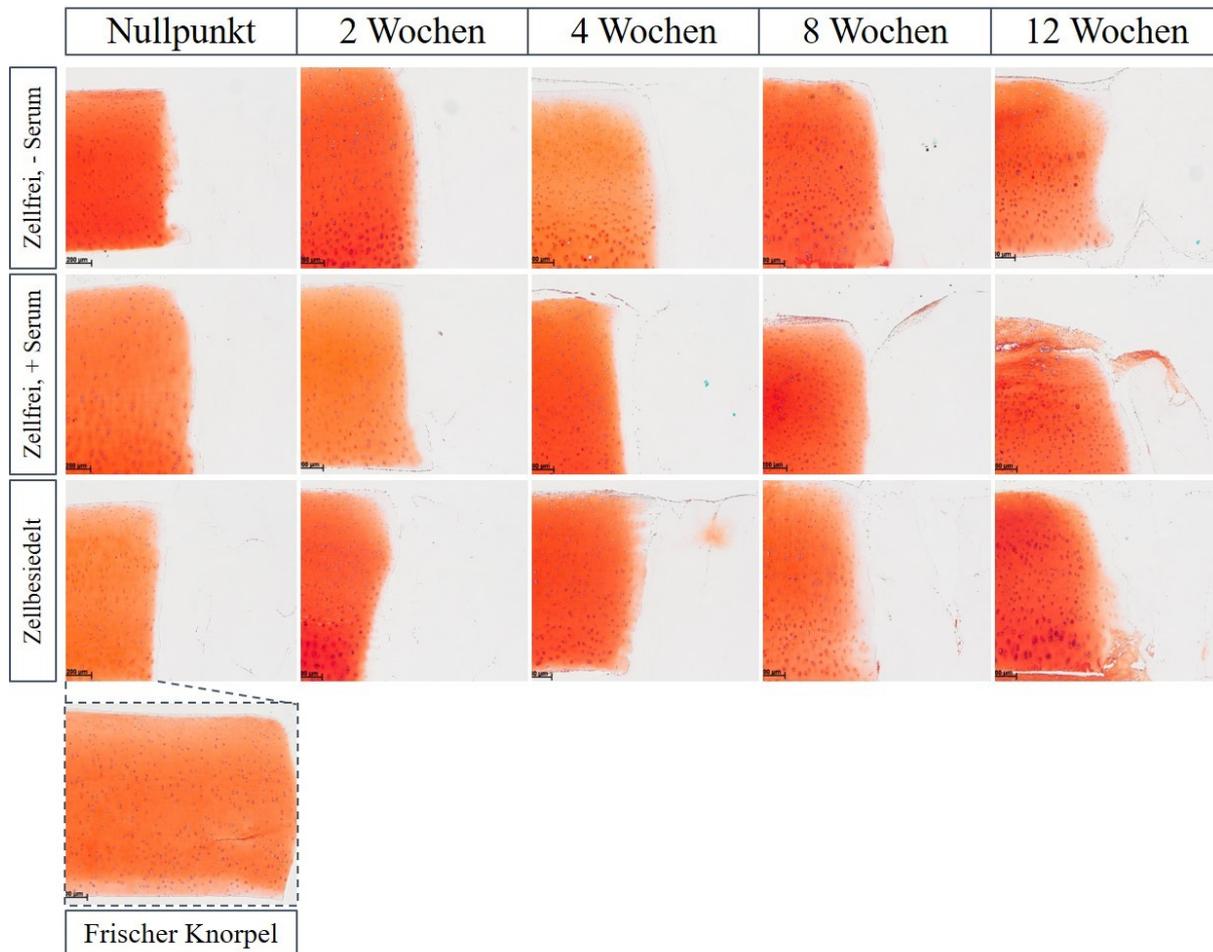


Abb. 29: Lichtmikroskopische Darstellung des Proteoglykangehalts im Knorpel-BNC-Konstrukt im Verlauf der *in vitro* Kultur.

Dargestellt sind repräsentative Vertikalschnitte von Knorpel-BNC-Regeneraten im Verlauf der *in vitro*-Langzeitkultur unter Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze. Neben einem stabilem PG-Gehalt im Knorpelimplantat zeigte sich auch ein positives Signal im Bereich ausgewandelter Chondrozyten und innerhalb des Cellulosegerüsts. Safranin-O/Lichtgrün-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

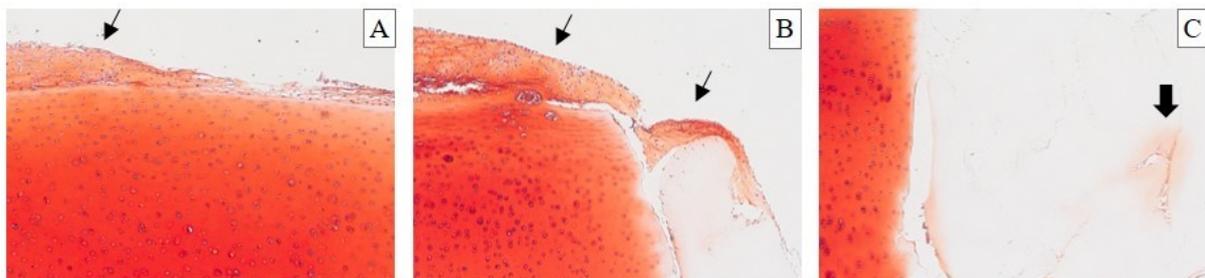


Abb. 30: Histologische Darstellung der Proteoglykan-Neosynthese im Knorpel-BNC-Regenerat.

Dargestellt sind Knorpel-BNC-Konstrukte nach *in vitro* Kultur von 8 (A) und 12 Wochen (B+C) aus den Ansätzen ZF+ (A+B) bzw. ZB (C). (A+B): Auf den Knorpel ausgewanderte und auf das BNC-Implantat migrierte Chondrozyten formen eine PG-haltige Interzellulärsubstanz (schräge Pfeile). (C): Nachweis einer PG-Einlagerung innerhalb des Knorpeldefekts, ausgehend von zellbesiedelten Implantatkanälen (dicker Pfeil). Safranin-O/Lichtgrün-Färbung von Paraffinschnitten. Originalvergrößerung: 40x.

5.4 Immunhistochemische Analysen im *in vitro* Regenerationsassay

Um den Einfluss der Langzeit-Kulturbedingungen auf die Knorpelhomöostase des Explantats und dessen Regenerationsverhalten innerhalb der Knorpel-BNC-Kokultur zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Matrixkomponenten immunhistochemisch analysiert. Dafür wurden die Paraffinschnitte mit Antikörpern gegen Aggrekan und Kollagen II als typische Bestandteile des gesunden Gelenkknorpels sowie Kollagen I als Marker für degenerative Prozesse überschichtet. Die abschließende DAB-Färbung führte bei Vorhandensein des entsprechenden Antigens zu einem braunen Farbsignal im Knorpel-BNC-Regenerat. Hiermit ließ sich der Gehalt des Proteins bzw. Proteoglykans semiquantitativ analysieren. Eine Zusammenstellung der immunhistochemischen mit den dazugehörigen histologischen Färbungen befindet sich im Anhang Seite 132-140, Abb. 43-Abb. 51.

5.4.1 Aggrekan

Die immunhistologische Untersuchung des Knorpelring-Gewebes zeigte über den gesamten Kulturverlauf hinweg einen konstant hohen Aggrekan-Gehalt ohne Anzeichen für qualitative Verluste. Dies bestätigte auch die semiquantitative Auswertung (Abb. 41, Anhang Seite 131). Bei genauerer Betrachtung der Vertikalschnitte konnte das Färbeverhalten entsprechend der typischen regionalen Gliederung des Knorpelgewebes dargestellt werden. So präsentierte sich die Aggrekan-haltige Interzellulärsubstanz im Gegensatz zu den Territorien der Chondrone deutlich intensiver gefärbt (Abb. 31, Frisch). Insgesamt sprach der dauerhaft hohe Aggrekangehalt während der Langzeitkultur für eine stabile Knorpelhomöostase. Somit kann grundsätzlich von einer ausreichenden Nährstoffversorgung des Knorpelimplantats während der *in vitro* Kultur von 12 Wochen ausgegangen werden.

Die auf die Knorpeloberfläche ausgewanderten Chondrozyten zeigten z.T. eine starke perizelluläre Aggrekanablagerung. Dieses Phänomen wurde bereits nach 4 Wochen sowohl in den zellfreien (**ZF+**) als auch zellbesiedelten Proben (**ZB**) beobachtet und lässt analog zu den histologischen Untersuchungen mit H/E und Safranin-O/Lichtgrün auf eine chondrogene (Re)differenzierung der migrierten Zellen mit der Fähigkeit zur Matrixsynthese und Knorpelregeneration schließen. Diese Aggrekan-Neosynthese fand auch in Bereichen mehrlagiger Zellen auf der Oberfläche des BNC-Implantates statt (Abb. 31). Bei der fokussierten Betrachtung des Implantats ließen sich in dieser Arbeit erstmals vielversprechende Ergebnisse bezüglich des regenerativen Potentials im bovinen Knorpelstanzenmodell veranschaulichen. So zeigte sich eine z.T. deutliche Einlagerung dieses Proteoglykans innerhalb des Cellulosegerüsts. Dabei wurde bei den zellfreien Ansätzen (**ZF-**,

ZF+) bereits nach 2 Wochen eine schwache Aggrekan-Einlagerung detektiert. Diese zeigte sich vornehmlich an der Defektgrenze zum Knorpel, weshalb hier entweder von einer defektnahen Synthese oder evtl. auch von einer passiven Verlagerung des Proteoglykans (i.S.e. „Cartilage flow-Phänomens“) vom angrenzenden Knorpelgewebe in das Implantat auszugehen ist. Insgesamt ließ sich im Verlauf der Langzeitkultur in allen Ansätzen eine zunehmende Aggrekan-Einlagerung in das Implantat nachweisen (Abb. 31). Dies führte in einigen Fällen sogar zu einer fast den gesamten Knorpeldefekt ausfüllenden Aggrekanbeladung am Ende der Langzeitkultur (Siehe auch Seite 132-134, Abb. 43-Abb. 45).

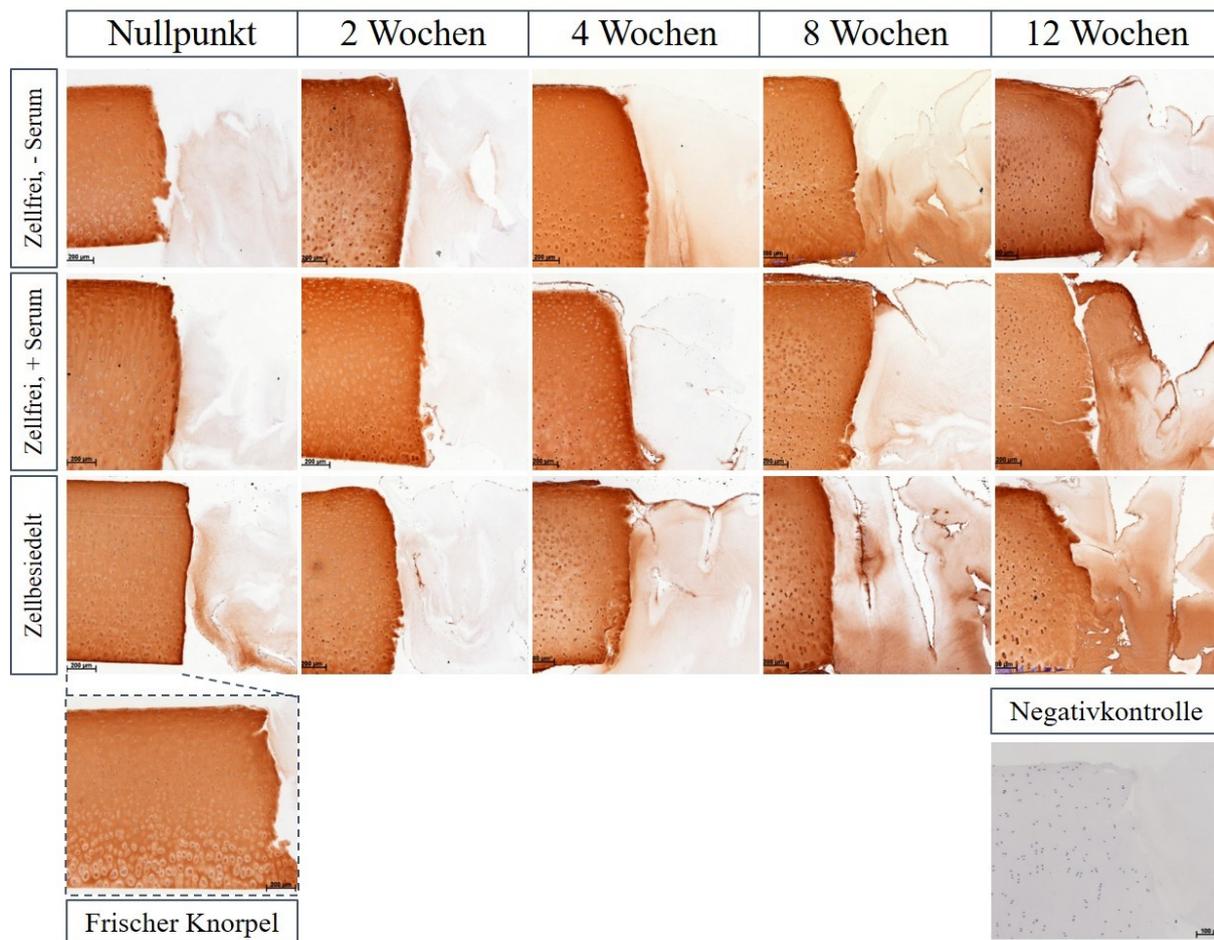


Abb. 31: Immunhistochemische Darstellung von Aggrekan in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Vertikalschnitte von Knorpel-BNC-Regeneraten mit zellfreien (+/-Serum) bzw. initial zellbesiedelten Inserts im Verlauf der *in vitro* Langzeitkultivierung von 0 bis 12 Wochen im Vergleich zur frisch entnommenen Knorpelprobe (Positivkontrolle). Originalvergrößerungen: 40x.

Unter genauerer Betrachtung der extrakartilaginären Matrixneosynthese fiel eine weitere Besonderheit auf, die zuvor schon in den Ergebnissen der H/E-Färbung angedeutet war. So konnte auch hier inmitten des BNC-Implantats eine den Kanal auskleidende, stark Aggrekan-positive Struktur gefunden werden, die dem nativen Knorpelgewebe sehr ähnelte (Abb. 32).

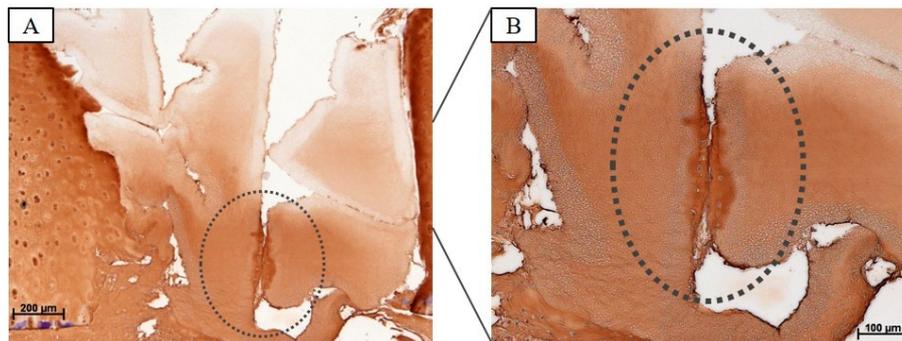


Abb. 32: Zentrale Aggrekan-Einlagerung eines zellbesiedelten BNC-Implantats nach 12 Wochen Kultur. Einzelfall-Abbildung. Es zeigt sich innerhalb eines defektfernen Kanals eine knorpelähnliche Struktur, die hochpositiv für Aggrekan ist. (B): Ausschnittvergrößerung aus (A). Originalvergrößerungen: A) 40x, B) 100x.

Die semiquantitative Analyse ergab für die **zellfreien Implantatproben** eine signifikante Zunahme der Aggrekanbeladung nach 4 Wochen, die im Falle der initial mit Serum inkubierten BNC-Implantate (**ZF+**) anschließend konstant blieb und bei den serumfreien Proben (**ZF-**) nach 12 Wochen leicht abfiel. Die Untersuchung der initial **zellbesiedelten Proben (ZB)** ergab eine sukzessive signifikante Zunahme der Aggrekaneinlagerung im BNC-Implantat bis zum Zeitpunkt 8 Wochen. Zwischen den 3 verschiedenen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB) wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Aggrekanvorkommens im Implantat im Kulturverlauf gefunden (Abb. 33).

Aggrekan-Beladung des BNC-Implantats

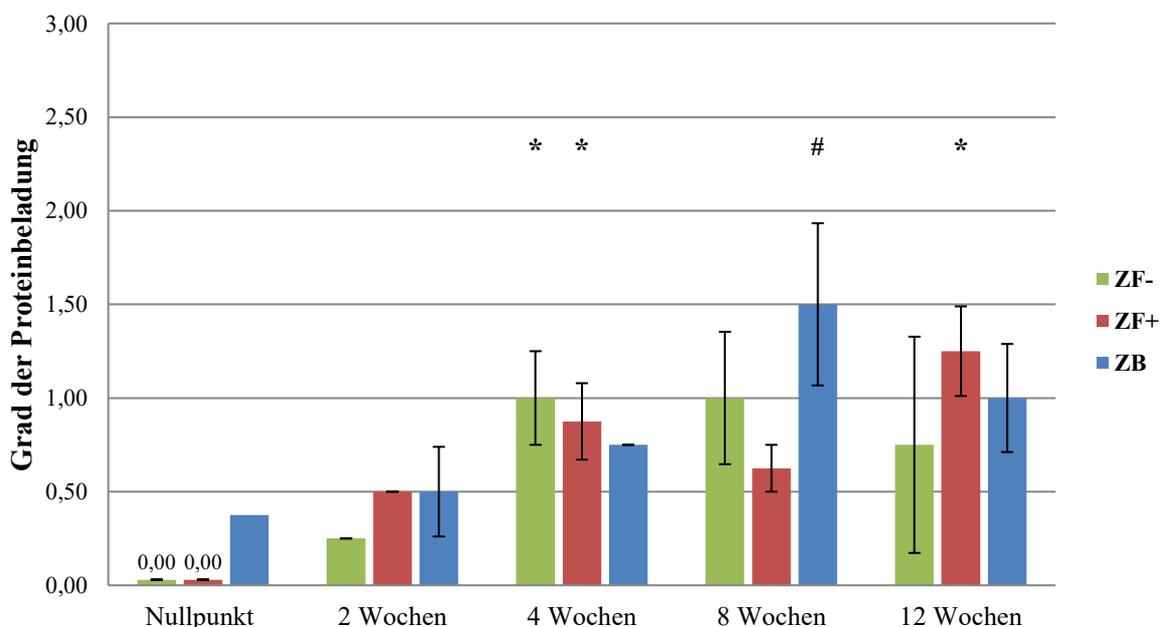


Abb. 33: Semiquantitative Analyse der Aggrekan-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = starke DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz (Frischknorpel). Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, #) vs. 2 Wochen.

5.4.2 Kollagen II

Kollagen II stellt einen entscheidenden Marker für die Beurteilung der Matrixbeschaffenheit von kartilaginärem Gewebe dar. In der immunhistologischen Auswertung der in dieser Arbeit kultivierten Knorpelringe ließ sich stets eine deutliche Positivität für Kollagen Typ II nachweisen. Semiquantitative Analysen bestätigten ebenfalls den nahezu konstant hohen Kollagen II-Gehalt des bovinen Knorpelgewebes über den gesamten Kultivierungszeitraum von 12 Wochen (siehe Abb. 42, Anhang Seite 131). In den Vertikalschnitten präsentierte sich eine homogene Kol-2-Färbung des Knorpelgewebes unter Aussparung einer dünnen oberflächlichen Schicht sowie der Chondrozytenhöhlen (Abb. 34, Frisch). Analog zu den Aggrekanfärbungen wurde im Kulturverlauf auch eine Kollagen-II-Expression im Bereich ausgewanderter und auf dem Knorpel sowie der Nanocellulose adhärierter Zellen beobachtet. Im Verlauf der Langzeitkultur war überdies eine deutliche Zunahme der Kollagen-II-Beladung innerhalb des BNC-Implantats erkennbar (Abb. 34).

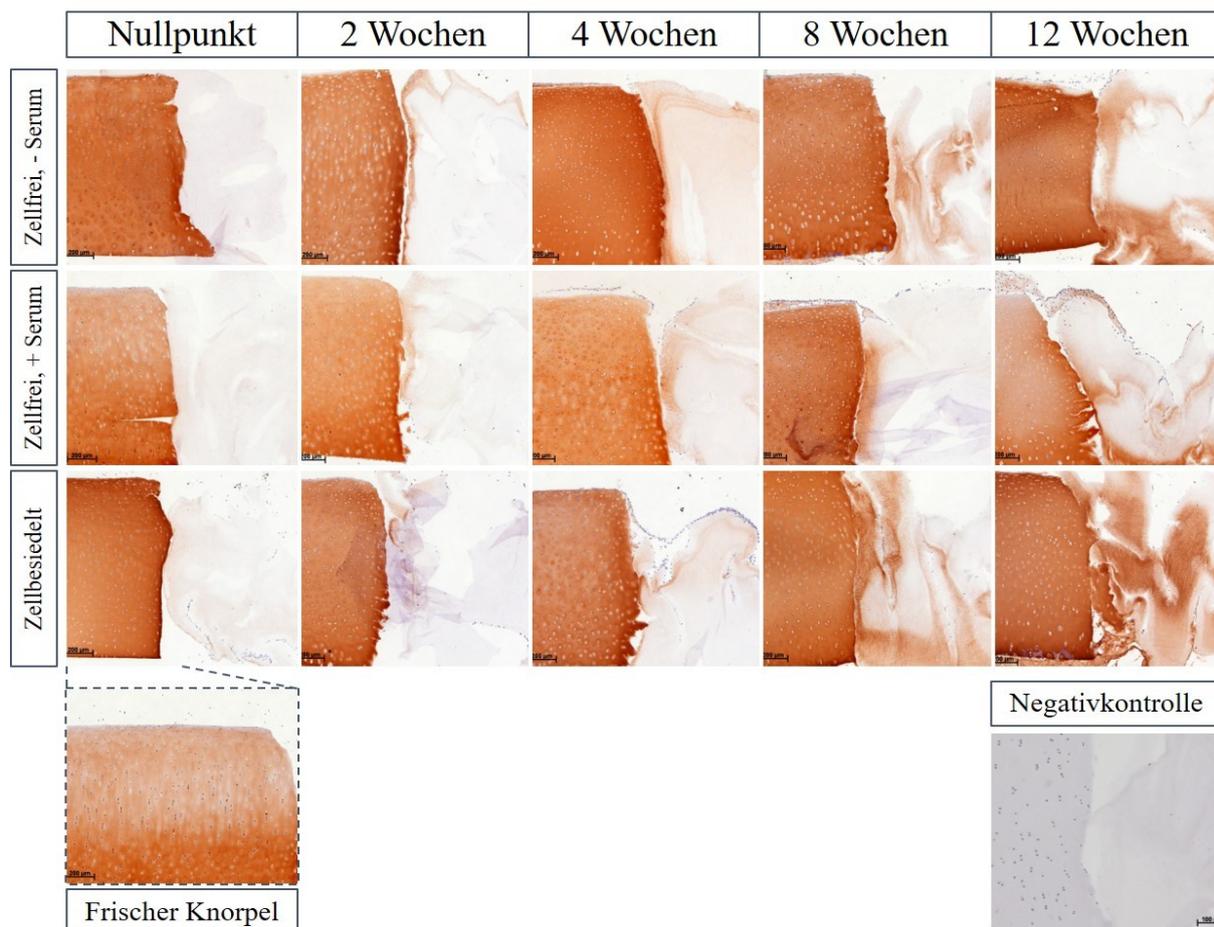


Abb. 34: Immunhistochemische Darstellung des Kollagen II-Gehalts in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Vertikalschnitte von Knorpel-BNC-Regeneraten mit initial zellfreien (+/- Serum) bzw. zellbesiedelten Inserts im Verlauf der *in vitro* Langzeitkultivierung von 0 bis 12 Wochen. Referenz: frisch entnommene Knorpelprobe (Positivkontrolle). Originalvergrößerungen: 40x.

Die semiquantitative Auswertung bestätigte die sichtbar zunehmende Kollagen II-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf (Abb. 35). Hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**) nachgewiesen. Erste Einlagerungen in den randständigen Bereichen des Cellulosegerüsts fanden sich dabei schon nach 2 Wochen. Bei den (**ZF-**)-Proben zeigte sich eine erste signifikante Kollagen-II-Beladung des Implantats nach 4 Wochen mit anschließend zunehmender Proteineinlagerung bis zum Erreichen eines Maximums nach 12 Wochen. Bei den (**ZF+**)-Proben wurde dagegen bereits zum Zeitpunkt 2 Wochen eine signifikante Kol-2-Beladung im Implantat mit anschließender Zunahme über den weiteren Kulturverlauf beobachtet. Der (**ZB**)-Ansatz wies ebenso eine sehr frühe signifikante Kollagen II-Beladung des Implantats auf (2 Wochen). Nach einer vorübergehenden Abnahme zum Zeitpunkt 4 Wochen wurde auch hier im weiteren Kulturverlauf ein zunehmender Kol-2-Gehalt mit Maximum nach 12 Wochen nachgewiesen (Abb. 35). Dabei schien die frühe, defektnahe Kollagen-II-Einlagerung in die BNC entweder von angrenzenden, syntheseaktiven Knorpelzellen auszugehen oder eventuell auch durch passives „Einsickern“ aus dem eröffnetem Knorpelgewebe zu stammen („Cartilage flow“). Die Kollagen-II-Synthese und -Einlagerung in den späteren Kultivierungszeitpunkten erfolgte dagegen offensichtlich durch die Implantat-ständigen Chondrozyten. Histomorphologisch zeigte sich zum Ende der Kultivierungszeit eine z.T. das gesamte Implantat durchgreifende Kol-2-Beladung und damit -Auffüllung des Knorpeldefekts mit gewebstypischer EZM (siehe auch Anhang Seite 132-134, Abb. 43-Abb. 45).

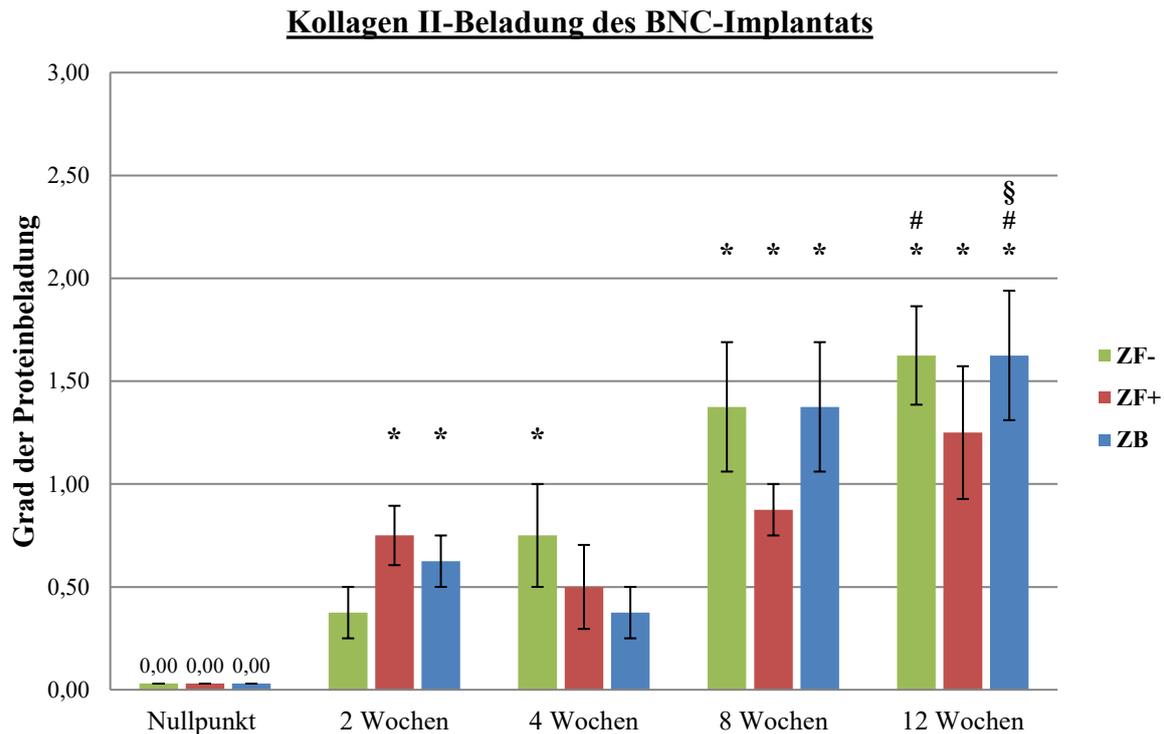


Abb. 35: Semiquantitative Analyse der Kollagen II-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = starke DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz (Frischknorpel). Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, #) vs. 2 Wochen, §) vs. 4 Wochen.

5.4.3 Kollagen I

Kollagen I ist ein Strukturprotein mit natürlichem Vorkommen in Knochen, Dentin, Haut und Sehnen (u.a.) und stellt im hyalinen Knorpel im Allgemeinen einen Marker für Dedifferenzierungsprozesse mit Bindegewebsbildung dar. Interessanterweise wurde durch die in dieser Arbeit verwendete immunhistochemische Methode Kollagen I sogar schon in den frischen bovinen Knorpel explantaten detektiert (Abb. 36 und Abb. 38, A). Dabei beschränkte sich das spezifische Färbeverhalten auf eine dünne, dem Knorpel aufliegende Schicht sowie ein schwaches positives Signal im perizellulären Bereich der Chondrozyten der Superfizialschicht und z.T. auch der tiefer liegenden Knorpelzonen. Im Vergleich zum Kollagen I-Gehalt im Knochen (Referenz) war das Signal im Knorpelgewebe jedoch deutlich schwächer. Im Verlauf der Langzeitkultivierung fiel eine dezente Zunahme von Kollagen I im Knorpelring auf, insbesondere in der Superfizial- und Übergangszone. Dies kann evtl. als unspezifische Reparaturantwort auf die Knorpelerosion interpretiert werden (Abb. 36).

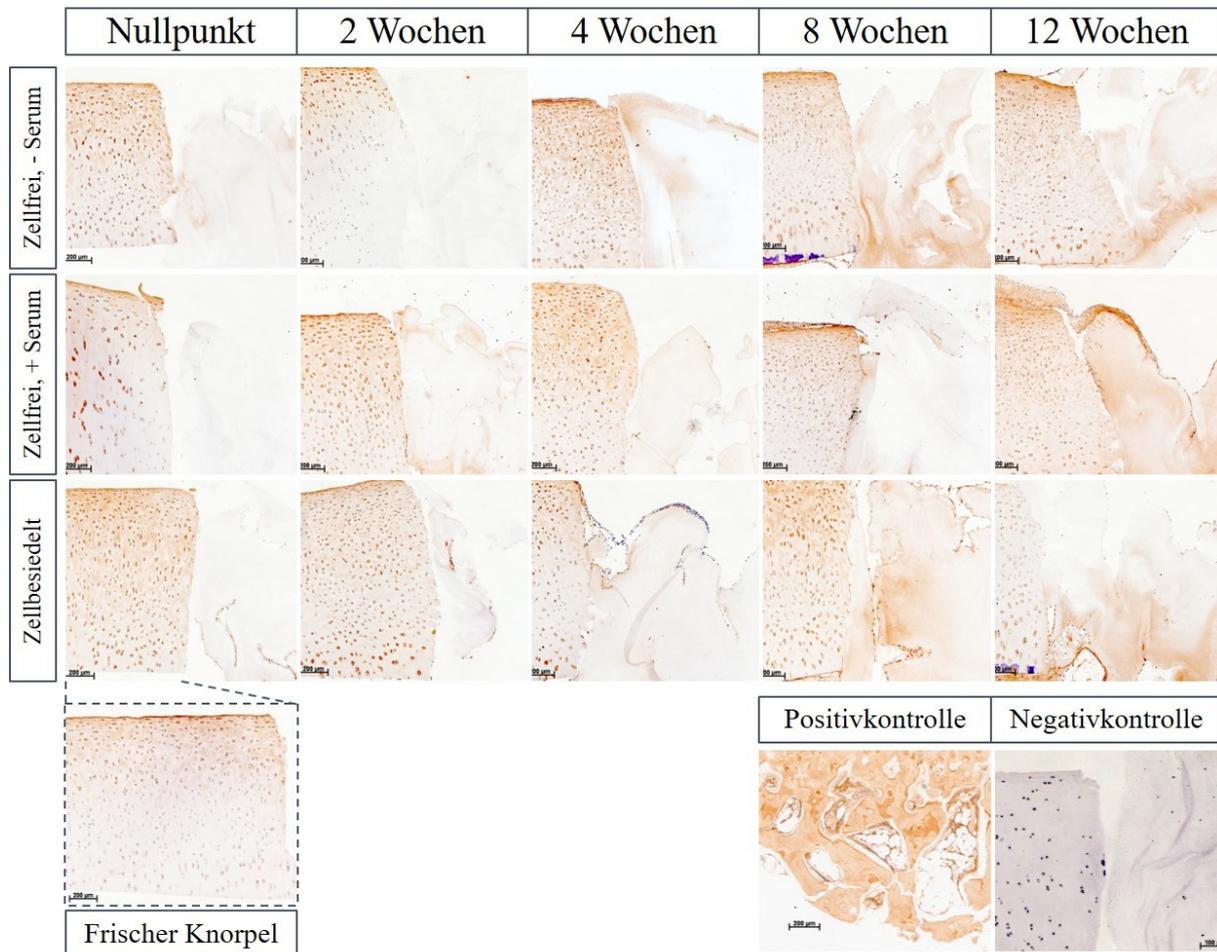


Abb. 36: Immunhistochemische Darstellung des Kollagen-I-Gehalts in Knorpelring und BNC-Implantat im Kulturverlauf.

Dargestellt sind Stichprobenaufnahmen von Knorpel-BNC-Regeneraten mit initial zellfreien (+/- Serum) bzw. zellbesiedelten Inserts im Verlauf der *in vitro* Langzeitkultivierung von 0 bis 12 Wochen im Vergleich zur frisch entnommenen Knorpelprobe. Referenz: Knochenbälkchen (Positivkontrolle). Originalvergrößerungen: 40x, Negativkontrolle: 100x.

Die semiquantitative Analyse verdeutlicht diesen Sachverhalt (Abb. 37). Bei den initial zellfreien Proben (**ZF-**, **ZF+**) zeigte sich insgesamt nur eine sehr schwache Zunahme des Kollagen-I-Gehalts **im Knorpelring**. Lediglich die initial zellbesiedelten Proben (**ZB**) wiesen nach 8 und 12 Wochen einen signifikanten Anstieg der Kol.-I Beladung gegenüber den frischen Gewebeproben („Nullpunkt“) auf. Eine deutliche Mehrsynthese von Kol-1 innerhalb des **ZB**-Ansatzes im Vergleich zu den beiden zellfreien Ansätzen (**ZF-**, **ZF+**) wurde nicht festgestellt. Interessanterweise wurde nach der 4-tägigen Vorkultur bei den zellfreien Knorpel-BNC-Konstrukten ohne Serumvorinkubation (**ZF-**) im Vergleich zum zellfreien Ansatz *mit* Serumvorinkubation (**ZF+**) ein tendenziell höherer Anstieg des Kol-1-Gehalts beobachtet (Abb. 37, hier mit Darstellung des „frisch“-Zeitpunkts zum Vergleich).

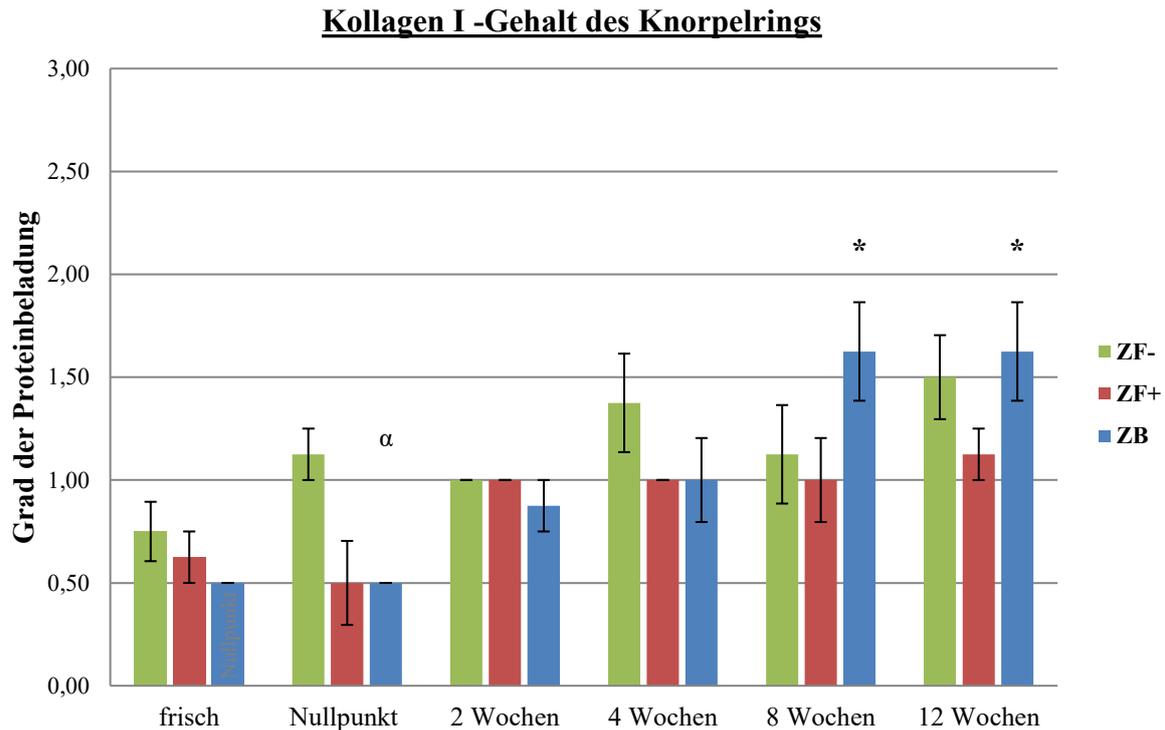


Abb. 37: Semiquantitative Analyse des Kollagen I-Gehalts des Knorpelrings im Kulturverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = starke DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz = Knochen. Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, α) vs. ZF-. (frisch (ZB) \cong Nullpunkt)

Weiterhin wurde in einigen Knorpel-BNC-Regeneraten im Bereich ausgewanderter und auf den Knorpel bzw. die BNC migrierter Chondrozyten eine Kollagen-I-Synthese nachgewiesen (Abb. 38, B+C). Zudem zeigten bereits die Chondrozyten direkt nach initialer Besiedlung des BNC-Implantats (ZB-Ansatz) eine Kol-I-Positivität zum Nullpunkt (Abb. 38, D). Hieraus kann geschlossen werden, dass die zuvor in einer Monolayerkultur expandierten Knorpelzellen, mit denen anschließend die BNC-Zylinder beladen wurden, einer gewissen Dedifferenzierung unterlagen und auf die unphysiologischen Kulturbedingungen mit der Synthese von Kollagen I reagierten. Darüber hinaus wurde auch eine schwache Einlagerung von Kollagen I im BNC-Implantat im Kulturverlauf beobachtet (Abb. 36). Diese schien von auf die BNC migrierten Zellen verursacht worden zu sein, da eine frühe laterale Proteinbeladung des Implantatgerüsts ausgehend vom Defektrand (sog. „Cartilage flow“) nicht gesehen wurde. In der semiquantitativen Analyse wurden bei (ZF-) insgesamt keine, bei dem (ZF+)-Ansatz erstmals nach 2 Wochen und bei (ZB) erstmals nach 8 Wochen signifikant erhöhte Kollagen-I-Werte gemessen (Abb. 39). Die leicht zunehmende Kollagen-I-Beladung des BNC-Implantats zeigte im Kulturverlauf insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (Abb. 39).

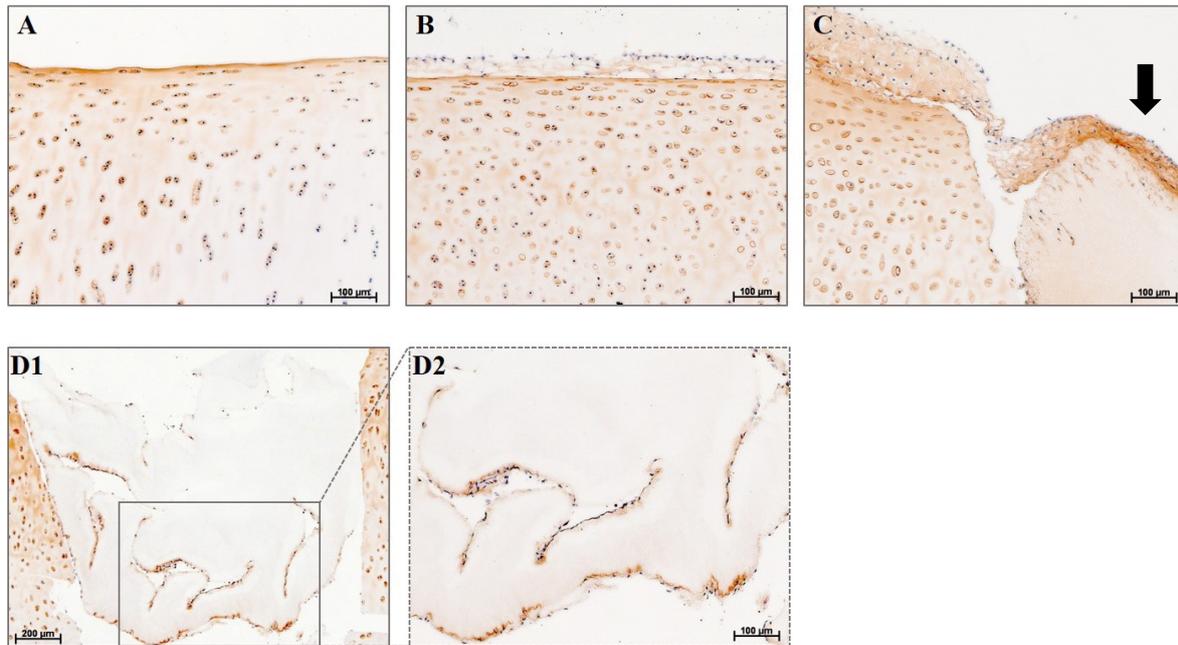


Abb. 38: Immunhistochemische Darstellung des Kollagen-I-Gehalts in frischem Knorpel (A) und der Kollagen I-Synthese durch mobilisierte bzw. allogen besiedelte Chondrozyten (B-D).

Dargestellt sind Auswahlbilder. Es zeigt sich nach 8 Wochen ein positives Signal für Kollagen I im Bereich ausgewandelter Chondrozyten auf der Knorpeloberfläche (B) sowie nach 12 Wochen auf der BNC-Oberfläche (C, Pfeil). (D1) Kol-1-positive Chondrozyten direkt nach artifizeller Implantatbesiedlung (Nullpunkt), daneben in vergrößerter Darstellung (D2). Originalvergrößerungen: A-C, D2) 100x, D1) 40x.

Kollagen I - Beladung des BNC-Implantats

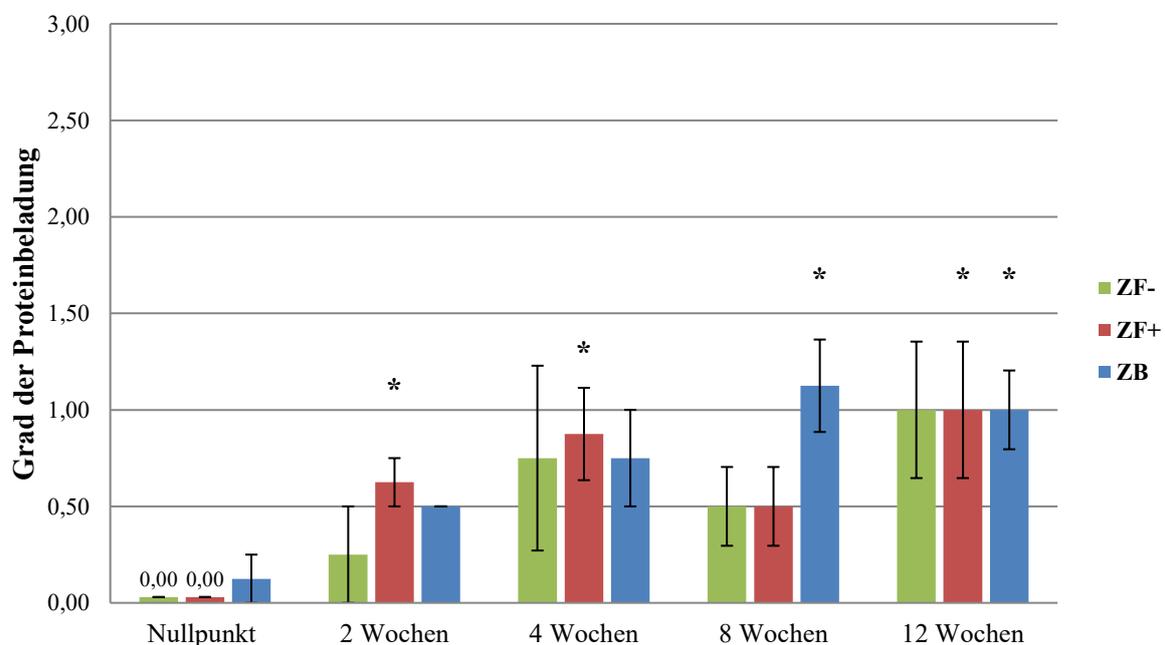


Abb. 39: Semiquantitative Analyse der Kollagen I-Beladung des BNC-Implantats im Kulturverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, (n=4); 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = starke DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz = Knochen. Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt.

5.5 Biomechanische Untersuchung mittels „Push-out-Tests“

Im Bereich des „Tissue Engineering“ ist nicht nur die Biokompatibilität eines Gewebeersatzmaterials, sondern auch dessen mechanische Stabilität und laterales Bonding bzw. Einwachsen in das umliegende, natürliche Gewebe von großer Bedeutung. So wurde in der vorliegenden Arbeit die *in situ* Integration des BNC-Implantats im bovinem Knorpelimplantat mittels Ausdrückversuchen getestet. Diese „Push-out-Tests“ wurden in der Abteilung für Biomechanik der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München nach einem etablierten Protokoll (Dunzel et al. 2013) durchgeführt. Die Ergebnisse schlossen dabei die vergleichende Betrachtung der zellfreien Implantate, die anfangs mit Serum vorinkubiert wurden (**ZF+**) mit den initial zellbesiedelten Implantaten (**ZB**) ein (Abb. 40). Während der Untersuchung presst dabei ein Metallstift das Implantat aus dem Knorpel-BNC-Regenerat. Die hierbei auftretenden Kräfte sind im Allgemeinen nur sehr gering und sollten entsprechend ihrer möglichen Änderung im Kultivierungsverlauf beurteilt werden. Somit ergab sich in der Analyse der zellfreien, serumbeladenen Knorpel-BNC-Regenerate (**ZF+**) eine nahezu konstante Auspresskraft über den gesamten Kultivierungszeitraum (0,033 - 0,041 N). Interessanterweise wurden in den frühen Zeitpunkten (0 bis 2 Wochen) bei den zellbesiedelten Implantatproben (**ZB**) signifikant niedrigere Auspresskräfte im Vergleich zu den initial zellfreien Proben (**ZF+**) gemessen. Bei den zellbesiedelten Knorpel-BNC-Konstrukten (**ZB**) stieg die Auspresskraft dann im Kulturverlauf signifikant an, ein Hinweis auf ein zunehmendes laterales „Bonding“ des BNC-Implantats und eine verbesserte Integration im Knorpeldefekt. So zeigte sich nach 8 Wochen mit einem Maximum von 0,048 N im Vergleich zu 0 und 2 Wochen ein signifikanter Anstieg der aufgebrauchten Ausdrückkraft, die dann bis zum Ende der Kultur konstant blieb (Abb. 40).

Die biomechanische Charakterisierung der Knorpel-BNC-Konstrukte ergab trotz anfänglich höher gemessener Ausdrückkräfte für die zellfreien Proben, nach Ablauf der Langzeitkultur von 12 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen **ZF+** und **ZB**.

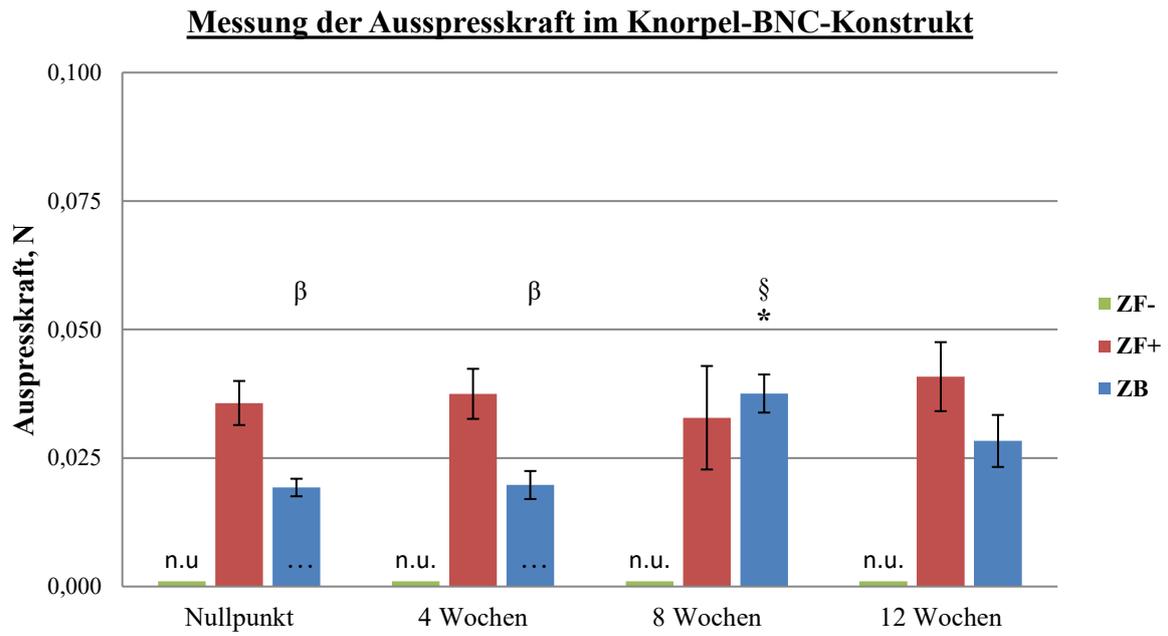


Abb. 40: Messung der Auspresskraft in N im Knorpel-BNC-Regenerat im Kulturverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$): *) vs. Nullpunkt, §) vs. 4 Wochen, β) vs. ZF+. (n.u. = nicht untersucht).

6 DISKUSSION

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der *in vitro* Kultur von Knorpel-Explantaten adulter Rinder mit zellfreien bzw. zellbesiedelten Implantaten aus 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose, die in einen künstlich generierten, vollschichtigen Defekt in den Knorpelring eingepasst wurden. Dies geschah nach dem Vorbild eines in der AG etablierten Knorpelstanzenmodells zur Evaluation der Regeneration von fokalen Knorpeldefekten (Pretzel et al. 2013). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Regeneration bzw. Reparatur substanzieller Knorpeldefekte anhand der folgenden positiven Ergebnisse veranschaulicht und somit die Eignung von 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose als potentielles Knorpelimplantat nachgewiesen werden:

- Die Migration von Chondrozyten aus dem Knorpelring auf die BNC führte durch die flächendeckende, oberflächliche Zellbesiedlung zu einer fast vollständigen Integration des Implantats im Knorpeldefekt.
- Neben der oberflächlichen Zellbesiedlung wurde in dieser Arbeit erstmals auch eine dreidimensionale Zellbesiedlung des initial zellfreien, 3D-modifizierten BNC-Implantats im Kulturverlauf erreicht.
- darüber hinaus konnte durch die initiale allogene Zellbesiedlung der 3D-modifizierten BNC eine deutlich frühere und über die gesamte Kultivierungsdauer hinweg stärkere Implantatbesiedlung im Vergleich zu den zellfrei implantierten Proben erreicht werden.
- Die Anzahl der auf die BNC migrierten Chondrozyten sowie deren Differenzierung nahm während der *in vitro* Kultur deutlich zu, was durch eine steigende Besiedlung und die Vor-Ort-Synthese von knorpeltypischen Matrixbestandteilen im Kulturverlauf belegt wurde.
- Neben der passiven Einlagerung von Matrixbestandteilen aus dem Knorpeldefektrand in das BNC-Gerüst wurde außerdem eine zum Teil tiefgreifende Matrixausfüllung des gesamten Implantats (insbesondere durch Aggrekan und Kollagen II) und somit eine Beladung des Knorpeldefekts mit gewebstypischer EZM beobachtet.

Mit diesen Ergebnissen wurde in Übereinstimmung mit eigenen Vorbefunden die hohe Biokompatibilität und -aktivität von bakterieller Nanocellulose bestätigt. Außerdem zeigte dieser Implantat-Prototyp (*3D-modifizierte BNC*) als initial zellfreie bzw. zellbesiedelte Leitschiene ein verbessertes regeneratives Potential im Vergleich zu den in Vorarbeiten verwendeten *unmodifizierten* BNC-Implantaten ohne 3D-Kanäle (Linss 2012).

6.1 *In vitro*-Langzeitkultivierung im bovinen Knorpelstanzenmodell

Im aktuellen Versuchsdesign wurden bovine Knorpel explantate mit einem vollschichtigem Gewebsdefekt versehen, 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose implantiert und die so entstandenen Knorpel-BNC-Konstrukte anschließend über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen kultiviert. In der Vergangenheit beschäftigten sich auch einige andere Forschungsgruppen mit *in vitro* Analysen zur Knorpelregeneration bzw. mit der Untersuchung von Knorpelreparaturverfahren unter Nutzung von Explantatkulturen (Wendt et al. 2005, Tuan et al. 2013). Diese unterscheiden sich von dem aktuellen Versuchsdesign insbesondere in den kürzeren Kultivierungszeiten von 5 Tagen (Madry et al. 2001), 4 Wochen (Secretan et al. 2010), 6 Wochen (Hunter und Levenston 2004, Vinardell et al. 2009) bzw. 8 Wochen (Obradovic et al. 2001, Erickson et al. 2012). In weiteren Projekten der eigenen Arbeitsgemeinschaft wurde die Kulturdauer zudem bereits auf 10 Wochen verlängert (Dunzel et al. 2013). Darüber hinaus gibt es große Unterschiede in der Wahl der Spezies, Entwicklungsstand des entnommenen Knorpelgewebes und der allgemeinen Versuchsbedingungen. So reichen die Studiendesigns von humanen Knorpel-Knochen-Konstrukten (Secretan et al. 2010), humanen Knorpelstanzen (Enders et al. 2010, Wardale et al. 2015), Untersuchungen von Knorpel explantaten von 2-3 Wochen alten Kälbern (Madry et al. 2001, Hunter und Levenston 2004, Obradovic et al. 2001) bis hin zu Explantatanalysen von 4 Monate alten Ferkeln (Vinardell et al. 2009). Der gemeinsame Vorteil der letztgenannten Modelle und des eigenen Modells liegt in der Verwendung von tierischem Knorpel, der im Rahmen von Schlachthausabfall gewonnen und somit in ausreichenden, ethisch unproblematischen Mengen mit guter, reproduzierbarer Qualität zur Verfügung steht. Im Unterschied zu den bisherigen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit Knorpel aus adulten Rindern (2-3 Jahre) verwendet, der eine größere Ähnlichkeit zum adulten Knorpel bei der Arthrose aufweisen soll (Khan et al. 2008, Barbero et al. 2004). Knorpel aus 2 bis 3 Wochen alten Kälbern, der z.B. im Defektreparaturmodell von Hunter und Levenston herangezogen wurde (Hunter und Levenston 2004), besitzt dagegen z. T. noch Gefäße und erfahrungsgemäß eine viel größere Regenerationskapazität als adulter Knorpel (DiMicco et al. 2002, Roth und Mow 1980). Daher können deutliche Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Knorpelreparaturverfahrens von „jungem“ Knorpel *in vitro* und von ausgewachsenem Knorpel *in vivo* entstehen. Auch wenn frühere experimentelle Studien z.T. Ähnlichkeiten zum vorliegenden Modell aufweisen, ist aus der Literatur noch kein exakt vergleichbares *in vitro* Modell zur langfristigen Knorpel-Regenerat-Kultivierung bekannt.

Die vorliegende Studie basiert auf dem in der AG Experimentelle Rheumatologie etablierten und publizierten bovinen Knorpelstanzenmodell zur Charakterisierung der Regeneration fokaler Knorpeldefekte unter Verwendung von Knorpelersatzmaterialien, z.B. von bakterieller Nanocellulose (Pretzel et al. 2013). Die damaligen Analysen beschränkten sich auf eine Kultivierungsdauer von 8 Wochen unter Einsatz unmodifizierter BNC-Implantate und lieferten vielversprechende Ergebnisse bezüglich des regenerativen Potentials von BNC zur Behandlung von Knorpeldefekten. Darüber hinaus wurde Serum als ein potentieller bioaktiver Faktor zur Rekrutierung, Migration und Proliferation von Knorpelzellen identifiziert. Diese Ergebnisse, die als Grundlage zur Optimierung und Erweiterung des Versuchsdesigns in der vorliegenden Arbeit dienten, sind in der Dissertation von Frau Dr. med. Stefanie Linß dargestellt (Linss 2012). Dies betraf neben der lasergestützten, strukturellen Modifikation der bakteriellen Nanocellulose auch die Erweiterung der Kultivierungszeit von 8 auf 12 Wochen. Dabei sollte einerseits der Einsatz von Serum als rekrutierender Faktor und andererseits der Einfluss der allogenen Zellbesiedlung analysiert werden. Daraus ergab sich die Testung von 3 verschiedenen BNC-Implantat-Typen:

- 1) Zellfreie, 3D-modifizierte BNC-Implantate, die *nicht* mit Serum inkubiert wurden (**ZF-**)
- 2) Zellfreie, 3D-modifizierte BNC-Implantate, die initial *mit* Serum inkubiert wurden (**ZF+**)
- 3) Zellbesiedelte, 3D-modifizierte BNC-Implantate (**ZB**)

Diese Knorpel-BNC-Konstrukte wurden nach einem standardisierten Protokoll angefertigt und für bis zu 12 Wochen kultiviert. Histologische, immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Analysen erfolgten nach 0, 2, 4, 8 und 12 Wochen, biomechanische („Push-out“-) Tests nach 0, 4, 8 und 12 Wochen. Darüber hinaus wurden molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen vorgenommen, die bereits in der Bachelorarbeit von Herrn Tobias Fiedler dargestellt sind (Fiedler 2014).

In dieser Arbeit konnte mit einer stark verbesserten, 3D-lasermodifizierten BNC sowie einem komplett neuen experimentellen Design (s.o.) nachhaltig bestätigt werden, dass das bovine Knorpelstanzenmodell eine geeignete Methode zur langfristigen Analyse der endogenen Regeneration von nativem Gelenkknorpel darstellt und als robustes und universell anwendbares Konzept zur Testung von Knorpelersatzmaterialien genutzt werden kann. Das hier erbrachte „proof of-Konzept“ kann dabei auch dazu beitragen, den Einsatz von ausgedehnten, kostenintensiven und möglicherweise ethisch problematischen Tierversuchen zu vermeiden bzw. zu reduzieren (sog. 3R Prinzip, Russell und Burch 1992).

6.1.1 Auswirkungen der Langzeitkulturbedingungen im untersuchten Assay

6.1.1.1 Effekte auf die Knorpelhomöostase

Insgesamt wies das Knorpelgewebe der bovinen Explantate über die gesamte *in vitro* Kultivierung einen weitgehend konstanten Proteoglykangehalt auf, der anhand der positiven Safranin-O-Färbung (orange bis rot) zu allen Zeitpunkten belegt wurde. Hierbei wurde kein eindeutiger Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB) festgestellt. Überdies zeigten die immunhistochemischen Analysen zu Aggrecan und Kollagen II ebenfalls einen konstant hohen Gehalt im Knorpelgewebe, der auch noch nach 12 Wochen Langzeitkultur weitgehend dem Gehalt der Referenzprobe (frischer Knorpel) entsprach (siehe Anhang, Abb. 41 + Abb. 42, Seite 131 + 131). Diese Befunde sprechen insgesamt für eine weitgehend intakte Knorpelhomöostase während des gesamten *in vitro* Kulturverlaufs und somit für eine ausreichende Nährstoffversorgung bzw. das Vorhandensein von sehr günstigen Umgebungsbedingungen zur *ex vivo* Kultivierung von bovinen Knorpelimplantaten im gewählten Assay.

Bei genauerer Betrachtung der Knorpelintegrität wurde in den Übersichtsfärbungen und REM-Untersuchungen jedoch bereits nach 2 Wochen eine Ablösung der oberflächlichen, zellfreien Schicht festgestellt, die im Verlauf der Kultur zu einem kompletten Verlust der Lamina splendens führte. Im Rahmen dieser initialen oberflächlichen Erosion durch die Ablösung der Lamina splendens konnten im weiteren Verlauf auch vermehrt ausgewanderte Chondrozyten detektiert werden, die sich teilweise zu mehrlagigen Zellrasen auf der Knorpeloberfläche formierten. Insbesondere die 12-Wochen-Kulturen zeigten eine deutlich fortgeschrittene oberflächliche Erosion, zu erkennen an unregelmäßiger Gewebeformation, gewölbter Oberfläche, diffuser Zellanordnung und Ausbildung von zellarmen und abgeblassten Bereichen oberflächennaher Knorpelzonen. Tiefer liegende Schichten wiesen dagegen in Analogie zu frischem Knorpel stets eine intakte Knorpelintegrität auf. Weiterhin wurden insbesondere zu den späten Kultivierungszeitpunkten von 8 und 12 Wochen in den oberen Gewebsschichten häufig Nester mit hypertrophierten Zellen nachgewiesen. Das Vorkommen solcher sog. Chondrozyten-Cluster wird in der Literatur als eine unkontrollierte Zellproliferation (Poole 1997) und Knorpeldegeneration interpretiert (Roberts et al. 2003). Im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen gelten diese Zellformationen als Indiz für das Vorkommen von minderwertigem Knorpelersatzgewebe mit hypertrophierten und damit instabilen Knorpelzellen (Rutgers et al. 2010). Dagegen betrachten andere Forschergruppen das Auftreten von Zellclustern eher als Zeichen einer Zellaktivierung für reparative statt degenerative Prozesse im Knorpelgewebe (Mainil-Varlet et al. 2001, Hembry et al. 2001).

Gegen die These der Degeneration und Formung minderwertigen Knorpels spricht in dieser Arbeit der Umstand, dass in der unmittelbaren Umgebung der Zellcluster große Mengen von Proteoglykan, Aggrekan und Kollagen II nachgewiesen wurden. Deutliche lokale Substanzverluste oder drastisch vermehrte Kollagen-I-Anreicherungen wurden dagegen nicht festgestellt. Allerdings wirkte das Knorpelgewebe in der Nähe solcher Zellcluster häufiger strukturell instabil (Deformierung der superfiziellen Schicht), was durch von diesen aktivierten Zellen synthetisierte Matrixmetalloproteinasen verursacht sein könnte (Hembry et al. 2001). Somit scheinen sowohl oberflächendegradierende als auch matrixstabilisierende Prozesse zur veränderten strukturellen Integrität des Knorpelgewebes beizutragen.

Insgesamt lassen die vorwiegend positive Kernfärbung in den H/E-Übersichtsaufnahmen, die fehlende Demaskierung der Kollagenfasern bei einem anhaltend stark orange-rot imponierenden PG-reichen Knorpel sowie der immunhistochemisch nachweisbare konstant hohe Aggrekan- und Kollagen II-Gehalt auf eine erhaltene Zellvitalität und stabile Knorpelhomöostase über die gesamte Kultivierungsdauer von 12 Wochen schließen. Dagegen scheint die zunehmende Störung der oberflächlichen, strukturellen Integrität der langzeitkultivierten Knorpel explantate sowie eine leichte Zunahme an Kollagen I im Gewebe die zeitlichen Grenzen dieses *in vitro* Modells aufzuzeigen. Weitere Knorpel-Proben, die in der eigenen Arbeitsgruppe über bis zu 24 Wochen kultiviert wurden, zeigten einen deutlichen Proteoglykan-Verlust (Dunzel et al. 2013), so dass Kultivierungszeiten von mehr als 12 Wochen im vorliegenden Modell nicht sinnvoll erscheinen.

Im Zuge der fortschreitenden oberflächlichen Erosion wurden vermehrt mobilisierte Knorpelzellen auf der Knorpeloberfläche detektiert, ein Befund, der bereits in Vorarbeiten beschrieben und diskutiert wurde (Linss 2012). Chondrozyten als der einzig vorkommende Zelltyp im Knorpelgewebe stellen bekanntermaßen die Basis für die Regeneration von Gelenkknorpeldefekten dar. Die mangelnde Reparaturantwort von hyalinem Gelenkknorpel wird neben der fehlenden Gefäßversorgung und geringen Zelldichte insbesondere auch auf die feste Einmauerung im Gewebe bzw. die Interaktion der Chondrozyten mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix zurückgeführt. Hierdurch wird eine frühzeitige Migration und Zellproliferation und damit auch die intrinsische Regeneration erschwert (Khan et al. 2008). Die Proteoglykan-Zell-Interaktion hemmt dabei die zelluläre Anhaftung und Zellmigration (Hunziker und Rosenberg 1996, Winnemoller et al. 1991, Davies et al. 2008). Nach Wegfall dieser Matrix-vermittelten inhibitorischen Signale konnte experimentell, z.B. durch enzymatischen Andau mittels Chondroitinase (Davies et al. 2008) oder Kollagenase (Qiu et

al. 2000), eine deutliche Steigerung der Knorpelzellmigration nachgewiesen werden. Folglich scheint der Verlust von Matrixbestandteilen und der Aufbruch des kollagenen Gerüsts im Bereich geschädigter Knorpelareale die physiologische Reparaturantwort anhand einer verbesserten Chondrozytenmigration zu begünstigen, was prinzipiell auch der *in vivo*-Situation nach traumatischen oder degenerativen Knorpeldefekten entspricht. Die in dieser Arbeit beobachtete Erosion und Degradation der Knorpeloberfläche im Kulturverlauf kann somit als Voraussetzung für die Aktivierung und Auswanderung knorpelständiger Chondrozyten angesehen und somit als prinzipiell förderlich für die Knorpelregeneration im Sinne einer physiologischen Reparaturantwort bewertet werden.

6.1.1.2 Effekte auf die Knorpelregeneration

Die initiale Ablösung der Lamina splendens sowie die oberflächliche Matrixdegradation und Destabilisierung der die Chondrozyten umgebenden Kollagenfasern könnten also die Herauslösung der Zellen aus ihrem festen Gewebeverband sowie ihre gerichtete Migration auf die Knorpeloberfläche gefördert haben. Im weiteren Verlauf adhärten die mobilisierten Chondrozyten auf der Implantatoberfläche und führten zu einer erfolgreichen dreidimensionalen Besiedlung des Implantats. Das 3D-modifizierte (d.h. perforierte) BNC-Gerüst ermöglichte dabei erstmals die tiefgreifende Besiedlung des Knorpeldefekts mit Chondrozyten und damit optimierte Voraussetzungen für die Defektreparatur. Ein Teil der aus dem Knorpel migrierten Chondrozyten verblieb auf der Knorpeloberfläche/-Außenseite, wo sie (wie auch auf dem Implantat) häufig flächendeckende Zellansammlungen ausbildeten und in Analogie zu Literaturbefunden knorpelähnliche Interzellularsubstanz formten (Bos et al. 2008). Immunhistologisch fand sich in diesen Bereichen eine Ablagerung von Aggrekan und Kollagen II, aber auch von geringen Mengen Kollagen I. In molekularbiologischen Untersuchungen wurde auch eine z.T. deutliche Zunahme der Syntheseaktivität für alle 3 Moleküle bei den ausgewanderten Chondrozyten nachgewiesen (Fiedler 2014 ; weitere Erläuterungen s.u.).

Die Regeneration im Knorpeldefekt war in dieser Arbeit z.T. sehr beeindruckend. So wurde nicht nur eine histomorphologisch und rasterlektronenmikroskopisch sichtbare Integration des Implantats in den Knorpeldefekt durch eine ausgedehnte Zellbesiedlung/ Zellüberwachsung belegt, sondern auch eine Auffüllung des BNC-Implantats im Defekt mit knorpeltypischen Matrixbestandteilen wie Aggrekan und Kollagen II. Die spezifische strukturelle 3D-Modifikation des Implantats trug sehr wahrscheinlich zu dieser Verbesserung bei. Arbeiten mit unmodifizierten (d.h. nicht perforierten) BNC-Implantaten konnten zwar eine vom Rand

des Knorpeldefekts ausgehende Einlagerung von Matrixbestandteilen nachweisen („Cartilage Flow“), zeigten jedoch im Verlauf der Langzeitkultur keine zunehmende Matrixanreicherung im Zentrum des Defekts (Pretzel et al. 2013). Durch die lasergestützte 3D-Modifikation wurde die dreidimensionale Zellbesiedlung des BNC-Implantats ermöglicht, was schließlich zu einer deutlichen, z.T. das gesamte Implantat durchdringenden Matrixeinlagerung führte. Wahrscheinlich konnten die in das dreidimensionale BNC-Gerüst migrierten Knorpelzellen erfolgreich chondrogen differenzieren und anschließend heterotop im Nanofasernetzwerk knorpeltypische Matrix produzieren und ablagern, ein erneuter Beleg für das regenerative Potential des Knorpel-BNC-Konstrukts. Mit Bezug auf die parallel durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen schienen die auf und im Implantat befindlichen Chondrozyten nach einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung im weiteren Kulturverlauf jedoch wieder zu dedifferenzieren (Fiedler 2014). Die zellbesiedelten (**ZB**) und auch die zellfreien/serumbeladenen Kulturen (**ZF+**) schienen dabei im Vergleich zu (**ZF-**) ihre chondrogene Differenzierung länger aufrechterhalten zu können (bis zu 8 Wochen). Insgesamt wies das Regenerationsmodell nach Ablauf der 12-wöchigen Kultivierungszeit jedoch gewisse Limitationen auf: Neben der in PCR-Untersuchungen erfassten Tendenz zur Dedifferenzierung von auf dem Implantat befindlichen Chondrozyten wurde in den REM-Aufnahmen in allen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB) ein geringer, aber eindeutig detektierbarer Anteil von pyknischen, abgestorbenen Zellen sowie eine leicht abnehmende Kernfärbung beobachtet. Der überwiegende Teil der Implantat-ständigen Zellen zeigte allerdings bis zum Kulturrende eine zufriedenstellende Vitalität.

Die über den Kulturverlauf beobachtete Knorpelregeneration soll im Folgenden anhand der einzelnen immunhistochemisch untersuchten Parameter nochmals detailliert erörtert werden. Hierzu sind im Anhang histologische und immunhistochemische Übersichts-Abbildungen (Abb. 43-Abb. 51, Seite 132-140) gegenübergestellt.

Aggrekan

Neben einem nahezu konstanten Aggrekan-Gehalt im umgebenden **Knorpelring** zeigte sich im BNC-Implantat, unabhängig von der Nähe zum Defektrand, über den Kultivierungszeitraum hinweg eine signifikante Zunahme der Aggrekaneinlagerung. Außerdem wurden in der Umgebung ausgewanderter Chondrozyten oft Aggrekan-Anreicherungen beobachtet. Die mobilisierten Zellen synthetisierten und lagerten daher wahrscheinlich aktiv Aggrekan im Knorpeldefekt ab. Die molekularbiologischen Analysen bestätigen diese Annahme, da hier die separat analysierten Chondrozyten (mobilisierte

Chondrozyten auf der Knorpeloberfläche bzw. im Implantat) eine deutliche mRNA-Expression für Aggrecan aufwiesen (Fiedler 2014). In den hier vorliegenden semiquantitativen Analysen zum Aggrecangehalt im **BNC-Implantat** wurden insgesamt keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen vorbehandelten Implantat-Typen (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**) gefunden. Jedoch wies der zellbesiedelte Ansatz (**ZB**) nach 8 Wochen den numerisch höchsten Aggrecangehalt im Implantat auf. In den PCR-Analysen der Implantat-ständigen Chondrozyten zeigten die (**ZB**)-Proben dagegen im Vergleich zu (**ZF-**) und (**ZF+**) eine über die gesamte Kulturdauer hinweg deutlich geringere Genexpressionsrate von Aggrecan. Außerdem wurde in den biochemischen Untersuchungen zu allen untersuchten Zeitpunkten bei allen Implantat-Typen, aber insbesondere bei **ZB**, eine vergleichsweise geringe Proteinabgabe in den Mediumüberstand (**ZB**: 2 ng/ml; **ZF-/ZF+**: 10-20 ng/ml) gefunden (Fiedler 2014). Die deutlich höhere Zellzahl im initial besiedelten Implantat (**ZB**) und der geringere Verlust von Aggrecan in den Mediumüberstand im Kulturverlauf könnten trotz niedrigerer Genexpressionsraten der Grund für den letztendlich sichtbaren, relativ hohen Aggrecangehalt im BNC-Implantat der (**ZB**)-Proben sein.

Bezüglich der Aggrecan-Verteilung im 3D-modifizierten BNC-Implantat wurde in den immunhistologischen Untersuchungen eine graduelle Zunahme der Aggrecanbeladung von der Oberfläche zum Boden des Regenerats beobachtet. Dieses Phänomen könnte einerseits darauf beruhen, dass zum Medium orientierte Bereiche durch die flüssige Phase stärker ausgewaschen wurden (unterhalb des Knorpel-BNC-Konstrukts befand sich ein Agarosebett). Andererseits könnte dies an einer niedrigeren Sauerstoffkonzentration in tiefer liegenden Regeneratschichten liegen, in Analogie zu den Befunden bei Analysen zu Membrankulturen (Mayer-Wagner et al. 2010). Dies könnte dazu geführt haben, dass hier ansässige Chondrozyten hypoxische und damit optimierte Umgebungsbedingungen zur chondrogenen Differenzierung vorfanden (Brighton und Heppenstall 1971, Lennon et al. 2001, Xu et al. 2007, Schrobback et al. 2012), somit in diesen Bereichen vermehrt knorpeltypische Matrixbestandteile synthetisierten und in die direkt benachbarte Cellulosematrix ablagerten. Lokal differenzierte mRNA-Analysen zu dieser Frage wären allerdings technisch sehr anspruchsvoll und wurden daher nicht durchgeführt.

Insgesamt lieferten die immunhistochemischen Analysen der Aggrecanbeladung im Knorpel-BNC-Regenerat vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Regeneration fokaler Knorpeldefekte bei Verwendung von 3D-modifizierter BNC als Knorpelimplantat.

Kollagen II

Kollagen II stellt einen wichtigen Marker in der Beurteilung von *in vitro* generiertem Knorpelgewebe dar (Im et al. 2005). Der **Knorpelring** aller untersuchten Proben (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**) wies über die gesamte Kulturdauer einen nahezu konstant hohen Kollagen II-Gehalt auf (siehe Anhang, Abb. 42, Seite 131). Daneben wurde in den PCR-Untersuchungen der knorpelständigen Chondrozyten insbesondere im (**ZF+**)-Ansatz nach 2 und 8 Wochen eine deutliche Zunahme der Genexpressionsrate von Kol2 nachgewiesen (Fiedler 2014), was auf eine gewisse Stimulation der Chondrozyten im Knorpelring durch die Serum-Beladung hindeutet, die jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf die Proteinbeladung des Knorpels hatte.

Ähnlich wie bei den immunhistochemischen Darstellungen von Aggrekan wurde auch eine Einlagerung von Kollagen II in das **BNC-Implantat** -anfangs in der Kontaktzone zum Knorpelring und später auch in zentraleren Bereichen des Implantats- nachgewiesen und in diesem Ausmaß in dieser Arbeit erstmals dargestellt. Daneben wurde auch hier eine graduelle Zunahme der Kol-2-Beladung in Richtung Implantatboden beobachtet. Die semiquantitativen Analysen zeigten über den Kulturverlauf hinweg einen progredienten Anstieg der Kol-2-Beladung ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**ZF-**, **ZF+** und **ZB**). Die molekularbiologischen Untersuchungen der Chondrozyten in der BNC unterstreichen diese Ergebnisse größtenteils (Fiedler 2014). Hier war bei den (**ZF+**)-Proben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunhistologischen Analysen die Genexpressionsrate von Kollagen II im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen insgesamt etwas niedriger. Die Proteinabgabe in den Mediumüberstand nahm über den gesamten Kulturverlauf stetig ab, was als Indiz für eine sichere Ablagerung und Speicherung des Strukturproteins im Implantat gewertet werden kann. Allerdings wurden im Vergleich zu Aggrekan und Kollagen I insgesamt sehr hohe Kollagen II-Mengen im Mediumüberstand gemessen (Fiedler 2014). Diese vergleichsweise hohe Protein-Abgabe an die Umgebung insbesondere während der frühen Kultivierungsphase lässt auf ein drastisches Ausschwemmen von Kollagen II aus dem Knorpelring durch die initiale Defektsetzung und evtl. auch degradierende Prozesse schließen. Später könnte jedoch auch ein Teil des von extrakartilaginären Chondrozyten synthetisierten Kollagen II freigesetzt worden sein.

Insgesamt verdeutlicht der zunehmende Kollagen II-Gehalt im Implantat erneut die zumindest partielle Knorpelregeneration. Die 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose scheint dabei die Differenzierung der mobilisierten Chondrozyten als Basis für eine erfolgreiche Reparatur von Knorpeldefekten zu fördern.

Kollagen I

Bezüglich der immunhistologischen Analysen zum Kollagen I-Gehalt im **Knorpelring** wurden in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu früheren Untersuchungen der eigenen AG (Linss 2012) oder auch von anderen Autoren (Peng et al. 2014) unterschiedliche Resultate gewonnen. So zeigte in der vorliegenden Untersuchung frischer boviner Knorpel ein spezifisches Kollagen I-Vorkommen insbesondere in einer dünnen Schicht an der Knorpeloberfläche. Diese Schicht könnte der in der Literatur beschriebenen Perichondrium-ähnlichen Schicht („perichondreal-like“ layer (Nerlich et al. 1993)) entsprechen, die bereits in immunhistologischen Analysen im gesunden und osteoarthrotischen Kaninchenknorpel beschrieben wurde (Pfander et al. 1999). Weiterhin wurde diese Schicht auch im humanen Gelenkknorpel als eine Art Ausläufer der Synovia dargestellt (Allard et al. 1990) sowie in anderen Dissertationen diskutiert, die sich mit Analysen zu humanen kartilaginären Exostosen beschäftigen (Mordstein 2005). Exakt vergleichbare immunhistologische Bilder zum Kollagen-I-Gehalt in adultem bovinem Knorpel sind jedoch bisher nicht publiziert. Im Gegensatz zu früheren eigenen Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Primär-Antikörper verwendet (polyklonaler Kaninchen-Anti human/bovin- Koll1-AK, dagegen in der Dissertation von Fr. Dr. Linß: Maus Anti-human/bovin-Koll1-AK), evtl. ein Grund für die abweichenden Ergebnisse (damals boviner Gelenkknorpel frei von Kollagen I). In der aktuellen Studie gibt es keine Hinweise auf eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers oder eine unspezifische Farbreaktion als mögliche Ursache für die o.a. Diskrepanzen. Dies wurde sowohl durch negative Färbungen mit Ig-Kontrollen als auch anhand eines typischen Färbemusters in der Kollagen I/ Kollagen II-Doppelfärbung an frischen bovinen Knorpel-Knochen-Bioptaten belegt (Abb. 52, Anhang Seite 141). Aus diesem Grund ist aktuell ein natürliches Vorkommen von Kollagen I in adultem bovinem Gelenkknorpel anzunehmen. Hinweise für den Gehalt an Kol-1 im frischen bzw. früh kultiviertem Knorpel lieferten ebenso die proteinbiochemischen und molekularbiologischen Analysen (Fiedler 2014). Da in den PCR-Analysen im frischen Knorpel keine Kollagen I-mRNA detektiert wurde, wird das zu Beginn der Kultivierungszeit im Mediumüberstand gemessene Kol-1 auf einer passiven Freisetzung aus dem Gewebe beruhen. Im weiteren Kulturverlauf wurde im Knorpelring anhand der immunhistologischen Untersuchungen in allen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB) eine leichte Zunahme der Kollagen I-Menge festgestellt. Die hierzu durchgeführten PCR-Untersuchungen zeigten ebenso eine zunehmende Kol-1-Expression knorpelständiger Chondrozyten in den späten Kulturphasen (insbesondere 8 Wochen; Fiedler 2014) und unterstützen somit die immunhistologischen Befunde. Ähnliche

Befunde wurden außerdem bereits in den PCR-Ergebnissen von früheren Arbeiten aus der eigenen AG beschrieben (Linss 2012). Darüber hinaus wurde in allen Ansätzen im Kulturverlauf eine steigende Freisetzung von Kollagen I in den Kulturüberstand gemessen (Fiedler 2014). Diese Befunde deuten insgesamt auf eine zunehmende Degeneration des Knorpels am Ende der Langzeitkultur hin.

Weiterhin wurde auch im **BNC-Implantat** eine tendenziell zunehmende Einlagerung von Kollagen I festgestellt, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (ZF-, ZF+ und ZB). Die Proteinbeladung zeigte in den semiquantitativen Analysen jedoch relativ große Schwankungen. Diese Befunde deuten auch bei den auf der BNC befindlichen Chondrozyten auf eine gewisse Tendenz zur Dedifferenzierung hin, ebenfalls in Übereinstimmung mit den molekularbiologischen Ergebnissen (Fiedler 2014). Dabei schienen die **(ZF+)**- und **(ZB)**-Proben das chondrogene Potential der im Implantat befindlichen Zellen etwas länger aufrechterhalten zu können (über 4 bis 8 Wochen) und damit bessere Umgebungsbedingungen zu bieten als die **(ZF-)**-Proben (4 Wochen).

6.1.2 Bedeutung des Serums im untersuchten Assay

Die Verwendung von Serum als Zusatz zu Kulturmedien ist eine weit verbreitete Routinetechnik in der Zell- und Gewebekultur (Gstraunthaler et al. 2013), wobei FCS als Standard-Adjuvans genutzt wird (van der Valk et al. 2010, Drewa et al. 2003). FCS (engl. *fetal calf serum*) enthält eine Vielzahl an größtenteils noch nicht genau bekannten Faktoren, z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Bindungs- und Transportproteine, Vitamine, Aminosäuren oder Protease-Inhibitoren (van der Valk et al. 2004, Gstraunthaler 2013). Im Rahmen von Zell- und Gewebekulturen kommt FCS insbesondere aufgrund seines mitogenen Potentials zum Einsatz. So wurde in der Literatur z.B. die fehlende Teilung von Chondrozyten unter serumfreien Bedingungen (Chua et al. 2005, Mandl et al. 2002) sowie die konzentrationsabhängige Proliferationsinduktion unter FCS-Zusatz belegt (Choi et al. 1980, Chua et al. 2005, Drewa et al. 2003). Hascall et al. beschrieben desweiteren einen Verlust des PG-Nettogehalts in Knorpelgewebe nach einer 14-tägigen *in vitro* Kultur ohne Serum, während die FCS-Supplementierung eine Aufrechterhaltung der Matrixhomöostase bewirkte (Hascall et al. 1983). Außerdem stimuliert FCS die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen während der *in vitro*-Expansion (Fani et al. 2016). In der vorliegenden Studie war der Zusatz von FCS zum Basalmedium (DMEM/F12) aufgrund des sehr langen Kultivierungszeitraumes von insgesamt 12 Wochen absolut notwendig, um eine ausreichende Nährstoffzufuhr zu gewährleisten und degenerative Vorgänge zu inhibieren. So

wurde ein Anteil von 5% FCS im Knorpelmedium verwendet (Linss 2012) und hiermit eine ausreichende Gewebshomöostase nach 12 Wochen aufrechterhalten. Der gewählte Anteil stellte dabei einen Kompromiss zwischen den in der Literatur standardmäßig in der Zell- und Gewebekultur verwendeten Medien mit 10% Serumgehalt und den in der Literatur ebenfalls zur Chondrozytenproliferation eingesetzten Medien mit 2% FCS dar (Chua et al. 2005). Chua et al. demonstrierten gleichzeitig, dass der Zusatz von ITS-Supplement als partieller Serumersatz gute Effekte auf die Differenzierung und Proliferation von humanen Knorpelzellen hatte. Somit wurde auch in dieser Arbeit Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) als Basalzusatz im Kulturmedium zur *in vitro* Langzeitkultivierung der bovinen Knorpelstanzen eingesetzt.

In dieser Arbeit wird der Begriff „Serum“ gleichbedeutend mit „FCS“ verwendet. Aufgrund der in Vorarbeiten durch die Trans Tissue Technologies GmbH (Berlin) und vergleichbare Studien (Mishima und Lotz 2008, Hidaka et al. 2006) belegten, hervorragenden chemotaktischen Wirkungen von Serum auf die Migration humaner und boviner Chondrozyten (Daten gezeigt in (Linss 2012)) und aufgrund der in der Literatur bekannten proliferationsinduzierenden Effekte von Serum (Bujia 1995, Guerne et al. 1994) sollte in der aktuellen Arbeit Serum explizit als bioaktiver Faktor im Knorpel-BNC-Regenerat untersucht werden. Die von einigen Autoren angeregte Verwendung von autologem, adultem, bovinem Serum (Fani et al. 2016) gestaltete sich in dieser Arbeit als schwierig, weil über den gewählten Zeitraum von 84 Tagen immens große Mengen an Kulturmedium erforderlich waren und eine definierte Charge an Serum-Supplement für eine Versuchsreihe genutzt werden sollte, um mögliche Chargen-Effekte zu umgehen. Eine solche Menge von autologem Serum konnte von den Schlachttieren aus logistischen Gründen nicht zu einem Zeitpunkt entnommen werden, da die Schlachtungen und somit die Knie-Präparationen gestaffelt (2 Kniegelenke pro Woche) erfolgten. Für die zellfreien Ansätze wurden zudem Knorpelxplantate aus insgesamt 3 verschiedenen Rindern verwendet, um die Anzahl der benötigten Proben sicherzustellen. Der Einsatz von gepooltem Serum hätte jedoch möglicherweise eine AK-vermittelte Immunreaktion im Gewebeexplantat verursacht und zu verfälschten Ergebnissen geführt. Außerdem bestanden keine ausreichenden Möglichkeiten zur entsprechenden Aufreinigung des Serums von extern geschlachteten adulten Tieren. Auf den zeitgleichen Einsatz von FCS und adultem, autologem Serum in einer Versuchsreihe sollte ebenso verzichtet werden, da hier zu viele verschiedene Parameter und mögliche Störfaktoren bei der Kultivierung auftreten würden. Kommerziell gebräuchliches FCS stellte somit im aktuellen Experiment eine einfache, stabile Alternative zu adultem Serum dar.

Um einen möglichen Vorteil der serumbeladenen (**ZF+**) im Vergleich zu den serumfreien, BNC-Implantaten (**ZF-**) zu belegen, wurde in dem vorliegenden Versuchsdesign eine Vorkultur von 4 Tagen in serumfreien Medium vorgenommen. Zur Untersuchung der Effekte von in Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder anderen Einflussfaktoren wurden bereits in vielen Arbeiten Zell- oder Gewebekulturen unter Serumentzug oder unter minimaler Basisstimulation mit Serum kultiviert (Mandl et al. 2002, Sah et al. 1996, Pohlers et al. 2007, Mayer-Wagner et al. 2010). Luyten et al. kultivierten beispielsweise bovine Knorpelimplantate über bis zu 40 Tage in FCS-freien Medium, um den Einfluss von IGF-I/II auf den Proteoglykangehalt bzw. -abbau zu untersuchen (Luyten et al. 1988). Knorpelimplantate wurden außerdem nach der Präparation für einige Tage in serumfreien Medien belassen, um z.B. die initialen Effekte einer nachfolgenden mechanischen Manipulation zu minimieren (van Haaften et al. 2016). Darüber hinaus belegten einige Studien, dass sogar nach mehrtägigem Serumentzug die anschließende Zugabe von FCS zu einer erneuten Aktivierung der Knorpelzellen führt (Hascall et al. 1983). In der hier vorliegenden Arbeit wurde also davon ausgegangen, dass ein initialer Serumentzug (mit Supplementation von ITS zum Basalmedium) von bis zu 4 Tagen die Gewebshomöostase des Knorpels nicht beeinflusst. Eigene Vorarbeiten hierzu zeigten ebenso, dass auch nach einer 5-tägigen Gewebe-Kultur in Serum- und Basalmedium-freier Umgebung unter einfacher Verwendung von sterilem PBS die Gewebshomöostase und die Zellvitalität in den histologischen Übersichtsfärbungen konstant blieb (Daten nicht gezeigt). Durch den Einsatz dieser 4-tägigen serumfreien Vorkultur sollte in dieser Arbeit ein möglicher Vorteil von *mit* Serum (FCS) vorinkubierten BNC-Implantaten (**ZF+**) im Vergleich zu serumfreien BNC-Inserts (**ZF-**) demonstriert werden. Mit dieser initialen Serumbeladung sollte insbesondere die Induktion der Migration knorpelständiger Chondrozyten auf das primär zellfreie Implantat analysiert werden. Exakt vergleichbare Modell-Arbeiten sind hierzu aus der Literatur nicht bekannt. Dieser Schritt der initialen Seruminkubation sollte insbesondere die spätere klinische Situation simulieren, in der das „native“, zellfreie BNC-Implantat direkt perioperativ in autologem Serum des Patienten getränkt und anschließend in den Knorpeldefekt implantiert werden könnte.

Insgesamt ließen sich in dieser Arbeit keine deutlichen Vorteile der Seruminkubation hinsichtlich des zellulären Migrations- und Proliferationsverhaltens im Knorpel-BNC-Regenerat über die gesamte Kultivierungszeit feststellen. Die initiale serumfreie Kultur über 4 Tage könnte allerdings den positiven Effekt der Seruminkubation des Implantats zu Beginn der Kultur neutralisiert haben. Weitere Studien, z.B. unter Verwendung verschiedener

Serumkonzentrationen während des gesamten Kultivierungszeitraums, wären diesbezüglich erforderlich, um einen deutlicheren Vorteil der Seruminkubation in einem *in vitro* Modell ableiten zu können. Ansonsten wären *in vivo*-Experimente zum Nachweis der positiven Eigenschaften des Serums als Chemo-Attraktant möglicherweise besser geeignet (Erggelet et al. 2007).

6.2 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose als potentielle Leitstruktur in der Therapie von Knorpeldefekten

BNC stellt aufgrund ihrer biologischen, strukturellen und biomechanischen Eigenschaften ein attraktives Gewebeersatzmaterial für die Behandlung von Knorpeldefekten dar (Svensson et al. 2005, Gama 2013). In der Vergangenheit wurden dabei bereits mehrfach die hohe Biokompatibilität, fehlende Zytotoxizität und vielversprechende *in situ*-Integration des Biopolymers nachgewiesen (Helenius et al. 2006, Chen et al. 2009, Moreira et al. 2009, Zahedmanesh et al. 2011, Cacicedo et al. 2016 und enthaltene Literaturstellen). Nach der Implantation von BNC in das subkutane Fettgewebe von Mäusen konnte z.B. weder eine akute oder chronische Immunreaktion noch eine Kapselbildung im Sinne einer Fremdkörperreaktion festgestellt werden (Helenius et al. 2006). Neben einer sicheren Integration in den Gewebewirt wurde außerdem eine gute Biostabilität und Elastizität des Nanocellulosenetzwerks *in vivo* beschrieben (Schnerer et al. 2014, Lang et al. 2015). Das charakterisiert die positiven Eigenschaften der BNC als nichtresorbierbares Material. Die in Vorarbeiten beschriebene positive Adhärenz boviner und humaner Chondrozyten auf dem Nanofasernetzwerk und die anschließend beobachtete metabolische Zellaktivität und Synthese kartilaginärer Matrixbestandteile unterstreichen die prinzipielle Eignung von BNC als Knorpelersatzmaterial (Svensson et al. 2005, Ahrem et al. 2011, Pretzel et al. 2013, Feldmann et al. 2013). In Vorarbeiten zum aktuellen Versuch konnte die oberflächliche Besiedelbarkeit des zellfreien BNC-Implantats mit knorpelständigen Chondrozyten sowie die randständige Aufnahme von Matrixbestandteilen in das Cellulosenetzwerk als Zeichen einer initialen Defektabdichtung im Knorpelregenerat gezeigt werden (Linss 2012). Es stellte sich jedoch heraus, dass bei der nicht 3D-modifizierten BNC ein Eindringen der Chondrozyten in tiefer liegende Celluloseschichten aufgrund der engmaschigen Netzwerkstruktur und der damit verbundenen Diskrepanz zwischen der Porengröße der BNC und der Größe der Chondrozyten nicht möglich war. Dabei konnte ein aktives Einwandern der Zellen, wie es in Studien mit Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen beschrieben wurde (Backdahl et al. 2006, Zahedmanesh et al. 2011, Schnerer et al. 2014) im Falle der Chondrozyten nicht

reproduziert werden. Somit wurden einige Modifikationen von Porengröße und Porendesign der BNC vorgenommen, die eine verbesserte dreidimensionale Besiedelbarkeit mit Knorpelzellen zum Ziel hatten (Andersson et al. 2010, Ahrem et al. 2011, Jing et al. 2013, Feldmann et al. 2013). In Kooperation mit der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG und der Günther-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH wurden daher mit Hilfe eines CO₂-Lasers postprozessuale, strukturelle Veränderungen der Nanocellulose-Vliese vorgenommen. Nach Ahrem et al. konnten schließlich unidirektional und dreidimensional perforierte BNC-Konstrukte hergestellt werden, wobei sich insbesondere die dreidimensional generierten Hohlraumstrukturen optimal mit Chondrozyten besiedeln ließen. Die BNC zeigte dabei auch nach der lasergestützten Modifikation eine hohe Biokompatibilität und im Vergleich zu anderen Matrices ausreichende mechanische Stabilität. Nach der erfolgreichen dreidimensionalen Zellbesiedlung konnten außerdem eine chondrozytäre Differenzierung und phänotypische Stabilität sowie eine beginnende Matrixsynthese nachgewiesen werden (Ahrem et al. 2014). Dieser 3D-modifizierte BNC-Prototyp wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des bovinen Knorpelregenerationsmodells als Implantatmaterial verwendet.

Der Vorteil von Matrixstrukturen als Leitschienen im Rahmen des Tissue Engineering besteht insbesondere in der Schaffung dreidimensionaler Kulturbedingungen zur Förderung des initialen Zell-Zell-Kontaktes *in vitro*. Außerdem kann durch eine entsprechende strukturelle Nachahmung des Gewebewirts eine frühe Zell-Matrix-Interaktion hergestellt werden (Zhu und Marchant 2011). Diese Eigenschaften sind im Falle der BNC aufgrund der Kollagen-imitierenden, faserförmigen Struktur und der hohen Wasserbindungsfähigkeit gegeben (Klemm et al. 2011). Weiterhin besteht bei der Verwendung von Gerüststrukturen (sog. Scaffolds) die Möglichkeit, chondrogene Faktoren zu applizieren, die durch eine anschließende (konstante) Abgabe im Sinne einer parakrinen Wirkung die enthaltenen Zellen positiv beeinflussen können (Haleem und Chu 2010). Weitere Anforderungen an Leitschienen im Rahmen der Knorpelregeneration sind neben der Biokompatibilität, eine fehlende Zytotoxizität, Immunogenität und Infektiosität sowie eine möglichst ausbleibende Fremdkörperreaktion. Zudem sollten eine Schrumpfung und Degradation mit Anfall von toxischen Abfallprodukten vermieden werden. Darüber hinaus sind die Gewährleistung einer homogenen Zellverteilung im Scaffold, die Förderung der Matrixproduktion und -Ablagerung innerhalb des Implantats, eine ausreichende mechanische Stabilität sowie eine möglichst komplette und übergangslose Integration in den Knorpeldefekt wichtige Eigenschaften eines potentiellen Knorpelimplantats (Chung und Burdick 2008, Frenkel und Di Cesare 2004, Haleem und Chu 2010). Diese Eigenschaften sollten in der vorliegenden Arbeit charakterisiert

werden. Nach Auswertung aller in diesem Versuch erzielten Ergebnisse erfüllt die 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose fast alle der oben genannten Anforderungen.

6.2.1 Eignung von 3D-modifizierter BNC als zellbesiedeltes Knorpelimplantat

Durch die lasergestützte Modifikation war es möglich, die BNC-Struktur gezielt zu perforieren und das gesamte Implantat durchdringende, interkonnektierende Kanalstrukturen zu generieren. Mit dem so entstandenen Hohlraumssystem wurde eine deutlich vergrößerte innere Oberfläche des BNC-Inserts geschaffen, die sich anschließend mittels dynamischer und statischer Inkubation optimal mit bovinen Chondrozyten besiedeln ließ (siehe histologische und semiquantitative Analysen in dieser Arbeit). Dabei zeigten die Chondrozyten direkt nach dem Besiedlungsprozess eine sehr gute Adhärenz auf der BNC und bildeten abgeflachte Zellkörper mit fingerförmigen Ausstülpungen. Im weiteren Kulturverlauf konnte eine deutliche Zunahme der Zellzahl auf dem Cellulosegerüst nachgewiesen werden. Insgesamt spricht dies für eine gute Biokompatibilität des lasermodifizierten BNC-Implantats (Jing et al. 2013, Svensson et al. 2005). Durch den Hitzeintrag des Laserschnitts entstanden zwar kleine, oberflächliche Schmelzherde auf dem Cellulose-Vlies (Ahrem et al. 2014), Hinweise auf mögliche zytotoxische Effekte aufgrund dieser thermolytischen Modifikation wurden in dieser Arbeit aber nicht beobachtet (Jing et al. 2013, Ahrem et al. 2014).

Zu Beginn der Kultivierungszeit wurde in den immunhistochemischen Untersuchungen der **(ZB)**-Proben (ca. 24 h nach Entnahme der Chondrozyten aus der Monolayerkultur und Besiedlung der BNC-Zylinder) perizellulär Kollagen I nachgewiesen. Im weiteren Kulturverlauf zeigten sich an dieser Stelle stattdessen zunehmende Aggrekan- und Kollagen II-Ablagerungen. Die PCR-Untersuchungen unterstützen diese immunhistochemischen Resultate. Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt. So neigen Chondrozyten in Monolayerkulturen prinzipiell zur Dedifferenzierung (Anders et al. 2009, Kaps et al. 2004, Marlovits et al. 2004, Benya und Shaffer 1982, Schnabel et al. 2002), wahrscheinlich durch den Verlust der dreidimensionalen Gewebeeinbettung und den dadurch fehlenden Zell-Matrix-Kontakt (von der Mark et al. 1977, Schulze-Tanzil et al. 2002). Nach Überführung in eine dreidimensionale Zell- bzw. Pelletkultur (Tallheden et al. 2004, Schrobback et al. 2012, Barbero et al. 2004) oder Membrankultur (Murdoch et al. 2007, Mayer-Wagner et al. 2011)) bzw. eine Aussaat in dreidimensionale Matrices (Kaps et al. 2004, Miot et al. 2005, Anders et al. 2009) ist es jedoch möglich, die dedifferenzierten primären Chondrozyten wieder zu redifferenzieren und somit *in vitro* die Neubildung von Knorpel anzuregen. Dabei soll die Anzahl der stattgehabten Passagen, d.h. die Zellexpansionszeit sowie das absolute Zellalter,

eine wesentliche Rolle spielen (Mayer-Wagner et al. 2011, Schulze-Tanzil et al. 2002, Darling und Athanasiou 2005, Barbero et al. 2004). Der Redifferenzierungsvorgang extrakartilaginärer Chondrozyten beruht möglicherweise auf den durch die dreidimensionale Neuorganisation entstandenen Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Kontakten, die eine chondrogene Ausrichtung der *in vitro* kultivierten Chondrozyten fördert. Außerdem werden durch eine initiale dreidimensionale Organisation nachgewiesenermaßen ideale Voraussetzungen für eine Proliferation und Matrixproduktion geschaffen (DeLise et al. 2000, Hall und Miyake 2000). Insgesamt ist die Überführung von primären Chondrozyten in 3D-Kulturen eine gängige Methode zur Herstellung von Knorpelgewebe *in vitro* (Bhattacharjee et al. 2015 und enthaltene Literaturstellen). Der Übergang von einer Monolayerkultur in eine 3D-Kultur wurde in der aktuellen Studie durch den Einsatz von modifizierter bakterieller Nanocellulose offensichtlich ermöglicht. Hierdurch wurden sehr gute Ergebnisse hinsichtlich des dreidimensionalen Besiedlungsgrads sowie der Synthese und Einlagerung von Aggrecan und Kollagen II in das BNC-Implantat erzielt. Daneben wurde jedoch auch eine begrenzte, aber über die Langzeitkultur zunehmende Ablagerung von Kol-1 im Cellulose-Netzwerk festgestellt. Nach Auswertung aller in dieser Arbeit erhobenen Befunde lässt sich anhand der EZM-Distribution im Knorpeldefekt kein eindeutiger Vorteil der artifiziellen Zellbesiedlung im Vergleich zu den zellfreien Implantatproben am Ende der *in vitro* Langzeitkultur erkennen. Jedoch belegten der stets höhere Besiedlungsgrad über den gesamten Kulturverlauf und die mittel- bis langfristige (4-8 Wochen) chondrogene Differenzierung der Chondrozyten im BNC-Implantat (Fiedler 2014) einen gewissen Vorteil der zellbesiedelten gegenüber den zellfreien Ansätzen. Daher eignet sich auch das 3D-modifizierte und allogene zellbesiedelte BNC-Implantat durchaus als potentiell Knorpelersatzmaterial im Rahmen der matrixgestützten allogenen Zelltransplantation.

6.2.2 Eignung von 3D-modifizierter BNC als zellfreies Knorpelimplantat

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Eignung von BNC als zellfreies Knorpelimplantat bestätigten insgesamt die bisherigen Resultate aus der eigenen AG. Die Vorteile der Verwendung zellfreier, biologischer Gewebeersatzmaterialien liegen insbesondere in der Vermeidung von Entnahmemorbidität durch die Gewinnung von Chondrozyten aus gesundem Knorpel in einem ersten Operationsschritt, die auch einen entsprechend hohen Kostenaufwand mit sich bringt. Zellfreie, dreidimensionale Knorpelimplantate wie im Falle der hier verwendeten BNC, können dagegen in einem einzigen Operationsverfahren („off the shelf“) implantiert werden. Durch die Einpassung des Implantatmaterials soll der Knorpeldefekt für die sich anschließende Regenerationsphase

abgedichtet und damit der subchondrale Knochen geschont werden. Zeitgleich besteht die Möglichkeit der Modellierung neuwertigen Gelenkknorpels, indem das eingesetzte Cellulosegerüst als stabile Leitschiene zur Migration von Gelenkknorpelzellen in den Knorpeldefekt genutzt wird. Aufgrund der Nichtresorbierbarkeit des defektauffüllenden Materials wäre dabei die Regeneration nicht von zeitlichen Faktoren abhängig, womit eine zu frühe biomechanische Instabilität vermieden werden kann. Außerdem würde aufgrund fehlender Degradationsprozesse innerhalb der Leitschiene auch die lokale Bildung von evtl. toxischen Abbauprodukte vermieden werden.

Vor dem Hintergrund dieser positiven Eigenschaften wurden in dieser Arbeit zellfreie, 3D-modifizierte BNC-Implantate in einen bovinen Knorpeldefekt eingebracht und der sich anschließende *in vitro*-Regenerationsprozess über 12 Wochen dokumentiert. Dabei konnte im Gegensatz zu Vorarbeiten (Linss 2012) eine erfolgreiche dreidimensionale Besiedlung des BNC-Implantats nach aktiver Migration knorpelständiger Chondrozyten nachgewiesen werden. Mit der lasergestützten Modifikation wurden Hohlraumstrukturen mit Verbindung zur Oberfläche geschaffen, die letztlich eine erweiterte Migration der Chondrozyten bis in tiefer liegende Implantatbereiche begünstigten (Ahrem et al. 2014). Dabei ging die Besiedlung der Implantatkanäle immer von oberflächennahen Bereichen aus. Eine Zellmigration ausgehend von seitlichen, zum Knorpeldefektrand ausgerichteten Kanalstrukturen wurde nicht beobachtet. Dieses Phänomen beruht auf dem bereits in der Literatur beschriebenen, gerichteten Migrationsverhalten gewebsständiger Chondrozyten, die in der Lage sind, entlang der Kollagenfasern in Richtung Knorpeloberfläche zu „wandern“, nicht jedoch entgegen dem Faserverlauf auszubrechen (Lyman et al. 2000), weshalb stets die Knorpeloberfläche nach Degradation der superfiziellen Knorpelschicht als erstes besiedelt wurde. In den histologischen Übersichtsaufnahmen wurden im Kulturverlauf allerdings häufig auch deutliche Zellansammlungen *unterhalb* des Knorpelrings beobachtet, als Zeichen einer erfolgreichen Migration auf die untere Oberfläche des BNC-Implantats mit Entwicklung einer dreidimensionalen Besiedlung der zum Boden ausgerichteten Laserkanäle. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass durch die präparationsbedingte mechanische Verletzung Chondrozyten aus den tieferen Schichten des Knorpelgewebes gelöst und zur Proliferation und Migration angeregt wurden (Bos et al. 2008). Die vorliegenden Ergebnisse belegen weiterhin, dass die migrierten und auf der BNC adhären Chondrozyten insbesondere in den 8 und 12 Wochen-Kulturen sowohl eine aktive Proteoglykan/Aggrekan-Synthese als auch eine Kollagen-II-Synthese zeigten. Wahrscheinlich aus diesem Grund wurde in den aktuellen immunhistochemischen Färbungen im Vergleich zu Vorarbeiten nicht nur eine randständige

Matrix-Einlagerung (Linss 2012), sondern eine tiefgreifende EZM-Distribution von Kol-2 und Aggrecan im gesamten Implantat beobachtet. Allerdings fanden sich zum Ende der Langzeitkultur vereinzelt avitale Chondrozyten auf dem BNC-Implantat sowie eine tendenziell zunehmende Kollagen I-Einlagerung im Cellulosegerüst. Diesen Sachverhalt bestätigten auch die parallel durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen (Fiedler 2014) sowie frühere Analysen aus der eigenen AG (Linss 2012). Diese späte Dedifferenzierung deutet auf die Grenzen des verwendeten *in vitro* Regenerationsmodells hin.

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse erneut das Potential des verwendeten Biomaterials zur chondrogenen Redifferenzierung lokaler Knorpelzellen und lassen den Schluss zu, dass die 3D-modifizierte bakterielle Nanocellulose prinzipiell als zellfreies Implantat im Rahmen der Knorpeldefekt-Reparatur geeignet ist. Dabei wurde kein signifikanter Vorteil der initialen Seruminkubation des Implantats für die Knorpelregeneration beobachtet. Ein möglicher Nutzen der Seruminkubation ließe sich daher nur vor dem Hintergrund der Literatur (Erggelet et al. 2007) und unter Betrachtung der in diesem Versuch beobachteten etwas längerfristigen chondrogenen Differenzierung der im BNC-Implantat befindlichen Zellen (**ZF+**: 8 Wochen vs. **ZF-**: 4 Wochen; Fiedler 2014) ableiten. In der klinischen Anwendung wäre somit der Einsatz von zellfreien (serumbeladenen) 3D-modifizierten BNC-Implantaten im Rahmen einer AMIC denkbar, die im Vergleich zur MACT (zellbesiedeltes BNC-Implantat) auch ein kostengünstigeres Verfahren darstellt.

6.3 Charakterisierung der *in situ* Integration im Knorpelregenerationsmodell anhand von „Push-out Tests“

Ein besonders wichtiges Merkmal zur Beurteilung eines potentiellen Knorpelersatzmaterials im Rahmen des Tissue Engineering stellt die saumlose Integration des Biomaterials oder des Knorpelregenerats in den umliegenden natürlichen Gelenkknorpel dar (Ge et al. 2012, Boushell et al. 2016). Anhand der histomorphologischen Ergebnisse konnte in dieser Arbeit die *in situ*-Integration des zellfreien oder zellbesiedelten BNC-Implantats in den umliegenden Knorpelring nachgewiesen werden. So wurde anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen neben dem lückenlosen Überdecken der Knorpel-BNC-Grenze im Kulturverlauf ein fast komplettes Überwachsen des Implantats (mitsamt der Kanaleingänge) mit einem dichten Zellrasen nachgewiesen. In den histologischen Übersichtsfärbungen wurde ebenso eine ausgeprägte Migration und Adhäsion auf das BNC-Implantat und die Bildung eines dichten, den gesamten Knorpeldefekt bedeckenden Zellrasens beobachtet. Außerdem wurde

in den immunhistochemischen Analysen das Vorkommen knorpeltypischer Matrixbestandteile (Kol-2, Aggrekan) im Cellulosegerüst (sowohl in Peripherie und Zentrum des Implantats) eindeutig belegt.

Die langfristige Befestigung des Implantats im Knorpeldefekt kann *in vitro* nur durch eine sichere laterale Anhaftung und einem daraus resultierenden festen mechanischen Kontakt des Materials mit dem umgebenen Knorpelring realisiert werden. Dieses „laterale Bonding“ ist entscheidend für die sich daran anschließende Integration des Biomaterials in das umgebene Gewebe. Im Rahmen dieser passgenauen und sicheren Insertion spielt die mechanische Stabilität des Implantatmaterials eine wichtige Rolle. Ahrem et. al beschrieben, dass bereits bei einer eindimensional lasergestützten Perforation ca. 10% des ursprünglichen BNC-Volumens entfernt wurden. In mechanischen Ausreißtests wurde dann auch eine deutliche Abnahme der maximalen Zugfestigkeit des BNC-Materials festgestellt. Die Festigkeit lag zwar immer noch im Bereich der biomechanischen Eigenschaften von anderen, klinisch angewandten Implantatmaterialien (Ahrem et al. 2014 und enthaltene Literaturstellen), die Laser-Perforation führte jedoch dazu, dass die im vorliegenden *in vitro* Modell eingesetzten, sehr kleinen BNC-Zylinder relativ labil waren. Vor diesem Hintergrund wurden für den aktuellen Versuch die 3D-modifizierten BNC-Zylinder mit einem größeren Durchmesser als der Durchmesser des generierten Knorpeldefekts hergestellt (2,7 mm vs. 2 mm), damit diese initial stabil in dem Knorpeldefekt arretiert werden konnten. Hiernach konnten in lichtmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowohl der sichere Kontakt des Inserts mit dem Defektrand als auch stets offene Kanalstrukturen im BNC-Implantat nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund, dass BNC-Implantate *in vivo* bereits ausgezeichnet und ohne Fremdkörper- oder Entzündungsreaktionen in das umliegende Gewebe einwachsen, (Helenius et al. 2006, Scherner et al. 2014, Lang et al. 2015), sollte auch in diesem Modell die *in situ* Integration des Biomaterials in den umliegenden bovinen Knorpelring evaluiert werden. Hierzu wurden in einem weiteren Projekt der AG Experimentelle Rheumatologie („QuReGe“-Funktionelle Qualitätssicherung von Regenerativen Gewebeersatzmaterialien für Knorpel und Meniskus) biomechanische Tests für die *in vitro* kultivierten Knorpel-Implantat-Regenerate durchgeführt. Dabei sollte ein fortschreitendes Einwachsen des modifizierten BNC-Implantats in das umliegende Knorpelgewebe im Sinne eines „lateralen Bondings“ im Verlauf der Langzeitkultur charakterisiert werden. Im Rahmen dieser „Push out Tests“ wurden mittels eines Stempels die 3D-modifizierten BNC-Inserts aus dem Knorpelring gedrückt und die

dabei auftretenden Kräfte gemessen (maximale Auspresskraft nach Abzug der Kraft bei der Leermessung).

In guter Übereinstimmung mit früheren Daten aus der eigenen AG mit *unmodifizierten* BNC-Implantaten verblieben die Auspresskräfte der zellfreien, serumbeladenen, 3D-modifizierten BNC-Implantate (**ZF+**) über die gesamte Kulturdauer auf einem Niveau zwischen 0,03 und 0,05 N (entsprechend 3 bis 5 g) und zeigten keinen signifikanten zeitabhängigen Anstieg. Der Grund dafür könnte eine Quellung der Nanocellulose während der Vorkultur von 4 Tagen sein, der möglicherweise bereits zum Nullpunkt zu einer leichten Verankerung des Implantates im umgebenen Knorpelring führte. Die geringfügig niedrigeren Auspresskräfte der 3D-modifizierten BNC-Implantate gegenüber den *unmodifizierten* BNC-Implantaten aus den Vorversuchen (0,06 bis 0,08 N) könnten einerseits auf einer geringeren mechanischen Stabilität des *modifizierten* BNC-Materials beruhen. Andererseits könnte dieser Unterschied auch darauf beruhen, dass die *unmodifizierten* BNC-Implantate in den Vorversuchen zum Teil deutlich über den Knorpeldefektrand hinausragten und somit falsch hohe Werte gemessen wurden. Im aktuellen Versuch wurde dagegen stets darauf geachtet, dass das BNC-Implantat einen glatten Kontaktabschluss zum umliegenden Knorpel aufwies.

In der AG Experimentelle Rheumatologie wurden auch biomechanische Analysen an anderen Implantatmaterialien durchgeführt, wie z.B. resorbierbaren PGA-Vliesen (Dunzel et al. 2013). Hier wurden zwar am Anfang der Kultur deutlich höhere Ausdrückkräfte gemessen (Nullpunkt: 0,13 – 0,17 N), die jedoch während der Kulturdauer über einen Zeitraum von 10 Wochen als Folge der Resorbierbarkeit des Materials um bis zu 82% auf Werte unter 0,05 N abnahmen. Interessanterweise zeigten damit die nicht-resorbierbaren, 3D-modifizierten BNC-Implantate langfristig ähnliche Werte wie die resorbierbaren PGA-Vliese (Dunzel et al. 2013).

In dieser Arbeit wiesen die zellbesiedelten BNC-Proben (**ZB**) zwar initial signifikant niedrigere Ausdrückkräfte als die zellfreien, serumbeladenen BNC-Proben (**ZF+**) auf, erreichten aber bis zum Zeitpunkt 8 Wochen mit einem signifikanten Anstieg ungefähr das Niveau der zellfreien Proben (maximal 0,048 N), möglicherweise als Folge einer zunehmenden lateralen Anheftung im Rahmen der Knorpelregeneration. Trotz insgesamt unterschiedlicher zeitlicher Verläufe wurden auch im Falle von zellfreien bzw. zellbesiedelten, nicht-resorbierbaren CaReS[®] Implantaten (Daten nicht gezeigt) oder resorbierbaren PGA-Vliesen langfristig vergleichbare Ausdrückkräfte beobachtet (Dunzel et al. 2013).

Insgesamt stellen die in den aktuellen biomechanischen Tests gemessenen, sehr niedrigen Ausdrückkräfte allerdings eine nachhaltige *in situ* Integration in Frage. Hier könnte auch die durch die 3D-Lasermodifikation destabilisierte Implantatstruktur und die damit verbundene geringere biomechanische Kompetenz des Implantats zu den niedrigen Auspresskräften beigetragen haben (Vgl. Ahrem et al. 2014).

Zur genaueren Untersuchung dieses Sachverhalts sollten weiterführende Tests vorgenommen werden. Hierzu wäre ggf. die Ko-Kultur des BNC-Implantats in osteochondralen Implantaten aus Gelenkknorpel und subchondralem Knochen nutzbar, da diese Komponenten eine bessere Stabilisierung des Implantatgerüsts im Defekt bezwecken und somit die *in vivo* Situation besser imitieren könnten.

6.4 Wahl der Untersuchungsmethoden

Die lichtmikroskopische Analyse der in dieser Arbeit kultivierten Knorpel-BNC-Konstrukte lieferte sehr aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der Regeneration von *in vitro* kultiviertem Knorpelgewebe unter Nutzung von 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose als Implantatmaterial im künstlich generiertem Knorpeldefekt. Die histologische Untersuchung ist für die Bewertung diverser operativer Knorpelreparaturmethoden von entscheidender Bedeutung (DiBartola et al. 2016). Sie stellt neben der makroskopischen Begutachtung im Rahmen arthroskopischer „Second-look“-Studien (van den Borne et al. 2007) einen festen Untersuchungsparameter für die Charakterisierung der Qualität des Reparaturgewebes bzw. des neu gebildeten Knorpels nach Anwendung von regenerativen und/oder „Tissue-engineering“ (TE-) basierten Knorpelersatzverfahren dar. Dabei wird im Allgemeinen zwischen hyalinem, hyalin-ähnlichem („hyaline-like“) und bindegewebigem („fibrocartilage“) Reparaturgewebe, sowie Mischformen aus „hyaline-like“ und „fibrocartilage“ unterschieden (Rutgers et al. 2010, Peterson et al. 2000, Knutsen et al. 2004). Im Rahmen der histologischen Analyseverfahren kommen verschiedene Scoring-Systeme zur Anwendung, die den Vorteil haben, semiquantitative Analysen durch eine zuvor durchgeführte „Notenvergabe“ im Rahmen der jeweils untersuchten Parameter vorzunehmen. Dies ermöglicht eine bessere (quantitative) Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Knorpelersatztherapien. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit basieren die meisten Scoring-Systeme auf klinischen Studien mit Biopsie-Analysen z.B. nach einer ACT (Roberts et al. 2003) bzw. auf der histologischen Auswertung von Proben aus *in vivo* Experimenten nach Tierversuchen (O'Driscoll et al. 1986, Wakitani et al. 1994). In diesen Studien wird im Unterschied zum vorliegenden Versuch das Regeneratgewebe erst nach einem deutlich längeren Zeitraum als

12 Wochen histologisch untersucht. Daneben existieren für *in vitro* regenerierten Knorpel nur sehr wenige histologische Klassifikationsmethoden, die bisher lediglich im Rahmen zellbasierter (TE-) Forschungsansätze angewendet wurden. Der „Bern-Score“ ist hierbei das wohl gebräuchlichste Graduierungssystem zur qualitativen Beurteilung von *in vitro* generiertem (Neo-)Knorpel und wurde erstmals zur histologischen Beurteilung von Pelletkulturen aus isolierten, humanen Gelenkknorpelzellen herangezogen (Grogan et al. 2006). In diesem Score wird neben Zellgehalt/Zellanordnung und Zellmorphologie auch der Glycosaminoglykangehalt im Knorpelregenerat anhand der Stärke der Safranin-O-Färbung bestimmt und jeweils in einer Dreipunkteskala benotet. Im et al. ergänzten diesen Score durch immunhistochemische Analysen zum Kollagen-II-Gehalt und untersuchten neben Pelletkulturen auch zellbesiedelte Fibringele (Im et al. 2005), ein weitestgehend mit der Untersuchungsmethodik der aktuellen Arbeit vergleichbarer Ansatz. Allerdings erfolgte die histologische Untersuchung der *in vitro* kultivierten MSC bereits nach 2-3 Wochen und damit nach einer deutlich kürzeren Kulturdauer als in der aktuellen Studie.

Im exakten Vergleich zum vorliegenden *in vitro* Modell (Kombination aus Knorpelgewebsexplantaten in Kokultur mit Implantatmaterialien) existieren bislang jedoch keine in der Literatur bekannten, histologischen Einteilungsmöglichkeiten. Daher wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen und immunhistochemischen semiquantitativen Analysen eigens aufgestellte Gradeinteilungen (Dreipunkteskala) mit spezifisch adaptierten Kriterien verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung eines in der AG für Experimentelle Rheumatologie etablierten *in vitro* Modells zur Langzeitkultivierung von bovinen Knorpelimplantaten und zugleich die Untersuchung von 3D-modifizierter bakterieller Nanocellulose hinsichtlich ihrer Eignung als zellfreies Implantat-Material für die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten. Hierbei sollte die Rolle von Serum als bioaktiver Faktor im Rahmen der *in vitro*-Regeneration boviner Knorpeldefekte evaluiert werden. Zudem galt es, den Einsatz eines dreidimensional zellbesiedelten BNC-Implantats als potentiell anwendbare Leitschiene im Sinne einer matrixassoziierten, allogenen Chondrozytenimplantation zu etablieren und seinen prinzipiellen Nutzen im Rahmen dieses *in vitro* Modells zu untersuchen.

Der Beitrag der verwendeten Versuchsbedingungen (Implantat-Eigenschaften) sollte zu einer verbesserten Knorpelregeneration anhand verschiedener Kriterien wie Migration, Zunahme der Zellzahl und Differenzierung der Chondrozyten sowie Matrixsynthese im Implantat und dessen Integration im Knorpeldefekt beurteilt werden. Die Charakterisierung erfolgte hierbei mittels histologischer, rasterelektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Analysen sowie unter Einsatz von Push-out Tests. Aus den gewonnenen positiven Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen treffen:

- Das vorliegende Regenerationsmodell bietet sehr gute Bedingungen für die *in vitro* Kultivierung von bovinen Knorpelimplantaten über bis zu 12 Wochen und liefert durch die Möglichkeit der Kokultivierung verschiedener Implantatmaterialien (in diesem Fall 3D-modifizierte BNC) gute Erkenntnisse hinsichtlich der initialen Regeneration des Knorpelgewebes sowie des defektauffüllenden Materials.
- Limitationen dieses *in vitro* Modells zeigten sich in der Detektion vereinzelter avitaler Zellen, der zunehmenden Desintegration oberflächennaher Knorpelschichten sowie zellulären Dedifferenzierungsprozessen am Ende der Langzeitkultivierung (12 Wochen).
- Die strukturelle Modifikation der BNC lieferte optimale Voraussetzungen zur erfolgreichen dreidimensionalen Besiedlung des Implantats mit bovinen Chondrozyten.
- Der Grad der dreidimensionalen Zellbesiedlung war bei den vorher zellbesiedelten Implantaten stets höher als bei den initial zellfreien Implantaten.
- Die Interaktion der im Implantat befindlichen Chondrozyten mit der modifizierten bakteriellen Nanocellulose führte zu einer erfolgreichen Adhäsion, Zellzunahme und

Differenzierung der mobilisierten Knorpelzellen und befähigte diese zur Synthese knorpelgewebstypischer Matrix.

- Es erfolgte eine sichere Speicherung von Kollagen II und Aggrekan im BNC-Implantat und somit eine erfolversprechende Defektauffüllung mit knorpeltypischer EZM.
- Die Matrixneosynthese und -einlagerung in das Cellulose-Gerüst der initial zellfreien Implantate war dabei mit denen in zellbesiedelten Implantaten vergleichbar.
- Die gute Integration des BNC-Implantates wurde durch die enorme oberflächliche Zellbesiedlung und den Einbau von Matrixbestandteilen belegt.
- Ausdrückversuche deuteten im Falle der zellbesiedelten Implantate auf eine Zunahme des lateralen Bondings im Kulturverlauf hin, waren jedoch wegen der sehr geringen absoluten Kräfte insgesamt nur begrenzt aussagekräftig.

Mit diesen Ergebnissen wurden zum Teil Literaturbefunde bestätigt (Pretzel et al. 2013, Ahrem et al. 2014), aber auch komplett neue Daten erhoben (aktuelle Arbeit; Fiedler 2014).

Aufgrund der in parallel durchgeführten *in vivo* Analysen festgestellten schlechten Haftung des Implantats im ovinen Knorpeldefekt bestehen für den Einsatz des 3D-modifizierten BNC-Materials in der klinischen Anwendung gewisse Limitationen. Die schlechte Fixierung im Knorpeldefekt könnte in weiteren Studien mittels einer nahtfreien Adaptation der BNC an den subchondralen Knochen gelöst werden. Dies könnte beispielsweise unter Zuhilfenahme eines *in vitro* Knorpel-Knochen-Modells realisiert werden. Mit diesem Modell ließen sich die biomechanischen Eigenschaften des singulär verwendeten Knorpelersatzgewebes evtl. verbessern und eine optimierte Integration in den Knorpeldefekt erreichen. *In vivo* wäre der Einsatz von 3D-modifizierter BNC nach einer Fixierung an eine Knochenkomponente und die anschließende Nutzung als Knorpel-Knochen-Implantat denkbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 3D-modifizierte BNC offenbar sehr gute Umgebungsbedingungen für die Kultivierung von bovinen Chondrozyten und die Regeneration eines künstlich generierten Knorpeldefekts schuf. Das Implantat ermöglichte dabei den Übergang von einer Monolayerkultur in eine 3D-Kultur. Die modifizierte Nanocellulose-Matrix scheint ideale Voraussetzungen zu liefern, um die chondrogene Differenzierung primärer Knorpelzellen positiv zu beeinflussen. Sie stellt damit möglicherweise ein geeignetes Material für die Knorpelrekonstruktion im Bereich des Tissue Engineering dar.

8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Agneskirchner JD, Brucker P, Burkart A, Imhoff AB. 2002. Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 10 (3):160-168.
- Ahrem H, Pretzel D, Mosig S, Rennert K, Kinne RW, Klemm DO. 2011. Bacterial nanocellulose biomaterials: Interaction with living cells. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 241.
- Ahrem H, Pretzel D, Endres M, Conrad D, Courseau J, Muller H, Jaeger R, Kaps C, Klemm DO, Kinne RW. 2014. Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants. *Acta Biomater*, 10 (3):1341-1353.
- Aigner T, McKenna L. 2002. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 59 (1):5-18.
- Albrecht C, Tichy B, Nurnberger S, Hosiner S, Zak L, Aldrian S, Marlovits S. 2011. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis Cartilage*, 19 (10):1219-1227.
- Allard SA, Bayliss MT, Maini RN. 1990. The synovium-cartilage junction of the normal human knee. Implications for joint destruction and repair. *Arthritis Rheum*, 33 (8):1170-1179.
- Ammon HP, Ege W, Oppermann M, Gopel W, Eisele S. 1995. Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. *Anal Chem*, 67 (2):466-471.
- Andereya S, Mumme T, Müller-Rath R, Schneider U. 2004. Welche Faktoren beeinflussen das Ergebnis der ACT bei Überschreiten der Indikationsgrenzen? *Z Orthop Unfall*, 142 (06):651-658.
- Andereya S, Maus U, Gavenis K, Müller-Rath R, Miltner O, Mumme T, Schneider U. 2006. Erste klinische Erfahrungen mit einem neuartigen dreidimensionalen Kollagengel (CaReS®) zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte am Kniegelenk. *Z Orthop Unfall*, 144 (03):272-280.
- Anders JO, Mollenhauer J, Beberhold A, Kinne RW, Venbrocks RA. 2009. Gelatin-based haemostyptic Spongostan as a possible three-dimensional scaffold for a chondrocyte matrix?: an experimental study with bovine chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 91 (3):409-416.
- Anders S, Schaumburger J, Grifka J. 2001. [[Surgical intra-articular interventions in arthrosis]. *Orthopade*, 30 (11):866-880.

- Andersson J, Stenhamre H, Backdahl H, Gatenholm P. 2010. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 94 (4):1124-1132.
- Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA. 1989. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 25 (7):659-668.
- Aurich M, Anders J, Trommer T, Liesaus E, Wagner A, Venbrocks R. 2007. [Autologous chondrocyte transplantation by the sandwich technique. A salvage procedure for osteochondritis dissecans of the knee]. *Unfallchirurg*, 110 (2):176-179.
- Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. 2006. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27 (9):2141-2149.
- Barbero A, Grogan S, Schafer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I. 2004. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 (6):476-484.
- Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G. 2005. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br*, 87 (5):640-645.
- Basad E. 2013. Gelenkerhaltende operative Maßnahmen bei der Gonarthrose
- Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. 2006. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee*, 13 (3):194-202.
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Lohnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Noth U, Perka C, Richter W, Schafer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K, German Society for T, German Society for Orthopedic S. 2004. [Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 142 (5):529-539.
- Benninghoff A. 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 2 (5):783-862.
- Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 85 (2):223-230.

- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30 (1):215-224.
- Bhattacharjee M, Coburn J, Centola M, Murab S, Barbero A, Kaplan DL, Martin I, Ghosh S. 2015. Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 84:107-122.
- Bobic V. 1999. [Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]. *Orthopade*, 28 (1):19-25.
- Bodin A, Concaro S, Brittberg M, Gatenholm P. 2007. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *J Tissue Eng Regen Med*, 1 (5):406-408.
- Bös L. 2003. Indikation und Ergebnisse der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation (Mosaikplastik). Köln.
- Bos PK, Kops N, Verhaar JA, van Osch GJ. 2008. Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *Osteoarthritis Cartilage*, 16 (2):204-211.
- Boushell MK, Hung CT, Hunziker EB, Strauss EJ, Lu HH. 2016. Current strategies for integrative cartilage repair. *Connective Tissue Research*:1-14.
- Brighton CT, Heppenstall RB. 1971. Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, 53 (4):719-728.
- Brittberg M. 2010. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med*, 38 (6):1259-1271.
- Brittberg M, Winanski CS. 2003. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2:58-69.
- Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. 2003. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3:109-115.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331 (14):889-895.
- Brown AJ. 1886. On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49 (0):432-439.

- Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. 2006. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma*, 20 (10):739-744.
- Buckwalter JA. 1998. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*, 28 (4):192-202.
- Buckwalter JA. 2002. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, (402):21-37.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47:477-486.
- Buckwalter JA, Brown TD. 2004. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, (423):7-16.
- Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. 1994. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg*, 2 (4):192-201.
- Bujia J. 1995. [Effect of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis in cultured human chondrocytes]. *Laryngorhinootologie*, 74 (7):444-449.
- Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB. 2001. [Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage]. *Unfallchirurg*, 104 (9):798-807.
- Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I, Bosnea L, Boura K, Tsafrakidou P, Dima A, Terpou A, Koutinas A, Castro GR. 2016. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresour Technol*, 213:172-180.
- Chan SM, Neu CP, Duraine G, Komvopoulos K, Reddi AH. 2010. Atomic force microscope investigation of the boundary-lubricant layer in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 (7):956-963.
- Chen YM, Tingfei X, Yudong Z, Tingting G, Jiaquan H, Yizao W, Chuan G. 2009. In Vitro Cytotoxicity of Bacterial Cellulose Scaffolds Used for Tissue-engineered Bone. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24 (1 Suppl):137-145.
- Choi YC, Morris GM, Lee FS, Sokoloff L. 1980. The effect of serum on monolayer cell culture of mammalian articular chondrocytes. *Connect Tissue Res*, 7 (2):105-112.
- Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH. 2005. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater*, 9:58-67; discussion 67.
- Chung C, Burdick JA. 2008. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2):243-262.

- Cole BJ, Farr J, Winalski CS, Hosea T, Richmond J, Mandelbaum B, De Deyne PG. 2011. Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med*, 39 (6):1170-1179.
- Convery FR, Akeson WH, Keown GH. 1972. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop Relat Res*, 82:253-262.
- Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. 1997. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 13 (4):456-460.
- Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM, Jr. 2006. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27 (2):145-151.
- Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM, Jr. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8 (1):1-12.
- Darling EM, Athanasiou KA. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*, 23 (2):425-432.
- Davies LC, Blain EJ, Caterson B, Duance VC. 2008. Chondroitin sulphate impedes the migration of a sub-population of articular cartilage chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 16 (8):855-864.
- de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, Tercjak A, Gutierrez J, Lustrri WR, de Oliveira OBJ, Ribeiro SJ. 2016. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr Polym*, 153:406-420.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8 (5):309-334.
- DiBartola AC, Everhart JS, Magnussen RA, Carey JL, Brophy RH, Schmitt LC, Flanigan DC. 2016. Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. *Knee*, 23 (3):344-349.
- Dijkgraaf LC, de Bont LGM, Boering G, Liem RSB. 1995. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53 (8):924-929.
- DiMicco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL. 2002. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (3):218-225.
- Drenckhahn D. 2003. *Knorpelgewebe*. München: Elsevier.
- Drewa T, Bilinski PJ, Galazka P, Czaplewski A, Drewa L, Wozniak A, Sir J. 2003. Influence of autologous serum on rabbit chondrocytes proliferation in vitro. Comparing study to standard sera supplements. *Ortop Traumatol Rehabil*, 5 (6):751-757.

- Dunzel A, Rudiger T, Pretzel D, Kopsch V, Endres M, Kaps C, Fohr P, Burgkart RH, Linss S, Kinne RW. 2013. [The bovine cartilage punch model: a tool for the *in vitro* analysis of biomaterials and cartilage regeneration]. *Orthopade*, 42 (4):254-261.
- Enders JT, Otto TJ, Peters HC, Wu J, Hardouin S, Moed BR, Zhang Z. 2010. A model for studying human articular cartilage integration *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*, 94 (2):509-514.
- Erggelet C, Sittinger M, Lahm A. 2003. The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy*, 19 (1):108-110.
- Erggelet C, Browne JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Mosely JB. 2000. [Autologous chondrocyte transplantation for treatment of cartilage defects of the knee joint. Clinical results]. *Zentralbl Chir*, 125 (6):516-522.
- Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. 2007. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials*, 28 (36):5570-5580.
- Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. 2009. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res*, 27 (10):1353-1360.
- Erickson IE, Kestle SR, Zellars KH, Dodge GR, Burdick JA, Mauck RL. 2012. Improved cartilage repair via *in vitro* pre-maturation of MSC-seeded hyaluronic acid hydrogels. *Biomed Mater*, 7 (2):024110.
- Evans CH, Mazzocchi RA, Nelson DD, Rubash HE. 1984. Experimental arthritis induced by intraarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knees. *Arthritis Rheum*, 27 (2):200-207.
- Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4 (1):30-35.
- Fani N, Ziadlou R, Shahhoseini M, Baghaban Eslaminejad M. 2016. Comparative epigenetic influence of autologous versus fetal bovine serum on mesenchymal stem cells through *in vitro* osteogenic and adipogenic differentiation. *Exp Cell Res*, 344 (2):176-182.
- Feldmann EM, Sundberg JF, Bobbili B, Schwarz S, Gatenholm P, Rotter N. 2013. Description of a novel approach to engineer cartilage with porous bacterial nanocellulose for reconstruction of a human auricle. *J Biomater Appl*, 28 (4):626-640.
- Fiedler T. 2014. Eignung von bakterieller Nanocellulose als Knorpelersatzmaterial - molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen im *in vitro* Knorpelstanzenmodell [Bachelorarbeit]. Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena: Fachberich Medizintechnik/Biotechnologie.

- Föhr P, Hautmann V, Prodingler P, Pohlig F, Kaddick C, Burgkart R. 2012. [Design of a high-dynamic closed-loop controlled cartilage test system]. *Orthopade*, 41 (10):820-826.
- Forriol F. 2009. Growth factors in cartilage and meniscus repair. *Injury*, 40 Suppl 3:S12-16.
- Freed LE, Martin I, Vunjak-Novakovic G. 1999. Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl):S46-58.
- Frenkel SR, Di Cesare PE. 2004. Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng*, 32 (1):26-34.
- Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD. 1984. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop Relat Res*, (182):200-205.
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. 2005. Stellenwert und Technik der Autologen Chondrozyten-Transplantation. *Zentralbl Chir*, 130:327-332.
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. 2006. [Cartilage repair in the knee joint]. *Unfallchirurg*, 109 (7):563-574; quiz 575-566.
- Fu FH, Zurakowski D, Browne JE, Mandelbaum B, Erggelet C, Moseley JB, Jr., Anderson AF, Micheli LJ. 2005. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. *Am J Sports Med*, 33 (11):1658-1666.
- Gaissmaier C, Fritz J, Weise K, Mollenhauer J. 2007. Regeneration und Reparatur von Knorpelschäden. *Trauma und Berufskrankheit*, 9 (4):258-264.
- Gaissmaier C, Benz K, Schewe B, Fritz J, Stoop R, Weise K. 2003a. Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *Stiftung zur Förderung der Arthroskopie - Arthroskopie Aktuell*, 16 (2003):4-14.
- Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, Schneider U, Marlovits S, Anders J, Schewe B, Weise K. 2003b. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks: Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion. *Dtsch Arztebl International*, 100 (38):2448-.
- Gama M, Klemm, D., Gatenholm, P. 2013. *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*. CRC Press, Boca Raton.
- Gannon JM, Walker G, Fischer M, Carpenter R, Thompson RC, Jr., Oegema TR, Jr. 1991. Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. *J Orthop Res*, 9 (4):485-494.

- Garrett JC. 1986. Treatment of osteochondral defects of the distal femur with fresh osteochondral allografts: a preliminary report. *Arthroscopy*, 2 (4):222-226.
- Gay S, Muller PK, Lemmen C, Remberger K, Matzen K, Kuhn K. 1976. Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and degenerative osteoarthritis. *Klin Wochenschr*, 54 (20):969-976.
- Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z. 2012. Functional biomaterials for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 100 (9):2526-2536.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. 2000. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 133 (5):321-328.
- Ghazavi MT, Pritzker KP, Davis AM, Gross AE. 1997. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 79 (6):1008-1013.
- Gille J, Schuseil E, Wimmer J, Gellissen J, Schulz AP, Behrens P. 2010. Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18 (11):1456-1464.
- Gilmore RS, Palfrey AJ. 1987. A histological study of human femoral condylar articular cartilage. *J Anat*, 155:77-85.
- Glowacki J, Trepman E, Folkman J. 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 172 (1):93-98.
- Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T. 2010a. Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am*, 92 (14):2470-2490.
- Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E. 2010b. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18 (4):434-447.
- Grande CJ, Torres FG, Gomez CM, Bano MC. 2009. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomater*, 5 (5):1605-1615.
- Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP. 2001. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Miner Res*, 16 (11):2005-2016.
- Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, Martin I, Mainil-Varlet P. 2006. Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Eng*, 12 (8):2141-2149.

- Gstraunthaler G. 2013. Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg,s.l. : Springer Berlin Heidelberg.
- Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. 2013. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, 65 (5):791-793.
- Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliuisis V, Bernotavicius G, Smailys A. 2005. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy*, 21 (9):1066-1075.
- Guerne PA, Sublet A, Lotz M. 1994. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 158 (3):476-484.
- Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, Cannon SR, Briggs TW. 2004. The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee*, 11 (1):51-55.
- Hagg R, Bruckner P, Hedbom E. 1998. Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J Cell Biol*, 142 (1):285-294.
- Haleem AM, Chu CR. 2010. Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20 (2):76-89.
- Hall BK, Miyake T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22 (2):138-147.
- Hangody L, Fules P. 2003. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2:25-32.
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. 1998. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*, 21 (7):751-756.
- Hardaker WT, Jr., Garrett WE, Jr., Bassett FH, 3rd. 1990. Evaluation of acute traumatic hemarthrosis of the knee joint. *South Med J*, 83 (6):640-644.
- Hardingham TE, Muir H. 1974. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J*, 139 (3):565-581.
- Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. 2011. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 19 (7):779-791.

- Hascall VC, Handley CJ, McQuillan DJ, Hascall GK, Robinson HC, Lowther DA. 1983. The effect of serum on biosynthesis of proteoglycans by bovine articular cartilage in culture. *Arch Biochem Biophys*, 224 (1):206-223.
- Heinegard D. 2009. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*, 90 (6):575-586.
- Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. 2006. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, 76 (2):431-438.
- Hembry RM, Dyce J, Driesang I, Hunziker EB, Fosang AJ, Tyler JA, Murphy G. 2001. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, 83-a (6):826-838.
- Henderson I, Tuy B, Oakes B. 2004. Reoperation after autologous chondrocyte implantation. Indications and findings. *J Bone Joint Surg Br*, 86 (2):205-211.
- Henderson I, Francisco R, Oakes B, Cameron J. 2005. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee--a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years. *Knee*, 12 (3):209-216.
- Heßler N. 2008. Bakterielle Nanocellulose : Struktur- und Formdesign während der Biosynthese. Dissertation, Universität Jena.
- Heßler N, Klemm D. 2009. Alteration of bacterial nanocellulose structure by in situ modification using polyethylene glycol and carbohydrate additives. *Cellulose*, 16 (5):899-910.
- Hestrin S, Schramm M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*, 58 (2):345-352.
- Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli PA. 2006. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 323 (1):127-135.
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. 2002. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 18 (7):730-734.
- Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. 2005. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87 (12):2671-2686.
- Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. 2003. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A (2):185-192.

- Huber M, Trattng S, Lintner F. 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*, 35 (10):573-580.
- Hunt SA, Jazrawi LM, Sherman OH. 2002. Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg*, 10 (5):356-363.
- Hunter CJ, Levenston ME. 2004. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng*, 10 (5-6):736-746.
- Hunziker EB. 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (6):432-463.
- Hunziker EB, Rosenberg LC. 1996. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*, 78 (5):721-733.
- Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ. 2002. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10 (7):564-572.
- Im GI, Shin YW, Lee KB. 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (10):845-853.
- Imhoff AB, Oetl GM. 1999. Arthroscopic and open techniques for transplantation of osteochondral autografts and allografts in various joints. *Surg Technol Int*, 8:249-252.
- Imhoff AB, Burkart A, Oetl GM. 1999a. [Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation]. *Orthopade*, 28 (1):45-51.
- Imhoff AB, Oetl GM, Burkart A, Traub S. 1999b. [Autologous osteochondral transplantation on various joints]. *Orthopade*, 28 (1):33-44.
- Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. 2009. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 17 (6):561-577.
- Jing W, Chunxi Y, Yizao W, Honglin L, Fang H, Kerong D, Yuan H. 2013. Laser Patterning of Bacterial Cellulose Hydrogel and its Modification With Gelatin and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Soft Materials*, 11 (2):173-180.
- Johnson LL. 1986. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy*, 2 (1):54-69.
- Johnson LL. 2001. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl):S306-317.
- Jonas R, Farah LF. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59 (1-3):101-106.

- Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, Sittlinger M. 2004. [Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece]. *Orthopade*, 33 (1):76-85.
- Keene DR, Engvall E, Glanville RW. 1988. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol*, 107 (5):1995-2006.
- Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. 1973. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta*, 297 (2):456-472.
- Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. 2008. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater*, 16:26-39.
- Kheir E, Shaw D. 2009. Hyaline articular cartilage. *Orthopaedics and Trauma*, 23 (6):450-455.
- Kirkley A, Birmingham TB, Litchfield RB, Giffin JR, Willits KR, Wong CJ, Feagan BG, Donner A, Griffin SH, D'Ascanio LM, Pope JE, Fowler PJ. 2008. A randomized trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 359 (11):1097-1107.
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26 (9):1561-1603.
- Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Hornung M, Schmauder H-P, Marsch S. 2006. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Polysaccharides II*. Springer, 49-96.
- Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindstrom T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A. 2011. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50 (24):5438-5466.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. 2004. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A (3):455-464.
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O. 2007. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 89 (10):2105-2112.

- Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Perdisa F, Marcacci M. 2013. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review. *Bone & Joint Research*, 2 (2):18-25.
- Kramer F, Klemm D, Schumann D, Heßler N, Wesarg F, Fried W, Stadermann D. 2006. Nanocellulose Polymer Composites as Innovative Pool for (Bio)Material Development. *Macromolecular Symposia*, 244 (1):136-148.
- Kreuz PC, Muller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. 2009. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis Res Ther*, 11 (2):R33.
- Kuettner KE. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clinical Biochemistry*, 25 (3):155-163.
- Kumar P, Oka M, Toguchida J, Kobayashi M, Uchida E, Nakamura T, Tanaka K. 2001. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *J Anat*, 199 (Pt 3):241-250.
- Labek G, Thaler M, Janda W, Agreiter M, Stockl B. 2011. Revision rates after total joint replacement: cumulative results from worldwide joint register datasets. *J Bone Joint Surg Br*, 93 (3):293-297.
- Lang N, Merkel E, Fuchs F, Schumann D, Klemm D, Kramer F, Mayer-Wagner S, Schroeder C, Freudenthal F, Netz H, Kozlik-Feldmann R, Sigler M. 2015. Bacterial nanocellulose as a new patch material for closure of ventricular septal defects in a pig model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 47 (6):1013-1021.
- Laprell H, Petersen W. 2001. Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6-12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg*, 121 (5):248-253.
- Lattermann C, Brucker PU. 2012. Osteochondrale Allografttransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten am Kniegelenk. *Arthroskopie*, 25 (1):19-29.
- Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M. 2000. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res*, 18 (5):790-799.
- Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. 2001. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol*, 187 (3):345-355.
- Linss S. 2012. Entwicklung eines bioaktiven Gelenkknorpelimplantates auf der Basis von bakteriellen Nanocellulose (BNC): in vitro-Untersuchungen in einem bovinen Knorpelregenerationsmodell [Dissertation]. FSU Jena.

- Lonner JH, Pedlow FX, Siliski JM. 1999. Total knee arthroplasty for post-traumatic arthrosis. *J Arthroplasty*, 14 (8):969-975.
- Lopes JL, Machado JM, Castanheira L, Granja PL, Gama FM, Dourado F, Gomes JR. 2011. Friction and wear behaviour of bacterial cellulose against articular cartilage. *Wear*, 271 (9–10):2328-2333.
- Lotz MK. 2010. New developments in osteoarthritis: Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Research & Therapy*, 12 (3):211.
- Lotz MK, Kraus VB. 2010. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther*, 12 (3):211.
- Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH. 1988. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 267 (2):416-425.
- Lyman J, Kelley S, Lee G. 2000. Chondrocyte process extension and migration response to partial thickness cartilage injuries in human explants. *Proc Orthopaedic Res Soc*, 46:0929.
- MacConaill MA. 1951. THE MOVEMENTS OF BONES AND JOINTS. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 33-B (2):251.
- Madry H. 2005. Operative und rekonstruktive Behandlung Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Madry H, Pape D. 2008. [Autologous chondrocyte transplantation]. *Orthopade*, 37 (8):756-763.
- Madry H, Zurakowski D, Trippel SB. 2001. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther*, 8 (19):1443-1449.
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. 2010. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18 (4):419-433.
- Madry H, Grun UW, Knutsen G. 2011. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*, 108 (40):669-677.
- Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. 2001. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl A:S6-15.
- Maletius W, Aigner T. 1999. Morphologie und Molekularpathologie der Osteoarthrose. *Arthroskopie*, 12 (1):3-8.

- Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. 2002. Serum-free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tissue Eng*, 8 (4):573-580.
- Manfredini M, Zerbini F, Gildone A, Faccini R. 2007. Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop Belg*, 73 (2):207-218.
- Mankin HJ. 1982. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, 64 (3):460-466.
- Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loretto I. 2002. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 10 (3):154-159.
- Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez Ávila Hc, Hägg D, Gatenholm P. 2015. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16 (5):1489-1496.
- Marlovits S, Vecsei V. 2000. Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten — Teil 2: Chirurgische Behandlungsoptionen zur biologischen Knorpelreparatur. *Acta Chirurgica Austriaca*, 32 (4):185-194.
- Marlovits S, Hombauer M, Tamandl D, Vecsei V, Schlegel W. 2004. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture. *Int J Mol Med*, 13 (2):281-287.
- Martinek V. 2003. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. Köln.
- Martinek V, Imhoff AB. 2003. Therapie von Knorpelschäden. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, Jahrgang 54, Nr. 3 (2003):70-76.
- Martinez H, Brackmann C, Enejder A, Gatenholm P. 2012. Mechanical stimulation of fibroblasts in micro-channeled bacterial cellulose scaffolds enhances production of oriented collagen fibers. *J Biomed Mater Res A*, 100 (4):948-957.
- Matziolis G, Windisch C. 2014. [The post-traumatic arthritis - a challenge?]. *Z Orthop Unfall*, 152 (5):510-515.
- Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Docheva D, Schieker M, Betz OB, Jansson V, Müller PE. 2010. Membrane-based cultures generate scaffold-free neocartilage in vitro: influence of growth factors. *Tissue Eng Part A*, 16 (2):513-521.
- Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Redeker JI, Schmitt B, Buettner A, Jansson V, Müller PE. 2011. Scaffold-free 3D cellulose acetate membrane-based cultures form large cartilaginous constructs. *J Tissue Eng Regen Med*, 5 (2):151-155.

- Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. 1989. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol*, 108 (1):191-197.
- Messner K, Maletius W. 1996. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand*, 67 (2):165-168.
- Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, Fu F, Mandelbaum B, Moseley JB, Zurakowski D. 2001. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med*, 11 (4):223-228.
- Minas T. 1998. Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: economics and quality of life. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 27 (11):739-744.
- Minas T. 2001. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl):S349-361.
- Minas T, Peterson L. 1999. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med*, 18 (1):13-44, v-vi.
- Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T. 2009. Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med*, 37 (5):902-908.
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R. 2004. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol*, 122 (3):229-236.
- Miot S, Woodfield T, Daniels AU, Suetterlin R, Peterschmitt I, Heberer M, van Blitterswijk CA, Riesle J, Martin I. 2005. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials*, 26 (15):2479-2489.
- Mishima Y, Lotz M. 2008. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 26 (10):1407-1412.
- Mitchell N, Shepard N. 1976. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am*, 58 (2):230-233.
- Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. 2009. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med*, 37 (10):2053-2063.
- Mithoefer K, Williams RJ, 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG. 2005. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am*, 87 (9):1911-1920.

- Mittelmeier W, Josten C, Siebert HR, Niethard FU, Marzi I, Klüß D. 2012. Forschung in Orthopädie und Unfallchirurgie - Bestandsaufnahme und Ausblick -. Weißbuch Forschung in Orthopädie & Unfallchirurgie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie eV, 1. Auflage (Dez 2012):1-198.
- Mordstein V. 2005. Histologische und immunhistochemische Charakterisierung cartilaginärer Exostosen und Vergleich mit fetalen und postnatalen Wachstumsfugen [Dissertation]. Universität Ulm.
- Moreira S, Silva NB, Almeida-Lima J, Rocha HA, Medeiros SR, Alves C, Jr., Gama FM. 2009. BC nanofibres: in vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol Lett*, 189 (3):235-241.
- Moreland LW. 2003. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Research & Therapy*, 5 (2):54-67.
- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP. 2002. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 347 (2):81-88.
- Moseley JB, Jr., Anderson AF, Browne JE, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C. 2010. Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am J Sports Med*, 38 (2):238-246.
- Mow VC, Holmes MH, Michael Lai W. 1984. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *Journal of Biomechanics*, 17 (5):377-394.
- Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays*, 17 (12):1039-1048.
- Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. 2006. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 27 (21):3955-3963.
- Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. 2007. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells*, 25 (11):2786-2796.
- Nehrer S, Dorotka R, Domayer S, Stelzeneder D, Kotz R. 2009. Treatment of full-thickness chondral defects with hyalograft C in the knee: a prospective clinical case series with 2 to 7 years' follow-up. *Am J Sports Med*, 37 Suppl 1:81S-87S.
- Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R. 2006. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *European Journal of Radiology*, 57 (1):3-8.

- Nerlich AG, Wiest I, Vondermark K. 1993. Immunohistochemical Analysis of Interstitial Collagens in Cartilage of Different Stages of Osteoarthritis. *Virchows Archiv B-Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 63 (4):249-255.
- Niemeyer P, Kostler W, Salzmann GM, Lenz P, Kreuz PC, Sudkamp NP. 2010. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal cartilage defects in patients age 40 years and older: A matched-pair analysis with 2-year follow-up. *Am J Sports Med*, 38 (12):2410-2416.
- Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, Behrens P, Bosch U, Erggelet C, Fickert S, Fritz J, Gebhard H, Gelse K, Gunther D, Hoburg A, Kasten P, Kolombe T, Madry H, Marlovits S, Meenen NM, Muller PE, Noth U, Petersen JP, Pietschmann M, Richter W, Rolauffs B, Rhunau K, Schewe B, Steinert A, Steinwachs MR, Welsch GH, Zinser W, Albrecht D. 2013. [Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: a guideline by the working group "Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (DGOU)]. *Z Orthop Unfall*, 151 (1):38-47.
- Novaes AB, Jr., Novaes AB. 1992. IMZ implants placed into extraction sockets in association with membrane therapy (Gengiflex) and porous hydroxyapatite: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 7 (4):536-540.
- Noyes FR, Stabler CL. 1989. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med*, 17 (4):505-513.
- Nuernberger S, Cyran N, Albrecht C, Redl H, Vecsei V, Marlovits S. 2011. The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts. *Biomaterials*, 32 (4):1032-1040.
- O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. 2001. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl):S190-207.
- O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. 1986. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, 68 (7):1017-1035.
- Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2001. Integration of engineered cartilage. *J Orthop Res*, 19 (6):1089-1097.
- Ochs BG, Muller-Horvat C, Albrecht D, Schewe B, Weise K, Aicher WK, Rolauffs B. 2011. Remodeling of articular cartilage and subchondral bone after bone grafting and matrix-associated autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans of the knee. *Am J Sports Med*, 39 (4):764-773.
- OECD/EU. 2016. Health at a Glance: Europe 2016: State of Health in the EU Cycle. OECD Publishing, Paris.

- Outerbridge RE. 1961. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*, 43-B:752-757.
- Panagopoulos A, van Niekerk L, Triantafillopoulos I. 2012. Autologous chondrocyte implantation for knee cartilage injuries: moderate functional outcome and performance in patients with high-impact activities. *Orthopedics*, 35 (1):e6-14.
- Pape D, Filardo G, Kon E, van Dijk CN, Madry H. 2010. Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18 (4):448-462.
- Passler HH. 2000. [Microfracture for treatment of cartilage defects]. *Zentralbl Chir*, 125 (6):500-504.
- Peng G, McNary SM, Athanasiou KA, Reddi AH. 2014. Surface zone articular chondrocytes modulate the bulk and surface mechanical properties of the tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng Part A*, 20 (23-24):3332-3341.
- Petersen N, Gatenholm P. 2011. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91 (5):1277-1286.
- Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. 2010. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 38 (6):1117-1124.
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. 2002. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med*, 30 (1):2-12.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (374):212-234.
- Petrides PE. 1998. Binde- und Stützgewebe. **erlin**: Springer-Verlag.
- Pfander D, Rahmzadeh R, Scheller EE. 1999. Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin, and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol*, 26 (2):386-394.
- Pohlars D, Beyer A, Koczan D, Wilhelm T, Thiesen HJ, Kinne RW. 2007. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*, 9 (3):R59.
- Poole AR, Matsui Y, Hinek A, Lee ER. 1989. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat Rec*, 224 (2):167-179.

- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl):S26-33.
- Poole CA. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 191 (Pt 1):1-13.
- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci*, 103 (Pt 4):1101-1110.
- Portal O, Clark WA, Levinson DJ. 2009. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers. *Wounds*, 21 (1):1-3.
- Pot MW, Gonzales VK, Buma P, IntHout J, van Kuppevelt TH, de Vries RB, Daamen WF. 2016. Improved cartilage regeneration by implantation of acellular biomaterials after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PeerJ*, 4:e2243.
- Pretzel D, Linss S, Ahrem H, Endres M, Kaps C, Klemm D, Kinne RW. 2013. A novel in vitro bovine cartilage punch model for assessing the regeneration of focal cartilage defects with biocompatible bacterial nanocellulose. *Arthritis Res Ther*, 15 (3):R59.
- Pridie K. 1959. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg*, 41-B:618-619.
- Putz R. 2008. Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels. *Aktuelle Rheumatologie*, 33 (1):22-28.
- Qiu W, Murray MM, Shortkroff S, Lee CR, Martin SD, Spector M. 2000. Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound Repair Regen*, 8 (5):383-391.
- Reichenbach S, Rutjes AW, Nuesch E, Trelle S, Juni P. 2010. Joint lavage for osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*, (5):CD007320.
- Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. 1999. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 81 (6):1064-1068.
- Richter W, Diederichs S. 2009. Regenerative Medizin in der Orthopädie. *Der Orthopäde*, 38 (9):859-869.
- RKI/DSTATIS. 2015. Wo steht Deutschland im europäischen Vergleich, Kapitel 10, Gesundheit in Deutschland, aus Gesundheitsberichterstattung des Bundes Berlin, November 2015: RKI und DSTATIS.

- Robert-Koch-Institut. 2013. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54. RKI, Berlin.
- Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, Richardson JB. 2003. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther*, 5 (1):R60-73.
- Rosen CL, Steinberg GK, DeMonte F, Delashaw JB, Jr., Lewis SB, Shaffrey ME, Aziz K, Hantel J, Marciano FF. 2011. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery*, 69 (5):1093-1103; discussion 1103-1094.
- Roth V, Mow VC. 1980. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am*, 62 (7):1102-1117.
- Rudert M, Wirth CJ. 1998. [Cartilage regeneration and substitution]. *Orthopade*, 27 (5):W309-321.
- Russell WMS, Burch RL. 1992. The principles of humane experimental technique. Potters Bar: UFAW.
- Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. 2010. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 (1):12-23.
- Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ. 1996. Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res*, 14 (1):44-52.
- Saska S, Barud HS, Gaspar AM, Marchetto R, Ribeiro SJ, Messaddeq Y. 2011. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater*, 2011:175362.
- Scherner M, Reutter S, Klemm D, Sterner-Kock A, Guschlbauer M, Richter T, Langebartels G, Madershahian N, Wahlers T, Wippermann J. 2014. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? *J Surg Res*, 189 (2):340-347.
- Schmid TM, Linsenmayer TF. 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol*, 100 (2):598-605.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (1):62-70.

- Schneider U, Andereya S. 2003. [First results of a prospective randomized clinical trial on traditional chondrocyte transplantation vs CaReS-Technology]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 141 (5):496-497.
- Schneider U, Schmidt-Rohlfing B, Gavenis K, Maus U, Mueller-Rath R, Andereya S. 2011a. A comparative study of 3 different cartilage repair techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 19 (12):2145-2152.
- Schneider U, Rackwitz L, Andereya S, Siebenlist S, Fensky F, Reichert J, Loer I, Barthel T, Rudert M, Noth U. 2011b. A prospective multicenter study on the outcome of type I collagen hydrogel-based autologous chondrocyte implantation (CaReS) for the repair of articular cartilage defects in the knee. *Am J Sports Med*, 39 (12):2558-2565.
- Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. 2012. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 347 (3):649-663.
- Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308 (3):371-379.
- SCMPMD. 2001. The Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices. Opinion on the State Of The Art concerning Tissue Engineering. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General.
- Secretan C, Bagnall KM, Jomha NM. 2010. Effects of introducing cultured human chondrocytes into a human articular cartilage explant model. *Cell Tissue Res*, 339 (2):421-427.
- Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. 2002. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol*, 14 (2):134-141.
- Serafica G, Mormino R, Oster G, Lentz K, Koehler K. 2004. Microbial cellulose wound dressing for treating chronic wounds Google Patents.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75 (4):532-553.
- Shi Z, Zhang Y, Phillips GO, Yang G. 2014. Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35:539-545.
- Shive MS, Stanish WD, McCormack R, Forriol F, Mohtadi N, Pelet S, Desnoyers J, Methot S, Vehik K, Restrepo A. 2015. BST-CarGel(R) Treatment Maintains Cartilage Repair Superiority over Microfracture at 5 Years in a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Cartilage*, 6 (2):62-72.

- Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C. 2001. [Healing of osteochondral transplants--animal experiment studies using a sheep model]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 139 (5):382-386.
- Sohn DH, Lottman LM, Lum LY, Kim SG, Pedowitz RA, Coutts RD, Sah RL. 2002. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res*, 394:254-262.
- Spahn G. 2007. Knorpelschaden und Gonarthrose, Teil IV. *Akt Traumatol*, 37 (01):16-30.
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. 1999. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade*, 28 (1):26-32.
- Steinwachs MR, Gugli T, Kreuz PC. 2008. Marrow stimulation techniques. *Injury*, 39 Suppl 1:S26-31.
- Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Gohlke-Steinwachs U. 1999. [Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation]. *Unfallchirurg*, 102 (11):855-860.
- Stockwell RA. 1978. Chondrocytes. *Journal of Clinical Pathology Supplement (Royal College of Pathologists)*, 12:7-13.
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26 (4):419-431.
- Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, Van Der Lee J, Hagg R, Tommasini R, Lindahl A. 2004. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 (7):525-535.
- Thompson RC, Jr. 1975. An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint. *Clin Orthop Relat Res*, (107):239-248.
- Torres FG, Commeaux S, Troncoso OP. 2012. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J Funct Biomater*, 3 (4):864-878.
- Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. 2013. Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*, 21 (5):303-311.
- Ueno T, Kagawa T, Mizukawa N, Nakamura H, Sugahara T, Yamamoto T. 2001. Cellular origin of endochondral ossification from grafted periosteum. *Anat Rec*, 264:348-357.
- van den Borne MP, Raijmakers NJ, Vanlauwe J, Victor J, de Jong SN, Bellemans J, Saris DB, International Cartilage Repair S. 2007. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis Cartilage*, 15 (12):1397-1402.

- van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*, 24 (4):1053-1063.
- van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V. 2004. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro*, 18 (1):1-12.
- van Haaften EE, Ito K, van Donkelaar CC. 2016. The initial repair response of articular cartilage after mechanically induced damage. *J Orthop Res*.
- Vaquero J, Forriol F. 2012. Knee chondral injuries: clinical treatment strategies and experimental models. *Injury*, 43 (6):694-705.
- Vavken P, Samartzis D. 2010. Effectiveness of autologous chondrocyte implantation in cartilage repair of the knee: a systematic review of controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 (6):857-863.
- Vinardell T, Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ. 2009. Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an in vitro cartilage defect repair model. *Ann Biomed Eng*, 37 (12):2556-2565.
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267 (5611):531-532.
- von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, Stoss H. 1992. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 35 (7):806-811.
- Wachsmuth L, Soder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. 2006. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol*, 21 (5):477-485.
- Wagner H. 1964. [Surgical Treatment of Osteochondritis Dissecans, a Cause of Arthritis Deformans of the Knee]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, 50:335-352.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76 (4):579-592.
- Wardale J, Mullen L, Howard D, Ghose S, Rushton N. 2015. An ex vivo model using human osteoarthritic cartilage demonstrates the release of bioactive insulin-like growth factor-1 from a collagen-glycosaminoglycan scaffold. *Cell Biochem Funct*, 33 (5):277-284.

- Weise K, Krackhardt T, Gaissmaier C. 2000. Die operative Behandlung von Gelenkknorpeldefekten unter besonderer Berücksichtigung der autologen Knorpelzelltransplantation: Grundlagen - Ergebnisse - Ausblick. *OP-JOURNAL*, 16 (02):150-159.
- Weiss NG, Parvizi J, Trousdale RT, Bryce RD, Lewallen DG. 2003. Total knee arthroplasty in patients with a prior fracture of the tibial plateau. *J Bone Joint Surg Am*, 85-a (2):218-221.
- Weißberger M, Stein T, F W. 2014. Focal cartilage defects – current state of diagnostics and therapy. *Deutscher Ärzte-Verlag, Orthopädisch Unfallchirurgische Praxis*, 3 (07-08/2014).
- Wendt D, Jakob M, Martin I. 2005. Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *J Biosci Bioeng*, 100 (5):489-494.
- Werner A, Fuß M, Krauspe R. 2003. Operative gelenkerhaltende Verfahren bei Gelenkknorpelschäden: Knorpel induzierende Techniken und Knorpeltransplantation. *Dtsch Arztebl International*, 100 (9):546-.
- Wilder FV, Hall BJ, Barrett JP, Jr., Lemrow NB. 2002. History of acute knee injury and osteoarthritis of the knee: a prospective epidemiological assessment. The Clearwater Osteoarthritis Study. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (8):611-616.
- Wildner M, Sangha O, Behrend C. 2000. Wirtschaftlichkeitsuntersuchung zur autologen Chondrozytentransplantation (ACT). *Arthroskopie*, 13 (3):123-131.
- Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H. 1991. Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Eur J Cell Biol*, 54 (1):10-17.
- Wippermann J, Schumann D, Klemm D, Kosmehl H, Salehi-Gelani S, Wahlers T. 2009. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 37 (5):592-596.
- Wirth CJ, Rudert M. 1996. Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy*, 12 (3):300-308.
- Wong M, Hunziker EB. 1998. Articular cartilage biology and mechanics. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 6 (1):4-12.
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR. 1992. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem*, 267 (32):23007-23014.
- Wu LD, Xiong Y, Yan SG, Yang QS. 2005. Total knee replacement for posttraumatic degenerative arthritis of the knee. *Chin J Traumatol*, 8 (4):195-199.

- Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. 2007. In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Eng*, 13 (12):2981-2993.
- Zahedmanesh H, Mackle JN, Sellborn A, Drotz K, Bodin A, Gatenholm P, Lally C. 2011. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 97 (1):105-113.
- Zhu J, Marchant RE. 2011. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*, 8 (5):607-626.

9 ANHANG

Tab. 2: Protokolle der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen im Überblick.

Angegeben sind die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung von Kollagen I, Kollagen II und Aggrekan. EK: Endkonzentration, RT: Raumtemperatur, KS: Kaninchenserum, BSA: bovines Serumalbumin.

Kollagen 1	Kollagen 2	Aggrekan
Kaninchen Anti-human/bovin Col1-Ig (polyklonal)	Maus Anti-human/bovin Col2-IgG1 (α 1 Kette) (monoklonal)	Maus Anti-human/bovin Aggrekan IgG1 (monoklonal)
Acris, EK: 1 μ g/ml	Acris, EK: 1 μ g/ml	GeneTex, EK: 0,1 μ g/ml
1) frisch angefertigte Paraffinschnitte für 1 h bei 60° anschmelzen, anschließend bei RT trocknen, dann entparaffinieren, für ca. 5 min in TBS lagern, mit Fettstift (Dako-Pen) umrahmen		
2) Verdau		
<ul style="list-style-type: none"> - Proteinase K (Dako) 1:50 in Tris-Puffer (0,05M Tris-HCL, pH7,5) - ca. 100 μl auf Schnitt geben - max. 15 min bei RT inkubieren - dann 3 x 2 min mit TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteinase K (Dako) 1:50 in Tris-Puffer (0,05M Tris-HCL, pH7,5) - ca. 100 μl auf Schnitt geben - max. 15 min bei RT inkubieren - dann 3 x 2 min mit TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Chondroitinase ABC (Sigma) 1:40 in vorgegebenen Puffer (= 0,25 U/ml) - ca. 100 μl pro Schnitt - 90 min bei 37°C inkubieren - dann 3 x 2 min mit TBS waschen
3) Absättigen der endogenen Peroxidase		
<ul style="list-style-type: none"> - 10 min in 0,5% H₂O₂ / Methanol - dann 3 x 2 min mit TBS waschen 		
4) Blockieren		
<ul style="list-style-type: none"> - 30 min mit 25% BSA/TBS (danach abkippen, nicht waschen) 	<ul style="list-style-type: none"> - 30 min mit 25% BSA/TBS (danach abkippen, nicht waschen) 	<ul style="list-style-type: none"> - 30 min mit 10% KS/TBS (danach abkippen, nicht waschen)
5) Primär-Antikörper- und Isotyp-Inkubation		
<ul style="list-style-type: none"> - Kol-1 (1:1000 in 1% BSA/TBS) - Isotyp: Kaninchen IgG (Kamiya) (1:7500 in 1% BSA/TBS) → jeweils 50 μl pro Schnitt, über Nacht bei 4°C - 3 x 2 min in TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Kol-2 (1:500 in 1% BSA/TBS) - Isotyp: Maus IgG (Dako) (1:100 in 1% BSA/TBS) → jeweils 50 μl pro Schnitt, über Nacht bei 4°C - 3 x 2 min in TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Aggrekan (1:50 in 10% KS/TBS) - Isotyp: Maus IgG (Dako) (1:1000 in 10% KS/TBS) → jeweils 50 μl pro Schnitt, über Nacht bei 4°C - 3 x 2 min in TBS waschen
6) Sekundär-Antikörper-Inkubation		
<ul style="list-style-type: none"> - Ziege Anti-Kaninchen IgG-HRP (Dako) (1:30 in 1% BSA/TBS) - 50 μl pro Schnitt, 1h bei RT inkubieren - 3 x 2 min in TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Kaninchen Anti-Maus IgG-HRP (Dako) (1:30 in 1% BSA/TBS) - 50 μl pro Schnitt, 1h in bei RT inkubieren - 3 x 2 min in TBS waschen 	<ul style="list-style-type: none"> - Kaninchen Anti-Maus IgG-HRP (Dako) (1:30 in 10% KS/TBS) - 50 μl pro Schnitt, 1h in bei RT inkubieren - 3 x 2 min in TBS waschen
7) Substratzugabe		
<ul style="list-style-type: none"> - ca. 100 μl pro Schnitt DAB-Substrat-Lösung (Sigma), ca. 3-5 min 		
8) Abstoppen der Farbentwicklung durch Eintauchen der Objektträger in TBS		
<ul style="list-style-type: none"> - ca.5 min Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1:2) - dann ca. 5 min Bläuen in Leitungswasser - Eindeckeln mit Aquatex® 		

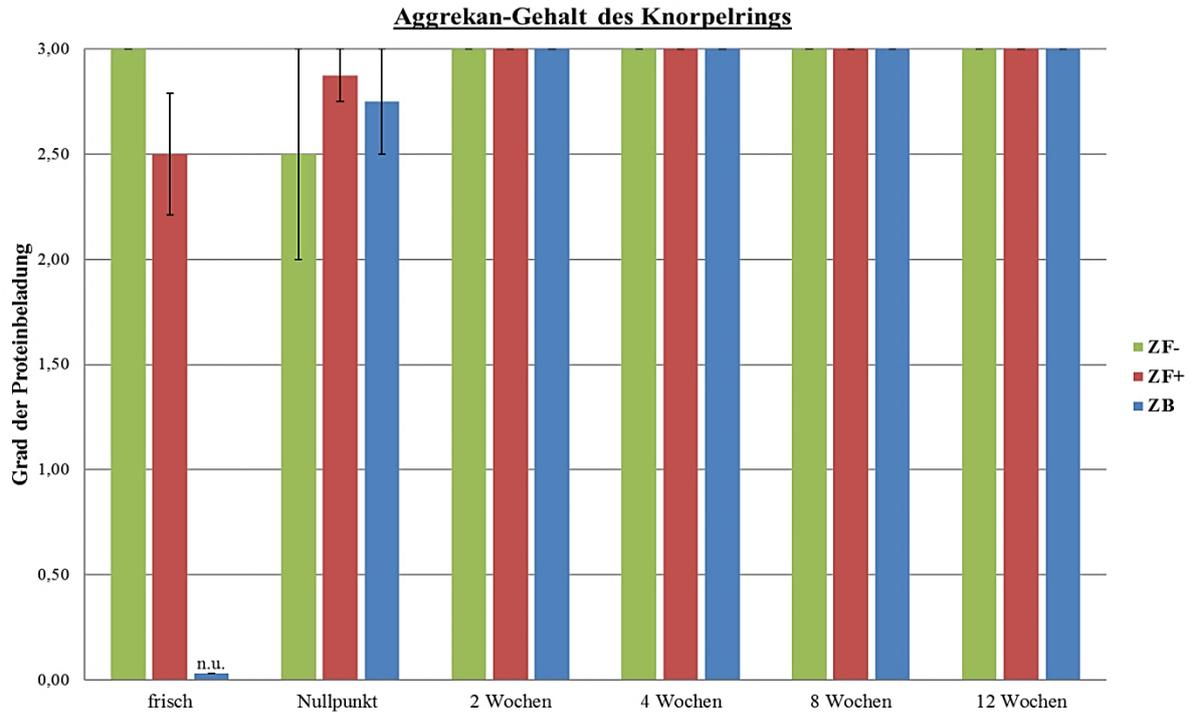


Abb. 41: Semiquantitative Analyse der Aggrekan-Beladung des Knorpelrings im Kulturverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Legende: 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = maximale DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz (Frischknorpel). (n.u. = nicht untersucht)

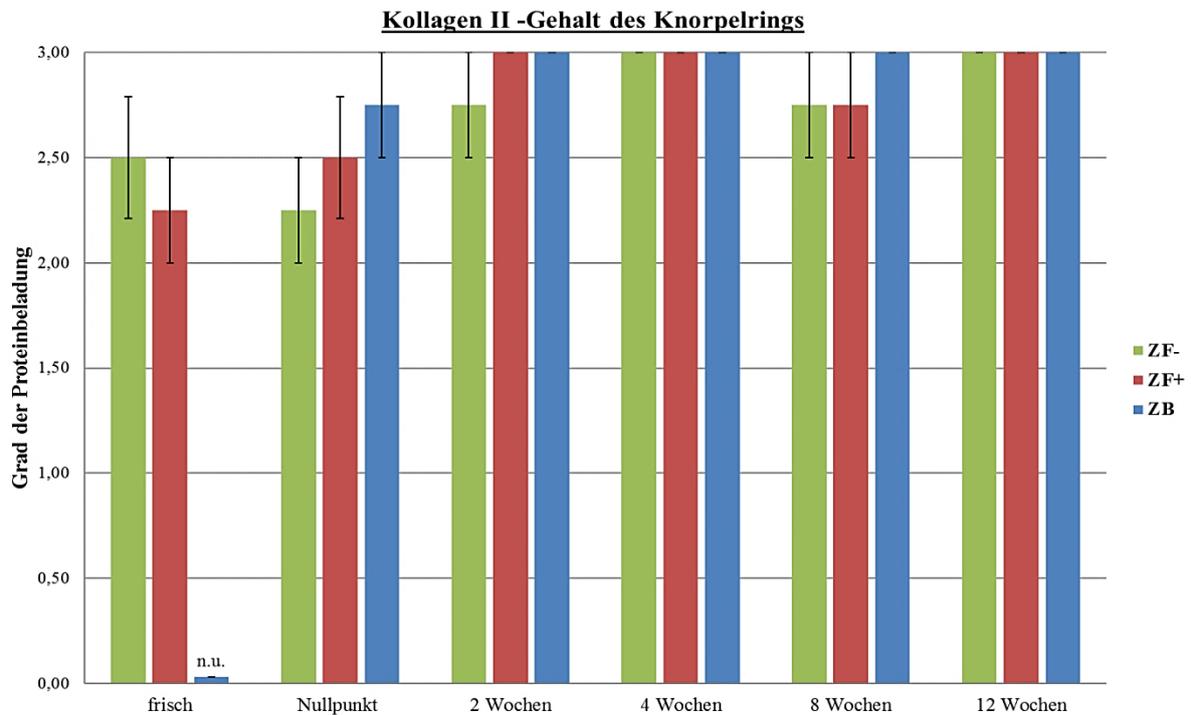


Abb. 42: Semiquantitative Analyse der Kollagen II-Beladung des Knorpelrings im Kulturverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Legende: 0 = keine Farbentwicklung, 1 = DAB-Entwicklung erkennbar, schwache Intensität (+), 2 = mäßiggradige DAB-Färbung (++), 3 = maximale DAB-Entwicklung (+++), Vgl. Referenz (Frischknorpel). (n.u. = nicht untersucht)

Abb. 43: Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF)-Ansatz. Originalvergrößerung: 12,5x

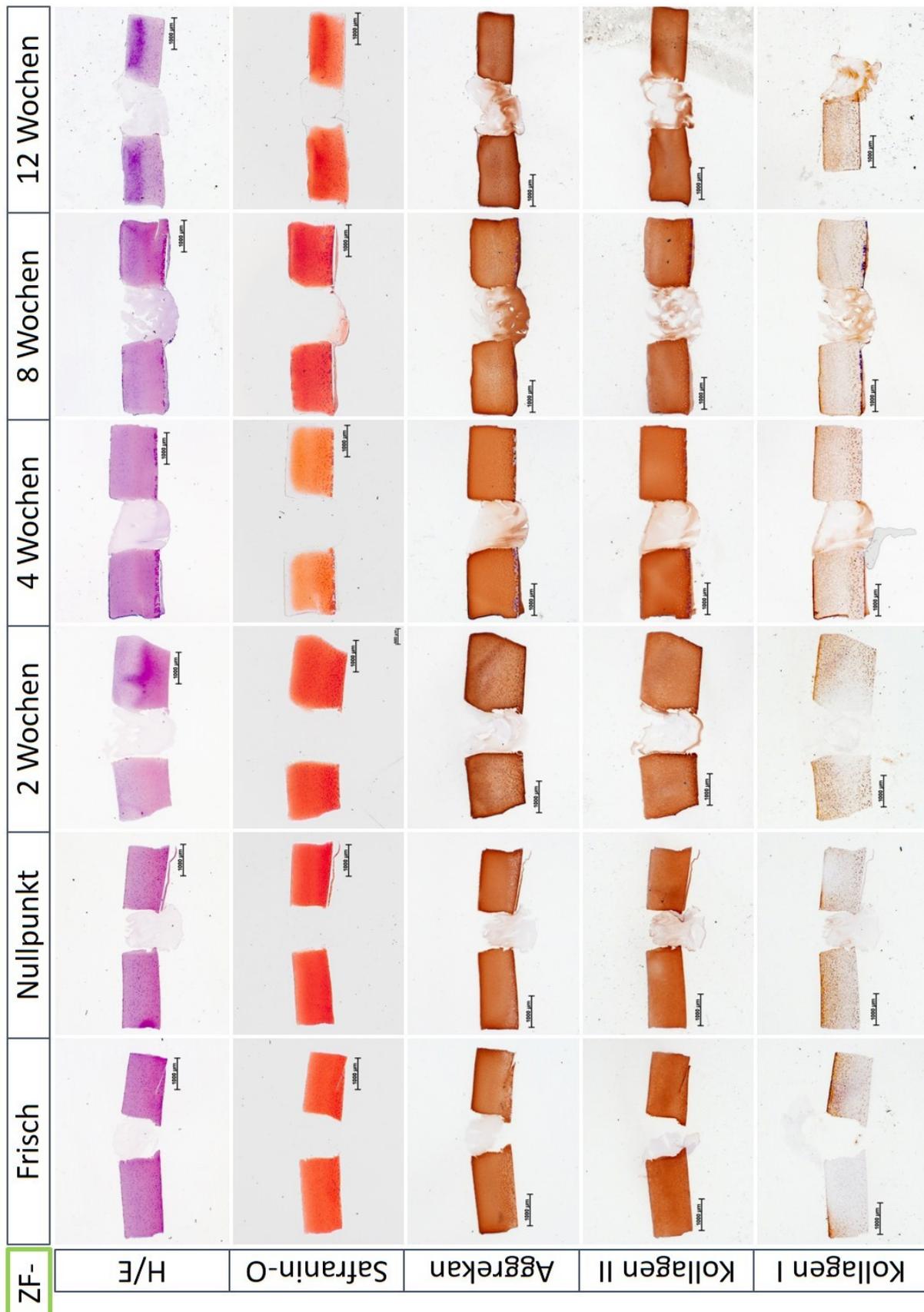


Abb. 44: Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz. Originalvergrößerung: 12,5x

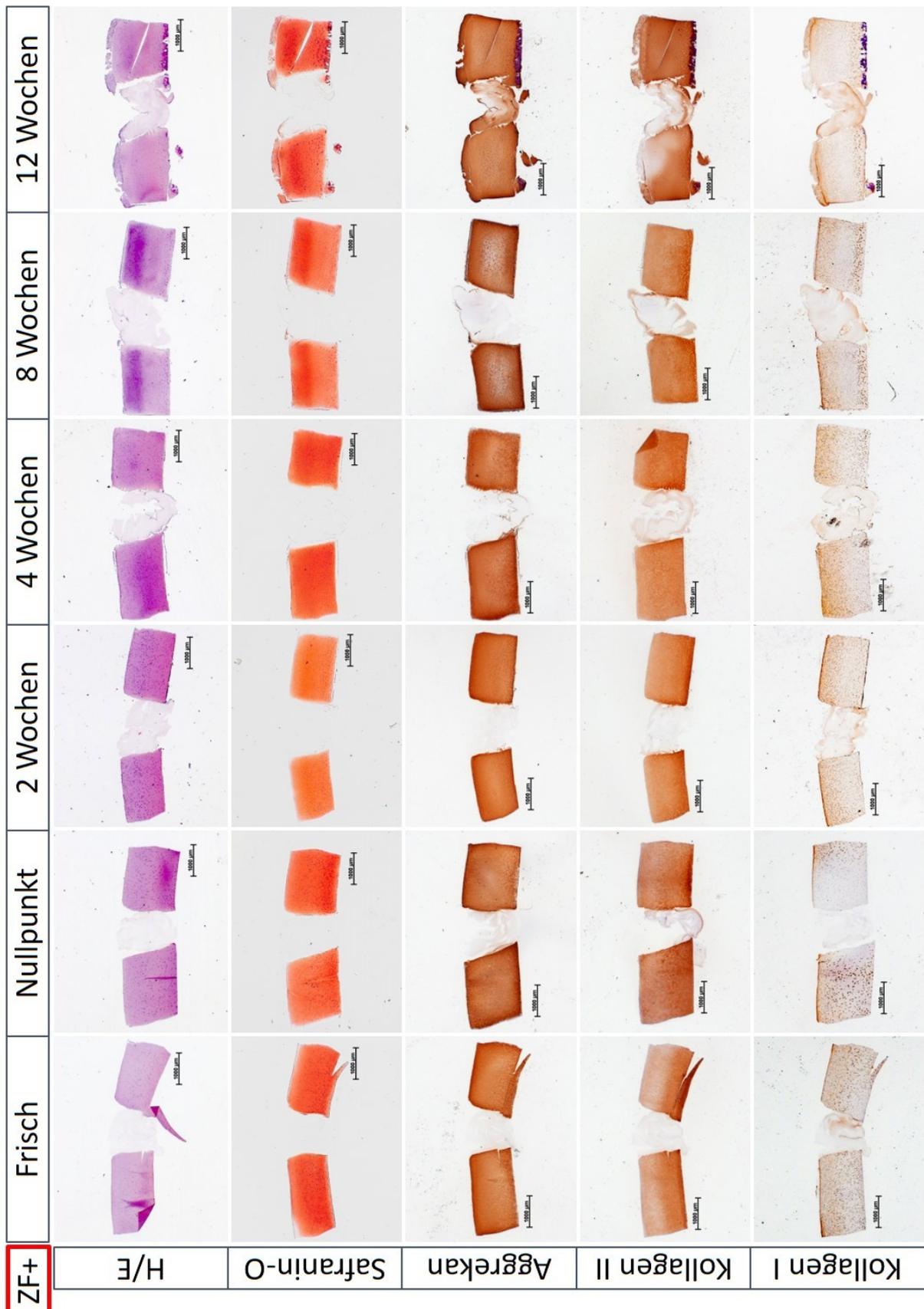


Abb. 45: Übersichtsdarstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz. Originalvergrößerung: 12,5x

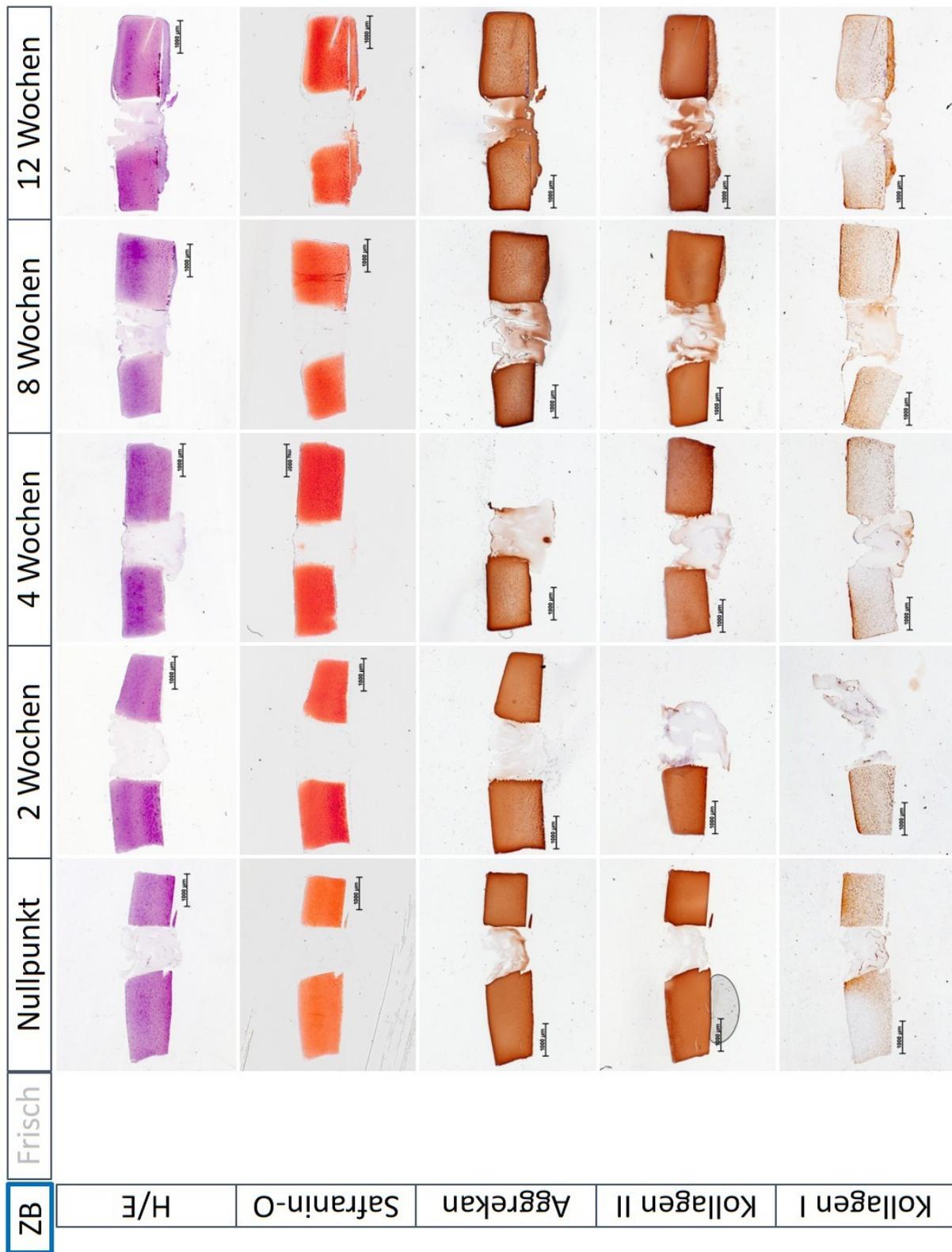


Abb. 47: Vergrößerte Darstellung des Knorpelrings im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz.
Originalvergrößerung: 40x

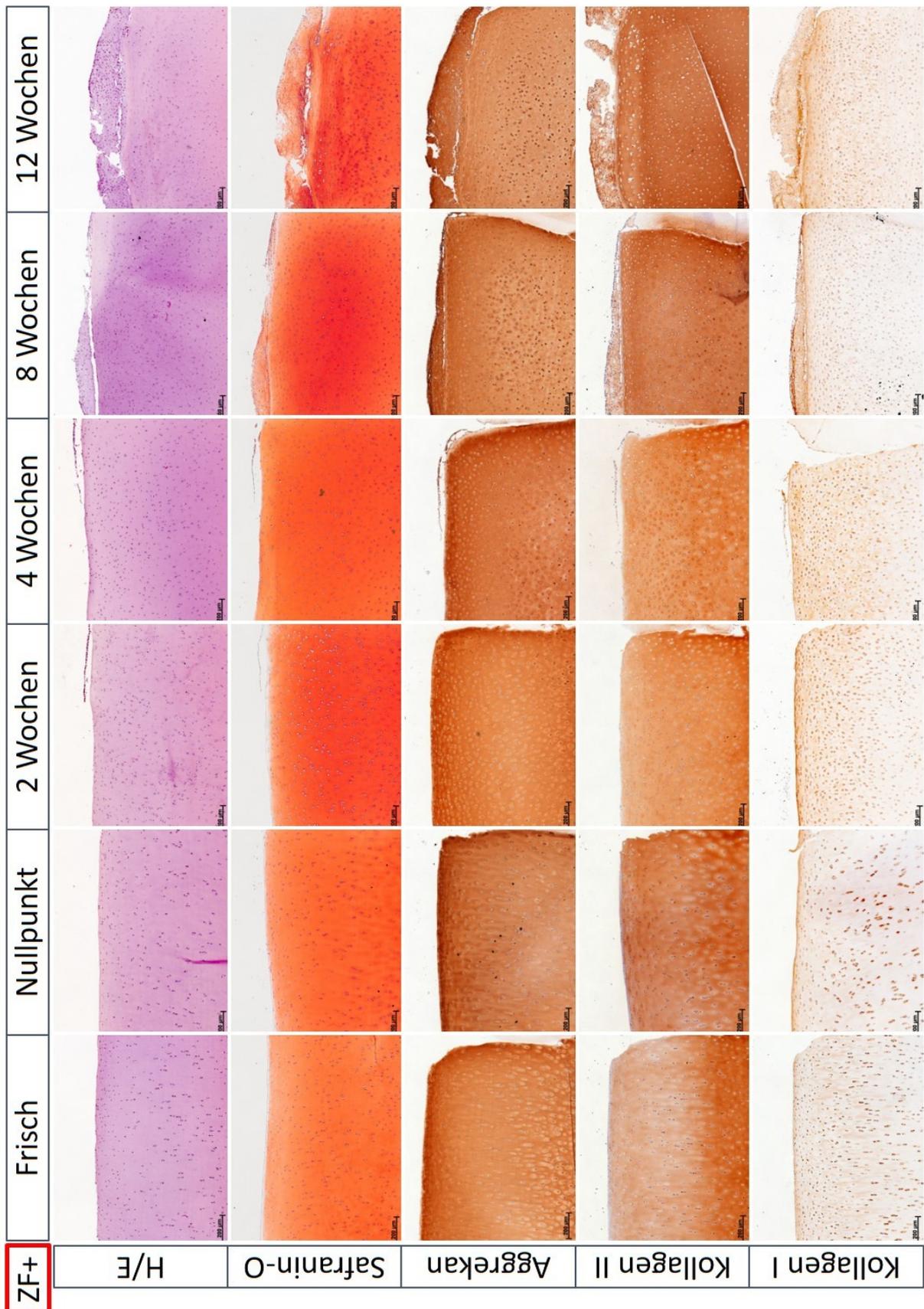


Abb. 48: Vergrößerte Darstellung des Knorpelrings im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz.
Originalvergrößerung: 40x

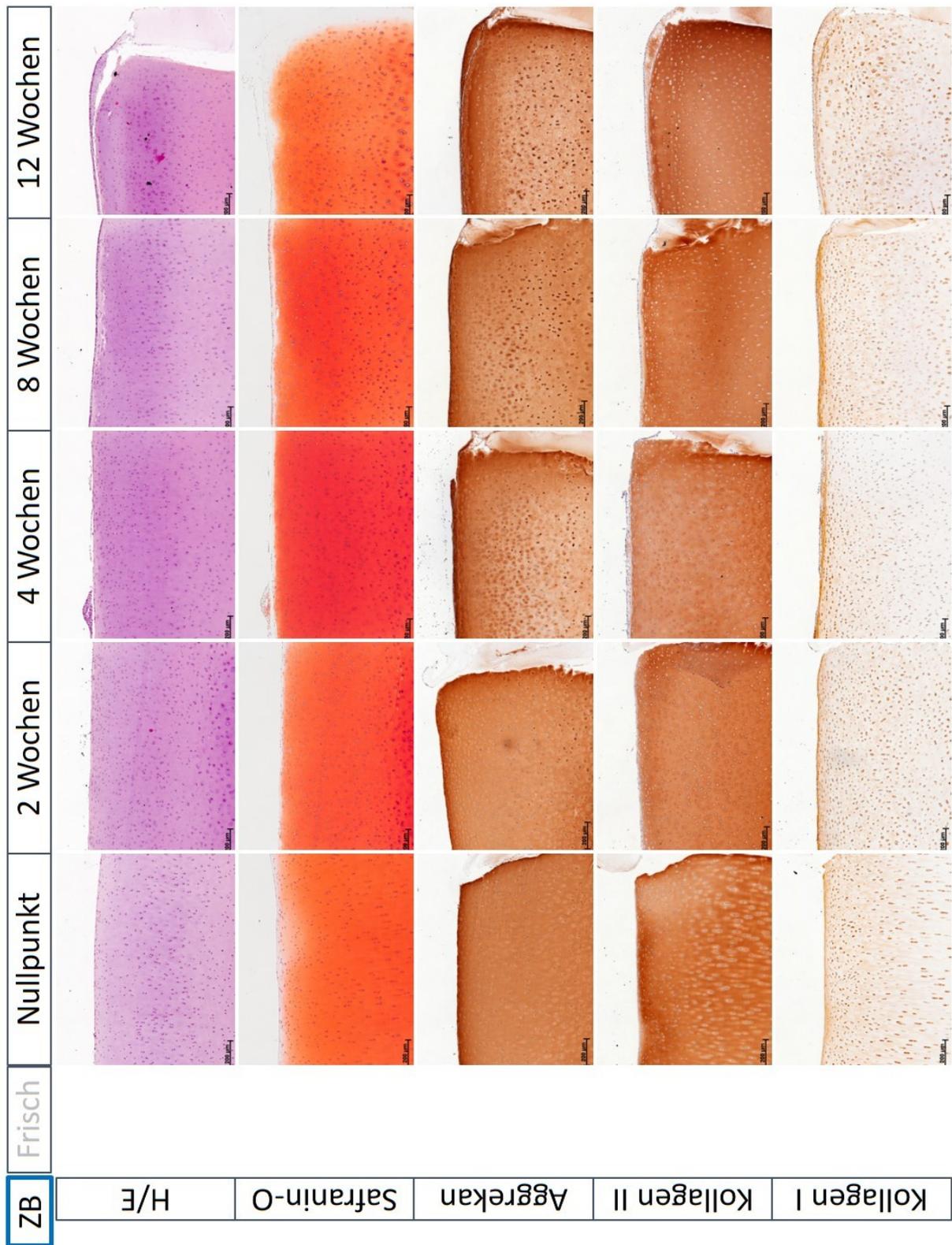


Abb. 49: Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF)-Ansatz.
Originalvergrößerung: 40x

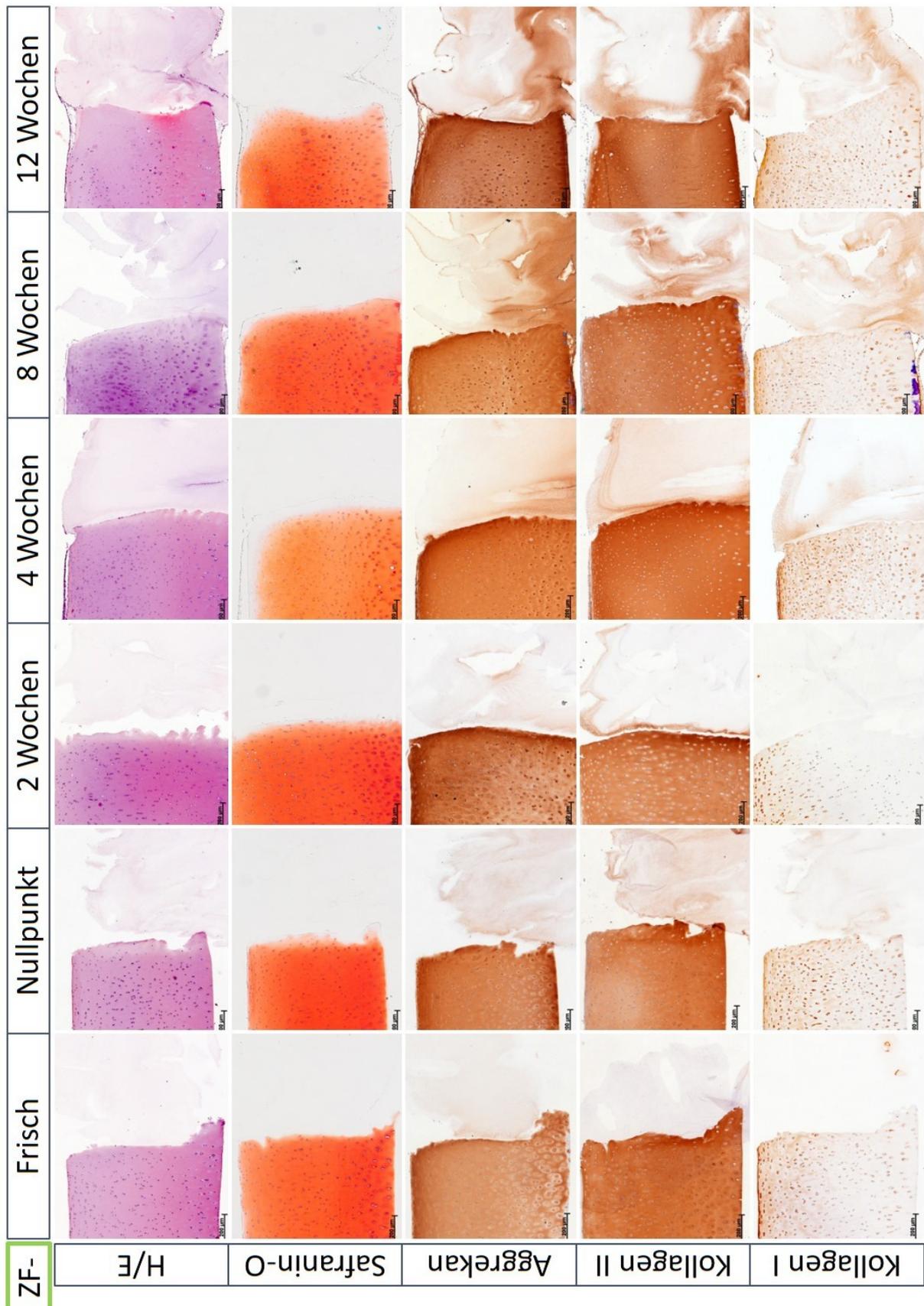


Abb. 50: Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZF+)-Ansatz.
Originalvergrößerung: 40x

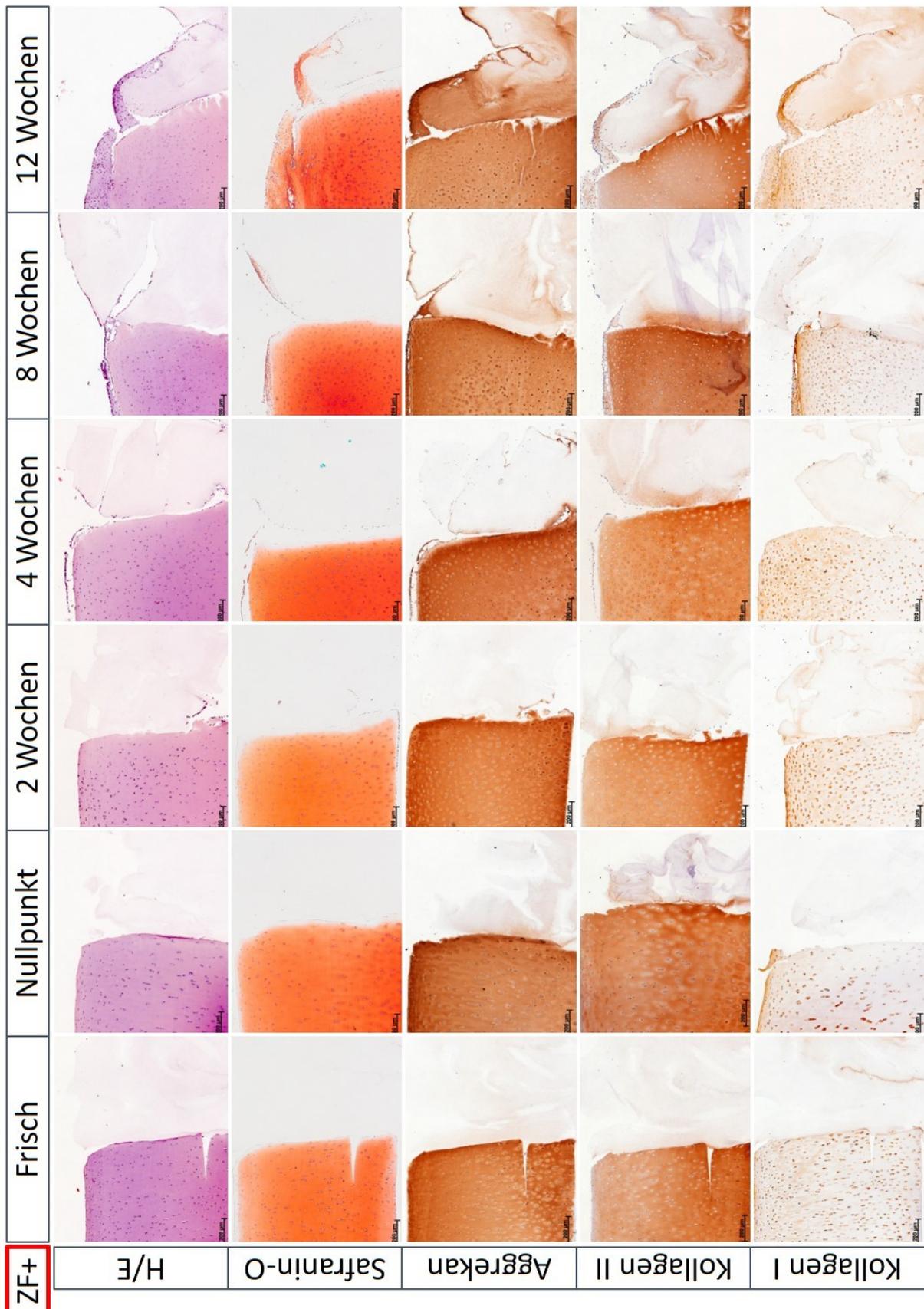
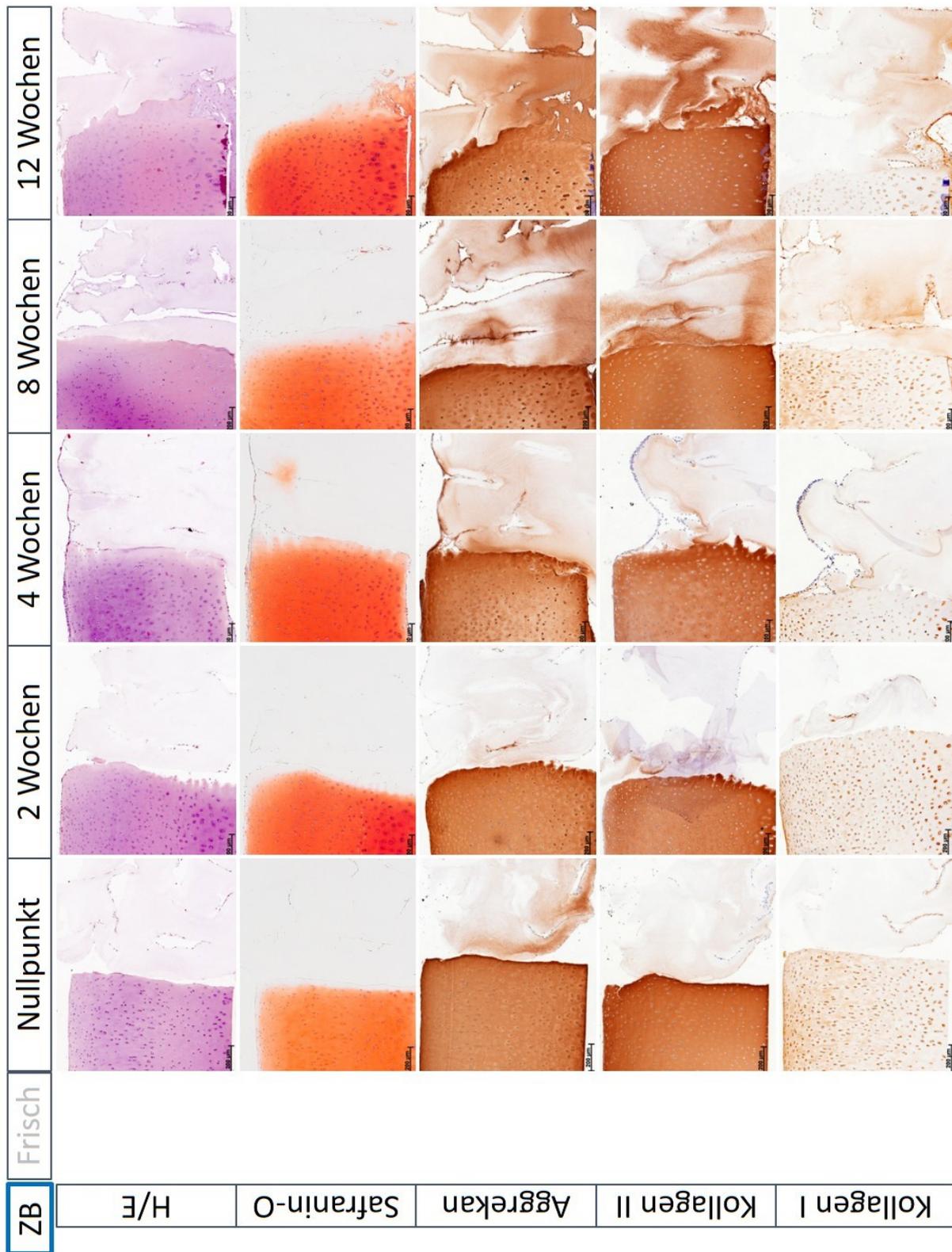


Abb. 51: Vergrößerte Darstellung des Knorpel-BNC-Konstrukts im Kulturverlauf – Überblick der histologischen und immunhistochemischen Färbungen im (ZB)-Ansatz.
Originalvergrößerung: 40x



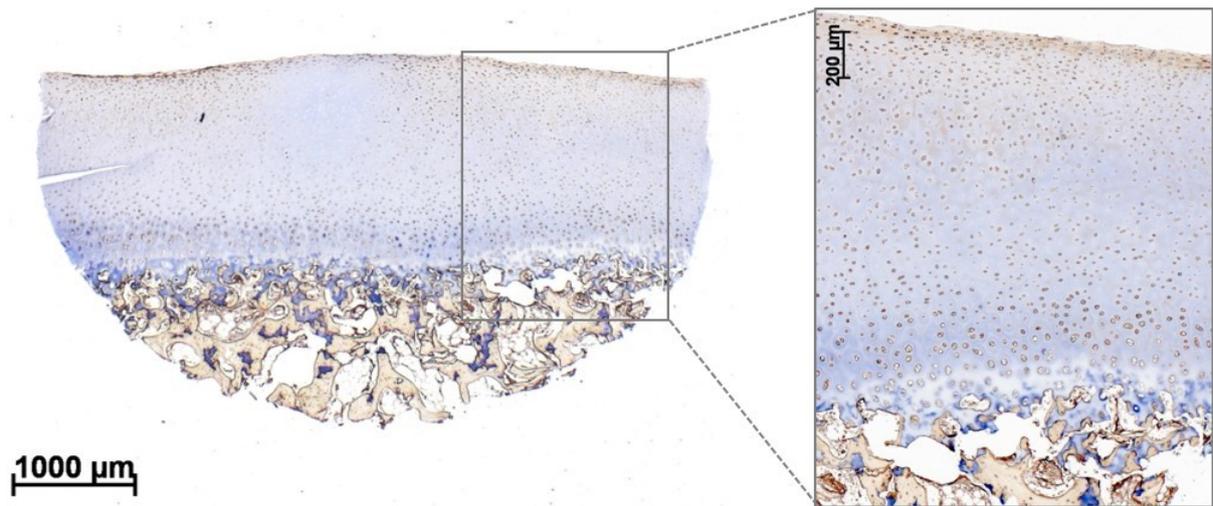


Abb. 52: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen I und Kollagen II einer bovinen Knorpel-Knochen-Probe aus der Patella.

Doppelfärbung von Kollagen I (braun) und Kollagen II (blau) innerhalb eines frischen bovinen Knorpel-Knochen-Konstrukts. Originalvergrößerung: linkes Bild: 12,5x; rechtes Bild: 40x.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die diese Arbeit ermöglicht, mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und so zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

In erster Linie bin ich Herrn Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne zu tiefstem Dank verpflichtet. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die große Unterstützung bei dem Erwerb des Promotionsstipendiums. Außerdem möchte ich mich für die enorme Geduld, die umfangreiche Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Niederschrift dieser Arbeit sowie deren Begutachtung bedanken.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. David Pretzel und Dr. med. Stefanie Klette (geb. Linß) für die Einführung in die Thematik und die wertvollen Ratschläge zu Beginn der Promotionsarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Astrid Petermann für die angenehme Betreuung und Anleitung im Labor und ihre vielen motivierenden Worte bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an alle Mitarbeiterinnen der AG „Experimentelle Rheumatologie“ dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich hervorragend theoretisch und methodisch unterstützt haben. Danke für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit!

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Biol. Hannes Ahrem für seine große Unterstützung im Rahmen der Versuchsplanung, die Bereitstellung der BNC-Vliese und für seine enorme Hilfe bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen. Weiterhin danke ich Hannes Ahrem sowie Herrn Daniel Conrad von der Günter-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH für die hervorragende Arbeit bei der lasergestützten Herstellung der BNC-Implantate.

Außerdem möchte ich meinen lieben Eltern danken. Sie haben mein Medizinstudium ermöglicht und mich mein gesamtes Leben bedingungslos unterstützt.

Zuletzt danke ich meinem Mann – Daniel – dafür, dass er die größte Stütze in meinem Leben ist. Ich danke ihm für sein Verständnis, seine Gelassenheit und die vielen ermutigenden Worte. Ich danke ihm für seine Liebe.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne, Dr. rer. nat. David Pretzel, Dr. rer. nat. Astrid Petermann und Herr Dipl.-Biol. Hannes Ahrem,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.01.2019

Johanna Böttcher