

**Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen  
auf Polymerscaffolds**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Wunderer, Michelle Sophie  
geboren in Ehringshausen

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer

Tag der Disputation: 03.03.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Vorstellung des Gesamtprojekts Poly-IMPLANT-Druck .....	1
1.2 Gelenke .....	2
1.2.1 Aufbau und Funktion.....	2
1.2.2 Knorpelgewebe.....	2
1.3 Gelenkerkrankungen .....	4
1.3.1 Inzidenz .....	4
1.3.2 Arthrose .....	6
1.4 Therapien der Arthrose .....	8
1.4.1 Nicht-operative Verfahren.....	8
1.4.2 Operative Verfahren .....	10
1.5 Stammzellen.....	13
1.6 Chondrogene Differenzierung .....	15
1.7 Die Polymere .....	19
1.8 Fragestellung.....	21
<b>2 Material und Methode</b> .....	23
2.1 Zellkultur .....	23
2.1.1 Übersicht der verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen..	23
2.1.2 Zellen auftauen .....	25
2.1.3 Zellen splitten .....	26
2.1.4 Zellen einfrieren .....	26
2.1.5 Versuchsaufbau .....	26

2.1.6 Medien und Mediumswechsel.....	28
2.2 Molekularbiologie.....	31
2.2.1 RNA-Isolation .....	31
2.2.2 cDNA-Synthese.....	32
2.2.3 <i>Real-time</i> Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion .....	32
2.2.4 Kollagen II Elektrophorese .....	35
2.2.5 MTT-Assay .....	35
2.2.6 Interleukin-6 <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	36
2.2.7 Kollagen II <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	38
2.3 Statistische Auswertung.....	40
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1 Zellmorphologie .....	41
3.1.1 Lichtmikroskopischer Vergleich zwischen Kontrolle und Chondro...41	
3.1.2 Chondrogene Zellmorphologie an den Polymeren.....	44
3.2 <i>Real-time</i> Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	48
3.2.1 SOX9 .....	48
3.2.2 TRPV4.....	49
3.2.3 ACAN.....	50
3.2.4 HAPLN1 .....	51
3.2.5 RUNX2.....	52
3.2.6 COL1A1 .....	53
3.3 Kollagen II Elektrophorese .....	54
3.4 MTT-Assay .....	56
3.5 Interleukin-6 <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	57

3.6 Kollagen II <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	58
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>59</b>
4.1 Methodendiskussion – Elemente des Studiendesigns.....	59
4.2 Die Herausforderung einer chondrogenen Differenzierung .....	67
4.3 Interaktionen und Limitationen der Zellkultur im Materialkontakt.....	74
4.4 Einfluss der Polymere und der Heparinbeschichtung auf die Genexpression .	79
4.5 Ausblick .....	85
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>6 Summary</b> .....	<b>89</b>
<b>7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	91
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	94
7.3 Tabellenverzeichnis .....	95
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>96</b>
<b>9 Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>133</b>
<b>10 Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>135</b>
<b>11 Danksagung</b> .....	<b>136</b>

## **Gender-Hinweis**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich - sofern nicht anders kenntlich gemacht - gleichermaßen auf alle Geschlechter. Auf eine Doppelnennung und gegenderte Bezeichnungen wird zugunsten einer besseren Lesbarkeit verzichtet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorstellung des Gesamtprojekts Poly-IMPLANT-Druck

Diese Dissertation beschäftigt sich mit einem Teilvorhaben des Poly-IMPLANT-Druck Projektes der ProMatLeben – Polymere Gruppe, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (Förderkennzeichen: 13XP5089F). Das Gesamtprojekt erforscht den Einfluss von laserbasierten, im nano-dreidimensionalen (3D)-Druckverfahren hergestellten biphasischen Implantaten auf die Zellen des Knochen-Knorpelumbaus *in vitro* sowie *in vivo* in einem standardisierten Tiermodell.

Das Gesamtprojekt stellt einen Versuch dar, suprazelluläre, zelluläre und subzelluläre Komponenten in einem Therapieansatz in Form von modifizierten Scaffolds zu bündeln. Es wird unter anderem (u. a.) versucht, dies in einem biphasischen Aufbau zu erzielen, indem sowohl auf die Eigenschaften als auch auf die Regenerationsfähigkeiten von Knochen und Knorpel eingegangen werden soll. Für eine kontrollierte Proliferation sollen die Implantate dem umgebenden Gewebe zunächst als Gerüst dienen, um somit die osteochondralen Defekte schließen zu können. Im Verlauf werden die Implantate von körpereigenen Enzymen abgebaut, sodass das neu gebildete Gewebe letztendlich zurückbleibt. Zu diesem Zweck beschäftigt sich das Gesamtprojekt u. a. mit dem geeigneten Material als Basis für die Implantate. Materialien auf Polymerbasis weisen gute biomechanische Eigenschaften auf. Bereits in der Klinik etabliert sind Polymere auf Laktatbasis, die vielfältigen Einsatz in bioaktiven Mitteln, Nähten und bioabsorbierbaren Implantaten finden. Vor diesem Hintergrund wurde das synthetische Polymer Poly-((D,L)-Lactid- $\epsilon$ -Caprolacton)-dimethacrylat (LCM3) entwickelt und in diesem Projekt mit einem neuen Ansatz in Form des Weiteren Polymeres, Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton (ACM), verglichen. Im Gegensatz zu LCM3, das über Laktat (Milchsäure) abgebaut wird, degradiert ACM über Aminosäuren insbesondere Alanin und Glycin, wodurch es zu keinem Ansäuern des umliegenden Gewebes kommen sollte. Untersuchungen zu Cytokompatibilität, Degradation und Einwachsverhalten der verschiedenen *in vitro* untersuchten Zelllinien stellen die Basis für den durch das Labor für Experimentelle Unfallchirurgie durchgeführten Tierversuch dar (Liefieith et al., 2024). Die nachfolgende Dissertation zeigt somit ein Teilstück des vorgestellten Gesamtprojekts und beschäftigt sich mit dem Vergleich der Cytokompatibilität der genannten

Polymermaterialien im Rahmen der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC).

## 1.2 Gelenke

### 1.2.1 Aufbau und Funktion

Gelenke (Articulationes) bestehen aus miteinander interagierenden Flächen aus Knochen, welche gegeneinander bewegt werden können. Es wird zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Gelenken unterschieden. Bei den kontinuierlichen Gelenken (Synarthrosen) sind die miteinander agierenden Skelettelemente durch straffes Bindegewebe (Syndesmosis) oder Knorpelgewebe (Synchondrosis) verbunden. Bei den diskontinuierlichen Gelenken (Diarthrosen) sind die Kontaktstellen des Knochens mit Knorpel überzogen und von einer bindegewebigen Kapsel umschlossen. Der Gelenkspalt befindet sich zwischen den Gelenkflächen und stellt den freien Raum dar, in dem die Bewegung erfolgt. Dieser ist gefüllt mit Gelenkflüssigkeit (Synovia), die beim Erwachsenen den Knorpel ernährt, da dieser über keine eigene Blutversorgung verfügt. Der in den meisten Gelenken beteiligte Knorpeltypus ist der hyaline Knorpel, welcher als druckelastisches Gewebe der Abfederung von Bewegungen dient und dadurch die wirkenden Kräfte verteilt. Der Gelenkknorpel ist somit ein hochspezialisiertes Gewebe, welches eine verbindende Funktion innehat und weder vaskularisiert noch innerviert ist (Benninghoff et al., 2003; Hardingham, 2010).

### 1.2.2 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe als skelettstützendes sowie Knochen und Gelenke verbindendes Bindegewebe ist durch seine Zusammensetzung aus Kollagen, Proteoglykanen und Wasser in seinen Haupteigenschaften fest und elastisch. Die Zusammensetzung dieser Grundkomponenten variiert nach Knorpeltypus. Dabei wird zwischen Faserknorpel, hyalinem und elastischem Knorpel unterschieden (Welsch et al., 2022).

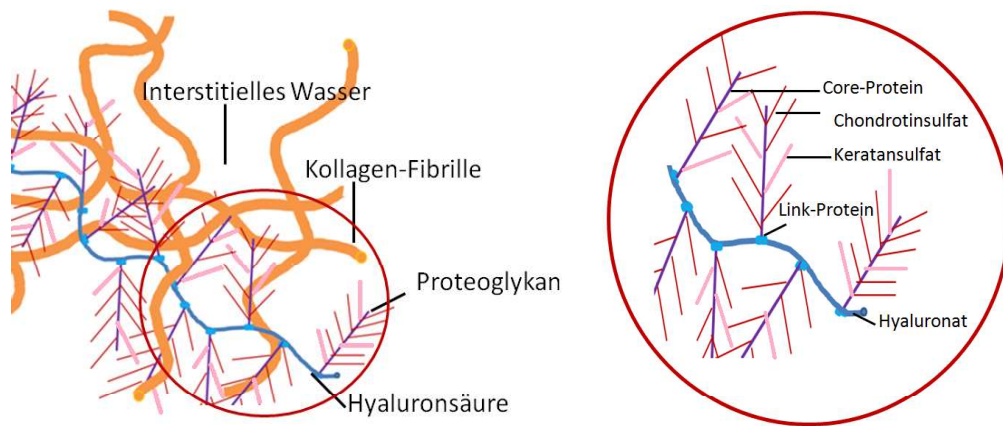
Elastischer Knorpel ähnelt dem hyalinen Knorpel, jedoch ist er zusätzlich von reichlich elastischen Fasern durchzogen und beinhaltet die meisten Zellen. Außerdem ist er sehr

biege- und druckelastisch, wodurch er an der Ohrmuschel, dem Gehörgang, den Bronchien und dem Kehledeckel vorkommt (Welsch et al., 2022).

Hyaliner Knorpel hat auf Grund der Zusammensetzung seiner extrazellulären Matrix eine starke Druckelastizität, sodass sich dieser an Gelenkflächen befindet, wo starke Druckbelastungen vorkommen. Teile des Nasenskeletts, Teile der Atemwege und der Ansatz der Rippen bestehen ebenfalls aus hyalinem Knorpel. Im hyalinen Knorpel liegen die Chondrozyten, die metabolisch aktiven Zellen des Knorpels, als Chondrone beieinander. Diese synthetisieren Bestandteile der extrazellulären Matrix in Form von kollagenen Fibrillen von Typ II, IX und XI sowie Proteoglykane. Die extrazelluläre Matrix besteht zu 90–95 % aus Kollagen Typ II, welches als Fibrillen mit Proteoglykanen vernetzt ist (Eyre et al., 2001; Fox et al., 2009). Das größte Proteoglykan ist Aggrecan, kleinere sind Biglycan und Fibromodulin (Fox et al., 2009; Roughley und Lee, 1994; Tufvesson und Westergren-Thorsson, 2002). Als strukturgebendes Proteoglykan bildet Aggrecan komplexe Aggregate mit Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat und Keratansulfat aus. Glykosaminoglykane sind unverzweigte, aus repetitiven Disaccharid-Einheiten zusammengesetzte Polysaccharide. An jedes Kernprotein eines Aggrecan-Monomers sind kovalent 100 Chondroitinsulfat-Ketten und 20–30 Keratansulfat-Ketten gebunden. Aus bis zu 100 Aggrecan-Monomeren, die wiederum nicht-kovalent an Hyaluronsäure über stabilisierende Verbindungs-Proteine verbunden sind, setzen sich große Aggrecan-Aggregate zusammen (Abbildung (Abb.) 1) (Hascall, 1977; Kjellén und Lindahl, 1991). Neben der strukturgebenden Funktion ergibt sich somit aus dieser Makrostruktur die starke Wasserbindungsfähigkeit von Aggrecan (Aigner und Stöve, 2003; Archer und Francis-West, 2003).

Faserknorpel enthält im Vergleich zum hyalinen und elastischen Knorpel die wenigsten Zellen und besitzt einen deutlich höheren Anteil an Kollagen vom Typ I. Er ist deutlich fester und federt Scherkräfte ab, sodass die Menisken, die Gelenklippen zur Erweiterung der Gelenkfläche (Labrum acetabulum, Labrum glenoidale), die Bandscheiben und die Schambeinfuge aus ihm bestehen (Welsch et al., 2022).

Darüber hinaus wird in der Literatur fetaler Knorpel beschrieben. Dieser ist eine Vorstufe, in der noch keine Chondrone nachzuweisen sind, da die Knorpelzellen gleichmäßig in der Matrix verteilt sind. Zudem können beim fetalen Knorpel im Gegensatz zum adulten Knorpel noch Blutgefäße vorkommen (Welsch et al., 2022).



**Abb. 1: Extrazelluläre Matrix des Knorpels mit fokussierter Darstellung eines Aggrecan-Aggregats**

Die extrazelluläre Matrix des Knorpels besteht aus einem Netz aus Makromolekülen und gebundenem interstitiellem Wasser. Insbesondere Aggrecan-Aggregate binden mechanisch und chemisch viel Wasser.

## 1.3 Gelenkerkrankungen

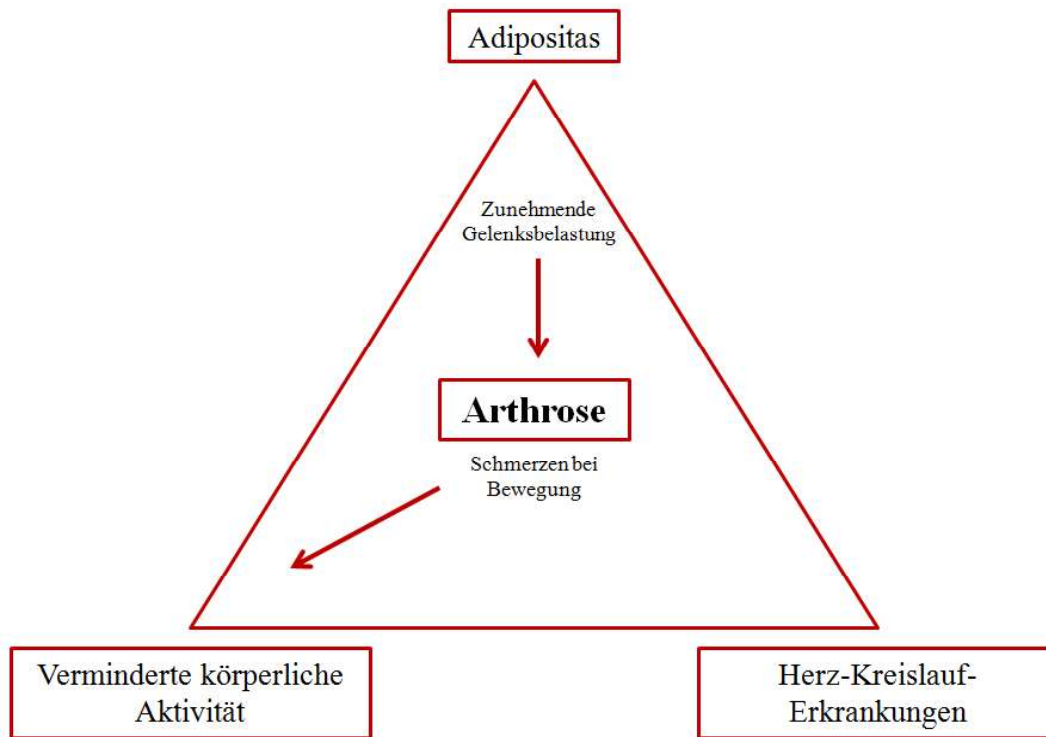
### 1.3.1 Inzidenz

Osteochondrale Defekte, die durch Osteoarthrose, Osteonekrose, Osteochondrosis dissecans, Traumata und Leistungssport entstehen, betrafen in Deutschland schon 1998 fünf Millionen Menschen. Das entspricht 6 % der Bevölkerung in Deutschland, die somit von Verletzungen und Erkrankungen der Gelenke betroffen sind (Statistisches Bundesamt, 1998). Auf Grundlage der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland von 2013 ergibt sich hochgerechnet eine Lebenszeitprävalenz von 12,4 Millionen Erwachsenen. Nach dieser Studie wurden bei 20,3 % der Personen zwischen 18 und 79 Jahren eine Arthrose ärztlich festgestellt (Fuchs et al., 2013). Viele Studien auf Basis der selbstberichteten Arthrose in Deutschland zeigen Häufigkeiten zwischen 20–25 % (Fuchs et al., 2017). Diese Häufigkeiten führen zu hohen Ausgaben im Gesundheitssystem. In Deutschland beliefen sich 2020 die Gesundheitsausgaben auf 440,6 Milliarden Euro, die sich in 431,8 Milliarden Euro für laufende Ausgaben und in 8,8 Milliarden Euro für Investitionen aufteilen. Diese 431,8 Milliarden Euro lassen sich in ärztliche Leistungen, pflegerische Leistungen, Arzneimittel, Transporte und therapeutische Leistungen einteilen. An den gesamten Krankheitskosten im Jahre 2020 hatten muskuloskeletale Erkrankungen einen Anteil von 41,7 Milliarden Euro und somit entsprechend 9,7 %. Die Kosten für Arthrose bezifferten sich auf 12,1 Milliarden

Euro. Damit rangieren die Kosten für muskuloskeletale Erkrankungen auf Platz fünf der Kosten auslösenden Krankheiten (Bundeszentrale für politische Bildung, 2022).

Die *World Health Organization* (WHO) schätzte 2003, dass die Anzahl von Knochen- und Gelenkerkrankungen sich in den Jahren 2000 bis 2020 verdoppeln würde (WHO Scientific, 2003). Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass eine Zunahme von Arthrose Erkrankungen u. a. durch einen steigenden Altersdurchschnitt in der Bevölkerung ausgelöst wird (Fuchs et al., 2013; Neogi, 2013; Fuchs et al., 2017; Long et al., 2022). Ebenso einen Anteil an der steigenden Fallzahl haben Komorbiditäten, die eine Entstehung von Arthrose begünstigen, wie beispielsweise (bspw.) Fettleibigkeit (Adipositas) (Long et al., 2022; Neogi, 2013). Zu diesen Komorbiditäten zählen, neben der Adipositas, Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen. Dabei haben diese Komorbiditäten gemeinsam, dass verminderte körperliche Aktivität einen Risikofaktor darstellt. Arthrose kann schmerzbedingt, wie auch durch eine verminderte Funktion von Gelenken, geringe körperliche Aktivität begünstigen (Muckelt et al., 2020). Verminderte körperliche Bewegung fördert Adipositas (Hamann et al., 2001). Adipositas als multikausale Erkrankung gilt als der wichtigste Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Di Angelantonio et al., 2016; Yusuf et al., 2004). Kardiovaskuläre Erkrankungen mit ihrem oft führenden Symptom der Dyspnoe und Schmerzen erschweren die körperliche Aktivität der Patienten. Arthrose, welche u. a. durch ein Missverhältnis zwischen Belastbarkeit und ausgeführter Belastung entsteht (Kurz et al., 2005), wirkt weiter eskalierend auf diese gegenseitigen Effekte ein (Abb. 2).

2019 waren weltweit 527,81 Millionen Menschen an Arthrose erkrankt im Vergleich zu 247,51 Millionen im Jahre 1990 (Long et al., 2022). Die Osteoarthrose ist damit weltweit die häufigste Gelenkerkrankung (Fuchs et al., 2017; Woolf und Pfleger, 2003). Am häufigsten betroffen ist hierbei das Kniegelenk mit 60,6 %, gefolgt von Arthrose der Hand mit 23,7 % und 5,5 % betreffen Hüftarthrosen. Die verbliebenen 10,2 % betreffen andere Gelenke (Long et al., 2022). Radiologisch lassen sich bei bis zu einem Drittel der Erwachsenen Zeichen einer Arthrose nachweisen (Felson et al., 1988). Das Risiko, an einer Arthrose zu erkranken, steigt mit dem Alter an (Allen et al., 2015; Fuchs et al., 2013; Fuchs et al., 2017; Neogi, 2013; Vina und Kwoh, 2018). Dabei erkranken Frauen signifikant häufiger als Männer (Allen et al., 2015; Fuchs et al., 2013 und 2017; Vina und Kwoh, 2018).



**Abb. 2: Schaudiagramm der Zusammenhänge von Arthrose und Komorbiditäten**

In Wechselbeziehungen untereinander stehen Adipositas, verminderte körperliche Bewegung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Schmerzen bei Bewegungen durch Arthrose führen zu weiterer Schonung, sodass der Circulus vitiosus zusätzlich angetrieben wird.

### 1.3.2 Arthrose

Als Arthrose wird eine degenerative Gelenkerkrankung bezeichnet, die einen progredienten Umbau der Knorpel- und Knochenstruktur auf der Basis von chronischen Überbelastungen darstellt. Dies kann bis hin zu Gelenkdeformitäten und Gelenkinstabilitäten mit möglichen Kapselschrumpfungen oder -dehnungen im Krankheitsgeschehen führen (Kurz et al., 2005).

Zu Grunde liegt ein Missverhältnis zwischen Belastbarkeit und ausgeführter Belastung des Knorpels. Durch erhöhte Ansprüche an das Gewebe erfolgt eine Ausdünnung der Knorpelschicht, wodurch diese ihre Elastizität und innere Festigkeit verliert. Es erfolgt ein Umbau und Ersatz mit Granulationsgewebe und weniger geeignetem Faserknorpel, welcher durch seinen erhöhten Gehalt an Kollagen Typ I zwar deutlich fester ist, aber besser Scherkräfte anstelle der im Gelenk wirkenden Druckbelastung abfedert. Dieser Verlust an Knorpelsubstanz führt zu einem Zusammenrücken der knöchernen

Gelenkanteile, welches als ungleichmäßige, exzentrische Gelenkspaltverschmälerung im Röntgenbild sichtbar ist. Durch den Verlust und Umbau von hyalinem Knorpel wird auch das unter dem Knorpelgewebe befindliche Knochengewebe (subchondrales Knochengewebe) stärker belastet, sodass sich dieses wiederum an stark beanspruchten Stellen verdichtet (subchondrale Sklerosierung). Weiterführende Belastung resultiert in Form von Rissen im Knorpelgewebe und Mikrofrakturen im Knochen, die schließlich zu Nekrosen des Gewebes führen, sodass Pseudozysten gefüllt mit Detritus und Synovia (Geröllzysten) entstehen. Zudem bilden sich wulstartige Knochenanbauten (Osteophyten) aus, um den erhöhten Druck auf den subchondralen Knochen am Gelenksrand abzufangen (Kurz et al., 2005).

Der Gewebeumbau und insbesondere die entstehenden Nekrosen induzieren chronische Entzündungsprozesse wie Synovitiden (Entzündungen der Gelenkschleimhaut). Es kommt zu rezidivierenden Gelenkergüssen, Bewegungseinschränkungen und Schwellungen und letztendlich zur Versteifung der Muskulatur, Kontrakturen und Funktionsverlust des Gelenks (Hasan und Shukett, 2010; Micheal et al., 2010).

Klinisch präsentiert sich die Arthrose durch Schmerzen, Gelenkversteifung und eingeschränkten Bewegungsumfang (Yunus et al., 2020). Die chronischen Schmerzen gehen vermutlich von freien sensorischen Nervenendigungen, Nozizeptoren und Mechanorezeptoren im subchondralen Knochen und Gelenkspalt aus (Abhishek und Doherty, 2013). Darüber hinaus kommt es im späteren Krankheitsgeschehen durch den Verlust des Knorpels zu Schmerzen. Ein Aneinanderreiben der gelenkbildenden Knochen führt zu weiterer mechanischer Belastung (Hasan und Shuckett, 2010). Dabei spielt u. a. der Mangel von Synovia, der klaren viskösen Flüssigkeit zwischen den interagierenden Gelenkkompartimenten, eine Rolle (Schwarz und Hills, 1998; Abhishek und Doherty, 2013). Synovialflüssigkeit wird von der inneren Schicht der Gelenkkapsel gebildet und besteht aus Wasser, Hyaluronsäure, Proteinen und Fetten (Benninghoff et al., 2003). Die Menge und Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit kann durch Arthrose beeinflusst werden, womit die Funktion der Synovia als Schmiermittel und Ernährer des Gelenkknorpels vermindert wird (Sellam und Berenbaum, 2010). Außerdem entsteht eine Hyperalgesie, vermutlich durch eine erhöhte Konzentration von erregenden Neurotransmittern, insbesondere Glutamat, welches von sensorischen Neuronen des Rückenmarks freigesetzt wird (Lawand et al., 2000; Salaffi et al., 2014).

Die Gelenksteife entsteht durch verminderte Flexibilität des Gelenks im Zuge von Gelenkkontrakturen durch Verkürzungen umliegender Weichteile und der Angst der Patienten vor durch adäquate Bewegungen des Gelenks ausgelösten Schmerzen. In extremen Fällen kann es bis zu einer Fixation des Gelenks in einer Flexionshaltung kommen, insbesondere bei Knie-, Hüft- oder Ellenbogengelenk (Hasan und Shuckett, 2010). Die Diagnose wird sowohl durch die Klinik des Patienten als auch durch radiologische Aufnahmen gestellt. Radiologisch fließen vier Kriterien in den Kellgren-Lawrence-Score zur Beurteilung von Arthrose ein. Darunter fallen Gelenkspaltverschmälerungen, Zunahme von subchondralen Sklerosierungen mit progressiver Zystenbildung, Deformitäten der gelenkbildenden Knochenanteile und Osteophytenbildung (Micheal et al., 2010).

## 1.4 Therapien der Arthrose

### 1.4.1 Nicht-operative Verfahren

Die konservative Therapie der Arthrose erfolgt symptomatisch. Hierbei stehen neben allgemeinen Maßnahmen wie Gewichtsreduktion, physiotherapeutischer Behandlung und allgemeiner körperlicher Bewegung, physikalische Maßnahmen wie Wärmeanwendungen bei Dauerschmerzen, Kältetherapie bei aktivierter Arthrose und medikamentöse Maßnahmen im Vordergrund (Arden et al., 2021; Hoeksma et al., 2004).

Darüber hinaus werden orthopädische Hilfsmittel eingesetzt, wie spezielle Schuhzurichtungen, Orthesen oder Phytotherapeutika, Vitamine und Homöopathika. Nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) können bei stärkeren Schmerzen zeitlich begrenzt als Analgetikum eingenommen werden unter Abwägung des individuellen Ulkus Risikos der zu behandelnden Patienten (Arden et al., 2021; Bannuru et al., 2019; Petersen et al., 2015; Primorac et al., 2021). Bei NSAR-Unverträglichkeit können u. a. der Einsatz von *Slow Acting Drugs for Osteoarthritis* (SADAO) wie Chondrotinsulfat oder Glukosamin (Yang et al., 2015) in Erwägung gezogen werden. Die Datenlage zur Wirksamkeit von SADAO ist jedoch widersprüchlich (Henrotin et al., 2014).

Intraartikulär applizierte Hyaluronsäurepräparate wirken schmerzlindernd und der Stoffwechsel des Gelenkknorpels soll mit diesen verbessert werden. Bisher wurden

keine positiven Langzeiteffekte nachgewiesen, sodass es sich mehr um einen bisher kurzfristigen symptomorientierten Ansatz handelt (Trigkilidas und Anand, 2013; Liu et al., 2018). Die schmerzlindernde Wirkung von Hyaluronsäure-Präparaten scheint erheblich durch Placeboeffekte erklärbar zu sein (Bannuru et al., 2015).

Ebenso werden Kortikosteroide intraartikulär injiziert, welche immunsuppressiv und antientzündlich wirken, indem sie u. a. die Synthese proinflammatorischer Cytokine, wie bspw. Interleukin-1 und katabolische Proteine wie Matrix-Metallproteasen (MMPs) blockieren. Ähnlich wie die artikulären Hyaluronsäure-Injektionen führen auch die Kortikosteroide nur zu einer kurzfristigen Schmerzlinderung, dabei helfen sie insbesondere Patienten mit einer Arthrose-assoziierten, sterilen Gelenkentzündung (Ayhan et al., 2014; Primorac et al., 2021). Im Vergleich zeigen intraartikulär applizierte Kortikosteroide bessere kurzfristige Effekte (bis zu einem Monat) als Hyaluronsäure, während Hyaluronsäure-Präparate bessere schmerzlindernde Effekte nach sechs Monaten im selbigen Vergleich erzielen (He et al., 2017). Dennoch unterliegt jede intraartikuläre Injektion dem Risiko einer Gelenkentzündung und speziell die Anwendung von Kortikosteroiden der Gefahr einer erhöhten Infektneigung mit gleichzeitiger Infektverschleierung. Zudem wurden in Studien eine Toxizität für Chondrozyten nachgewiesen (Dragoo et al., 2012; Wernecke et al., 2015) sowie ein beschleunigter Schwund des Gelenkknorpels (McAlindon et al., 2017).

Des Weiteren wird die Etablierung von intraartikulären Applikationen von thrombozytenreichem Plasma erforscht (Ayhan et al., 2014). Dieses Verfahren bereitet Eigenblut von Patienten durch Zentrifugationsschritte auf, welches anschließend dem Patienten intraartikulär appliziert wird, um von den Wachstumsfaktoren zu profitieren, die bei der Blutgerinnung von Thrombozyten freigesetzt werden (Meheux et al., 2016; Rodríguez-Merchán et al., 2022). Einen weiteren Therapieansatz stellt der Einsatz von Biologica dar. Antikörper gegen bspw. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) sollen die erhöhten Cytokinspiegel senken. Die erhöhten Cytokine fördern ihrerseits die Synthese knorpelabbauender Enzyme wie Kollagenasen (Yang et al., 2008). Jüngere Patienten nach Gelenktraumata haben ein hohes Risiko, Jahre nach der Verletzung an einer posttraumatischen Arthrose zu erkranken. Insbesondere diese Patienten benötigen Therapien, um fortschreitende Knorpeldefekte

und damit anschließende mögliche Gelenkfehlfunktionen frühzeitig zu therapieren (Anderson et al., 2011; Schenker et al., 2014).

#### 1.4.2 Operative Verfahren

Zur Verbesserung der Gelenkmechanik und -biologie gibt es diverse operative Behandlungen. Diese müssen angepasst an die Destruktionen des Knochens und Knorpels verwendet werden. Außerdem müssen mögliche intra- und postoperative Komplikationen mit der operativen Indikation gegeneinander abgewogen werden.

Zum einen stehen Verfahren zur Verbesserung der Gelenkmechanik zur Verfügung. Für einige dieser Verfahren stellt die Gelenksarthroskopie eine Grundvoraussetzung dar, somit werden Arthroskopien nicht nur im Zuge der Diagnostik eingesetzt. Gelenkspülungen, sogenannte Lavagen und Wundsanierungen (Débridements), sollen Entzündungszellen und freie Gelenkkörper entfernen (Schneider et al., 1999; Spahn et al., 2013). Die Knorpelglättung mittels Shaver dient dem Zweck, die Knorpeloberfläche abzurunden, um somit freie oder sich ablösende Knorpelanteile zu entfernen, als auch Stufenbildung im Zuge von Knorpelschäden auszugleichen. Durch dieses Verfahren können inflammatorische Prozesse reduziert werden. Obwohl sich die Gelenkmechanik kurzfristig verbessert, führt dieses Verfahren jedoch zu keiner Reparatur der Schäden, sondern fügt iatrogen weitere Schäden zu und muss dementsprechend umsichtig eingesetzt werden (Spahn et al., 2006). Zur Herstellung kongruenter Gelenkflächen und einer Minderung der Hauptbelastungszonen wird die Umstellungsosteotomie für das Kniegelenk eingesetzt, indem durch knöcherne Schnitte eine Achskorrektur erreicht wird (Brouwer et al., 2014).

Zum anderen gibt es Verfahren, die zur Selbstheilung des Knorpels beitragen sollen. Diese stützen sich auf drei Ansätze: Integration von Zellen, Auslösung von Signalkaskaden und Strukturunterstützung (Abb. 3). Da der artikuläre Knorpel nur über ein geringes Potential an intrinsischer Heilungskapazität verfügt, wird versucht dieses Potenzial durch das Einwandern von Stammzellen zu erhöhen. Die Pridie-Bohrung und die Mikrofrakturierung stellen unterschiedliche Operationsmethoden dar, um aus dem subchondralen Knochen Stammzellen des Blutes in die Verletzung einzuschwemmen. Nach dem Débridement des defekten Gewebes werden minimalinvasiv im Abstand von

2–3 mm kleine Löcher gesetzt, welche zentralwärts auf dem gesamten Defekt verteilt für eine kontrollierte Einblutung aus dem Markraum sorgen sollen (Johnson et al., 1986; Steadman et al., 1997). Diese Einblutungen führen nicht zu einer Regeneration von hyalinem Knorpel sondern zu einer Defektdeckung mit Faserknorpel, sodass sie nur zu einer kurzfristigen Verbesserung führen, indem das ausgebildete Ersatzgewebe die Gleitfähigkeit des Gelenks vorläufig wieder verbessert (Bae et al., 2006; Johnson et al., 1986; Kreuz et al., 2006). Der biomechanisch und biochemisch unterlegene Faserknorpel ist an die Druckbelastungen, die im Gelenk wirken, nicht ausreichend angepasst. Postoperativ entstehen nach 18–24 Monaten erneute Degradationen (Kreuz et al., 2006). Unabhängig von der Defektgröße sind fünf Jahre nach dem Eingriff die Verbesserungen durch den Eingriff nicht mehr nachweisbar, sodass dieser Ansatz die Knorpeldegeneration nur kurzfristig hinauszögert (Goyal et al., 2013). Des Weiteren wurde eine 3–7-fach höhere Misserfolgsrate von autologer Chondrozytenimplantation (ACI) beziehungsweise (bzw.) autologer Chondrozytentransplantation (ACT) nach einer stattgefundenen Mikrofrakturierung nachgewiesen (Minas et al., 2009; Pestka et al., 2012). Die ACI ist eine Technik, die vorrangig nur vor der Manifestation einer Arthrose bei umrissenen Knorpeldefekten zum Einsatz kommt. Häufig wird diese Technik bei traumatischen Knorpelschäden eingesetzt. Zwei Eingriffe sind für die Knorpelzelltransplantation notwendig. Zunächst wird mittels Stanzbiopsie im Zuge einer Arthroskopie ein kleines Stück Knorpel aus einem nicht gewichtsbelasteten Areal der Gelenkfläche entnommen und anschließend werden *in vitro* aus diesem Stück weitere autologe Knorpelzellen gezüchtet. Nach drei bis vier Wochen können die Knorpelzellen implantiert werden. Dafür wird in einer erneuten Arthroskopie das defekte Areal entfernt und das Transplantat eingenäht (Brittberg et al., 1994; Peterson et al., 2010). Langzeituntersuchungen von über zehn Jahren haben festgestellt, dass ACI für ausgewählte Patienten gute Langzeiteffekte in Bezug auf Schmerzreduktion und Funktionsverbesserung aufzeigt (Steinwachs et al., 1999; Peterson et al., 2010). Selbst Defekte von > 4 cm<sup>2</sup> zeigten zufriedenstellende Langzeitergebnisse (Minas et al., 2009; Peterson et al., 2010). Außerdem steht bei tiefer reichenden Defekten, die bereits den subchondralen Knochen tangieren, die osteochondrale Transplantation, auch Mosaikplastik genannt, als Therapieoption zur Verfügung. Wie bei der ACI wird auch hier ein autologes Transplantat entnommen und reimplantiert (Bös und Ellermann, 2003). Dabei entstehen ähnlich zur ACI Spalträume zwischen Transplantat und eingesetztem Gewebe

und im Vergleich zur ACI sind die Langzeiterfolge bei Defektgrößen  $> 3 \text{ cm}^2$  schlechter, u. a. durch eine hypertrophische Dedifferenzierung des Gewebes (Bentley et al., 2012). Um einer Hypertrophie bzw. Dedifferenzierung zuvorzukommen, wurden Scaffolds entwickelt. Diese stellen bioresorbierbare Gerüste dar, welche den Zellen als Hilfe dienen sollen, sich zu organisieren. In Studien wurde nachgewiesen, dass hMSC sich besser in hyalinen Knorpel differenzieren, wenn sie in einer 3D-Zellkultur heranwachsen (Caron et al., 2012). Zudem besteht so die Möglichkeit, Defekte passgenauer aufzufüllen und eine bessere Integration mit dem Nachbargewebe herzustellen. Des Weiteren ist die Rehabilitationszeit postoperativ verkürzt (Makris et al., 2015). Als Weiterentwicklung der ACI durch Scaffolds gilt die matrixgestützte autologe Chondrozytenimplantation (MACI) bzw. die matrixgestützte autologe Chondrozytentransplantation (MACT). Bei diesem Verfahren werden die gewonnenen Chondrozyten auf eine resorbierbare Matrix aufgetragen und dort kultiviert. Die Matrix soll die Chondrozyten stabilisieren, sodass die Chondrozyten besser im Defekt verteilt werden sollen (Ochs et al., 2007). Autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC) stellt eine weitere Scaffold-Technik dar, die wiederum als Weiterentwicklung der Mikrofrakturierung eingeordnet werden kann (Behrens, 2005). Dabei werden nach einem Débridement der Knorpeldefekte Scaffolds passgenau in die Bohrungen eingesetzt (Walther et al., 2012).

Darüber hinaus gibt es Operationsverfahren mit dem Ziel der Schmerzminderung. Die Synovektomie kann bei sekundärer Arthrose durchgeführt werden, indem die Schleimhaut abgetragen wird und somit weniger entzündlicher Erguss gebildet werden soll. Jedoch ist dabei die starke räumliche Nähe zur Gelenkkapsel zu beachten, welche die Mechanorezeptoren beinhaltet. Als Komplikation kann es zu einer Störung der Propriozeption kommen. Zudem besitzt die Synovia ein hohes Regenerationspotenzial (Spahn et al., 2015). Des Weiteren gibt es die Denervierung, die insbesondere bei starken Schmerzen, vor allem an der Hand und dem Ellenbogen, Einsatz findet (Merk und Rudigier, 2002).

Als Gelenkersatz stellen Endoprothesen eine Möglichkeit dar (Ethgen et al., 2004). Mittlerweile ermöglichen Endoprothesen auch jüngeren Menschen trotz einer Erkrankung an Arthrose, ihre Ziele im Sport wieder erreichen zu können (Bohnsack, 2015). Endoprothesen unterliegen einer endlichen Haltbarkeit. Etwa dreiviertel der

implantierten Hüftprothesen halten bspw. 15–20 Jahre (Evans et al., 2019). Knieprothesen halten zum Großteil 25 Jahre (Evans et al., 2019). Ein Prothesenaustausch ist nur in begrenzter Anzahl möglich, da Wechseloperationen höhere Komplikationsrisiken als Erstoperationen aufweisen und anspruchsvoller sind (Lenzen-Schulte, 2017). Die letzte Therapieoption stellen Arthrodesen dar, welche den Patienten bei schwerster Arthrose helfen können, durch Gelenkversteifung schmerzfrei unter Belastung zu sein (Abt et al., 2011).

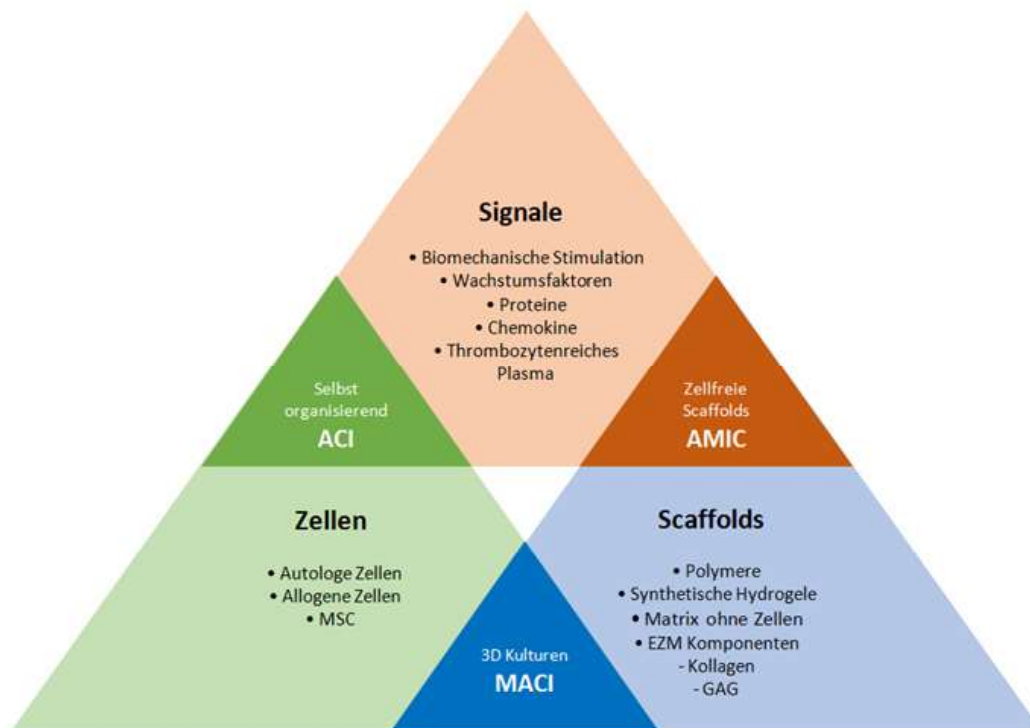


Abb. 3: Ansätze zur Heilung von Knorpeldefekten. Modifiziert nach Makris et al., 2015

## 1.5 Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch das Potential aus, sich in Folge von Stimulation sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* in verschiedene mesodermale Gewebe zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Mesenchym ist ein Begriff für unreifes Bindegewebe (Alfejew, 1926). Das Mesoderm bezeichnet das mittlere Keimblatt des Embryoblasten, welcher nach der Zellteilung aus der eingenisteten, befruchteten Eizelle hervorgegangen ist. In der dritten Entwicklungswoche wandern beim Menschen Mesoderm-Zellen nach einer epithelial-mesenchymalen Umwandlung zwischen

Epiblast und Hypoblast ein. Dadurch entstehen die drei Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Aus dem Mesoderm entwickelt sich eine Reihe an Derivaten, aus denen sich seröse Häute, Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Fett, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, glatte Muskulatur und die Nuclei pulposi der Zwischenwirbelscheiben differenzieren. Des Weiteren bilden sich aus dem Mesoderm auch Organe, darunter Herz, Blutgefäße, Lymphknoten, Nieren, Keimdrüsen, Milz, Nebennieren und zum Teil die inneren Geschlechtsorgane, aus (Benninghoff et al., 2003). Diese Fähigkeit zur Differenzierung, ausgehend von dem Mesoderm, nennt sich multipotent (Pittenger et al., 1999).

Multipotenz beschreibt die Entwicklungspotenz der Zellen bzw. deren Differenzierungsmöglichkeiten. Die befruchtete Eizelle gefolgt von den Zellstadien bis zur Morula haben die Fähigkeit, alle Gewebe eines neuen Individuums hervorzubringen, daher nennt man ihre Entwicklungspotenz totipotent oder auch omnipotent. Die Embryoblastzellen der Blastozyste sind im Vergleich pluripotent. Sie können kein extraembryonales Gewebe, wie die Plazenta, mehr ausdifferenzieren und haben somit die Fähigkeit, ein neues Individuum zu erschaffen, verloren. Sie sind jedoch in der Lage, sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter zu differenzieren (Benninghoff et al., 2003; Kalra und Tomar, 2014; Kelly, 1977). Multipotente Stammzellen können sich nur noch in Zelltypen eines Gewebetyps entwickeln (Pittenger et al., 1999). In Ausnahmen können sich mesodermale, multipotente Stammzellen bei passender Behandlung in einige nicht-mesodermale Zelllinien, wie pankreatische Zellen und neuronenhähnliche Zellen, entwickeln (Marappagounder et al., 2013; Ghorbani et al., 2018). Unipotent werden Zellen genannt, die nur Zellen eines Typus durch mitotische Teilung bilden können, bspw. Fibroblasten (Benninghoff et al., 2003; Kalra und Tomar, 2014).

Knochenmark, Nabelschnurblut und Fettgewebe sind etablierte Quellen zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen (Hass et al., 2011). Nach der *International Society for Cell Therapy* werden MSC klassifiziert, wenn die gewonnenen Zellen an Plastik haften, gewisse Oberflächenmarker wie unter anderem CD73, CD90 und CD105 exprimieren, hämopoetische Marker wie CD14, CD19 und CD45 nicht exprimieren und das Potential innehaben sich in Knochen, Fett und Knorpel zu differenzieren (Dominici et al., 2006; Robert et al., 2020). Durch ihr Potential, sich in verschiedene Zellreihen zu differenzieren, stellen sie einen Therapieansatz zur Behandlung und Erforschung

degenerativer Erkrankungen dar, die durch *Tissue Engineering*, die gezielte Aufzucht von Gewebe, behandelt werden sollen (Pittenger et al., 1999; Rebelatto et al., 2008).

Dafür wird biologisches Gewebe durch die gerichtete Kultivierung von Zellen gezüchtet, mit dem Ziel krankes Gewebe zu ersetzen oder zu regenerieren (Makris et al., 2015). Die damit angestrebte zellbasierte, personalisierte Therapie baut auf den Einsatz von hMSC, welche als multipotente, sich selbst erneuernde Zellen (Billing et al., 2016), zudem nur ein sehr geringes Risiko von Tumorentstehung innehaben (Hass et al., 2011; Wang et al., 2021). Der Differenzierungserfolg der eingesetzten Stammzellen ist abhängig von der Genexpression und damit von den Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsprodukten (Billing et al., 2016).

## 1.6 Chondrogene Differenzierung

Der Rahmen einer Zellkultur umfasst die kontrollierte Kultivierung einer Zellpopulation außerhalb des Organismus. In geeigneten Kulturgefäßen wachsen die Zellen, proliferieren und können zur Differenzierung angeregt werden. All dies ermöglicht ein geeignetes Nährmedium. Dieses versorgt den Metabolismus der Zellen mit den benötigten Bauelementen, wie Kohlenstoff, Aminosäuren und Vitaminen (Gstraunthaler und Lindl, 2021).

Für einen nicht selektiven Calcium-permeablen Kationenkanal kodiert das Gen *transient receptor potential vanilloid cation channel 4* (TRPV4) auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q24.1) (Voets et al., 2002). Dieser Kanal ist sowohl an der Knorpel- und Knochenausbildung beteiligt als auch an der Osmoregulation, der Mechano- und Nozizeption (Xu et al., 2020). Im Zuge der chondrogenen Differenzierung wird dieses Gen exprimiert und aktiviert wiederum *sex determining region Y (SRY)-box transcription factor 9* (SOX9) (Muramatsu et al., 2007). Das Protein SOX9 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, welcher zum einen eine zentrale Rolle bei der Regulation vom Anti-Müller-Hormon bei der Geschlechtsbestimmung des Menschen darstellt und zum anderen führt dessen Expression zur Ausbildung eines chondrogenen Zelltypus bei Stammzellen (Bi et al., 1999; Lefebvre et al., 2007, 2019). SOX9 als früher chondrogener Differenzierungsmarker aktiviert die Transkription diverser knorpelspezifischer Matrixproteine (Akiyama et al., 2002). Eine chondrogene

Differenzierung von hMSC *in vitro* kann durch die drei Isoformen der *transforming growth factors beta* (TGF- $\beta$ ) ausgelöst werden (Freyria und Mallein-Gerin, 2012). Dabei erhöht der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 die Kollagensynthese aller Typen in einer Zellkultur (Galéra et al., 1992). Durch die Bindung der TGF- $\beta$  Isoformen an einen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor an der Zelloberfläche wird dieser autophosphoryliert. Dadurch formen SMAD-Proteine miteinander Komplexe und wandern in den Zellkern, in welchem sie als Co-Aktivatoren und Co-Suppressoren die Genexpression verstärken bzw. vermindern (Heldin et al., 1997; Derynck und Zhang, 2003). Dabei wird insbesondere die chondrogene Differenzierung über zwei verschiedene Signalwege verstärkt und aktiviert. Zum einen über die Transkriptionsfaktoren SMAD2 und SMAD3 und zum anderen über die Transkriptionsfaktoren SMAD1, SMAD5 und SMAD8 (Chen et al., 2021; Ferguson et al., 2000; Furumatsu et al., 2005). SMAD3 induziert die Transkriptionsaktivität von SOX9 (Furumatsu et al., 2009). Zwar führen beide Signalwege zur Ausbildung eines chondrogenen Zelltypus, hingegen können SMAD1, SMAD5 und SMAD8 auch eine hypertrophische Genexpression fördern durch die Verstärkung der Aktivität von  *runt-related transcription factor-2* (RUNX2) (Chen et al., 2021). RUNX2 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der insbesondere in hypertrophischen chondrogenen Zellen und bei einer osteogenen Differenzierung exprimiert wird (van der Kraan et al., 2009; Zhou et al., 2015). Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors RUNX2 differenzieren sich MSC entlang der osteoblastären Zelllinie. In der Folge der Expression von RUNX2 werden die osteogenen Marker Osteocalcin (OC) und die Alkalische Phosphatase (ALP) verstärkt exprimiert (Qi et al., 2003). Über die SMAD Transkriptionsfaktoren führt TGF- $\beta$ 1 zur verstärkten Expression chondrogener Gene und inhibiert zudem die Ausbildung eines hypertrophischen Zelltyps (Roman-Blas et al., 2007). Die SMAD-abhängigen Signalwege fördern anabole Prozesse in Gelenkknorpelzellen (Roman-Blas et al., 2007). Diese Signalwege werden durch Cytokine wie bspw. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  modifiziert, sodass katabole Prozesse überwiegen können (Roman-Blas et al., 2007; Thielen et al., 2021). Die Qualität der Chondrogenese kann durch die Kombination diverser Wachstumsfaktoren gesteigert werden (Indrawattana et al., 2004; Murphy et al., 2015) (Abb. 4). *Bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) ist ein weiterer Wachstumsfaktor, der die Ausbildung eines chondrogenen Zelltypus fördert (Zhou, 2015). Eine Kombination von TGF- $\beta$  mit *bone morphogenetic proteins* (BMP) ist eine günstige Kombination zur

Induktion chondrogener Differenzierung in hMSC (Indrawattana et al., 2004). Die BMP aktivieren über *bone morphogenetic protein receptor 1* (BMPRI) ebenfalls SMAD Proteine. Dabei werden insbesondere SMAD1, SMAD5 und SMAD8 durch Phosphorylierung aktiviert (Nordin und LaBonne, 2014; Yoon et al., 2005). Neben den SMAD-abhängigen Signalwegen ist der *p38/mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg (Wu et al., 2016; Kim et al., 2007) und der Wnt-Signalweg (Chen et al., 2021) wichtig bei der chondrogenen Differenzierung. Der MAPK kann sowohl durch den TGF- $\beta$  Signalweg als auch durch den BMP-Signalweg aktiviert werden und kann das Gleichgewicht von SMAD2/SMAD3 und SMAD1/SMAD5/SMAD8 verändern, sodass SOX9 bzw. RUNX2 verstärkt aktiviert werden kann (Chen et al., 2021). Der Wachstumsfaktor *growth differentiation factor-5* (GDF-5) blockiert durch die Aktivierung von *dickkopf-related protein 1* (DKK-1) den Wnt-Signalweg, welcher katabolische Prozesse aktiviert und die Differenzierung von hMSC blockiert (Boland et al., 2004; Thorfve et al., 2012). Zu den schlussendlich erwünschten diversen knorpelspezifischen Matrixproteinen zählt insbesondere Kollagen Typ II. Dieses wird durch das Gen *collagen type II alpha 1 chain* (COL2A1) auf Chromosom 12 am Genlokus 12q13.11 kodiert. Nach Prozessierung und Sekretion bildet Kollagen Typ II extrazellulär ein fibrilläres Netzwerk, in welches sich Proteoglykane einbinden. Dadurch entsteht eine Viskoelastizität, welche die Eigenschaften von hyalinem und elastischem Knorpel determiniert (Aigner und Stöve, 2003). Aggrecan ist ein Protein, das als Proteoglykan in hyalinem Knorpel vorkommt und zusammen mit Hyaluronsäure viel Wasser bindet, wodurch die stoßdämpfende Wirkung des Knorpels generiert wird (Aigner und Stöve, 2003). *Hyaluronan and proteoglycan link protein 1* (HAPLN1) kodiert für ein weiteres Protein, welches zusammen mit Hyaluronsäure die Proteoglykane der extrazellulären Matrix von Chondrozyten, insbesondere Aggrecan, stabilisiert (Hardingham, 1979; Roughley und Mort, 2014). Die Verwendung von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung von Stammzellen stellt eine Gratwanderung dar, bei der es zu einer Hypertrophie der zu differenzierenden Zellen kommen kann (van der Kraan und van den Berg, 2012). Durch Hypertrophie wird u. a. Kollagen Typ I verstärkt exprimiert. Das Protein *collagen type I alpha 1 chain* (COL1A1) wird auf Chromosom 17 an Genlokus 50.18-50.2 kodiert und stellt einen von zwei Typen von Kollagen I dar. Kollagene als Bestandteil der Extrazellulärmatrix werden von verschiedenen Zellen synthetisiert und sezerniert. Kollagen Typ I bildet Fibrillen aus,

die sich jeweils aus drei Peptidketten zusammensetzen (Triplehelix). Im Extrazellulärraum lagern sich diese parallel aneinander und werden durch kovalente Bindungen quervernetzt, wodurch das entstehende Gewebe eine starke Zugfestigkeit gewinnt (Patino et al., 2002). Durch die Verwendung von Hypoxie wird eine verminderte Sekretion von Kollagen Typ I *in vitro* erzielt (Ronziere et al., 2010). Entgegen der Hypertrophie und zugunsten einer chondrogenen Differenzierung wirkt ein niedriger Sauerstoffgehalt von 1–6 % statt 20 % (Hiaro et al., 2006). Dieser Effekt entsteht durch die vermehrte transkriptionale Aktivität von dem Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) (Portron et al., 2015; Ronziere et al., 2010). Die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  führt zu einer verbesserten chondrogenen Differenzierung der MSC (Robins et al., 2005; Zheng et al., 2017). Bei einer Verwendung von BMP-2 als auch einem Zusatz von HIF-1 $\alpha$  konnte eine erhöhte SOX9-Expression und zudem eine verminderte Expression von RUNX2 festgestellt werden (Zhou et al., 2015). Durch die Verwendung von Hypoxie-induzierbarer-Faktor-hydroxylase Inhibitoren, wie bspw. *Dimethyl-oxalylglycine* (DMOG), können die Effekte von Hypoxie ebenfalls erzielt werden. DMOG stabilisiert HIF-1 $\alpha$ , wodurch die chondrogene Differenzierung unterstützt wird und die Ausbildung von chondrogener Hypertrophie vermindert wird (Sathy et al., 2019; Taheem et al., 2018). Es wurde allerdings nachgewiesen, dass HIF-1 $\alpha$  stabilisierende Stoffe wie DMOG zu einer verminderten Matrixsynthese in der späten chondrogenen Differenzierung durch Inaktivierung der 4-Prolyl-Hydroxylase führen, welche für die Kollagen Typ II-Synthese essenziell ist (Falcon et al., 2021; Myllyharju et al., 2003).

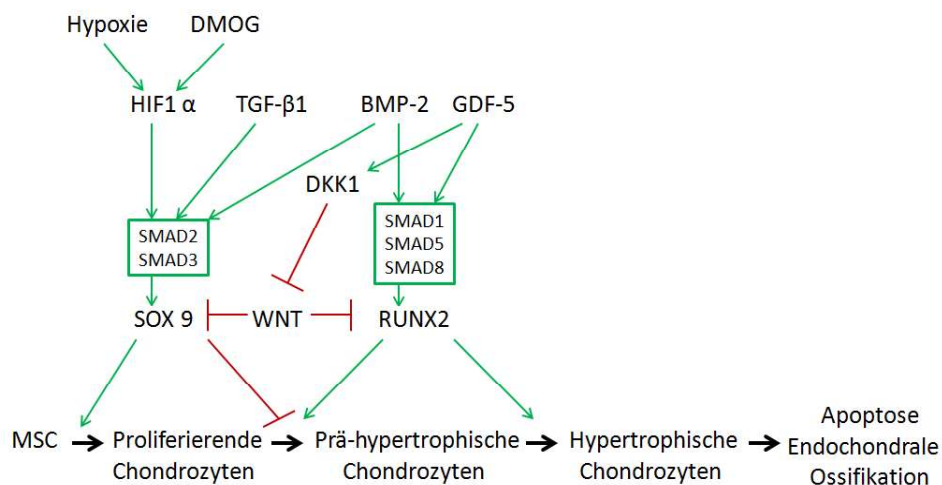


Abb. 4: Übersicht beeinflussender Faktoren auf die chondrogene Differenzierung

## 1.7 Die Polymere

Scaffolds zur Heilung osteochondraler Defekte finden bereits zum Teil klinischen Einsatz. Mit ihnen wird versucht, die Morphologie von nativem Gelenkknorpel zu imitieren (Hutmacher, 2000). Während es schon einige Ansätze für isolierte, chondrale Defekte gibt, wie bspw. Novocart® und Chondro-Gide®, sind kombinierte Lösungen für tiefreichende Defekte, die den subchondralen Knochen mit einbeziehen, seltener. TruFit CB® und MaioRegen™ stellen Beispiele dar, wobei TruFit CB® inzwischen nicht mehr im klinischen Einsatz auf Grund minderwertiger Langzeitergebnisse ist (D'Ambrosi et al., 2019; Melton et al., 2010). Die benannten Beispiele gehören zum AMIC Verfahren. Da häufig Defekte erst klinisch relevant werden, wenn bereits der subchondrale Knochen in Mitleidenschaft gezogen wurde (Felson et al., 1988), findet sich hier weiterhin eine therapeutische Lücke, die es zu schließen gilt.

Zur Therapie solcher Defekte muss ein Scaffold besondere Anforderungen erfüllen. Das Material muss biokompatibel sein. Das Scaffold sollte die im Gelenk wirkenden Kräfte möglichst physiologisch verteilen, sodass es während der Proliferationsphase des Gewebes dessen Funktion ausreichend ersetzt. Gleichzeitig sollte es dem Körper als Führungsschiene dienen, damit die körpereigenen Zellen für eine Heilung der Defekte einwachsen können. Es benötigt somit angepasste biomechanische und biochemische Eigenschaften und eine Architektur, welche den einwachsenden Zellen ermöglicht, weiter durch Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte ihren Informationsaustausch und metabolischen Austausch aufrechtzuerhalten. Eine angepasste Resorption des Materials an die Regenerationszeit des Gewebes ist nötig, wobei die Degeneration des Materials zu keiner immunologischen Reaktion führen sollte. Für zukünftige Weiterentwicklungen im Sinne der Hauptansätze des *Tissue Engineering*, ist es wichtig, dass das Material potentiell mit Wachstumsfaktoren bedeckt werden kann, um eine gezielte Differenzierung zu unterstützen oder mit dem Scaffold auch Zellen in den Defekt mitzubringen (Grande et al., 1997; Hauptmann et al, 2019; Langer und Vacanti, 1993; Zhang et al., 2020).

Etabliert im klinischen Einsatz sind bisher vor allem Scaffolds auf der Basis von Kollagen. In der Forschung beschäftigt man sich bereits mit einem deutlich breiteren Spektrum an Biomaterialien. Diese unterscheiden sich nach möglicher Biodegeneration und dem Ursprung des Materials. Diverse Variationen an Kollagen Typ I, II und III

basierten Scaffolds in Form von Hydrogelen, Kollagen-Alginat Gelen und Membranen sind Vertreter der natürlich vorkommenden Biomaterialien, welche nach einer gewissen Zeit abgebaut werden (Qi und Scully, 1997; Sams und Nixon, 1995; Tomoats et al., 1984). Ebenfalls inspiriert vom Aufbau der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels sind Polysaccharid-basierte-Hydrogele wie bspw. Hydrogele basierend auf Hyaluronsäure und Alginaten, welche ebenfalls vom Körper resorbiert werden (Levett et al., 2014). Analog zu im Knorpel vorkommenden Glykosaminoglykanen gibt es auch Ansätze mit Glykosaminoglykanen wie bspw. Chitosan (Erickson et al., 2019; Park et al., 2013). Diese natürlich vorkommenden Polymere imitieren zunächst die extrazelluläre Matrix von natürlichem hyalinen Knorpel, jedoch haben sie weniger mechanische Stärke und unterliegen einer schnellen Degenerationsrate (Niu et al., 2023). Beispiele für biodegenerierbare, synthetisierte Polymere sind Poly-L-Glutaminsäure (PGA), Poly-(D, L)-Laktat (PLA), Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL) und Polyethylene Glycol (PEG) (Ovsianikov et al., 2011; Niu et al., 2023). Einige von diesen Polymeren werden bereits in Ländern wie den USA und Japan für orthopädische und dentale Versorgungen genutzt und sind für spezifische Eingriffe zugelassen (Narayanan et al., 2016). Synthetisierte Polymere haben den Vorteil, dass ihre chemischen und mechanischen Eigenschaften durch ihre Kettenlänge, chemischen Gruppen und Schwellungs- bzw. Schrumpfungseigenschaften genau festgelegt werden und auch ihre Degenerationsgeschwindigkeiten beeinflusst werden können (Huang et al., 2004). Weiterführend können die Polymere um eine Beschichtung ergänzt werden. Häufig haften Zellen an synthetisierten Polymeren weniger, da sie weniger Zelladhäsionssequenzen besitzen. Dies beeinflusst die Adhäsion und die Proliferation der Zellen (Niu et al., 2023). Daher ist es weit verbreitet, Scaffolds mit Beschichtungen zu optimieren. Es kann bspw. eine Heparinbeschichtung eingesetzt werden, um eine Hämostase bei Blutkontakt zu hemmen (Hauptmann et al., 2022).

Anknüpfend an die bereits bestehende Forschung wurden in dem vom BMBF geförderten Poly-Implant-Druck-Projekt Implantate aus Polymeren entwickelt, die entweder nach dem Vorbild der in vielen klinischen Bereichen angewendeten Materialien über Laktat degradieren (LCM3) (Hauptmann et al., 2019) oder über Aminosäuren (ACM) (Hauptmann et al., 2022). Beide Materialien können in einer 3D-Struktur mit einer speziellen Porengröße synthetisiert werden (Hauptmann et al., 2019 und 2022). LCM3 besteht aus Polyestern, welche gut einstellbare physikalische und

chemische Eigenschaften besitzen (Hauptmann et al., 2019). Bei der Degradation von Strukturen, welche Polylaktat enthalten, wird Milchsäure freigesetzt, sodass der lokale pH-Wert im Zuge der Acetolyse herabgesetzt wird (Hutmacher et al., 1996). ACM besteht aus Polyesteramiden. Die Ester-Verbindungen vermindern die mechanische Steifheit des Polymers, während die starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidgruppen die mechanischen Eigenschaften ausmachen (Hauptmann et al., 2022). Bei der Degradation von ACM entstehen die nicht toxischen Monomere Caprolacton und Alanin. Unter physiologischen Konditionen zeigte ACM beinahe keine Schwellung bzw. Schrumpfung des Materials (Hauptmann et al., 2022). Zusätzlich wurden die Polymere LCM3 und ACM auch mit einer Heparinbeschichtung getestet (LCM3H, ACMH), sodass vier Materialien miteinander verglichen werden konnten. Die Materialien lagen für die Versuche in Form von Ronden mit einer Höhe von 1 mm und einem Durchmesser von 7 mm vor.

## 1.8 Fragestellung

Osteoarthritis als weltweit häufigste Gelenkerkrankung nimmt seit Jahrzehnten zu. Durch einen steigenden Altersdurchschnitt in der Bevölkerung nehmen die Arthrose-Fallzahlen und die damit vergesellschafteten Krankheitskosten im Gesundheitssystem zu. Durch eine letztendlich verminderte Funktion von Gelenken und auch schmerzbedingt wird die körperliche Aktivität der Patienten weniger, was wiederum auch Komorbiditäten wie Adipositas, Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen negativ beeinflusst. Daraus resultiert ein zunehmender Handlungsdruck. Mit der weiterhin limitierenden endlichen Haltbarkeit von Endoprothesen als definitiven Gelenkersatz bedarf es weiterer Therapien, die Gelenkmechanik und -biologie zu verbessern in Form von bestmöglicher Heilung osteochondraler Defekte. Scaffolds stellen einen Therapieansatz dar, indem sie umliegenden Zellen als Gerüst eine kontrollierte Proliferation ermöglichen. Bisher eingesetzte natürliche Polymere führen *in vivo* zu minderwertigem Faserknorpel. Synthetisierte Polymere stellen eine vielversprechende Basis für die Versorgung von osteochondralen Läsionen dar, da sich ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften zuverlässig einstellen lassen. Außerdem lässt sich die Degenerationszeit der Polymere beeinflussen, sodass die kritische Übergangsphase zwischen der Besiedlung der Defekte mit körpereigenen Zellen und dem Abbau der

stützenden Gerüste besser koordiniert werden kann. Als Basis für die zukünftige klinische Anwendung dieser neu entwickelten Scaffold-Materialien bedarf es zunächst Untersuchungen zu deren Cytokompatibilität *in vitro*.

Das Ziel dieser Studie ist, die chondrogene Differenzierungsfähigkeit von hMSC an zwei verschiedenen synthetisierten Polymermaterialien, jeweils mit und ohne Heparinbeschichtung, die über Laktat (LCM3) bzw. über Aminosäuren (ACM) degradieren, zu vergleichen. Untersucht wird u. a. die Genexpression im Verlauf der Differenzierung mit *real-time* Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (*real-time* RT-PCR), der Kollagen Typ II und IL-6 Gehalt mit zugehörigen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und die metabolische Aktivität der Zellen mit einem MTT-Assay.

Damit stehen die folgenden Fragen im Vordergrund:

- Haben die Polymere einen Einfluss auf die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der hMSC?
- Inwiefern wird die Proteinsynthese von Kollagen Typ II durch die Polymere beeinflusst?
- Fördert eine zusätzliche Heparinbeschichtung die chondrogene Differenzierungsfähigkeit?
- Exprimieren die Zellen in Kontakt zu den Materialien proinflammatorische Cytokine?

Ziel dieser Arbeit soll eine Empfehlung für den Einsatz eines Polymer-Materials sein, welches als Teil eines biphasischen Implantats in einem Tierversuch getestet werden soll. Diese modifizierten Scaffolds sollen letztendlich sowohl die Eigenschaften als auch die Regenerationsfähigkeiten von Knochen und Knorpel positiv beeinflussen und würden damit eine Grundlage für gewebespezifische Therapieansätze bieten.

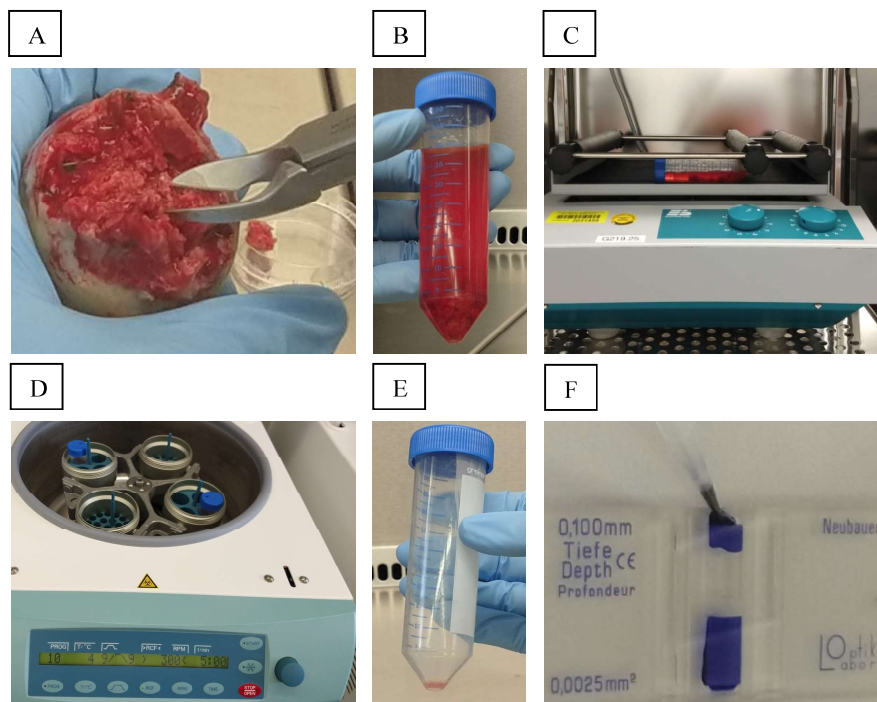
## 2 Material und Methode

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Übersicht der verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen

Im Rahmen einer endoprothetischen Versorgung männlicher Patienten wurde aus den nicht mehr benötigten Oberschenkelknochenköpfen (Capites femoris) bei schriftlicher Zustimmung der Patienten spongiöser Knochen gewonnen. Aus diesem wurden von den Mitarbeiter\*innen der Experimentellen Unfallchirurgie hMSC isoliert. Dafür wurde bereits intraoperativ der Oberschenkelknochenkopf steril in ein Gefäß mit Medium aus Hibernate A (Gibco, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), 20 % FBS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1 % Gentamycin/Amphotericin B (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) überführt. Es folgte anschließend im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie eine mechanische Lösung des spongiösen Knochens mit einer Zange (Abb. 5A). Die Fragmente wurden in Zentrifugenröhrchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), bestehend aus 10 mM Kaliumhydrogenphosphat, 30mM Dinatriumhydrogenphosphat und 1,5 M Natriumchlorid (Thermo Fisher Scientific GmbH), gewaschen. Daraufhin wurden die Fragmente in einem Medium aus Hibernate A und 10 % FBS für 10 min im Brutschrank (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) bei 37 Grad Celsius (°C) und 6 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) inkubiert (Abb. 5B). Nach der Inkubation wurde das Medium dekantiert und stattdessen durch Medium aus Hibernate A, 0,1 M/ml Calciumchlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 10 µg/ml Kollagenase (Fujifilm Wako, Neuss, Deutschland) ersetzt und die Fragmente für weitere 60 min im Brutschrank auf einer Rüttelplatte (Edmung Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland) inkubiert (Abb. 5C). Zum Abstoppen der Reaktion wurden 20 ml Medium aus Hibernate A und 10 % FBS verwendet. Es folgte eine Zentrifugation der Lösung bei 4 °C für 5 min bei 300g (Zentrifuge Hettich Rotina 380R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) (Abb. 5D). Nach dem Dekantieren des Mediums wurde das Zellpellet in *Erythrocyte Lysis Buffer* bestehend aus 77,5 mM/ml Ammoniumchlorid, 5 mM Kaliumbikarbonat und 5 mM/ml EDTA resuspendiert und 5 ml Medium aus Hibernate A mit 10 % FBS hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension mit einem 70 µm Zellsieb (Falcon™ Zellsiebe, Thermo Fisher Scientific) steril filtriert und erneut bei 4 °C für 5 min bei 300g zentrifugiert (Abb. 5E).

Das Zellpellet wurde in Mesenpro 20 % Medium (Tabelle (Tab.) 2) resuspendiert davon wurden 10  $\mu$ l mit einer Trypanblau-Färbung in einer Neubauer Zählkammer (LO - Laboroptik, Lancing, England) dargestellt (Abb. 5F), um die Qualität der Zellen vor dem Kultivieren zu überprüfen. Der Rest der Zellsuspension wurde in einer Zellkulturflasche (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) in Mesenpro 20 % Medium kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums wurden die Zellen gesplittet, zum Teil für zukünftige Versuche eingefroren und weiter kultiviert. Bei Erreichen erneuter Zellkonfluenz wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie mit *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (BD FACSMelody Cell Sorter, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) nach der positiven (+) bzw. negativen Expression (-) der Oberflächenmarker CD 73+, CD 105+, CD31- und CD45- durch Mitarbeiter\*innen der Experimentellen Unfallchirurgie sortiert. Dafür wurden die folgenden Antikörper verwendet: PB-conjugated mouse-anti-human CD73 (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA), APC-conjugated mouse-anti-human CD 105 (BioLegend), mouse-anti-human C31-APC/Cy7 (BioLegend) und mouse-anti-human CD45-APC/Cy7 (BioLegend).



**Abb. 5: Isolierung von hMSC aus einem Caput femoris A: Präparation eines Caput femoris mit einer Zange B: Knochenfragmente in Hibernate A Medium mit 10 % FBS C: Inkubation der Fragmente auf einer Rüttelplatte D: Zentrifugation der Zellpellets E: Gewonnenes Zellpellet F: Zellen in Zählkammer mit Trypanblau gefärbt**

Eine Auflistung der anonymisierten Spendernummern (Zellkultur, ZK) mit Zellpassage (P), Alter, Geschlecht und Anamnese ist Tab. 1 zu entnehmen. Die Verwendung des überschüssigen Patientenmaterials wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen unter dem Antrag 74/09 im November 2019 bewilligt.

**Tab. 1 Verwendete hMSC (n =6)**

<b>Zellkultur Nummer mit Passage (P)</b>	<b>Alter (in Jahre)</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Anamnese</b>
ZK 108 P 9	29	Männlich	Keine Vorerkrankungen
ZK 124 P 11	44	Männlich	Keine Vorerkrankungen
ZK 137 P 11	56	Männlich	Keine Vorerkrankungen
ZK 162 P 9	18	Männlich	Keine Vorerkrankungen
ZK 168 P 9	72	Männlich	Knochengesund
ZK 170 P 8	90	Männlich	Knochengesund

### 2.1.2 Zellen auftauen

Zur Vorbereitung wurden zwei Zellkulturflaschen mit 20 ml des Kulturmediums Mesenpro 20 % befüllt und 30 min im Brutschrank bei 37 Grad °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige Aliquot mit den auszusäenden Zellen aus dem Stickstofftank geholt und in einem Wasserbad bei 37 °C für 2 Minuten (min) aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen unter der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland und Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) aufgeteilt. Bis zu einer Konfluenz von circa (ca.) 70–80 % bzw. bis zum Mediumswechsel wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

### 2.1.3 Zellen splitten

Für eine ausreichende Zellmenge wurden zur Vervielfältigung der Zellen, unter Erhöhung der Passage, die Zellen gesplittet. Für diesen Zweck wurden die Zellen in Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Nach dem optischen Nachweis einer Konfluenz von ca. 70–80 % im Lichtmikroskop wurde das Zellmedium dekantiert und der Zellrasen mit PBS gespült. Anschließend wurden 3 ml TripLE Express (Thermo Fisher Scientific GmbH) in die Zellkulturflasche pipettiert und diese für 5 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 3 ml von dem 20 % MesenPro Medium verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellflasche wurde mit 3 ml PBS ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Mediumüberstand dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Das resuspendierte Zellpellet wurde auf zwei Zellkulturflaschen mit jeweils 15 ml 20 % MesenPro Medium aufgeteilt. Nach einer lichtmikroskopischen (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) Kontrolle wurden die Zellkulturflaschen erneut im Brutschrank inkubiert.

### 2.1.4 Zellen einfrieren

Die für den Versuchsaufbau überzähligen Zellen wurden für zukünftige Arbeiten erneut eingefroren. Dafür wurden die Zellen bei 4 °C, für 5 min und bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Restmedium dekantiert und die Zellen erneut in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Aliquots wurden mit 900 µl FBS und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) vorbereitet. Anschließend wurden ca. 1.000.000 Zellen pro Aliquot verteilt. Die Passage der hMSC erhöhte sich um + 1.

### 2.1.5 Versuchsaufbau

Das Material wurde in 96-Well-Platten geliefert. Um die Sterilität des Materials zu gewährleisten, wurden die Materialien zunächst unter der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank für einen Versuchsaufbau mit einer sterilen Pinzette aus der 96-

Well-Platte entnommen und in eine 48-Well-Platte (Costar® 48-well Clear TC-treated Multiple WellPlates, Sterile, Corning, Glendale, Arizona, USA) überführt. Dort wurden die Materialien in den einzelnen Wells zunächst mit 70-prozentigem Ethanol (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) bedeckt. Anschließend wurde der Alkohol mit einer Pipette abgenommen und die Materialien wiederholt mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Materialien mit einer sterilen Pinzette in die für die Versuche vorgesehenen 48-Well-Platten überführt, mit chondrogenem Differenzierungsmedium (Chondromedium) überschichtet und für 24 Stunden (h) inkubiert.

Vor der Aussaat wurde die Konfluenz der Zellen in den Zellflaschen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Anschließend wurde das Medium der Zellflasche dekantiert. Der Zellrasen wurde mit 20 ml PBS gespült. Dann wurden 3 ml TripLE Express in die Zellkulturflasche gegeben. Für das Wirkmaximum des Enzyms Trypsin wurde die Zellkulturflasche im Brutschrank für 5 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die vorbereiteten Platten aus dem Brutschrank entnommen und das Chondromedium aus den Wells mit den Materialien mit einer Pipette abgenommen. Nach der Inkubation wurde die Zelldissoziation am Lichtmikroskop kontrolliert. Zum Beenden der Reaktion wurden 3 ml MesenPro 20 % Medium in die Zellkulturflasche hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde erneut die Zellkulturflasche mit PBS gespült und die Spüllösung ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 1 ml Kontrollmedium resuspendiert. Es erfolgte die Zellanzahlbestimmung mit CASY (Cell Counter Casy Modell TTC, Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland). Die errechnete Menge der Zellsuspension wurde dann in das Chondromedium bzw. in das Kontrollmedium gegeben. Daraufhin erfolgte die Aussaat mit 500 µl pro Well nach Belegungsplan. Nach der Aussaat wurden die Platten bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden für jeden Versuch insgesamt sechs Platten vorbereitet. Die erste Platte enthielt nur ein Well mit 20.000 Zellen in Kontrollmedium für den MTT-Assay an Tag 0 des Versuches. Die Platten, die für eine RNA-Isolation vorgesehen waren, wurden, wie in Abb. 6A, dargestellt, behandelt. Ebenso wurden die Proben, die für einen Kollagen II ELISA am Tag 20 nach Aussaat vorgesehen waren, gemäß Abb. 6A ausgesät. Zur Durchführung einer RNA-Isolation an Tag 5 nach Aussaat wurden die Zellen in Doppelbestimmung ausgesät (Abb. 6B).

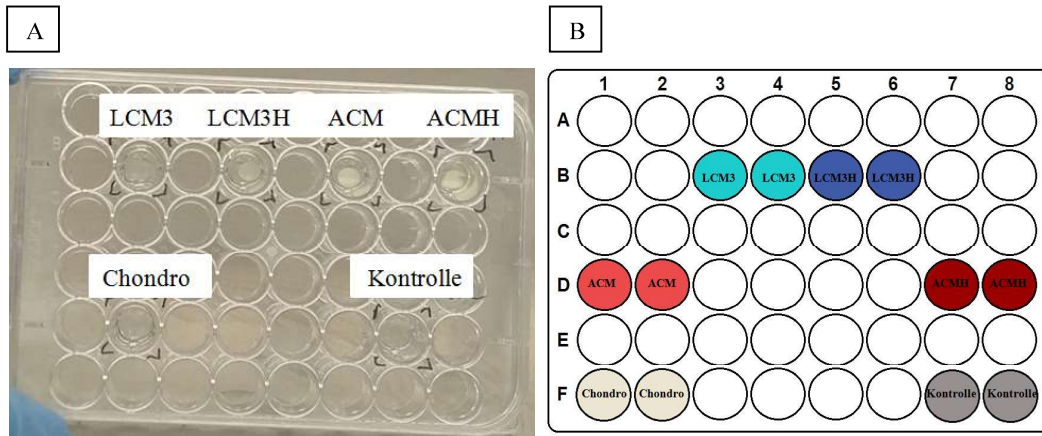


Abb. 6: Belegungspläne A: Polymere in der 48-Well-Platte B: Schematische Darstellung des Belegungsplanes mit Doppelbestimmung

Für einen MTT-Assay an Tag 5 nach der Aussaat wurden, zusätzlich zu der normalen Aussaat in Einfachbestimmung, die vier verschiedenen Materialien ausschließlich mit Chondromedium ohne Zellen inkubiert, um somit *Background* Scaffolds zur Auswertung des MTT-Assays zu erhalten (Abb. 7). An den Tagen 5, 10, 15 und 20 wurden mit dem Lichtmikroskop Bilder von den Zellkulturen angefertigt.

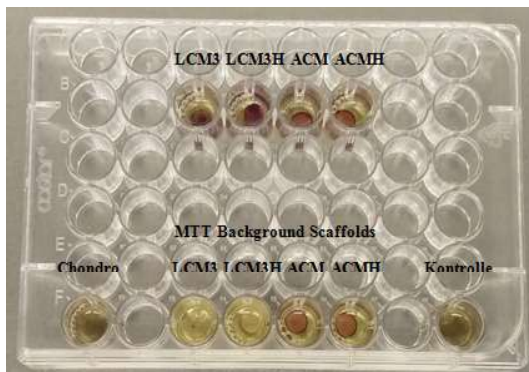


Abb. 7: Versuchsaufbau in der 48-Well-Platte mit MTT-Farbstoff nach 4 h Inkubation

### 2.1.6 Medien und Mediumswechsel

An den Tagen 3, 5, 7, 10, 14, 17 wurde das Medium gewechselt. Dafür wurde mit einer Pipette das inkubierte Medium abgesaugt und verworfen. Jenes vom Versuchstag 5 wurde für einen IL-6 ELISA bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurde das neue Medium in die Wells pipettiert.

Im Zuge der chondrogenen Differenzierung wurde die Zusammensetzung der Zelldifferenzierungsmedien über die Versuchszeit angepasst, sodass u. a. die Menge von Zellmedienbestandteilen zwischen Tag 0 bis Tag 17 der Versuche wechselt (Tab. 4). Zunächst wurde an Tag 5 der Versuche DMOG (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nicht mehr dem Differenzierungsmedium zugesetzt. An Tag 7 der Versuche wurde die Konzentration von fetalem Kälberserum (FBS) von 10 % auf 1 % reduziert. Zudem wurde die TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Laufe der Versuche reduziert. Im Kontrollmedium wurde ebenfalls an Tag 7 der Versuche die FBS-Konzentration von 10 % auf 1 % reduziert (Tab. 3).

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 (Sigma Aldrich) wurde entsprechend der Herstellerangaben in 10 milimolarer (mM) Citronensäure pH 3 gelöst. Zur Herstellung der Säure wurde Citronensäure Monohydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in destillierten Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die pH-Einstellung (pH-Meter Schott CG 820, Schott Instrumente GmbH, Mainz, Deutschland) unter Verwendung von Natriumhydroxid (Carl Roth GmbH + Co. KG). Anschließend erfolgte zweimal eine sterile Filtration (Millipore Express® PES Membrane Filter Unit 0,22  $\mu$ m, Merck Group, Tullagreen, Carrigtowohill, County Cork, Irland). In 20  $\mu$ l Citronensäure wurde 1  $\mu$ g TGF- $\beta$ 1 gelöst und bei -20 °C gelagert. Das rekombinante Protein BMP-2 (Thermo Fisher Scientific GmbH) wurde entsprechend der Herstellerangaben in 2 mM Essigsäure gelöst. Zu diesem Zweck wurde 100 % Essigsäure (Merck KGaA) mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Säure wurde daraufhin zweimal steril filtriert. Nach der Vorbereitung der Säure wurden 1  $\mu$ g BMP-2 in 10  $\mu$ l 2 mM Essigsäure gelöst und bei -20 °C gelagert.

**Tab. 2 Medien Zusammensetzung: MesenPro 20%**

Bezeichnung	Ansatz Stock	Endkonzentration
FBS MSC	-	20 %
Gentamicin/Amphotericin B 500x	5 mg/ml und 125 $\mu$ g/ml	0,2 %
Glutamin (100x) (CAPRICORN Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland)	-	1 %
MesenPro Supplement (Gibco, Fisher Scientific)	-	2 %
MesenPro RST <sup>TM</sup> Medium (Gibco, Fisher Scientific)	-	100 %

**Tab. 3 Medien Zusammensetzung: Kontrollmedium**

Bezeichnung	Ansatz Stock	Endkonzentration Tag 0–5	Endkonzentration Tag 5–17
FBS MSC	-	10 %	1 %
Gentamicin/Amphotericin B 500x	5 mg/ml und 125 µg/ml	0,2 %	0,2 %
Glutamin 100x	-	1 %	1 %
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose (Fisher Scientific GmbH)	-	88,8 %	97,8 %

**Tab. 4 Medien Zusammensetzung: Chondrogenes Differenzierungsmedium**

Bezeichnung	Ansatz Stock	Endkonzentration Tag 0–5	Endkonzentration Tag 5–7	Endkonzentration Tag 7–17
FBS	-	10 %	1 %	1 %
TGF-β1	Aliquot 2 µg in 40 µl Citronensäure	10 ng/ml	7,5 ng/ml	5 ng/ml
DMOG HIF Hydroxylase Inhibitor	Aliquot 50 mg in 1 ml DMSO	100 µM/l	0 µM/l	0 µM/l
BMP-2 Rekombinantes Protein	10 µg in 100 µl Essigsäure	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
ITS+ (Merck KGaA)	-	1 %	1 %	1 %
(+)Natrium-L- ascorbat (Sigma Aldrich, Merck KGaA)	10 mg/ml steril filtrieren	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
L-Proline (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)	10 mg/ml steril filtrieren	40 µg/ml	40 µg/ml	40 µg/ml
L-Glutamin (100x)	-	1 %	1 %	1 %
Dexamethasone (Merck KGaA)	1 mg/ml EtOH + 49 ml DMEM	100 nmol/l	100 nmol/l	100 nmol/l
Gentamicin/ Amphotericin B 500x	5mg/ml und 125µg/ml	0,2 %	0,2 %	0,2 %
DMEM Low Glucose	-	86,58 %	95,59 %	95,785 %

## 2.2 Molekularbiologie

### 2.2.1 RNA-Isolation

An den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15 wurden Zelllysate für eine RNA-Isolation hergestellt. Dafür wurde das Medium abpipettiert und anschließend die Wells dreimalig mit 500 µl PBS gewaschen. Nachfolgend wurden 750 µl Trizol (Life Technologies Inc., Thermo Fisher Scientific GmbH) in die jeweiligen Wells pipettiert. Nach 5 Minuten wurden die Lysate durch auf- und abpipettieren homogenisiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Pro Probe wurden 150 µl Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG) in die Tubes gegeben. Anschließend wurden diese für 15 Sekunden (s) stark geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 15 min bei 14.000 revolutions per minute (rpm) und  $15^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Zentrifuge Hettich Mikro 20, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), wodurch die einzelnen Phasen getrennt wurden. Darauffolgend wurde die obere, wässrige, durchsichtige Phase mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Tube überführt. Dabei wurde darauf geachtet, keine Kontamination mit der Interphase, einer milchigen Zwischenschicht, auszulösen. Die Volumina der durchsichtigen Proben wurden mit Hilfe einer Pipette bestimmt. Daraufhin wurde äquivalent zu den Volumina 70-prozentiger Ethanol zu den Proben hinzugegeben.

Die weiteren Schritte wurden mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Auf die im Kit enthaltene RNeasy Mini Säule wurden maximal 700 µl der mit Ethanol gemischten Proben gegeben und anschließend für 30 s bei 8000 *g-force* (g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Reste der Proben wurden auf die Spin Column pipettiert und ebenfalls zentrifugiert. Die jeweiligen Durchflüsse wurden verworfen. Anschließend wurde auf jede RNeasy Mini Säule zunächst 700 µl RW1 Puffer aufgetragen und für 30 s bei 8000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Spülschritte der RNeasy Mini Säule mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Nach dem Auftragen des RPE Puffers wurde einmal für 30 s und das andere Mal für 2 min bei 8000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach jedem Spülschritt wurde der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurden die Säulen in neue Tubes gestellt und für 1 min bei 18.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Schließlich wurde auf die Säulen je 30 µl RNase-freies Wasser aufgetragen und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, um sie schlussendlich für 1 min bei 8000 g und Raumtemperatur zu zentrifugieren. Die RNA-Konzentrationen der Eluate wurden mit dem Nanodrop®-Spectrophotometers (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen und diese vorerst bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits® (Qiagen) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für diesen Zweck wurde die isolierte RNA auf Eis aufgetaut. Zur Erlangung einer standardisierten RNA-Menge wurden die Proben mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Die Menge an RNA-freiem Wasser richtete sich nach den RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben, welche mittels Nanodrop®-Spectrophotometers bestimmt wurden. Im nächsten Schritt wurden 18 µl der verdünnten RNA-Proben mit 3 µl des im Kit enthaltenen gDNA Wipeout Puffers (Qiagen) vermischt. Zur genomischen DNA-Eliminierung wurden die Proben im Thermocycler (Bio-Rad iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) für 5 min bei 42 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Zur Transkription der komplementären DNA wurden 14 µl der von der genomischen DNA befreiten Proben mit 6 µl RT Mastermix gemischt und für 30 min bei 42°C inkubiert. Der RT Mastermix bestand aus 4 µl Quantiscript RT Puffer, 1 µl RT Primer Mix und 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, welche alle im Kit enthalten waren. Zur Inaktivierung der Reversen Transcriptase erfolgte schlussendlich noch eine Inkubation der Proben bei 95 °C für 3 min. Eine Negativkontrolle wurde hergestellt, indem statt der Reversen Transcriptase jeweils eine Probe mit RNase-freiem Wasser versetzt wurde, um somit den vollständigen Abbau der genomischen DNA kontrollieren zu können. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.3 *Real-time* Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Zum Vergleich der RNA-Menge spezifischer chondrogener Proteine wurde die *real-time* RT-PCR durchgeführt. Alle verwendeten Primer sind human und intronspannend (Tab.5). Bis auf den Primer RUNX2, bei dem LightCycler Fast Start DNA Master Plus

SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) als Mastermix verwendet wurde, wurde Quantifast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) als Mastermix benutzt.

**Tab. 5 Primer**

<b>Genprodukte</b>	<b>Gen Bank Accession number</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>	<b>Länge (Basenpaare, bp)</b>
<b>ACAN</b>	NM_001135	F:CGCCCATCAACAGAGACCTAC R:CGTGTGGCGAAGAACACCTC	74 bp
<b>B2M</b>	NM_004048.4	F:TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG R:CAACTTCAATGTCCGATGGA	135 bp
<b>COL1A1</b>	NM_000088.4	F:GCAAGAACCCCAAGGACAAG R:ATCAGGCGCAGGAAGGTC	130 bp
<b>COL2A1</b>	NM_001844	F:GAGCAGCAAGAGCAAGGAG R:TGTTGGGAGCCAGATTGTC	98 bp
<b>HAPLN1</b>	NM_001884.4	F:GAGTCTACTTCTTCTGGTGCTG R:AAACACCTTGGCTTGCTCTG	154 bp
<b>RUNX2</b>	NM_001015051	F:GGCCTTCAAGGTGGTAGCC R:ATCGTTACCCGCCATGACA	70 bp
<b>SOX9</b>	NM_000346	F:AGGTGCTCAAAGGCTACGAC R:GTAATCCGGGTGGTCCTTCT	281 bp
<b>TRPV4</b>	NM_021625	F:AGGTCATTACGCTCTTCACT R:CTGAGACGATCACCAGGACA	150 bp

Im ersten Schritt wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1 : 4 verdünnt. Der Reaktions-Mix Quantifast SYBR Green PCR Kit setzte sich für jede Probe aus 0,1 µl spezifischem Primer, 5 µl Mastermix und je nach verwendetem Primer aus 0,9 µl bzw. 5,9 µl Nuklease-freiem Wasser zusammen. Für die Primer ACAN und COL2A1 wurden 4 µl cDNA und 6 µl Reaktions-Mix verwendet. Für die restlichen Primer wurden 1 µl cDNA und 9 µl Reaktions-Mix verwendet. Bei der Verwendung des LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I als Mastermix wurden 2 µl des Mastermixes verwendet, 3,9 µl Nuklease-freies Wasser und 0,1 µl an spezifischem Primer (RUNX2).

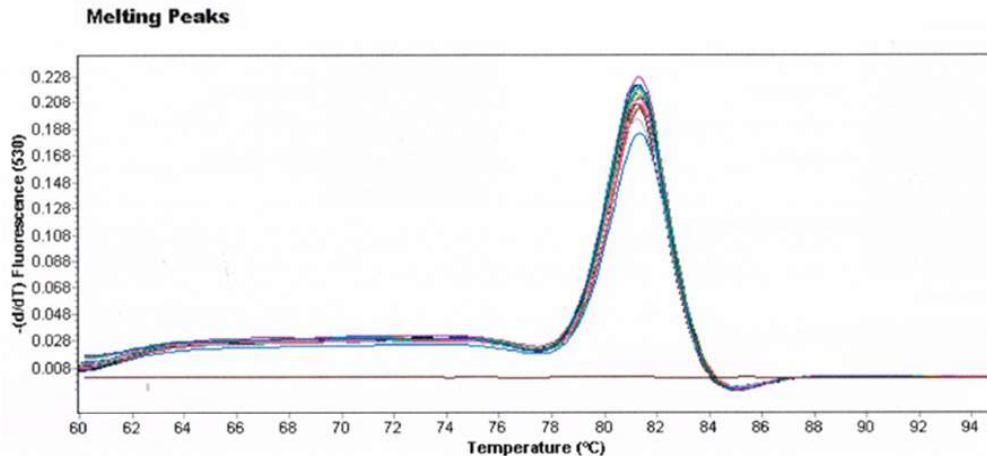
Nach der Vorbereitung des Reaktions-Mixes wurde dieser zunächst in die Glaskapillaren (Roche Diagnostics GmbH) vorgelegt. Im Nachfolgenden wurden die

restlichen Kapillaren mit den jeweiligen Proben in Doppelbestimmung bzw. für die interne Kontrolle in Dreifachbestimmung bestückt. Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Anschließend erfolgte die PCR nach Protokoll wie in Tab. 6 dargestellt im LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH) mit der LightCycler® Software Version 4.1, Roche. Die PCR-Protokolle unterscheiden sich nach verwendetem Mastermix in Bezug auf die Zeit und die Temperatur (Tab. 6). Im Anschluss an das PCR-Protokoll erfolgte die Erstellung einer Schmelzkurve (Abb. 8).

**Tab. 6 Standardisiertes *real-time* PCR-Protokoll**

Schritt	Quantifast SYBR Green PCR Kit			LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I		
	Zeit s	Temperatur °C	Zyklen	Zeit s	Temperatur °C	Zyklen
Denaturierung	300	95	1x	600	95	
Denaturierung	10	95		5	95	
Hybridisierung (Annealing)	30	60	40x	5	56	40x
DNA-Polymerisation (Elongation)				5	72	
Schmelzkurve	15	95	1x	15	95	1x
		60			60	
		95			95	

Die resultierenden CT-Werte (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus) entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die durchlaufen wurden, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen (Pfaffl, 2001). Anschließend wurden die Messwerte mit einem Referenzgen, Beta2-Mikroglobulin (B2M), normalisiert.



**Abb. 8: Schmelzkurven der *real-time* RT-PCR**

Die untersuchten Proben zeigen als Schmelzpunktkurven ein gemeinsames Maximum bei 81,5 °C bei dem untersuchten Referenzgen B2M. Die lineare Probe stellt die Negativkontrolle in Form von Nuklease-freiem Wasser dar.

#### 2.2.4 Kollagen II Elektrophorese

Mit QIAxcel® - Pure Excellence (Qiagen) wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben der Kollagen II-PCR-Produkte eines durchgeführten Versuches mit dem QIAxcel Advanced System (Qiagen) und der QIAxcel ScreenGel Software untersucht. Dafür wurde die vorbereitete Kartusche des QIAxcel DNA Fast Analysis Kit (Qiagen) in dem Gerät platziert. 10 µl der PCR-Produkt Samples mit 5 µl RNase-freiem Wasser wurden in das Instrument pipettiert und schließlich mit der Software die Elektrophorese-Ergebnisse erstellt.

#### 2.2.5 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay (Sigma Aldrich, Merck KGaA) wurde die metabolische Aktivität der Zellen verglichen. Dieser wurde 2 h nach Versuchsstart, sowie an Tag 5 der Versuche, durchgeführt. Als Proben wurden an Tag 5 sowohl die Zellen im Kontrollmedium, die Zellen im Differenzierungsmedium, die Zellen im Differenzierungsmedium und den jeweiligen Materialien, als auch die reinen Zellkulturmedien mit Materialien, aber ohne Zellen verwendet. Zunächst wurde der MTT-Farbstoff (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid*) licht-

geschützt aufgetaut und anschließend durch Schütteln gemischt. In kreisförmigen Bewegungen wurden 50 µl MTT-Farbstoff in die Medien der jeweiligen Wells pipettiert, woraufhin diese sich gelblich verfärbten. Daraufhin wurde die Well-Platte für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand mit einer Pipette abgesaugt und 500 µl MTT-Lysis-Puffer in die Wells pipettiert. Daraufhin wurde die 48-Well-Platte auf Eis für 10 min geschüttelt, wodurch ein Farbumschlag zu lila sichtbar wurde. Nach sorgfältigem Mischen mit einer Pipette wurden 200 µl der lilafarbigen Proben in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte (CELLSTAR®, 96 Well Cell Culture Plate, sterile, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Als Blindwert wurden 200 µl MTT-Lysis-Puffer verwendet. Schließlich wurde die Absorption im Plattenreader (Microplate Reader Synergy HT, BioTek Instruments GmbH, Winooski, Vermont, USA) mit dem Programm Gen 5™ (BioTek Instruments GmbH) bestimmt. Zur Auswertung der Ergebnisse erfolgte zunächst die Bildung einer Differenz zwischen den Zellen an den Materialien und den zugehörigen *Background Scaffolds*, um somit ausschließlich die optische Dichte (*optical density*, OD) der Zellen zu erhalten.

#### 2.2.6 Interleukin-6 *enzyme-linked immunosorbent assay*

Zur Bestimmung der Menge von IL-6 in den Proben wurde ein IL-6 spezifischer ELISA (Quantikine ELISA Human IL-6, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet. Die untersuchten Proben waren die jeweiligen Medien von den vier Kulturen in Kontakt zu den verschiedenen Materialien und das Medium der Zellen mit Differenzierungsmedium ohne Materialkontakt von Tag 5. Es wurden die Medien von sechs knochengesunden (ZK 137, ZK 108, ZK 162, ZK 168, ZK 170, ZK 124) Spender-Zelllinien untersucht.

Als Positivkontrollen diente ein Standard (Quantikine Immunoassay Control Group 1, R&D Systems), das Zellmedium von Morbus Sudeck Zellen (Articulatio mediocarpalis P 2, human) und die Zellmedien von Zellen (ZK 164 P 10), die mit 7,5 µl Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung (Fisher Scientific GmbH) für 1 h, für 4 h und für 24 h kultiviert wurden. Die humanen Morbus Sudeck Zellen aus Articulatio mediocarpalis P2 wurden bereits in anderen Arbeiten der Experimentellen Unfallchirurgie Gießen verwendet und ihre Nutzung wurde im Ethikantrag unter AZ:117/14 im Juni 2014 von

der Justus-Liebig Universität Gießen bewilligt. Diese wurden aufgetaut und in einem Medium aus 20 % FBS Gold (PAA, Cölbe, Deutschland), 1 % Penicillin-Streptomycin (PAN Biotech), 1 % Glutamin und 78 % DMEM High Glucose (Fisher Scientific GmbH) in eine Zellflasche ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium der Zellen eingefroren und die Fibroblasten erneut eingefroren. Für eine weitere Positivkontrolle wurden Zellen von ZK 164 P 10 in einem Kontrollmedium ausgesät. Dieses bestand aus 1 % FBS, DMEM Low Glucose und 1 % Gentamicin/Amphotericin B. Zu jeweils 20.000 Zellen mit 742,5 µl Kontrollmedium wurde 7,5 µl LPS hinzugegeben. Dafür wurde zuvor 1 mg LPS in 1 ml Kontrollmedium gelöst. Die Zellen, die für 24 h mit LPS gereizt wurden, wurden mit dem LPS im Medium eingefroren, während bei den anderen beiden Gruppen das Medium mit einer Pipettenspitze nach 1 bzw. 2 h abgenommen wurde und nach dreimaligem Waschen mit PBS neues Kontrollmedium in die Wells pipettiert wurde und das neue Medium nach 23 h bzw. 22 h bei -80 °C eingefroren wurde.

Zunächst wurden die Proben auf Eis aufgetaut, durch Schütteln gemischt und bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es folgte die Ansetzung der Standardreihe durch die schrittweise Verdünnung von der mitgelieferten Standard-Stammlösung mit Reagenzverdünnungsmittel nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden 100 µl Assay-Verdünnungsmittel RD1W in alle Wells mit Hilfe einer Multipipette verteilt. In die erste Spalte wurde die Standardreihe mit je 100 µl pipettiert. Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 40 verdünnt, indem 97,5 µl PBS und 2,5 µl der jeweiligen Probe in die Wells verteilt wurden. Als Negativkontrolle bzw. Blindprobe wurde 100 µl PBS verwendet. Schließlich wurde die Platte für 2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand dekantiert und viermal die Wells mit 100 µl Waschpuffer gewaschen und mittels behutsamen Ausklopfens überschüssige Flüssigkeit entfernt. In die Wells wurden jeweils 200 µl des enzymmarkierten Antikörpers Human-IL-6 pipettiert und erneut wurde die Wellplatte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin abermals viermal gewaschen. Danach wurden 200 µl einer Substratlösung in jedes Well gegeben, sodass sich die Lösung bläulich verfärbte.

Nach Inkubation von über 20 min bei Raumtemperatur wurde 50 µl Stop Lösung in jedes Well pipettiert, sodass ein Farbwechsel von blau zu gelb eintrat und die Reaktion

beendet wurde. Die Extinktion wurde im Platten-Reader bei 405 nm gemessen und eine Korrekturmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt.

### 2.2.7 Kollagen II *enzyme-linked immunosorbent assay*

Für die Quantifizierung von Kollagen Typ II in den Zellhomogenaten der Proben wurde ein Kollagen II spezifischer ELISA (abbexa, Cambridge, Großbritannien) benutzt. Die Zelllysate wurden hierfür an Versuchstag 20 mit Papain (Stemcell, Vancouver, Kanada) geerntet. Dafür wurden an Tag 20 die Wells, nach Entnahme der Zellmedien, dreimalig mit je 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 220 µl der Papain-Lösung (1 mg/ml in 1 mM EDTA-Lösung (Versene, Gibco, Thermo Fisher Scientific GmbH)) hinzugegeben, um die Zellen zu lösen. Zu der Lösung wurden 500 µl 4 °C kaltes PBS pipettiert. Die Suspensionen wurden in bruchsichere 2 ml fassende Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert, sodass sich die Zellen am Boden absetzten. Der Überstand wurde mit einer Pipette entnommen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 1 ml PBS und nachfolgender Zentrifugation und Abnahme des Überstandes. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und die Zellwände in einer Schwingmühle (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) durch eine Mahlkugel (Mahlkugeln Zirkonoxid, Labor- und Krankenhausbedarf Marburg, Marburg, Deutschland) bei einer Frequenz von 30/s für 1 min zermahlen. Anschließend wurden die Proben in einem Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) für 5 min homogenisiert. Als Positivkontrolle wurden *Human Embryonic Kidney Zellen* (HEK-293) P 14 verwendet. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus der Niere eines humanen, abgetriebenen Fötus gewonnen und in dem Labor der Universität Leiden in Holland in den 1970er Jahren kultiviert. In die HEK-Zellen wurden in den publizierten Versuchen von Frank Graham DNA-Fragmente des humanen Adenovirus 5 transferiert. Den Zusatz 293 erhielt die Zelllinie, da es das 293. Experiment darstellte (Graham et al., 1977). Diese wurde nach dem Auftauen in Medium aus 10 % FBS MSC, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Glutamin und 88 % DMEM Low Glucose kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und die Reaktion mit FBS abgestoppt. Der Hauptteil der Zellen wurde erneut eingefroren, während 20.000 Zellen nach mehrfachen Zentrifugations- und Waschschrten mit PBS

in der Schwingmühle zerkleinert wurden und im Ultraschallbad homogenisiert wurden. Die Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese durch Schütteln gemischt und anschließend bei  $1000\text{ g}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für  $20\text{ min}$  zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde der im Kit beinhaltete lyophilisierte Standard vorbereitet, indem dieser mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  Standard Verdünnungspuffer verdünnt,  $10\text{ min}$  inkubiert und schließlich durch Schütteln gemischt wurde. Aus diesem ( $3000\text{ pg/ml}$ ) wurde die Standardreihe durch schrittweise Verdünnung nach Herstellerangabe hergestellt. In die erste Spalte wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  der Standardreihe verteilt und als Negativkontrolle bzw. Blindprobe  $100\text{ }\mu\text{l}$  PBS verwendet. Anschließend erfolgte die Vorlage von  $95\text{ }\mu\text{l}$  PBS in die restlichen Wells der mitgelieferten 96-Well-Platte und jeweils  $5\text{ }\mu\text{l}$  der einzelnen Zellysate. Daraufhin wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und für  $1\text{ h}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Detektionsreagenz A nach Herstellerangabe angesetzt durch Verdünnung der im Kit enthaltenen Detektionsreagenz A mit Verdünnungspuffer A. Nach der Inkubation wurde der Überstand der Platte dekantiert und auf sauberen trockenen Papiertüchern vorsichtig abgeklopft. Anschließend wurden in jedes Well  $100\text{ }\mu\text{l}$  Reagenz A zu jedem Well gegeben, wonach die Platte erneut mit einer Folie abgedeckt und für  $1\text{ h}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurde. Während der Inkubationszeit wurde nach Herstellerangaben Detektionsreagenz B mit Verdünnungspuffer B verdünnt. Daraufhin erfolgte wieder das Dekantieren des Überstandes von der Platte und dreimalig eine Waschung mit anschließendem vorsichtigem Abklopfen gegen Papiertücher. Schließlich wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  der Reagenz B in jedes Well gegeben und die Platte erneut für  $1\text{ h}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Erneut wurde die Lösung von der Platte dekantiert und fünfmalig gewaschen. Es folgte die Zugabe von  $90\text{ }\mu\text{l}$  3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Substrat zu jedem Well und eine erneute Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für  $30\text{ min}$ . Daraufhin zeigte sich ein blauer Farbumschlag der vorher farblosen Lösung. In jedes Well wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  einer Stop- Lösung hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Erneut war ein Farbumschlag diesmal von blau zu gelb sichtbar. Die Absorption wurde bei  $450\text{ nm}$  im Plattenreader gemessen.

### 2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Kruskal-Wallis- und des Bonferroni-post hoc-Tests mit der Software SPSS (V25, Institut Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Es erfolgte eine Überprüfung der Werte auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei Annahme einer Normalverteilung im Kolmogorov-Smirnov-Test wurde nach signifikantem Manchly-Test, der als allgemeines, lineares Modell für Messwiederholungen steht, der T-Test für paarweises Testen mit verbundenen Stichproben angewendet. Wenn keine Normalverteilung vorlag, erfolgte anschließend die zweifaktorielle Varianzanalyse für Ränge nach Friedman bei verbundenen Stichproben.

Die Stichprobengröße umfasste stets  $n = 6$ . Die Ergebnisse wurden als Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Kastengrafik umfasst ein Rechteck auch Box genannt und zwei Linien, welche als Fühler oder Whiskers bezeichnet werden, welche die Verlängerungen des Rechtecks darstellen. Die Box beinhaltet 50 % der Daten, wobei die Länge des Rechtecks durch das obere und untere Quartil bestimmt wird. Somit entspricht die Länge der Box dem Interquartilsabstand, da sich dieser aus dem Abstand zwischen dem 3. und 1. Quartil ergibt. Das 3. Quartil bzw. obere Quartil ist der obere Rand des Rechtecks und repräsentiert 75 % der Daten, welche  $\leq$  diesem Wert sind. Die untere Begrenzung der Box stellt das 1. Quartil dar und somit befinden sich unter diesem Bereich 25% der Daten, welche  $\leq$  diesem Wert sind. Durch die Box läuft ein waagrechter Strich, der den Median darstellt. Die Fühler zeigen minimale und maximale Daten, welche unter dem 1,5-fachen Interquartilsabstand liegen. Ausreißer, welche sich über dem 1,5-fachen und unter dem 3-fachen Interquartilsabstand befinden, wurden graphisch gesondert als Kreise dargestellt und Extremwerte, welche sich über dem 3-fachen Interquartilsabstand befinden, werden durch Sternchen abgebildet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p (\leq) 0,05$  festgelegt (\*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ ) und in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet. Ausreißer wurden mit Kreisen (°) markiert und Sterne (\*) stehen für Extremwerte, beides in der jeweiligen Farbe der zugehörigen Box.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellmorphologie

#### 3.1.1 Lichtmikroskopischer Vergleich zwischen Kontrolle und Chondro

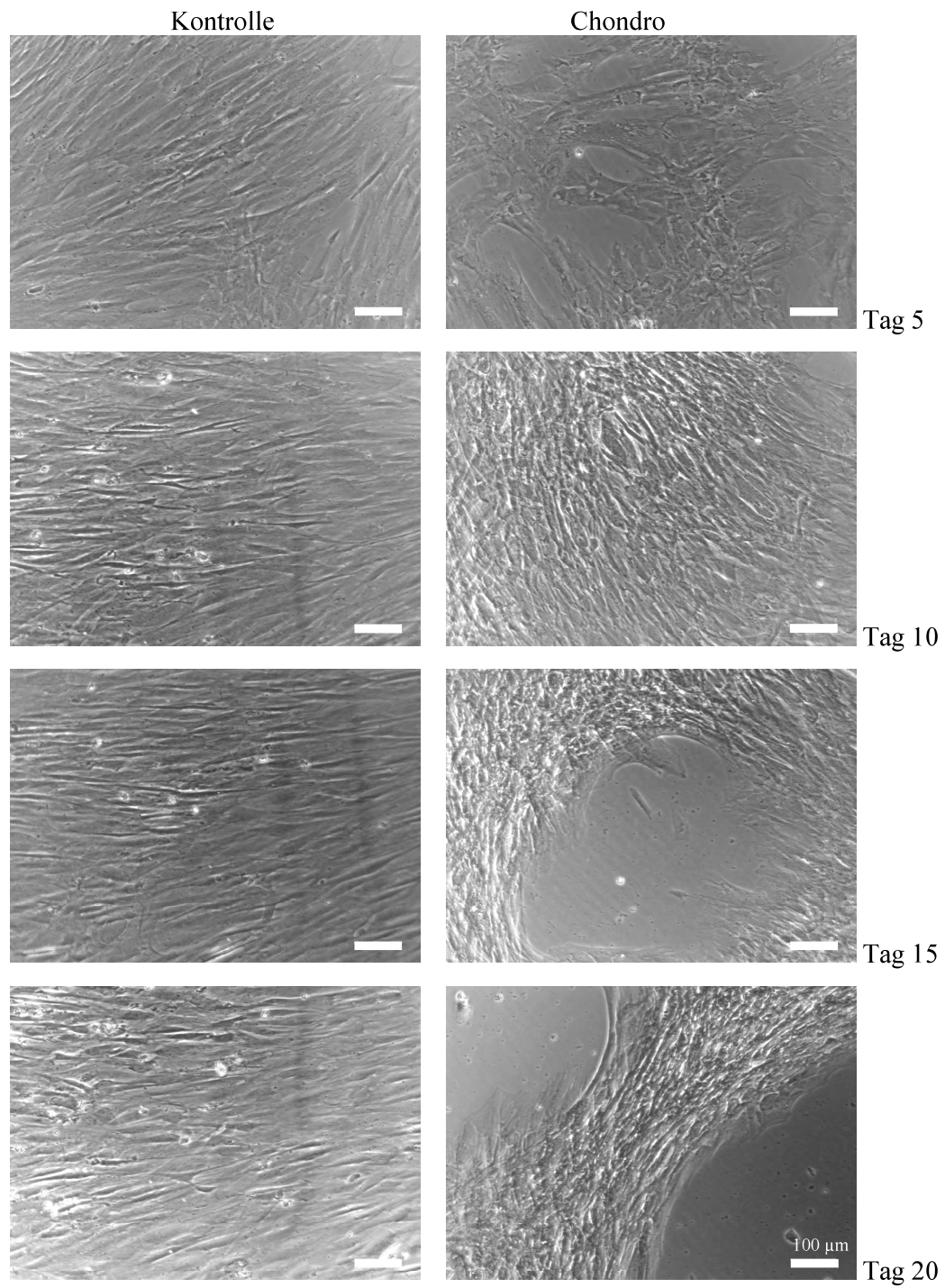
Während des Versuchszeitraumes wurde an den Tagen 5, 10, 15 und 20 die Vitalität und die morphologischen Veränderungen lichtmikroskopisch untersucht und mit Fotos in 10-facher (Abb. 9) und 32-facher Vergrößerung (Abb. 10) festgehalten.

An Tag 5 der Kultivierung haben die hMSC in Kontrollmedium eine typische Haarnadelstruktur ausgeformt. Die Zellen lagen eng aneinander, ihre Form war länglich und sie waren bipolar gestreckt. Im Vergleich dazu entstanden bei hMSC in chondrogenen Differenzierungsmedium freie Flächen in den Zellgruppen. Die Ausläufer der Ränder sahen transparent, durchscheinend aus. Zentrale Stellen reflektierten verstärkt das Licht. Einzelne Zellen waren schwer voneinander abgrenzbar. Die Zellen hatten einen polygonalen Umriss.

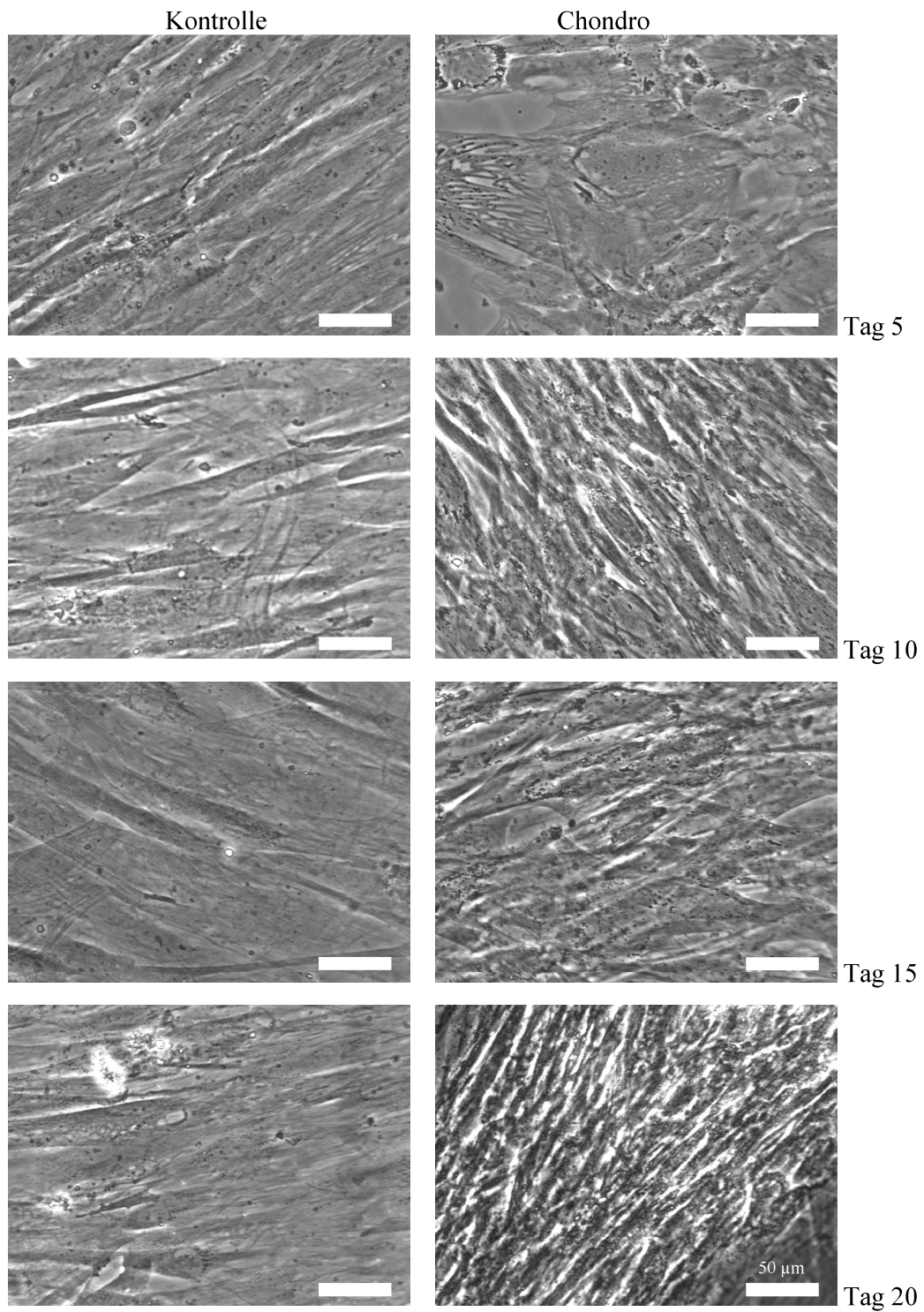
Die Zellen der Kontrolle waren an Tag 10 weiterhin lang auslaufend, schmal und dicht aneinander gereiht. Chondro nahm inzwischen auch deutlich mehr Fläche im Well ein. An den Rändern solcher Gruppierungen waren weiterhin durchscheinende Ausläufer erkennbar, während der Rest sehr massiv erschien. Die Zellabgrenzung war zunehmend erschwert. Der Raum zwischen den Zellen war stark gefüllt.

An Tag 15 nahmen die Licht-reflektierenden Vesikel in der Kontrollgruppe zu. Die Zellen lagen weiterhin dicht aneinander und formten die typische Haarnadelstruktur aus. Eine zunehmende Formierung der Zellen in Chondromedium in großen Kreisen konnte beobachtet werden.

Die Vitalität der Zellen der Kontrolle schien an Tag 20 zunehmend abzunehmen. Die Zellen wirkten verschmälert, mit zunehmend weiteren Vesikeln, welche ein Anzeichen für Apoptose sein könnten. In den Bereichen, wo besonders viele Vesikel das Licht reflektierten, waren die Zellen schwer abgrenzbar. Chondro zeigte im Vergleich weiterhin keine Vesikel. Die Zellen reflektierten das Licht stark und große Zellanhäufungen hatten sich in kreisartigen Strukturen formiert.



**Abb. 9: Die zellmorphologische Entwicklung der Kontrolle und Chondro anhand der ZK 137 P 11 in 10-facher Vergrößerung von Tag 5–20**

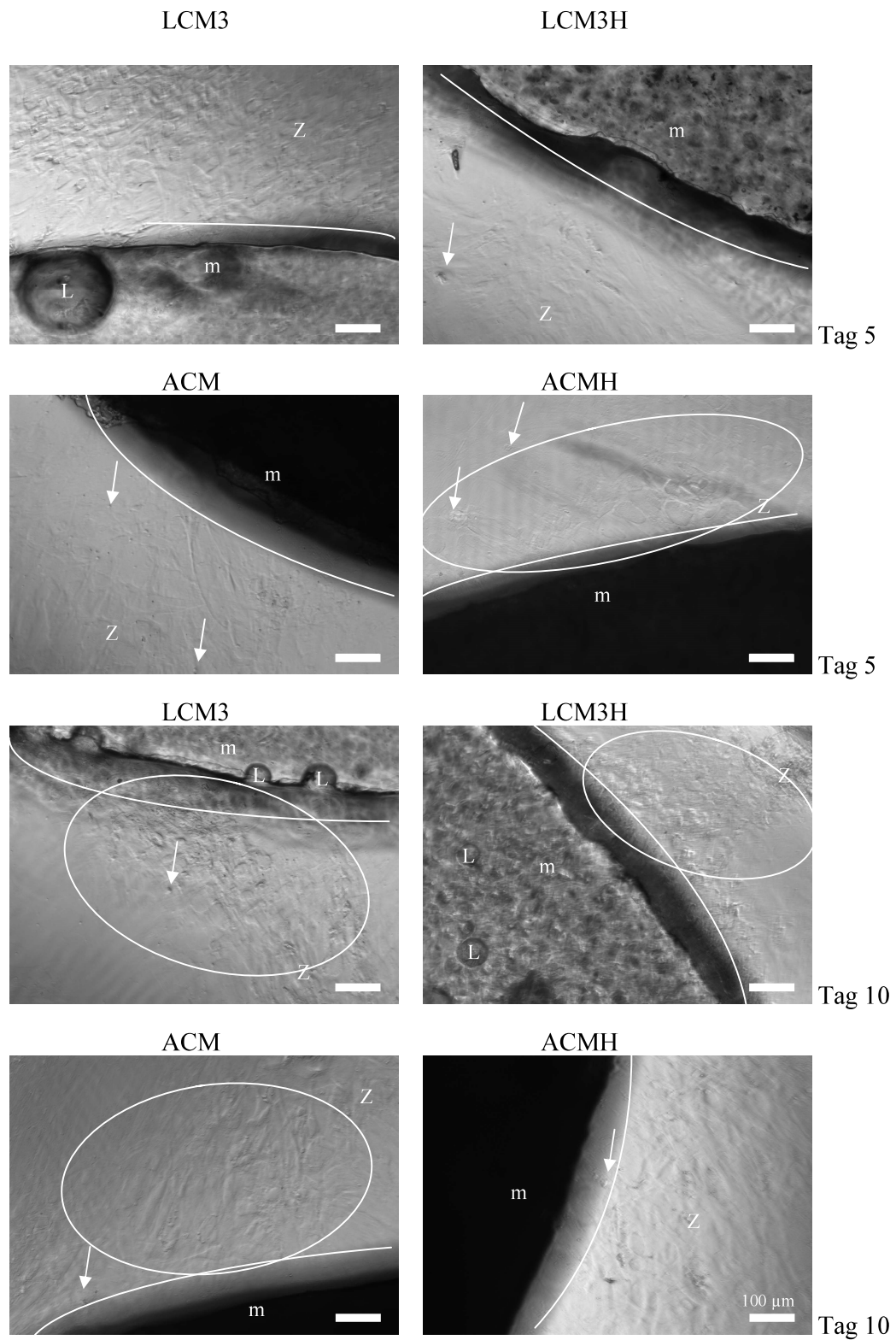


**Abb. 10: Die zellmorphologische Entwicklung der Kontrolle und Chondro anhand der ZK 137 P 11 in 32-facher Vergrößerung von Tag 5–20**

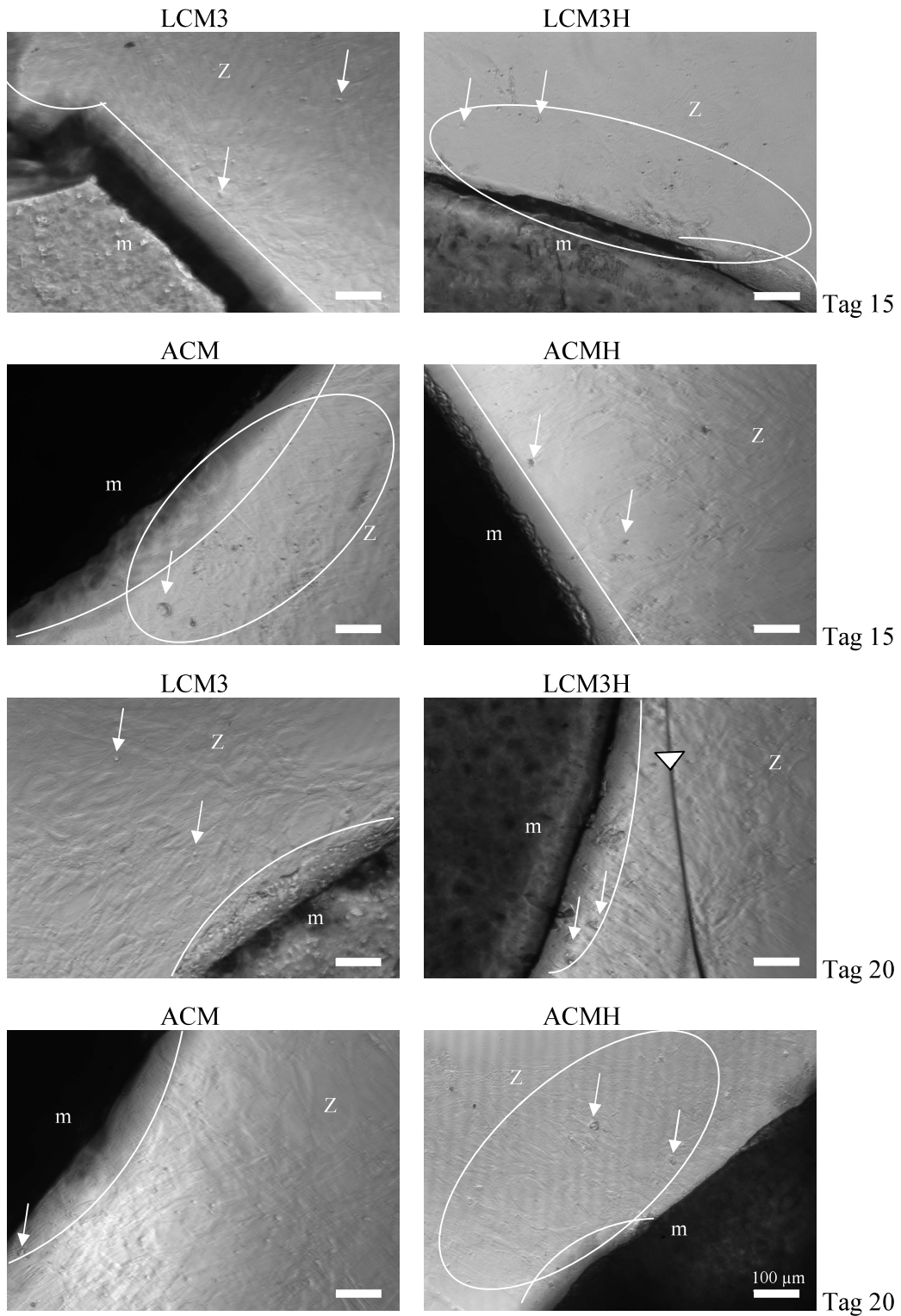
### 3.1.2 Chondrogene Zellmorphologie an den Polymeren

Ebenfalls wurde an den Tagen 5, 10, 15 und 20 die Vitalität und die morphologischen Veränderungen der Zellen an den Polymeren lichtmikroskopisch untersucht und mit Fotos in 10-facher (Abb. 11) und 32-facher Vergrößerung (Abb. 12) festgehalten.

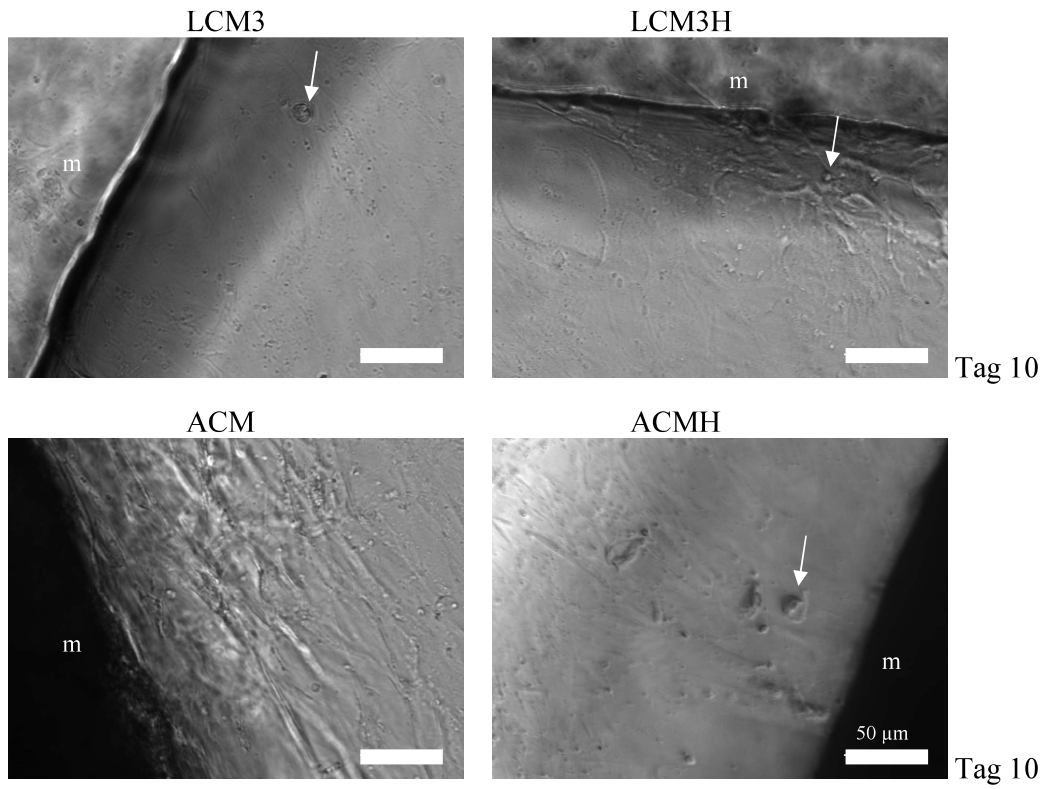
Im Vergleich zu ACM war LCM3 lichtdurchlässiger im Lichtmikroskop, sodass unter anderem Unregelmäßigkeiten im Materialaufbau wie "Luftblasen" erkennbar waren. Auch ließen sich unter dem Mikroskop weitere Unregelmäßigkeiten wie bspw. feine Ausläufer von den Materialien erkennen, die in das Well als feine Fädchen hineinragten. ACM zeigte sowohl mit und ohne Heparinbeschichtung eine dunkle Grenzfläche zu den Zellen, sodass die Polymere ACM und ACMH sich im Lichtmikroskop schlicht schwarz darstellten. Trotz der helleren Darstellung der LCM3 Polymere konnten die Zellen, die sich auf und unter dem Material befanden nicht abgrenzbar eingestellt werden. Das hatte zur Folge, dass sich eine Beurteilung der Zellen auf jene beschränkt, die an den Grenzen zu den Materialien sichtbar und abgrenzbar waren und auf jene Wenige in der Peripherie. Direkt an den Randbereichen der Polymere waren die Zellen auf Grund von Schattenbildung durch die Ronden schwer im Bild darzustellen. In der 32-fachen Vergrößerung waren diese Bereiche besser abbildbar. Im Versuchszeitraum konnte bei allen Materialien beobachtet werden, dass sich kaum Zellen entfernt von den Materialien ansiedelten. Ausläufer von Zellen, welche weiter in der Peripherie vorkamen, sahen durchscheinender aus. Zellen, die direkt an den Materialien waren, schienen mehr Substanz zu haben, wobei sich die visuelle Darstellung der Zellen auf Grund der Lichtbrechung neben dem Material sich als schwierig darstellte. In Kontakt zu allen vier Materialien zeigten die Zellen im direkten Kontakt zu den Materialien eine Art Verdichtungszone. Weiter in der Peripherie wirkten die Zellen transparenter und durchscheinender. Zellkerne ließen sich bei allen Materialien gut erkennen. Vesikel, die ein Anzeichen für Apoptose sein könnten, konnten keine dargestellt werden. In den Abbildungen sind vereinzelt Zellkerne markiert, um die im nicht bewegten Bild dargestellten Zellen besser hervorzuheben.



**Abb. 11.1: Chondrogene Differenzierung an den Polymeren in 10-facher Vergrößerung anhand der ZK 124 P 11 Tag 5 und 10** m: Material, Z: Zellen, Pfeile: Zellkerne; Ellipse: Verdichtungszone, L: "Luftblasen", weiße Linien: Schatten durch Polymere



**Abb. 11.2: Chondrogene Differenzierung an den Polymeren in 10-facher Vergrößerung anhand der ZK 124 P 11 an Tag 15 und 20** m: Material, Z: Zellen, Pfeile: Zellkerne, Ellipse: Verdichtungszone, weiße Linien: Schatten durch Polymere, Dreieck: Polymerfaden von der Ronde ausgehend

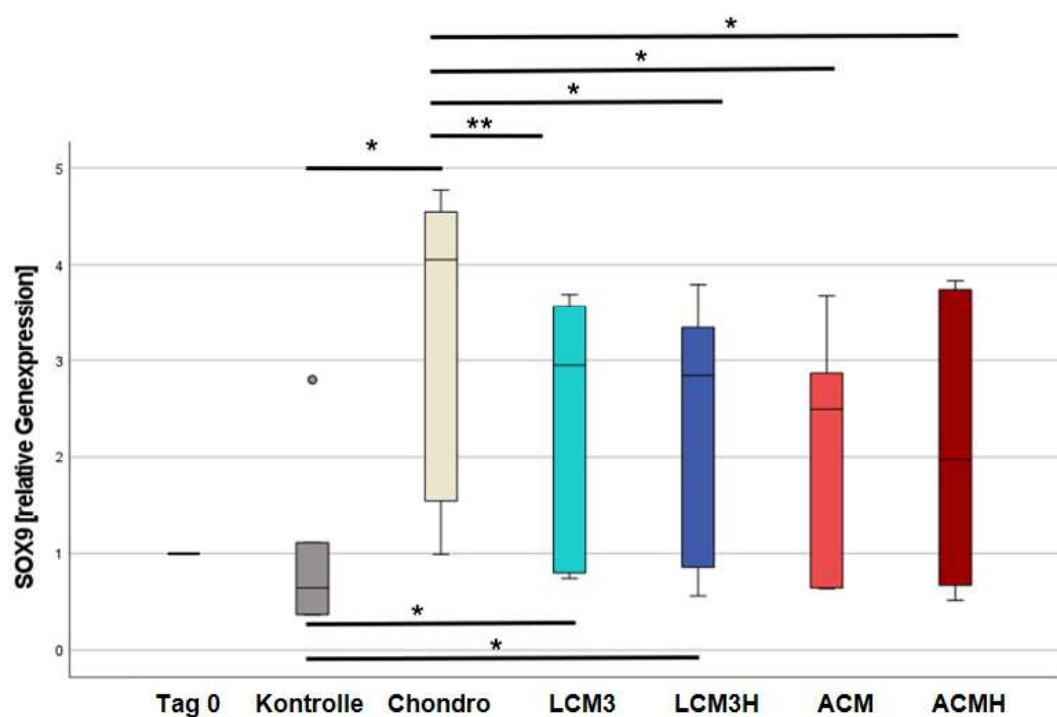


**Abb. 12: Zell-Polymerkontakt in 32-facher Vergrößerung an Tag 10 dargestellt an der ZK 170 P 8**  
 m: Material, Pfeile: Zellkerne

## 3.2 Real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

### 3.2.1 SOX9

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden die Zellen von Tag 0 zum Normieren der Werte verwendet. Dieser Wert entspricht stets dem Wert eins. Im Vergleich zum Kontrollmedium war die SOX9 mRNA-Expression der Zellen an Scaffolds aus LCM3 ( $p = 0,029$ ) und LCM3H ( $p = 0,031$ ) signifikant erhöht. Zellen ohne Materialkontakt präsentierten eine noch höhere mRNA-Expression, sodass auch signifikante Unterschiede zwischen den Zellen ohne Materialkontakt und mit Chondromedium im Vergleich zu LCM3 ( $p = 0,03$ ), LCM3H ( $p = 0,04$ ), ACM ( $p = 0,012$ ) und ACMH ( $p = 0,027$ ) bestehen. Im Vergleich der SOX9 Expression in den Materialgruppen untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Kontrolle zeigte bei ZK 170 P 8 einen Ausreißer (Abb. 13).

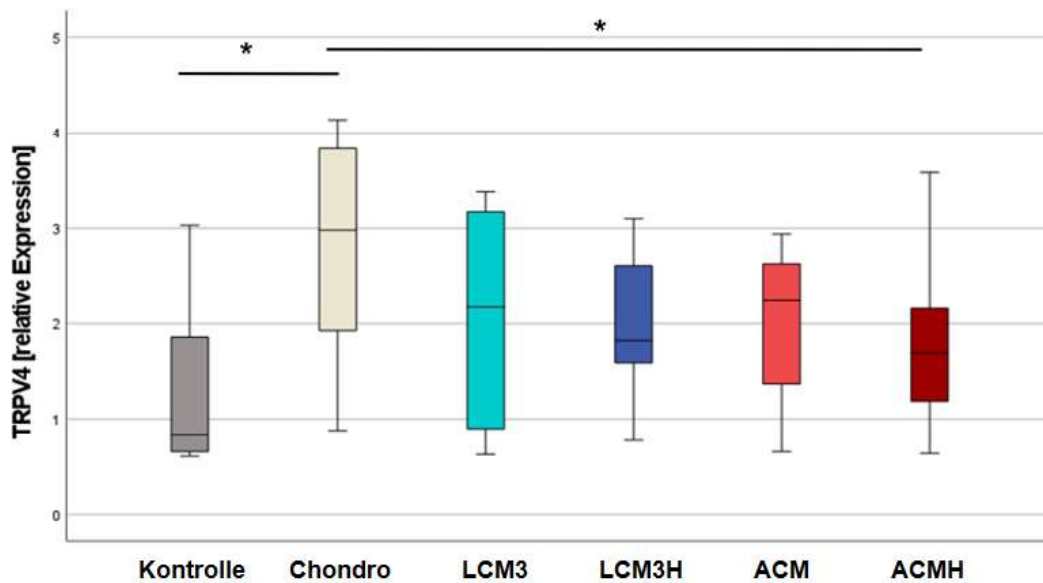


**Abb. 13: Relative Genexpression von SOX9 in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (T-Test mit verbundenen Stichproben) der mRNA von SOX9 der einzelnen Zellgruppen an Tag 5 der Differenzierung. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$

### 3.2.2 TRPV4

Die mRNA-Expression der Zellen mit Differenzierungsmedium und ohne Materialkontakt Chondro war signifikant höher als die der Zellen in reinem Kontrollmedium ( $p = 0,017$ ). Zellen mit Materialkontakt zu Scaffolds aus ACMH zeigten eine geringere mRNA-Expression als Zellen in reinem chondrogenen Differenzierungsmedium ( $p = 0,037$ ). Zwischen den Materialien bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Maximalwerte entstammen bei allen Gruppen der ZK 170 P 8 (Abb. 14).

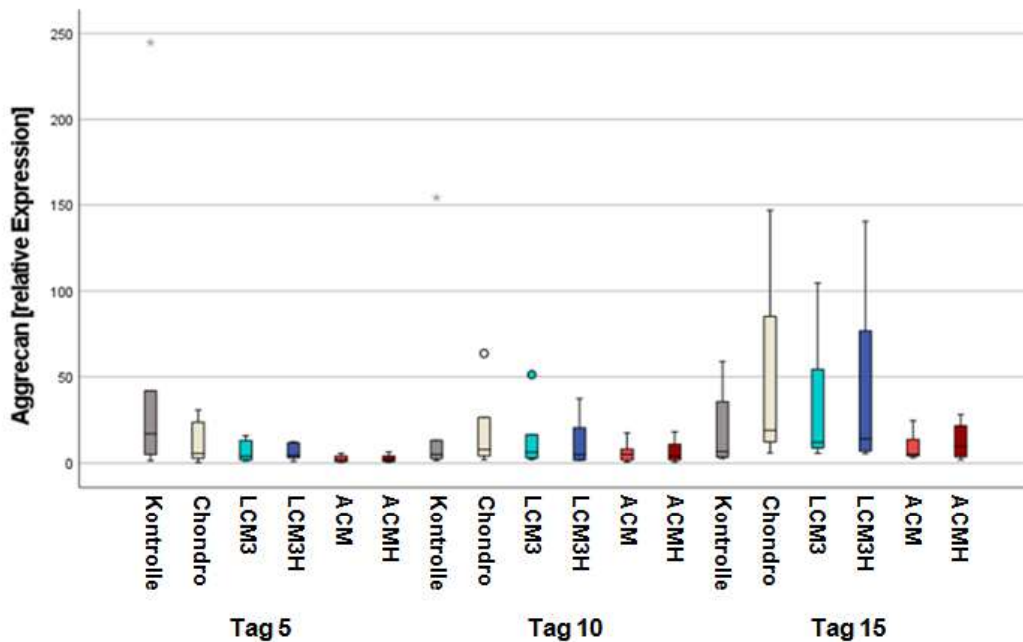


**Abb. 14: Relative Genexpression von TRPV4 in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (T-Test mit verbundenen Stichproben) der mRNA von TRPV4 der einzelnen Zellgruppen an Tag 5 der Differenzierung. \*  $p \leq 0,05$

### 3.2.3 ACAN

Die mRNA-Expression von ACAN wurde an den Versuchstagen 5, 10 und 15 gemessen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Der Median von Chondro befand sich an Tag 5 der Differenzierung noch unter jenem von der Kontrolle. An Tag 10 und 15 lag dieser über dem Median der Kontrolle. Am Tag 15 waren auch die Mediane der Polymere LCM3, LCM3H und ACMH über dem Median der Kontrolle. Die Kontrolle zeigte sowohl an Tag 5 wie auch an Tag 10 einen Extremwert in der Gruppe von ZK 168 P 9. An Tag 10 fand sich sowohl bei Chondro als auch bei LCM3 ein Ausreißer ebenfalls bei ZK 168 P 9. Ebenso entstammten die Maximalwerte an Tag 15 aus der Untersuchung von ZK 168 P 9 (Abb. 15).

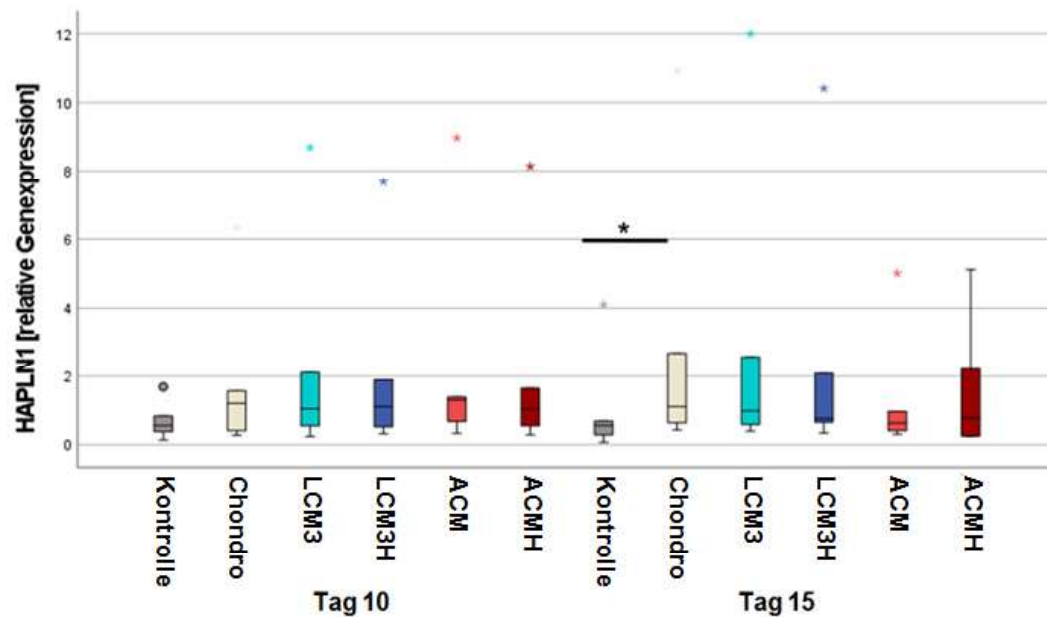


**Abb. 15: Relative Genexpression von ACAN in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (Friedman-Test) der mRNA von ACAN der einzelnen Zellgruppen an Tag 5, Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung.

### 3.2.4 HAPLN1

An den Tagen 10 und 15 wurde die HAPLN1-Expression untersucht. Am Versuchstag 15 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der chondrogenen Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt und der Kontrollgruppe ( $p = 0,022$ ). Bei HAPLN1 befanden sich die Mediane von Chondro und allen Polymermaterialien an beiden Tagen über dem Median der Kontrolle. An Tag 10 ließ sich bei der Kontrolle ein Ausreißer und bei Chondro, LCM3, LCM3H, ACM und ACMH Extremwerte in der Gruppe ZK 170 P 8 feststellen. Auch an dem untersuchten Tag 15 waren Extremwerte in der Kontrolle, Chondro, LCM3, LCM3H und ACM bei der Gruppe ZK 170 P 8 feststellbar (Abb. 16).

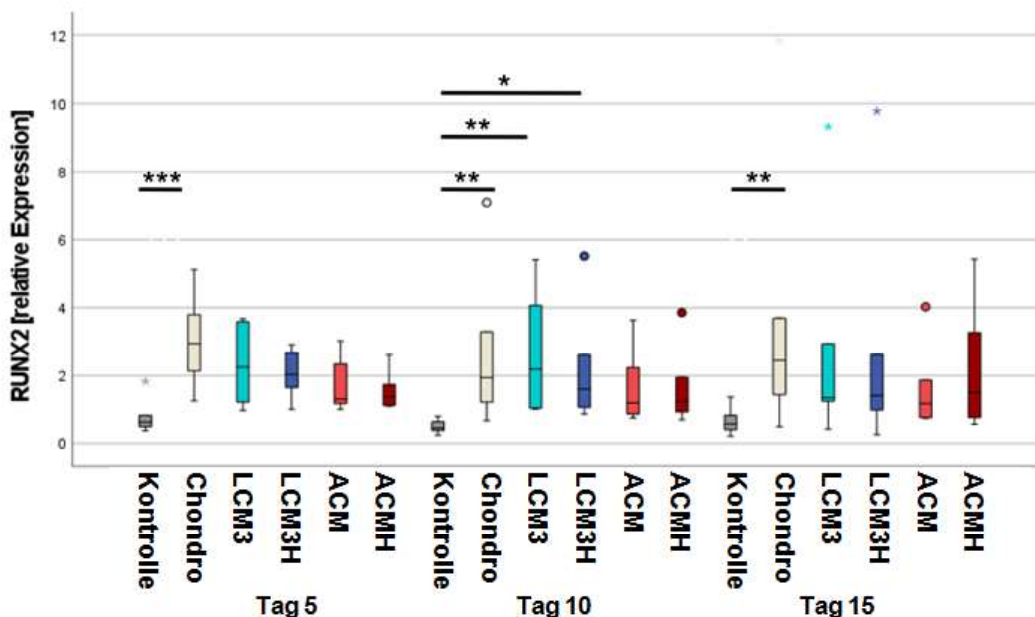


**Abb. 16: Relative Genexpression von HAPLN1 in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (Friedman-Test) der mRNA von HAPLN1 der einzelnen Zellgruppen an Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung. \*  $p \leq 0,05$

### 3.2.5 RUNX2

An den Tagen 5, 10 und 15 wurde die RUNX2-Expression untersucht. Am Versuchstag 5 wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der chondrogenen Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt festgestellt ( $p = 0,000$ ). Zwischen Chondro und ACMH bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,051$ ). Am Versuchstag 10 wurden sowohl zwischen der Kontrollgruppe und der chondrogenen Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt ( $p = 0,006$ ) als auch zwischen der Kontrollgruppe, sowie den Zellen mit Materialkontakt zu LCM3 ( $p = 0,001$ ) und der Kontrolle zum LCM3 Material mit Heparinbeschichtung signifikante Unterschiede festgestellt ( $p = 0,039$ ). Am Untersuchungstag 15 war erneut nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der chondrogenen Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt feststellbar ( $p = 0,003$ ). Die Mediane von Chondro und den Polymermaterialien lagen an allen drei Untersuchungszeitpunkten über dem Median der Kontrolle. An Tag 5 besaß die Kontrolle einen Extremwert bei ZK 124 P 11. An Tag 10 fanden sich allerdings Ausreißer bei der ZK 170 P 8 bei Chondro, LCM3H und ACMH. Ebenso an Tag 15 waren Extremwerte bei ZK 170 P 8 in den Gruppen LCM3 und LCM3H als auch ein Ausreißer bei ACM feststellbar (Abb. 17).

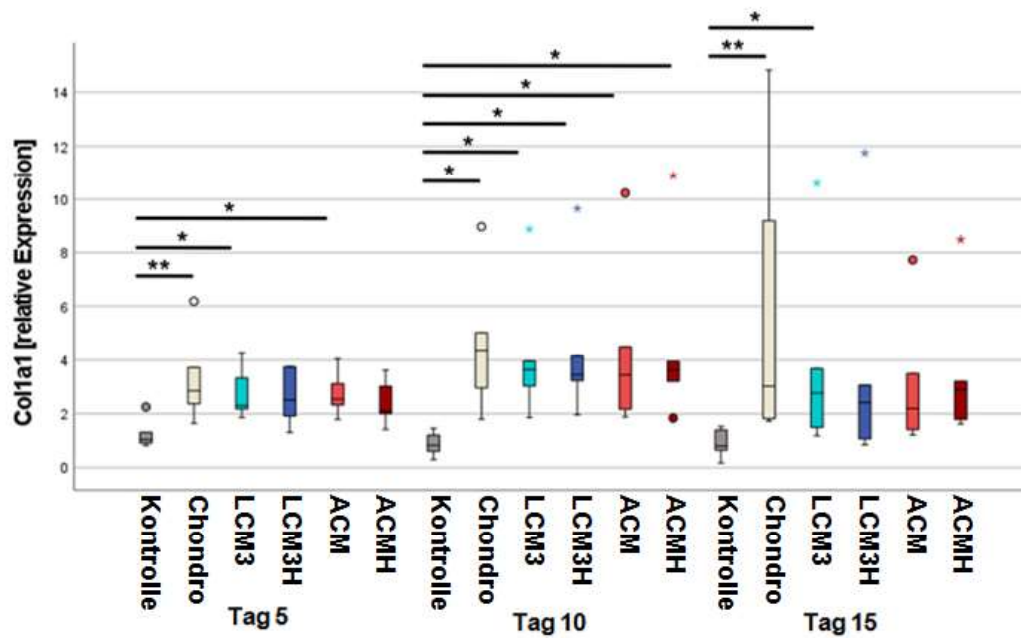


**Abb. 17: Relative Genexpression von RUNX2 in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (Friedmann-Test) der mRNA von RUNX2 der einzelnen Zellgruppen an Tag 5, Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$

### 3.2.6 COL1A1

An den Tagen 5, 10 und 15 wurde die COL1A1-Expression untersucht. An Tag 5 bestand ein sehr signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Chondrogruppe ( $p = 0,002$ ). Ebenso bestand sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und LCM3 ( $p = 0,039$ ) als auch zu ACM ( $p = 0,023$ ). An Tag 10 präsentierten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Chondro ( $p = 0,045$ ), Kontrollgruppe zu LCM3 ( $p = 0,029$ ), Kontrollgruppe zu LCM3H ( $p = 0,019$ ), Kontrollgruppe zu ACM ( $p = 0,045$ ) und Kontrollgruppe zu ACMH ( $p = 0,019$ ). An Tag 15 war die Expression von Kollagen Typ I der Chondrogruppe signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ( $p = 0,002$ ). LCM3 zeigte zu diesem Zeitpunkt ebenso eine signifikant höhere Expression von Kollagen Typ I als die Kontrollgruppe ( $p = 0,03$ ). Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. An Tag 5 fand sich sowohl bei der Kontrolle als auch bei Chondro ein Ausreißer in der Gruppe ZK 170 P 8. Ebenfalls an Tag 10 zeigte die ZK 170 P 8 bei Chondro und ACM einen Ausreißer und bei LCM3, LCM3H und ACMH einen Extremwert. Auch an Tag 15 war bei der ZK 170 P 8 Extremwerte bei LCM3, LCM3H und ACMH und ein Ausreißer bei ACM. Auch der Maximalwert bei Chondro an Tag 15 entstammte der ZK 170 P 8 (Abb. 18).



**Abb. 18: Relative Genexpression von COL1A1 in den verschiedenen Zellgruppen**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression (Friedman-Test) der mRNA von COL1A1 der einzelnen Zellgruppen an Tag 5, Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$

### 3.3 Kollagen II Elektrophorese

Kollagen Typ II wurde qualitativ mit Hilfe einer Elektrophorese nachgewiesen, in welchem die PCR-Produkte von Tag 15 nach Größe aufgetrennt und mit einer Positivkontrolle verglichen wurden. Entsprechend der Positivkontrolle zeigten auch die weiteren Proben auf der gleichen Höhe eine Bande. Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser verwendet, und als Positivkontrolle wurde das PCR-Produkt von HEK-293 Zellen verwendet. Die Bande bei der Negativkontrolle kommt am wahrscheinlichsten von der Wanderung von Primer-Dimeren. Weitere Banden wurden nicht detektiert (Abb. 19).

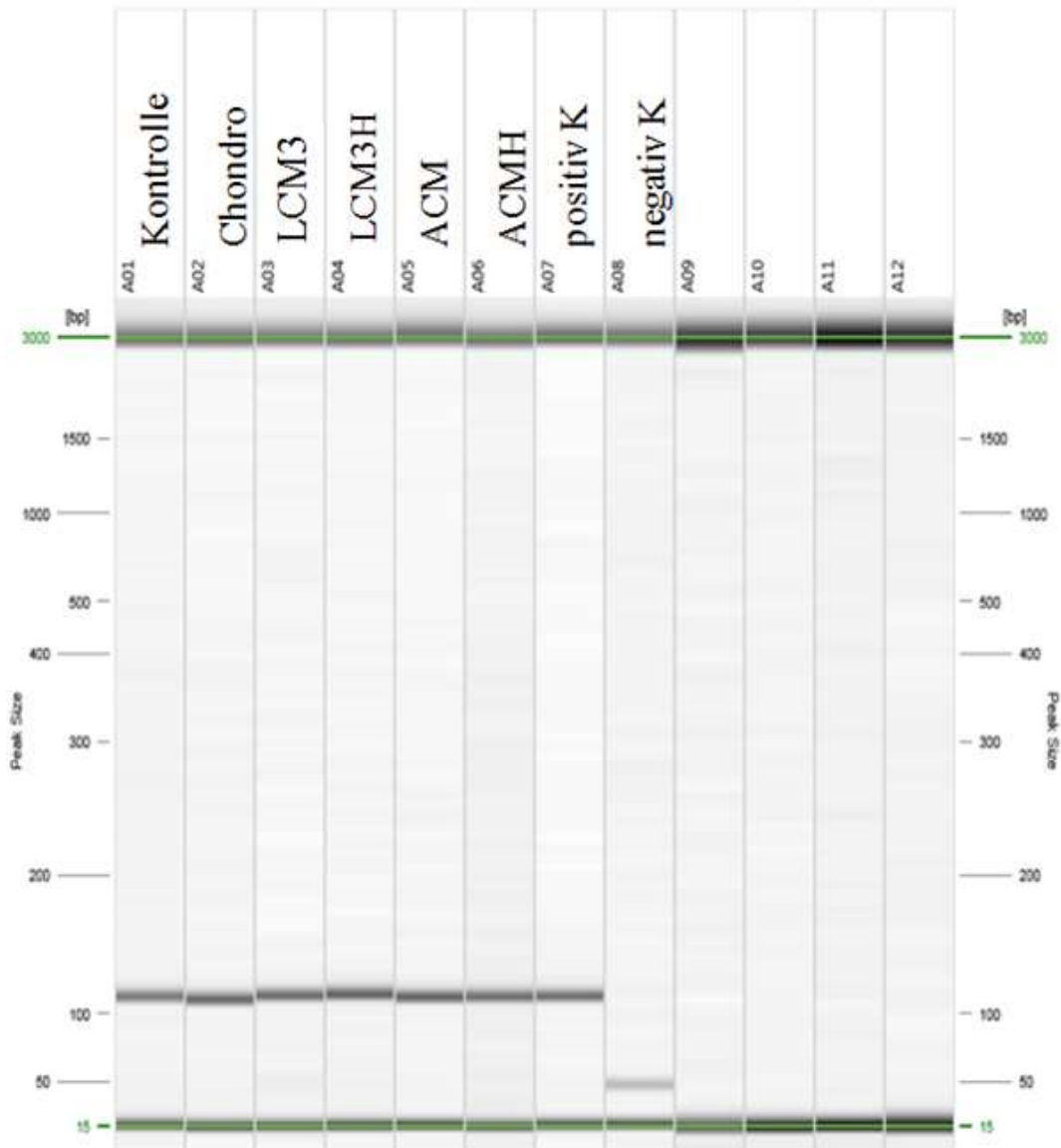
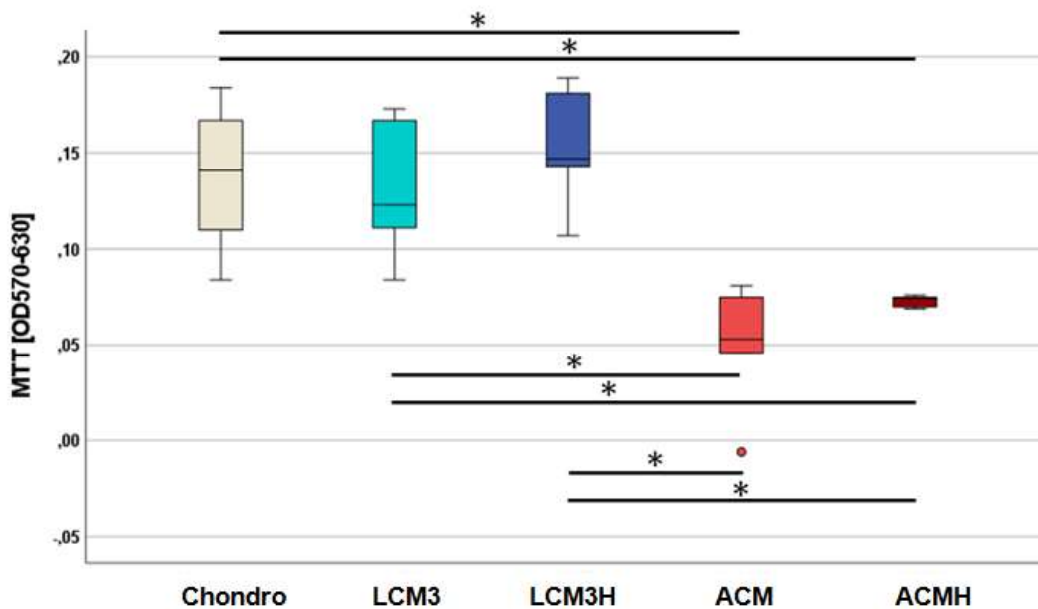


Abb. 19: Die PCR-Produkte von COL2A1 als Elektrophorese am Beispiel von der ZK 168 P 9  
 Tag 15 K: Kontrolle

### 3.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay zeigte signifikante Unterschiede zwischen Chondro und den Zellen mit dem Kontakt zu den Materialien ACM ( $p < 0,001$ ) und ACMH ( $p = 0,009$ ). Ebenso präsentierten sich signifikante Unterschiede zwischen den Zellen an LCM3 und ACM ( $p = 0,001$ ) bzw. ACMH ( $p = 0,027$ ), als auch zwischen den Zellen an LCM3H und ACM ( $p < 0,001$ ) bzw. ACMH ( $p = 0,001$ ). Ein Ausreißer war bei ACM bei der ZK 124 P 11 zu verzeichnen (Abb. 20).

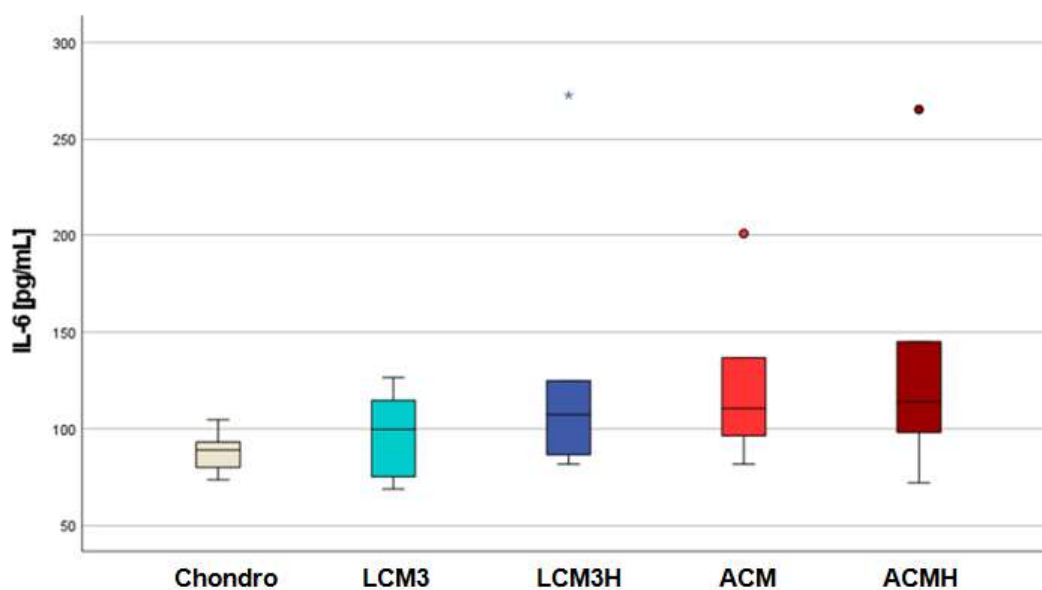


**Abb. 20: MTT-Assay der verschiedenen Zellgruppen von Tag 5 der Versuche**

Box-Whisker-Plots des MTT-Assays (ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur) der einzelnen Zellgruppen an Tag 5. \*  $p \leq 0,05$

### 3.5 Interleukin-6 *enzyme-linked immunosorbent assay*

Der IL-6 ELISA konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen darstellen. Die Mediane aller untersuchten Polymere waren größer als der Median von Chondro. Ein Ausreißer bei ACM fand sich bei der ZK 168 P 9 und ein weiterer Ausreißer war bei ACMH bei der ZK 108 P 9 feststellbar. Bei LCM3H findet sich ein Extremwert bei der ZK 124 P 11 (Abb. 21). Als Positivkontrolle des ELISAs wurden neben einem standardisierten Positivkontrollen Probenset, der Mediumsüberstand von Morbus Sudeck Zellen und die Mediumsüberstände von Zellen, die für 1h, 4h und 24 h mit LPS gereizt wurden, verwendet. Die Positivkontrollen erzielten deutlich höhere IL-6 Werte. Während das standardisierte Probenset zwischen 31 bis 200 pg/ml erzielte und sich damit in einem ähnlichen Bereich wie die untersuchten Proben befanden, enthielt das Medium der mit LPS gereizten Zellen zwischen 1660, 2186 und 2259 pg/ml. Die höchste IL-6-Konzentration mit 4807 pg/ml konnte im Mediumsüberstand der Morbus Sudeck Zellen festgestellt werden.



**Abb. 21: IL-6 ELISA der verschiedenen Zellgruppen von Tag 5 der Versuche**

Box-Whisker-Plots der IL-6 (Friedman-Test) der einzelnen Zellgruppen an Tag 5 aus den Zellmedien.

### 3.6 Kollagen II *enzyme-linked immunosorbent assay*

Durch den Kollagen II ELISA konnte quantitativ der Gehalt an Kollagen Typ II bestimmt werden. Der Kollagen II ELISA zeigte auf Proteinebene einen signifikanten Anstieg des Kollagen Typ II Gehaltes der Zellen an den Ronden aus LCM3, ACM und LCM3H ( $p = 0,043$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen LCM3H und ACMH wurde ein signifikanter Unterschied dargestellt ( $p = 0,043$ ). Der Kollagen Typ II Gehalt der Kontrolle im Vergleich zu Chondro zeigte keinen signifikanten Unterschied. Auch die Mediane von Chondro und allen vier Polymeren waren größer als die Kontrolle. Bei ACM zeigte sich in der ZK 124 P 11 ein Extremwert (Abb. 22).

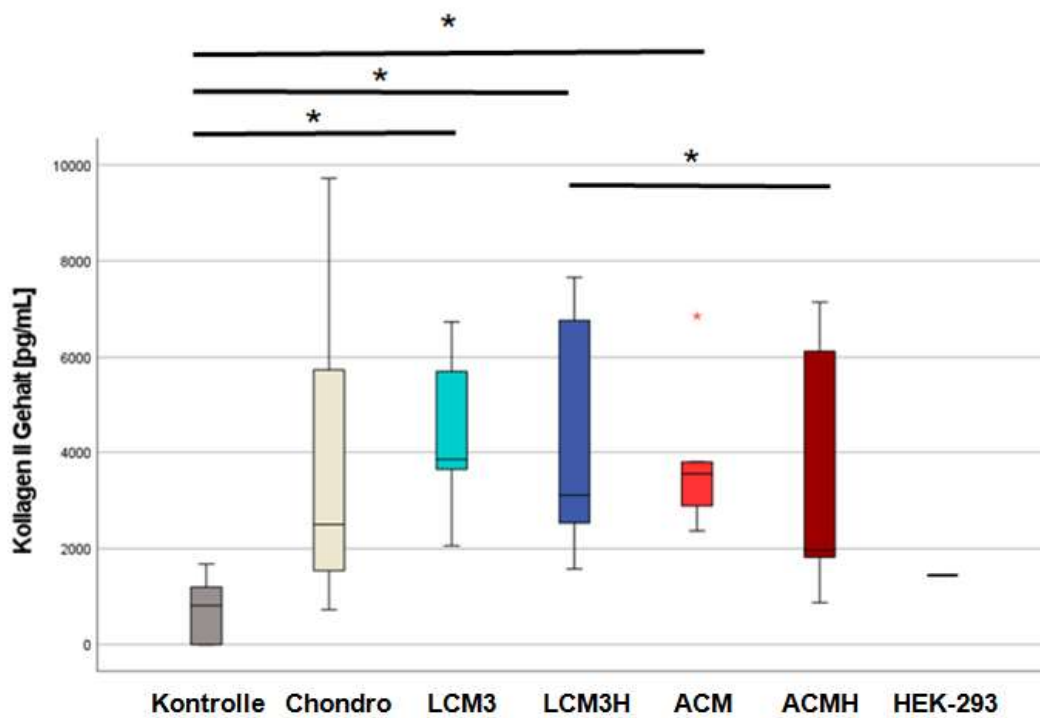


Abb. 22: Kollagen II ELISA der verschiedenen Zellgruppen von Tag 20 der Versuche

Box-Whisker-Plots der Kollagen II Proteinexpression (Friedman-Test) der einzelnen Zellgruppen an Tag 20.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion – Elemente des Studiendesigns

Die hier dargestellten Untersuchungen erfolgten an hMSC aus dem Knochenmark (*Bone marrow MSC*, BM-MSC). Die getesteten Materialien könnten potentiell für AMIC und Knochen-Knorpel *Tissue Engineering* verwendet werden. Bei AMIC als Weiterentwicklung der Mikrofrakturierung werden hMSC mit dem Blut eingeschwemmt (Behrens, 2005). Perspektivisch im Sinne der Prinzipien des *Tissue Engineering* könnten die Scaffold-Materialien auch mit Zellen vor der Implantation kultiviert oder mit Wachstumsfaktoren bezogen werden (Makris et al., 2015). Mit diesen Möglichkeiten der zukünftigen Weiterentwicklung wurde die Materialverträglichkeit an hBM-MSC getestet. Viele Studien, die sich mit *Tissue Engineering* beschäftigen, nutzen BM-MSC (Indrawattana et al., 2004; Legendre et al., 2017), sodass auf ein großes Repertoire an Literatur bei der Ausarbeitung der Versuche zurückgegriffen werden konnte. So stellen BM-MSC die erstmals beschriebene Kultivierung von MSC dar (Friedenstein et al., 1970). Andere nutzten *human articular cartilage* (hAC) zur Untersuchung möglicher Arthrose-Therapien (Thoms und Murphy, 2010; Murphy et al., 2015). Die Materialien sollten auf die umliegenden Knorpelzellen keine negativen Effekte haben, damit möglichst hochwertiges neues Gewebe entsteht und an die Defekte grenzende Areale nicht zusätzlich geschädigt werden. Somit wäre auch eine Untersuchung der Auswirkungen der Materialien auf hAC sinnvoll. Des Weiteren könnten die Scaffolds potentiell auch mit Chondrozyten kultiviert werden und dadurch die etablierte Technik ACI weiterentwickelt werden. Allerdings führt eine Arthrose zu einer Störung der Homöostase im gesamten Gelenk (Sellam und Berenbaum, 2010; Nasi et al., 2016), sodass der Einsatz von patienteneigenen Knorpelzellen zur Defektdeckung bei Arthrose fraglich erscheint. Andere etablierte Quellen zur Gewinnung von MSC stellen Nabelschnurblut und Fettgewebe dar (Pittenger et al., 1999; Rebelatto et al., 2008). Als sogar vorteilhaft bei der Therapie von Arthrose wird inzwischen der Einsatz von *human umbilical cord* (hUC) MSC angesehen (Zhang et al., 2024). Diese proliferieren mehr, differenzieren sich besser und regulieren stärker das Immunsystem im Vergleich zu MSC aus anderen Geweben, sodass u.a. weniger Cytokine exprimiert werden (Shang et al., 2021; Zhang et al., 2024). Der Einsatz von patienteneigenen hUC-MSC ist nur möglich, wenn diese bereits

bei der Geburt von potentiellen Patienten aufgehoben worden sind (Shang et al., 2021). Bei der Verwendung von hUC-MSC gilt es zu beachten, dass sich diese insbesondere zur Therapie von hämatologischen Erkrankungen auf Grund der geringeren Expression von humanen Leukozyten-Antigen (HLA) im Vergleich zu BM-MSC eignen. Damit einhergehend tritt bei der Verwendung von hUC-MSC weniger *graft versus host disease* auf (Thaweesaphithak et al., 2019; Zhao et al., 2019). Daher sollte sich der Einsatz von hUC-MSC auf die Behandlung hämatologischer Erkrankungen beschränken. Ebenso etabliert ist die Forschung mit MSC aus Fettgewebe (Portron et al., 2015). Die Gewinnung von adipösen MSC im Rahmen einer Liposuktion (Bony et al., 2016) ist weniger invasiv als die Möglichkeiten zur Gewinnung von BM-MSC. Neben der Forschung an isolierten adipösen MSC werden stromale vaskuläre Fraktion (SVF)-Injektionen bei bspw. der Gonarthrose angewendet. SVF kann mechanisch oder enzymatisch aus dem gewonnenen Material einer Liposuktion hergestellt werden. Dafür werden mechanisch oder enzymatisch die Fettzellen zerstört, sodass u.a. Lymphozyten, Endothelzellen, Muskelzellen und die erwünschten MSC zurückbleiben, welche schließlich injiziert werden (Bora und Majumdar, 2017; Vargel et al., 2022). Durch den bereits etablierten klinischen Einsatz und deren weniger invasive Gewinnung wären auch adipöse MSC eine Alternative zu den verwendeten BM-MSC, aber dafür wären weitere kostenintensive Vorversuche nötig gewesen, um eine ausreichende Isolierung zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit stellen abschließend MSC aus dem Blut dar. Deren Anzahl im peripheren Blut ist gering, jedoch kann sie durch eine Behandlung mit *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) deutlich erhöht werden (Schmitt et al., 2016). Auch die Heilung von Knorpeldefekten mit Hilfe von MSC aus dem peripheren Blut wird zunehmend erforscht (Chen, Y. R. et al., 2020). Neben menschlichen MSC werden auch häufig Untersuchungen an tierischen MSC vorgenommen. Dabei werden häufig die gleichen Spezies *in vitro* und *in vivo* verwendet. So nutzten bspw. Sathy et al., 2019 BM-MSC von Schweinen, mit welchen sie zunächst *in vitro* deren chondrogene Differenzierungsfähigkeit unter dem Einfluss von DMOG erforschten und weiterführend auch *in vivo* bei Schweinen testeten. Um zunächst den grundlegenden Fragen zu den Materialien nachzugehen, boten sich hMSC mehr an. Die bereits vorhandene Expertise in Bezug auf die Isolierung von BM-MSC im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie und deren Verfügbarkeit gaben gemeinsam mit den Forschungszielen den Ausschlag hBM-MSC zu nutzen.

Für eine letztendlich ausreichende Bildung neuen Gewebes *in vivo* dürfen die Materialien keinen negativen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der sich ausdifferenzierenden Zellen ausüben. Für den Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Auf Grund seines einfachen und schnellen Protokolls ist der MTT-Assay gut replizierbar (Gerlier und Thomasset, 1986). Er stellt einen Endpunkt-Assay dar und bildet somit keinen dynamischen Prozess ab. Die metabolische Aktivität der Zellen wird auf Basis einer kolorimetrischen Messung bei 550 nm in einem Multiwell-Spektrophotometer quantifiziert. Diese Messung beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violettem, wasserunlöslichem MTT-Formazan. Der Farbstoff in den Formazan-Kristallen kann nach Lyse der Zellen und der Solubilisierung der Kristalle mit Hilfe des Nanospektrometers bei 550 nm gemessen werden (*optical density*, OD) (Berridge und Tan, 1993; Mosmann, 1983). Dabei ist die Anzahl proliferierender Zellen direkt proportional zu der Menge an umgesetztem Farbstoff, da nur stoffwechselaktive Zellen den Farbstoff umsetzen können (Gerlier und Thomasset, 1986). Trotz der nachgewiesenen Proportionalität entsteht bei der Korrelation der Ergebnisse des MTT-Assays mit der Zellviabilität häufig eine Unterschätzung der Zellviabilität, da sich häufig nicht alle Formazan-Kristalle im organischen Lösungsmittel lösen (Ginouves et al., 2014). Direkte Möglichkeiten, um ergänzend die Zellviabilität abzubilden, stellen diverse Färbetechniken dar, wie u. a. eine Trypanblau-Färbung (Strober, 1997) oder auch eine Doppelfärbung lebender und toter Zellen mit bspw. Fluoreszenzfarbstoffen wie Calcein-AM und Propidiumiodid, die ebenfalls in der Forschung eingesetzt werden (Zhu et al., 2022). Da die Ronden sich jedoch als nicht ausreichend lichtdurchlässig zeigten und die meisten Zellen sich sehr dicht an den Materialien ansiedelten, wurde von der Durchführung von Färbetechniken, deren Ergebnisse mit einem Lichtmikroskop dargestellt werden, abgesehen. Eine Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen wäre vermutlich möglich gewesen, dennoch musste sich auf Grund der Menge an zur Verfügung gestellten Materialien auf einige Untersuchungsmethoden beschränkt werden. Weitere Assays, welche die Stoffwechselaktivität abbilden, sind der XTT-Assay und der WST8-Assay. Ebenso wie der MTT-Assay wird bei diesen Assays aus Tetrazoliumsalzen Formazan gespalten. Beide haben im Vergleich zu MTT eine höhere Empfindlichkeit, weil deren Spaltprodukte wasserlöslich sind, sodass der zusätzliche Solubilisierungsschritt im Vergleich zum

MTT-Assay entfällt (Chamocoy et al. 2019; Scudiero et al., 1988). Dafür ist es MTT, dank seiner positiven Ladung möglich, die Zellmembran über das Plasmamembranpotenzial zu passieren und wird in den Zellen zum Formazan-Derivat reduziert. XTT und WST-8 hingegen sind negativ geladen, sodass die Reduktion an der Zelloberfläche durch Elektronentransport stattfindet (Berridge et al., 2005). Für eine ausreichende Empfindlichkeit benötigen sowohl XTT als auch WST-8 einen intermediären Elektronentransporter (Hisada und Yagi, 1977; Ginouves et al., 2014). Insbesondere bei XTT und PMS als dessen intermediären Elektronentransporter kann es zu Kristallbildungen kommen, wodurch die Absorptionsmessung beeinträchtigt wird. Dadurch leiden Reproduzierbarkeit und Sensitivität (Scudiero et al., 1988). Unter diesen Gesichtspunkten wurde sich für den MTT-Assay entschieden, da eine Kristallbildung unter dem Lichtmikroskop vielleicht nicht ausreichend aufgefallen wäre oder mögliche Interaktionen mit den Materialien hätten auftreten können.

Um gegebenenfalls proinflammatorische Auswirkungen der Materialien auf die Zellen nachweisen zu können, wurde ein IL-6 ELISA durchgeführt. IL-6 löst unspezifische Immunreaktionen aus. Als proinflammatorisches Cytokin aktiviert es Akute-Phase-Proteine (Gabay, 2006). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass insbesondere die Cytokine IL-1, IL-6 und IL-8 verstärkt bei Arthrose sezerniert werden (Hoff et al., 2013; Tsuchida et al., 2014). Die Cytokine führen zu einer verstärkten Aktivität von katabolen Stoffwechselwegen, sodass u. a. die Matrixsynthese unterdrückt wird und die Apoptose von Zellen induziert wird (Ryu et al., 2011). Auch die Seneszenz von Chondrozyten nimmt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Progression einer Arthrose ein. Mit voranschreitender Zellalterung stellen die Chondrozyten weniger extrazelluläre Matrix her (Musumeci et al., 2015). Senile Zellen sezernieren sowohl verstärkt IL-6 als auch IL-8 (Jacob et al., 2022). Ryu et al. haben 2011 in einem Mausmodell dargestellt, dass IL-6 die Destruktion von Knorpel durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-2 alpha (HIF-2 $\alpha$ ) vermittelt. HIF-2 $\alpha$  führt zur Expression von Metalloproteasen wie MMP-3 und MMP-13 aus Chondrozyten und damit zum Knorpelabbau. Des Weiteren zeigten sie, dass die Mengen von HIF-2 $\alpha$  und IL-6 auch in humanem arthrotischen Knorpel signifikant erhöht sind. Zudem hemmte ein IL-6 *knockout* in Mäusen die Ausbildung experimenteller Arthrose bei diesen. Überdies konnte ein Zusammenhang zwischen der IL-6 Sekretion und der Mineralisierung von Chondrozyten in der Pathogenese von Arthrose nachgewiesen werden (Nasi et al.,

2016). Auch andere Arbeitsgruppen konnten aufzeigen, dass durch eine Blockade von IL-6 bei experimentell induzierter Arthrose in Mäusen diese signifikant gelindert werden konnte (Latourte et al., 2016). Somit ist IL-6 sowohl in der Pathogenese von Arthrose als auch bei der Entwicklung möglicher Therapieoptionen wichtig. Statt des IL-6 wäre auch die Untersuchung von bspw. der Laktatdehydrogenase (LDH) oder von TNF- $\alpha$  denkbar. Das Enzym LDH kommt in allen Zelltypen vor und wird bei Zelluntergang in den Extrazellulärraum ausgeschüttet, sodass sich dieses gut als Marker für Zelltod nutzen lässt (Legrand et al., 1992). TNF- $\alpha$  induziert Apoptose bei Chondrozyten (Aizawa et al., 2001) und inhibiert die Synthese extrazellulärer Matrix in Chondrozyten (Reginato et al., 1993). Zudem hat TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle beim Knochenumbau (Kimble et al., 1997; Lerner und Ohlin, 1993). Da IL-6 gerade in der Pathogenese der Arthrose eine fulminantere Rolle zu haben scheint, wurde sich für die Untersuchung von IL-6 entschieden.

Ebenso wie IL-6 ist auch Kollagen Typ II ein Protein höherer molekularer Struktur, welche sich gut mit dem ELISA-Verfahren nachweisen lässt. Zudem lassen sich Aussagen zu deren quantitativer Menge bzw. Konzentration treffen. Sowohl der durchgeführte IL-6 ELISA als auch der durchgeführte Kollagen II ELISA sind Sandwich-ELISA. Durch die Proportionalität zwischen der Menge des gebundenen Zielantigens mit dem Umsatz der photometrisch nachzuweisenden Aktivität des Enzyms (Engvall und Perlman, 1971; Dusemund und Barrach, 1982) sind ELISA gut zu quantifizieren. Alternativ zu den ELISA-Techniken kann auch mit einem Western Blot die Proteinexpression untersucht werden. Der Western Blot stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, mit welchem durch Übertragung auf eine Trägermembran Proteine nachgewiesen werden können. Zunächst werden Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE bei ihrer Wanderung durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Gel nach Größe und Ladung getrennt. Anschließend werden sie auf eine Membran transferiert, auf welcher das gesuchte Protein mit Antikörpern nachgewiesen wird (Burnette, 1981). Für IL-6 wurde die ELISA-Technik ausgewählt, statt der *real-time* RT-PCR und des Western Blots, weil im Zuge der Untersuchung des Überstandes die Durchführung eines ELISAs sich als besser durchführbar darstellte. Ein Kollagen II ELISA wurde neben einer *real-time* RT-PCR durchgeführt, um auch eine quantitative Aussage auf Proteinebene zu Kollagen Typ II treffen zu können. Dieser stellte sich ebenfalls als einfacher durchführbar und kostengünstiger dar als ein Western Blot.

Zur Untersuchung der Genexpression wurde die *real-time* RT-PCR durchgeführt. Die PCR wurde seit ihrer Erfindung 1983 von Dr. Kary B. Mullis (Mullis, 1990) in ihren Möglichkeiten erweitert und verfeinert, sodass auch einige Bestandteile der Methode dargelegt werden müssen, um entsprechend Vor- und Nachteile aufzeigen zu können. Mit der PCR lassen sich geringste Mengen von DNA in biologischen Proben nachweisen (Clementi et al., 1993). Im Anschluss werden die Produkte in einer Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und somit qualitativ nachgewiesen. Für eine Validierung kann das PCR-Produkt zusätzlich sequenziert werden (Jalali et al., 2017). Ebenso wie die PCR ist auch die RT-PCR zunächst ein qualitativer Nachweis. Bei dieser wird die RNA mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird eine PCR-Untersuchung durchgeführt (Bustin, 2000). Für den Erfolg der Untersuchung ist vor allem die Qualität und Reinheit der RNA entscheidend. RNA als einzelsträngiges Oligopeptid ist meist sehr instabil (Pérez-Ortín et al., 2019). Dennoch ist gerade die Untersuchung der RNA-Expression von Bedeutung, um den Weg der Differenzierung abzubilden. Nach der Synthese einer stabileren cDNA-Probe kann diese letztendlich lange gelagert werden und ermöglicht die Untersuchung mehrerer Ziel-Gene (Jalali et al., 2017). Während der Herstellung kann die cDNA-Probe potentiell verunreinigt werden oder auch Probenanteile auf Grund von u.a. Pipettierungsarbeiten verloren gehen. Dafür entstehen durch die Transkription der RNA-Proben mit gleichen Volumina und RNA-Konzentrationen in ng/ $\mu$ l, sodass die Proben besser untereinander verglichen werden können. Damit erhöht die Transkription auch die Qualität der Ergebnisse. Als Weiterentwicklung der PCR von Mullis wurden Methoden etabliert, mit denen nach Abschluss der PCR-Zyklen die Menge an angereichertem PCR-Produkt gemessen werden kann, hierzu zählt bspw. der Flüssigszintillationszähler, mit welchem die Konzentration der radioaktiv markierten PCR-Produkte gemessen werden kann (Chelly et al., 1990). Durch Messungen nach verschiedenen Zyklen konnte festgestellt werden, dass die Amplifikation zunächst exponentiell und anschließend linear bis zur Bildung eines Plateaus verläuft (Chelly et al., 1990). Kleine Unterschiede in der Amplifikationseffizienz können zu großen Produktschwankungen führen (Clementi et al., 1993; Ferre, 1992). Die *real-time* PCR erlaubt es im Vergleich den Fortschritt der PCR während ihres Ablaufs darzustellen. Dies erfolgt, indem fluoreszierende Farbstoffe zur Markierung von PCR-Produkten während des Thermocyclings verwendet werden. Wenn das Fluoreszenzniveau während

der exponentiellen Phase erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, markiert dies den CT-Wert an dem der festgelegte Schwellenwert überschritten wird. Je höher die anfängliche Kopienzahl des zu amplifizierenden Zieles, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz registriert, sodass keine Mengen sondern Zeitpunkte miteinander verglichen werden (Heid et al., 1996). Der CT-Wert ist somit proportional zu dem Logarithmus der ursprünglichen Zielgenmenge, da bei der *real-time* PCR, während der exponentiellen Phase der Reaktion gemessen wird (Heid et al., 1996; Ponchel et al., 2003). Während des gesamten PCR-Prozesses werden somit Reaktionen anhand des Zeitpunkts ihrer Vervielfältigung dargestellt, indem der Zeitpunkt der Amplifikation eines Ziels erkannt wird und nicht im Nachhinein anhand der angereicherten Menge des Ziels nach einer festgelegten Anzahl von Zyklen errechnet werden muss. Damit eignet sich die *real-time* PCR besser als die Methode mit dem Flüssigszintillationszähler. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen müssen zwei grundlegende Ansätze voneinander unterschieden werden, die farbstoffbasierte PCR (*dye-based*) und die sondenbasierte PCR (*probe-based*). In dieser Arbeit wurde die farbstoffbasierte *real-time* PCR verwendet. Bei dieser ist die Durchführung einer Schmelzkurve unersetzbar, um die Spezifität nachzuweisen. Der in diesen Experimenten benutzte SyberGreen-Farbstoff fluoresziert bei der Bindung an jegliche ds-DNA, sodass er potentiell auch bei Primerdimeren leuchtet (Ponchel et al., 2003). Für eine erfolgreiche farbstoffbasierte *real-time* PCR ist der Einsatz eines spezifischen Primers mit Optimierung der eingesetzten Primermenge unerlässlich (Ponchel et al., 2003). Im Anschluss an das *real-time* PCR-Experiment wird die Denaturierung der entstandenen Produkte in einer Schmelzkurve dargestellt, die für jedes amplifizierte Produkt spezifisch ist. Wenn sich neben dem gewünschten amplifizierten Zielgen auch Primerdimere vorfinden, entstehen zwei Schmelzkurven, wobei sich Primerdimere bei einer geringeren Temperatur als kleinere und breitere Wellen darstellen (Pals et al., 1999). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass immer nur ein Ziel-Gen untersucht werden kann. Dafür erfordert die farbstoffbasierte PCR weniger Zeit, weniger Material und weniger Kosten (Ponchel et al., 2003). Die sondenbasierte PCR, auch Taqman, benutzt stattdessen Fluorophoren markierte Sonden, die ausschließlich an spezifische Amplifikationsprodukten hybridisiert werden. Die Emission des Fluorophors auf dem 5'-Ende wird von einem Farbstoff an einem kurzen 3' Oligonukleotid, welches komplementär zur Zielsequenz ist, solange unterdrückt, bis im Zuge der

voranschreitenden Amplifikation eine räumliche Trennung der beiden Farbstoffe zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt. Das 5'-Ende fungiert als Reporter, während das 3'-Ende als Quencher die Energie der Fluoreszenz transferiert, bis auf Grund der räumlichen Trennung weniger Energie umgewandelt wird und dadurch das Fluoreszenzsignal signifikant ansteigt (Heid et al., 1996). Damit ist die Analyse einer Schmelzkurve obsolet, da Primerdimere keine genügende räumliche Trennung darstellen. Es können mehrere Zielgene in einer einzigen Reaktion untersucht werden, indem verschiedene, unterscheidbare Reporter-Farbstoffe eingesetzt werden. Der Nachteil besteht darin, dass unterschiedliche Sonden für unterschiedliche Sequenzen synthetisiert werden müssen (Heid et al., 1996). Da in diesen Versuchen farbstoffbasierte PCR angewandt wurde, wurde die *two-step real-time* RT-PCR angewandt. Dadurch wird eine stabile cDNA-Probe generiert, mit der diverse Reaktionen durchgeführt werden können (Bustin, 2000). Somit werden das Zielgen und das Referenzgen anhand derselben cDNA untersucht. Zudem hält sich die cDNA für eine lange Zeit. Als Nachteile müssen mehr Optimierungen im Vergleich zur *one-step real-time* RT-PCR vorgenommen werden. Des Weiteren dauert dieses Verfahren durch die vielen Pipettierungsschritte länger und das Risiko einer DNA-Kontamination ist höher (Bustin, 2000). Möglich wäre auch die Durchführung einer *one-step real-time* RT-PCR gewesen. Bei dieser finden die Reverse Transkription und die PCR-Analyse in einem Reaktionsgefäß nacheinander statt (Bustin, 2000). Diese Methode ist schneller, birgt weniger Risiko einer Kontamination mit DNA und besitzt weniger Variation, da beide Reaktionen im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Beide Reaktionen werden miteinander kombiniert, sodass die Reaktionsumstände jedoch einen Kompromiss zwischen den beiden Reaktionen darstellen (Jalali et al., 2017). Um die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR zwischen den Proben vergleichen zu können, erfolgt die Normalisierung mit einem Referenzgen (Heid et al., 1996; Pfaffl, 2001; Ponchel et al., 2003). Damit entspricht die Quantifizierung einer relativen, da sie immer in Relation zu jenem Referenzgen gesetzt werden muss, sodass ausschließlich die relativen Änderungen zwischen den Proben verglichen werden können. Eine absolute Quantifizierung kann mit einer Standardkurve vorgenommen werden, mit deren Hilfe die genaue Kopienanzahl der Ziel-RNA in einer bestimmten biologischen Probe ermittelt werden kann (Leong et al., 2007). Dazu müssen jedoch zunächst die absoluten Mengen des Standards anhand unabhängiger Methoden bestimmt werden. Dies führt zu

einem verhältnismäßigen Mehraufwand und höherem Materialverbrauch. Zudem stellt eine Differenzierung einen dynamischen, organischen Prozess dar, sodass eine absolute Quantifizierung der RNA keine genaueren Aussagen zulässt. Die *real-time* RT-PCR stellt eine gut reproduzierbare Methode dar. Zudem unterstützt diese Methode den Einsatz von Genen zur Normalisierung der Ergebnisse (Referenzgene) und da die Reaktion in einem geschlossenen Reaktionsgefäß stattfindet, ist die Kontaminierungsgefahr der amplifizierten Produkte geringer (Heid et al., 1996). Eine andere Möglichkeit, die RNA nachzuweisen, ist der Northern Blot. Nach Auftrennung des isolierten RNA-Gemisches in einer Gelelektrophorese wird die RNA auf einer Membran fixiert. Anschließend wird die Membran mit einer Lösung mit radioaktiven, fluoreszierenden oder chemisch markierten Gensonden inkubiert. Zur Bestimmung der RNA-Menge werden die Gensonden durch Röntgenfilm sichtbar gemacht (Alwine et al., 1977; Brown, 2004). Der Vorteil besteht bei dieser Untersuchungsmethode, dass die RNA direkt nachgewiesen wird und nicht zuerst in die cDNA überführt wird, somit sind Kontaminierungsrisiken geringer. Jedoch sind Wiederholungsanalysen ebenso wie beim Western Blot nicht möglich und somit wurde sich für die *real-time* RT-PCR entschieden mit der Herstellung eines stabilen cDNA-Pools. Bei COL2A1 wurden rezidivierend mehrere Peaks bei den Schmelzkurven abgebildet und es wurden hohe CT-Werte erzielt, daher wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Analyse als qualitativen Nachweis zu überprüfen.

## 4.2 Die Herausforderung einer chondrogenen Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung von hMSC ist nach wie vor eine Herausforderung (Yang et al., 2023) und stellt die Grundlage dieser Versuche dar. Daher wurden nicht nur die Materialien untereinander auf Signifikanzen untersucht, sondern auch eine chondrogene Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt im Vergleich zu hMSC im Kontrollmedium, um die Qualität der Differenzierung einordnen zu können. Für eine differenziertere Betrachtung der relevanten Einflussfaktoren auf die Ergebnisse und die Komponenten des Differenzierungsprotokolls wird an dieser Stelle ausführlicher auf zugrunde liegende biochemische Vorgänge eingegangen. Eng verzahnt mit der osteogenen Differenzierung (Goldring et al., 2008) versuchen viele Arbeitsgruppen weltweit chondrogene Differenzierungsprotokolle zu entwickeln, bei welchen eine

extrazelluläre Matrix mit einem möglichst hohen Gehalt an Kollagen Typ II und mit Knorpel typischen Proteoglykanen wie Aggrecan und HAPLN1 entsteht. Dabei ist u. a. der gezielte Einsatz von Wachstumsfaktoren (Zhou et al., 2015) und hypoxischen Zuständen (Hiaro et al., 2006) entscheidend, um eine Differenzierung zu induzieren. Es werden neben den erwünschten Genen ebenfalls vermehrt hypertrophische Gene wie RUNX2, MMP-13, Kollagen Typ I und X exprimiert (Chariyev-Prinz et al., 2023; Ronziere et al., 2010; Weißenberger et al., 2023), sodass sich die zur chondrogenen Differenzierung angeregten Zellen von nativem, hyalinem Knorpel unterscheiden. Die chondrogene Differenzierung wird durch ein komplexes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren und miteinander agierenden Transduktionswegen reguliert (Li et al., 2015). Von entscheidender Bedeutung ist die Aktivierung der SMAD-Signalwege (Thielen et al., 2019). Stark etabliert ist daher die Verwendung von TGF- $\beta$ 1 zur Induktion der chondrogenen Differenzierung von hMSC. Dieser Wachstumsfaktor führt über die Induktion der SMAD-Signalwege zur Ausbildung eines chondrogenen Zelltypus und zur Blockierung von Zell-Hypertrophie (Ferguson et al., 2000; Furumatsu et al., 2005 und 2009; Chen et al., 2021). Neben dem SMAD-Signalweg wird auch der MAPK-Signalweg aktiviert durch die TGF- $\beta$ -aktivierende Kinase 1 (TAK1), welche durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert wird. Dieser Signalweg reguliert Apoptose und die mesenchymale-epitheliale Transition (Lamouille und Derynck, 2007). Die TAK1 stellt insbesondere bei der chondrogenen Differenzierung einen wichtigen Regulator dar, ohne welchen es zu einer verminderten Proliferation und Überleben von Chondrozyten kommt (Gunnell et al., 2010). Die Regulierung der chondrogenen Differenzierung erfolgt dagegen auch durch Induktion kataboler Stoffwechselforgänge, wie die Expression von MMP-13 durch *p38*, einem weiteren Anteil des MAPK-Signalweges (Chen et al., 2021). Auch die anderen beiden Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 führen *in vitro* zu einer chondrogenen Differenzierung (Freyria und Mallein-Gerin, 2012). Es überwiegt nach wie vor die Forschung an TGF- $\beta$ 1, sodass die Isoform TGF- $\beta$ 1 genutzt wurde. Außerdem ist auch die Zellanordnung und die Länge der TGF- $\beta$ 1 Exposition von Bedeutung (Freyria und Mallein-Gerin, 2012; Goldberg et al., 2017; Futrega et al., 2021). Der Goldstandard chondrogener Differenzierung von BMSC *in vitro* stellt eine Pelletkultur dar (Johnstone et al., 1998; Barry et al., 2001; Futrega et al., 2021). Anhand solcher Kulturen wurde bspw. aufgezeigt, dass bereits eine Exposition von 24 h mit TGF- $\beta$ 1 eine chondrogene Differenzierung induziert und gerade bei sogenannten

Mikropellet-Kulturen vorteilhaft zu sein scheint. Makropellet-Kulturen schienen im Vergleich von einer durchgängigen Exposition mehr zu profitieren. Neben der Expression chondrogener Gene wie SOX9, Aggrecan und Kollagen Typ II wurden auch hypertrophische Gene wie RUNX2, Kollagen Typ I und Kollagen Typ X exprimiert (Futrega et al., 2021). Ein weiterer Grund, den Einsatz von Wachstumsfaktoren zeitlich zu begrenzen, ist der potentielle Einsatz *in vivo*. Bei einer länger anhaltenden Stimulation durch TGF- $\beta$ 1 *in vivo* wurden endochondrale Ossifikationen nachgewiesen (Van Beuningen et al., 2000). Unter diesen Aspekten wurde in diesem Differenzierungsprotokoll die Menge von TGF- $\beta$ 1 über die Zeit reduziert. Des Weiteren wird auch in der Pathophysiologie der Arthrose die Rolle des TGF- $\beta$ -induzierten Signalweges erforscht, sodass mit zunehmendem Wissen der Interaktionen auch ein differenzierterer Einsatz möglich wird. So untersuchten Thielen et al., 2021 den Einfluss inflammatorischer Cytokine wie IL-1 $\beta$  auf den TGF- $\beta$ -Signalweg insbesondere im Hinblick auf SMAD2 und SMAD3 an Rinderknorpel und an drei verschiedenen menschlichen, knorpelähnlichen Zelllinien. Durch den Einfluss von IL-1 $\beta$  als auch durch den Einfluss von konditioniertem Medium von arthrotischen Synoviazellen wurde die SMAD2- und SMAD3-Aktivität in den Zellen reduziert. Somit konnten sie aufzeigen, dass Cytokine den SMAD2/3-Signalweg inhibieren und dadurch vermehrt hypertrophische Zelltypen entstanden. Das durch TGF- $\beta$  angeregte Differenzierungsverhalten von Zellen entsteht somit aus einer Vielzahl miteinander agierender Signalwege und ist ebenfalls abhängig von der exprimierten Rezeptorkonstellation der zu differenzierenden Zellen (Wang et al., 2014). Einen weiteren Ansatz bzw. eine Ergänzung zur erfolgreichen chondrogenen Differenzierung bietet der Wachstumsfaktor BMP-2, welcher ebenfalls die Ausbildung eines chondrogenen Zelltypus fördert (Zhou, 2015), jedoch solitär verwendet zur Ausbildung eines osteogenen Zelltypus führen kann (Ryoo et al., 2006), da BMP-2 sowohl SMAD1, SMAD5 und SMAD8 als auch den Signalweg Wnt aktiviert (Papathanasiou et al., 2012). Sekiya et al., 2005 verglichen die chondrogene Differenzierungsfähigkeit von humanen BM-MSCs ohne bzw. mit BMP-2, *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4) oder *bone morphogenetic protein-6* (BMP-6) *in vitro*. Die Zellen wurden als Pelletkultur mit TGF- $\beta$ 3 und Dexamethason kultiviert. Dabei erzielte die Kultur mit BMP-2 die beste Proteoglykansynthese. Auch in einem *in vivo* Modell konnte der positive Einfluss eines Langzeiteinsatzes von BMP-2 im Vergleich zu einem kurzen Einsatz von BMP-2 im Vergleich zu einer reinen

Behandlung von arthrotischen Defekten mittels Mikrofrakturierung aufgezeigt werden (Yang et al., 2011). Die von BMP-2 induzierte Chondrogenese wird von TGF- $\beta$  verstärkt und führt zur Ausbildung von Knorpel, der hyalinem Knorpel stärker ähnelt als bei solitärer Verwendung von BMP-2 (Shintani et al., 2013). So wiesen Toh et al., 2005 eine verstärkte Kollagen Typ II-Synthese und verminderte Kollagen Typ I-Synthese bei der chondrogenen Differenzierung von Kaninchen MSC in 3D-Kulturen unter der Verwendung von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 nach. Zur Verbesserung der Proteoglykansynthese wurde sich daher dafür entschieden, neben dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 auch BMP-2 zu verwenden, um eine bestmögliche Proteoglykansynthese zu erzielen auch mit dem Risiko einer verstärkten RUNX2-Expression. Murphy et al. untersuchten 2015 die chondrogene Genexpression von hMSC im Vergleich zu passagierten hAC unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren. Eine Kombination der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1, GDF-5 und BMP-2 erzielte die höchste Expression chondrogener Gene u. a. von SOX9, ACAN und COL2A1. Ebenfalls war das Verhältnis von COL2A1 zu COL1A1 am größten. Auch die Kombination von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 erzielte eine hohe Synthese von Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen in beiden Zelltypen. Bei dem Wachstumsfaktor GDF-5 wurde nachgewiesen, dass dieser katabolische Genexpression wie bspw. die Expression von MMP-13 hemmt und dafür anabolische Prozesse durch die Expression von SOX9 und ACAN fördert (Enochson et al., 2014). Über DKK-1 hemmt GDF-5 den kanonischen Signalweg Wnt, welcher für die Induktion degenerativer Prozesse verantwortlich gemacht wird (Enochson et al., 2014). Dieser Signalweg wird mit Knorpeldegeneration und Hypertrophie in Verbindung gebracht im Zuge von osteoarthrotischen Defekten (Thorfve et al., 2012). Der Wnt-Signalweg reguliert im Allgemeinen grundlegende zelluläre Prozesse, sodass ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung und zwischen Überleben und Apoptose entsteht (Hoppler und Kavanagh, 2007). In hMSC fördert Wnt3a die Proliferation der hMSC und inhibiert deren osteogene Differenzierung (Boland et al., 2004). Zudem aktiviert GDF-5 die Proteine SMAD-1, SMAD-5 und SMAD-8 (Sun et al., 2021). Weissenberger et al. verglichen 2023 die chondrogene Differenzierung von BM-MSC in Pelletkulturen unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1, GDF-5 oder R57A. Dabei zeigten alle Pelletkulturen eine chondrogene Genexpression, aber alle Gruppen präsentierten auch eine signifikant höhere Expression hypertrophischer Gene wie Kollagen Typ X und

ALP im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei die GDF-5 Variante R57A die besten Ergebnisse erzielte. Diese Ergebnisse reflektieren nicht den starken protektiven Effekt von GDF-5 entgegen einer Zellhypertrophie wider. Bereits 2013 zeigten Coleman et al. eine verbesserte chondrogene Differenzierung durch GDF-5 mit TGF- $\beta$ 3 im Vergleich zu TGF- $\beta$ 3 alleine. Sie wiesen auch eine verstärkte hypertrophische Genexpression in Form von ALP, Kollagen Typ I und Kollagen Typ X nach. Somit ist die Wirkung von GDF-5 bei der chondrogenen Differenzierung noch nicht hinreichend geklärt. Um einer überschießenden SMAD1, SMAD5 und SMAD8 Aktivierung entgegen zu wirken, wurde auf die Verwendung von GDF-5 als zusätzlichen Wachstumsfaktor verzichtet. Des Weiteren werden in der Forschung noch andere Wachstumsfaktoren untersucht, wie bspw. *Insulin-like growth factor* (Chen, L. et al., 2020; Peng et al., 2023). Unter Berücksichtigung bisheriger biochemischer Signalwege und auch aus Kostengründen wurde sich auf die Verwendung von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 als gut erforschte Wachstumsfaktoren konzentriert.

Dexamethason wird in vielen chondrogenen Differenzierungsprotokollen genutzt (Chariyev-Prinz et al., 2023; Weißenberger et al., 2023). Dexamethason unterstützt die von TGF- $\beta$  induzierte chondrogene Differenzierung von hMSC in Form von gesteigerter Expression chondrogener extrazellulärer Matrixproteine (Derfoul et al., 2006). Shintani und Hunziker wiesen 2011 nach, dass der Einfluss von Dexamethason auf die Differenzierung abhängig von den verwendeten Wachstumsfaktoren und vom Zellursprung ist. Insbesondere bei hBM-MSC und dem Einsatz von TGF- $\beta$  konnte der positive Effekt von Dexamethason auf die Differenzierung beobachtet werden, während Dexamethason bei synovialen Explantaten eine chondrogene Differenzierung sogar nachweislich hemmte. Die Kombination von Dexamethason und BMP-2 bei hMSC führte lediglich zu einem Anstieg von SOX9, aber nicht zu einer verstärkten Expression von Kollagen Typ II, Aggrecan und COMP. Somit ist der Einsatz von Dexamethason stark kontextabhängig. Die Mechanismen, über die Dexamethason eine inhibierende bzw. aktivierende Wirkung ausübt, sind nicht vollends geklärt. Nach einem Vorversuch wurde sich dafür entschieden, Dexamethason in diesem Versuchsaufbau zu verwenden als günstige Alternative zu weiteren Wachstumsfaktoren wie bspw. GDF-5.

Neben den Wachstumsfaktoren führt auch die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch Hypoxie zu einer chondrogenen Differenzierung (Robins et al., 2005; Zheng et al., 2017). Die

Effekte durch die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  wurden auch von der Arbeitsgruppe von Zhou et al. (2015) untersucht. Bei deren Versuchen wurde HIF-1 $\alpha$  mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 bei der murinen MSC-Linie (C3H10T1/2) und HEK-293 eingesetzt, wodurch eine chondrogene Differenzierung induziert und eine Hypertrophie der Zellen gehemmt wurde. Dabei zeigte sich u. a. eine verminderte Expression von RUNX2.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde DMOG anstatt Hypoxie verwendet, welches ebenso HIF-1 $\alpha$  stabilisiert (Taheem et al., 2018). Bei der Verwendung von DMOG spielt der Zeitraum des Einsatzes eine entscheidende Rolle, da DMOG die Synthese extrazellulärer Matrix hemmt (Falcon et al., 2021). Neben der Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  kann DMOG auch die Prolyl-4-Hydroxylase hemmen, die wiederum insbesondere bei der Synthese von Kollagen Typ II benötigt wird (Pihlajaniemi et al., 1991). Dieser Effekt scheint jedoch bei einer kurzen Anwendungsdauer nicht anzuhalten und nur der positive Einfluss auf die Differenzierung der MSC bleibt zurück. Sathy et al. veröffentlichten 2019 eine Arbeit, in der Mäuse beladene Hydrogele mit MSC, DMOG und den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3 und BMP-2 implantiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Hydrogele mit DMOG und den Wachstumsfaktoren die Ausbildung eines stabilen knorpeligen Gewebes mit einer Anhäufung von Glycosaminoglykanen (GAGs) am meisten förderten. Die Dauer der Freisetzung von DMOG betrug dabei 72 h (Sathy et al., 2019). Somit stellt der Einsatz von DMOG im Differenzierungsprotokoll auch einen Ansatz dar, welcher in der personalisierten Medizin etabliert werden könnte. Denkbar wäre es nach weiterer Forschung, die Scaffolds mit hMSC des Empfängers zu kultivieren und ihre Differenzierung mit Wachstumsfaktoren und DMOG positiv zu beeinflussen. Im Hinblick auf diese Möglichkeiten und da die Zellen zum Mediumtausch immer wieder normalen Zusammensetzungen der Luft ausgesetzt werden würden, erschien eine Versuchsdurchführung mit DMOG statt Hypoxie besser reproduzierbar und somit aussagekräftiger.

Eine weitere Variante, die extrazelluläre Matrixsynthese bei der chondrogenen Differenzierung zu steigern, stellt die Verwendung von Druck dar (Angele et al., 2003; Sakao et al., 2008). Diese Möglichkeit wurde nicht in Erwägung gezogen, da in der Literatur Uneinigkeit über den Nutzen dieser physikalischen Maßnahme auf die

Differenzierung *in vitro* besteht und somit der Aufwand dem fraglichen Nutzen entgegenstand. Zuletzt 2023 veröffentlichten Chariyev-Prinz et al. eine Studie in der Druck nur eine untergeordnete Rolle bei der chondrogenen Differenzierung von hMSC einzunehmen schien. Stattdessen unterschieden sich die Qualitäten der Differenzierung anhand der verwendeten Zelldichte und der Konzentration an verwendeten Biomaterialien. Dabei wurde die Qualität der Differenzierung an ihren Protoglykanmengen und ihren Gehältern an Kollagen diskutiert.

Aus dem Überblick der verschiedenen Signalwege, die durch die TGF- $\beta$ -Superfamilie aktiviert werden, und der Rolle von Hypoxie bei der chondrogenen Differenzierung wurden in diesen Versuchen die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 gemeinsam mit DMOG als HIF-1 $\alpha$ -stabilisierenden Faktor verwendet. Mit diesem Differenzierungsprotokoll gelang eine frühe chondrogene Differenzierung mit einem signifikanten Unterschied zwischen Chondro und Kontrolle bei den untersuchten Genen TRPV4 und SOX9. Bei den Genen der späten chondrogenen Differenzierung zeigte sich kein derartig deutliches Bild. Der Median von Chondro bei dem untersuchten Gen HAPLN1 lag bereits an Tag 10 über dem Median der Kontrolle. An Tag 15 ließ sich ein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression zwischen der Kontrolle und Chondro für HAPLN1 nachweisen. Ebenfalls stieg bei ACAN der Unterschied zwischen den Medianen von Chondro im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 5 war zunächst der Median der Kontrolle höher, an den Tagen 10 und 15 war es der von Chondro. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Auch der Kollagen Typ II ELISA zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und Chondro, obwohl der Median von Chondro deutlich über dem der Kontrolle lag. Zudem zeigte Chondro eine signifikant höhere relative Genexpression von RUNX2 bei allen drei Versuchszeitpunkten und auch die relative Genexpression von COL1A1 war signifikant höher als bei der Kontrolle. RUNX2 triggert Metalloproteasen, die für einen katabolen Stoffwechsel verantwortlich sind, sodass Aggrecan und HAPLN1 stärker abgebaut werden (Wang et al., 2004). Dies könnte einen Grund darstellen, dass kein signifikanter Unterschied von ACAN gefunden wurde. Zudem beschreiben Blaney Davidson et al., 2007, dass ein Einsatz von BMP-2 die relative Genexpression von ACAN senkt, sodass zusammen mit der beschriebenen Aktivierung von RUNX2 die durchgehende Verwendung von BMP-2 im Differenzierungsprotokoll zu diesen Ergebnissen geführt haben könnte. HAPLN1 als weiteres Proteoglykan des Knorpels

(Hardingham, 1979; Roughley und Mort, 2014) zeigte an Tag 15 der Differenzierung eine signifikant erhöhte relative Genexpression in Bezug zu der Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass dennoch typische Proteoglykane des Knorpels zunehmend exprimiert wurden.

In der Gesamtschau deuten die Ergebnisse auf eine Hypertrophie der zur chondrogenen Differenzierung angeregten hMSC hin. Dieses Ergebnis ist im Vergleich zur Literatur nicht überraschend. Auch bei Pellet Kulturen von hMSC wurde bspw. unter dem Einsatz von TGF- $\beta$ 3 und BMP-2 zwar Kollagen Typ II verstärkt gebildet, jedoch auch vermehrt hypertrophische Gene exprimiert wie u. a. Kollagen Typ X und MMP-13 (Ronziere et al., 2010).

Somit spiegeln diese Ergebnisse die geschilderten Herausforderungen bei der chondrogenen Differenzierung gut wider. Durch die Interaktionen der verschiedenen induzierten Signalwege wurde verstärkt RUNX2 induziert und damit einhergehend weniger chondrogene Matrix hergestellt. Zur differenzierteren Betrachtung dieser Ergebnisse wäre die Untersuchung weiterer Gene von Interesse wie u. a. die relative Genexpression von MMP-13, Kollagen Typ X, OC und ALP, welche weitere Rückschlüsse zulassen würden.

#### 4.3 Interaktionen und Limitationen der Zellkultur im Materialkontakt

Zellkulturen stellen stets Modelle dar. In diesen Versuchen wurde, angepasst an die zur Verfügung gestellten Materialronden, eine 48-Well-Platte gewählt. Durch diese Wahl hatten die Zellen einerseits wenig Material-freie Fläche zur Verfügung und andererseits bestand noch genügend Platz, falls sich das Material wider Erwarten ausgedehnt hätte. Damit die Zellen möglichst viel Kontakt zu dem Material erhielten, wurde sich für den Versuchsaufbau des Monolayers entschieden. Die Aussaat Größe wurde auf 20.000 Zellen festgelegt. In Vorversuchen wurde getestet, dass die erzielte RNA-Expression bei diesen Proben für eine cDNA Herstellung ausreichend ist. Entsprechend der Vorversuche wurden für den Untersuchungszeitpunkt Tag 5 für jede untersuchte Gruppe zwei Wells gepoolt, um damit die RNA-Menge zu erhöhen und somit die Reinheit der RNA zu erhöhen. Idealerweise wäre ein Pooling auch an den Untersuchungszeitpunkten von Tag 10 und 15 erfolgt, bei jedoch limitierter

Materialmenge erfolgte nur an Tag 5 für die RNA-Extraktion ein Pooling. Zudem proliferieren die Zellen während der Durchführung einer Zellkultur, sodass Vorversuche zeigten, dass die RNA-Menge an Tag 10 und 15 für *real-time* RT-PCR Untersuchungen eine ausreichende Reinheit aufweist. Der Versuchszeitraum wurde auf 20 Tage beschränkt, weil sich im Rahmen der voranschreitenden Proliferation in Vorversuchen insbesondere bei der Kontrolle lichtmikroskopisch zunehmend Vesikel zeigten, die auf eine Apoptose hindeuten (Krammer, 2000). In der Literatur sind die meisten chondrogenen Differenzierungsversuche auf eine Versuchsdauer von 14–28 Tage begrenzt, die mittlere Versuchsdauer beträgt 20 Tage (Barry et al., 2001; Murphy et al., 2015; Futrega et al., 2021; Weißenberger et al., 2023).

Die extrazelluläre Matrix von hyalinem Knorpel besteht zu 90–95 % aus Kollagen Typ II, welches als Fibrillen mit Proteoglykanen wie Aggrecan vernetzt ist (Eyre, 2001). Mit dieser Arbeit konnten keine vergleichbaren Verhältnisse erzielt werden. Aufgrund von zwei verschiedenen Peaks in den Schmelzkurven als auch durch hohe CT-Werte ( $> 33$ ) konnte keine Auswertung der *real-time* RT-PCR für COL2A1 erfolgen und somit auch kein Verhältnis zu Kollagen Typ I gebildet werden. Die Abbildung von zwei Peaks in den Schmelzkurven könnte entweder durch Primerdimere, eine Verunreinigung der Proben oder durch die Amplifikation einer nicht erwünschten Gensequenz entstanden sein (Pals et al., 1999). Zum Ausschluss einer Verunreinigung und der Amplifikation einer weiteren nicht erwünschter DNA wurde eine Elektrophorese der PCR-Produkte von COL2A1 durchgeführt, um diese in Bezug auf ihre Länge zu vergleichen. Diese zeigte bei allen Proben außer der Negativkontrolle Banden auf der gleichen Höhe. Bei der Negativkontrolle bildete sich eine leichte Bande unter 50 bp ab, welche als Artefakt durch bspw. Primerdimere gewertet wurde. Die amplifizierten Produkte haben somit wie die Positivkontrolle beinahe identische Längen, was für die Amplifikation der gleichen cDNA und gegen eine Verunreinigung spricht, da keine weiteren Banden detektiert worden. Für eine Quantifizierung von Kollagen Typ II auf Proteinebene wurde ein Kollagen II ELISA an Tag 20 durchgeführt. Dieser zeigte signifikant höhere Kollagen Typ II Werte für die Polymere LCM3, LCM3H und ACM im Vergleich zur Kontrolle. Zudem waren auch die Mediane aller zur chondrogenen Differenzierung angeregten Zellen über dem Wert der Positivkontrolle (HEK-293) vorzufinden. HEK-293 Zellen exprimieren viel Kollagen Typ II (Rouillard et al., 2016). Damit zeigt der Kollagen II ELISA ein deutlich anderes Bild als die *real-time* RT-PCR Messung von

Kollagen Typ II an den Versuchszeitpunkten Tag 10 und Tag 15. Die Versuchszeitpunkte mit Tag 10 und 15 könnten als zu verfrühte Zeitpunkte angesehen werden, um den Kollagen Typ II Gehalt mit einer PCR zu quantifizieren. Des Weiteren könnten die zu differenzierenden Zellen hypertrophisch sein. Bei hypertrophischen Zellen ist es bekannt, dass sie mehr RUNX2 exprimieren und weniger Kollagen Typ II (Chen et al., 2021). Andere Arbeitsgruppen bestimmten den Kollagen Typ II Gehalt an den Versuchstagen 5 , 7 und 9 (Zhou et al., 2015) oder an 3, 7, 14 und 21 (Weißberger, 2023) oder an 1, 3, 7, 14 und 21 (Futrega et al., 2021) oder 7, 14, 21 und 28 (Desancé et al., 2018). Bei diesen fällt auf, dass bei den meisten Arbeitsgruppen erst ab Tag 14 signifikant mehr Kollagen Typ II nachgewiesen werden konnte im Vergleich zu Kontrollgruppen.

Andere Arbeitsgruppen verwenden statt Monolayer-Kulturen häufig 3D-Kulturen, mit welchen die extrazelluläre Matrixsynthese gesteigert werden kann (Barry et al., 2001; Johnstone et al., 1998; Huang et al., 2021). So zeigten bspw. Caron et al. 2012, dass bei der Redifferenzierung von hAC die Genexpression und GAG-Synthese bei 3D-Kulturen und Monolayer-Kulturen sich signifikant voneinander unterschieden. Bei den kultivierten Zellen im Monolayer kam es zu einer vermehrten Expression hypertrophischer Gene wie RUNX2 und COL10A1. Die hier durchgeführten Materialtestungen fanden in Wellplatten als Monolayer-Kulturen statt. Die Materialien wurden als Ronden mit 1 mm Durchmesser und 7 mm Höhe in den Wells platziert und hatten keine Poren, in welche die Zellen hätten einwachsen können. Denkbar wäre höchstens zu einem späteren Zeitpunkt eine Unterstützung der Zellorganisation an den Kanten der Materialien gewesen. Dies muss u. a. bei der Beurteilung des Kollagen II ELISA Ergebnisses und der PCR Untersuchung berücksichtigt werden. Wird nun der Versuchsaufbau als reiner Monolayer-Versuch eingestuft, wäre dies ein Grund, dass bei einigen untersuchten Targets keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Chondro auftraten. Zudem ließ sich auch ein signifikant höherer Gehalt an Kollagen Typ I bei Chondro im Vergleich zur Kontrolle an allen untersuchten Zeitpunkten feststellen. Bei den Materialien wies ebenfalls LCM3 an allen Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. ACM zeigte sowohl an Tag 5 wie Tag 10 einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Alle anderen Materialien wiesen nur an Tag 10 einen signifikanten Unterschied des Kollagen Typ I Gehalts zur Kontrolle auf. Eine Möglichkeit, um die Kollagen Typ I Expression zu senken, stellen *small interfering*

*RNAs* (siRNA) dar. Diese greifen in die Genregulation ein und schalten vorübergehend die Genexpression bestimmter Gene aus (Tuschl, 2001), wodurch mit deren Einsatz ein höherer Gehalt extrazellulärer Matrix, ähnlich der von hyalinem Knorpel, erreicht werden kann. Desancé et al. verwendeten 2018 in einem Modell für Knorpeldefekte umbilikale Nabelschnurblut-*MSC* von Rennpferden (eUB-*MSC*). Eine 3D-Kultur von eUCB-*MSC* zeigt durch die Induktion mit den chondrogenen Wachstumsfaktoren BMP-2 und TGF- $\beta$ 1 ein hohes chondrogenes Differenzierungspotential mit einem signifikanten Anstieg knorpel-spezifischer Gene sowohl auf mRNA-Level wie Kollagen Typ II und Aggrecan als auch auf Protein Ebene in Form von Kollagen Typ II. Die Verwendung der Wachstumsfaktoren führte auch zu einem Anstieg von Kollagen Typ I, welcher durch die Verwendung von siRNA gegen COL1A2 erfolgreich verringert wurde (Legendre et al., 2017; Desancé et al., 2018). Da Kollagen Typ I für diesen Studienansatz als Anzeichen für Zellhypertrophie und zur Bewertung der unterschiedlichen Materialverträglichkeit genutzt werden sollte, wurde sich gegen den Einsatz der siRNA entschieden.

Des Weiteren muss zur Bewertung der relativen Genexpression die Zellseneszenz beachtet werden. Zellseneszenz beschreibt die Zellalterung, welche mit einer limitierten Kapazität an Zellteilungen einhergeht und auch als "Hayflick Limit" bekannt ist (Hayflick, 1984). Die h*MSC* von älteren Spendern haben eine limitierte Lebenszeitspanne, stellen in der Zellkultur ihr Wachstum früher ein und besitzen eine geringere Differenzierungsfähigkeit (Stenderup et al., 2003). Die hier verwendeten Zellspender waren zwischen 18 und 90 Jahre alt und die Passagen der Zellen waren zwischen P 8 und P 11, sodass dies eine Differenzierung negativ beeinflusst haben könnte. Überraschenderweise erzielten in diesen Versuchen die ältesten Zellspender (ZK 170 und ZK 168) mit 72 und 90 Lebensjahren die höchsten relativen Genexpressionen und zeigten dies ebenfalls in Form von Ausreißern und Maximalwerten. Die relative Genexpression des jüngsten Zellspenders mit 18 Lebensjahren befand sich häufig im 1. Quartil. Bei Betrachtung der verwendeten Zellpassage haben die beiden ältesten verwendeten Zellspender jeweils die geringsten Zellpassagen mit P 8 und P 9, jedoch im Kontrast dazu entstammen auch die h*MSC* des jüngsten Zellspenders einer neunten Passage. Somit kann der Einfluss der Zellseneszenz in dieser Versuchsreihe nur teilweise als ersichtlicher Faktor betrachtet werden. Die Zellseneszenz bewirkt beim erwachsenen Menschen *in vivo* sowohl eine langsamere Matrixkomponenten-Synthese

durch Chondrozyten als auch eine höhere Expression von IL-6 und IL-8, welche wiederum eine Entstehung von Arthrose begünstigen (Musumeci et al., 2015). Die metabolische Aktivität von Chondrozyten unterliegt verschiedenen chemischen und mechanischen Einflussfaktoren, insbesondere Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Cytokine. Diese induzieren die Synthese bzw. die Degradation von Matrixmolekülen (Goldring et al., 2008; Fortier et al., 2011; Kapoor et al., 2011). In einem gesunden Gelenk werden die anabolischen und katabolischen Vorgänge des Knorpelumsatzes an die verschiedenen Belastungssituationen des Gelenks angepasst (Falah et al., 2010). Proinflammatorische Cytokine und Chemokine führen im Rahmen des komplexen Krankheitsgeschehens der Arthrose zu einem Ungleichgewicht der Knorpelmatrixsynthese (Akkiraju et al., 2015). Es kommt zu einer hohen Ausschüttung von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  bei einer Arthrose (Hoff et al., 2013; Kapoor et al., 2011). So entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine, was zu einem allmählichen Verlust des Knorpelgewebes führt. Die Versteifung der Gelenke resultiert aus dem fibrotischen und ossären Umbau der Defekte (Hashimoto et al., 2002; Findlay und Atkins, 2014). Die Untersuchung der Zellkulturmedien von Tag 5 zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den IL-6-Gehalt zwischen den Untersuchungsgruppen. Dies deutet auf keine proinflammatorische Wirkung der Materialien hin und bedeutet im Rahmen von arthrotischen Erkrankungen, dass die Zellen zumindest durch den Polymerkontakt kein zusätzliches IL-6 sezernieren. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden auch die Zellmedien von mit LPS gereizten Zellen und das Zellmedium von Morbus Sudeck Zellen untersucht. Beide Kontrollgruppen erzielten deutlich höhere IL-6 Werte. LPS als Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien induziert die Freisetzung von Cytokinen wie u. a. IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Raetz et al., 1991; Roth, 1998). Der Morbus Sudeck oder auch *Complex Regional Pain Syndrom* (CRPS) beschreibt eine chronisch neurologische Erkrankung, welche sich nach Frakturen und Quetschungen ausbilden kann, allerdings nicht mit der Schwere der Verletzung korreliert. Das CRPS stellt einen Symptomkomplex aus Schmerzen, Sensibilitätsstörungen und sowohl motorischen als auch trophischen Störungen dar, dessen Pathomechanismus noch nicht vollends geklärt ist (Harnik et al., 2023). Insbesondere wird geforscht, ob das CRPS durch eine Entzündungskomponente entsteht und unter Umständen durch einen

Überschuss an Cytokinen u. a. von Substanz P eine Dysregulation im Zentralen Nervensystem verursacht wird (Clark et al., 2018).

Mit dem MTT-Assay wurde ergänzend die metabolische Aktivität der Zellen verglichen. Um die Polymergruppen mit Chondro vergleichen zu können, wurden zunächst von der OD der Polymergruppen, die der zugehörigen Background-Scaffolds abgezogen. Dies führte zu einem besonderen Ausreißer bei ACMH. Dieser erhielt dadurch bei der ZK 124 einen Wert mit negativen Vorzeichen (-0,06). Trotz dieses Ausreißers wurde mit der Differenz die Statistik erstellt, um den Einfluss der Materialien auf die Extinktion der Differenzierungsmedien herausrechnen zu können. Insbesondere bei ACM und ACMH zeigte sich eine Verfärbung der Materialien durch die MTT-Behandlung. Zudem ließen sich bereits ab Tag 5 der Versuche kleine Materialpartikel im Well erkennen, sodass die Differenzbildung mit den Backgroundscaffolds eine Möglichkeit darstellte, um die metabolische Aktivität der Zellen und nicht die erhöhte Extinktion durch u a. Materialpartikel miteinander zu vergleichen. Im Vergleich zu Chondro, LCM3 und LCM3H ließen sich bei ACM und ACMH signifikant weniger Farbstoff im Spektrometer messen. Das bedeutet, dass die Zellen weniger metabolisch aktiv sind. Auf eine Korrelation der Extinktionswerte mit einer Zellzahl und somit einer möglichen Zellvitalität wurde in dieser Arbeit verzichtet. Die Erstellung einer Standardgeraden war aufgrund der nicht quantifizierbaren Proliferation und durch die verschiedene Effizienz bei dem Umsatz des MTTs zu Formazan von den unterschiedlichen ZKs nicht möglich.

#### 4.4 Einfluss der Polymere und der Heparinbeschichtung auf die Genexpression

Scaffolds als angewandte 3D-Modelle führen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer gesteigerten Matrixsynthese (Mirzaei et al., 2017; Sathy et al., 2019; Huang et al., 2021) und somit zu einer verbesserten chondrogenen Differenzierung. So werden Scaffolds auch zur Heilung von osteochondralen Defekten genutzt (Hutmacher, 2000). Wie auch bei anderen knorpelregenerativen Verfahren zeigen diese insbesondere bei der Therapie von Osteoarthrosegraden 2–4 minderwertige Langzeitergebnisse (D'Ambrosi et al., 2019; Melton et al., 2010). Einen Grund könnte die verhältnismäßig schnelle

Resorptionszeit der bisher verwendeten und zugelassenen Materialien auf Kollagen- und Hyaluronbasis darstellen (Niu et al., 2023), da bei einer Arthrose aufgrund der gestörten Homöostase katabole Stoffwechselfvorgänge überwiegen (Akkiraju et al., 2105) und somit der Heilungsprozess mehr Zeit erfordert. Synthetisierte Polymere haben das Potential, die nötige Stabilität zu bieten, um die wirkenden Kräfte im Gelenk wieder besser zu verteilen und die nötige Zeit für eine Bildung qualitativ neuen Gewebes bis zur Resorption der Scaffolds zur Verfügung zu stellen (Huang et al., 2004). Mit der Etablierung der Zwei-Photonen-Lithographie ist eine Herstellung von synthetisierten Scaffolds als hochpräzise 3D-Mikrostrukturen möglich geworden (Maruo et al., 1997; El-Tamer et al., 2017), sodass die Architektur der Scaffolds besser angepasst werden kann. Vor diesem Hintergrund wurden zwei verschiedene Polymere LCM3 und ACM *in vitro* untersucht.

Da Zellen häufig weniger an synthetisierten Polymeren als an natürlichen Polymeren haften, weil sie weniger Zelladhäsionssequenzen besitzen (Niu et al., 2023), können synthetisierte Polymere durch Beschichtungen optimiert werden. Die hier untersuchten Materialien könnten zunächst als AMIC eingesetzt werden. Im Zuge des Débridement von Knochen-Knorpeldefekten wird dabei Blut in die Defekte eingespült (Walther et al., 2012). Somit soll eine Heparinbeschichtung neben besseren Zelladhäsionssequenzen auch eine Hämostase bei Blutkontakt hemmen (Hauptmann et al., 2022). Daher erfolgten die Versuche ebenfalls an den Polymeren mit Heparinbeschichtung (LCM3H, ACMH).

Bei den frühen chondrogenen Differenzierungsmarkern zeigte Chondro eine signifikant höhere relative Genexpression als ACMH auf. Bei SOX9 wiesen wie Chondro, LCM3 und LCM3H eine signifikant höhere relative Genexpression im Vergleich zur Kontrolle auf. Chondro zeigte jedoch zu allen vier Materialien eine signifikant höhere relative Genexpression auf. Dies spricht für eine geringere Induktion der frühen chondrogenen Differenzierung bei den Zellen mit Materialkontakt im Vergleich zu Chondro. Im reinen Vergleich der Materialien untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede bei den frühen chondrogenen Differenzierungsmarkern festgestellt werden. Die Mediane von LCM3 und LCM3H lagen über denen von ACM und ACMH bei SOX9. Bei TRPV4 ist der Median von ACM zwar über LCM3 und LCM3H, aber der Median von

ACMH befindet sich erneut am niedrigsten. Die Polymere ohne Beschichtung erzielten höhere Mediane als ihre mit Heparin-beschichteten Gegenstücke.

Diese bereits angedeuteten Unterschiede zwischen den Materialien zu ihren Heparin-beschichteten Gegenstücken waren auch von Hauptmann et al., 2022 festzustellen, welche die Proliferation von hMSC auf ACM und ACMH nach 72 h verglichen. Dabei zeigte sich eine bessere Zellproliferation und Zelladhäsion an ACM im Vergleich zum Heparin-beschichteten Gegenstück. Neben dem Einfluss auf das Gerinnungssystem hat Heparin auch Effekte auf den Knochen-Knorpelstoffwechsel. Durch eine Langzeittherapie mit Heparin kann Osteoporose ausgelöst werden (Mazziotti et al., 2010). Das Glykosaminoglykan Heparin bietet einige Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren des Knochen-Knorpel-Stoffwechsels. Für Wachstumsfaktoren, wie u.a. TGF- $\beta$ 1, GDF-5 und BMP-2 wurde nachgewiesen, dass diese verstärkt an Heparin binden (Murali et al., 2013; Lee et al., 2015; Ayerst et al., 2017). Dabei deuten *in vitro* und *in vivo* Experimente auf verschiedene Konsequenzen einhergehend mit solchen Bindungen hin. Lee et al. untersuchten 2015 den Effekt von Heparin auf die chondrogene Differenzierung von hMSC induziert durch TGF- $\beta$ 1 anhand von der Phosphorylisation von SMAD-2 und SMAD-3. Sie konnten nachweisen, dass in Anwesenheit von Heparin die Phosphorylisation von SMAD-2 steigert. Dies deutet auf eine verbesserte Wirkung des Wachstumsfaktors durch Heparin hin. Im Gegensatz dazu stellten Ayerst et al. 2017 eine deutliche Hemmung durch Heparin bei der durch den Wachstumsfaktor GDF-5 induzierten chondrogenen Differenzierung fest bei sowohl der Differenzierung von hMSC als kultivierte Pelletkulturen als auch bei der Zelllinie ATDC5. Im *Tissue Engineering* wird die Bindungsaffinität von Heparin zu Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 genutzt, um eine stetige Freisetzung des Wachstumsfaktors zu erreichen, da hohe Dosen von TGF- $\beta$ 1 Entzündungen fördern, anstatt eine chondrogene Differenzierung anzuregen (Levinson et al, 2019). Auch Murali et al. nutzten 2013 erfolgreich die Bindung von BMP-2 an Heparansulfat, um dadurch die Bioaktivität und Halbwertszeit des Wachstumsfaktors zu erhöhen und damit knöchernen Defekte bei Kaninchen zu therapieren. Eine Bindung der chondrogenen Differenzierung induzierenden Wachstumsfaktoren an Heparin könnte einen möglichen Faktor darstellen, weshalb in diesem Rahmen die Zellen an den Materialien mit Heparinbeschichtung sich schlechter differenzierten als ihre Gegenstücke ohne Beschichtung. Da die Menge der Wachstumsfaktoren anhand von

bestehender Literatur kalkuliert wurde, traten die geschilderten Vorteile von Heparinbeschichtungen bei Wachstumsfaktoren beladenen Scaffolds in diesem Rahmen nicht in Erscheinung, sondern bewirkten stattdessen das Gegenteil. Mirzaei et al. untersuchten 2017 den Effekt von elektrogesponnenen Scaffolds auf Poly L-Laktatsäure (*Poly (L-lactide) acid*, PLLA) und PEG Basis mit bzw. ohne eine Beschichtung mit Glukosamin auf die chondrogene Differenzierungsfähigkeit von MSC. Dabei nahmen neben der Beschichtung mit Glukosamin, insbesondere das Molekulargewicht der Scaffolds und die Steifheit der Materialien einen Einfluss auf die Zelladhäsion und die chondrogene Genexpression. Ein MTT-Assay wurde an den Tagen 1–4 durchgeführt. Dieser zeigte eine Zunahme der metabolischen Aktivität von Tag 1–4 bei allen untersuchten Gruppen. An Tag 4 zeigten schließlich die Zellen auf allen Materialien signifikant höhere metabolische Aktivität als die Kontrollzellen ohne Materialkontakt. Neben weiteren Untersuchungen benutzten sie ebenfalls die *real-time* RT-PCR allerdings an den Tagen 7 und 14. Neben signifikant höherer SOX-9 Genexpression bei den hochmolekularen Scaffolds und jenem hochmolekularen Scaffold mit Glukosamin im Vergleich zu der Kontrollgruppe an den Tagen 7 und 14, wiesen sie auch für Kollagen Typ II an den Tagen 7 und 14 für die hochmolekularen Scaffolds mit Glukosamin die höchste Kollagen Typ II Expression nach. Sie detektierten im Vergleich zur relativen Genexpression von Kollagen Typ II auch eine hohe relative Genexpressionen von Kollagen Typ I. Dabei exprimierten die Materialien mit Glukosamin weniger Kollagen Typ I, sodass sich im Gesamten betrachtet die Beschichtung mit Glukosamin positiv auf das Differenzierungsverhalten ausgewirkt hat. Im Vergleich zu einer Beschichtung der Scaffolds mit Glukosamin zeigen die hier erzielten Ergebnisse keinen Vorteil der Materialien bei einer zusätzlichen Heparinbeschichtung.

Dass Heparin im Allgemeinen einen Einfluss auf die Genexpression ausübt, zeigten auch Pot et al. 2017. Diese verglichen die chondrogene Differenzierung von C3H10T1/2 Zellen durch den Wachstumsfaktor BMP-2 auf Kollagen Scaffolds, welche eine bzw. keine Heparinbeschichtung hatten. Dabei bildeten die Zellen an den Scaffolds mit Heparin mehr Chondotinsulfat und weniger Kollagen Typ II im Vergleich zu den Zellen an den Scaffolds ohne Heparin.

Bei den Genen, welche für typische Proteoglykane der chondrogenen Matrix exprimieren, konnten weder bei HAPLN1 noch bei ACAN signifikante Unterschiede festgestellt werden. Bei ACAN hat zwar die relative Genexpression von LCM3 und LCM3H von Tag 10 zu Tag 15 zugenommen, hingegen konnte unter den Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Mediane von LCM3 und LCM3H befanden sich erneut über denen von ACM und ACMH. Bei HAPLN1 waren alle vier Materialien ähnlich verteilt und die Mediane lagen sehr nah beieinander, ebenso wie erzielte Extremwerte. Dafür konnten bei Genen, welche für eine Hypertrophie der Zellen sprechen, diverse signifikante Unterschiede festgestellt werden. Am Untersuchungszeitpunkt Tag 10 der Differenzierung exprimierten sowohl die Zellen an Chondro wie auch LCM3 und LCM3H relativ mehr RUNX2 als die Zellen der Kontrolle. Es muss aber erneut darauf hingewiesen werden, dass Chondro auch an den Untersuchungszeitpunkten Tag 5 und Tag 15 signifikante Unterschiede zu der Kontrolle zeigte. Unter diesem Aspekt muss überlegt werden, ob die fehlenden signifikanten Unterschiede von den Polymeren ACM und ACMH zur Kontrolle als positiv zu werten sind. Der fehlende signifikante Unterschied zwischen diesen Materialien und der Kontrolle kann entweder aus protektiven Eigenschaften vor Hypertrophie, von den Materialien resultieren oder in der Gesamtschau wahrscheinlicher als eine verminderte Zelldifferenzierung der Zellen an ACM und ACMH gedeutet werden. Die verstärkte Genexpression hypertrophischer Gene an LCM3 ist durch den Vergleich zwischen der Kontrolle und Chondro dem Differenzierungsmedium zu Last zu legen, welches zu einer allgemeinen verstärkten Genexpression führte. Bei Kollagen Typ I zeigte LCM3 genau wie Chondro signifikante Unterschiede in der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrolle an allen drei Untersuchungszeitpunkten. ACM hatte an den Untersuchungszeitpunkten Tag 5 und 10 ebenfalls eine signifikant höhere relative Genexpression als die Kontrolle. Die anderen beiden Materialien, LCM3H und ACMH, zeigten nur an Tag 10 signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Da die *real-time* RT-PCR Untersuchung von COL2A1 nicht verwertbar war, fehlt an dieser Stelle das für die Beurteilung wichtige Verhältnis zwischen Kollagen Typ I und II. Im Allgemeinen sieht man unabhängig vom Verhältnis auch bspw. bei Mirzaei et al. (2017) die meiste relative Genexpression von Kollagen Typ I bei dem insgesamt am besten abgeschnittenen Material.

Mit einer hohen Expression chondrogener Gene werden häufig auch verstärkt hypertrophische Gene nachgewiesen (Ronziere et al., 2010; Legendre et al., 2017), sodass deren vermehrte Expression mehr auf eine verstärkte Induktion der Zellen hinweist. Daher wird die vermehrte Expression hypertrophischer Gene dem Differenzierungsprotokoll zur Last gelegt. Die signifikant höhere Expression von Kollagen Typ I und RUNX2 zeigt zumindest eine stärkere Induktion der Zellen, anstatt dass diese durch die Materialien in ihrem Differenzierungsverhalten gehemmt werden. Für eine solche Auslegung der Ergebnisse der hypertrophischen Gene spricht auch das Ergebnis des MTT-Assays von Tag 5. Dieser wies sowohl für ACM als auch für ACMH eine verminderte metabolische Aktivität im Vergleich zu Chondro, LCM3 und LCM3H nach. Dies könnte eine verminderte Differenzierung der Zellen im Kontakt zu ACM und ACMH untermauern. So ging auch bei Mirzaei et al. 2017 eine hohe metabolische Aktivität im MTT-Assay mit einer vermehrten relativen Genexpression einher.

An Tag 5 konnte kein erhöhter Gehalt an IL-6 nachgewiesen werden. Als proinflammatorisches Cytokin hätte dies eine Erklärung für die verminderte metabolische Aktivität liefern können (Ryu et al., 2011).

Die bereits an Tag 5 signifikant geringere metabolische Aktivität von ACMH zeigte sich auch bei dem Kollagen Typ II ELISA an Tag 20. ACMH erzielte signifikant weniger Kollagen Typ II als LCM3H. Währenddessen hatten die Zellen von LCM3, LCM3H und ACM signifikant höheren Gehalt an Kollagen Typ II als Chondro. Damit scheinen die Zellen an den Materialien zumindest in Bezug auf die extrazelluläre Matrixsynthese ein besseres Differenzierungsverhalten schlussendlich aufzuzeigen als Chondro. Dies weist darauf hin, dass in der späteren chondrogenen Differenzierung die Materialien einen positiven Einfluss auf die Differenzierung ausgeübt haben.

Eine Erklärung könnte sich aus den Ergebnissen von Zhang et al. (2016) ableiten, welche die Auswirkungen von Laktat auf humane Chondrozyten bei der Degeneration zweier verschiedener Polymermaterialien auf Laktatbasis, PLGA (Polylactid-co-Glycolid) und PLLA, untersuchten. Sie zeigten, dass ein saurer pH-Wert bei der Degeneration der Materialien zu einer verminderten extrazellulären Matrixsynthese und Proliferation der Chondrozyten führt. Zudem konnten sie auch darstellen, dass dies dosis- und zeitabhängig ist, da Laktat auch einen gegenteiligen Effekt durch die Induktion von HIF-1 $\alpha$  innehat. Laktat fördert die Expression von HIF-1 $\alpha$  und führt

sowohl bei gesunden wie auch bei arthrotischen Chondrozyten zu einer gesteigerten Synthese von COL2A1, ACAN und SOX9 und gleichzeitig zu einer Inhibition der Expression von Proteasen. Diese Ergebnisse unterstreichen erneut die bedeutungsvolle Eigenschaft von synthetisierten Polymeren, dass deren Degeneration zeitlich einstellbar ist (Huang et al., 2004) und verwendete Materialien als solche positiven Einfluss auf die chondrale Defektdeckung nehmen können. So wäre es denkbar, dass LCM einen besseren Einfluss auf die chondrogene Differenzierung ausübte als ACM.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Zellen an LCM3 und LCM3H ein ähnliches Differenzierungsverhalten aufwiesen wie die Zellen in Differenzierungsmedium ohne Materialkontakt. Im direkten Vergleich von den Materialien mit und ohne Heparinbeschichtung schnitten die Materialien ohne Heparinbeschichtung besser ab. Die Ergebnisse des IL-6 ELISAS deuten auf keine proinflammatorische Wirkung der Materialien hin. Insbesondere durch die bessere metabolische Aktivität im MTT-Assay und auch den Nachweis einer signifikanten frühen chondrogenen Differenzierung wird im Vergleich der vier Materialgruppen, LCM3 als das Material angesehen, welches eine chondrogene Differenzierung in diesem Versuchsrahmen am besten unterstützt hat.

#### 4.5 Ausblick

Weiterführende Genexpressions-Untersuchungen u. a. von OC, ALP, MMP-13 und Kollagen Typ X würden eine genauere Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf Zellhypertrophie und eine mögliche enchondrale Ossifikation ermöglichen. Ein zusätzlicher Kollagen Typ I ELISA würde die Möglichkeit bieten, die Kollagen Typ I und II Synthese zueinander ins Verhältnis zu setzen und somit noch besser mit bereits bestehenden Arbeiten zu vergleichen. Ein Vitalitätsassay oder eine Trypanblau-Färbung könnten Aufschlüsse geben, ob die geringere metabolische Aktivität der Zellen an ACM und ACMH auch einer geringeren Proliferation oder Vitalität geschuldet war. Zudem könnte die Messung des Gehalts an HIF-1 $\alpha$  klären, ob LCM durch dessen vermehrte Expression bessere Ergebnisse zeigte. Auch wäre eine Messung von SMAD-2 und SMAD-3 von Interesse, um insbesondere die Effekte der Heparinbeschichtung in diesem Versuchssetting besser einzuordnen. All diese zusätzlichen Untersuchungsmöglichkeiten entspringen einem stetig wachsenden Verständnis biochemischer

Prozesse während Zelldifferenzierungen und pathophysiologischen Prozessen. Womit sich zunehmende Chancen, bieten Wachstumsfaktoren und dergleichen umsichtig einzusetzen und sinnvoll miteinander zu kombinieren. So bietet der Einsatz von DMOG auch *in vivo* zukünftig spannende Möglichkeiten, jedoch wären genauere Untersuchungen auf die Auswirkungen auf die Prolyl-4-Hydroxylase sinnvoll. Auch wenn in dieser Studie auf den Einsatz von si-RNA verzichtet wurde, bietet diese spannende und vielfältige Möglichkeiten. Die chondrogene Differenzierung der hMSC in Scaffolds als angewandte 3D-Kulturen mit geeigneter Porengröße, ebenso wie eine Kultivierung als Pellet-Kultur könnten noch differenziertere Ergebnisse im Vergleich zu dem hier verwendeten Versuchsaufbau liefern. Des Weiteren wären zum einen eine erneute Untersuchung *in vitro* bei Einsetzen der Degeneration von Interesse und zum anderen eine Langzeituntersuchung *in vivo* von Interesse, um die Zusammensetzung der Matrix bei und nach Einsetzen der Degradation der Materialien zu untersuchen. In der Zukunft könnten die hier vorgestellten Materialien in der Klinik die Basis zur Deckung tieferreichender osteochondraler Defekte bilden. Im Rahmen des *Tissue Engineering* könnte dieser kurative Ansatz durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren oder patienteneigenen Zellen erweitert und personalisiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Als avaskuläres Gewebe besitzt hyaliner Knorpel nur ein geringes Regenerationspotential. Chondrale Defekte werden mit dem widerstandsfähigeren, gleichzeitig weniger elastischen und somit auch weniger stoßdämpfenden Faserknorpel ersetzt, sodass sich Defekte immer tiefer fortpflanzen. Trotz vielfältiger Therapieansätze stellen osteochondrale Defekte weiterhin eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar. Arthrose als häufigste degenerative Gelenkerkrankung nimmt weltweit durch eine steigende Lebenserwartung drastisch zu. In diesem BMBF-Projekt wurden Implantate aus synthetisierten Polymeren entwickelt, welche entweder über Laktat (Poly-(D,L)-Laktid- $\epsilon$ -Caprolacton, LCM3) oder über Aminosäuren (Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton, ACM) degradieren. Zusätzlich wurden die Scaffolds mit einer gerinnungshemmenden Heparinbeschichtung (LCM3H, ACMH) hergestellt. Mit dieser *in vitro* Studie wurde die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) an den unterschiedlichen Polymeren untereinander und mit einer Kontrolle in chondrogenem Differenzierungsmedium (Chondro), sowie hMSC in Kontrollmedium (Kontrolle) verglichen, um eine Empfehlung für den Einsatz in einem biphasischen Scaffold für den chondrogenen Anteil zu geben.

Die Polymere wurden dafür in Ronden mit einer Höhe von 1 mm und einem Durchmesser von 7 mm gegossen. Im Rahmen einer endoprothetischen Hüftgelenks-Versorgung männlicher Patienten ( $n = 6$ ) wurde aus dem nicht mehr benötigten Knochengewebe der Hüftköpfe hMSC isoliert. Es folgte die chondrogene Differenzierung der hMSC unter Verwendung der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1, BMP-2 und durch den vorübergehenden Einsatz von DMOG an den Ronden jeweils mit und ohne Heparinbeschichtung. An den Versuchstagen 5, 10 und 15 wurde die Expression ausgewählter chondrogener Differenzierungsmarker durch *real-time* RT-PCR bestimmt. Zudem wurde an Tag 5 ein MTT-Assay durchgeführt und die Zellkulturüberstände von Tag 5 in einem IL-6 ELISA verwendet. An Tag 20 wurden Zellen für einen Kollagen II ELISA geerntet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test unter Verwendung von SPSS.

TRPV4 als früher chondrogener Marker zeigte in der relativen Genexpression für das Material ACMH eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Chondro ( $p = 0,037$ ). Die mRNA-Expression des frühen chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX9 war

signifikant höher an den Scaffolds aus LCM3 ( $p = 0,029$ ) und LCM3H ( $p = 0,031$ ) im Vergleich zu den Zellen im Kontrollmedium. Bei den späteren Differenzierungsmarkern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien nachgewiesen werden. Der IL-6-Gehalt des Zellmediumsüberstandes war an keinem der Materialien signifikant erhöht. Die metabolische Aktivität der Zellen an LCM3 und LCM3H erwies sich als signifikant höher als derer an ACM und ACMH. Im Kollagen II ELISA wurde signifikant mehr Kollagen Typ II in den Zellen an LCM3, LCM3H und ACM im Vergleich zu Chondro festgestellt ( $p < 0,05$ ).

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigen die Zellen an den Polymeren aus LCM3 ein besseres Differenzierungsverhalten und metabolische Aktivität als die Zellen an ACM, wobei der Kontakt zu keinem der Materialien zu einer vermehrten Expression proinflammatorischen IL-6 führte. Auf Proteinebene scheinen sich die Zellen besser an den Materialien differenziert zu haben als sogar in der chondrogenen Differenzierungsgruppe ohne Materialkontakt. Bei beiden Materialien erwies sich eine zusätzliche Heparinbeschichtung als nachteilig. Ob durch einen gewebeschonenderen Abbau von ACM ein späterer Vorteil entsteht, müssen nun Langzeituntersuchungen nachgehen.

## 6 Summary

Hyaline cartilage as an avascular tissue has a small amount of regeneration potential. Chondral defects are getting replaced with more resilient and also less elastic and less shock absorbing fibrocartilage. Therefore new defects are formed, which are reaching progressively deeper. Despite many different therapeutic approaches osteochondral defects are still a great challenge in clinical practice. The number of osteoarthritis as a degenerative arthropathy increases dramatically worldwide due to an aging population. In this BMBF-project were designed implants out of synthetic polymers, which degrade into lactate (Poly-(D,L)-Laktid- $\epsilon$ -Caprolacton, LCM3) or into aminoacids (Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton, ACM). Additionally, the implants were produced with an anticoagulant heparin layer (LCM3H, ACMH). With this in vitro study the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in contact to the different polymers were compared among each other and in comparison with a control group with chondrogenic differentiation medium (Chondro) and with hMSC in control medium (Kontrolle) to give a recommendation to use one of them in a biphasic scaffold as the chondrogenic part.

The polymers were formed to scaffolds with a height of 1 mm and a diameter of 7 mm. In the context of endoprosthetic hip surgery on male patients ( $n = 6$ ) hMSC were isolated from the no longer required bone tissue of the head of femur. In the following the hMSC were chondrogenic differentiated using growth factors TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 and temporary using DMOG in contact to the scaffolds with and without heparin coating. On days 5, 10 and 15 of cultivating the expression of selected chondrogenic differentiation markers were determined. Additionally, on day 5 of culture a MTT-assay was done and the cell culture supernatants were used for an IL-6 ELISA. On day 20 of culture the cells were harvested for a collagen II ELISA. The statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis H test and SPSS statistics.

TRPV4 as an early chondrogenic gene showed for the material ACMH a significant reduction in relative geneexpression in comparison to Chondro ( $p = 0,037$ ). The mRNA-expression of the early chondrogenic differentiation marker SOX9 was significant higher at the scaffolds made out of LCM3 ( $p = 0,029$ ) und LCM3H ( $p = 0,031$ ) in comparison to the cells in control medium. The later chondrogenic differentiation markers showed no significant differences between the materials. The IL-6 content of

the cell culture supernatants was not significantly increased at any material. The metabolic activity was significant higher in the cells of LCM3 and LCM3H in comparison to ACM and ACMH. The cells at the polymers LCM3, LCM3H and ACM produced significant more collagen II in comparison to Chondro ( $p < 0,05$ ).

In summary, the cells in contact to the polymers made out of LCM3 showed a better chondrogenic differentiation and metabolic activity as the cells in contact to ACM, though the contact to none of the materials induced an increased expression of proinflammatory IL-6. On protein level the cells in contact to the materials seemed to differentiate even better than the cells in chondrogenic medium without material contact. For both materials an additional heparin layer proved to be disadvantageous. Whether a tissue-friendly degradation of ACM might be beneficial later, needs to be further investigated through long-term examinations.

## 7. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ACAN	Aggrecan-Gen
ACI	autologe Chondrozytenimplantation
ACM	Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
ACMH	Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton mit Heparinbeschichtung
AMIC	autologe matrixinduzierte Chondrogenese
ALP	Alkalische Phosphatase
B2M	Beta2-Mikroglobulin
BM-MSC	<i>bone marrow MSC</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein-2</i>
BMP-4	<i>bone morphogenetic protein-4</i>
BMP-6	<i>bone morphogenetic protein-6</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMPR1	<i>bone morphogenetic protein receptor 1</i>
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Chondro	Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium ohne Materialkontakt
Chondromedium	chondrogenes Differenzierungsmedium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL1A1	<i>collagen type I, alpha 1 chain</i> , Alpha-1-Typ-I-Kollagen

COL2A1	<i>collagen type II, alpha 1 chain</i> , Alpha-1-Typ-II-Kollagen
CRPS	<i>Complex Regional Pain Syndrom</i>
CT-Wert	<i>cycle thereshold</i> , Schwellenwertzyklus
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMOG	Dimethyloxalylglycine
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eUB-MSC	equine umbilikale Nabelschnur Blut MSC
FACS	<i>fluorensence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetales Kälberserum
g	<i>g-force</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> (Granzulozyten Kolonie stimulierender Faktor)
GDF-5	<i>growth differentitation factor-5</i>
h	<i>hours</i> - Stunden
hAC	<i>human articular cartilage</i>
HAPLN1	Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein 1
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIF-1 $\alpha$	Hyopxie-induzierbarer Faktor-1 alpha
HIF-2 $\alpha$	Hyopxie-induzierbarer Faktor-2 alpha
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hUC-MSC	<i>human umbilical cord</i> mesenchymale Stammzellen
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
LCM3	Poly-((D,L)-Lactid- $\epsilon$ -Caprolacton)-dimethacrylat
LCM3H	Poly-((D,L)-Lactid- $\epsilon$ -Caprolacton)-dimethacrylat mit Heparinbeschichtung
LDH	Laktatdehydrogenase

LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro
MACI	autologe Chondrozytenimplantation
MACT	autologe Chondrozentransplantation
MAPK	<i>p38/mitogen-activated protein kinase</i>
mM	millimolar
min	Minute
MMP	<i>matrix metalloprotease</i> , Matrixmetalloprotease
MSC	mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
OC	Osteocalcin
OD	<i>optical density</i> , optische Dichte
P	Passage
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Poly-ε-Caprolacton
PEG	Polyethylene Glycol
PGA	Poly-L-Glutaminsäure
PGE2	Prostaglandin E2
PLA	Poly-(D, L)-Laktat
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PLLA	<i>Poly- (L-lactide) acid</i> , Poly L-Laktatsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
RUNX2	<i>runt-related transcription factor-2</i>
s	Sekunde
S.	Seite
SADAO	<i>Slow Acting Drugs for Osteoarthritis</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SOX9	<i>sex determining region Y (SRY)-box transcription factor 9</i>
SVF	stromale vaskuläre Fraktion
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFβ-1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRPV4	<i>transient receptor potential vanilloid cation channel 4</i>
u. a.	unter anderem
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZK	Zellkultur

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Extrazelluläre Matrix des Knorpels mit fokussierter Darstellung eines Aggrecan-Aggregats .....	4
Abb. 2:	Schaudiagramm der Zusammenhänge von Arthrose und Komorbiditäten.....	6
Abb. 3:	Ansätze zur Heilung von Knorpeldefekten. Modifiziert nach Makris et al., 2015 .....	13
Abb. 4:	Übersicht beeinflussender Faktoren auf die chondrogenen Differenzierung .	18
Abb. 5:	Isolierung von hMSC aus einem Caput femoris A: Präparation eines Caput femoris mit einer Zange B: Knochenfragmente in Hibernate A Medium mit 10 % FBS C: Inkubation der Fragmente auf einer Rüttelplatte D: Zentrifugation der Zellpellets E: gewonnenes Zellpellet F: Zellen in Zählkammer mit Trypanblau gefärbt .....	24
Abb. 6:	Belegungspläne A: Polymere in der 48-Well-Platte B: Schematische Darstellung des Belegungsplanes mit Doppelbestimmung.	28
Abb. 7:	Versuchsaufbau in der 48-Well-Platte mit MTT-Farbstoff nach 4 h Inkubation .....	28
Abb. 8:	Schmelzkurven der <i>real-time</i> PCR .....	35
Abb. 9:	Die zellmorphologische Entwicklung der Kontrolle und Chondro anhand	

der ZK 137 P 11 in 10-facher Vergrößerung von Tag 5–20.....	42
Abb. 10: Die zellmorphologische Entwicklung der Kontrolle und Chondro anhand der ZK 137 P 11 in 32-facher Vergrößerung von Tag 5–20.....	43
Abb. 11.1: Chondrogene Differenzierung an den Polymeren in 10-facher Vergrößerung anhand der ZK 124 P 11 Tag 5 und 10.....	45
Abb. 11.2: Chondrogene Differenzierung an den Polymeren in 10-facher Vergrößerung anhand der ZK 124 P 11 Tag 15 und 20.....	46
Abb. 12: Zell-Polymerkontakt in 32-facher Vergrößerung an Tag 10 dargestellt an der ZK 170 P 8.....	47
Abb. 13: Relative Genexpression von SOX9 in den verschiedenen Zellgruppen.....	48
Abb. 14: Relative Genexpression von TRPV4 in den verschiedenen Zellgruppen.....	49
Abb. 15: Relative Genexpression von ACAN in den verschiedenen Zellgruppen.....	50
Abb. 16: Relative Genexpression von HAPLN1 in den verschiedenen Zellgruppen....	51
Abb. 17: Relative Genexpression von RUNX2 in den verschiedenen Zellgruppen.....	52
Abb. 18: Relative Genexpression von COL1A1 in den verschiedenen Zellgruppen....	54
Abb. 19: Die PCR-Produkte von COL2A1 als Elektrophorese am Beispiel von ZK 168 P9 Tag 15.....	55
Abb. 20: MTT-Assay der verschiedenen Zellgruppen von Tag 5 der Versuche.....	56
Abb. 21: IL-6 ELISA der verschiedenen Zellgruppen von Tag 5 der Versuche.....	57
Abb. 22: Kollagen II ELISA der verschiedenen Zellgruppen von Tag 20 der Versuche.....	58

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete hMSC.....	25
Tab. 2: Medien Zusammensetzung: MesenPro 20 % .....	29
Tab. 3: Medien Zusammensetzung: Kontrollmedium .....	30
Tab. 4: Medien Zusammensetzung: Chondrogenes Differenzierungsmedium.....	30
Tab. 5: Primer .....	33
Tab. 6: Standardisiertes <i>real-time</i> PCR-Protokoll .....	34

## 8. Literaturverzeichnis

- Abhishek, A. & Doherty, M. (2013). Diagnosis and clinical presentation of osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 39(1), Seite (S.) 45-66.  
<https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.10.007>
- Abt, H. P., Neun, O., Zivko, G., Vehn, C. & Hoffmann, R. (2011). Posttraumatische Arthrose des oberen Sprunggelenks. *Trauma und Berufskrankheit*, 13(3), S. 198-203.  
<https://doi.org/10.1007/s10039-011-1746-8>
- Aigner, T. & Stöve, J. (2003). Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), S. 1569-1593.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.009>
- Aizawa, T., Kon, T., Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. (2001). Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(5), S. 785-796.  
[https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(00\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(00)00078-4)
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. & de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development*, 16(21), S. 2813-2828.  
DOI: 10.1101/gad.1017802
- Akkiraju, H. & Nohe, A. (2015). Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *Journal of Developmental Biology*, 3(4), S. 177-192.  
<https://doi.org/10.3390/jdb3040177>
- Alfejew, S. (1926). Über die embryonale Histogenese der kollagenen und reticulären Fasern des Bindegewebes bei Säugetieren. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 3(2), S. 149-168.  
<https://doi.org/10.1007/BF00376689>
- Allen, K. D. & Golightly, Y. M. (2015). State of the evidence. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(3), S. 276-283.

- <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000161>
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), S. 5350-5354.
- <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5350>
- Anderson, D. D., Chubinskaya, S., Guilak, F., Martin, J. A., Oegema, T. R., Olson, S. A. & Buckwalter, J. A. (2011). Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(6), S. 802-809.
- <https://doi.org/10.1002/jor.21359>
- Angele, P., Yoo, J. U., Smith, C., Mansour, J., Jepsen, K. J., Nerlich, M. & Johnstone, B. (2003). Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(3), S. 451-457.
- [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00230-9)
- Archer, C. W. & Francis-West, P. (2003). The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(4), S. 401-404.
- [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00301-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00301-1)
- Arden, N. K., Perry, T. A., Bannuru, R. R., Bruyère, O., Cooper, C., Haugen, I. K., Hochberg, M. C., McAlindon, T. E., Mobasheri, A. & Reginster, J. Y. (2021). Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(1), S. 59-66.
- <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00523-9>
- Ayerst, B. I., Smith, R. A., Nurcombe, V., Day, A. J., Merry, C. L. & Cool, S. M. (2017). Growth differentiation factor 5-mediated enhancement of chondrocyte phenotype is inhibited by heparin: Implications for the use of heparin in the clinic and in tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part A*, 23(7-8), S. 275-292.
- <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0364>
- Ayhan, E., Kesmezacar, H. & Akgun, I. (2014). Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*, 5(3), S. 351-361.

- <https://doi.org/10.5312/wjo.v5.i3.351>
- Bae, D. K., Yoon, K. H. & Song, S. J. (2006). Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 22(4), S. 367-374.
- <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2006.01.015>
- Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M. A., Kraus, V. B., Lohmander, L. S., Abbott, J. H., Bhandari, M., Blanco, F. J., Espinosa, R., Haugen, I. K., Lin, J., Mandl, L. A., Moilanen, E., Nakamura, N., Snyder-Mackler, L., Trojian, T., Underwood, M. & McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11), S. 1578-1589.
- <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.011>
- Bannuru, R. R., McAlindon, T. E., Sullivan, M. C., Wong, J. B., Kent, D. M. & Schmid, C. H. (2015). Effectiveness and implications of alternative placebo treatments: A systematic review and network meta-analysis of osteoarthritis trials. *Annals of Internal Medicine*, 163(5), S. 365-372.
- <https://doi.org/10.7326/M15-0623>
- Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B. & Murphy, J. M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*, 268(2), S. 189-200.
- <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
- Behrens, P. (2005). Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. *Arthroskopie*, 18(3), S. 193-197.
- <https://doi.org/10.1007/s00142-005-0316-0>
- Benninghoff, A., Drenckhahn, D., (2003). Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 1. *Urban & Fischer*, München, Jena, 16. Auflage, S. 214-228; S. 254-260.
- Bentley, G., Biant, L. C., Vijayan, S., Macmull, S., Skinner, J. A. & Carrington, R. W. J. (2012). Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty

- for symptomatic articular cartilage lesions of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 94(4), S. 504-509.  
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B4.27495>
- Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, S. 127-152.  
[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Berridge, M. V. & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), S. 474-482.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics*, 22(1), S. 85-89.  
<https://doi.org/10.1038/8792>
- Billing, A. M., Ben Hamidane, H., Dib, S. S., Cotton, R. J., Bhagwat, A. M., Kumar, P., Hayat, S., Yousri, N. A., Goswami, N., Suhre, K., Rafii, A. & Graumann, J. (2016). Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Scientific reports*, 6(1), S. 1-15.  
<https://doi.org/10.1038/srep21507>
- Blaney Davidson, E. N., Vitters, E. L., van Lent, P. L., van de Loo, F. A., van den Berg, W. B. & van der Kraan, P. M. (2007). Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. *Arthritis Research & Therapy*, 9(5), S. 1-11.  
<https://doi.org/10.1186/ar2305>
- Bohnsack, M. (2015). Sport mit Endoprothese: Da geht viel, aber nicht alles. *Orthopädie & Rheuma*, 18(4), S. 26-29.  
<https://doi.org/10.1007/s15002-015-0657-7>

- Boland, G. M., Perkins, G., Hall, D. J. & Tuan, R. S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(6), S. 1210-1230.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.20284>
- Bony, C., Cren, M., Jorgensen, C., Domergue, S., Toupet, K., Jorgensen, C. & Noël, D. (2016). Adipose Mesenchymal Stem Cells Isolated after Manual or Water-jet-Assisted Liposuction Display Similar Properties. *Frontiers in Immunology*, 6, S. 655.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00655>
- Bora, P. & Majumdar, A. S. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), S. 145.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>
- Bös, L. & Ellermann, A. (2003). Indikation und Ergebnisse der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation (Mosaikplastik). *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 54(6).  
 [Online im Internet:] URL: [https://www.germanjournalsportsmedicine.com/fileadmin/content/archiv2003/heft06/B%C3%B6s\\_2.pdf](https://www.germanjournalsportsmedicine.com/fileadmin/content/archiv2003/heft06/B%C3%B6s_2.pdf)  
 [Stand: 11.10.2021, 16:32]
- 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. *New England Journal of Medicine*, 331(14), S. 889-895.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>
- Brouwer, R. W., Huizinga, M. R., Duivenvoorden, T., van Raaij, T. M., Verhagen, A. P., Bierma-Zeinstra, S. M. & Verhaar, J. A. (2014). Osteotomy for treating knee osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD004019.pub4>
- Brown, T., Mackey, K. & Du, T. (2004). Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. *Current Protocols in Molecular Biology*, 67(1), S. 4-9.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0409s67>
- Bundeszentrale für politische Bildung (2022) Gesundheitsausgaben  
 [Online im Internet:] URL: <https://www.bpb.de/kurz-knapp/zahlen-und-fakten/soziale-situation-in-deutschland/61804/gesundheitsausgaben/>

[Stand: 17.04.2023, 13:57]

- Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112 (2) S. 195-203.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), S. 169-193.  
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Caron, M. M. J., Emans, P. J., Coolen, M. M. E., Voss, L., Surtel, D. A. M., Cremers, A., van Rhijn, L. W. & Welting, T. J. M. (2012). Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(10), S. 1170-1178.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016>
- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U. & Boonyuen, U. (2019). Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*, 20, S. 1-14.  
<https://doi.org/10.1186/s12858-019-0108-1>
- Chariyev-Prinz, F., Szojka, A., Neto, N., Burdis, R., Monaghan, M. G. & Kelly, D. J. (2023). An assessment of the response of human MSCs to hydrostatic pressure in environments supportive of differential chondrogenesis. *Journal of Biomechanics*, 154, S. 111590.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2023.111590>
- Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J. C. & Kahn, A. (1990). Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction: Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *European Journal of Biochemistry*, 187(3), S. 691-698.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15355.x>
- Chen, L., Liu, J., Guan, M., Zhou, T., Duan, X. & Xiang, Z. (2020). Growth factor and Its polymer scaffold-based delivery system for cartilage tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, S. 6097-6111.  
DOI: 10.2147/IJN.S249829

- Chen, Y. R., Yan, X., Yuan, F. Z., Ye, J., Xu, B. B., Zhou, Z. X., Mao, Z. M., Guan, J., Song, Y. F., Sun, Z. W., Wang, X. J., Chen, Z., Y., Wang, D. Y., Fan, B. S., Yang, M. Song, S. T., Jiang, D. & Yu, J. K. (2020). The use of peripheral blood-derived stem cells for cartilage repair and regeneration in vivo: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, S. 404.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00404>
- Chen, H., Tan, X. N., Hu, S., Liu, R. Q., Peng, L. H., Li, Y. M. & Wu, P. (2021). Molecular mechanisms of chondrocyte proliferation and differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 664168.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664168>
- Clark, D. J., Tawfik, V. L., Tajerian, M. & Kingery, W. S. (2018). Autoinflammatory and autoimmune contributions to complex regional pain syndrome. *Molecular Pain*, 14, S. 1744806918799127.  
<https://doi.org/10.1177/1744806918799127>
- Clementi, M., Menzo, S., Bagnarelli, P., Manzin, A., Valenza, A. & Varaldo, P. E. (1993). Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods and Applications*, 2, S. 191-196.  
<https://doi.org/10.1101/gr.2.3.191>
- Coleman, C. M., Vaughan, E. E., Browe, D. C., Mooney, E., Howard, L. & Barry, F. (2013). Growth differentiation factor-5 enhances in vitro mesenchymal stromal cell chondrogenesis and hypertrophy. *Stem Cells and Development*, 22(13), S. 1968-1976.  
<https://doi.org/10.1089/scd.2012.0282>
- D'Ambrosi, R., Valli, F., De Luca, P., Ursino, N. & Uselli, F. G. (2019). MaioRegen osteochondral substitute for the treatment of knee defects: A systematic review of the Literature. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6), S. 783.  
<https://doi.org/10.3390/jcm8060783>
- Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J. & Tuan, R. S. (2006). Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 24(6), S. 1487-1495.  
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0415>

- Derynck, R. & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*, 425, S. 577-584.  
<https://doi.org/10.1038/nature02006>
- Desancé, M., Contentin, R., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Branly, T., Jacquet, S., Betsch, J., Batho, A., Legendre, A., Audigié, F., Galéra, P. & Demoor, M. (2018). Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), S. 537.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19020537>
- Di Angelantonio, E., Bhupathiraju, S. N., Wormser, D., Gao, P., Kaptoge, S., De Gonzalez, A. B. & Hu, F. B. (2016). Body-mass index and all-cause mortality: Individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *The Lancet*, 388(10046), S. 776-786.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30175-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30175-1)
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), S. 315-317.  
DOI: 10.1080/14653240600855905
- Dragoo, J. L., Danial, C. M., Braun, H. J., Pouliot, M. A. & Kim, H. J. (2012). The chondrotoxicity of single-dose corticosteroids. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20(9), S. 1809-1814.  
<https://doi.org/10.1007/s00167-011-1820-6>
- Dusemund, B. & Barrach, H. J. (1982). Double-antibody enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of collagen types I and II. *Journal of Immunological Methods*, 50(3), S. 255-268.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90163-6)
- El-Tamer, A., Hinze, U. & Chichkov, B. N. (2017). 3D Mikro-und Nano-Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation. In: Lachmayer, R., Lippert, R. Additive Manufacturing Quantifiziert. *Springer Vieweg*, Berlin, Heidelberg. S. 117-132.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-54113-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54113-5_8)

- Enochson, L., Stenberg, J., Brittberg, M. & Lindahl, A. (2014). GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(4), S. 566-577.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.004>
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), S. 871-874.  
[https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Erickson, A. E., Sun, J., Lan Levensgood, S. K., Swanson, S., Chang, F. C., Tsao, C. T. & Zhang, M. (2019). Chitosan-based composite bilayer scaffold as an in vitro osteochondral defect regeneration model. *Biomedical Microdevices*, 21, S. 1-16.  
<https://doi.org/10.1007/s10544-019-0373-1>
- Ethgen, O., Bruyère, O., Richy, F., Dardennes, C. & Reginster, J. Y. (2004). Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty: A qualitative and systematic review of the literature. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 86(5), S. 963-974.  
<https://doi.org/10.2106/00004623-200405000-00012>
- Evans, J. T., Evans, J. P., Walker, R. W., Blom, A. W., Whitehouse, M. R. & Sayers, A. (2019). How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *The Lancet*, 393(10172), S. 647-654.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31665-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31665-9)
- Eyre, D. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 4(1), S. 1-6.  
<https://doi.org/10.1186/ar380>
- Falah, M., Nierenberg, G., Soudry, M., Hayden, M. & Volpin, G. (2010). Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *International Orthopaedics*, 34(5), S. 621-630.  
<https://doi.org/10.1007/s00264-010-0959-y>
- Falcon, J. M., Chirman, D., Veneziale, A., Morman, J., Bolten, K., Kandel, S., Querido, W., Freeman, T. & Pleshko, N. (2021). DMOG negatively impacts tissue engineered cartilage development. *Cartilage*, 13(2), S. 722-733.  
<https://doi.org/10.1177/1947603520967060>

- Felson, D. T. (1988). Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiologic Reviews*, 10(1), S. 1-28.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036019>
- Ferguson, C. M., Schwarz, E. M., Reynolds, P. R., Puzas, J. E., Rosier, R. N. & O'Keefe, R. J. (2000). Smad2 and 3 mediate transforming growth factor- $\beta$ 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology*, 141(12), S. 4728-4735.  
<https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7848>
- Ferre, F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *Genome Research*, 2(1), S. 1-9.  
<https://doi.org/10.1101/gr.2.1.1>
- Findlay, D. M. & Atkins, G. J. (2014). Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Current Osteoporosis Reports*, 12, S. 127-134.  
<https://doi.org/10.1007/s11914-014-0192-5>
- Fortier, L. A., Barker, J. U., Strauss, E. J., McCarrel, T. M. & Cole, B. J. (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(10), S. 2706-2715.  
<https://doi.org/10.1007/s11999-011-1857-3>
- Fox, A. J. S., Bedi, A. & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition and function. *Sports Health*, 1(6), S. 461-468.  
<https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Freyria, A. M. & Mallein-Gerin, F. (2012). Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury*, 43(3), S. 259-265.  
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.035>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4), S. 393-403.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Fuchs, J., Rabenberg, M. & Scheidt-Nave, C. (2013). Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt*, 56, S. 678-686.  
<https://doi.org/10.1007/s00103-013-1687-4>

- Fuchs, J., Ronny K. & Scheidt-Nave, C. (2017). 12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*, 2 (3), S. 55-60.  
<https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-054>
- Furumatsu, T., Ozaki, T. & Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(5), S. 1198-1204.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.10.032>
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y. & Asahara, H. (2005). Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding Protein/p300 recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), S. 8343-8350.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413913200>
- Futrega, K., Robey, P. G., Klein, T. J., Crawford, R. W. & Doran, M. R. (2021). A single day of TGF- $\beta$ 1 exposure activates chondrogenic and hypertrophic differentiation pathways in bone marrow-derived stromal cells. *Communications Biology*, 4(1), S. 1-12.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01520-0>
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 8(2), S. 1-6.  
<https://doi.org/10.1186/ar1917>
- Galéra, P., Rédini, F., Vivien, D., Bonaventure, J., Penfornis, H., Loyau, G. & Pujol, J. P. (1992). Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process. *Experimental Cell Research*, 200(2), S. 379-392.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90186-C](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90186-C)
- Gerlier, D. & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1-2), S. 57-63.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)
- Ghorbani, S., Tiraihi, T. & Soleimani, M. (2018). Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells using composite 3D scaffold combined with valproic acid induction. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(6), S. 702-715.  
<https://doi.org/10.1177/0885328217741903>

- Ginouves, M., Carne, B., Couppie, P. & Prevot, G. (2014). Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against leishmania spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), S. 2131-2138.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00201-14>
- Goldberg, A., Mitchell, K., Soans, J., Kim, L. & Zaidi, R. (2017). The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: A systematic review. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 12, S. 1-30.  
<https://doi.org/10.1186/s13018-017-0534-y>
- Goldring, M. B., Otero, M., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. & Li, Y. (2008). Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(3), S. 75-82.  
<https://doi.org/10.1136/ard.2008.098764>
- Goyal, D., Keyhani, S., Lee, E. H. & Hui, J. H. P. (2013). Evidence-based status of microfracture technique: A systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 29(9), S. 1579-1588.  
<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2013.05.027>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), S. 59-72.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Grande, D. A., Halberstadt, C., Naughton, G., Schwartz, R. & Manji, R. (1997). Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(2), S. 211-220.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199702\)34:2<211::AID-JBM10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199702)34:2<211::AID-JBM10>3.0.CO;2-L)
- Gstraunthaler, G. & Lindl, T. (2021). Zell- und Gewebekultur. *Springer*, Berlin 8. Auflage, S.126-130.  
[doi:10.1007/978-3-662-62606-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-62606-1)
- Gunnell, L. M., Jonason, J. H., Loiselle, A. E., Kohn, A., Schwarz, E. M., Hilton, M. J. & O'Keefe, R. J. (2010). TAK1 regulates cartilage and joint development via the MAPK and BMP signaling pathways. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(8), S. 1784-1797.

- <https://doi.org/10.1002/jbmr.79>
- Hamann, A., Münzberg, H., Algenstaedt, P. & Tafel, J. (2001). Molekulare Grundlagen der Adipositas. *Herz*, 26, S. 178-184.
- <https://doi.org/10.1007/PL00002020>
- Hardingham, T. E. (1979). The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochemical Journal*, 177(1), S. 237-247.
- <https://doi.org/10.1042/bj1770237>
- Hardingham, T. E. (2010). Fell-muir lecture: Cartilage 2010 - The known unknowns. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(3), S. 203-209.
- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00719.x>
- Harnik, M. A., Kesselring, P., Ott, A., Urman, R. D. & Luedi, M. M. (2023). Complex regional pain syndrome (CRPS) and the value of early detection. *Current Pain and Headache Reports*, 27(9), S. 417-427.
- <https://doi.org/10.1007/s11916-023-01124-3>
- Hasan, M. & Shuckett, R. (2010). Clinical features and pathogenetic mechanisms of osteoarthritis of the hip and knee. *BC Medical Journal*, 52(8), S. 393-398.
- [Online im Internet:] URL: <https://bcmj.org/articles/clinical-features-and-pathogenetic-mechanisms-osteo%C2%ADarthritits-hip-and-knee>
- [Stand: 09.09.2022, 10:12]
- Hascall, V. C. (1977). Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *Journal of Supramolecular Structure*, 7(1), S. 101-120.
- <https://doi.org/10.1002/jss.400070110>
- Hashimoto, S., Creighton-Achermann, L., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R. D. & Lotz, M. (2002). Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(3), S. 180-187.
- <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0505>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9, S. 1-14.
- <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hauptmann, N., Lian, Q., Ludolph, J., Rothe, H., Hildebrand, G. & Liefelth, K. (2019). Biomimetic designer scaffolds made of D, L-lactide-ε-caprolactone polymers by 2-photon polymerization. *Tissue Engineering Part B*, 25(3), S. 167-186.

- <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0284>
- Hauptmann, N., Ludolph, J., Rothe, H., Rost, J., Krupp, A., Lechner, J., Kohlhaas, S., Winkler, M., Stender B., Hildebrand, G. & Liefeith, K. (2022). Poly-alanine- $\epsilon$ -caprolacton-methacrylate as scaffold material with tuneable biomechanical properties for osteochondral implants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), S. 3115.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23063115>
- Hayflick, L. (1984). Intracellular determinants of cell aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 28(2-3), S. 177-185.  
[https://doi.org/10.1016/0047-6374\(84\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0047-6374(84)90018-6)
- He, W. W., Kuang, M. J., Zhao, J., Sun, L., Lu, B., Wang, Y., Ma, J. X. & Ma, X. L. (2017). Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid and corticosteroid for knee osteoarthritis: A meta-analysis. *International Journal of Surgery*, 39, S. 95-103.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2017.01.087>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), S. 986-994.  
<https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. (1997). TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659), S. 465-471.  
<https://doi.org/10.1038/37284>
- Henrotin, Y., Marty, M. & Mobasher, A. (2014). What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas*, 78(3), S. 184-187.  
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.015>
- Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H. & Myoui, A. (2006). Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), S. 31079- 31092.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M602296200>
- Hisada, R. & Yagi, T. (1977). 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate: A photochemically stable electron mediator between NADH and various electron acceptors. *The Journal of Biochemistry*, 82(5), S. 1469-1473.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131836>

- Hoeksma, H. L., Dekker, J., Ronday, H. K., Heering, A., van der Lubbe, N., Vel, C., Breedveld, F. C. & van den Ende, C. H. M. (2004). Comparison of manual therapy and exercise therapy in osteoarthritis of the hip: A randomized clinical trial. *Arthritis Care & Research*, 51(5), S. 722-729.  
<https://doi.org/10.1002/art.20685>
- Hoff, P., Buttgereit, F., Burmester, G. R., Jakstadt, M., Gaber, T., Andreas, K., Matziolis, G., Perka, C. & Röhner, E. (2013). Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *International Orthopaedics*, 37(1), S. 145-151.  
<https://doi.org/10.1007/s00264-012-1724-1>
- Hoppler, S. & Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *Journal of Cell Science*, 120(3), S. 385-393.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.03363>
- Huang, J., Huang, Z., Liang, Y., Yuan, W., Bian, L., Duan, L., Rong, Z., Xiong, J., Wang, D. & Xia, J. (2021). 3D printed gelatin/hydroxyapatite scaffolds for stem cell chondrogenic differentiation and articular cartilage repair. *Biomaterials Science*, 9(7), S. 2620-2630.  
DOI: 10.1039/D0BM02103B
- Huang, M. H., Li, S., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Vacanti, C. A., Braud, C. & Vert, M. (2004). Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol). *Journal of Biomedical Materials Research*, 69(3), S. 417-427.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30008>
- Hutmacher, D., Hürzeler, M. B. & Schliephake, H. (1996). A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 11(5).  
PMID: 8908867
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), S. 2529-2543.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)

- Indrawattana, N., Chen, G., Tadokoro, M., Shann, L. H., Ohgushi, H., Tateishi, T., Tanaka, J. & Bunyaratvej, A. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), S. 914-919.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.029>
- Jacob, J., Aggarwal, A., Aggarwal, A., Bhattacharyya, S., Kumar, V., Sharma, V. & Sahni, D. (2022). Senescent chondrogenic progenitor cells derived from articular cartilage of knee osteoarthritis patients contributes to senescence-associated secretory phenotype via release of IL-6 and IL-8. *Acta Histochemica*, 124(3), S. 151867.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151867>
- Jalali, M., Zaborowska, J. & Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In basic science methods for clinical researchers. *Academic Press*. S.1-18.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
- Johnson, L. L. (1986). Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 2(1), S. 54-69.  
[https://doi.org/10.1016/S0749-8063\(86\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0749-8063(86)80012-3)
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), S. 265-272.  
<https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
- Kalra, K. & Tomar, P. C. (2014). Stem cell: Basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), S. 919-930. [Online im Internet:] URL: <https://www.imedpub.com/articles-pdfs/stem-cell-basics-classification-andapplications.pdf>  
[Stand: 11.11.2021, 08:46]
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P. & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), S. 33-42.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>

- Kelly, S. J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *Journal of Experimental Zoology*, 200(3), S. 365-376.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1402000307>
- Kim, S. I., Kwak, J. H., Zachariah, M., He, Y., Wang, L. & Choi, M. E. (2007). TGF- $\beta$ -activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF- $\beta$ 1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(5), S. 1471-1478.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00485.2006>
- Kimble, R. B., Bain, S. & Pacifici, R. (1997). The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(6), S. 935-941.  
<https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.6.935>
- Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), S. 443-475.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002303>
- Krammer, P. H. (2000). Apoptose. *Deutsches Aerzteblatt-Aerztliche Mitteilungen-Ausgabe A*, 97(25), S. 1752-1758.  
 [Online im Internet:] URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/23461/Apoptose>  
 [Stand: 12.11.2022, 13:19]
- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M. & Südkamp, N. (2006). Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(11), S. 1119-1125.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>
- Kurz, B., Lemke, A. K., Fay, J., Pufe, T., Grodzinsky, A. J. & Schünke, M. (2005). Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 187(5-6), S. 473-485.  
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2005.07.003>
- Lamouille, S. & Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *Journal of Cell Biology*, 178(3), S. 437-451.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200611146>
- Langer, R. & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260(5110), S. 920-926.

- <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Latourte, A., Cherifi, C., Maillet, J., Ea, H. K., Bouaziz, W., Funck-Brentano, T., Cohen-Solal, M., Hay, E. & Richette, P. (2016). Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(4), S. 748-755.
- <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209757>
- Lawand, N. B., McNearney, T. & Westlund, K. N. (2000). Amino acid release into the knee joint: Key role in nociception and inflammation. *Pain*, 86(1), S. 69-74.
- [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00311-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00311-5)
- Lee, J., Wee, S., Gunaratne, J., Chua, R. J. E., Smith, R. A., Ling, L., Fernig, D. G., Swaminathan, K., Nurcombe, V. & Cool, S. M. (2015). Structural determinants of heparin–transforming growth factor- $\beta$ 1 interactions and their effects on signaling. *Glycobiology*, 25(12), S. 1491-1504.
- <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv064>
- Legendre, F., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Gruchy, N., Mallein-Gerin, F., Leclercq, S., Demoor, M. & Galéra, P. (2017). Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$ 1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs. *Scientific Reports*, 7(1), S. 3406.
- <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03579-y>
- Legrand, C., Bour, J. M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudthke, M., Kretzmer, G., Demangel, C. & Duval, D. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *Journal of Biotechnology*, 25(3), S. 231-243.
- [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90158-6)
- Lefebvre, V., Angelozzi, M. & Haseeb, A. (2019). Sox9 in cartilage development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 61, S. 39-47.
- <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.008>
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y. & Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(12), S. 2195-2214.
- <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.019>

- Lenzen-Schulte, M. (2017). Orthopädenkongress: Wenn die Prothese nicht mehr hält. *Deutsches Aerzteblatt*, 114(48), S. 2281-2286.  
 [Online im Internet:] URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/195049/Orthopaedenkongress-Wenn-die-Prothese-nicht-mehr-haelt>  
 [Stand: 24.10.2020, 14:41]
- Leong, D. T., Gupta, A., Bai, H. F., Wan, G., Yoong, L. F., Too, H. P., Chew, F. T. & Hutmacher, D. W. (2007). Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*, 28(2), S. 203-210.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.011>
- Lerner, U. H. & Ohlin, A. (1993). Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  can stimulate bone resorption in cultured mouse calvariae by a prostaglandin-independent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(2), S. 147-155.  
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650080205>
- Levett, P. A., Melchels, F. P., Schrobback, K., Hutmacher, D. W., Malda, J. & Klein, T. J. (2014). A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomaterialia*, 10(1), S. 214-223.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.005>
- Levinson, C., Lee, M., Applegate, L. A., & Zenobi-Wong, M. (2019). An injectable heparin-conjugated hyaluronan scaffold for local delivery of transforming growth factor  $\beta$ 1 promotes successful chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, 99, S. 168-180.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.017>
- Li, X., Ding, J., Wang, J., Zhuang, X. & Chen, X. (2015). Biomimetic biphasic scaffolds for osteochondral defect repair. *Regenerative Biomaterials*, 2(3), S. 221-228.  
<https://doi.org/10.1093/rb/rbv015>
- Liefeith, K., Hauptmann, N., Brandes, N., Wloka, T., Czich, S., Ludolph, J., Rost, J., Rothe, H., Hildebrand, G., Gumbert, J., Mardare, C., Welzel, J., Noll, M., Krupp, A., Lechner, J., Kohlhaas, S., Mair, V., Dupuis, Y., Houbertz, R., Wiedenmann, J., Stender, B., Mokros, J., Liebelt, M., Oberbach, T., Ortman, C., Lehner, V., Biehl, C., Czub, L., Fibbe, M. J., Heger, I. M., May, P., Plit, F. J., Rieble Fernandez-Tenllado, A.T., Sommer, U., Spreda, M., Tüngler,

- T. L., Wagner, M., Wattenbach, J. M., Wischniewski, F., Wunderer, M., Lips, K. S. (2024). Erforschung eines industriellen laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens für hierarchisch strukturierte Knorpel-Knochen-Implantate auf Polymerbasis (Poly-IMPLANT-Druck)  
 [Online im Internet:] URL: <https://promatleben.de/de/projekte/projekte-alphabetisch/poly-implant-druck1/>  
 [Stand: 07.07.2024, 12:44]
- Liu, S. H., Dubé, C. E., Eaton, C. B., Driban, J. B., McAlindon, T. E. & Lapane, K. L. (2018). Longterm effectiveness of intraarticular injections on patient-reported symptoms in knee osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, 45(9), S. 1316-1324.  
<https://doi.org/10.3899/jrheum.171385>
- Long, H., Liu, Q., Yin, H., Wang, K., Diao, N., Zhang, Y., Lin, J. & Guo, A. (2022). Prevalence trends of site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: Findings from the global burden of disease study 2019. *Arthritis & Rheumatology*, 74(7), S. 1172-1183.  
<https://doi.org/10.1002/art.42089>
- Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1), S. 21-34.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157>
- Marappagounder, D., Somasundaram, I., Dorairaj, S. & Sankaran, R. J. (2013). Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 18(1), S. 75-88.  
<https://doi.org/10.2478/s11658-012-0040-5>
- Maruo, S., Nakamura, O. & Kawata, S. (1997). Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Optics Letters*, 22(2), S. 132-134.  
<https://doi.org/10.1364/OL.22.000132>
- Mazziotti, G., Canalis, E. & Giustina, A. (2010). Drug-induced osteoporosis: Mechanisms and clinical implications. *The American Journal of Medicine*, 123(10), S. 877-884.

- <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.028>
- McAlindon, T. E., LaValley, M. P., Harvey, W. F., Price, L. L., Driban, J. B., Zhang, M. & Ward, R. J. (2017). Effect of intra-articular triamcinolone vs saline on knee cartilage volume and pain in patients with knee osteoarthritis: A randomized clinical trial. *Jama*, 317(19), S. 1967-1975.
- <https://doi.org/10.1001/jama.2017.5283>
- Meheux, C. J., McCulloch, P. C., Lintner, D. M., Varner, K. E. & Harris, J. D. (2016). Efficacy of intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: A systematic review. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 32(3), S. 495-505.
- <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.08.005>
- Melton, J. T., Wilson, A. J., Chapman-Sheath, P. & Cossey, A. J. (2010). TruFit CB® bone plug: Chondral repair, scaffold design, surgical technique and early experiences. *Expert Review of Medical Devices*, 7(3), S. 333-341.
- <https://doi.org/10.1586/erd.10.15>
- Merk, R. & Rudigier, J. (2002). Die Denervierung von Fingergelenken als Alternative zur Arthrodese und Endoprothese. *Handchirurgie·Mikrochirurgie·Plastische Chirurgie*, 34(03), S. 182-186.
- DOI: 10.1055/s-2002-33689
- Michael, J. W. P., Schlüter-Brust, K. U. & Eysel, P. (2010). The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Arzteblatt International*, 107(9), S. 152-162.
- <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0152>
- Minas, T., Gomoll, A. H., Rosenberger, R., Royce, R. O. & Bryant, T. (2009). Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *The American Journal of Sports Medicine*, 37(5), S. 902-908.
- <https://doi.org/10.1177/0363546508330137>
- Mirzaei, S., Karkhaneh, A., Soleimani, M., Ardeshirylajimi, A., Seyyed Zonouzi, H., & Hanaee-Ahvaz, H. (2017). Enhanced chondrogenic differentiation of stem cells using an optimized electrospun nanofibrous PLLA/PEG scaffolds loaded with glucosamine. *Journal of Biomedical Materials Research*, 105(9), S. 2461-2474.
- <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36104>

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), S. 55-63.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Muckelt, P. E., Roos, E. M., Stokes, M., McDonough, S., Grønne, D. T., Ewings, S. & Skou, S. T. (2020). Comorbidities and their link with individual health status: A cross-sectional analysis of 23,892 people with knee and hip osteoarthritis from primary care. *Journal of Comorbidity*, 10, S.1-11.  
<https://doi.org/10.1177/2235042X20920456>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), S. 56-65.  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Murali, S., Rai, B., Dombrowski, C., Lee, J. L. J., Lim, Z. X. H., Bramono, D. S., Ling, L., Bell, T., Hinkley, S., Nathan, S. S., Hui, J. H., Wong, H. K., Nurcombe, V. & Cool, S. M. (2013). Affinity-selected heparan sulfate for bone repair. *Biomaterials*, 34(22), S. 5594-5605.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.017>
- Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., Shiojiri, S., Tashiro, K., Suzuki, Y., Nishimura, R., Kuhara, S., Sugano, S., Yoneda, T. & Matsuda, A. (2007). Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), S. 32158-32167.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M706158200>
- Musumeci, G., Aiello, F. C., Szychlinska, M. A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P. & Mobasher, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: Risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), S. 6093-6112.  
<https://doi.org/10.3390/ijms16036093>
- Murphy, M. K., Huey, D. J., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. (2015). TGF- $\beta$ 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells*, 33(3), S. 762-773.  
<https://doi.org/10.1002/stem.1890>

- Myllyharju, J. (2003). Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biology*, 22(1), S. 15-24.  
[https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(03\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(03)00006-4)
- Narayanan, G., Vernekar, V. N., Kuyinu, E. L. & Laurencin, C. T. (2016). Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, S. 247-276.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.015>
- Nasi, S., So, A., Combes, C., Daudon, M. & Busso, N. (2016). Interleukin-6 and chondrocyte mineralisation act in tandem to promote experimental osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(7), S. 1372-1379.  
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207487>
- Neogi, T. (2013). The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(9), S. 1145-1153.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.03.018>
- Niu, X., Li, N., Du, Z. & Li, X. (2023). Integrated gradient tissue-engineered osteochondral scaffolds: Challenges, current efforts and future perspectives. *Bioactive Materials*, 20, S. 574-597.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.06.011>
- Nordin, K. & LaBonne, C. (2014). Sox5 is a DNA-binding cofactor for BMP R-Smads that directs target specificity during patterning of the early ectoderm. *Developmental Cell*, 31(3), S. 374-382.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.003>
- Ochs, B. G., Müller-Horvat, C., Rolaufts, B., Fritz, J., Weise, K. & Schewe, B. (2007). Einzeitige Rekonstruktion osteochondraler Defekte am Kniegelenk bei Osteochondrosis dissecans. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 145(2), S. 146-151.  
<https://doi.org/10.1055/s-2007-965167>
- Ovsianikov, A., Malinauskas, M., Schlie, S., Chichkov, B., Gittard, S., Narayan, R., Löbner, M., Sternberg, K., Schmitz, K.-P. & Haverich, A. (2011). Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly (ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 7(3), S. 967-974.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.10.023>

- Pals, G., Pindolia, K., & Worsham, M. J. (1999). A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using BRCA1 as an example. *Molecular Diagnosis*, 4(3), S. 241-246.  
[https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(99\)80027-7](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(99)80027-7)
- Papathanasiou, I., Malizos, K. N. & Tsezou, A. (2012). Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 14, S. 1-14.  
<https://doi.org/10.1186/ar3805>
- Park, H., Choi, B., Hu, J., & Lee, M. (2013). Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9(1), S. 4779-4786.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.033>
- Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B. & Cohen, R. E. (2002). Collagen: An overview. *Implant dentistry*, 11(3), S. 280-285.  
<https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00014>
- Peng, Y., Jiang, H. & Zuo, H. D. (2023). Factors affecting osteogenesis and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *World Journal of Stem Cells*, 15(6), S. 548-560.  
DOI: 10.4252/wjsc.v15.i6.548.
- Pérez-Ortín, J. E., Tordera, V. & Chávez, S. (2019). Homeostasis in the central dogma of molecular biology: The importance of mRNA instability. *RNA Biology*, 16(12), S. 1659-1666.  
<https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1655352>
- Pestka, J. M., Bode, G., Salzmann, G., Südkamp, N. P. & Niemeyer, P. (2012). Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation for failed microfracture treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *The American Journal of Sports Medicine*, 40(2), S. 325-331.  
<https://doi.org/10.1177/0363546511425651>
- Petersen, W., Ellermann, A., Rembitzki, I. V., Semsch, H., Liebau, C. & Best, R. (2015). Konservative Optionen zur Beeinflussung der Beinachse bei medialer Gonarthrose: Was bringen Einlagen und Orthesen? *OUP 2015*, 12, S. 620-626.

DOI 10.3238/oup.2015.0620-0626

Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M. & Lindahl, A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: A long-term follow-up. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(6), S. 1117-1124.

<https://doi.org/10.1177/0363546509357915>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), S. 2002-2007.

<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Pihlajaniemi, T., Myllylä, R. & Kivirikko, K. I. (1991). Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *Journal of Hepatology*, 13(3), S. 2-7.

[https://doi.org/10.1016/0168-8278\(91\)90002-S](https://doi.org/10.1016/0168-8278(91)90002-S)

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), S. 143-147.

<https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P., A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D. & Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3, S. 1-13.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>

Portron, S., Hivernaud, V., Merceron, C., Lesoeur, J., Masson, M., Gauthier, O., Vinatier, C., Beck, L. & Guicheux, J. (2015). Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension provides cues for stem cell-based cartilage tissue engineering. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), S. 841-857.

<https://doi.org/10.1159/000369742>

Pot, M. W., de Kroon, L. M., van der Kraan, P. M., van Kuppevelt, T. H. & Daamen, W. F. (2017). Unidirectional BMP2-loaded collagen scaffolds induce chondrogenic differentiation. *Biomedical Materials*, 13(1), S. 15007.

DOI 10.1088/1748-605X/aa8960

- Primorac, D., Molnar, V., Matišić, V., Hudetz, D., Jeleč, Ž., Rod, E., Čukelj, F., Vidović, D., Vrdoljak, T., Dobričić, B., Antičević, D., Smolić, M., Miškulin, M., Čačić, D. & Borić, I. (2021). Comprehensive review of knee osteoarthritis pharmacological treatment and the latest professional societies guidelines. *Pharmaceuticals*, 14(3), S. 205.  
<https://doi.org/10.3390/ph14030205>
- Qi, W. N., & Scully, S. P. (1997). Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Journal of Orthopaedic Research*, 15(4), S. 483-490.  
<https://doi.org/10.1002/jor.1100150402>
- Qi, H., Aguiar, D. J., Williams, S. M., La Pean, A., Pan, W. & Verfaillie, C. M. (2003). Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), S. 3305-3310.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0532693100>
- Raetz, C. R. H., Ulevitch, R. I., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A., & Nathan, C. F. (1991). Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction 1. *The FASEB Journal*, 5(12), S. 2652-2660.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.5.12.1916089>
- Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretao, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligovski, C., Mansur, F., Christofis, A., Amaral, V.F., Brofman, P.S., Goldenberg, S., Nakao, L.S. & Correa, A. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7), S. 901-913.  
<https://doi.org/10.3181/0712-RM-356>
- Reginato, A. M., Sanz-Rodriguez, C., Diaz, A., Dharmavaram, R. M. & Jimenez, S. A. (1993). Transcriptional modulation of cartilage-specific collagen gene expression by interferon  $\gamma$  and tumour necrosis factor  $\alpha$  in cultured human chondrocytes. *Biochemical Journal*, 294(3), S. 761-769.  
<https://doi.org/10.1042/bj2940761>
- Robert, A. W., Marcon, B. H., Dallagiovanna, B. & Shigunov, P. (2020). Adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis of human mesenchymal stem/stromal cells:

- A comparative transcriptome approach. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, S. 1-27.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00561>
- Robins, J. C., Akeno, N., Mukherjee, A., Dalal, R. R., Aronow, B. J., Koopman, P. & Clemens, T. L. (2005). Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*, 37(3), S. 313-322.  
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.040>
- Rodríguez-Merchán, E. C. (2022). Intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: A review of their current molecular mechanisms of action and their degree of efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), S. 1-18.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23031301>
- Roman-Blas, J. A., Stokes, D. G. & Jimenez, S. A. (2007). Modulation of TGF- $\beta$  signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(12), S. 1367-1377.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.04.011>
- Ronziere, M. C., Perrier, E., Mallein-Gerin, F. & Freyria, A. M. (2010). Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials and Engineering*, 20(3), S. 145-158.  
DOI: 10.3233/BME-2010-0626
- Roughley, P. J. & Lee, E. R. (1994). Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microscopy Research and Technique*, 28(5), S. 385-397.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070280505>
- Roughley, P. J. & Mort, J. S. (2014). The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 1(8), S. 1-11.  
<https://doi.org/10.1186/s40634-014-0008-7>
- Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G. & Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: A collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database*, 2016.  
<https://doi.org/10.1093/database/baw100>

- Roth, J. (1998). Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress. *Progress in Brain Research*, 115, S. 177-192.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62036-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62036-1)
- Ryoo, H. M., Lee, M. H. & Kim, Y. J. (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366(1), S. 51-57.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.011>
- Ryu, J. H., Yang, S., Shin, Y., Rhee, J., Chun, C. H. & Chun, J. S. (2011). Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ -induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 63(9), S. 2547-2838.  
<https://doi.org/10.1002/art.30451>
- Sakao, K., Takahashi, K. A., Arai, Y., Inoue, A., Tonomura, H., Saito, M., Yamamoto, T., Kanamura, N., Imanishi, J., Mazda, O. & Kubo, T. (2008). Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(7), S. 805-814.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.10.021>
- Salaffi, F., Ciapetti, A. & Carotti, M. (2014). The sources of pain in osteoarthritis: A pathophysiological review. *Reumatismo - The Italian Journal of Rheumatology*, 66(1), S. 57-71.  
<https://doi.org/10.4081/reumatismo.2014.766>
- Sams, A. E. & Nixon, A. J. (1995). Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 3(1), S. 47-59.  
[https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80037-8)
- Sathy, B. N., Daly, A., Gonzalez-Fernandez, T., Olvera, D., Cunniffe, G., McCarthy, H. O., Dunne, N., Jeon, O., Alsberg, E., Haut Donahue, T. L. & Kelly, D. J. (2019). Hypoxia mimicking hydrogels to regulate the fate of transplanted stem cells. *Acta Biomaterialia*, 88, S. 314-324.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.042>
- Schenker, M. L., Mauck, R. L., Ahn, J. & Mehta, S. (2014). Pathogenesis and prevention of posttraumatic osteoarthritis after intra-articular fracture. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 22(1), S. 20-28.

- <https://doi.org/10.5435/JAAOS-22-01-20>
- Schmitt, M., Hoffmann, J. M., Lorenz, K., Publicover, A., Schmitt, A. & Nagler, A. (2016). Mobilization of autologous and allogeneic peripheral blood stem cells for transplantation in haematological malignancies using biosimilar G-CSF. *Vox Sanguinis*, 111(2), S. 178-186.  
<https://doi.org/10.1111/vox.12397>
- Schneider T., Liebau C., Krämer R. & Merk H. (1999). 10-Jahres-Analyse nach arthroskopischem Kniegelenkdébridement bei Gonarthrose. *Arthroskopie* 12 (1): S. 17–21.  
<https://doi.org/10.1007/s001420050065>
- Schwarz, I. M. & Hills, B. A. (1998). Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *Rheumatology*, 37(1), S. 21-26.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/37.1.21>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J. & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), S. 4827-4833.  
PMID: 3409223.
- Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Reger, R. L. & Prockop, D. J. (2005). Comparison of effect of BMP-2,-4, and-6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell and Tissue Research*, 320(2), S. 269-276.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-004-1075-3>
- Sellam, J. & Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(11), S. 625-635.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.159>
- Shang, Y., Guan, H. & Zhou, F. (2021). Biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells and its therapeutic potential for hematological disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. S. 570179.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.570179>

- Shintani, N. & Hunziker, E. B. (2011). Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: Influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cell Mater*, 22, S. 302-319.  
 [Online im Internet:] URL: [https://www.researchgate.net/profile/Nahoko-Shintani/publication/51829948\\_Differential\\_effects\\_of\\_dexamethasone\\_on\\_the\\_chondrogenesis\\_of\\_mesenchymal\\_stromal\\_cells\\_Influence\\_of\\_microenvironment\\_tissue\\_origin\\_and\\_growth\\_factor/links/0c96052d0426d469df000000/Differential-effects-of-dexamethasone-on-the-chondrogenesis-of-mesenchymal-stromal-cells-Influence-of-microenvironment-tissue-origin-and-growth-factor.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Nahoko-Shintani/publication/51829948_Differential_effects_of_dexamethasone_on_the_chondrogenesis_of_mesenchymal_stromal_cells_Influence_of_microenvironment_tissue_origin_and_growth_factor/links/0c96052d0426d469df000000/Differential-effects-of-dexamethasone-on-the-chondrogenesis-of-mesenchymal-stromal-cells-Influence-of-microenvironment-tissue-origin-and-growth-factor.pdf)  
 [Stand: 02.03.2024, 15:16]
- Shintani, N., Siebenrock, K. A. & Hunziker, E. B. (2013). TGF- $\beta$ 1 enhances the BMP-2-Induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy. *PLoS One*, 8(1), e53086.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053086>
- Spahn, G., Fröber, R. & Linß, W. (2006). Treatment of chondral defects by hydro jet. Results of a preliminary scanning electron microscopic evaluation. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 126, S. 223-227.  
<https://doi.org/10.1007/s00402-005-0002-8>
- Spahn, G., Hofmann, G. O. & Klinger, H. M. (2013). The effects of arthroscopic joint debridement in the knee osteoarthritis: Results of a meta-analysis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21, S. 1553-1561.  
<https://doi.org/10.1007/s00167-012-2169-1>
- Spahn, G., Hofmann, G., Dornacher, I., Schmitt, V. & Jerosch, J. (2015). Arthroskopie bei der Gonarthrose. *OUP*, 2015, 05. S. 264–275.  
 DOI 10.3238/oup.2015.0264–0275
- Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Gesundheitsbericht für Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Band 1. *Verlag Metzler-Poeschel*, Stuttgart, 1998, ISBN 3824605694. S. 194-197.
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Singleton, S. B. & Briggs, K. K. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 7(4), S. 300-304.  
[https://doi.org/10.1016/S1048-6666\(97\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S1048-6666(97)80033-X)

- Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Lahm, A. & Guhlke-Steinwachs, U. (1999). Clinical and cellbiological aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Der Unfallchirurg*, 102, S. 855-860.  
<https://doi.org/10.1007/s001130050494>
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), S. 919-926.  
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
- Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), S. 1-3.  
<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Sun, K., Guo, J., Yao, X., Guo, Z. & Guo, F. (2021). Growth differentiation factor 5 in cartilage and osteoarthritis: A possible therapeutic candidate. *Cell Proliferation*, 54(3), S. 1-13.  
<https://doi.org/10.1111/cpr.12998>
- Taheem, D. K., Foyt, D. A., Loaiza, S., Ferreira, S. A., Ilic, D., Auner, H. W., Grigoriadis, A. E., Jell, G. & Gentleman, E. (2018). Differential regulation of human bone marrow mesenchymal stromal cell chondrogenesis by hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  hydroxylase inhibitors. *Stem Cells*, 36(9), S. 1380-1392.  
<https://doi.org/10.1002/stem.2844>
- Thaweesapphithak, S., Tantrawatpan, C., Kheolamai, P., Tantikanlayaporn, D., Roytrakul, S. & Manochantr, S. (2019). Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, S. 1-18.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1175-3>
- Thielen, N. G., van der Kraan, P. M. & van Caam, A. P. (2019). TGF $\beta$ /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis. *Cells*, 8(9), S. 969.  
<https://doi.org/10.3390/cells8090969>
- Thielen, N., Neefjes, M., Wiegertjes, R., van den Akker, G., Vitters, E., van Beuningen, H., Blaney Davidson, E., Koenders, M., van Lent, P., van de Loo, F., van Caam, A. & van der Kraan, P. (2021). Osteoarthritis-related inflammation blocks TGF- $\beta$ 's protective effect on chondrocyte hypertrophy via (de)

- phosphorylation of the SMAD2/3 Linker Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), S. 8124.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22158124>
- Thoms, B. L. & Murphy, C. L. (2010). Inhibition of hypoxia-inducible factor-targeting prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) enhances matrix synthesis by human chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), S. 20472-20480.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115238>
- Thorfve, A., Dehne, T., Lindahl, A., Brittberg, M., Pruss, A., Ringe, J., Sittering, M. & Karlsson, C. (2012). Characteristic markers of the WNT signaling pathways are differentially expressed in osteoarthritic cartilage. *Cartilage*, 3(1), S. 43-57.  
<https://doi.org/10.1177/1947603511414178>
- Toh, W. S., Liu, H., Heng, B. C., Rufaihah, A. J., Ye, C. P. & Cao, T. (2005). Combined effects of TGF $\beta$ 1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors*, 23(4), S. 313-321.  
<https://doi.org/10.1080/08977190500252763>
- Tomoats, U., Natsu, O., Sugur, U. & Keir, O. (1984). Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*<sup>®</sup>, 186, S. 231-239.  
[Online im Internet:] URL: [https://journals.lww.com/clinorthop/abstract/1984/06000/chondrocytes\\_embedded\\_in\\_collagen\\_gels\\_maintain.39.aspx](https://journals.lww.com/clinorthop/abstract/1984/06000/chondrocytes_embedded_in_collagen_gels_maintain.39.aspx)  
[Stand: 18.11.2023, 09:04]
- Trigkilidas, D. & Anand, A. (2013). The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 95(8), S. 545-551.  
<https://doi.org/10.1308/rcsann.2013.95.8.545>
- Tsuchida, A. I., Beekhuizen, M., t Hart, M. C., Radstake, T. R., Dhert, W. J., Saris, D. B., van Osch, G. J. & Creemers, L. B. (2014). Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 16(5), S. 1-15.  
<https://doi.org/10.1186/s13075-014-0441-0>

- Tufvesson, E. & Westergren-Thorsson, G. (2002). Tumour necrosis factor- $\alpha$  interacts with biglycan and decorin. *FEBS Letters*, 530(1-3), S. 124-128.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03439-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03439-7)
- Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem*, 2(4), S. 239-245.  
[https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010401\)2:4<239::AID-CBIC239>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010401)2:4<239::AID-CBIC239>3.0.CO;2-R)
- Van Beuningen, H. M., Glansbeek, H. L., van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. (2000). Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor- $\beta$  injections. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(1), S. 25-33.  
<https://doi.org/10.1053/joca.1999.0267>
- Van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. (2012). Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(3), S. 223-232.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.003>
- Van der Kraan, P. M., Davidson, E. B., Blom, A. & Van den Berg, W. B. (2009). TGF- $\beta$  signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(12), S. 1539-1545.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.06.008>
- Vargel, İ., Tuncel, A., Baysal, N., Hartuç-Çevik, İ., & Korkusuz, F. (2022). Autologous adipose-derived tissue stromal vascular fraction (AD-tSVF) for knee osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), S. 13517.  
<https://doi.org/10.3390/ijms232113517>
- Vina, E. R. & Kwoh, C. K. (2018). Epidemiology of osteoarthritis: Literature update. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), S. 160-167.  
DOI: 10.1097/BOR.0000000000000479
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bödding, M., Droogmans, G. & Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), S. 33704-33710.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204828200>

- Walther, M., Becher, C., Volkering, C., Röser, A., Süzer, F. & Thermann, H. (2012). Therapie chondraler und osteochondraler Defekte am Talus durch Autologe Matrix Induzierte Chondrogenese. *Fuß & Sprunggelenk*, 10(2), S. 121-129.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuspru.2012.03.002>
- Wang, X., Manner, P. A., Horner, A., Shum, L., Tuan, R. S. & Nuckolls, G. H. (2004). Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(12), S. 963-973.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.08.008>
- Wang, W., Rigueur, D. & Lyons, K. M. (2014). TGFβ signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 102(1), S. 37-51.  
<https://doi.org/10.1002/bdrc.21058>
- Wang, Y., Yi, H. & Song, Y. (2021). The safety of MSC therapy over the past 15 years: A meta-analysis. *Stem Cell Research & Therapy*, 12, S. 1-15.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02609-x>
- Weißberger, M., Wagenbrenner, M., Nickel, J., Ahlbrecht, R., Blunk, T., Steinert, A. F. & Gilbert, F. (2023). Comparative in vitro treatment of mesenchymal stromal cells with GDF-5 and R57A induces chondrogenic differentiation while limiting chondrogenic hypertrophy. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 10(1), S. 29.  
<https://doi.org/10.1186/s40634-023-00594-z>
- Welsch, U., Kummer, W. & Deller, T. (2022). Histologie - Das Lehrbuch. *Urban & Fischer in Elsevier*, S. 107-109. ISBN 978-3-437-44427-2.
- Wernecke, C., Braun, H. J. & Dragoo, J. L. (2015). The effect of intra-articular corticosteroids on articular cartilage: A systematic review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 3(5).  
<https://doi.org/10.1177/2325967115581163>
- WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium & World Health Organization. (2003). The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium: Report of a WHO Scientific Group (No. 919). *World Health Organization*.  
 [Online im Internet:] URL: <https://iris.who.int/handle/10665/42721>  
 [Stand: 18.12.2022, 16:57]

- Woolf, A. D. & Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9), S. 646-656.  
PMID: 14710506
- Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. (2016). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research*, 4(1), S. 1-21.  
<https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>
- Xu, B. Y., Jin, Y., Ma, X. H., Wang, C. Y., Guo, Y. & Zhou, D. (2020). The potential role of mechanically sensitive ion channels in the physiology, injury, and repair of articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 28(3).  
<https://doi.org/10.1177/2309499020950262>
- Yang, S., Eaton, C. B., McAlindon, T. E. & Lapane, K. L. (2015). Effects of glucosamine and chondroitin supplementation on knee osteoarthritis: An analysis with marginal structural models. *Arthritis & Rheumatology*, 67(3), S. 714-723.  
<https://doi.org/10.1002/art.38932>
- Yang, K. G. A., Raijmakers, N. J. H., van Arkel, E. R. A., Caron, J. J., Rijk, P. C., Willems, W. J., Zijl, J. A. C., Verbout, A. J., Dhert, W. J. A. & Saris, D. B. F. (2008). Autologous interleukin-1 receptor antagonist improves function and symptoms in osteoarthritis when compared to placebo in a prospective randomized controlled trial. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(4), S. 498-505.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.07.008>
- Yang, H. S., La, W. G., Bhang, S. H., Kim, H. J., Im, G. I., Lee, H., Park, J. H. & Kim, B. S. (2011). Hyaline cartilage regeneration by combined therapy of microfracture and long-term bone morphogenetic protein-2 Delivery. *Tissue Engineering Part A*, 17(13-14), S. 1809-1818.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0540>
- Yang, R., Xue, W., Ma, X., Ren, Y., Xu, L., Kong, W., Zhang, W., Tan, X. & Chi, B. (2023). Engineering the dynamics of biophysical cues in supramolecular hydrogels to facile control stem cell chondrogenesis for cartilage regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 250, S. 110429.  
<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.110429>

- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R. & Lyons, K. M. (2005). Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), S. 5062-5067.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0500031102>
- Yunus, M. H. M., Nordin, A. & Kamal, H. (2020). Pathophysiological perspective of osteoarthritis. *Medicina*, 56(11), S. 614.  
<https://doi.org/10.3390/medicina56110614>
- Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J. & Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *The Lancet*, 364(9438), S. 937-952.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)
- Zhang, B., Huang, J. & Narayan, R. J. (2020). Gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering and regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), S. 8149-8170.  
<https://doi.org/10.1039/D0TB00688B>
- Zhang, X., Wu, Y., Pan, Z., Sun, H., Wang, J., Yu, D., Zhu, S., Dai, J., Chen, Y., Tian, N., Heng, B. C., Coen, N. D., Xu, H. & Ouyang, H. (2016). The effects of lactate and acid on articular chondrocytes function: Implications for polymeric cartilage scaffold design. *Acta Biomaterialia*, 42, S. 329-340.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.029>
- Zhang, X., Zhan, X., Cheng, H., Dong, Z., Hu, C., Liu, C., Liang, J., Chen, Y., Fan, Y. & Zhang, X. (2024). Cartilage-like protein-polysaccharide hybrid hydrogel for enhancing chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Collagen and Leather*, 6(1), S. 3.  
<https://doi.org/10.1186/s42825-023-00146-2>
- Zhao, L., Chen, S., Yang, P., Cao, H., & Li, L. (2019). The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: Prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, S. 1-13.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1287-9>

- Zheng H., Guangxu, H. & Yanke, H. (2017). Deferoxamine synergizes with transforming growth factor- $\beta$  signaling in chondrogenesis. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), S. 698-702.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0324>
- Zhou, N., Hu, N., Liao, J. Y., Lin, L. B., Zhao, C., Si, W. K., Yang, Z., Yi, S.X., Fan, T.X., Bao, W., Linag, X., Wei, X., Chen, H., Chen, C., Chen Q., Lin, X. & Huang, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  as a regulator of BMP2-induced chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(1), S. 44-60.  
<https://doi.org/10.1159/000374052>
- Zhu, Y., Ye, L., Cai, X., Li, Z., Fan, Y. & Yang, F. (2022). Icariin-loaded hydrogel regulates bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and promotes cartilage repair in osteoarthritis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, S. 755260.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.755260>

## 9 Publikationsverzeichnis

### Nicht publiziert:

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandender Posterbeitrag:

Lips, K. S., Lehner, V., Spreda, M., Czub, L., Wagner, M., **Wunderer M.**, Krupp, A., Noll, M., Liefeith, K. & Biehl C. (2021). Zytokompatibilität von polymerbasierten im Nano-3D-Druckverfahren hergestellten Knochen-Knorpel-Implantaten. *Poster bei ProMat Leben Midterm Konferenz 18.-19.05.2021 virtuell.*

[https://dechema.converia.de/custom/media/ProMatLeben21/ProMatLeben\\_Midterm\\_BoA.pdf](https://dechema.converia.de/custom/media/ProMatLeben21/ProMatLeben_Midterm_BoA.pdf)

Kongressbeitrag:

**Wunderer, M.**, Lehner, V., Biehl, C., Heiß, C., Ludolph, J., Liefeith, K. & Lips, K. S. (April, 2022). Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen auf Polymerscaffolds zur osteochondralen Defektheilung. *Vortrag bei 70. Jahrestagung der VSOU e.V., „Freie Themen und Grundlagenforschung“. 28.-30. April 2022, Baden-Baden, Deutschland.*

### Publiziert:

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandender Kongressbeitrag:

Lips, K. S., Fibbe, M., Lehner, V., Plit, F., **Wunderer M.**, Biehl C. & Liefeith, K. (2023). Zelluläre Verträglichkeit des neuentwickelten Polymers Polyamid- $\epsilon$ -Caprolacton als Material für im 3D-Druck hergestellte Implantate für osteochondrale Defekte. *Vortrag bei Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2023). 24-27.10.2023, Berlin, Deutschland. DOI:10.3205/23dkou173*

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandene Gesamtprojektübersicht -  
Abschlussprojektband:

Liefeith, K., Hauptmann, N., Brandes, N., Wloka, T., Czich, S., Ludolph, J., Rost, J.,  
Rothe, H., Hildebrand, G., Gumbert, J., Mardare, C., Welzel, J., Noll, M., Krupp, A.,  
Lechner, J., Kohlhaas, S., Mair, V., Dupuis, Y., Houbertz, R., Wiedenmann, J., Stender,  
B., Mokros, J., Liebelt, M., Oberbach, T., Ortmann, C., Lehner, V., Biehl, C., Czub, L.,  
Fibbe, M.J., Heger, I.M., May, P., Plit, F.J., Rieble Fernandez-Tenllado, A.T., Sommer,  
U., Spreda, M., Tüngler, T.L., Wagner, M., Wattenbach, J.M., Wischniewski, F.,  
**Wunderer, M.** & Lips, K.S. (2024). Erforschung eines industriellen laserbasierten  
Nano-3D-Druckverfahrens für hierarchisch strukturierte Knorpel-Knochen-Implantate  
auf Polymerbasis (Poly-IMPLANT-Druck). *ProMatLeben Polymere*.

<https://promatleben.de/de/projekte/projekte-alphabetisch/poly-implant-druck1/>

## **10 Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

## 11. Danksagung

Ein besonders großer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips für die einmalige Chance, diese Arbeit im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie durchzuführen und somit an wissenschaftlicher Forschung teilhaben zu dürfen. Insbesondere möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowohl während des praktischen Anteils, als auch bei der Niederschrift, dieser Arbeit bedanken. Zudem möchte ich mich für die Teilnahme an der VSOU in Baden-Baden bedanken und den emotionalen Rückhalt.

Ebenfalls gilt ein besonderer Dank Frau Veronika Lehner, ohne welche dieses chondrogene Differenzierungsprotokoll nicht entstanden wäre. Neben einer sehr guten Einarbeitung, teilte sie ihren Erfahrungsschatz auf dem Gebiet der Zellkultur und ermutigte mich, mich kritisch mit wissenschaftlichen Arbeiten auseinanderzusetzen. Fachlich wie auch über mich selbst konnte ich viel durch sie lernen und dafür bin ich sehr dankbar.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Heiß und allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie für die Unterstützung des Projektes. Insbesondere danke ich Frau Olga Dakischew und Frau Ivonne Bergen, welche auf dem Gebiet der Zellkultur und der Molekularbiologie viel Wissen weitergaben und den Anfang des Projektes unterstützten.

Ich danke Frau Linda Czub und ihrer Familie für die Unterstützung, während den unzähligen Stunden, die zur Erstellung dieser Arbeit geführt haben. Ein offenes Ohr zur richtigen Stunde hat an vielen Stellen geholfen, diese Arbeit fertig zu stellen.

Darüber hinaus danke ich dem BMBF für die Förderung des Poly-Implant-Druck Projekts. Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Liefeith, Frau Johanna Ludolph und Frau Dr. Nicole Hauptmann für die Bereitstellung der Materialronden für diese Zellkultur Versuche und einen angenehmen fachlichen Austausch.

Nicht zuletzt geht ein besonderer Dank an meine Familie, meinen Lebenspartner und meine Freunde, die mich bei der Ausübung meines Berufs und der Verfolgung meiner Ziele unterstützen und den nötigen warmen Rückhalt geben, um immer weiter zu wachsen.