

# **Entwicklung und Testung eines resorbierbaren Trägermaterials für die Behandlung von artikulären Knorpeldefekten**

vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
Annette Thiem  
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Lothar W. Kroh

1. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Schubert

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Gross

3. Gutachter: PD Dr. Christian Große-Siestrup

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.10.2011

Berlin 2011

D 83

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Schubert als Leiter des Instituts für Werkstoffwissenschaften und -technologien für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und die Möglichkeit zur selbstständigen Durchführung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Ulrich Gross und Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup möchte ich gern für ihr großes Engagement und die stetige Diskussionsbereitschaft im Rahmen ihrer Gutachter-Tätigkeit danken.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Werkstoffwissenschaften und -technologien für die stets gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Herrn Dr. Rolf Zehbe danke ich für die Möglichkeit, auf diesem Projekt zu arbeiten und für die vielen konstruktiven Diskussionen. Bei Frau Franziska Schmidt und Frau Rosali Möllmann möchte ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche und für ihr stets offenes Ohr bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Margret Dilger für die exzellente Unterstützung und jegliche Hilfe im Labor.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup und Herrn Mohammad Bagheri für die hervorragende Kooperation bei der Planung und Durchführung der Implantationsstudie an der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Berlin. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Christoph Brochhausen vom REPAIR-Lab der Universitätsmedizin Mainz für die angenehme Zusammenarbeit und die histologischen Arbeiten für das Projekt sowie Frau Sarah Jeuthe für die Unterstützung bei den Versuchen und der Auswertung danken. Ich danke weiterhin Frau PD Dr. Gundula Schulze-Tanzil für die Kooperation mit ihrer Arbeitsgruppe der experimentellen Unfallchirurgie der Charité und dabei besonders Herrn Karym El-Sayed für sein großartiges Engagement und die exzellente Zusammenarbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meiner Promotion.

*Dieses Projekt wurde im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsprojekts der „Dritte Patentportfolio Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. KG“ durchgeführt, welche zudem Inhaberin der korrespondierenden Patente ist.*

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>  | <b>I</b>    |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>IV</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>VIII</b> |
| <br>   |             |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Hyaliner Knorpel</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1.1 Zusammensetzung des Gelenkknorpels                                     | 1           |
| 1.1.2 Struktur des Gelenkknorpels  | 5           |
| <b>1.2 Knorpeldefekte und intrinsische Reparaturmechanismen</b>              | <b>8</b>    |
| <b>1.3 Konventionelle Therapiekonzepte</b>                                   | <b>10</b>   |
| 1.3.1 Konservative Therapien   | 10          |
| 1.3.2 Operative Verfahren  | 10          |
| <b>1.4 Tissue Engineering Strategien für die Knorpelregeneration</b>         | <b>13</b>   |
| 1.4.1 Trägermaterialien  | 15          |
| <b>1.5 Zielstellung</b>  | <b>18</b>   |
| <br>   |             |
| <b>2 Material und Methoden</b>   | <b>20</b>   |
| <b>2.1 Material</b>  | <b>20</b>   |
| 2.1.1 Chemikalien  | 20          |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial   | 21          |
| 2.1.3 Enzyme   | 21          |
| 2.1.4 Antikörper   | 21          |
| 2.1.5 Technische Geräte und andere Apparaturen                               | 21          |
| 2.1.6 Software   | 22          |
| <b>2.2 Materialwissenschaftliche Methoden</b>                                | <b>23</b>   |
| 2.2.1 Herstellung der Gelatine-PLGA-Scaffolds                                | 23          |
| 2.2.1.1 Herstellung der Rezepturen mit Lösemittel                            | 23          |
| 2.2.1.2 Herstellung der Rezeptur ohne Lösemittel                             | 23          |
| 2.2.1.3 Einfrieraufbau   | 24          |
| 2.2.1.4 Einfrierverfahren und Gefriertrocknung der Rezepturen mit Lösemittel | 25          |
| 2.2.1.5 Einfrierverfahren und Gefriertrocknung der Rezeptur ohne Lösemittel  | 25          |
| 2.2.1.6 Dehydrothermale Vernetzung   | 26          |
| 2.2.2 Charakterisierung der Scaffolds  | 27          |
| 2.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie  | 27          |
| 2.2.2.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie)         | 27          |
| 2.2.2.3 Analyse der Partikelgrößenverteilung                                 | 27          |
| 2.2.2.4 Bestimmung der Porengröße und des Porengradienten                    | 27          |
| 2.2.2.5 Analyse der Porosität mittels Archimedes-Verfahren                   | 28          |
| 2.2.2.6 Untersuchung des Degradationsverhaltens <i>in vitro</i>              | 29          |
| 2.2.3 Computergestützte Analysen   | 30          |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.2.3.1    | Bildanalysen   | 30        |
| 2.2.3.2    | Statistische Auswertungen  | 30        |
| <b>2.3</b> | <b>Biologische Methoden</b>  | <b>30</b> |
| 2.3.1      | Zellkultur und zellbiologische Arbeiten  | 30        |
| 2.3.1.1    | Verwendete Zellkultursysteme   | 30        |
| 2.3.1.2    | Isolation primärer Chondrozyten aus artikulärem Knorpel                                  | 32        |
| 2.3.1.3    | Dissoziation und Subkultivierung von Zellen  | 32        |
| 2.3.1.4    | Zellzahlbestimmung mit Trypanblau  | 33        |
| 2.3.1.5    | Kryokonservierung und Auftauen von Zellen  | 34        |
| 2.3.1.6    | Dreidimensionale Kultur von primären Gelenkchondrozyten                                  | 34        |
| 2.3.2      | Biochemische und molekularbiologische Methoden   | 35        |
| 2.3.2.1    | <i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest   | 35        |
| 2.3.2.2    | Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay                                   | 35        |
| 2.3.2.3    | Vitalfluoreszenzfärbung mit FDA/EB   | 36        |
| 2.3.3      | Tierexperimentelle Studie zur Gewebeverträglichkeit                                      | 37        |
| 2.3.3.1    | Subkutane Implantation   | 37        |
| 2.3.3.2    | Explantation und Auswertung der <i>in vivo</i> Toxizität und Degradation                 | 39        |
| 2.3.4      | Histologische Methoden   | 39        |
| 2.3.4.1    | Gefrierschnitte  | 39        |
| 2.3.4.2    | Paraffinpräparate  | 40        |
| 2.3.4.3    | Histologische Färbungen  | 40        |
| 2.3.4.4    | Immunhistologische Färbungen   | 41        |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b>  | <b>43</b> |
| 3.1        | Herstellung der Gelatine-PLGA-Scaffolds  | 43        |
| 3.2        | Charakterisierung der Scaffolds aus Rezeptur 3   | 52        |
| 3.2.1      | FTIR-Spektroskopie   | 52        |
| 3.2.2      | Porosität und Porengröße   | 55        |
| 3.2.3      | <i>In vitro</i> Degradation der Gelatine-PLGA-Scaffolds                                  | 56        |
| 3.3        | Testung der Biokompatibilität  | 58        |
| 3.3.1      | <i>In vitro</i> Zytotoxizität  | 58        |
| 3.3.2      | Gewebeverträglichkeit und Resorption mittels subkutaner Implantation                     | 62        |
| 3.4        | <i>In vitro</i> Anwendungsstudien zur Eignung des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger | 66        |
| 3.4.1      | Optimierung der Zelldichte   | 67        |
| 3.4.2      | Kollagen II-Nachweis   | 71        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>  | <b>73</b> |
| 4.1        | Konstruktion und Herstellung des Trägermaterials   | 73        |
| 4.1.1      | Einfluss des Herstellungsverfahrens auf die Scaffold-Struktur                            | 75        |
| 4.1.2      | Einfluss von Lösemitteln auf Struktur und Biokompatibilität der Scaffolds                | 79        |
| 4.2        | Charakterisierung der optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds                                | 81        |
| 4.2.1      | Porosität und Porengröße   | 81        |
| 4.2.2      | Vernetzung und Sterilisation   | 83        |
| 4.2.3      | <i>In vitro</i> Degradation und biomechanische Stabilität                                | 85        |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3 Biokompatibilität der Gelatine-PLGA-Scaffolds</b>  | <b>88</b>  |
| 4.3.1 <i>In vitro</i> Zytotoxizität   | 89         |
| 4.3.2 Gewebeverträglichkeit und Resorption nach subkutaner Implantation                           | 92         |
| <b>4.4 Funktionalität der Gelatine-PLGA-Scaffolds</b>   | <b>95</b>  |
| 4.4.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Anwendbarkeit des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger | 95         |
| 4.4.2 <i>In vivo</i> Funktionalitätsstudie  | 100        |
| <b>4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick</b>  | <b>101</b> |
| <br>  |            |
| <b>5 Literaturverzeichnis</b>   | <b>105</b> |
| <br>  |            |
| <b>6 Anhang</b>   | <b>117</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1:  | Prozentuale Zusammensetzung des hyalinen Gelenkknorpels.  | 2  |
| Abbildung 2:  | Schematische Abbildung des makromolekularen Netzwerks der extrazellulären Knorpelmatrix.  | 4  |
| Abbildung 3:  | Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels in oberflächliche, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone.                                | 6  |
| Abbildung 4:  | Mikroskopische Aufnahme eines Chondrons.  | 7  |
| Abbildung 5:  | Schematische Darstellung der osteochondralen Transplantation und der Mikrofrakturierung.  | 12 |
| Abbildung 6:  | Schematische Abbildung der autologen Chondrozyten-Transplantation.  | 14 |
| Abbildung 7:  | Schematische Abbildung der Hypothesen bezüglich der Konstruktion des Trägermaterials.   | 18 |
| Abbildung 8:  | Schematischer Querschnitt durch den Einfrieraufbau und die Scaffold-Form.   | 25 |
| Abbildung 9:  | Implantation von jeweils vier Prüf- bzw. Kontrollkörpern in subkutane Hauttaschen.  | 38 |
| Abbildung 10: | Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.   | 43 |
| Abbildung 11: | REM-Aufnahmen der Scaffold-Morphologie der Rezepturen 1 und 2 .   | 46 |
| Abbildung 12: | FTIR-Spektren von Gelatine und PLGA, Proben der Rezeptur 1 und Ethylacetat.   | 47 |
| Abbildung 13: | Scaffolds mit Lösemittelzusatz nach dem Gefriertrocknen.  | 48 |
| Abbildung 14: | Verteilungssumme und Häufigkeit der PLGA-Partikel in Rezeptur 3.  | 49 |
| Abbildung 15: | REM-Aufnahmen der Scaffold-Struktur der optimierten Rezeptur 3.   | 51 |
| Abbildung 16: | FTIR-Spektren von Gelatine, PLGA und Proben der Rezeptur 3.   | 53 |
| Abbildung 17: | Amid I-Bande von Gelatine und Proben der Rezeptur 3 mittels FTIR-Spektroskopie.   | 54 |
| Abbildung 18: | Ergebnis der Porenanalyse eines Gelatine-PLGA-Scaffolds.  | 56 |
| Abbildung 19: | Prozentuales Gewicht der Gelatine-PLGA-Scaffolds während der Degradation in verschiedenen Abbaulösungen.                                | 57 |
| Abbildung 20: | Stoffwechselaktivität von L929-Fibroblasten nach dem Zytotoxizitätstest von Gelatine-PLGA-Scaffolds mittels MTT-Assay.                  | 59 |
| Abbildung 21: | Stoffwechselaktivität von L929-Fibroblasten nach dem Zytotoxizitätstest von reinen Gelatine-Scaffolds mittels MTT-Assay.                | 60 |
| Abbildung 22: | Ergebnis der FDA/EB-Vitalfärbung von L929-Fibroblastenzellen nach der Inkubation mit dem Extrakt der Gelatine-PLGA-Scaffolds.           | 62 |
| Abbildung 23: | Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold und Ethisorb®-Kontrolle nach 2 Wochen <i>in vivo</i> .      | 63 |
| Abbildung 24: | Detailaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold und Ethisorb®-Kontrolle nach 2, 4 und 8 Wochen <i>in vivo</i> . | 64 |
| Abbildung 25: | Ermittelte Rangwerte für Prüfkörper und Kontrolle 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.  | 66 |
| Abbildung 26: | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellzahlen auf dem Gelatine-PLGA-Scaffold nach einem Tag und einer Woche.             | 68 |

---

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| Abbildung 27:  | Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellverteilung in unterschiedlich dicht besiedelten Gelatine-PLGA-Scaffolds nach einem Tag und einer Woche.  | 69  |
| Abbildung 28:  | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Chondrozyten im Gelatine-PLGA-Scaffold nach einem Tag und 2 Wochen.                                    | 70  |
| Abbildung 29:  | Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II in besiedelten Gelatine-PLGA-Konstrukten nach 2 Tagen und 2 Wochen.                               | 71  |
| Abbildung 30:  | Verlauf der freien Bildungsenthalpie $\Delta G$ bei der Keimbildung.   | 77  |
| Abbildung 31:  | Temperaturverlauf der Gelatine-PLGA-Lösung während des Einfrierprozesses.  | 78  |
| Abbildung 32:  | REM-Aufnahmen der Porenstrukturen eines industriell hergestellten Kollagenschwamms und eines Gelatine-PLGA-Scaffolds.                          | 79  |
| Abbildung 33:  | Graphische Darstellung des Masseverlustes und des E-Modulverlaufs während der Degradation der Gelatine-PLGA-Scaffolds.                         | 87  |
| <b>Anhang:</b> |  |     |
| Abbildung 34:  | Logarithmische Kurvenanpassung an den Degradationsverlauf der Gelatine-PLGA-Scaffolds in gepufferter Abbaulösung (PBS).                        | 118 |
| Abbildung 35:  | Mikroskopische Aufnahmen der FDA/EB-Vitalfärbung von L929-Fibroblastenzellen nach der Inkubation mit dem Extrakt der Gelatine-PLGA-Scaffolds.  | 119 |
| Abbildung 36:  | Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold nach 2 und 4 Wochen <i>in vivo</i> .                               | 120 |
| Abbildung 37:  | Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Ethisorb® nach 2 und 4 Wochen <i>in vivo</i> .  | 121 |
| Abbildung 38:  | Zellmorphologie von primären Chondrozyten nach einem Tag und einer Woche auf dem Gelatine-PLGA-Scaffold.                                       | 123 |
| Abbildung 39:  | Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II in besiedelten Gelatine-PLGA- sowie Ethisorb®-Konstrukten nach 2 Tagen, einer Woche und 2 Wochen. | 124 |
| Abbildung 40:  | Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten <i>in vivo</i> (H&E-Färbung).                | 125 |
| Abbildung 41:  | Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten <i>in vivo</i> (Alzianblau-Färbung).         | 126 |

---

## Tabellenverzeichnis

|                |   |     |
|----------------|---|-----|
| Tabelle 1:     | Liste der bisher klinisch eingesetzten Zellträger.  | 15  |
| Tabelle 2:     | Kategorien des Punktbewertungssystems aus DIN EN ISO 10993-06, Anhang E.  | 39  |
| Tabelle 3:     | Berechnete Rohdichte und Porosität der Scaffolds.   | 55  |
| <b>Anhang:</b> |   |     |
| Tabelle 4:     | Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 2 Wochen. | 122 |
| Tabelle 5:     | Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 4 Wochen. | 122 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| 3D                | dreidimensional  |
| ACT               | autologe Chondrozyten-Transplantation                              |
| AMIC              | autologe matrix-induzierte Chondrogenese                           |
| <i>Aqua dest.</i> | destilliertes Wasser   |
| DMEM              | Dulbecco's Minimal Essential Medium                                |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid   |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure   |
| EB                | Ethidiumbromid   |
| ECM               | extrazelluläre Matrix  |
| FDA               | Fluoreszeindiacetat  |
| FKS               | fötale Kälberserum   |
| GAG               | Glykosaminoglykan  |
| H&E               | Hämatoxylin und Eosin  |
| MACT              | autologe matrix-assoziierte Chondrozyten-Transplantation           |
| MTT               | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid         |
| n                 | Anzahl   |
| NADH              | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid                                |
| NADPH             | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat                       |
| PBS               | Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> ) |
| Pen/Strep         | Penicillin/Streptomycin  |
| pGC               | primäre Gelenkchondrozyten   |
| PLGA              | Poly lactid-co-Glycolid  |
| REM               | Rasterelektronenmikroskop  |
| Rpm               | Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )           |
| RT                | Raumtemperatur   |
| U                 | Aktivitätseinheit ( <i>Unit</i> )                                  |
| üN                | über Nacht   |
| v/v               | Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )                   |
| w/v               | Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )                   |

---

## Zusammenfassung

Aufgrund der unzureichenden regenerativen Fähigkeiten des Gelenkknorpels führen bereits kleine Läsionen zu progressiven Gelenkbeschwerden, die in einer Arthrose und nachfolgender Invalidität enden können. Bedingt ist diese bereits lange bekannte Problematik durch die spezielle Anatomie des Knorpelgewebes, insbesondere durch seine Avaskularität. Um die Regeneration von Knorpeldefekten zu unterstützen, wurden daher in den letzten Jahrzehnten verschiedene konventionelle, operative Verfahren entwickelt, zu denen z.B. die Lavage, die Mikrofrakturierung oder die osteochondrale Transplantation gehören. Keines dieser Verfahren führt jedoch bei minimaler Patientenbelastung und optimaler Kosteneffizienz zur Regeneration von zonal aufgebautem, hyalinem Knorpel.

Den Startpunkt neuartiger regenerativer Methoden bildete 1994 die von Brittberg beschriebene Methode der autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT), bei der körpereigene Knorpelzellen aus weniger belasteten Bereichen des Gelenks entnommen und anschließend *in vitro* vermehrt werden. Nachdem die Zellen ausreichend expandiert wurden, erfolgt die Applikation der Zellen zurück in den Knorpeldefekt, um dort die Ausbildung von knorpelartigem Gewebe zu ermöglichen. Aufgrund von operationstechnischen und zellbiologischen Problemen wurde diese Methode zu trägerassozierten Verfahren weiterentwickelt, bei denen resorbierbare Trägermaterialien für eine dreidimensionalen Anordnung der Zellen und des sich bildenden Gewebes verantwortlich sind. Das Trägermaterial muss dabei verschiedene Anforderungen bezüglich der Biokompatibilität, der Struktur, der chemischen und mechanischen Stabilität sowie der Oberflächeneigenschaften erfüllen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Kompositmaterial, basierend auf Gelatine und dem synthetischen Polymer PLGA, hergestellt werden, das die Anforderungen an ein Trägermaterial möglichst weitgehend erfüllt. Durch die anfängliche Rezepturoptimierung gelang es dabei, das PLGA lösemittelfrei und homogen in der Gelatinebasis zu integrieren. Anschließend erfolgte die Herstellung des dreidimensionalen Trägermaterials mittels gerichtetem Einfrieren und Gefriertrocknung, wobei durch Anpassung der Herstellungsparameter eine gleichmäßige und parallel angeordnete, durchgängige Porenstruktur erzeugt werden konnte. Die nachfolgende Vernetzung und Sterilisation des Materials, welche Voraussetzung für die sich anschließenden *in vitro* und *in vivo* Anwendungen war, gelang in einem einzigen Prozessschritt durch Applikation von trockener Hitze.

Anhand der folgenden physikochemischen Charakterisierungen der entstandenen Gelatine-PLGA-Scaffolds konnte eine optimale Porosität und Porengröße für die Besiedelung der Zell-

träger festgestellt werden. Weiterhin zeigte die Untersuchung zur *in vitro* Degradation des Materials bei konstantem physiologischen pH-Wert und der Abwesenheit von spezifischen Enzymen eine gute chemische Stabilität der Scaffolds. Mittels infrarotspektroskopischer Analysen konnte zudem die Vernetzung und eine damit einhergehende stärkere Denaturierung der Gelatine nachgewiesen werden.

Im Rahmen von *in vitro* Zytotoxizitäts-Versuchen gemäß DIN EN ISO 10993 wurden Stoffwechselaktivität und Vitalität von Fibroblastenzellen nach Kontakt mit dem extrahierten Material analysiert. Die Ergebnisse deuteten dabei auf eine gute Biokompatibilität des Materials, welche durch eine nachfolgende subkutane Implantationsstudie bestätigt werden konnte. Zusätzlich waren an den histologischen Präparaten dieser *in vivo* Studie eine bessere Gewebeeintragung und eine geringere Fremdkörperreaktion, verglichen mit dem bereits zugelassenen Kontrollmaterial Ethisorb®, feststellbar.

Bei weiterführenden *in vitro* Versuchen zur Besiedelbarkeit der Zellträger mit primären Chondrozyten konnte durch eine dynamische Besiedelungsmethode und Optimierung der Zelldichte eine gleichmäßige Zellverteilung auf und in dem Scaffold-Material beobachtet werden. Immunhistologische Untersuchungen bezüglich des Gehalts an Kollagen II in der synthetisierten Matrix sowie die Zellmorphologie zeigten dabei, dass der differenzierte Status der Chondrozyten auch nach längeren Kultivierungszeiträumen erhalten blieb.

Eine erste Funktionalitätsstudie am Gelenkknorpeldefekt von Ziegen deutete zudem im Vergleich zur bisherigen operativen Standardmethode Mikrofrakturierung auf eine bessere Geweberegeneration des Defekts nach Mikrofrakturierung mit anschließender Applikation des Trägermaterials (AMIC-Verfahren) hin.

Der entwickelte Gelatine-PLGA-Scaffold stellt demnach insbesondere aufgrund seiner optimalen Struktur einen geeigneten Zellträger zur Unterstützung der Knorpelregeneration dar.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hyaliner Knorpel

Knorpel ist ein Stütz- und Bindegewebe des Skelettsystems und kann nach dem Charakter der Interzellulärsubstanz in hyalinen, elastischen und faserigen Knorpel eingeteilt werden. Alle Arten von Knorpelgewebe bestehen aus hochgradig spezialisierten Knorpelzellen (Chondrozyten) und einer wasserhaltigen, extrazellulären Matrix, welche die Form und die mechanischen Eigenschaften des Gewebes vorgibt (Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003).

Hyaliner Knorpel ist die am häufigsten vorkommende Knorpelart. Er bildet bereits die Grundlage für das Übergangsskelett des Embryos und bleibt nach dessen Verknöcherung z.B. als Knorpelspannen der Luftröhre, als Nasen- und Rippenknorpel, in den Epiphysenfugen sowie als Gelenkknorpel erhalten (Sommer 1990). Die komplexe und hochgradig geordnete Struktur des hyalinen Knorpels ist durch eine geringe Zelldichte sowie gruppenweise angeordnete Chondrozyten, die von einer konzentrisch geschichteten, proteoglykanreichen Matrix umgeben sind, charakterisiert (Aigner *et al.* 2003, Buckwalter und Mankin 1998a, Sommer 1990).

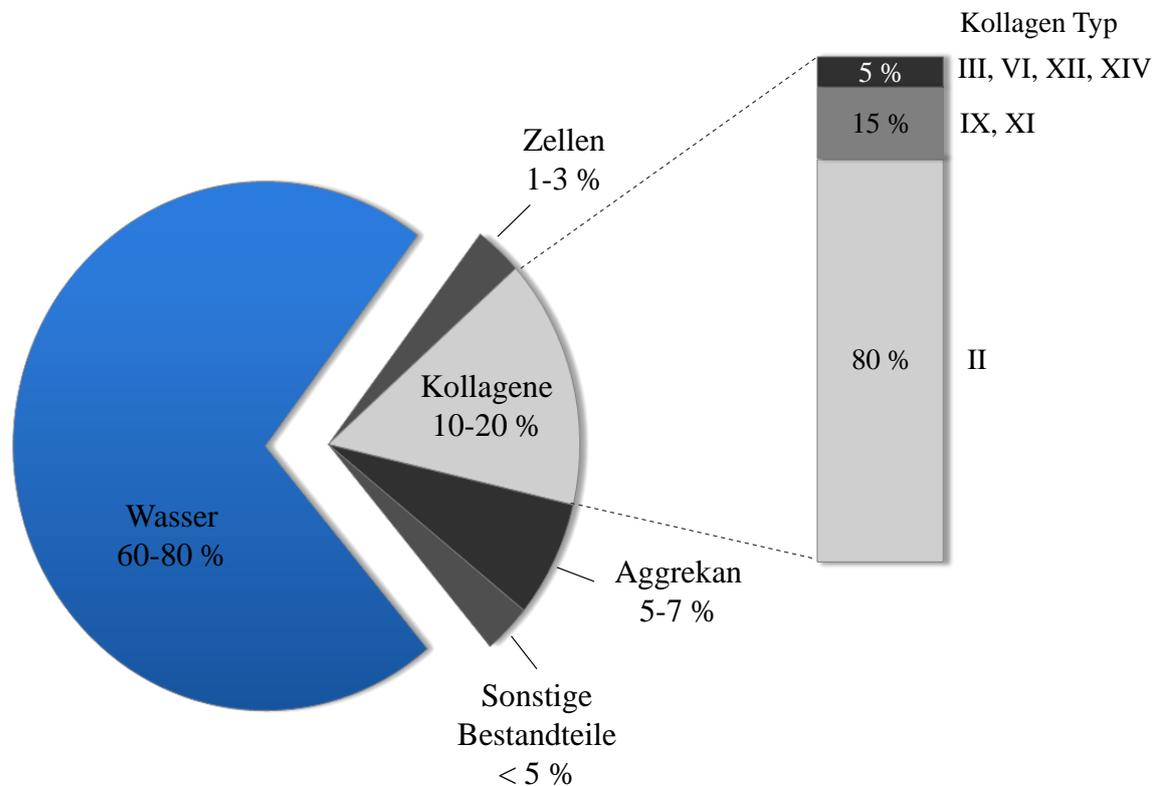
Im synovialen Gelenk bildet hyaliner Knorpel aufgrund seiner biomechanischen Eigenschaften das zentrale funktionale Element. Dementsprechend ermöglicht er aufgrund seiner Zugfestigkeit und Elastizität ein Abfedern von Spitzenbelastungen, die ein Mehrfaches des Körpergewichts betragen können (Aigner *et al.* 2003). Während die einzigartige Zugfestigkeit des Knorpels durch ein Netzwerk aus Kollagenfasern gewährleistet wird, sind hygroscopisch wirkende Proteoglykane für die hohe Elastizität des Gewebes verantwortlich (Caplan 1984). Im Zusammenspiel mit der Synovialflüssigkeit erlaubt er zudem eine nahezu reibungsfreie und somit schmerzlose Bewegung der Gelenke (Aigner *et al.* 2003, Mow *et al.* 1984, Sommer 1990).

Der Gelenkknorpel von Erwachsenen besitzt keine Blut- und Lymphgefäße oder Nervenbahnen und wird daher nutritiv über Diffusion von der Synovialflüssigkeit versorgt (Aigner *et al.* 2003, Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003). Dementsprechend besitzt artikulärer Knorpel nur ein geringes Regenerationspotential (Buckwalter und Mankin 1998a, Erggelet *et al.* 2000), weshalb Verletzungen oder Abnutzungen meist zu progressiven Gelenkbeschwerden führen und daher von großem medizinischem Interesse sind.

### 1.1.1 Zusammensetzung des Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel besteht aus 60-80 % Wasser, 10-20 % Kollagen Typ II und 5-7 % Proteoglykanen (Abbildung 1). Der zelluläre Anteil im humanen Gelenkknorpel beträgt dabei

je nach Gelenk und Lokalisation nur 1-3 % des Knorpelvolumens (Aigner *et al.* 2003, Buckwalter und Mankin 1998a).



**Abbildung 1: Prozentuale Zusammensetzung des hyalinen Gelenkknorpels.** Sonstige Bestandteile sind u.a. kleine Proteoglykane (Biglykan, Decorin, Fibromodulin), Link-Proteine, Fibronectin und Lipide.

### **Chondrozyten**

Im artikulären Knorpel sind als einziger Zelltyp hochspezialisierte Chondrozyten mit einer charakteristischen kugeligen Zellmorphologie und Syntheseaktivität vorhanden (Buckwalter und Mankin 1998a, Hardmeier *et al.* 2010, Martinek 2003). Auch im ausgereiften Zustand sind Chondrozyten trotz fehlender Zellteilungsaktivität fortwährend für die Synthese von Kollagen Typ II, großen Proteoglykanen und spezifischen nicht-kollagenen Proteinen als Bestandteile der Knorpelmatrix und somit für die Aufrechterhaltung der Integrität des Knorpelgewebes verantwortlich. Die typische Zellmorphologie kann dabei in den verschiedenen Knorpelzonen bezüglich Größe und Form variieren (Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003).

Wegen der fehlenden Blutzufuhr werden Knorpelzellen über Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit versorgt. Eine mechanische Belastung des Gewebes und die damit

einhergehende kontinuierliche Flüssigkeitsbewegung wirken dabei unterstützend auf das Vordringen der Nährstoffe in die extrazelluläre Matrix (Caplan 1984, Mohr 1986, Otte 1983). Aufgrund der Funktionsweise dieses Systems liegt im Knorpelgewebe allerdings eine relativ niedrige Sauerstoffkonzentration vor, weshalb Chondrozyten hauptsächlich auf den anaeroben Stoffwechsel angewiesen sind (Buckwalter und Mankin 1998a).

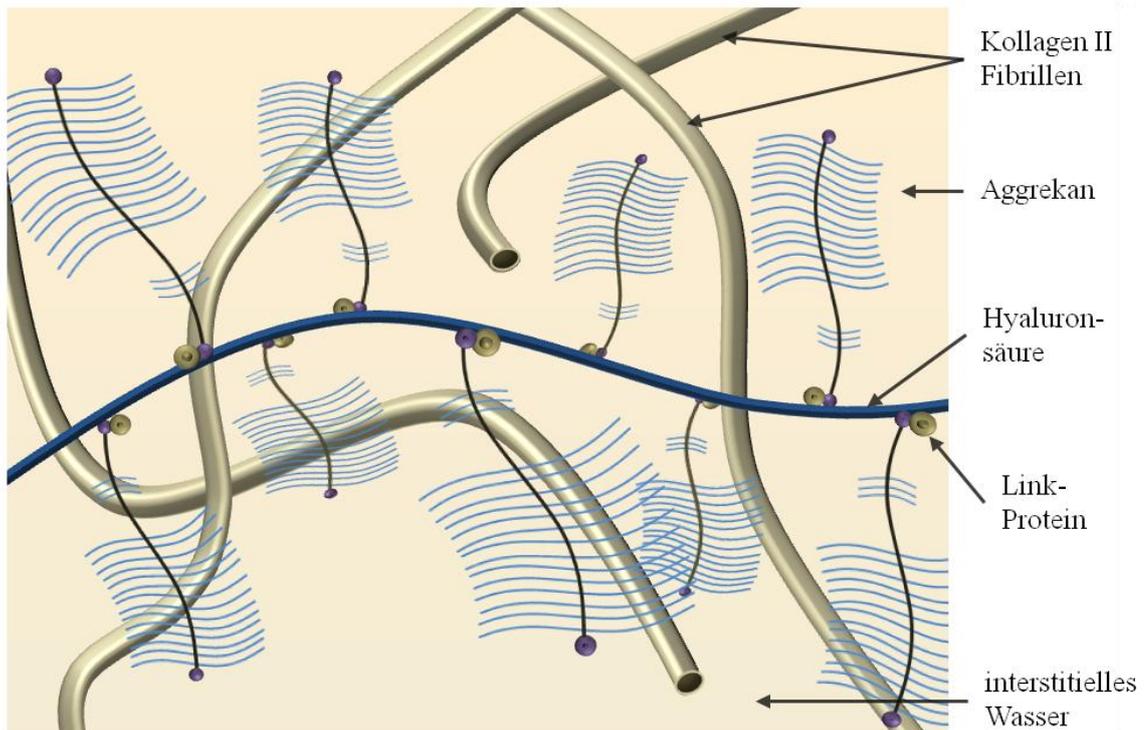
### *Extrazelluläre Matrix*

Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von hyalinem Knorpelgewebe ist Wasser, das aufgrund von Interaktionen mit einem Netzwerk aus strukturellen Makromolekülen dem Knorpel seine Form und Stabilität verleiht (Abbildung 2; Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003). Der größte Teil dieses Wassers ist dabei extrazellulär verteilt und frei beweglich, so dass es während einer Belastung des Knorpels aus der Matrix zurückgedrängt werden kann und somit eine Komprimierung des Gewebes erfolgt (Buckwalter und Mankin 1998a, Linn und Sokoloff 1965). Beim Nachlassen der Belastung strömt das Wasser aufgrund von osmotischem Druck und elektrostatischen Kräften zurück in das Gewebe, während ein Netzwerk aus Kollagenfasern als Widerstand gegen diesen enormen Schwellldruck wirkt (Aigner *et al.* 2003, Buckwalter und Mankin 1998a, Caplan 1984). Durch die resultierende konstante Flüssigkeitsbewegung wird gleichzeitig eine Verbesserung der Diffusion von Gasen, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, anderen kleinen Proteinen und Stoffwechselprodukten erzielt, die in der Gewebsflüssigkeit gelöst sind (Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003).

Kollagene sind ein weiterer wichtiger Bestandteil des Knorpels und maßgeblich für die Zugfestigkeit des Gewebes verantwortlich. Kollagene werden von Chondrozyten zunächst als Ketten von etwa 1100 Aminosäuren synthetisiert. Dieses sogenannte Prokollagen zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Glyzin sowie Prolin bzw. Hydroxyprolin aus, die eine Verdrehung der Aminosäurekette ermöglichen, so dass sich jeweils drei linksgängige Prokollagen-Helices zu einer rechtsgängigen Superhelix zusammenlagern können. Durch Kürzung der Kettenenden außerhalb der Zelle entstehen stäbchenförmige Tropokollagene, welche sich anschließend bündelweise zu längeren und dickeren Kollagenfibrillen anordnen (Caplan 1984).

Den größten Anteil an der extrazellulären Matrix von hyalinem Knorpel hat Kollagen II, aber auch Kollagene der Typen VI, IX, X und XI sind im Knorpelgewebe vorhanden. Diese sind unter anderem für die Einbindung der Chondrozyten in die extrazelluläre Matrix sowie für die Quervernetzung der Kollagenfibrillen untereinander und mit anderen Matrixkomponenten

verantwortlich. Das dadurch entstehende Netzwerk von Kollagenfasern bedingt im Wesentlichen die Festigkeit und die damit einhergehende strukturelle Integrität des Gelenkknorpels (Aigner *et al.* 2003, Eyre und Wu 1995, Hardmeier *et al.* 2010). Die Kollagenfibrillen unterliegen dabei aufgrund ihrer hohen Halbwertszeit von mehreren Jahrzehnten so gut wie keinem Umbau, da Kollagenasen im normalen adulten Knorpel nicht oder nur in sehr geringem Maß exprimiert werden (Aigner *et al.* 2003, Billinghamurst *et al.* 1997).



**Abbildung 2: Schematische Abbildung des makromolekularen Netzwerks der extrazellulären Knorpelmatrix.** Aggrekane, bestehend aus einem zentralen Hyaluronsäurestrang, der mit zahlreichen Proteoglykanen verknüpft ist, bilden zusammen mit einem Netzwerk aus Kollagen die struktur- und formgebenden Komponenten der Knorpelmatrix.

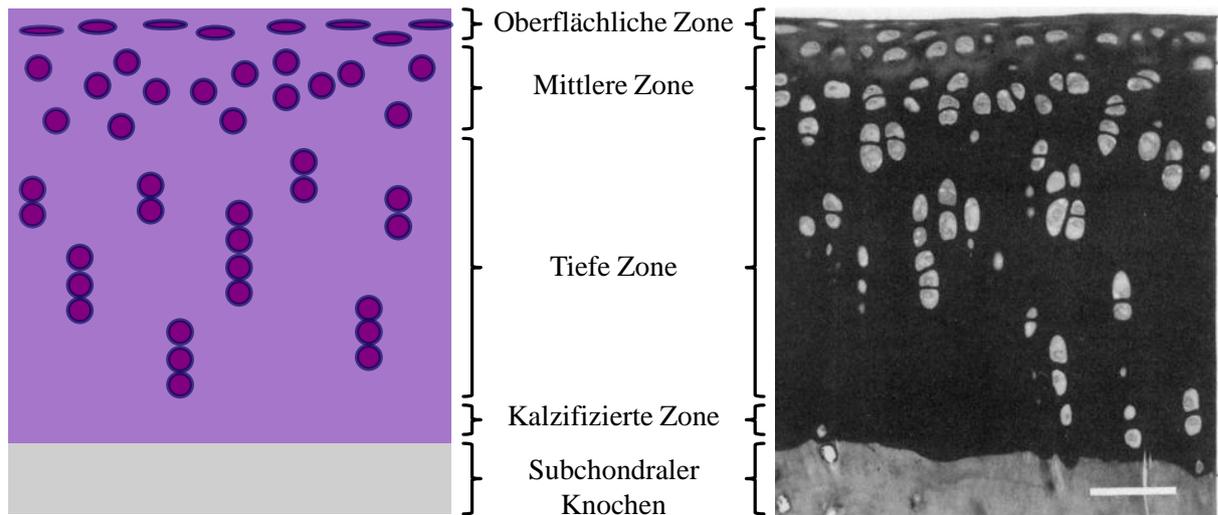
Eine weitere Gruppe von Makromolekülen mit zentraler Funktion sind die Proteoglykane. Das Zentrum dieser Glykoproteine ist ein langgestrecktes Proteinmolekül, an das lange, unverzweigte Glykosaminoglykane (GAGs) unterschiedlicher Zusammensetzung gebunden sind. Diese bestehen aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten, die jeweils einen Aminozucker und wenigstens eine negativ geladene Sulfat- oder Carboxylgruppe enthalten (Caplan 1984, Bruns und Steinhagen 2000). Der Polysaccharid-Anteil im Knorpel besteht dabei im Wesentlichen aus den GAGs Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Hyaluronsäure (Bruns und Steinhagen 2000).

Die resultierenden Proteoglykane können in zwei Gruppen eingeteilt werden: die großen, aggregierenden Proteoglykane (Aggrekane) und kleine Proteoglykane wie Decorin, Biglykan und Fibromodulin (Buckwalter und Mankin 1998a, Knudson und Knudson 2001). Aggrekane nehmen einen Großteil des interfibrillären Raums ein und stehen dort mit dem Kollagenetzwerk in engem Kontakt (Abbildung 2). Sie sind maßgeblich für die chemische und mechanische Bindung von Wasser und somit für die Elastizität des Knorpelgewebes verantwortlich (Hardmeier *et al.* 2010, Roughley und Lee 1994). Sie bilden über Verbindungsproteine (*link proteins*) nicht-kovalente Bindungen zu langen Hyaluronsäureketten aus und formen auf diese Weise teilweise extrem große und komplexe Aggregate. Dadurch erfolgt eine Verankerung der Proteoglykane in der extrazellulären Matrix, so dass die Beweglichkeit der Makromoleküle während der Deformation des Gewebes limitiert wird (Aigner *et al.* 2003, Buckwalter und Mankin 1998a, Caplan 1984). Im normalen Knorpel sind Aggrekane einem konstanten und strikt geregeltem Auf- und Abbau unterworfen, welcher Voraussetzung für die Erhaltung der Integrität der Knorpelmatrix ist (Martinek 2003).

Außerdem sind im Knorpelgewebe nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine vorhanden, die allerdings nur einen kleinen Anteil der Knorpelmatrix stellen und bisher nicht so gut untersucht sind wie Proteoglykane und Kollagene. Sie sind vermutlich ebenso wie die Proteoglykane am Wasserbindungsvermögen des Gewebes beteiligt und helfen das makromolekulare Netzwerk zu organisieren und zu stabilisieren (Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003).

### **1.1.2 Struktur des Gelenkknorpels**

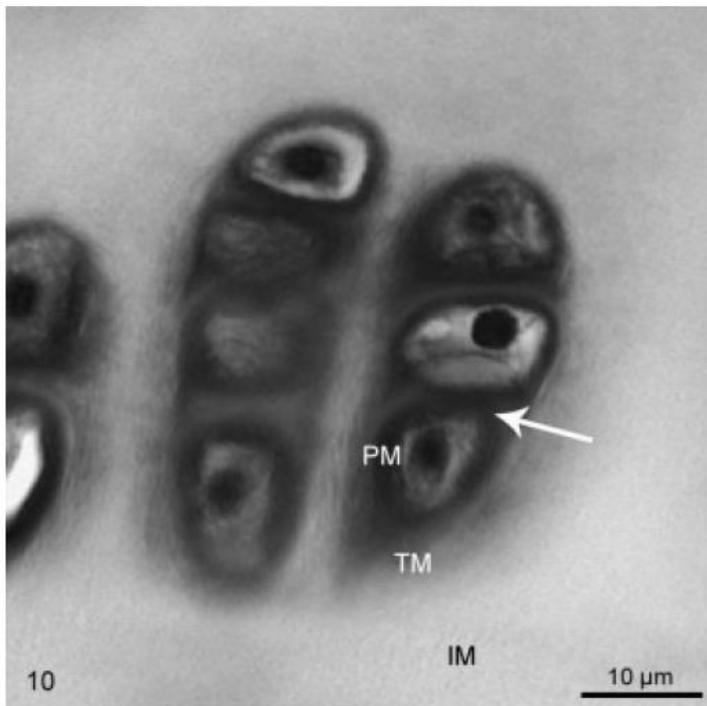
Die Chondrozyten des Gelenkknorpels organisieren Kollagene, Proteoglykane und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix in einer einzigartigen, hochgradig geordneten Struktur (Buckwalter und Mankin 1998a). Dabei variieren Zellmorphologie, Matrixzusammensetzung, mechanische Eigenschaften der Matrix und möglicherweise auch die Zellfunktion in Abhängigkeit zur Gelenkflächenentfernung. Dementsprechend kann der Gelenkknorpel anhand der unterschiedlichen Morphologie von Knorpelzellen und Matrix von der Oberfläche bis zum subchondralen Knochen in folgende vier Zonen eingeteilt werden: oberflächliche Zone, mittlere Zone, tiefe Zone und kalzifizierte Zone (Abbildung 3, Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003).



**Abbildung 3: Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels in oberflächliche, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone.** Links: schematische Abbildung (nicht maßstabsgetreu); rechts: mikroskopische Aufnahme des Gelenkknorpels eines 8-Monate alten Kaninchens (Maßstab: 50 µm, aus Buckwalter und Mankin 1998a).

Die oberflächliche Knorpelzone, die etwa 10 % der Knorpeldicke ausmacht, ist nochmals in zwei Schichten unterteilt. Während in der unteren Schicht spindelförmige Chondrozyten vorliegen, die zusammen mit den Kollagenfasern tangential zur Oberfläche ausgerichtet sind, überzieht die obere Schicht die Knorpeloberfläche in Form eines dünnen, zellfreien Belags aus feinen Fibrillen (*Lamina splendens*). Durch die spezielle Anordnung der Kollagenfasern erhält diese Zone eine besondere Zugfestigkeit und kann dadurch Scherkräften, die aufgrund von Bewegungen des Gelenks entstehen, standhalten (Schumacher *et al.* 2002, Roth und Mow 1980). Die mittlere Zone macht etwa 30 % der Knorpeldicke aus und bildet bezüglich der Zellmorphologie und Matrixkomposition einen Übergang zwischen der oberflächlichen und der tiefen Zone. Die Chondrozyten in diesem Bereich nehmen eine rundlichere, größere Form an und erscheinen diffus in der Matrix verteilt (Aigner *et al.* 2003). In der tiefen Zone, die mit einer Dicke von etwa 60 % den größten Anteil im Knorpelgewebe bildet, ordnen sich die kugeligen Knorpelzellen dagegen säulenartig und senkrecht zur Gelenkfläche an. Die Kollagenfasern dieser Zone sind ebenfalls senkrecht ausgerichtet und tauchen mit ihren Enden in eine dünne, zellfreie Grenzschicht, die sogenannte *Tidemark*, die zwischen dem kalzifizierten und unkalzifizierten Knorpel verläuft (Buckwalter und Mankin 1998a, Hunziker 2002a, Jadin 2005). Der elastische hyaline Knorpel wird abschließend durch eine dünne Schicht kalzifizierten Knorpels vom starren subchondralen Knochen getrennt. Die Chondrozyten dieser Schicht sind kleiner und teilweise vollständig von kalzifiziertem Knorpel umschlossen (Aigner *et al.*

2003, Martinek 2003, Buckwalter und Mankin 1998a), zudem sind viele Zellen in diesem Bereich tot oder degeneriert (Aigner *et al.* 2001).



**Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahme eines Chondrons.** Zentral gelegene Chondrozyten werden konzentrisch von perizellulärer Matrix (PM), territorialer Matrix (TM) und interterritorialer Matrix (IM) umgeben (aus Hardmeier *et al.* 2010).

Unabhängig von dieser zonalen Einteilung können Variationen in der Matrix in Form von konzentrischen Kompartimenten um die Knorpelzellen beobachtet werden. Diese Kompartimente werden in Abhängigkeit von ihrem Abstand zur Zelle als perizelluläre, territoriale und interterritoriale Region bezeichnet und entstehen durch die kontinuierliche Sekretion von Matrixbestandteilen durch die zentral gelegenen Chondrozyten (Buckwalter und Mankin 1998a). Die Knorpelzelle bildet dabei zusammen mit ihrer perizellulären Matrix die grundlegende funktionelle Einheit des Gelenkknorpels, welche als Chondron bezeichnet wird (Abbildung 4, Poole 1997).

Chondrone verankern die Knorpelzellen in der Matrix, schützen die enthaltenen Knorpelzellen vor Schäden durch mechanische Deformation und unterstützen die Aufrechterhaltung des Zell-Phänotyps. Zusammen mit den angrenzenden Knorpelregionen dienen sie zum Transport und möglicherweise auch als Speicherort für Nährstoffe, Stoffwechselprodukte und andere Moleküle und sind außerdem für die Signalübertragung zu den Knorpelzellen verantwortlich (Buckwalter und Mankin 1998a, Caplan 1984, Gray *et al.* 1988).

## 1.2 Knorpeldefekte und intrinsische Reparaturmechanismen

Das Auftreten von Knorpeldefekten ist meist mit Schmerzen und Funktionseinbußen bis hin zur Invalidität verbunden und kann oftmals zu einem vollständigen Gelenkersatz führen, wenn die Läsionen nicht erfolgreich behandelt werden (Pelttari *et al.* 2009). Knorpeldefekte können dabei entweder durch Verletzungen oder pathologische Prozesse ausgelöst werden. Während bei jungen Patienten oft osteochondrale Defekte aufgrund von Traumata überwiegen, sind bei Patienten über 40 Jahren vermehrt arthrotische Veränderungen des Gelenkknorpels in Form von Matrixläsionen und späteren chondralen Defekten zu beobachten (Noyes *et al.* 1980).

Traumatische Läsionen entstehen z.B. durch direkte Kontusionen bzw. indirekt durch Distorsionen oder Luxationen des Gelenks. Auch eine Anhäufung von Mikrotraumen, die aufgrund von hohen und repetitiven Impulsbelastungen entstehen, können Defekte verursachen (Bruns und Steinhagen 2000). Chondrale Läsionen müssen dabei in Hinblick auf die anwendbaren Therapieoptionen von subchondralen Defekten differenziert werden (siehe Kapitel 1.3), dementsprechend werden Knorpeldefekte nach Outerbridge in folgende Schweregrade eingeteilt (Bös und Ellermann 2003, Erggelet *et al.* 2000, Outerbridge 1961):

- Grad 0: intakter Gelenkknorpel, glatte weiße Oberfläche, gute Konsistenz
- Grad I: Erweichung der Knorpeloberfläche, glatt erhaltene Oberfläche ohne Schädigung oder Fibrillation
- Grad II: oberflächliche Schichten aufgeraut und deutliche Fibrillation, < 50 % Läsionstiefe
- Grad III: tiefe, makroskopisch erkennbare Fissuren bis in die Matrix, > 50 % Läsionstiefe, subchondraler Knochen nicht betroffen
- Grad IV: Zerstörung des Knorpels bis zum subchondralen Knochen und darüber hinaus

Traumatisch bedingte Defekte können unbehandelt zu einem progressiven Fortschreiten der Läsion und somit zu Arthrose führen (Ball *et al.* 2007), der weltweit am häufigsten auftretenden Gelenkerkrankung. Allein in Deutschland leiden über fünf Millionen Menschen an Beschwerden, die durch Arthrose verursacht werden, wobei vor allem ein Großteil der älteren Bevölkerung betroffen ist (Deutsche Arthrose-Hilfe e. V. 2011). Die Ursache ist meist ein Missverhältnis zwischen der Belastbarkeit und der tatsächlichen Belastung des Knorpels, z.B. aufgrund von Alterung, Übergewicht oder Gelenkfehlstellungen und führt zu einer zuneh-

menden Knorpeldegeneration. Aber auch andere Erkrankungen wie die rezidivierende Polychondritis oder *Osteochondrosis dissecans* (OCD) sind mit schweren Degenerationen des Knorpelgewebes verbunden.

Die ausbleibende Regeneration von traumatisch oder pathologisch verursachten Knorpelläsionen ergibt sich dabei aus der speziellen Anatomie des Gelenkknorpels und ist insbesondere durch die fehlende Vaskularisation sowie die Abwesenheit einer regenerativen Stammzellpopulation bedingt. Auch die niedrige Zelldichte, fehlende Zellproliferation und die Abgrenzung der Knorpelzellen von der Defektzone durch die extrazelluläre Matrix tragen zum geringen Regenerationspotential bei (Bruns und Steinhagen 2000).

Zwar existieren keine körpereigenen Mechanismen zur vollständigen Regeneration von Knorpeldefekten, allerdings kann eine begrenzte Reparatur durch intrinsische Prozesse beobachtet werden (Bruns und Steinhagen 2000). Dazu zählt zum einen die Aktivierung der Chondrozyten aufgrund von biochemischen Veränderungen im Gewebe, die zu einer Steigerung der Proteoglykansynthese und der Proliferation führt (Buckwalter und Mankin 1998b, Mitchell *et al.* 1992). Zum anderen tritt insbesondere an den Rändern von Knorpeldefekten das sogenannte „*Cartilage-flow*-Phänomen“ auf, bei dem sich die Defektränder abrunden und Knorpelmasse in die Läsion eingepresst wird.

Den wichtigsten Reparaturmechanismus bei subchondralen Knorpeldefekten stellt eine Blutung in die Läsion und die damit einhergehende Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen dar. In Folge dessen kommt es bestenfalls zur Bildung von fibrösem Knorpel, der durch die vermehrte Synthese von knorpeluntypischem Kollagen Typ I charakterisiert ist. Dadurch können zwar größere Defekte aufgefüllt und kleinere Läsionen verschlossen werden (Buckwalter und Mankin 1998b, Mankin 1982), jedoch ist das resultierende Narbengewebe funktionell wenig belastbar und teilweise einer nachfolgenden Degeneration unterworfen, wodurch spätere Arthrosen und Osteosklerosen des subchondralen Knochen ausgelöst werden können (Buckwalter und Mankin 1998b, Hunziker 2002b, Mitchell und Shepard 1976). Trotzdem nutzen verschiedene operative Verfahren zur Knorpeldefektbehandlung, insbesondere die sogenannten knochenmarkstimulierenden Techniken, diesen körpereigenen Reparaturmechanismus (siehe Kapitel 1.3.2).

### 1.3 Konventionelle Therapiekonzepte

Über die Jahrhunderte haben zahlreiche Mediziner versucht, Defekte im Gelenkknorpel mit teilweise sehr innovativen Techniken zu behandeln, so wurde z.B. die erste Knorpeltransplantation bereits im Jahr 1865 durchgeführt (nach Grande *et al.* 1989). Allerdings ist es erst in den letzten 30 Jahren mit Hilfe von modernen biochemischen und zellbiologischen Techniken gelungen, Fortschritte in der Behandlung von Knorpeldefekten zu erzielen. Wichtig für die Wahl des Therapieverfahrens sind dabei neben der Ursache des Schadens vor allem die Defektgröße, -lokalisation und -klassifizierung (siehe Kapitel 1.2). Auch Begleiterkrankungen wie Gelenkfehlstellungen, Zysten oder Tumore des subchondralen Knochens sowie Systemerkrankungen müssen bedacht werden (Erggelet *et al.* 2000).

#### 1.3.1 Konservative Therapien

Das Ziel von konservativen Therapien ist vor allem die symptomatische Beschwerdelinderung sowie eine Funktionsverbesserung des betroffenen Gelenks mit Hilfe von Medikamenten, Nahrungsergänzungsmitteln, Gelinjektionen oder physikalischen Maßnahmen. Beispielsweise kann eine medikamentöse oder physikalische Behandlung einer defektbegleitenden Entzündung der Gelenkschleimhaut unter Umständen eine weitere Degeneration von Knorpelschäden verlangsamen. Bisher konnte jedoch die Regeneration eines Gelenkknorpeldefekts durch eine konservative Therapie nicht schlüssig bewiesen werden (Erggelet *et al.* 2000).

#### 1.3.2 Operative Verfahren

Bezüglich der operativen Verfahren existieren verschiedene Techniken, die je nach Schweregrad des Knorpelschadens, klinischen Indikationen, Patientenprofil und Behandlungsziel angewandt werden (Sgaglione 2003). Sie können eingeteilt werden in symptomatische Techniken, knochenmarkstimulierende Techniken und verschiedene Arten von Transplantationen (Erggelet *et al.* 2000).

##### *Symptomatische Maßnahmen*

Die symptomatischen Techniken, wie die Gelenkspülung (Lavage) und die Knorpelglättung (*Debridement*) sollen vor allem zur Beschwerdelinderung und zur Funktionsverbesserung führen. Bei beiden Techniken werden losgelöste Knorpelfragmente, die als Entzündungsmediatoren wirken können, aus dem Gelenk entfernt, was die Schmerzsymptomatik bereits lindert (Chang *et al.* 1993, Erggelet *et al.* 2000, Livesley *et al.* 1991). Die Knorpelglättung führt

zwar zu einer länger anhaltenden Schmerzfreiheit als die Gelenkspülung (Hubbard 1996), jedoch erreichen beide Techniken keine Regeneration des Knorpelschadens (Redman *et al.* 2005).

### ***Knochenmarkstimulierende Techniken***

Zu den knochenmarkstimulierenden Techniken zählen die Abrasionsarthroplastik, die Pridie-Bohrung und die Mikrofrakturierung. Während bei der Abrasionsarthroplastik das verletzte Knorpelgewebe zusammen mit der subchondralen Knochenplatte entfernt wird (Ficat *et al.* 1979), erfolgt bei der Pridie-Bohrung nur ein mehrfaches Anbohren des Defekts bis zur Vaskularisierungszone des subchondralen Knochens (Pridie 1959, Insall 1974). Bei der Mikrofrakturierung wird dagegen erst das defekte Knorpelgewebe abgetragen, um die subchondrale Schicht anschließend mit kleinen Stiften oder Bohrern zu perforieren (Abbildung 5; Steadman *et al.* 1997). Alle diese Verfahren nutzen den intrinsischen Reparaturmechanismus der Einblutung in den Knorpeldefekt, der durch Penetration der subchondralen Knochenplatte ausgelöst wird und in der Bildung eines fibrösen Reparaturgewebes resultiert. Die Ergebnisse dieser Verfahren sind mitunter sehr positiv (Knutsen *et al.* 2004, Steadman *et al.* 2003), können allerdings stark variieren, da sie neben dem Alter und dem Aktivitätslevel der Patienten insbesondere von der Qualität des sich bildenden Reparaturgewebes beeinflusst werden (Hunt *et al.*, Johnson 2001, Steadman *et al.* 2003).

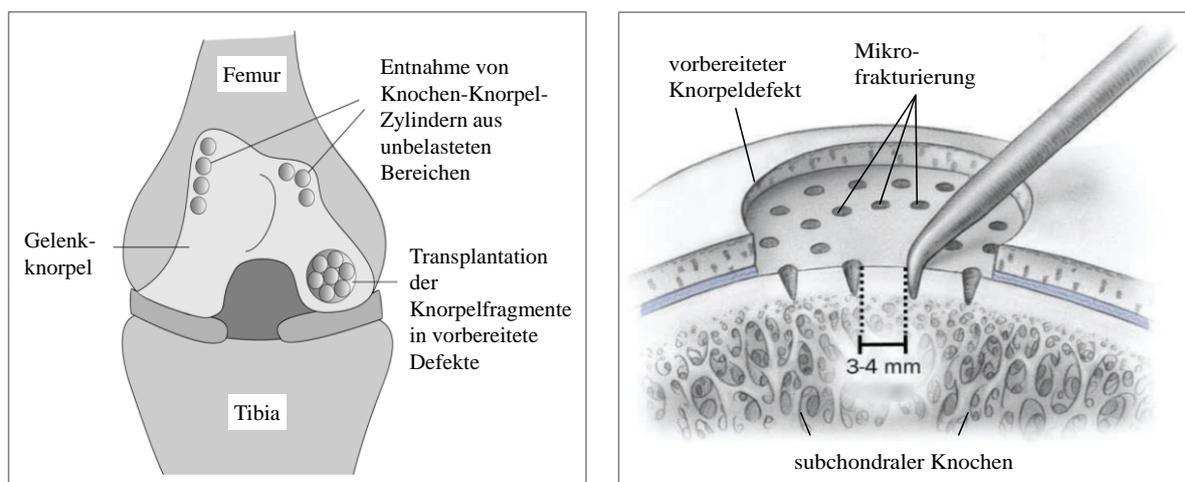
### ***Weichgewebetransplantate***

Bei der Weichgewebetransplantation wird Periost- oder Perichondrium-Gewebe in den Gelenkknorpeldefekt eingesetzt, wodurch zum einen eine sofortige Verbesserung der mechanischen Integrität des Knorpels erreicht wird (Erggelet *et al.* 2000). Zum anderen sind in beiden Gewebetypen pluripotente Stammzellen enthalten, die befähigt sind, in matrixproduzierende Chondrozyten zu differenzieren und somit zur Schließung des Defekts beizutragen (Amiel *et al.* 1985, Bruns *et al.* 1997, O'Driscoll 1999). Die Periost-Transplantation wird dabei aufgrund der besseren Verfügbarkeit des Donor-Gewebes (z.B. an der Tibia-Vorderkante) häufiger durchgeführt (Redman *et al.* 2005). Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Erhaltung der subchondralen Knochenplatte (Chu *et al.* 1997), jedoch wurde in tierexperimentellen und klinischen Studien trotz Bildung von hyalinartigem Knorpel eine hohe Varianz der Ergebnisse beobachtet (Redman *et al.* 2005).

### ***Osteochondrale Transplantate***

Die Transplantation von autogenem oder allogenen, osteochondralem Gewebe wird insbesondere bei schwerwiegenden sowie posttraumatischen Knorpeldefekten durchgeführt. Dazu werden zylinderförmige Knorpelfragmente zusammen mit dem subchondralen Knochen aus gering belasteten Knorpelarealen, typischerweise am medialen und/oder lateralen Trochlea-Rand entnommen und in den zuvor gleich groß ausgestanzten Knorpeldefekt eingesetzt (Abbildung 5; Erggelet *et al.* 2000, Redman *et al.* 2005). In den ausgestanzten Bereichen bildet sich aufgrund einer Einblutung in das Gewebe Faserknorpel. Das Verfahren wird auch als ‚Mosaikplastik™‘ (Hangody *et al.* 1997) bzw. ‚OATS™‘ (*Osteochondral Autograft Transfer System*; Bobic 1999) bezeichnet und wird meist am offenen Gelenk durchgeführt (Sgaglione 2005, Hangody *et al.* 1997).

Die osteochondrale Transplantation führt zur funktionalen Verbesserung der Gelenkfunktion sowie Schmerzlinderung und zeigt die besten Resultate in kleinen und mittleren subchondralen Defekten (Hangody *et al.* 2004, Jakob *et al.* 2002). Größere Defekte können aufgrund des limitierten Spendergewebes und der wachsenden Morbidität der Entnahmestelle nicht behandelt werden. Das Hauptproblem des Verfahrens stellt allerdings das Absterben von Chondrozyten in den Randbereichen der Knochen-Knorpel-Zylinder, bedingt durch die Entnahme dar, welches zur Gewebedegeneration sowie mangelnder Integration in das umgebende Empfängerewebe und somit zum Versagen des Transplantats führen kann (Evans *et al.* 2004). Neben der fraglichen Belastbarkeit der transplantierten Knorpelfragmente sind die biologischen und funktionellen Eigenschaften des Donor-Bereichs noch weitgehend unbekannt (Erggelet *et al.* 2000).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der osteochondralen Transplantation (links) und der Mikrofrakturierung (rechts) als exemplarische Techniken der konventionellen, operativen Verfahren (Abbildung links nach Redman *et al.* 2005; rechts nach Mithoefer 2006).**

Alle zurzeit verfügbaren chirurgischen Techniken zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten zeigen somit gewisse Vor- und Nachteile bezüglich der Anwendbarkeit und der Behandlungsergebnisse. Bisher existiert jedoch kein Verfahren, das als optimale chirurgische Methode heraussticht und bei minimaler Patientenbelastung sowie optimaler Kosteneffizienz und Anwendungsbreite zur Regeneration von zonal aufgebautem, hyalinem Knorpel führt (Sgaglione 2005). Die Integration des regenerierten Knorpelgewebes in den umgebenden nativen Knorpel und die permanente Funktionalität auch bei andauernder Belastung sind weitere Kriterien, die erfüllt werden müssen (Poole 2003).

Für eine Verbesserung der Behandlungsergebnisse, insbesondere hinsichtlich der Qualität des regenerierten Gewebes, wird bereits seit mehr als 20 Jahren nach alternativen Methoden geforscht, von denen zellbasierte Transplantationen als Strategie aus dem *Tissue Engineering* einen vielversprechenden Ansatz darstellen.

#### **1.4 *Tissue Engineering* Strategien für die Knorpelregeneration**

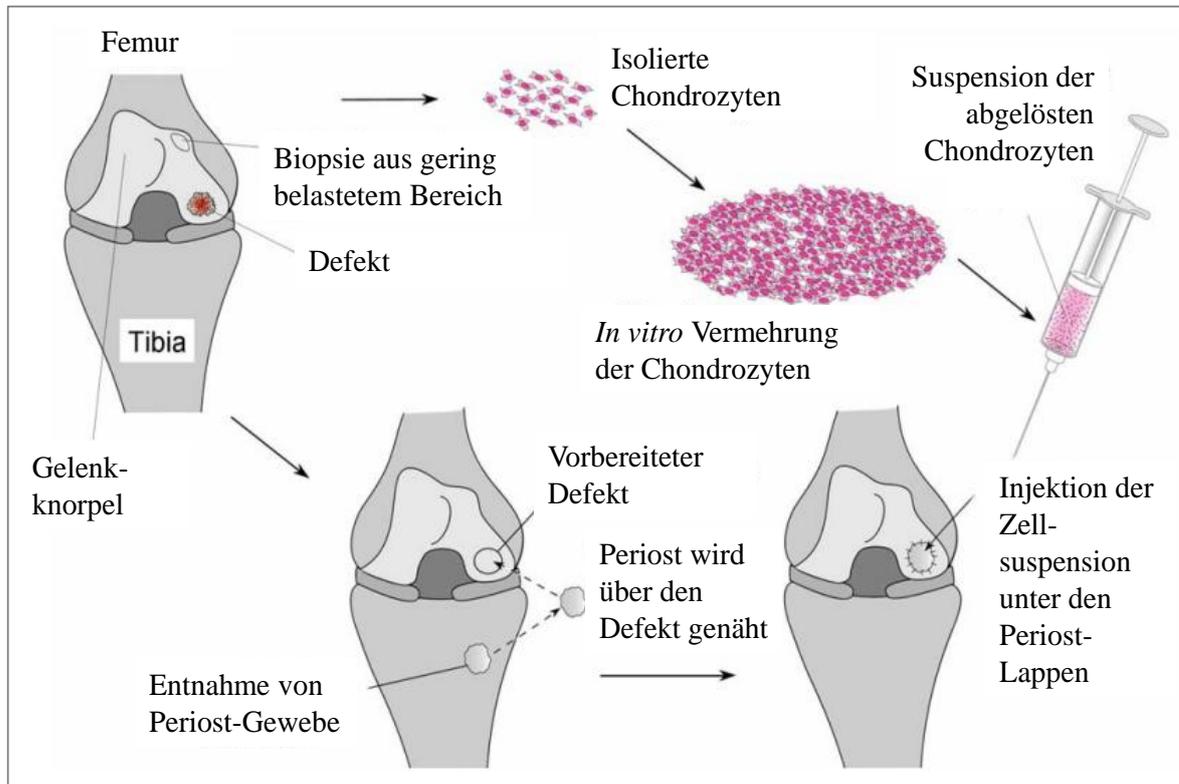
Das *Tissue Engineering* ist eine interdisziplinäre Technik, die zum Ziel hat, Gewebefunktionen zu erhalten, wiederherzustellen oder zu verbessern, indem Gewebe und Organe *de novo* gebildet werden. Die grundlegenden Ansätze dieses Verfahrens nutzen dabei die biologische Kompetenz lebender Zellen, einzeln oder in Kombination mit dreidimensionalen Trägermaterialien sowie Signalfaktoren (Chung und Burdick 2008).

Das erste bereits zugelassene, zellbasierte Verfahren für die Knorpelregeneration ist die 1994 von Brittberg *et al.* beschriebene Methode der autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT; Brittberg *et al.* 1994). Damals vermuteten Brittberg *et al.*, dass eine Transplantation von Chondrozyten zur Reparatur von Knorpeldefekten führen könnte, da sie als einziger vorhandener Zelltyp allein für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Brittberg 1999).

Da bei dem Verfahren autologe Zellen verwendet werden, erfolgt zunächst eine arthroskopische Biopsie eines kleinen Knorpelgewebestücks, aus dem anschließend die enthaltenen Chondrozyten enzymatisch isoliert werden. Aufgrund der sehr geringen Zellausbeute muss im nächsten Schritt eine *in vitro* Vermehrung der isolierten Zellen erfolgen, bevor sie in den Knorpeldefekt appliziert und mit Hilfe von Fibrin und einem Periost-Lappen, der auf dem umgebenden Knorpel vernäht wird, fixiert werden (Abbildung 6).

Das Regenerationspotential der Knorpelzellen wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen (Brittberg *et al.* 1994, Peterson *et al.* 2000, Peterson *et al.* 2002), allerdings kann die Morphologie des regenerierten Gewebes variieren. Zwar führt die Behandlung zur Linderung

der Symptome, in den meisten Fällen entsteht jedoch nur funktional minderwertiger Faserknorpel (Brittberg 1999, Grigolo 2005, Horas *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2003, Tins *et al.* 2005). Zudem ist das Verfahren sehr aufwendig und mit gravierenden zellbiologischen und operationstechnischen Problemen behaftet (Chung und Burdick 2008, Schneider *et al.* 1999).



**Abbildung 6: Schematische Abbildung der autologen Chondrozyten-Transplantation** (Abbildung nach Redman *et al.* 2005).

Eine Weiterentwicklung der ACT-Technik ist die matrix-assoziierte autologe Chondrozyten-Transplantation (MACT™), bei der die Knorpelzellen *in vitro* auf dreidimensionale, resorbierbare Trägermaterialien (Scaffolds) aufgebracht werden (Marlovits *et al.* 2004b, Marlovits *et al.* 2006). Auf diese Weise wird der Differenzierungsstatus der Chondrozyten beibehalten und dem sich bildenden Gewebe eine Orientierung vorgegeben, wodurch sich die Qualität des Regenerats verbessern soll (Schneider 2003). Das resultierende Zell-Scaffold-Konstrukt kann anschließend ohne weitere Abdeckung arthroskopisch in den Defekt eingesetzt werden. Erste klinische Ergebnisse diesbezüglich zeigen ein biologisch akzeptables Reparaturgewebe mit hyalinartigem Knorpel (Pavesio *et al.* 2008). Zurzeit existieren bereits verschiedene Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien auf dem Markt, die beim MACT-Verfahren als Zellträger für die autologen Chondrozyten angewendet werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Liste der bisher klinisch eingesetzten Zellträger** (aus Schneider 2003).

| <b>Material</b>    | <b>Bezeichnung</b>          | <b>Hersteller</b>                     |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Fibrinogen/Polymer | Bioseed <sup>®</sup>        | Biotissue AG Freiburg, Deutschland    |
| Hyaluronsäurenetz  | Hyalograft <sup>®</sup> C   | Fidia, Italien                        |
| Kollagenetze       | MACI <sup>®</sup>           | Verigen AG, Leverkusen, Deutschland   |
|                    | Chondro-Gide <sup>®</sup> * | Geistlich, Schweiz                    |
| Kollagengele       | CaReS <sup>®</sup>          | Ars Arthro AG, Esslingen, Deutschland |
|                    | Atelocollagen <sup>®</sup>  | Koken Co. Ltd, Japan                  |

\* als Periostlappenersatz

Ein neuer vielversprechender Ansatz aus dem *Tissue Engineering* ist das erstmals 2003 angewandte AMIC-Verfahren (autologe matrix-induzierte Chondrogenese), bei dem das Regenerationspotential von mesenchymalen Stammzellen ausgenutzt wird (Behrens 2005). Als erstes erfolgt dabei mit Hilfe der Mikrofrakturierung eine Perforierung der subchondralen Knochenplatte, was zu einer Blutung in den Defekt führt. Daraufhin wird ein zellfreies Trägermaterial in den Defekt appliziert, so dass die im Blut enthaltenen Stammzellen auf dem Zellträger adhären und in Knorpelzellen differenzieren können, die die Läsion anschließend durch die Synthese von extrazellulärer Matrix schließen. Diese Methode hat gegenüber der ACT oder MACT mehrere Vorteile: Das Verfahren ist patientenschonender sowie zeit- und kosteneffizienter, da nur ein einziger operativer Eingriff vonnöten ist und keine Laborkosten für die Zellkultivierung anfallen. Da die zellfreien Trägermaterialien außerdem vorhaltbar sind, können Knorpeldefekte sofort behandelt werden und neue Defekte, die durch die Knorpelgewebeentnahme entstehen und zu weiteren Schäden führen können, werden vermieden (Behrens 2005).

Sowohl das MACT- als auch das AMIC-Verfahren bieten demnach verschiedene Vorteile gegenüber der Zellträger-freien, autologen Chondrozyten-Transplantation und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Da beide Verfahren von Trägermaterialien abhängig sind, ist vor allem die Entwicklung von resorbierbaren und kosteneffizienten Zellträgern, welche die Anforderungen an ein solches Material optimal erfüllen, von größter Relevanz.

### 1.4.1 Trägermaterialien

Die Anforderungen an ein Trägermaterial im *Tissue Engineering* von Knorpel sind sehr vielfältig und komplex. Zunächst sollten weder die verwendeten Komponenten noch deren Degradationsprodukte zytotoxische Effekte hervorrufen, um eine entzündliche Reaktion auf das

Material *in vivo* zu vermeiden (Chung und Burdick 2008, Freed *et al.* 1994b). Die Oberfläche des Materials sollte weiterhin die Zelladhäsion, -vitalität sowie -proliferation unterstützen, während die dreidimensionale Struktur der Differenzierung der Zellen und der Orientierung des sich entwickelnden Gewebes dient (Chung und Burdick 2008, Bonassar und Vacanti 1998, El-Ayoubi *et al.* 2011, Freed *et al.* 1994b, Hutmacher *et al.* 2001).

Die Porosität sollte mindestens 90 % betragen, um eine hohe Materialoberfläche für die Zelladhäsion und Zell-Material-Interaktion, ausreichend Platz für die Bildung der extrazellulären Matrix sowie minimale Diffusionseinschränkungen für Nährstoffe sowie Stoffwechselprodukte zu gewährleisten (Chung und Burdick 2008, Freed *et al.* 1994b, Hollister 2002). Diesbezüglich muss allerdings ein Kompromiss zwischen Porosität und mechanischer Stabilität des Scaffolds gefunden werden. Letztere sollte an das jeweilige Gewebe angepasst werden, um die mechanische Integrität des Defektbereichs wiederherzustellen (Chung und Burdick 2008, Bonassar und Vacanti 1998, El-Ayoubi *et al.* 2011, Hollister 2002, Hutmacher *et al.* 2001). Zudem ist es vorteilhaft, ein degradierbares Material zu verwenden, so dass permanente Entzündungsreaktionen vermieden werden und am Ende ausschließlich das regenerierte Gewebe vorhanden ist (Bonassar und Vacanti 1998, Freed *et al.* 1994b). Dabei sollte die Degradationsrate des Materials an die Geweberegeneration angepasst werden (Chung und Burdick 2008, Bonassar und Vacanti 1998, Freed *et al.* 1994b, Hutmacher *et al.* 2001). Nicht zuletzt sind eine reproduzierbare Herstellung der 3D-Strukturen, die sich idealerweise an die Defektgröße anpassen können, sowie eine geeignete Sterilisationsmethode unverzichtbar (Freed *et al.* 1994 b, Hutmacher *et al.* 2001).

Die Biomaterialien können dabei in Form von Hydrogelen, Schwämmen oder Vliesen als Zellträger für die Knorpelregeneration dienen. Viele natürliche und synthetische Polymere wurden bereits als Gerüstmaterial untersucht. Aus natürlichen Polymeren wie Alginat, Agarose, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagen, Gelatine, Chitosan, Chondroitin-Sulfat und Zellulose können bioaktive Scaffolds hergestellt werden, die mit den Zellen interagieren können und somit eine natürlichere Oberfläche, verglichen mit synthetischen Polymeren, anbieten (Chung und Burdick 2008, Sachlos und Czernuszka 2003). Im Gegenzug können diese Polymere Immunreaktionen auslösen und Krankheitserreger übertragen (Arem 1985, Schmidt 2000, Chung und Burdick 2008), zudem verlieren sie aufgrund ihrer enzymatischen Degradierbarkeit schnell an Stabilität (Chung und Burdick 2008, Lee 2001).

Synthetische Polymere sind dagegen bezüglich ihrer mechanischen Stabilität und Degradation durch Modifizierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften variabel und kontrol-

lierbar. Beim *Tissue Engineering* von Knorpel kamen bisher vor allem die degradierbaren Poly( $\alpha$ -Hydroxy-Ester) wie Polylactide (PLA), Polyglycolide (PGA) sowie deren Copolymere Polylactid-co-Glycolid (PLGA) zum Einsatz, aber auch Polyethylenglykol (PEG) und Polyurethane (Chung und Burdick 2008). Aufgrund ihrer künstlichen Oberflächenchemie können diese Polymere allerdings keine direkten Zell-Interaktionen eingehen, was einen Einfluss auf die Zelladhäsion und Signalübertragung haben kann (Chung und Burdick 2008, Sachlos und Czernuszka 2003). Zudem lösen sie zwar bei direktem Kontakt keine Immunreaktion aus, ihre Biokompatibilität kann jedoch durch sehr saure oder toxische Abbauprodukte herabgesetzt werden (Chung und Burdick 2008, Lavik und Langer 2004, Sachlos und Czernuszka 2003, Seal 2001).

Die unterschiedlichen Biomaterialien und Formen von Zellträgern zeigen demnach verschiedene Vor- und Nachteile. Ein optimaler Scaffold, der die Eigenschaften und Struktur von nativem Knorpel nachahmt, konnte bisher jedoch nicht entwickelt werden (Chung und Burdick 2008, Hunziker 1999, Hunziker 2002a, Schneider 2003).

## 1.5 Zielstellung

Trotz der bereits lange bekannten geringen regenerativen Fähigkeiten von hyalinem Gelenkknorpel existiert bis heute keine optimale Lösung dieser Problematik. Weder die bestehenden operativen Techniken noch die autologe Chondrozyten-Transplantation als erstes zugelassenes Verfahren des *Tissue Engineerings* konnten konstant positive Ergebnisse erbringen und dabei zusätzlich eine geringe Patientenbelastung, optimale Kosteneffizienz und breite Anwendungsmöglichkeit anbieten. Weltweit wird daher nach einer Methode gesucht, welche die Behandlungsergebnisse von Knorpeldefekten verbessert. Erste vielversprechende Ansätze zeigen die aus der ACT weiterentwickelten matrix-assoziierten Verfahren MACT und AMIC. Die vermeintlich wichtigste Komponente für die Entstehung eines bioartifizialen, funktionellen Zell-Scaffold-Konstrukts ist dabei das zugrunde liegende Trägermaterial. Obwohl bereits viele Forschergruppen nach einem optimalen Zellträger suchen, konnte bisher kein Material gefunden werden, welches alle Anforderung erfüllt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Trägermaterial entwickelt und untersucht werden, das die strukturellen Eigenschaften des nativen Knorpelgewebes nachahmt und somit den Chondrozyten ein optimales Gerüst für den Aufbau von hyalinartigem Gewebe bietet. Zusätzlich sollte dabei eine kosteneffiziente Produktion des Materials im Vordergrund stehen. Im nachfolgenden Schema sind Überlegungen zur Konstruktion des Trägermaterials dargestellt (Abbildung 7):

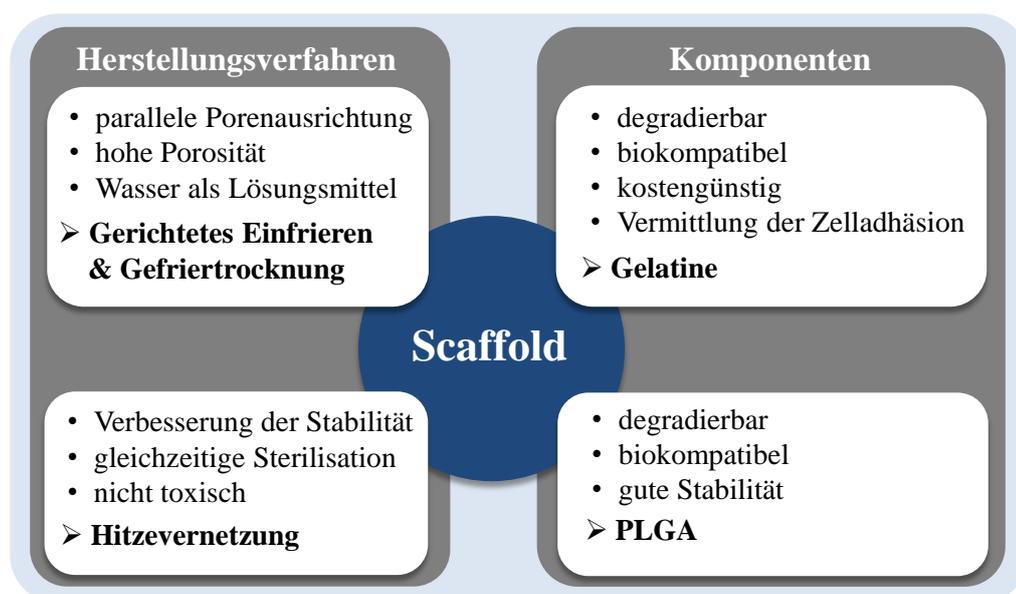


Abbildung 7: Schematische Abbildung zu den Überlegungen bezüglich der Konstruktion des Trägermaterials.

Als biokompatible und degradierbare Hauptkomponente wurde Gelatine gewählt, da sie die Zelladhäsion an das Material vermittelt und eine kostengünstige Alternative zu Kollagen darstellt. Aufgrund ihrer geringen chemischen und mechanischen Stabilität sollte zusätzlich PLGA in die Konstrukte involviert werden. Da dieses jedoch stark sauer degradiert, sollte der Anteil des synthetischen Polymers relativ gering gehalten werden.

Um eine parallele Porenausrichtung zu erhalten, die die Struktur des nativen Knorpels nachahmt, wurde das gerichtete Einfrieren mit Gefriertrocknung als Herstellungsverfahren gewählt. Vorteilhaft ist dabei die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel, welches sich nicht auf die Biokompatibilität des Materials auswirkt und durch die Gefriertrocknung vollständig entfernt werden kann. Für eine längerfristige Stabilisierung sollte anschließend eine Vernetzung der Gelatine durch die Applikation von trockener Hitze erfolgen, wodurch eine gleichzeitige Sterilisation der Konstrukte ermöglicht werden sollte. Auf diese Weise wurden keine chemischen Vernetzungsmittel benötigt, die die Biokompatibilität beeinflussen können.

Die Arbeit wurde dementsprechend in folgende Schwerpunkte aufgeteilt:

1. Ermittlung der optimalen Rezeptur zur Integration des PLGA in das gelatinebasierte Trägermaterial sowie Anpassung der Herstellungsparameter zur Optimierung der Gerüststruktur.
2. Physikochemische Charakterisierung der resultierenden Gelatine-PLGA-Scaffolds mit Schwerpunkt auf den strukturellen und biochemischen Eigenschaften des Zellträgers.
3. Analyse der Biokompatibilität der Zellträger anhand von *in vitro* Zytotoxizitätsversuchen und einer *in vivo* Studie zur Gewebeverträglichkeit.
4. Untersuchungen zur Eignung der Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger für Chondrozyten anhand von *in vitro* Versuchen bezüglich der Besiedelbarkeit und der Zellreaktion auf das Material.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|   |  |
|---|--|
| Alzianblau 8 GS   | Roth, Karlsruhe                          |
| DAPI  | Roche, Basel, Schweiz                    |
| DMEM-Medium   | Biochrom AG, Berlin                      |
| DMEM-Medium ohne Phenolrot  | Biochrom AG, Berlin                      |
| DMSO, Dimethylsulfoxid  | Roth, Karlsruhe                          |
| EB, Ethidiumbromid  | Sigma-Aldrich, St Louis, USA             |
| Esel-Serum  | Millipore, Billerica, USA                |
| Essigsäure  | Roth, Karlsruhe                          |
| Ethanol   | VWR, Darmstadt                           |
| Ethylacetat   | Roth, Karlsruhe                          |
| Eukitt  | Riedel de Haën, Seelze                   |
| FDA, Fluoresceindiacetat  | Sigma-Aldrich, St Louis, USA             |
| FKS, Fötale Kälberserum   | Biochrom AG, Berlin                      |
| Fluoromount G   | Southern Biotech, Alabama, USA           |
| Gelatine, Bovine Bone (Ph. Eur.), Typ B                             | Gelita, Ebersbach                        |
| Glutaraldehyd   | Sigma-Aldrich, St Louis, USA             |
| Kernechtrot   | Merck, Darmstadt                         |
| L-Ascorbinsäure   | Sigma-Aldrich, St Louis, USA             |
| Lichtgrün   | Merck, Darmstadt                         |
| MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) | Roth, Karlsruhe                          |
| NaCl, Natriumchlorid  | Baker, Deventer, Niederlande             |
| Orange G  | Waldeck, Münster                         |
| Paraformaldehyd   | Roth, Karlsruhe                          |
| PBS, Phosphatpuffer   | Biochrom AG, Berlin                      |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U)                                  | Biochrom AG, Berlin                      |
| Phosphormolybdänsäure   | Roth, Karlsruhe                          |
| PLGA RESOMER® RG 502 H  | Boehringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein |
| PLGA RESOMER® RG 503 H  | Boehringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein |
| Ponceau de Xylidine   | Roth, Karlsruhe                          |
| Ringerlösung  | DeltaSelect, Pfullingen                  |
| RPMI-Medium   | Biochrom AG, Berlin                      |
| Säurefuchsin  | Merck, Darmstadt                         |
| Silikon Köraform A18 (A+B)  | Alpina GmbH, Geretsried                  |
| Tris/HCl  | Roth, Karlsruhe                          |
| Trypanblau  | Biochrom AG, Berlin                      |
| Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)  | Biochrom AG, Berlin                      |
| Weigert's Eisenhämatoxylin A und B                                  | Roth, Karlsruhe                          |

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

|   |  |
|---|--|
| 24- und 48-Wellplatten                      | Greiner bio-one, Solingen                |
| 96-Wellplatten                              | Nunc, Langenselbold                      |
| Braunol                                     | Braun, Melsungen                         |
| Deckgläser                                  | R. Langenbrick, Emmendingen              |
| EDTA-Blutröhrchen KE/1.3                    | Sarstedt, Nürmbrecht                     |
| Ethisorb®-Tamponaden                        | Ethicon, Norderstedt                     |
| Heißluftsterilisationsbeutel, Polyamidbasis | VWR, Darmstadt                           |
| Kanülen                                     | Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA    |
| Leitsilber                                  | Plano, Wetzlar                           |
| Objektträger, Super Frost Plus              | R. Langenbrick, Emmendingen              |
| Parafilm                                    | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA |
| Pflaster Cosmopor E                         | Hartmann, Heidenheim                     |
| Prolene-Nahtmaterial                        | Ethicon, Norderstedt                     |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml              | VWR, Darmstadt                           |
| Reaktionsgefäße 15 ml; 50 ml                | VWR, Darmstadt                           |
| REM-Probenteller                            | Plano, Wetzlar                           |
| Skalpelle                                   | Braun, Melsungen                         |
| Spritzen                                    | Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA    |
| Spritzenfilter                              | Roth, Karlsruhe                          |
| Thermanox-Plättchen                         | Nunc, Langenselbold                      |
| TissueTek                                   | Sakura Finetek, Zoeterwonde, Niederlande |
| Zellkulturflaschen                          | Greiner bio-one, Solingen                |

### 2.1.3 Enzyme

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Kollagenase, Typ 1 von <i>Clostridium histolyticum</i> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Kollagenase, CSL Typ II                                | Biochrom AG, Berlin           |

### 2.1.4 Antikörper

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Primär-Antikörper (rabbit anti Collagen Typ II)    | Acris-Antibodies, Herford |
| Sekundär-Antikörper (donkey anti rabbit Alexa 488) | Invitrogen, Darmstadt     |

### 2.1.5 Technische Geräte und andere Apparaturen

|                                   |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Analyse-Waagen                    | Sartorius, Göttingen               |
| Archimedes Aufbau                 | Sartorius, Göttingen               |
| Brutschrank                       | Binder, Tuttlingen                 |
| Cleanbench                        | Thermo Fisher Scientific, Walldorf |
| Digital-Mikrometer, $\mu$ -mate   | Sony, Tokio, Japan                 |
| Feinwaage KC BA 100               | Sartorius, Göttingen               |
| Frequenzgenerator                 | Hewlett Packard, Wilmington, USA   |
| Cryo 1 °C Freezing Container      | Nalgene, Roskilde, Dänemark        |
| Gefriertrockner, Modylo           | Edwards, Crawley, Großbritannien   |
| Infrarot-Spektrometer, Equinox 55 | Bruker, Ettlingen                  |

|   |  |
|---|--|
| Kryostat HM560                                    | Thermo Fisher Scientific, Walldorf       |
| Kühl-Wasserbad, Haake K20                         | Thermo Fisher Scientific, Walldorf       |
| Mikroplatten-Reader MRX                           | Dynex Technologies, Denkendorf           |
| Netzteil  | Voltcraft, Hirschau                      |
| Millipore, Simpax 2                               | Millipore, Billerica, USA                |
| <i>Mikroskope:</i>                                |  |
| - Durchlicht-Mikroskop, DMRM                      | Leica, Wetzlar                           |
| - Fluoreszenz-Mikroskop, DM 4000M                 | Leica, Wetzlar                           |
| - Mikroskop-Kamera, DFC 320                       | Leica, Wetzlar                           |
| Partikelgrößenmessgerät Helos H1505               | Sympatec, Clausthal-Zellerfeld           |
| Peltier-Element                                   | Quick Cool, Wuppertal                    |
| Peltier-Controller TC2812-LAB-12                  | Cooltronic GmbH, Rossrüti, Schweiz       |
| REM XL 20   | Philips, Amsterdam, Niederlande          |
| Schüttler Intelli-Mixer                           | NeoLab, Heidelberg                       |
| Sputter-Coater                                    | Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein |
| Stromversorgung f. Peltier-Controller, Konstanter | Gossen Metrawatt, Nürnberg               |
| Trockenschrank                                    | Heraeus Instruments, Hanau               |
| Ultraschallwasserbad, Sonorex Super RK 100 SH     | Bandelin, Berlin                         |
| Zentrifuge Jouan C412                             | Thermo Fisher Scientific, Walldorf       |

### 2.1.6 Software

|  |  |
|--|--|
| GraphPad Prism 5.01                            | GraphPad Software, USA                   |
| ImageJ   | U. S. National Institutes of Health, USA |
| Origin 8                                       | Microcal Software, Northampton, USA      |
| Software zur Steuerung des Peltier-Controllers | Cooltronic GmbH, Rossrüti, Schweiz       |

## 2.2 Materialwissenschaftliche Methoden

### 2.2.1 Herstellung der Gelatine-PLGA-Scaffolds

Grundlage für die Produktion der Komposit-Scaffolds war die Herstellung einer Gelatinelösung mit homogen verteiltem Polylactid-co-Glycolid (PLGA). Hierfür wurden verschiedene Verfahren genutzt: Bei der Herstellung mit Zusatz von Lösemitteln wurde das hydrophobe PLGA durch Ethylacetat gelöst und als Öl-Phase mit der wässrigen Gelatinelösung emulgiert. Beim Verfahren ohne Lösemittelzusatz wurde das PLGA-Pulver durch Mörsern mit der Gelatinelösung vermischt, so dass feine PLGA-Partikel in der Lösung vorlagen. Die so gewonnenen Gelatine-PLGA-Lösungen wurden anschließend an eine Elektrolyse-Spannung angeschlossen, gerichtet eingefroren und gefriergetrocknet. Dieses bereits patentierte Herstellungsverfahren (Zehbe und Schubert 2004) sollte dabei an die neuen Rezepturen angepasst und optimiert werden.

#### 2.2.1.1 Herstellung der Rezepturen mit Lösemittel

Als erstes wurden die Gelatine und das PLGA-Pulver abgewogen, in ein steriles und lösungsmittelresistentes Polypropylen-Reaktionsgefäß überführt und durch Schütteln miteinander vermischt. Nach Zugabe von Wasser wurde das Reaktionsgefäß für 10 min bei RT geschüttelt (99 rpm), um das Aufquellen der Gelatine zu optimieren. Anschließend wurden Essigsäure und/oder Ethylacetat zugefügt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Das Reaktionsgefäß wurde für 15 bis 20 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, bis Gelatine und PLGA aufgelöst waren. Eventuell an der Wandung des Gefäßes haftendes PLGA wurde durch Ultraschallbehandlung und kräftiges Schütteln entfernt. Die fertige Lösung wurde für maximal 7 Tage bei -20 °C aufbewahrt.

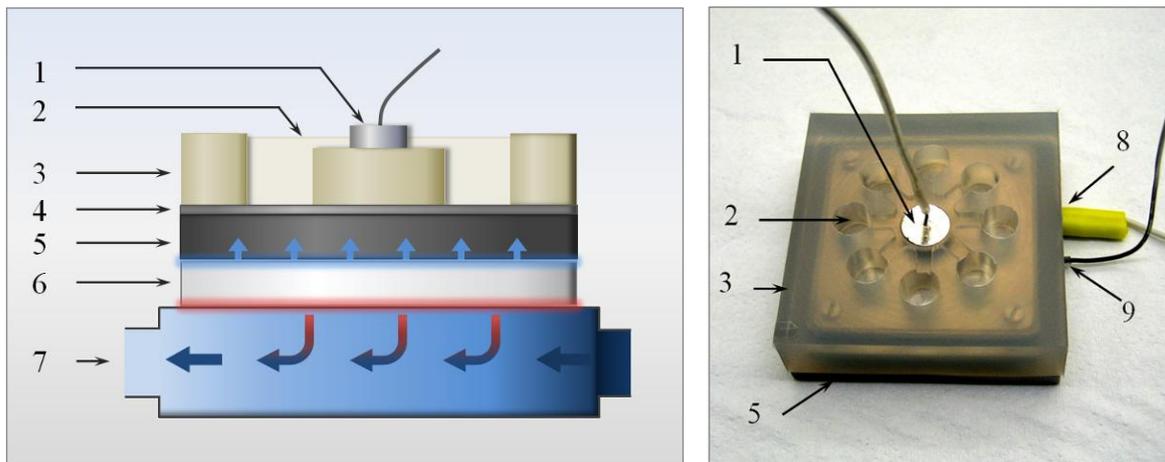
Rezeptur 1: 5 % (w/v) Gelatine; 0,1 % (w/v) PLGA RESOMER® RG 502 H; 5 % (v/v) Ethylacetat in *Aqua dest.*

Rezeptur 2: 5 % (w/v) Gelatine; 0,1 % (w/v) PLGA RESOMER® RG 502 H; 5 % (v/v) Essigsäure; 5 % (v/v) Ethylacetat in *Aqua dest.*

#### 2.2.1.2 Herstellung der Rezeptur ohne Lösemittel

Die Herstellung der 5 %igen Gelatinelösung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem Verflüssigen der Gelatine bei 60 °C im Wasserbad wurde die Lösung auf unter 50 °C abgekühlt.





**Abbildung 8: Schematischer Querschnitt durch den Einfrieraufbau (links) und die Scaffold-Form (rechts).** 1) Platinyylinder (Anode); 2) Hohlraum für Scaffold-Lösung; 3) Silikon-Oberteil der Scaffold-Form; 4) Platinplatte (Kathode); 5) Edelstahlplatte der Scaffold-Form; 6) Peltier-Element; 7) Kühlkörper; 8) Anschluss für Kathode; 9) Temperatursensor.

#### 2.2.1.4 Einfrierverfahren und Gefriertrocknung der Rezepturen mit Lösemittel

Für das Einfrieren der Rezepturen mit Lösemittel wurde die Elektrolyse-Spannung auf 20 V eingestellt. Nachdem die Gelatine-PLGA-Lösung im Wasserbad bei 40 °C verflüssigt worden ist, konnte sie in die Vertiefungen der zusammengesetzten Form pipettiert werden, so dass die Lösung Kontakt zur Anode hatte. Die komplette Scaffold-Form wurde auf das trockene, vorgekühlte Peltier-Element gestellt und anschließend auf -6 °C abgekühlt. Gegebenenfalls wurde durch leichtes Drücken oder Klopfen der Form die Eiskristallbildung induziert. Anschließend wurde die Lösung mit 0,2 – 0,3 °C/min eingefroren. Nach etwa 40 min waren die Scaffolds komplett gefroren, konnten in lösemittelbeständige Teflonplatten überführt und bei -80 °C bis zur Trocknung zwischengelagert werden.

Die Gefriertrocknung erfolgte mindestens 6 Tage in der Kühlfalle bei ca. -50 °C. Bei Erreichen von etwa  $8 \times 10^{-2}$  bis  $1 \times 10^{-1}$  mbar waren die Proben durchgetrocknet und konnten für weitere 4 h auf der oberen Ebene des Gefriertrockners bei RT nachgetrocknet werden. Anschließend wurden die zylinderförmigen Proben mit einem desinfizierten Keramikmesser in Scheiben geschnitten und bis zur Sterilisation in einem dicht schließenden Gefäß bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.1.5 Einfrierverfahren und Gefriertrocknung der Rezeptur ohne Lösemittel

Die Gelatine-PLGA-Lösung wurde im Wasserbad auf maximal 40 °C erwärmt und gegebenenfalls nochmals mit Ultraschall behandelt, um die PLGA-Partikel voneinander zu trennen. Anschließend wurde die Lösung durch 5-10 min langsames Schütteln (25 rpm) abgekühlt, um

eine gleichmäßige Verteilung der PLGA-Partikel in der Gelatinelösung zu erzeugen. Die Elektrolyse-Spannung wurde auf 29,5 V eingestellt. Anschließend erfolgte das Einfüllen der dickflüssigen Lösung in die zusammengesetzte Form, so dass der Kontakt zur Anode hergestellt wurde. Daraufhin wurde die Scaffold-Form auf das trockene, vorgekühlte Peltier-Element gesetzt und auf -5,0 °C abgekühlt. Die Induzierung der Eiskristallbildung wurde durch leichtes Klopfen der Form unterstützt. Um ein zu schnelles Fortschreiten der Eisfront zu verhindern, wurde die Temperatur am Regler auf -2,5 °C erhöht. Anschließend erfolgte das langsame Abkühlen des Peltier-Elements um 0,1 °C/min auf -10 °C. Nach 50 bis 60 min waren die Scaffolds komplett eingefroren, konnten aus der Form entfernt und in den Teflonplatten bei -80 °C bis zur Trocknung zwischengelagert werden.

Aufgrund der fehlenden Lösemittel konnte die Trocknung der Scaffolds auf der oberen Ebene des Gefriertrockners bei RT erfolgen. Nach maximal 3 Tagen und bei einem Unterdruck von  $8 \times 10^{-2}$  bis  $1 \times 10^{-1}$  mbar waren die Proben komplett trocken. Anschließend erfolgte das Schneiden der zylinderförmigen Proben mit Hilfe eines desinfizierten Keramikmessers und einer speziell angefertigten Edelstahl-Schneideform, je nach Anforderung in 2 oder 3 mm dicke Scheiben. Bis zum Sterilisations-Prozess wurden die Scaffolds in einem dicht schließendem Reaktionsgefäß bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.1.6 Dehydrothermale Vernetzung**

Nach der Gefriertrocknung und dem Schneiden der Scaffolds erfolgte die Vernetzung der Gelatine bei gleichzeitiger Sterilisation der Proben. Dazu wurden die Scaffolds zuerst in Sterilisationsbeutel für trockene Hitze gelegt. Die offenen Beutel wurden für 1 h bei 100 °C in den Trockenofen gestellt, um eventuell enthaltene Restfeuchtigkeit aus den Scaffolds zu entfernen. Anschließend wurde der Trockenofen auf eine Temperatur von 140 °C geheizt, bei welcher die offenen Beutel eine weitere Stunde verblieben. Danach wurden die Scaffolds eingeschweißt und für weitere 23 h bei 140 °C vernetzt und sterilisiert. Eine längere Aufbewahrung der sterilisierten Scaffolds erfolgte bei -20 °C.

## 2.2.2 Charakterisierung der Scaffolds

### 2.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Für morphologische Analysen von den gefertigten Scaffolds wurden diese zwischen 240 und 300 sec mit Gold besputtert und anschließend in einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Anhand der Aufnahmen wurden vor allem die Porengröße und -verteilung in den Scaffolds analysiert.

### 2.2.2.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie)

Mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie können Moleküle identifiziert und quantifiziert, Molekülveränderungen festgestellt und chemische Zusammensetzungen verschiedener Stoffe analysiert werden. Um Lösemittelreste in den Scaffolds und mögliche Molekülveränderungen durch den Vernetzungsprozess zu detektieren, wurden FTIR-Spektroskopie-Messungen im ATR-Modus (*attenuated total reflectance*) von 4000 bis 500  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von 1  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt. Die Auswertung der Spektren wurde mit der Software Origin durchgeführt. Dazu erfolgte als erstes eine manuell angepasste Basislinienkorrektur mit 5 bis 8 Stützpunkten und anschließender Normierung der Spektren auf den höchsten Peak des gesamten Spektrums bzw. der Amid-I-Bande. Der Grad der Denaturierung und Vernetzung der Proben wurde durch Berechnung des 1235/1450  $\text{cm}^{-1}$  bzw. des 1553/1450  $\text{cm}^{-1}$  Verhältnisses bestimmt (Haugh *et al.* 2009). Die  $\text{CO}_2$ -Bande im Bereich zwischen 2400 und 2275 Wellenzahlen wurde aufgrund der Anwesenheit von Luft- $\text{CO}_2$  bei allen Messungen detektiert und als Mess-Artefakt aus der Auswertung ausgeschlossen.

### 2.2.2.3 Analyse der Partikelgrößenverteilung

Die Analyse der PLGA-Partikelgrößenverteilung in den Gelatine-PLGA-Lösungen erfolgte mit Hilfe eines Partikelgrößenmessgeräts in einem Bereich von 0,9 bis 175  $\mu\text{m}$ . Nach Zugabe der jeweiligen Gelatine-PLGA-Lösung zum Transportmittel (destilliertes Wasser) wurde eine Aggregatbildung der Partikel durch eine anfängliche Applikation von 10 sec Ultraschall und nachfolgender kontinuierlicher Umwälzung vermieden.

### 2.2.2.4 Bestimmung der Porengröße und des Porengradienten

Die Porengröße und -form der Scaffolds aus den Rezepturen 1 bis 3 wurde anhand von REM-Aufnahmen (siehe Kapitel 2.2.2.1) mit anschließender Bildanalyse (siehe Kapitel 2.2.3.1)

ermittelt. Für eine detailliertere Bestimmung sowie der Untersuchung eines potentiellen Porengradienten wurden Serien-Gefrierschnitte eines Gelatine-PLGA-Scaffolds hergestellt (siehe Kapitel 2.3.4.1) und ungefärbt mikroskopiert. Anhand der Aufnahmen wurde ebenfalls mittels Bildanalyse die Porengröße in jedem Schnitt ermittelt, um aus den gewonnenen Daten einen mittleren Porendurchmesser für alle Schnitte zu bilden. Außerdem erfolgte ein Vergleich der mittleren Porendurchmesser jeder einzelnen Schnittebene untereinander, um einen möglichen Porengradienten innerhalb des Scaffolds zu detektieren.

### 2.2.2.5 Analyse der Porosität mittels Archimedes-Verfahren

Die Porosität eines Materials wird durch den Anteil an offenen und geschlossenen Poren am Gesamtvolumen des Probekörpers, sowie durch die Porengröße und -form charakterisiert. Die Untersuchung der offenen und geschlossenen Porosität des Gelatine-PLGA-Scaffold erfolgte mit Hilfe des Archimedischen Prinzips. Hierfür wurde die Masse von insgesamt 12 Scaffolds trocken ( $m_1$ ), in einer Prüfliquidität mit bekannter Dichte ( $m_2$ ) sowie getränkt mit dieser Flüssigkeit ( $m_3$ ) ermittelt. Als Prüfliquidität diente Dimethylsulfoxid (DMSO), da dieses im Gegensatz zu wässrigen Lösungen die Scaffolds nicht aufquellen lässt. Die Proben wurden vor der Messung von  $m_2$  und  $m_3$  mehrere Tage in DMSO inkubiert, um eingeschlossene Luftbläschen aus den Poren zu entfernen. Anhand der ermittelten Werte konnte über Formel (A) die Rohdichte der Scaffolds und über Formel (B) der prozentuale Anteil der offenen Poren bestimmt werden. Die geschlossene Porosität wurde aus dem Verhältnis der Dichte des porösen Scaffolds und der Reindichte des Scaffold-Materials berechnet (C). Letztere konnte anhand von kompakten Prüfkörpern, bestehend aus dem zusammengepressten Scaffold-Material, ebenfalls über das Archimedes-Verfahren und Formel (A) bestimmt werden. Die Gesamtporosität der Prüfkörper ergab sich anschließend aus der Summe der offenen und der geschlossenen Porosität.

$$(A) \quad \rho_{Scaffold} = \frac{m_1 \times \rho_{DMSO}}{m_1 - m_2}$$

$m_1$  – Masse trocken  
 $m_2$  – Masse Auftrieb in DMSO  
 $m_3$  – Masse getränkt in DMSO

$$(B) \quad Porosität_{offen} = \frac{m_3 - m_1}{m_3 - m_2} \times 100$$

$$(C) \quad Porosität_{geschlossen} = \frac{\rho_{Rein} - \rho_{Scaffold}}{\rho_{Rein}} \times 100$$

$\rho_{Scaffold}$  – Rohdichte Scaffold  
 $\rho_{DMSO}$  – Dichte DMSO = 1,04 g/cm<sup>3</sup>  
 $\rho_{Rein}$  – Reindichte Scaffold-Material

### 2.2.2.6 Untersuchung des Degradationsverhaltens *in vitro*

Das *in vitro* Degradationsverhalten der Gelatine-PLGA-Scaffolds wurde anhand von vier verschiedenen Abbaulösungen untersucht. Die Analyse der Degradation in konstant gepuffertem Milieu bei physiologischem pH-Wert erfolgte unter Verwendung von Phosphatpuffer als Prüflösung. Der hydrolytische Abbau der Scaffolds wurde in Ringerlösung untersucht, einer ungepufferten, wässrigen Lösung mit annähernd physiologischer Mineralkonzentration. Um eine beschleunigte, enzymatische Degradation zu simulieren, wurde die Abbauprüfung in Phosphatpuffer mit Zusatz von 1 µg/ml sowie 373 ng/ml Kollagenase Typ 1 durchgeführt. 373 ng/ml entspricht dabei der Kollagenase-Konzentration der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis (Holland *et al.* 2005).

Für eine bessere Handhabung der Proben während des Versuchs erfolgte der Abbau in speziell angefertigten Inserts aus Polypropylen mit einem passenden Zellulose-Filter im Boden. Die Inserts wurden anfangs mit Hilfe einer Feinwaage gewogen, nachfolgend autoklaviert und in eine sterile 48-Wellplatte einsortiert. Insgesamt 72 Scaffolds wurden nach 22 h des Sterilisationsprozesses ebenfalls gewogen und für weitere 2 h bei 140 °C inkubiert, um einer möglichen Kontamination durch den Wäge-Prozess vorzubeugen. Anschließend wurden die Scaffolds in die Inserts sortiert und mit 1 ml der jeweiligen Abbaulösung überschichtet. Die Inkubation der Wellplatte mit Ringerlösung erfolgte im Trockenschrank bei 37 °C, die der Wellplatten mit gepufferter Abbaulösung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach 3 Tagen sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen wurden jeweils 4 Proben aus jeder Abbaulösung entnommen, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und im Insert gefriertrocknet. Daraufhin konnte die Masse der Scaffold-Reste im Insert bestimmt und der Masseverlust der Scaffolds über folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Masseverlust}_{\text{scaffold}} = 100 - \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100$$

$m_1$  – Masse Scaffold + Insert zum jeweiligen Zeitpunkt  
 $m_2$  – Masse des Inserts  
 $m_3$  – Ausgangsgewicht Scaffold

Die Abbaulösungen wurden über den gesamten Versuchszeitraum wöchentlich erneuert, um den pH-Wert und die Enzymkonzentration konstant zu halten. Die abgenommenen Überstände wurden dabei vor der pH-Wert-Messung mit den Überständen der jeweils vorherigen Zeitpunkte gepoolt.

Ringerlösung: 8,6 g/l NaCl; 0,3 g/l KCl; 0,33 g/l CaCl in *Aqua dest.*

## 2.2.3 Computergestützte Analysen

### 2.2.3.1 Bildanalysen

Alle Bildanalysen von mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit Hilfe der Software ImageJ. Für die Quantifizierung und Ermittlung geometrischer Parameter von Objekten, wie z.B. Scaffold-Poren oder Zellen, wurde die Partikelanalyse-Funktion verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Bilder als erstes in Graustufen umgewandelt, um anschließend mit Hilfe der ‚*Threshold*‘-Funktion die zu untersuchenden Objekte vom Hintergrund zu trennen. Optional wurden eng aneinander liegende oder überlappende Partikel mit der ‚*Watershed*‘-Funktion vereinzelt. Über die ‚*Analyze Particles*‘-Funktion konnten anschließend zu kleine, große oder unförmige Bildartefakte aus der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Als morphologische Parameter wurden vor allem der Feret-Durchmesser und die Zirkularität des jeweiligen Objekts untersucht. Für den Feret-Durchmesser wird dabei der größte Abstand zweier Tangenten an die Partikel-Kontur nach Betrachtung aller möglichen Messrichtungen (0-180°) berechnet. Die Zirkularität gibt das Verhältnis des tatsächlichen Umfangs des Objekts zum Umfang eines Kreises mit der gleichen Fläche an und wird in Werten von 0 bis 1 (perfekter Kreis) angegeben.

### 2.2.3.2 Statistische Auswertungen

Von allen ermittelten Rohdaten wurden, wenn durchführbar, der Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet und dargestellt. Für statistische Auswertungen wurde bei Vergleich zweier Gruppen der Student’s t-Test angewandt. Der Vergleich mehrerer Gruppen untereinander erfolgte mit Hilfe von Varianzanalysen (2way-ANOVA) in Verbindung mit Bonferroni post-Tests (GraphPad Prism).

## 2.3 Biologische Methoden

### 2.3.1 Zellkultur und zellbiologische Arbeiten

#### 2.3.1.1 Verwendete Zellkultursysteme

In der vorliegenden Arbeit wurden hinsichtlich der *in vitro* Analysen zwei unterschiedliche Zelltypen tierischen Ursprungs verwendet. Die Zytotoxizitätsprüfungen erfolgten unter Verwendung der empfohlenen L929-Fibroblasten-Zelllinie, für die übrigen Analysen zur Zellproliferation, Zellverteilung und Matrixproduktion von Zellen auf den dreidimensionalen Matri-

zes wurden ausschließlich primäre, porcine Gelenkchondrozyten verwendet. Nachfolgend werden die Eigenschaften und die Kultivierung beider Zelltypen beschrieben.

#### ***L929-Fibroblasten-Zelllinie:***

Diese Maus-Fibroblasten-Zelllinie ist ein Subklon vom Stamm L und stammt somit aus dem subkutanen, areolaren und adipotischen Gewebe einer 100 Tage alten männlichen C3H/An Maus. Sie wurde erstmals im März 1948 von Sanford etabliert (Sanford 1948). Da sie einfach zu kultivieren ist und ein sensibles *in vitro*-Testsystem für die Zytotoxizität darstellt, wird sie häufig für die Bioverträglichkeitsprüfungen von Materialien, aber z. B. auch als Transfektions-Host eingesetzt. Die adhärennten Zellen wachsen als Monolayer und verdoppeln sich unter optimalen Kulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) etwa alle 24 Stunden, so dass die annähernd konfluente Kultur ein- bis zweimal in der Woche subkultiviert werden muss (siehe Kapitel 2.3.1.3).

Kulturmedium für L929-Zellen: DMEM; 5 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin (entspricht 100 U)

#### ***Primäre Gelenkchondrozyten (pGCs):***

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten porcinen pGCs wurden direkt aus dem Gelenkknorpel von 6 bis 10 Monate alten Hausschweinen isoliert (siehe Kapitel 2.3.1.2) bzw. freundlicherweise vom Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Die adhärennten pGCs dedifferenzieren bei längerer Kultur als Monolayer und verlieren dadurch ihre morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften. Um diese Dedifferenzierung zu vermeiden, erfolgte die Expansion der Zellen nur bis Passage 2, so dass die pGCs in allen Analysen in Passage 3 auf die Probekörper gegeben und als dreidimensionale Kultur weitergeführt werden konnten. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Subkultivierung der semikonfluenten Zellen wurde je nach Proliferationsgeschwindigkeit ein bis zweimal pro Woche durchgeführt.

Kulturmedium für pGCs: DMEM; 10 % FKS; 50 mg/l L-Ascorbinsäure; 1 % Penicillin/Streptomycin (entspricht 100 U)

### 2.3.1.2 Isolation primärer Chondrozyten aus artikulärem Knorpel

Als Ausgangsmaterial diente artikulärer Knorpel aus den Kniekondylen von Hausschweinen (Alter 6-10 Monate), der freundlicherweise von der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité zur Verfügung gestellt wurde. Für die Entnahme wurde das Kniegelenk chirurgisch geöffnet, um anschließend den Knorpel unter Aussparung der synovialen und subchondralen Bereiche mit einem sterilen Skalpell abzuschaben. Die Knorpelspäne wurden unverzüglich in ein Reaktionsgefäß mit sterilem PBS überführt und bis zur Isolation der Chondrozyten innerhalb von maximal 24 h bei 4 °C gelagert.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Steril-Bank durchgeführt, um eine Kontamination des Knorpelmaterials zu vermeiden. Durch mehrmaliges Waschen der gesammelten Knorpelstücke mit vorgewärmten PBS wurden eventuell anhaftende Blut- und Gewebereste entfernt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 70 %igem Ethanol zur Desinfektion des Ausgangsmaterials mit anschließendem, erneutem Waschen mit PBS. Die Knorpelspäne wurden in eine Petrischale mit Isolationsmedium gegeben und mit sterilen Skalpell in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Fragmente zerteilt. Diese wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, mit steril filtrierter Enzymlösung bedeckt und 18 h bei 37 °C und 3 rpm verdaut. Die resultierende Zellsuspension wurde bei 400 g und RT für 10 min abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und nachfolgend vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert, um die Anzahl und Vitalität der isolierten Zellen mittels Trypanblau-Methode (siehe Kapitel 2.3.1.4) zu bestimmen. Abschließend wurden die Chondrozyten in einer Dichte von 8 x 10<sup>3</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zur Verwendung in Passage 3 nach dem Standardverfahren kultiviert (siehe Kapitel 2.3.1.1).

|                   |  |
|-------------------|--|
| Isolationsmedium: | RPMI 1640; 10% FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin (entspricht 100 U) |
| Enzymlösung:      | Isolationsmedium mit 0,2 % (ca. 10.000 U) Collagenase CLS Typ II   |

### 2.3.1.3 Dissoziation und Subkultivierung von Zellen

Die Subkultivierung der L929-Zellen und der pGCs erfolgte etwa ein bis zweimal pro Woche, wobei das Vorgehen für beide Zelltypen identisch war. Das Passagieren der Chondrozyten wurde bei einer Konfluenz von 70-80 % durchgeführt, um einer Aggregatbildung der Zellen

während des Ablösens vorzubeugen. Die Fibroblasten konnten aufgrund der geringeren Matrixbildung auch bei 90 %iger Konfluenz noch passagiert werden.

Für die Dissoziation der Zellen wurde als erstes das alte Zellkulturmedium mit Hilfe einer Absaugvorrichtung abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit vorgewärmten PBS, um mögliche Serum-Reste, die zur Inhibierung des nachfolgenden Enzyms Trypsin führen können, zu entfernen. Daraufhin wurden etwa 10-20 µl Trypsin-EDTA-Lösung pro cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche zugefügt und durch Schwenken verteilt, so dass der Boden der Flasche mit Enzymlösung überschichtet war. Nach 5 bis 15 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Ablösen der Zellen lichtmikroskopisch überprüft und gegebenenfalls durch Schwenken der Flasche und leichtes Klopfen unterstützt. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 5 bis 10 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, konnte das Zellpellet in 3 bis 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und für die Subkultivierung in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:8 in neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Alternativ konnte nach dem Resuspendieren die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.3.1.4) werden.

#### **2.3.1.4 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau**

Mit Hilfe der Trypanblau-Methode kann sowohl die Zellzahl als auch die Zellvitalität von abgelösten Zellen bestimmt werden. Trypanblau dringt selektiv in das Zytoplasma von toten Zellen ein und färbt dieses blau, während es von vitalen Zellen aufgrund seiner Größe nicht aufgenommen werden kann. Nach dem Ablösen der Zellen (siehe Kapitel 2.3.1.3) wurden 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit 0,5%igem Trypanblau gemischt und 2 bis maximal 5 min inkubiert. Anschließend wurde die gefärbte Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipetiert und die Zellzahlen der vitalen und toten Zellen in 4 bzw. 8 großen Eckquadraten bestimmt. Das Volumen eines Eckquadrats entspricht 0.1 µl, so dass die Zellzahl pro ml über folgende Formel berechnet werden konnte:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \bar{x} \times 10.000 \times VF$$

$\bar{x}$  – Mittelwert aller Eckquadrate  
VF – Verdünnungsfaktor (= 2)

### 2.3.1.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für eine längere Konservierung von überzähligen Zellen wurden diese eingefroren. Die Vorgehensweise war dabei für die L929-Fibroblasten-Zelllinie sowie für die primären Gelenkchondrozyten identisch.

Als erstes wurden 1 ml-Kryoröhrchen vorbereitet und mit 600 µl Einfriermedium befüllt. Anschließend wurden die adhärennten Zellen trypsinisiert (siehe Kapitel 2.3.1.3) und mit DMEM ohne Zusätze auf  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 400 µl in die Kryoröhrchen gegeben und mit dem Einfriermedium vermischt. Der primäre Einfriervorgang erfolgte mit einer Kühlrate von etwa 1 °C/min bis -80 °C mit Hilfe einer speziellen Einfriervorrichtung für Kryoröhrchen (Cryo 1°C Freezing Container). Anschließend wurden die Röhrchen in Flüssigstickstoff-Tanks für die Langzeitlagerung überführt.

Das Auftauen der Zellen sollte im Gegensatz zum Einfrieren rasch erfolgen. Dazu wurden die aufzutauenden Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt, bis sich alle Eiskristalle aufgelöst hatten. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Kompletmedium gegeben und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets wurden Zellzahl und -vitalität bestimmt (siehe Kapitel 2.3.1.4), bevor die Zellen in angemessener Dichte in neue Kulturgefäße ausgesät wurden. Die Kontrolle der Adhärenz der Zellen erfolgte 24 h später lichtmikroskopisch.

Einfriermedium: DMEM; 15 % FKS; 10 % DMSO

### 2.3.1.6 Dreidimensionale Kultur von primären Gelenkchondrozyten

Für eine dreidimensionale Kultur von primären Gelenkchondrozyten wurden die Zellen auf Gelatine-PLGA-Scaffolds und Ethisorb®-Vliese aufgebracht und als Zell-Matrix-Konstrukte weiter kultiviert. Um dabei eine möglichst hohe Besiedelungseffizienz und optimale Zellverteilung im Material zu erhalten, wurde ein dynamischer Besiedelungsansatz gewählt. Vor der Besiedelung wurden Scaffolds und Vliese durch leichten Unterdruck mit Kulturmedium infiltriert, um Luftbläschen zu entfernen, die eine gleichmäßige Zellverteilung im Material stören könnten. Parallel dazu erfolgte die Dissoziation der pGCs in Passage 2 (siehe Kapitel 2.3.1.3) und das Zählen der Zellen (siehe Kapitel 2.3.1.4). Anschließend wurden die infiltrierten Matrices in sterile 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einem Zellsuspensionsvolumen, das die gewünschte Zellzahl enthielt (2 bis 3 Mio Zellen pro Scaffold), überschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden mit Kulturmedium auf 2 ml aufgefüllt, bevor sie 24 h bei 37 °C und 2 rpm

rotiert wurden. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen durch die Rotationsbewegung ständig in Bewegung gehalten, so dass die Scaffolds bzw. die Vliese die pGCs siebartig aus der Suspension filtern konnten. Am folgenden Tag wurden die Zell-Matrix-Konstrukte in 24-Wellplatten überführt, mit 2 ml Kulturmedium bedeckt und statisch weiter kultiviert. Zudem wurde die Anzahl und Vitalität der Zellen im Überstand bestimmt (siehe Kapitel 2.3.1.4), so dass die Besiedlungseffizienz über folgende Formel ermittelt werden konnte:

$$BE (\%) = 100 - \frac{Zellzahl_{\text{Überstand}}}{Zellzahl_{\text{Einsatz}}} \times 100$$

*BE – Besiedlungseffizienz in %*  
*Zellzahl<sub>Überstand</sub> – gezählte Zellzahl*  
*Zellzahl<sub>Einsatz</sub> – eingesetzte Zellzahl*

## 2.3.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden

### 2.3.2.1 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Die Prüfung auf *in vitro* Zytotoxizität der Gelatine-PLGA-Scaffolds erfolgte in Anlehnung an die DIN-Norm 10993-5 (DIN-Norm DIN EN ISO 10993-5, November 1999). Um einen Extrakt der Proben herzustellen, wurden 0,5 g der Scaffolds in 10 ml Zellkulturmedium für 24 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Scaffold-Reste vorsichtig durch eine 20 ml Spritze gedrückt, in die ein sterilisiertes Titan-Netz gelegt wurde, und dadurch vom Extrakt getrennt. Parallel dazu wurden jeweils 10.000 Zellen der Fibroblasten-Zelllinie L929 in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Subkonfluenz vorkultiviert. Die Morphologie der Zellen wurde vor Beginn der Prüfung lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen und durch den unverdünnten Extrakt sowie verschiedene Verdünnungen des Extrakts in Zellkulturmedium ersetzt. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium, als Positivkontrolle Medium mit Zusatz von 20 % DMSO.

Nach einer Einwirkzeit von 24 h wurde der Extrakt entfernt. Durch Waschen der Wells mit vorgewärmten PBS wurden alle Extrakt-Reste entfernt, bevor mittels MTT-Assay die Stoffwechselaktivität der Zellen ermittelt werden konnte (siehe Kapitel 2.3.2.2). Die pH-Werte der Extrakte wurden nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ohne Inkubation mit Zellen gemessen.

### 2.3.2.2 Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay ist eine von Mosmann (Mosmann 1983) entwickelte einfache Methode, die der Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen dient und somit für Untersuchungen der

Zellproliferation und der Zytotoxizität angewendet werden kann. Das Prinzip des Tests beruht dabei auf der Reduktion des gelben MTT-Farbstoffs durch verschiedene zelluläre, NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen sowie durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen in vitalen Zellen (Berridge *et al.* 2005). Das entstehende blau-violette Formazan korreliert mit der Stoffwechselaktivität der vitalen Zellen und kann durch eine photometrische Messung bei 550 nm quantifiziert werden.

Für die Durchführung des Tests wurde das verbrauchte Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen, welche daraufhin mit vorgewärmten PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden 100 µl frisches Zellkulturmedium (ohne Phenolrot als pH-Indikator) mit Zusatz von 10 % MTT-Reagenz zu den Zellen gegeben und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand aus den Wells abgenommen und das gebildete Formazan durch Zugabe von 50 µl DMSO aufgelöst. Die photometrische Messung der Absorption des Formazans erfolgte bei 550 nm. Abschließend wurde die prozentuale Stoffwechselaktivität der Zellen aus jeder Extrakt-Verdünnung im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet.

MTT-Reagenz: 5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) in PBS

### 2.3.2.3 Vitalfluoreszenzfärbung mit FDA/EB

Die Vitalfluoreszenzfärbung mit FDA/EB kann unter anderem zur Bestimmung der Zellvitalität von eukaryotischen Zellen angewandt werden. Dazu wurde die besiedelte Probe vorsichtig aus dem Nährmedium genommen und in eine kleine Petrischale gelegt. Anschließend wurde die Färbelösung mit Fluoreszeindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EB) zu den Zellen gegeben und je nach Struktur der Probekörper 5 bis 10 min abgedunkelt inkubiert. Währenddessen setzten die membrangebundenen Esterasen vitaler Zellen das lipidlösliche, nicht fluoreszierende FDA in das polare, grün fluoreszierende Fluoreszein um, welches in den Zellen akkumulierte. Ethidiumbromid wurde dagegen nur von membrangeschädigten Zellen aufgenommen. Dort interkalierte es mit der DNA und RNA der Zellen, wodurch sich seine Fluoreszenz-Emission stark erhöhte (Netuschil *et al.* 1989, Rotman und Papermaster 1966).

Die Probe wurde nach der Inkubationszeit im Fluoreszenzmikroskop unter verschiedenen Anregungsfiltern betrachtet. Die grüne Fluoreszenz in den vitalen Zellen konnte durch Wellenlängen von 450-490 nm angeregt und bei 510 nm detektiert werden (Leica-Filter I3). Die rote Fluoreszenz der toten oder stark geschädigten Zellen wurde bei 515-560 nm angeregt und bei 580 nm detektiert (Leica-Filter N2.1). Auf diese Weise entstanden zwei verschiedene

Aufnahmen desselben Bildausschnitts, die entweder übereinandergelegt oder einzeln analysiert werden konnten. Neben der Zellvitalität können mit dieser Methode auch Zellproliferation und Zellverteilung beurteilt werden.

FDA/EB-Gebrauchslösung: 0,5 % FDA-Stammlösung; 0,5 % EB-Stammlösung in 0,9 % NaCl-Lösung

FDA-Stammlösung: 5 mg/ml Fluoresceindiacetat in Aceton

EB-Stammlösung: 0,5 mg/ml Ethidiumbromid in 0,9 % NaCl-Lösung

### 2.3.3 Tierexperimentelle Studie zur Gewebeverträglichkeit

Für die Beurteilung des Verlaufs der Gewebeverträglichkeit und der Abbaurate des Gelatine-PLGA-Scaffolds *in vivo* erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 10993-06 (DIN-Norm DIN EN ISO 10993-6, August 2007) eine Langzeitimplantationsstudie im Ratten-Modell. Nach Genehmigung der Studie durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo-Nr: G0445/08) erfolgte die Versuchsdurchführung an der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité unter der Leitung von PD Dr. Christian Große-Siestrup.

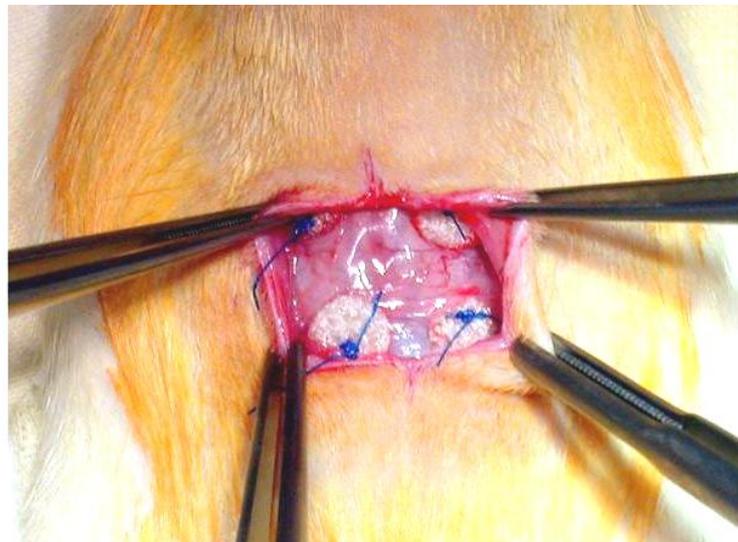
Die Scaffold-Prüfkörper wurden dabei in das subkutane Rückengewebe von weiblichen Wistar-Ratten implantiert und nach unterschiedlichen Zeitspannen wieder entfernt, um das explantierte Gewebe anschließend histologisch aufzubereiten. Außerdem wurde ein Kontrollmaterial mit bekannter Bioverträglichkeit mitgeführt, um bei der Auswertung gemäß der DIN-Norm die Gewebereaktion, die nach Kontakt mit dem Scaffold-Material beobachtet werden konnte, mit der Reaktion auf das Kontrollmaterial zu vergleichen. Als Kontrollkörper dienten resorbierbare Ethisorb® Tamponaden der Fa. Ethicon, welche aus Polyglactin 910 sowie Poly-p-dioxanon bestehen und eine vliesartige Struktur aufweisen. Das Material ist bereits zugelassen und wird hauptsächlich in der Mund- und Kieferchirurgie zur Blutstillung bei Knochendefekten angewandt.

#### 2.3.3.1 Subkutane Implantation

Nach einer 5tägigen Eingewöhnungszeit wurden 84 weibliche Wistar-Ratten in 6 Gruppen à 14 Tiere eingeteilt. Jeweils 7 Tiere einer Gruppe waren für die Implantation des Prüfmaterials, die anderen 7 für die des Kontrollmaterials vorgesehen.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Tiere auf die Operation. Dazu wurden sie mittels Inhalationsnarkose (1 % O<sub>2</sub>; 2 % N<sub>2</sub>O; 2,5-5 % Isofluran) narkotisiert, um das Körpergewicht zu

ermitteln, Blut abzunehmen, die Schwanzmarkierungen anzubringen und das Rückenfell zu scheren. Nachdem alle Tiere auf diese Weise vorbereitet und markiert worden waren, wurden sie für die Operation erneut narkotisiert und über eine Atemmaske kontinuierlich mit Narkosegas versorgt. Nach großflächiger Desinfektion des rasierten Bereichs wurde ein 2-3 cm langer Hautschnitt mittig am unteren Rücken gesetzt. Danach erfolgte die Präparation der subkutanen Hauttaschen, in die pro Ratte 4 Prüf- bzw. Kontrollkörper gesetzt und mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial an der Faszie des Rückenmuskels fixiert wurden (Abbildung 9). Das nicht-resorbierbare Material wurde verwendet, um das spätere Auffinden der degradierten Proben zu erleichtern. Der Schnitt wurde mit demselben Nahtmaterial vernäht, die Wunde gesäubert, nochmals desinfiziert und mit einem Pflaster abgedeckt. Die operierten Ratten wurden anschließend bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose beobachtet.



**Abbildung 9: Implantation von jeweils vier Prüf- bzw. Kontrollkörpern in subkutane Hauttaschen.** Die Materialien wurden mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial am Rückenmuskel der Ratten fixiert.

In der ersten Woche nach der OP wurden eventuelle Auffälligkeiten beim äußeren Erscheinungsbild und Verhalten der Tiere aus der Distanz sowie beim Handling im Belastungsprotokoll (gemäß Morton 1997) dokumentiert. Außerdem wurde das Gewicht der Ratten in der ersten und zweiten Woche nach der OP sowie anschließend alle 4 Wochen über den gesamten Versuchszeitraum ermittelt.

### 2.3.3.2 Explantation und Auswertung der *in vivo* Toxizität und Degradation

Nach 2, 4, 8, 12, 16 und 26 Wochen erfolgte die Explantation der Prüf- und Kontrollgruppe jeweils einer Studiengruppe à 14 Tiere.

Dazu wurden die Tiere narkotisiert, gewogen und am Rücken rasiert. Anschließend erfolgten eine Blutprobenentnahme und die Euthanasie der Tiere, bevor die Implantate mit dem umliegenden Gewebe entnommen wurden. Der explantierte Hautlappen wurde in Paraformaldehyd (4 %) fixiert und als Paraffinpräparat aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.3.4.2).

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen der Präparate erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Gewebereaktion auf das Prüf- und Kontrollmaterial gemäß DIN-Norm 10993-6 (DIN-Norm DIN EN ISO 10993-6, August 2007, Anhang E). Dazu wurden die angegebenen Zelltypen und Gewebereaktionen in vier 200fach<sup>1</sup> vergrößerten Gesichtsfeldern pro Präparat ausgezählt bzw. gewertet und tabellarisch aufgelistet. Anschließend wurde eine Rangwertung für die Reizung des Gewebes durch das Prüfmaterial im Vergleich zum Kontrollmaterial durchgeführt. Die Differenz beider Werte stellt den Grad der Gewebereizung durch das Prüfmaterial im Vergleich zum Kontrollmaterial dar und kann den folgenden Kategorien zugeordnet werden (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Kategorien des Punktbewertungssystems aus DIN EN ISO 10993-06, Anhang E.**

\*Eine negative Differenz wird als Null gewertet.

| Differenz*<br>Rangwert <sub>(Prüfmaterial)</sub> – Rangwert <sub>(Kontrollmaterial)</sub> | Kategorie      |
|---|----------------|
| 0 bis 2,9   | nicht reizend  |
| 3,0 bis 8,9   | leicht reizend |
| 9,0 bis 15,0  | mäßig reizend  |
| > 15,1  | stark reizend  |

## 2.3.4 Histologische Methoden

### 2.3.4.1 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte wurden von unbesiedelten sowie besiedelten Gelatine-PLGA-Scaffolds angefertigt, um die Porengröße und den Porengradienten der Scaffolds bzw. die Zellverteilung im

<sup>1</sup> Aufgrund der hohen Auflösung der verwendeten Mikroskopkamera wurde diese Vergrößerung statt der in der Norm angegebenen 400fachen Vergrößerung gewählt.

Material und die Matrixproduktion der Chondrozyten zu untersuchen. Die Vorgehensweise war dabei für die unterschiedlichen Materialien identisch.

Als erstes wurden die Proben nach der Kultivierung kurz in vorgewärmten PBS gewaschen und bei RT für 15 min in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Um eine Strukturveränderung der Präparate durch die Bildung von großen Eiskristallen beim nachfolgenden Einfrieren zu verhindern, wurden diese in steriler 30 %iger Sucroselösung bei 4 °C üN gelagert. Darauf folgend wurden die Proben in passenden Kryoförmchen ausgerichtet, für 1 h bei RT mit dem Einbettmedium TissueTek überschichtet und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Für die Herstellung der Schnitte wurde der gefrorene Probenblock mit TissueTek an einem Probenhalter befestigt, welcher in den Schneideapparat des Kryostaten eingespannt wurde. Präparate, die für histologische oder immunhistologische Färbungen vorgesehen waren, wurden möglichst dünn (14 µm) und orthogonal zur Porenausrichtung geschnitten (Querschnitte). Für die Analyse der Zellverteilung mussten die Proben dagegen dicker und parallel zur Porenausrichtung geschnitten werden (etwa 30 µm, Längsschnitte), um ein Zerreißen des Scaffold-Materials zu vermeiden. Porengröße und Porengradient der Scaffolds wurden anhand von 50 µm dicken Serien-Querschnitten eines unbesiedelten Gelatine-PLGA-Scaffolds untersucht. Die angefertigten Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgebracht, getrocknet und anschließend gefärbt (siehe Kapitel 2.3.4.3 und 2.3.4.4.) oder zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

#### **2.3.4.2 Paraffinpräparate**

Die Herstellung der Paraffinpräparate aus den subkutanen Gewebefragmenten der tierexperimentellen Studie erfolgte im Labor für Pathologie der Universitätsklinikum Mainz nach dem Standardprotokoll.

#### **2.3.4.3 Histologische Färbungen**

Die histologischen Färbungen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden kurz erläutert.

**Hämalaun & Eosin (H&E):** Die H&E-Färbung wurde als einfache Übersichtsfärbung nach dem Standardprotokoll für die Präparate der tierexperimentellen Studie angewandt. Die Färbung stellt Zellkerne, Kalk, sauren Schleim und grampositive Bakterien blau dar, das Zytoplasma wird rosa bis hellrot gefärbt.

**Masson-Goldner:** Die Masson-Goldner-Färbung ist eine Trichromfärbung, welche zur Anfärbung von Kollagenfibrillen und deren Differenzierung von Epithel- und Muskelgewebe entwickelt wurde. Diese Methode färbt Zellkerne schwarz, das Zytoplasma leuchtend rot, Gliafibrillen, Keratin und Muskelfasern ebenfalls rot und Kollagen sowie saure Mukosubstanzen grün. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Färbemethode wie die Alzianblau & Kernechtrot-Färbung zur Darstellung der chondrogenen Matrixbildung verwendet, mit dem Vorteil, dass das Scaffold-Material rot, die von den pGCs gebildete Matrix dagegen grün dargestellt wurde.

Für die Durchführung der Färbung wurden die vorgesehenen Kryoschnitte als erstes aufgetaut und in destilliertem Wasser gewässert. Nachdem die Zellkerne bis zu 5 min in Weigert´s Eisenhämatoxylin gefärbt worden sind, erfolgte das Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs mit Leitungswasser, wodurch die Präparate gleichzeitig gebläut wurden. An den 5-minütigen Färbeschritt mit Säurefuchsin-Ponceau schloss sich dreimaliges Waschen der Schnitte in 1 %iger Essigsäure an. Für die nachfolgende Differenzierung wurden die Objektträger 15-30 sec in Phosphormolybdänsäure-Orange G getaucht und wiederum in 1 %iger Essigsäure gespült, bevor die Gegenfärbung mit Lichtgrün (5 min) erfolgte. Der überschüssige Farbstoff wurde ebenfalls mit 1 %iger Essigsäure ausgespült, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach 2 x 5 min in Xylol mit Eukitt eingedeckt werden konnten. Die beschriebenen Zeitintervalle sollten dabei an das jeweilige Präparat angepasst werden. Teilweise erfolgte eine Modifizierung dieser Färbemethode, da bei manchen Präparaten die Lichtgrün-Färbung zu blass erschien. In diesen Fällen wurden die betroffenen Schnitte im Anschluss an die Masson-Goldner-Färbung 30 min mit Alzianblau gegengefärbt.

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Weigert´s Eisenhämatoxylin: | 50 % Lösung A; 50 % Lösung B  |
| Säurefuchsin- Ponceau:      | 0,07 % Ponceau de Xylidine; 0,3 % Säurefuchsin; 0,2 % Eisessig in <i>Aqua dest.</i> |
| Differenzierungslösung:     | 3 % Phosphormolybdänsäure; 2 % Orange G in <i>Aqua dest.</i>                        |
| Lichtgrün:                  | 0,1 % Lichtgrün; 0,2 % Eisessig in <i>Aqua dest.</i>                                |

#### 2.3.4.4 Immunhistologische Färbungen

Mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen können spezifische Antigene von Zellen oder Geweben durch Bindung eines passenden Antikörpers und anschließende Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden. Bezüglich des Nachweisverfahrens die-

ser Primärantikörper-Bindung existieren verschiedene Methoden. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode angewandt, bei der die Visualisierung mit Hilfe eines Sekundärantikörpers erfolgt, der mit einem Chromophor gekoppelt ist und an den Primärantikörper bindet. Auf diese Weise sollte mittels der entsprechenden Antikörper der Nachweis von knorpelspezifischem Kollagen II in den Zell-Matrix-Konstrukten erfolgen.

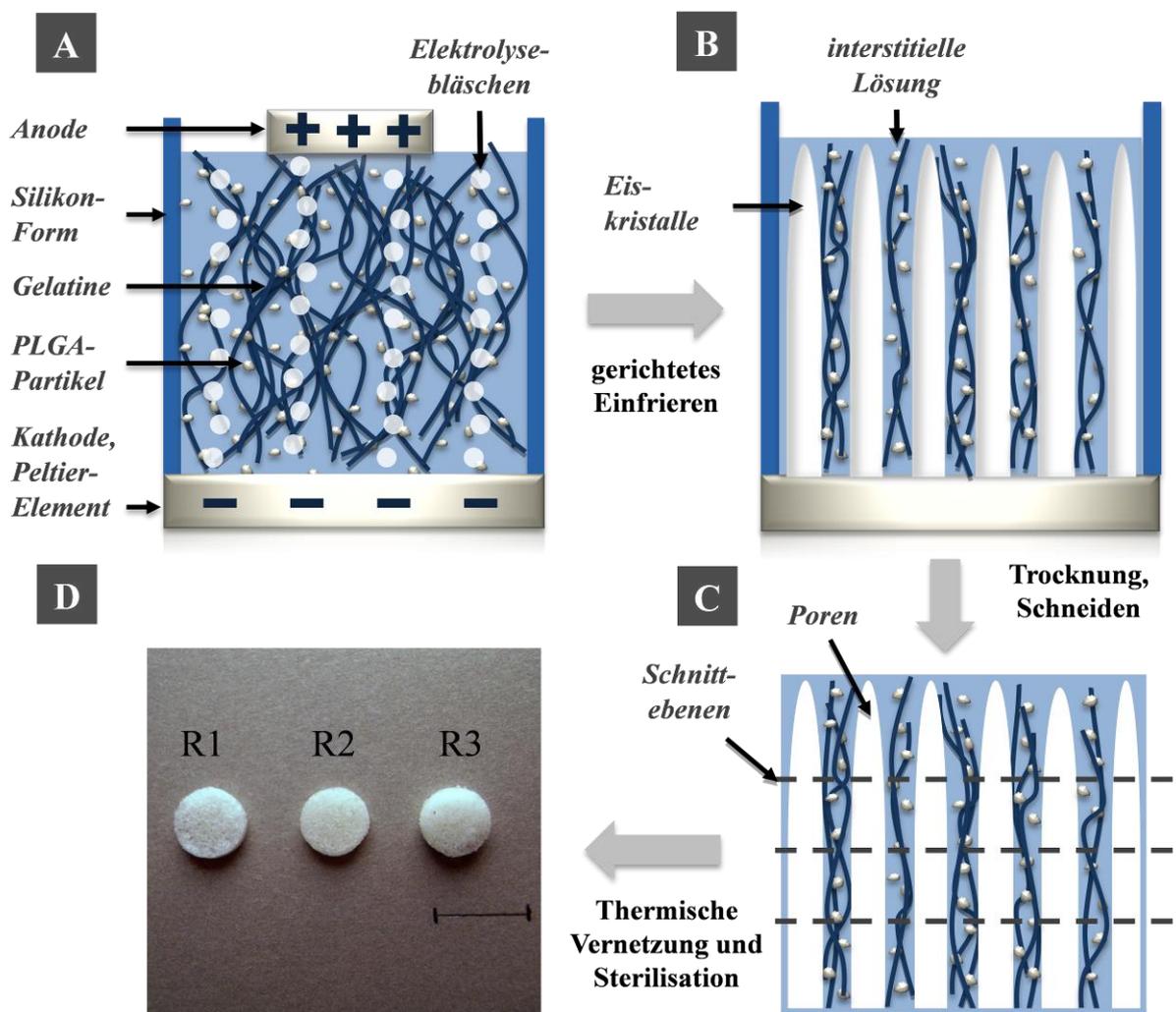
Dazu wurden die entsprechenden Kryoschnitte der Konstrukte zunächst dreimal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen, um anschließend unspezifische Bindungsstellen durch eine 30 minütige Inkubation mit der Blockierlösung zu maskieren. Daraufhin wurde der primäre Antikörper (2,5 % in Blockierlösung) für 45 min aufgebracht. Durch erneutes Waschen der Schnitte mit TBS wurde der Primärantikörper von unspezifischen Bindungsstellen entfernt, so dass der sekundäre Antikörper aufgetragen und für 45 min abgedunkelt inkubiert werden konnte. Bei diesem Schritt wurden gleichzeitig die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt, wodurch sich die Kerne beim späteren Mikroskopieren blau darstellten, während Kollagen II grün fluoreszierte. Abschließend wurden Reste des Sekundärantikörpers durch Waschen mit TBS entfernt und die Schnitte mit Fluoromount G eingedeckt. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das Präparat auszuschließen, wurde jeweils ein Schnitt nur mit diesem Antikörper inkubiert.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| TBS-Puffer:               | 100 ml 1,5 M NaCl; 100 ml 0,5 M Tris pH 7,6; <i>ad 1l</i> mit <i>Aqua dest.</i> |
| Blockierlösung:           | 5 % Esel-Serum in 1x TBS  |
| Lösung für Sekundären AK: | 100 ng/ml DAPI; 0,5 % sekundärer Antikörper in Blockierlösung                   |

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung der Gelatine-PLGA-Scaffolds

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Herstellung eines dreidimensionalen, porösen Scaffold-Systems mit biochemischen und strukturellen Eigenschaften, die das native Knorpelgewebe möglichst gut nachbilden. Die verwendete Herstellungsmethode basierte dabei auf dem gerichteten Einfrieren einer Suspension aus Gelatine und Polylactid-co-Glycolid (PLGA) mit anschließender Gefriertrocknung und thermischer Vernetzung (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.** A: Vorstrukturierung der Gelatine-PLGA-Lösung durch Elektrolysebläschen; B: Bildung von zellularen Eiskristallen durch gerichtetes Einfrieren der Lösung; C: Scaffold-Struktur als Negativabdruck der Eiskristallmorphologie nach Sublimation der Eiskristalle durch Vakuum-Trocknen (nicht maßstabsgetreu); D: Scaffolds der Rezepturen 1, 2 und 3 (Maßstab: 1 cm).

Die anfängliche Applikation einer Elektrolyse-Spannung wurde aus dem Patent von Zehbe und Schubert (Zehbe und Schubert 2004) übernommen und sollte zu einer vorangehenden Strukturierung der Gelatine-PLGA-Lösung führen. Aufgrund der elektrochemischen Aufspaltung von Wassermolekülen erfolgte dabei die Bildung sehr kleiner Sauerstoff- und Wasserstoffbläschen, die aufgrund der einsetzenden Gelierung in der abkühlenden Lösung fixiert wurden und somit erste Poren erzeugten (Abbildung 10 A).

Beim nachfolgenden Einfrierprozess entstanden in der vorstrukturierten Suspension Eiskristalle, die als Porogene wirkten und somit maßgeblichen Einfluss auf Porengröße und -orientierung im resultierenden Gerüst hatten: während dieses Einfrierprozesses trat zuerst eine Unterkühlung der Gelatine-PLGA-Lösung im Bereich mit der niedrigsten Temperatur auf, bevor ungelöste Partikel in der Suspension als Kristallisationskern für die Eiskristallbildung dienten (Oetjen und Haseley 2004). Es folgte das schlagartige Einfrieren des unterkühlten Bereichs, woraus eine feine Porenstruktur an der Probenunterseite resultierte; die übrige Probe konnte anschließend unter definierten Bedingungen erstarren. Dabei entstanden parallel zur Hauptwärmestromrichtung angeordnete zelluläre oder dendritische Eiskristalle, deren Größe von dem Temperaturgradienten, der Eisfrontgeschwindigkeit und der Konzentration gelöster Stoffe abhängig war (Kuberka *et al.* 2004, Schoof *et al.* 2001).

Während sich die Eisfront durch die Probe schob, wurden ausschließlich Wassermoleküle in die wachsenden Eiskristalle eingebaut, so dass sich gelöste Stoffe in den interstitiellen Zwischenräumen konzentrierten (Abbildung 10 B, Schoof *et al.* 2001, Qian und Zhang 2011). Nach dem vollständigen Einfrieren der Probe wurden die Eiskristalle beim anschließenden Gefriertrocknen durch Sublimation entfernt. Aufgrund des Wasserentzugs erfolgte bereits eine schwache Vernetzung der Peptidketten der Gelatine und es entstand ein stabiles, dreidimensionales Gerüst, das dem Negativabdruck der beim Einfrierprozess gebildeten Eiskristallmorphologie entsprach (Abbildung 10 C, Kuberka *et al.* 2004).

Mit Hilfe dieses Herstellungsprozesses wurden zylinderförmige Matrices mit einem Durchmesser von 7,5 mm und einer Höhe von etwa 10 mm hergestellt. Der mittlere Bereich der Zylinder wurde in ein bis zwei 2 mm dicke Scheiben geschnitten, der untere und obere Teil wurde aufgrund der geschlossenen Poren an der Unter- bzw. Oberseite verworfen (Abbildung 10 C und D).

Um das Auflösen der Scaffolds in wässrigen Lösungen zu verhindern, erfolgte im Anschluss eine stärkere Vernetzung der Gelatinefasern durch eine trockene thermische Behandlung der Proben für 24 h bei 140 °C. Dabei führt eine Dehydrierung der Gelatine auf unter 0,2 % Was-

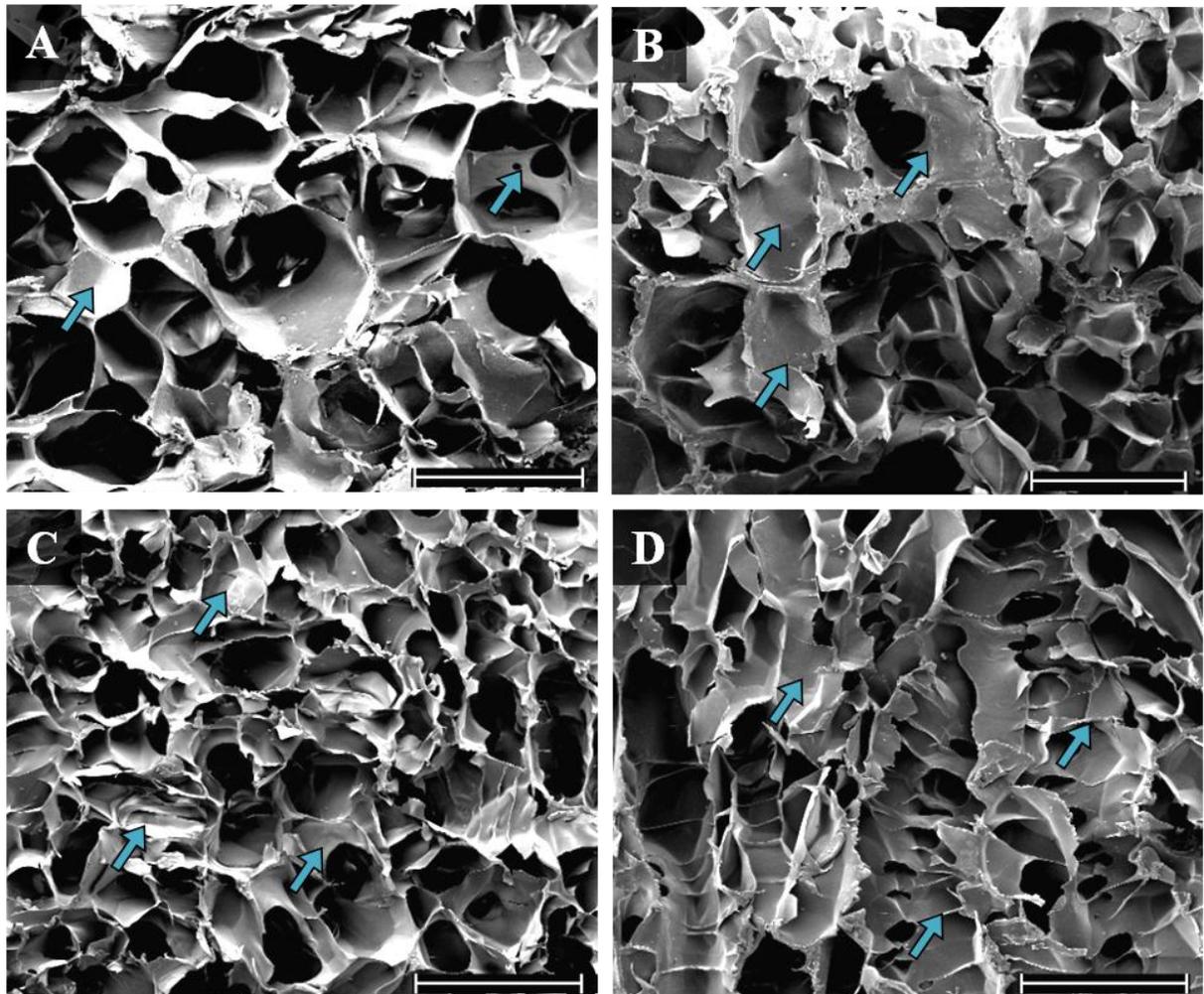
sergehalt zur Ausbildung von intermolekularen Amidbindungen und somit zur kovalenten Vernetzung der Peptidketten (Yannas und Tobolsky 1967). Zudem wurde die Sterilisationswirkung dieses Prozesses vom Institut für Technische Hygiene der Freien Universität Berlin anhand der hitzeresistenten Keime *Bacillus atrophaeus* und *Geobacillus stearothermophilus* untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle Keime nach 24 h bei 140 °C abgetötet worden waren. Somit konnte mit einem Prozess eine gleichzeitige Vernetzung und Sterilisation der Proben erreicht werden.

Gelatine weist als natürliches Polymer trotz des Vernetzungsprozesses eine geringere chemische und mechanische Stabilität auf als synthetische Polymere, wie PGA, PLA oder dessen Copolymer PLGA (Huang *et al.* 2005, Xia *et al.* 2004). Für den Einsatz der Scaffolds im Knorpeldefekt sollte daher eine zusätzliche Stabilisierung der Konstrukte durch die Integration von PLGA erfolgen. Um das hydrophobe Polymer möglichst homogen in der Gelatinelösung zu verteilen, wurden verschiedene Rezepturversuche durchgeführt. Als zusätzliche Komponenten kamen dabei Ethylacetat als organisches, halogenfreies Lösungsmittel für das PLGA und Essigsäure zum Einsatz. Letztere besitzt eine gute Löslichkeit in Wasser sowie in Ethylacetat und beeinflusst zudem die Eiskristallgröße während des Einfrierprozesses und somit die Porengröße der resultierenden Scaffolds (Kuberka *et al.* 2004).

Anfangs erfolgten verschiedene Tests bezüglich der optimalen Gelatine-, PLGA- und Lösungsmittelkonzentration sowie des Einfrier- und Trocknungsverhaltens der entstandenen Suspensionen. Dabei wurde vor allem auf eine möglichst geringe Konzentration des Ethylacetats und der Essigsäure geachtet, da beide den Gefrierpunkt der resultierenden Lösung verschoben, wodurch sowohl der Gefrier- als auch der Trocknungsprozess bei niedrigeren Temperaturen ablaufen mussten. Die zwei Rezepturen mit den besten Resultaten im Hinblick auf die Morphologie der gebildeten Scaffolds werden im Folgenden als Rezeptur 1 und 2 bezeichnet.

In Rezeptur 1 wurde das PLGA nur mit Hilfe von Ethylacetat gelöst, während zur Rezeptur 2 zusätzlich Essigsäure zugegeben wurde, um die Integration des PLGA zu verbessern und die Porengröße der Scaffolds zu variieren. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Ethylacetat in Wasser bildeten beide Gelatine-PLGA-Lösungen eine Emulsion mit dem in Ethylacetat gelösten PLGA als innere Phase. Die so erzeugten Gelatine-PLGA-Suspensionen wurden in den Einfrierlauf gefüllt, mittels Elektrolyse vorstrukturiert und abgekühlt. Bei -6 °C setzte üblicherweise die Eiskristallbildung am Boden der Form ein, so dass die anschließende geregelte Temperaturabnahme von 0,2 bis 0,3 °C/min zum gerichteten Einfrieren der Scaffolds führte.

Daraufhin erfolgte die Haupttrocknung der Proben für mindestens 6 Tage sowie die Nach-trocknung und die Sterilisation der Proben.

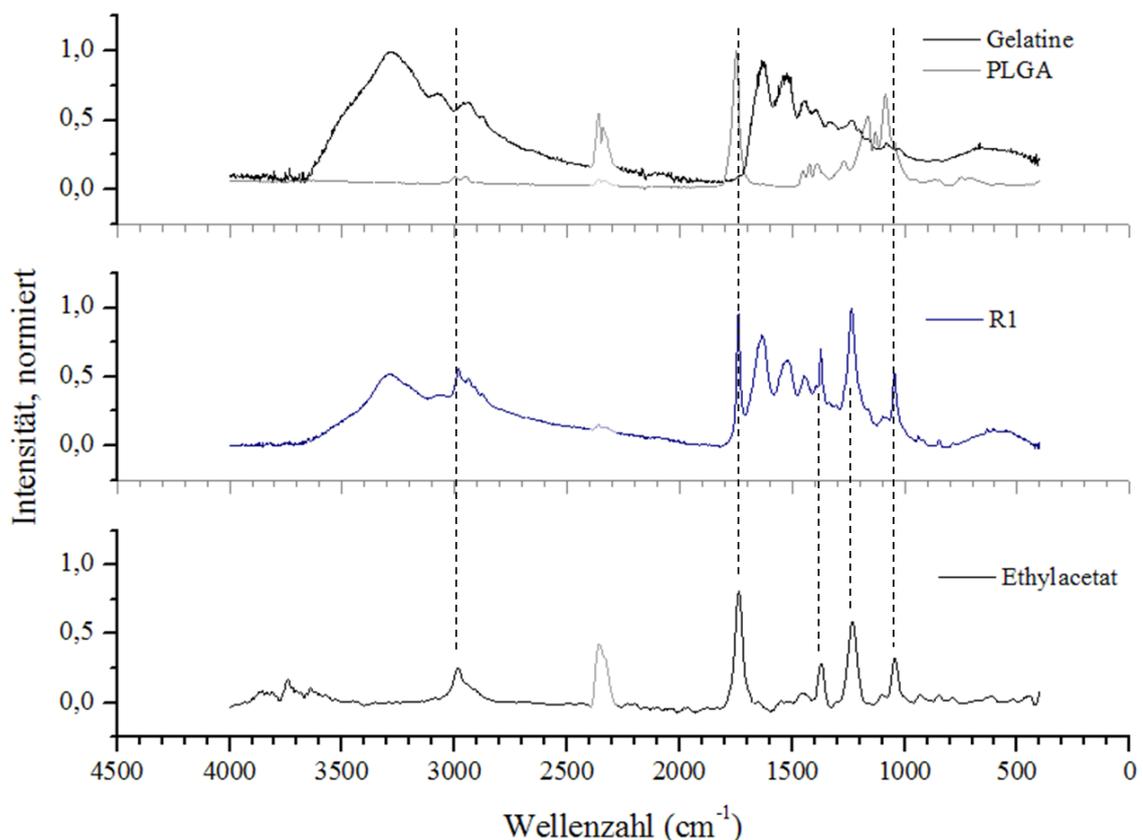


**Abbildung 11: REM-Aufnahmen der Scaffold-Morphologie der Rezepturen 1 und 2.** Oben: Porenstruktur in der Aufsicht (A) und Porenkanäle im Längsschnitt (B) der Rezeptur 1 mit Ethylacetat. Unten: Porenstruktur in der Aufsicht (C) und Porenkanäle im Längsschnitt der Rezeptur 2 mit Ethylacetat und Essigsäure. Pfeile zeigen exemplarisch horizontal verlaufende Lamellen, die Poren teilweise oder ganz verschließen (Vergrößerung: 50x, Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ ).

Abbildung 11 zeigt REM-Aufnahmen der Scaffolds, die aus den Rezepturen 1 und 2 hergestellt worden sind. Mit Hilfe von Bildanalysen konnten Feret-Durchmesser und Zirkularität der Poren in den gezeigten Aufnahmen bestimmt werden. Die Poren von Rezeptur 1 waren mit bis zu 568  $\mu\text{m}$  teilweise sehr groß und wiesen mit einem mittleren Durchmesser von 271  $\mu\text{m}$  und einer Standardabweichung von 121  $\mu\text{m}$  eine sehr große Streuung auf. In Konstrukten der Rezeptur 2 waren die Poren dagegen trotz Zugabe von Essigsäure deutlich kleiner und erreichten nur einen Durchmesser von  $125 \pm 58 \mu\text{m}$ .

Bei beiden Konstrukten konnte nur eine geringe Zirkularität der Poren von 0,63 (Rezeptur 1) bzw. 0,65 (Rezeptur 2) ermittelt werden. Zudem war die Porenanordnung sehr ungleichmäßig, was insbesondere anhand der Längsschnitte, die den ungeordneten Verlauf der Porenkanäle im Inneren der Scaffolds zeigen (Abbildung 11, B und D), deutlich wurde. Während in Konstrukten der Rezeptur 1 keine Struktur erkennbar war, konnte in Rezeptur 2 eine vertikale Ausrichtung der Kanäle beobachtet werden. Außerdem wurden sowohl in den Quer- als auch in den Längsschnitten beider Rezepturen horizontal verlaufende, lamellenartige Strukturen beobachtet, die die Poren teilweise oder ganz verschlossen, wodurch diese unzugänglicher für z.B. Zellen wurden.

Um eventuell verbliebene Lösemittelrückstände in den Scaffolds der Rezeptur 1 und 2 zu detektieren, die durch den Gefriertrocknungsprozess nicht entfernt werden konnten, wurden nach dem Sterilisationsprozess infrarotspektroskopische Messungen durchgeführt.

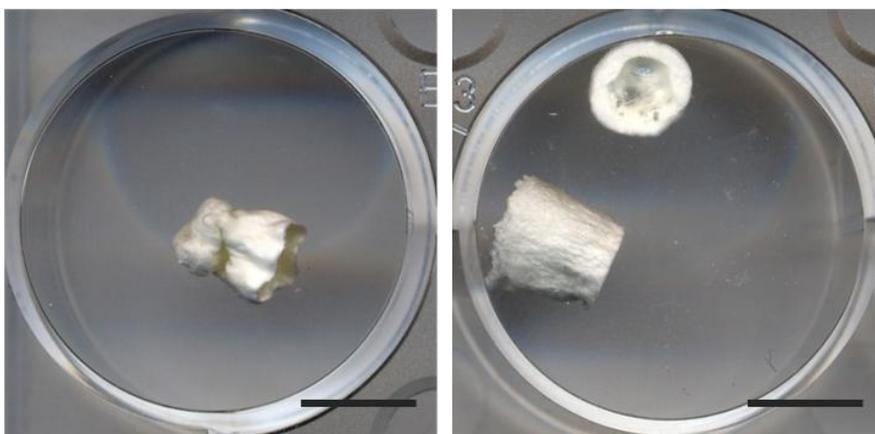


**Abbildung 12: FTIR-Spektren von Gelatine und PLGA (oben), Proben der Rezeptur 1 (R1, Mitte) und Ethylacetat (unten).** Die Spektren wurden auf den jeweils höchsten Peak normiert. Der CO<sub>2</sub>-Peak zwischen 2400 und 2300 cm<sup>-1</sup> ist ein Artefakt der Messung und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

In Abbildung 12 sind die FTIR-Spektren von fertigen Konstrukten der Rezeptur 1 sowie von Gelatine, PLGA und Ethylacetat als Bestandteile der Proben dargestellt. Die Spektren setzen sich dabei aus verschiedenen Peaks zusammen, die die unterschiedlichen Atombindungen in den Molekülen repräsentieren und somit in Kombination für jede Verbindung charakteristisch sind. Aufgrund der Übereinstimmung der fünf am stärksten ausgeprägten Peaks im Ethylacetat-Spektrum ( $2983$ ,  $1743$ ,  $1374$ ,  $1243$  und  $1048\text{ cm}^{-1}$ ) mit dem Proben-Spektrum konnten Reste des Lösemittels in den Scaffolds detektiert werden. Da Ethylacetat und PLGA teilweise identische chemische Bindungen aufweisen (RCOOR), könnte die Bande im Probenspektrum bei  $1743\text{ cm}^{-1}$  auch durch das PLGA verursacht worden sein. Weil es allerdings nur zu etwa 2 % in der Trockenmasse der Konstrukte vorhanden war, würde man eine deutlich niedrigere Intensität erwarten.

Für Rezeptur 2 konnte anhand der ATR-Messungen kein eindeutiger Nachweis für Ethylacetat oder Essigsäure im fertigen Konstrukt erfolgen. Vermutlich waren jedoch auch in diesen Proben Lösemittelreste enthalten, da sie bis auf die zusätzliche Essigsäure in ihrer Zusammensetzung mit Rezeptur 1 übereinstimmten.

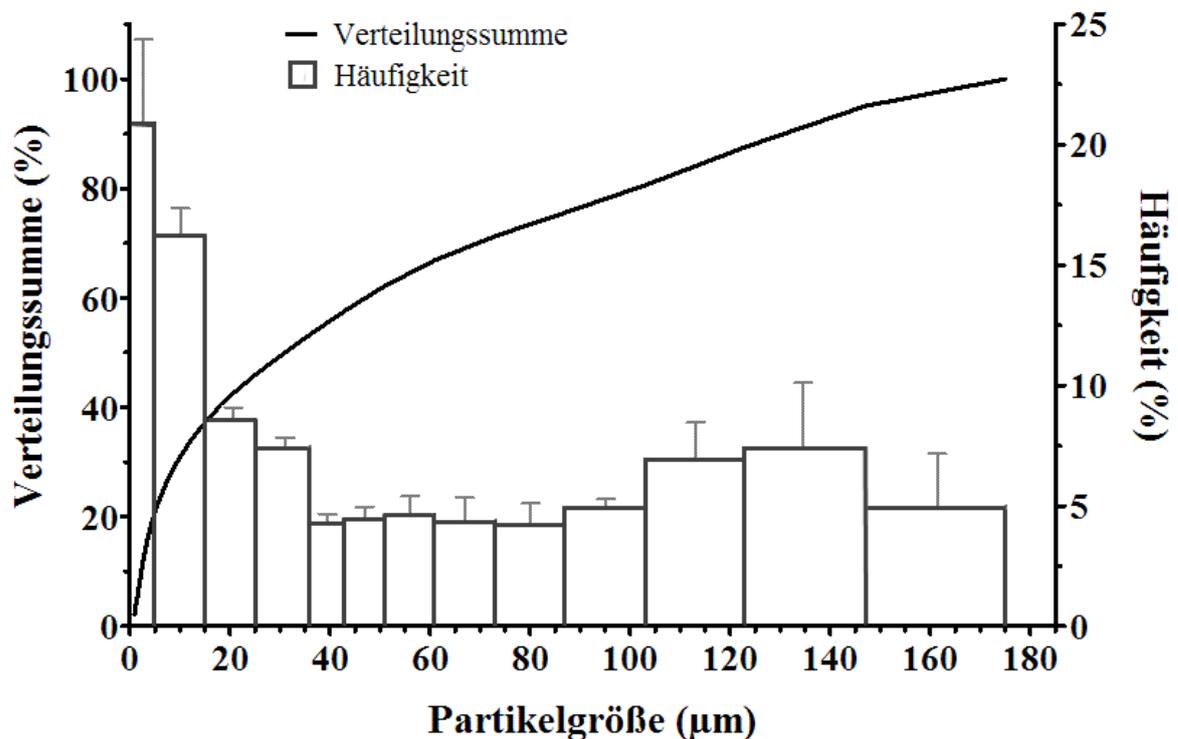
Parallel zu den Untersuchungen der Lösemittelreste erfolgten erste *in vitro* Zytotoxizitätstests mit Extrakten der Scaffolds, um Erkenntnisse über die Biokompatibilität der Materialien zu erlangen. Als Resultat wurde bei beiden Rezepturen eine Verminderung der Stoffwechselaktivität um durchschnittlich 40 % beobachtet, die vermutlich durch die Lösemittelreste bedingt war (Daten nicht gezeigt). Außerdem traten trotz der langen Trocknungszeiten von mindestens 6 Tagen Verformungen und Hohlrumbildungen in den Scaffolds auf, die ebenfalls auf Lösemittelreste zurückzuführen waren und zu einer hohen Ausschussrate führten (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Scaffolds mit Lösemittelzusatz nach dem Gefriertrocknen.** Links: Schrumpfung durch zu kurze Trocknungszeit (6 d). Rechts: Hohlrumbildung durch zu hohe Temperatur bei der Haupttrocknung ( $-50\text{ °C}$ ; Maßstab: 0,5 cm).

Aufgrund der negativen Auswirkungen sowohl der Essigsäure als auch des Ethylacetats auf die Biokompatibilität und die Herstellung der Scaffolds wurden Rezeptur 1 und 2 verworfen.

Für die Verbesserung der Biokompatibilität der Scaffolds sollte im Anschluss eine Methode entwickelt werden, um das PLGA lösemittelfrei und homogen in der Gelatinelösung zu verteilen. Durch eine Erhöhung des PLGA-Anteils um das Zehnfache war es möglich, das Pulver in die Gelatinelösung zu mörsern. Dabei war eine zu starke Erwärmung durch Reibung oder die verflüssigte Gelatinelösung zu verhindern, um die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) des verwendeten PLGA zwischen 44 und 48 °C nicht zu überschreiten. Ab dieser Temperatur fand der Übergang vom spröden in den elastischen Zustand statt, wodurch die Partikel akkumulierten und durch das Mörsern nicht mehr zerkleinert werden konnten. Um das zu vermeiden, wurde der Prozess kontrolliert von Hand und nicht durch elektrische Mühlen ausgeführt. Auf diese Weise konnte eine opake Suspension hergestellt werden, welche im Folgenden als Rezeptur 3 bezeichnet wird.



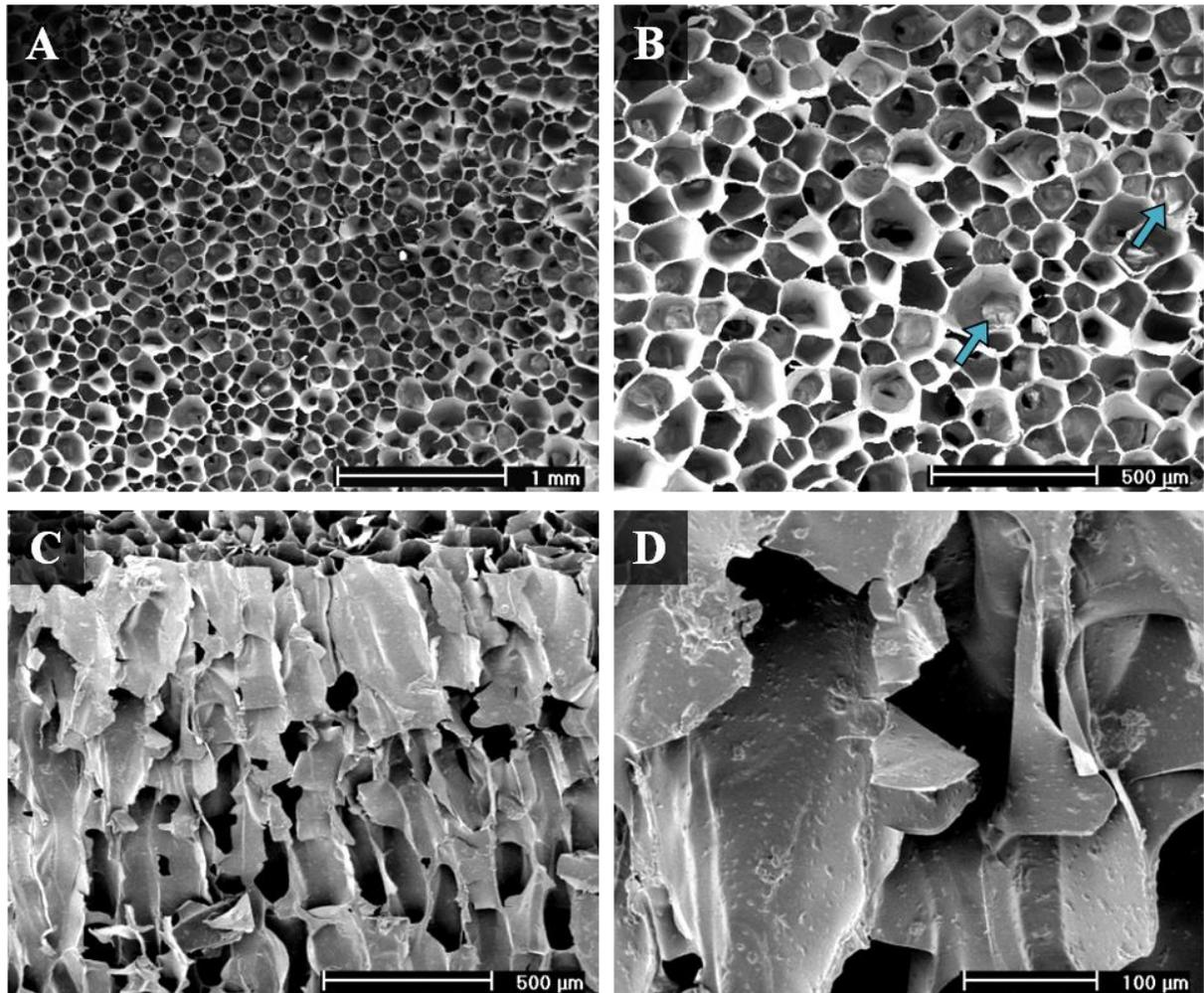
**Abbildung 14: Verteilungssumme und Häufigkeit der PLGA-Partikel in Rezeptur 3.** Die Verteilungssumme zeigt die aufsummierten, relativen Häufigkeiten der Partikelgrößen über den gesamten Messbereich, die Häufigkeitsverteilung (Histogramm) gibt den prozentualen Anteil der Partikel im jeweiligen Partikelgrößen-Intervall an (n=4).

Die resultierende Partikelgrößen-Verteilung der Gelatine-PLGA-Suspension der Rezeptur 3 ist anhand der Verteilungssumme und der Partikelgrößen-Häufigkeit in Abbildung 14 dargestellt. Für die Berechnung der Verteilungssumme wurde die relative Häufigkeit jeder Partikelgröße über den gesamten gemessenen Bereich (0,9 – 175  $\mu\text{m}$ ) summiert. Der Kurvenverlauf zeigt dabei zwischen 0,9 und etwa 20  $\mu\text{m}$  Partikelgröße einen starken Anstieg mit einem relativ gleichmäßigen, nahezu linearen Verlauf über den restlichen Messbereich. Folglich waren vor allem kleine Partikel in der Lösung vorhanden, wie auch die Häufigkeitsverteilung zeigt. Diese gibt im jeweiligen Partikelgrößenintervall die relative Menge an Partikeln bezogen auf die Gesamtmenge an. Dabei wurden die gemessenen Intervalle im unteren Partikelgrößenbereich bis 36  $\mu\text{m}$  in neue Intervalle von 5-10  $\mu\text{m}$  zusammengefasst, um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu erhöhen. Demnach hatten Teilchen bis zu einer Größe von 5  $\mu\text{m}$  mit etwa 21 % den größten Anteil in der Lösung. Mit steigendem Durchmesser fiel die Häufigkeit der Partikel stark ab, bis sie sich ab einer Größe von 40  $\mu\text{m}$  je nach Intervallbreite bei einem Anteil von 4,3 bis 7,5 % einpendelte.

Demnach gelang eine relativ feine und homogene Verteilung des PLGA-Pulvers durch die Verarbeitung im Mörser und somit eine lösemittelfreie Integration des Polymers in die Gelatinelösung. Mit dieser Lösung der Rezeptur 3 wurden anschließend über einen adaptierten Herstellungsprozess neue Scaffolds produziert. Vor allem der Einfrierprozess musste dabei angepasst werden, da in dieser Rezeptur keine Additive vorhanden waren, die die Porengröße beeinflussten. Dementsprechend erfolgte ein sehr langsames Einfrieren der Proben mit nur 0,1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , um möglichst große Eiskristalle und somit Poren zu schaffen. Zusätzlich wurde die Temperatur des Peltier-Elements nach der Eiskristallbildung wieder erhöht, so dass sich die Proben etwas erwärmten. Die Lösung blieb währenddessen gefroren, der Rest der Probe konnte jedoch noch langsamer und sehr gleichmäßig einfrieren. Da keine Lösemittel in der Rezeptur vorlagen, konnte das Trocknen der Konstrukte bei Raumtemperatur erfolgen, wodurch die Trocknungszeit um die Hälfte verkürzt wurde.

Abbildung 15 zeigt REM-Aufnahmen von Scaffolds, die aus Rezeptur 3 mit dem verbesserten Einfrierverfahren hergestellt wurden. Die Porenanordnung und -morphologie war bei diesen Proben deutlich gleichmäßiger und geordneter als bei den anderen beiden Rezepturen. Durch die geringe Erwärmung der Proben nach dem Einfrieren und die sehr niedrige Einfrierrate konnte ein mittlerer Feret-Porendurchmesser von  $126 \pm 42 \mu\text{m}$  (ermittelt durch Bildanalyse von Abbildung 15 B) erzeugt werden. Die Zirkularität der Poren war bei diesen Konstrukten mit einem Wert von 0,77 deutlich größer als bei den Rezepturen 1 und 2 (0,63 bzw. 0,65).

Der Längsschnitt zeigt zudem eine parallele Anordnung der Porenkanäle, die größtenteils durchgängig waren, so dass man in der Aufsicht durch die Poren bis auf den Probenteller blicken konnte (Abbildung 15, C und B). Dabei wurden die einzelnen Poren nur durch dünne Gelatine-Häutchen von etwa 4  $\mu\text{m}$  Dicke voneinander getrennt. In der Detailaufnahme der Porenwandung sind deutlich PLGA-Partikel zu sehen, die durch die getrocknete Gelatine nach außen hervorstanden (Abbildung 15, D).



**Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Scaffold-Struktur der optimierten Rezeptur 3.** A: Übersichtsbild (25x) und B: Detailaufnahme der Poren (50x) in der Aufsicht, Pfeile markieren exemplarisch den Probenteller, der durch die durchgängigen Porenkanäle sichtbar war. C: Porenkanäle im Querschnitt (50x), D: Detailaufnahme der Porenwandung (200x).

Aufgrund der sehr einheitlichen und durchgängigen Porenstruktur, des Verzichts auf zytotoxische Lösemittel, des kürzeren Herstellungsprozesses und der geringeren Ausschussrate wurden alle folgenden Charakterisierungen und Versuche mit Konstrukten der Rezeptur 3 durchgeführt. Zudem wurde auf das verbesserte Herstellungsverfahren mit der gekoppelten Hitzevernetzung und -sterilisation ein neues Patent angemeldet (Zehbe *et al.* 2010).

## 3.2 Charakterisierung der Scaffolds aus Rezeptur 3

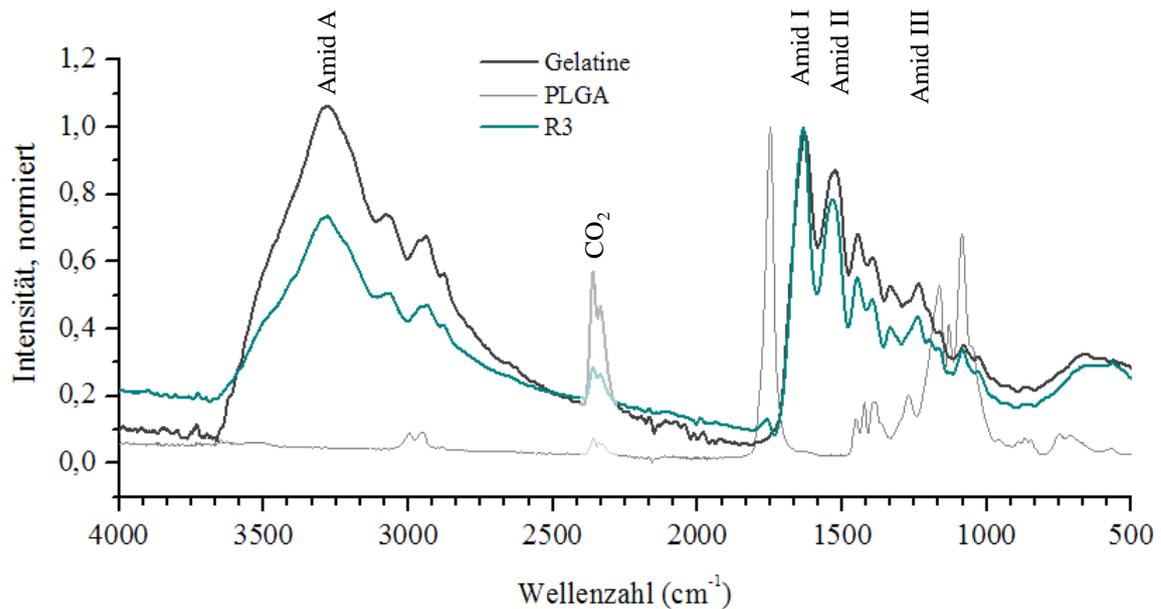
Im Anschluss an die Herstellung der optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds erfolgte im nächsten Schritt eine physikochemische Charakterisierung der Konstrukte. Mit Hilfe von Infrarotspektroskopischen Messungen (FTIR) sollten dabei Veränderungen der Materialkomponenten detektiert werden, die möglicherweise beim Vernetzungsprozess entstanden waren, wie z.B. der Vernetzungs- und Denaturierungsgrad der Gelatine. Die ebenfalls durchgeführte Analyse der Porosität und der Porengröße innerhalb des Materials war insbesondere für Eignung der Scaffolds als Zellträger von Interesse, während die *in vitro* Degradation erste Aufschlüsse über die chemische Stabilität der Konstrukte unter verschiedenen Bedingungen erbringen sollte.

### 3.2.1 FTIR-Spektroskopie

An den optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds wurden FTIR-Messungen durchgeführt, um Molekülveränderungen, wie Denaturierung und Vernetzung, die aufgrund des Sterilisationsprozesses entstehen, zu untersuchen.

Proteine zeigen im FTIR-Spektrum charakteristische Banden, die durch die Sekundärstruktur der Peptidketten beeinflusst werden. Dazu gehören die Amid A-Bande im Bereich  $3300\text{ cm}^{-1}$  sowie die Amid I- ( $1636\text{-}1661\text{ cm}^{-1}$ ), Amid II- ( $1549\text{-}1558\text{ cm}^{-1}$ ) und Amid III-Bande ( $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), welche Vibrationen und Deformationen der C=O- und N-H-Bindungen in den Peptiden repräsentieren. Veränderungen in der Sekundärstruktur von Proteinen sind daher anhand von FTIR-Spektren feststellbar.

In Abbildung 16 sind die Spektren von Gelatine, PLGA und Scaffolds der Rezeptur 3 dargestellt. Das Spektrum der Proben aus Rezeptur 3 zeigt im Vergleich zu Gelatine keine Verschiebungen der Peaks, allerdings können zusätzliche Banden (bei  $1750\text{ cm}^{-1}$ ) bzw. Bandenüberlagerungen (bei  $1080\text{ cm}^{-1}$ ) aufgrund des PLGA-Anteils beobachtet werden. Zudem konnte eine Verringerung in der Intensität der Amid A-, II- und III-Banden festgestellt werden, die auf Wasserverlust und eine strukturelle Veränderung der Gelatine nach der Sterilisation schließen lässt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diesbezüglich durch Wärmebehandlung von nativem Kollagen eine Intensitätsverringerng aller Amid-Banden feststellen, die auf eine Zerstörung der Triple-Helix-Struktur des Kollagens hindeutet (Myonga 2004, Friess und Lee 1996).



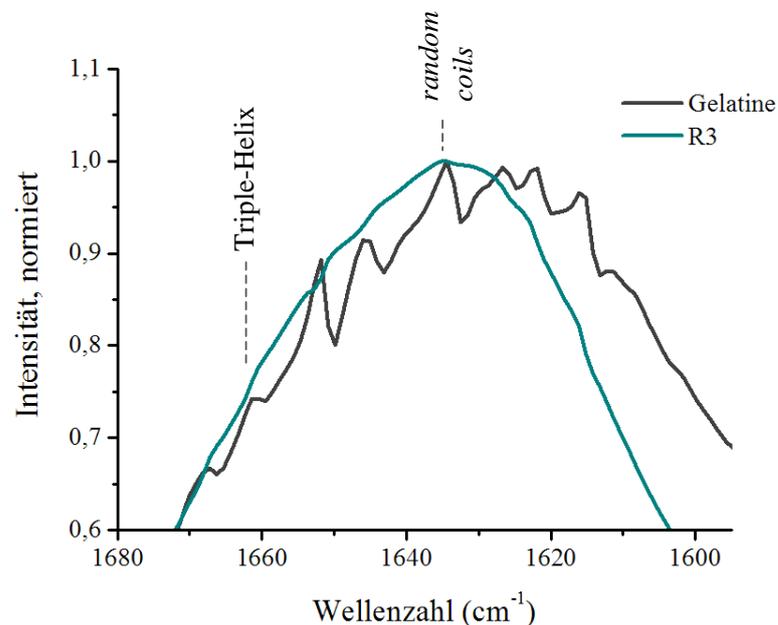
**Abbildung 16: FTIR-Spektren von Gelatine, PLGA und Proben der Rezeptur 3 (R3).** Gelatine- und R3-Spektrum wurden auf den höchsten Peak der Amid I-Bande normiert, das PLGA-Spektrum auf den höchsten Peak des gesamten Spektrums. Die CO<sub>2</sub>-Bande zwischen 2400 und 2300 cm<sup>-1</sup> ist ein Artefakt der Messung und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Veränderungen aufgrund von Denaturierung können außerdem an der Amid I-Bande beobachtet werden, die die C=O-Bindung der zentralen Peptidkette in den Proteinen repräsentiert. Eine Einengung der Amid I-Bande sowie ein Ansteigen der Komponenten um 1630 cm<sup>-1</sup> bei gleichzeitiger Abnahme der Komponenten um 1660 cm<sup>-1</sup> deuten dabei auf die Auflösung der kollagenen Triple-Helix-Struktur zu sogenannten *random coils* hin (Achilli *et al.* 2010, Myonga 2004, Payne und Veis 1988).

Da Gelatine aus denaturiertem Kollagen besteht, zeigte die gemessene Amid I-Bande von Gelatine und Konstrukten der Rezeptur 3 erwartungsgemäß den höchsten Peak bei 1634 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 17). Bei der unbehandelten Gelatine konnte zudem ein schwacher Peak bei 1660 cm<sup>-1</sup> beobachtet werden, was auf einen geringen Anteil verbliebener Triple-Helix-Strukturen hindeutet. Aufgrund des fehlenden Peaks bei 1660 cm<sup>-1</sup> im Scaffold-Spektrum und der Verschmälerung der Amid I-Bande wurde die verbliebene Sekundärstruktur der Gelatine durch die Sterilisation anscheinend noch stärker aufgebrochen.

Dieses Ergebnis wurde weiterhin durch die Berechnung des Verhältnisses von 1235 cm<sup>-1</sup> zu 1450 cm<sup>-1</sup> gestützt. Die Intensität der Bande bei 1235 cm<sup>-1</sup> gab dabei den Anteil an Triple-Helices und somit die strukturelle Ordnung in dem Protein an. Die Bande bei 1450 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub>-Vibration) wurde dagegen weder durch Denaturierung noch durch Vernetzung der Peptide beeinflusst (Haugh *et al.* 2009). Das Verhältnis 1235/1450 als Maß der Denaturierung der

Probe war daher in der unbehandelten Gelatine mit 0,93 deutlich höher als in den vernetzten Scaffolds (0,80), was auf eine ungeordnetere Struktur in den Scaffolds schließen lässt.



**Abbildung 17: Amid I-Bande von Gelatine und Proben der Rezeptur 3 (R3) mittels FTIR-Spektroskopie.** Spektren wurden auf den höchsten Peak der Amid I-Bande normiert. Banden bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  und  $1630\text{ cm}^{-1}$  geben den Anteil an Triple-Helices bzw. *random coils* in der Sekundärstruktur der Proben an.

Der Grad der Vernetzung der Gelatine konnte durch Berechnung des Wellenzahlenverhältnisses  $1553/1450$  ermittelt werden, da die Bande bei  $1553\text{ cm}^{-1}$  eine Proportionalität zum Gehalt an  $\text{NH}_2$  aufweist.  $\text{NH}_2$  reagiert durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen während der Vernetzung der Peptidketten zu  $\text{NH}$ , so dass eine stetige Abnahme des  $\text{NH}_2$ -Gehalts bei steigender Vernetzung erfolgt (Haugh *et al.* 2009). Dementsprechend gibt ein hoher Wert für das  $1553/1450$ -Verhältnis eine geringe Vernetzung der Probe an. Erwartungsgemäß war dieser Wert in den Scaffolds kleiner (1,26) als in der Gelatine (1,33), wonach die Peptidketten der Konstrukte stärker vernetzt waren als die der unbehandelten Gelatine.

Somit konnte mit Hilfe der FTIR-Messungen eine deutliche Vernetzung des Scaffold-Materials und eine damit einhergehende stärkere Denaturierung der Gelatine aufgrund der Applikation von trockener Hitze festgestellt werden. Verunreinigungen oder unerwartete Reaktionsprodukte konnten nicht detektiert werden.

### 3.2.2 Porosität und Porengröße

Im Anschluss an die chemische Charakterisierung der Gelatine-PLGA-Scaffolds wurden die strukturellen Eigenschaften der Konstrukte detaillierter analysiert. Insbesondere Porosität und Porengröße des Materials waren dabei von Interesse, da beide Parameter die mechanischen Eigenschaften, das Tränkverhalten, die Durchlässigkeit für Flüssigkeiten und die Eignung des Materials als Zellträger beeinflussen.

Die Bestimmung der Porosität der optimierten Konstrukte erfolgte mit Hilfe des Archimedi-schen Verfahrens. Dazu wurde die Trockenmasse der Scaffolds, deren Auftrieb in DMSO und die Masse der Scaffolds getränkt in DMSO bestimmt, um anhand dieser Werte die offene und geschlossene Porosität der Proben zu berechnen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Berechnete Rohdichte und Porosität der Scaffolds.** Reindichte<sub>Scaffold</sub> = 1,28 g/cm<sup>3</sup>.

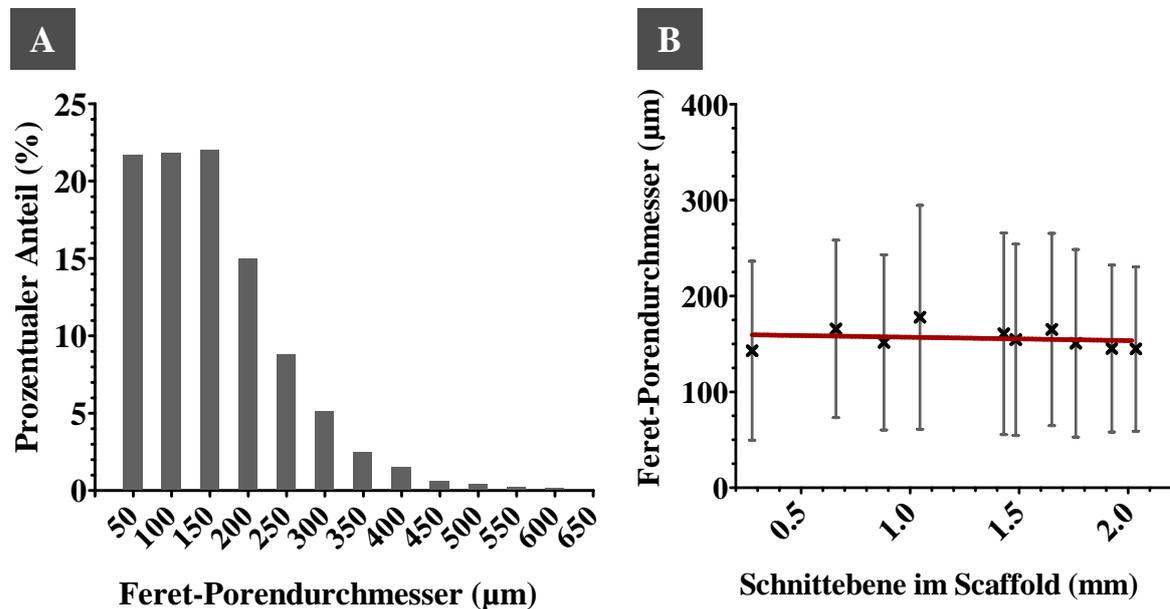
| Rohdichte Scaffold<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | Offene<br>Porosität (%) | Geschlossene<br>Porosität (%) | Porosität,<br>gesamt (%) |
|--|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>1,27 ± 0,01</b>                         | <b>93,8 ± 0,3</b>       | <b>0,7 ± 0,7</b>              | <b>94,5 ± 0,9</b>        |

Die Gesamt-Porosität war mit 94,5 % sehr hoch, dementsprechend lag der reine Materialanteil bei 5,5 % des Scaffold-Volumens. Demnach war im Inneren des Scaffolds ein ausreichendes Volumen für die Proliferation von Zellen und die Bildung der extrazellulären Matrix vorhanden. Zudem bestand der größte Teil aus offenen Poren und war somit von außen erreichbar, was für eine gleichmäßige Zellverteilung sowie die ungehinderte Diffusion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten von Bedeutung ist. Nur 0,7 % des gesamten Scaffold-Volumens waren geschlossen und demnach unzugänglich.

Für eine detailliertere Analyse der Porengröße und eines möglichen Porengradienten im Inneren des Materials wurden Serien-Gefrierschnitte orthogonal zur Porenausrichtung (Querschnitte) angefertigt. Die Poren in jeder Schnittebene wurden anschließend lichtmikroskopisch untersucht, um anhand der resultierenden Aufnahmen Bildanalysen bezüglich des Porendurchmessers durchzuführen.

Die Auswertung der Daten ergab einen mittleren Porendurchmesser von  $160 \pm 100 \mu\text{m}$ . Die Häufigkeitsverteilung der Werte zeigt, dass jeweils rund 22 % der Poren 25-75  $\mu\text{m}$ , 75-125  $\mu\text{m}$  und 125-175  $\mu\text{m}$  groß waren und somit etwa 66 % der Poren einen Durchmesser bis

175  $\mu\text{m}$  aufwiesen (Abbildung 18 A). Die übrigen Poren hatten ausschließlich einen größeren Durchmesser bis maximal 625  $\mu\text{m}$ .



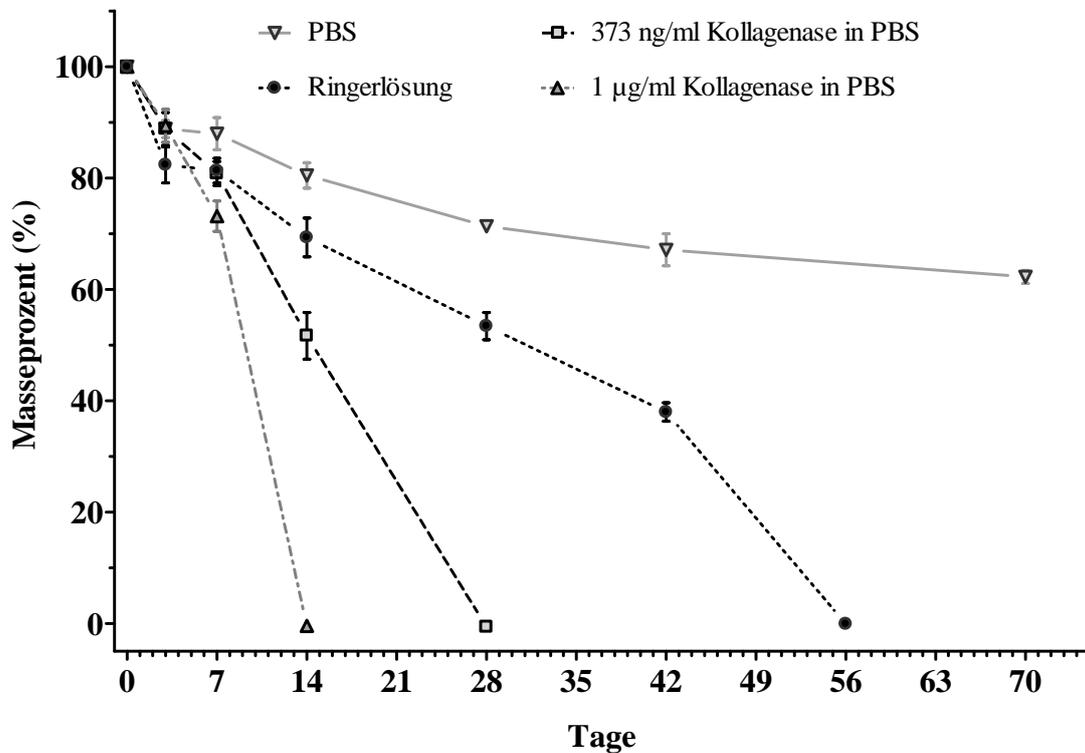
**Abbildung 18: Ergebnis der Porenanalyse eines Gelatine-PLGA-Scaffolds.** A) Histogramm des Feret-Porendurchmessers, Beschriftung der X-Achse gibt den mittleren Wert des Größenintervalls an ( $n = 5282$ ). B) Verteilung des Feret-Porendurchmessers innerhalb eines Scaffolds. Dargestellt sind die mittleren Porendurchmesser der jeweiligen Schnittebene (Kreuz,  $n > 490$ ), deren Standardabweichung sowie die lineare Regression durch die Mittelwerte aller Schnittebenen ( $y = 0,0035x + 160,4$ ).

Um einen möglichen Porengradienten im Konstrukt festzustellen, wurden die Porendurchmesser des jeweiligen Schnitts gegen die Schnittebene im Scaffold aufgetragen (Abbildung 18 B). Da die lineare Regression durch die mittleren Durchmesser jeder Ebene nur einen minimalen Anstieg zeigte (0,0035), konnte ein Porengradient innerhalb des Scaffolds ausgeschlossen werden. Demnach können Knorpelzellen, die eine durchschnittliche Größe von bis zu 20  $\mu\text{m}$  aufweisen, von beiden Seiten des Scaffolds ungehindert in die Poren eindringen und aufgrund der Durchgängigkeit der Poren und der offenen Porosität bis in das Innere des Scaffolds wandern.

### 3.2.3 *In vitro* Degradation der Gelatine-PLGA-Scaffolds

Die Untersuchungen zur *in vitro* Degradation wurden durchgeführt, um die chemische und enzymatische Stabilität der Scaffolds zu analysieren und eventuelle Rückschlüsse auf die Resorption *in vivo* ziehen zu können. Das Abbauverhalten wurde daher in folgenden unterschiedlichen Umgebungen untersucht: In ungepufferter Ringerlösung, in Phosphatpuffer

(PBS) und in PBS mit Zugabe von 1 µg/ml sowie 373 ng/ml Kollagenase. Die Abbaulösung mit 373 ng/ml Kollagenase in PBS sollte dabei die Enzymkonzentration in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis simulieren (Holland *et al.* 2005).



**Abbildung 19: Prozentuales Gewicht der Gelatine-PLGA-Scaffolds während der Degradation in verschiedenen Abbaulösungen.** Der Abbau erfolgte in PBS, PBS mit Zusatz von 1 µg/ml sowie 373 ng/ml Kollagenase sowie Ringerlösung. Nach Trocknung der Proben wurde die jeweilige prozentuale Abweichung zum Ausgangsgewicht ermittelt. PH-Wert und Enzymkonzentration wurden durch wöchentliches Wechseln der Lösung konstant gehalten (n = 4).

Abbildung 19 zeigt die durchschnittliche prozentuale Masse der Proben in der jeweiligen Abbaulösung über den gesamten Versuchszeitraum. Erwartungsgemäß wurden die Konstrukte in den Kollagenaselösungen aufgrund des enzymatischen Angriffs auf die Peptidketten der Gelatine am schnellsten abgebaut, so dass die Proben nach 14 Tagen (1 µg/ml) bzw. 28 Tagen (373 ng/ml) komplett degradiert waren. Dagegen erfolgte der Abbau in reinem PBS unerwartet langsam. Da nach 70 Tagen in der Abbaulösung noch über 60 % der Ausgangsmasse der Konstrukte vorhanden waren, wurde die Abbaukurve mittels einer logarithmischen Funktion extrapoliert ( $y = 108,4 - (25,3 \cdot \log(x))$ ; Abbildung siehe Anhang), wodurch eine Halbwertszeit von 200 Tagen für die Scaffolds in PBS abgeschätzt werden konnte. Der pH-Wert der drei

Abbaulösungen sank während des Versuchszeitraums initial von 7,3 auf 6,6 und pendelte über den restlichen Verlauf zwischen 6,5 und 6,8.

Der hydrolytische Abbau in Ringerlösung dauerte 56 Tage, wobei die Degradationsgeschwindigkeit mit dem Versuchsverlauf zunahm. Demnach erfolgten 60 % des Masseverlusts innerhalb von 42 Tagen, die übrigen 40 % des Materials waren bereits nach 14 weiteren Tagen abgebaut. Der pH-Wert der Ringerlösung sank dabei von anfangs 6,5 nach 7 Tagen auf 4,7 und innerhalb der folgenden 49 Tage auf 3,9.

Die Degradationsspanne war demnach hauptsächlich von den Umgebungsbedingungen pH-Wert und Enzymkonzentration abhängig. Rückschlüsse auf die Resorptionszeit *in vivo* sind allerdings schwierig, da die Abbaubedingungen in den verschiedenen Geweben sehr viel komplexer sind und variieren können.

### **3.3 Testung der Biokompatibilität**

Nach Abschluss der physikochemischen Charakterisierung der Gelatine-PLGA-Scaffolds erfolgte gemäß der DIN-Norm 10993 für die biologische Beurteilung von Medizinprodukten die Analyse der Biokompatibilität des Kompositmaterials anhand von *in vitro* Zytotoxizitätstests und einer Implantationsstudie im Rattenmodell (DIN-Norm DIN EN ISO 10993-6, August 2007).

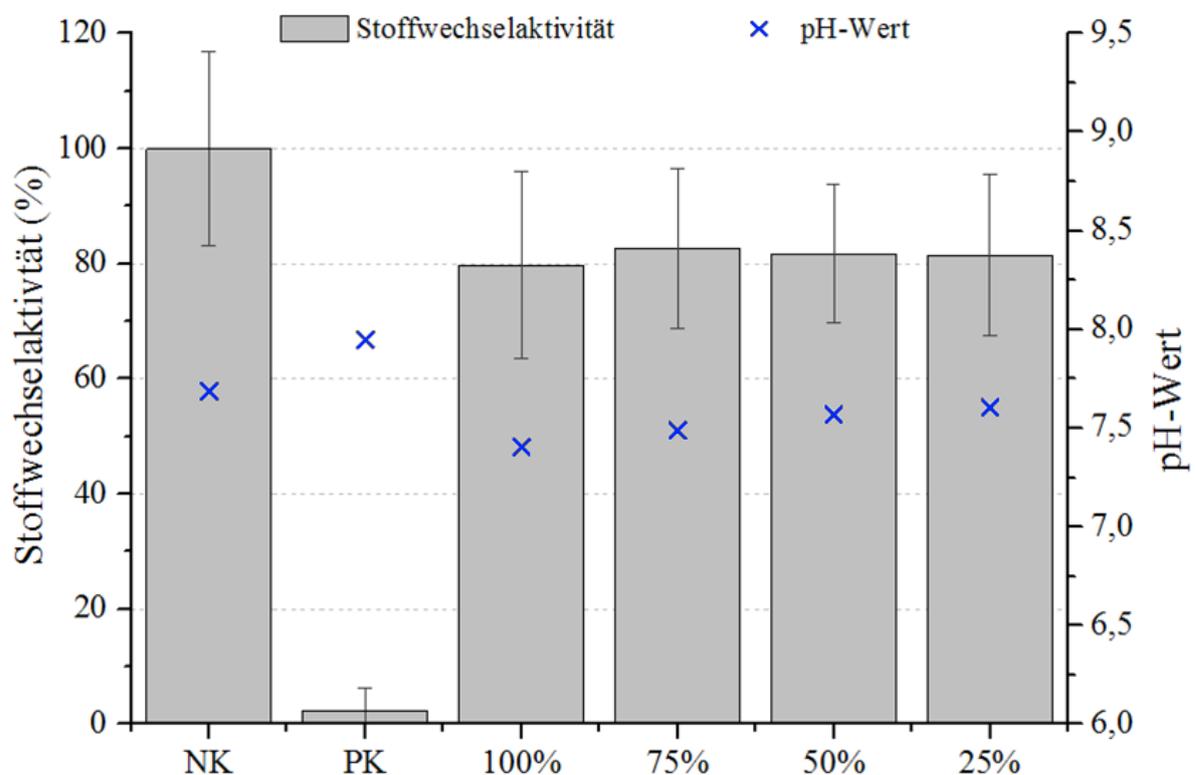
#### **3.3.1 *In vitro* Zytotoxizität**

Bevor Biomaterialien in Tieren oder im Menschen getestet werden können, muss deren Zytotoxizität anhand von *in vitro* Tests abgeklärt werden. Die Testung der Scaffolds erfolgte mittels eines Extraktionstests in Anlehnung an Teil 5 der DIN-Norm 10993 (Prüfungen auf *in vitro* Zytotoxizität). Für die Herstellung der benötigten Extrakte wurden die fertigen Prüfkörper in einem geeigneten Extraktionsmedium über 24 h bei 37 °C geschüttelt, um mögliche zytotoxische Inhaltsstoffe aus den Konstrukten in das Medium zu überführen. Als Extraktionsmedium diente Zellkulturmedium mit Zusatz von Serum, um sowohl polare als auch unpolare Substanzen aus dem Material lösen zu können und den Wachstumsanforderung der verwendeten Zellen zu entsprechen.

Die resultierenden Extrakte wurden in verschiedenen Verdünnungen auf L929-Fibroblastenzellen aufgebracht und für 24 h inkubiert, um anschließend den Einfluss möglicher zytotoxischer Substanzen aus dem Prüfmaterial auf die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels MTT-Assay zu bestimmen. Das Prinzip des Assays beruht auf der Reduktion des gel-

ben MTT-Salzes durch Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse vitaler Zellen zu blauem, wasserunlöslichen Formazan (Berridge *et al.* 2005). Dementsprechend stand die Menge des gebildeten Formazans in direkter Korrelation mit dem Zellstoffwechsel.

Für die Negativkontrolle erfolgte die Inkubation der Fibroblasten mit normalem Zellkulturmedium mit Zusatz von Serum, wie es auch für die Extraktion der Scaffolds verwendet wurde (Leertest). Auf diese Weise konnten die Zellen, die mit den Extrakten inkubiert wurden, ausschließlich durch Substanzen aus dem Prüfmaterial beeinflusst werden. Die Überprüfung des Testprinzips erfolgte mit Hilfe einer Positivkontrolle, bei der die Zellen mit einem zytotoxischen Reagenz (20 % DMSO in Zellkulturmedium) inkubiert wurden, um eine absichtliche Verringerung der Stoffwechselaktivität zu erzeugen.

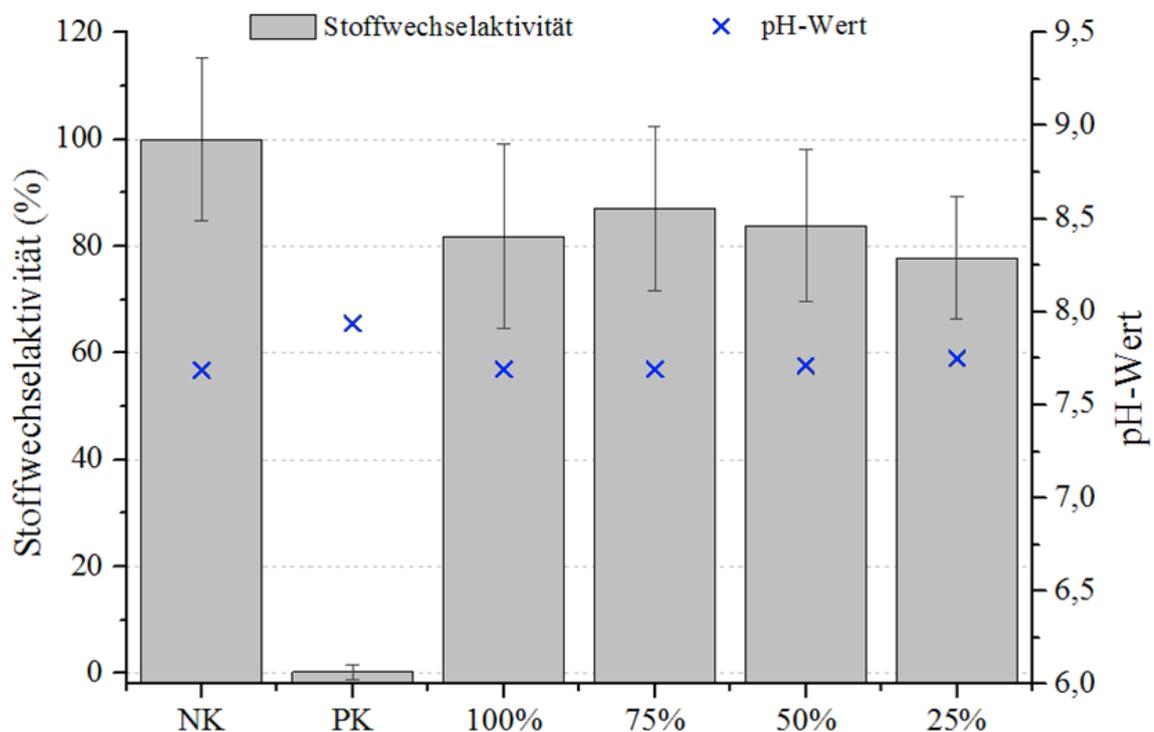


**Abbildung 20: Stoffwechselaktivität von L929-Fibroblasten nach dem Zytotoxizitätstest von Gelatine-PLGA-Scaffolds mittels MTT-Assay.** Die Inkubation der Zellen erfolgte mit reinem Scaffold-Extrakt (100 %) sowie verschiedenen Verdünnungen des Extrakts in Zellkulturmedium (75 %, 50 %, 25 %). Als Positivkontrolle (PK) diente Zellkulturmedium mit 20 % DMSO, Negativkontrolle (NK) war Zellkulturmedium. Messwerte wurden auf NK normiert (n = 30 bzw. 54 für NK). Signifikante Unterschiede im Vergleich zu NK sind mit \*\*\* (Student's t-Test,  $p < 0,0001$ ) gekennzeichnet. Die pH-Werte der jeweiligen Extrakte und Kontrollen sind durch Kreuze markiert.

In Abbildung 20 ist die prozentuale Stoffwechselaktivität der Fibroblasten nach Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen des Scaffold-Extrakts sowie den Kontrollen dargestellt. Der

unverdünnte Extrakt führte im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) zu einer signifikanten Verringerung der Stoffwechselaktivität auf 80 %. Der pH-Wert des Zellkulturmediums wurde dabei durch die Extraktion mit dem Prüfmaterial von durchschnittlich 7,7 auf 7,4 erniedrigt. Die übrigen Extraktverdünnungen verursachten eine vergleichbare Abnahme in der Aktivität um 17 bis 19 %, bei pH-Werten von 7,5 bis 7,6.

Da alle Verdünnungen denselben Effekt auf die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten zeigten, scheint der Mechanismus der metabolischen Hemmung unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu sein. Eine Ursache für die geringere Zellaktivität könnte der abgesenkte pH-Wert des Materialextrakts sein, da die zelleigenen Enzyme nur im pH-Optimum effizient arbeiten. Andererseits könnten auch während der Vernetzung Reaktionsprodukte entstehen, die zytotoxisch wirken und bei der Extraktion ins Medium übergehen. Um dies zu überprüfen, wurde analog ein weiterer Zytotoxizitätstest mit reinen Gelatine-Scaffolds durchgeführt, die analog hergestellt worden sind.



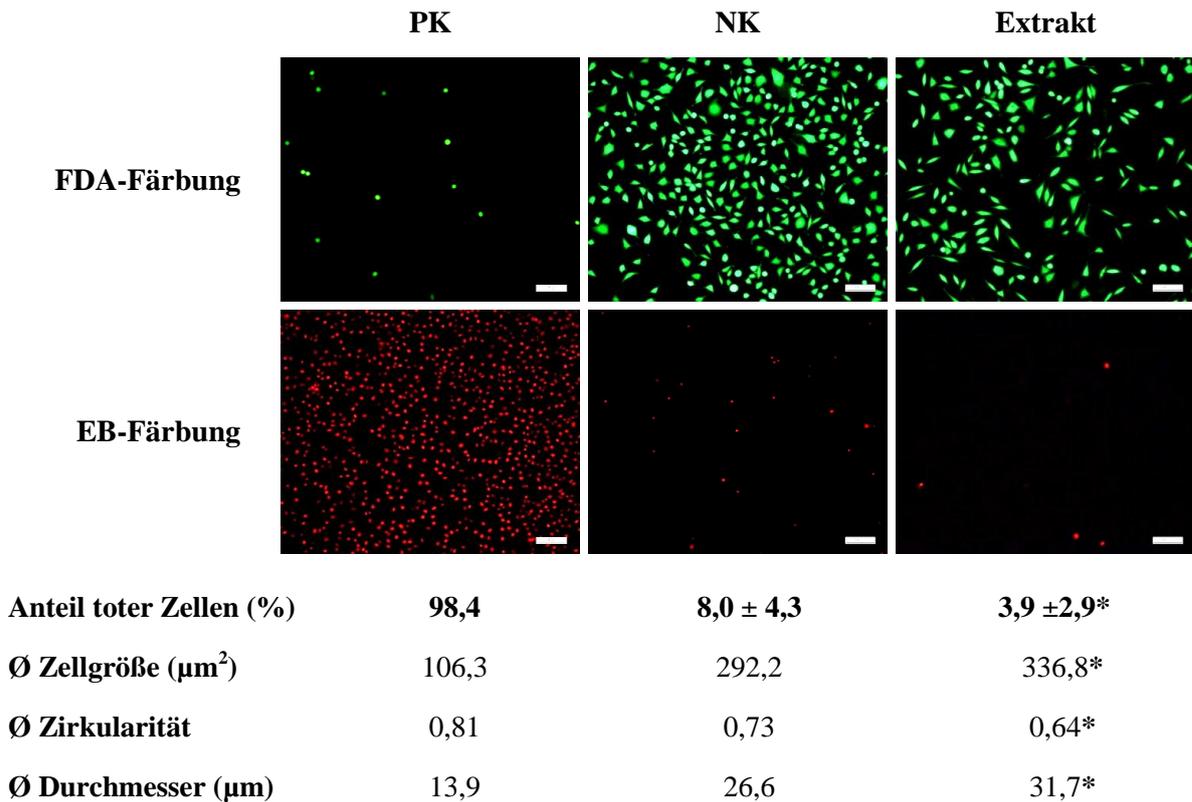
**Abbildung 21: Stoffwechselaktivität von L929-Fibroblasten nach dem Zytotoxizitätstest von reinen Gelatine-Scaffolds mittels MTT-Assay.** Die Inkubation der Zellen erfolgte mit unverdünntem Extrakt (100 %) aus reinen Gelatine-Prüfkörpern, sowie verschiedenen Verdünnungen des Extrakts in Zellkulturmedium (75 %, 50 %, 25 %). Als Positivkontrolle (PK) diente Zellkulturmedium mit 20 % DMSO, Negativkontrolle (NK) war Zellkulturmedium. Messwerte wurden auf NK normiert (n = 12 bzw. 24 für NK). Signifikante Unterschiede im Vergleich zu NK sind mit \* (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ) bzw. \*\*\* ( $p < 0,0001$ ) gekennzeichnet. Die pH-Werte der jeweiligen Extrakte und Kontrollen sind durch Kreuze markiert.

Das Ergebnis zeigte ebenfalls eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität um bis zu 22 % nach Inkubation der Zellen mit reinem Gelatine-Extrakt sowie dessen Verdünnungen (Abbildung 21). Demnach war auch bei diesem Versuch eine dosisunabhängige Hemmung zu beobachten, welche vermutlich weder durch den pH-Wert noch durch toxische Reaktionsprodukte bedingt war.

Um das Ergebnis des MTT-Tests zu verifizieren und gleichzeitig den Effekt des Gelatine-PLGA-Extrakts auf die Zellvitalität genauer zu analysieren, erfolgten Vitalfluoreszenzfärbungen. Dafür wurde der Scaffold-Extrakt den vorangegangenen Versuchen entsprechend für 24 h mit L929-Fibroblasten inkubiert, die auf zellkulturgeeignete Kunststoffplättchen ausgesät worden waren. Nach der Inkubation mit dem Extrakt wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen FDA/EB gefärbt und mikroskopisch untersucht. Da mit Hilfe dieser Färbung vitale, grün fluoreszierende Zellen eindeutig von toten Zellen mit roter Fluoreszenz unterschieden werden, konnte anhand der mikroskopischen Aufnahmen die Analyse der Zellzahlen, des Anteils an toten Zellen sowie spezifischer morphologischer Parameter erfolgen (Abbildung 22, größere Darstellung der Bilder siehe Anhang).

In der Positivkontrolle war ein Großteil der Zellen (98,4 %) erwartungsgemäß tot. Die toten Zellen zeigten aufgrund ihrer abgekugelten Form, die eine relativ hohe Zirkularität von 0,81 bedingt, nur noch geringe Größe ( $106,3 \mu\text{m}^2$ ) sowie Durchmesser ( $13,9 \mu\text{m}$ ). Dagegen konnten bei den Fibroblasten, die mit Negativkontrolle und dem Extrakt inkubiert worden waren, eine hohe Vitalität und normale Morphologie festgestellt werden. In den Extrakt-haltigen Proben war dabei der Anteil an toten Zellen mit 3,9 % signifikant geringer als in der Negativkontrolle (8,0 %,  $p = 0,0018$ ). Zudem nahmen die Zellen nach Inkubation mit dem Extrakt nahezu  $45 \mu\text{m}^2$  mehr Fläche ein und zeigten mit 0,64 eine ebenfalls signifikant geringere Zirkularität als Fibroblasten der Negativkontrolle (0,73). Da beide Kulturen noch subkonfluent waren, konnten diese morphologischen Varianzen nicht durch Platzmangel oder Zell-Zell-Interaktionen verursacht worden sein. Gleichzeitig wurde eine signifikante Verringerung der absoluten Zellzahl in den Extrakt-haltigen Proben um ca. 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt (Student's t-Test,  $p = 0,0014$ ).

Der Scaffold-Extrakt hatte demnach keine toxischen Effekte auf die Fibroblasten. Allerdings kann zusammen mit den Erkenntnissen der MTT-Assays vermutet werden, dass das Zellwachstum durch den Extrakt beeinflusst wurde.



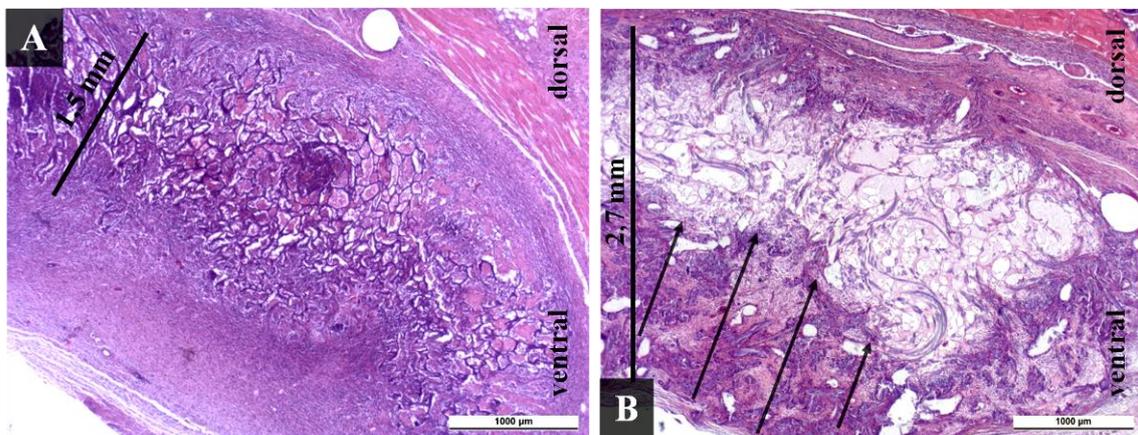
**Abbildung 22: Ergebnis der FDA/EB-Vitalfärbung von L929-Fibroblastenzellen nach der Inkubation mit dem Extrakt der Gelatine-PLGA-Scaffolds.** Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen FDA/EB-gefärbte Fibroblasten nach 24stündiger Inkubation mit dem Scaffold-Extrakt sowie mit Positiv- und Negativkontrolle (PK, NK). Vitale Zellen fluoreszieren dabei grün, tote Zellen rot. Der Anteil an toten Zellen sowie spezifische morphologische Parameter (Größe, Zirkularität und Durchmesser der Zellen) wurden für jede Probe mittels Bildanalyse ermittelt. Signifikante Unterschiede sind mit \*(Student's t-Test,  $p < 0,05$ ) markiert ( $n = 10$ ; Maßstab: 100µm). Größere Darstellung der Bilder im Anhang.

### 3.3.2 Gewebeverträglichkeit und Resorption mittels subkutaner Implantation

Die Analyse der Gewebeverträglichkeit sowie der *in vivo* Degradation der Gelatine-PLGA-Konstrukte erfolgte im Anschluss an die *in vitro* Zytotoxizitätstestung gemäß DIN EN ISO 10993-6 (Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation) anhand einer Implantationsstudie im Rattenmodell.

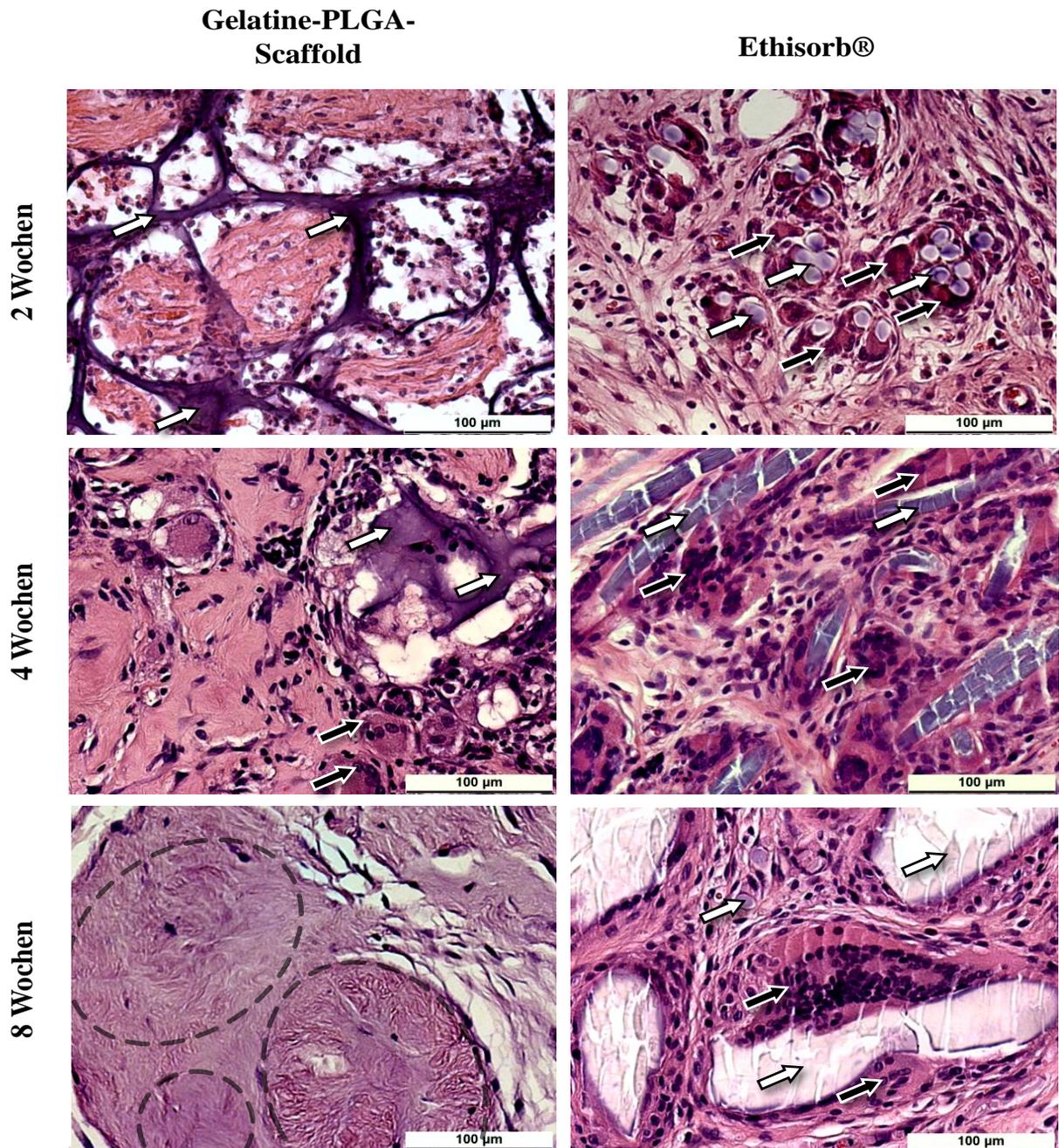
Dazu wurden das Prüfmaterial sowie Ethisorb® als Referenzmaterial in subkutane Taschen auf dem Rücken von Wistar-Ratten implantiert und nach unterschiedlichen Zeitspannen zwischen 2 und 26 Wochen wieder entnommen. Nach der histologischen Aufarbeitung der Präparate erfolgten die Untersuchung der Resorption sowie die Beurteilung der Gewebeverträglichkeit des Prüfmaterials im Vergleich zum Kontrollmaterial anhand eines semiquantitativen Punktbewertungssystems.

Die Übersichtsbilder der histologischen Präparate zeigen dabei für beide Materialien nach 2 Wochen *in vivo* eine gute Integration von Fibroblasten und Makrophagen in das Material und die Entwicklung von Bindegewebe im Zentrum der Prüf- und Kontrollkörper (Abbildung 23). Im Randbereich, insbesondere an der ventralen Seite, bildete sich dichteres, zellreiches Bindegewebe. Im Gelatine-PLGA-Scaffold nahm dieses Bindegewebe nach 2 Wochen zwischen 30 und 50 % des Konstrukts ein; einige Präparate waren bereits vollständig durchwachsen (Abbildung 23, A). In den Kontrollkörpern wurden dagegen im gleichen Zeitraum nur 25 bis 50 % des Materials mit Zellen und Matrix gefüllt und keines der Präparate zeigte eine Gewebekonstruktion bis in die zentralen Bereiche. Diese konnte erst nach 4 Wochen bei allen Prüf- und Kontrollkörpern festgestellt werden.



**Abbildung 23: Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold (A) und Ethisorb®-Kontrolle (B) nach 2 Wochen *in vivo*.** Balken markieren den Bereich mit dem jeweiligen Material. Prüfmaterial ist bereits vollständig durchwachsen, beim Kontrollmaterial zeigen Pfeile die Einwachsfront (H&E-Färbung; 2,5x; Maßstab: 1000 µm).

Die Degradation des Prüfmaterials war nach 2 Wochen meist gering, wobei die Verringerung der Scaffold-Höhe je nach Präparat etwa 10 bis 40 % betrug. Beim Referenzmaterial führte ein Aufquellen der Fasern in den Randbereichen zu einer Zunahme der Materialdicke von etwa 2 mm auf 2,6 bis 2,8 mm (Abbildung 23, B). Nach 4 Wochen *in vivo* waren die Gelatine-PLGA-Konstrukte vor allem in den äußeren Bereichen bereits stark degradiert. Das Ethisorb®-Material wies dagegen kompaktere Konturen und eine geringere Degradation auf (Abbildungen siehe Anhang). Die vollständige Zersetzung des Scaffold-Materials erfolgte zwischen 4 und 8 Wochen. Für die Ethisorb®-Kontrolle konnten nach 12 Wochen noch Polymerfasern nachgewiesen werden, Reste des sehr langsam abbauenden Polydioxanon waren nach 26 Wochen noch vorhanden.



**Abbildung 24: Detailaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold (links) und Ethisorb®-Kontrolle (rechts) nach 2, 4 und 8 Wochen *in vivo*.** Schwarze Pfeile kennzeichnen exemplarisch Riesenzellen, weiße Pfeile Materialreste. Die umrandeten Bereiche markieren mögliche degradierte Porenwände (H&E-Färbung, Maßstab: 100 µm).

In Abbildung 24 sind Detailaufnahmen der Präparate nach 2, 4 und 8 Wochen *in vivo* dargestellt. Das Prüfmaterial zeigte nach 2 Wochen die Bildung von Gewebe mit zellarmer, extrazellulärer Matrix in den zentralen Bereichen der Poren. Zusätzlich waren Makrophagen, insbesondere an den Porenwänden zu beobachten, die in den Abbau des Materials durch Phagozytose involviert waren. Lymphozyten und Granulozyten, welche vermehrt bei Entzündungen gebildet werden, wurden seltener beobachtet. Das Referenzmaterial löste dagegen

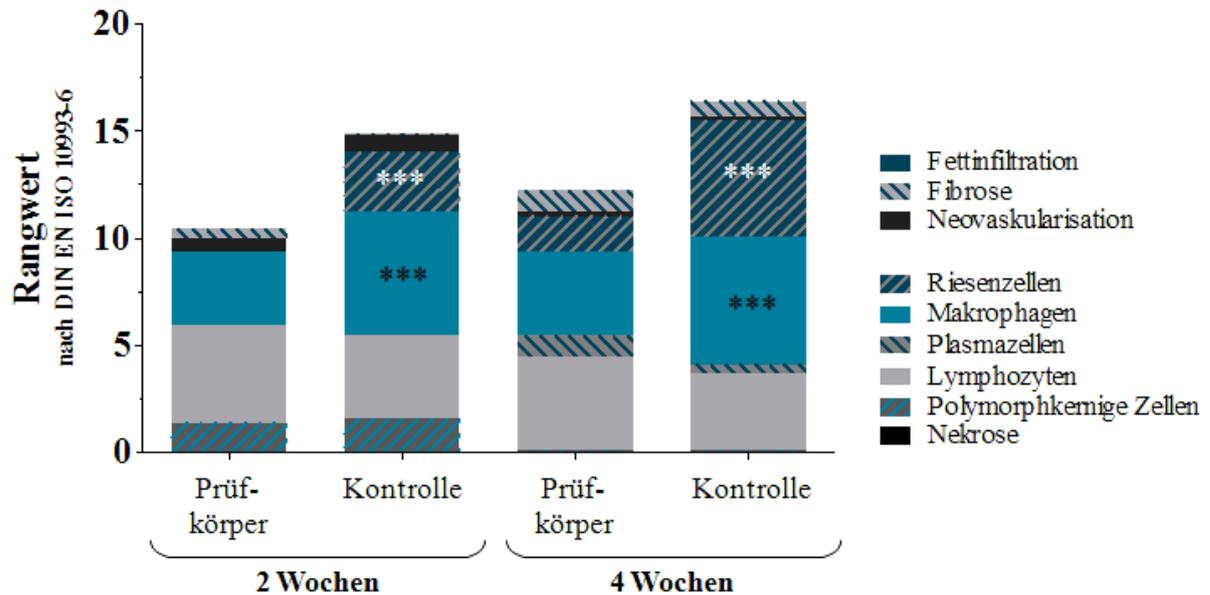
eine stärkere Fremdkörperreaktion aus, im Zuge derer sich vermehrt mehrkernige Riesenzellen ausbildeten. Diese können die Polyglactin-Fasern des Ethisorb®-Materials komplett umschließen und dadurch besser abbauen. Zwischen den Fasern waren lockeres Bindegewebe, Fibroblasten und Makrophagen erkennbar.

Nach 4 Wochen *in vivo* waren die Gelatine-PLGA-Konstrukte bereits stark degradiert. Dementsprechend waren einige der Porenwandungen komplett abgebaut, so dass sich in diesen Bereichen nur noch Bindegewebe mit einigen Fibroblasten und Makrophagen befand. Zu diesem Zeitpunkt waren auch Riesenzellen an dem Abbau des Scaffold-Materials beteiligt. Nach der kompletten Degradation der Konstrukte war zum 8-Wochen-Zeitpunkt nur noch zellarmes, fibröses Gewebe erkennbar, wobei die ehemalige Porenstruktur teilweise anhand der Faserausrichtung nachvollzogen werden konnte.

In den Ethisorb®-Präparaten waren sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen noch vermehrt Makrophagen und insbesondere Riesenzellen am Abbau der Polymere beteiligt. Nach 8 Wochen war dabei ein Teil der Polyglactin-Fasern bereits degradiert, während sich das Polydioxanon zu wolkenartigen Strukturen ausgebreitet hatte. Diese wurden nur sehr langsam abgebaut, so dass sie nach 26 Wochen *in vivo* noch erkennbar waren.

Die gewonnenen Erkenntnisse spiegelten sich auch in der semiquantitativen Auswertung gemäß der DIN-Norm wider. In Abbildung 25 ist eine Zusammenfassung der Rangwerte für beide Materialien nach 2 und 4 Wochen *in vivo* gezeigt, die Einzelwerte für Prüf- und Kontrollmaterial sowie für jeden Zeitpunkt sind im Anhang aufgeführt. Für weitere Zeitpunkte konnte keine Auswertung erfolgen, da das Scaffold-Material bereits vollständig degradiert war.

In beiden Gruppen war nach 2 Wochen *in vivo* ein geringer Anteil an polymorphkernigen Zellen erkennbar. Im Vergleich zum Kontrollmaterial konnte in den Präparaten des Prüfmaterials ein leicht erhöhter Anteil an Lymphozyten zu beiden Zeitpunkten, ebenso wie ein leicht erhöhter Gehalt an Plasmazellen nach 4 Wochen beobachtet werden. Beide Effekte waren jedoch nicht signifikant. Dagegen war die Anzahl an Makrophagen und Riesenzellen sowohl nach 2 als auch nach 4 Wochen im Kontrollmaterial signifikant erhöht (*2way ANOVA*;  $p < 0,0001$ ). Die Bildung neuer Blutgefäße wurde hauptsächlich in den ersten 2 Wochen beobachtet, während nach 4 Wochen erste fibröse Bereiche erkennbar waren. Nekrosen oder Fettinfiltrationen wurden bei beiden Versuchsgruppen nicht festgestellt.



**Abbildung 25: Ermittelte Rangwerte für Prüfkörper (Scaffold) und Kontrolle (Ethisorb®) 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.** Die Auswertung der verschiedenen Zelltypen und Gewebereaktionen erfolgte anhand der histologischen Schnitte gemäß DIN EN ISO 10993-6, Anhang E. \*\*\*signifikant höherer Score für die Kontrollgruppe nach 2 und 4 Wochen (2way ANOVA;  $p < 0,0001$ ).

Anhand der Differenz beider Rangwerte für den jeweiligen Zeitpunkt konnte gemäß DIN-Norm der Grad der Gewebereizung durch das Prüfmaterial abgeschätzt werden (siehe Tabelle 2). Da zu beiden Zeitpunkten der Rangwert für das Prüfmaterial kleiner war als für das Kontrollmaterial, führte die subkutane Implantation des Gelatine-PLGA-Scaffolds im Vergleich zur Ethisorb®-Kontrolle zu einer geringeren Gewebereizung.

### 3.4 *In vitro* Anwendungsstudien zur Eignung des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger

Um die Eignung des Gelatine-PLGA-Konstrukts als dreidimensionaler Zellträger für *in vitro* oder *in vivo* Anwendungen zu untersuchen, wurden Analysen zur effizientesten Besiedlungsmethode, optimalen Zelldichte sowie zur Matrixsynthese von Chondrozyten auf dem Material durchgeführt.

Da für die meisten Anwendungen eine möglichst gleichmäßige, dreidimensionale Zellverteilung sowie adäquate Zell-Zell-Interaktionen angestrebt werden, erfolgten als erstes Untersuchungen zur optimalen Besiedlungsmethode. Für die anfänglichen statischen Versuche wurden primäre Gelenkchondrozyten (pGCs) in einem entsprechenden Volumen von einer oder von beiden Seiten auf das Trägermaterial pipettiert. Da die Ergebnisse jedoch eine sehr vari-

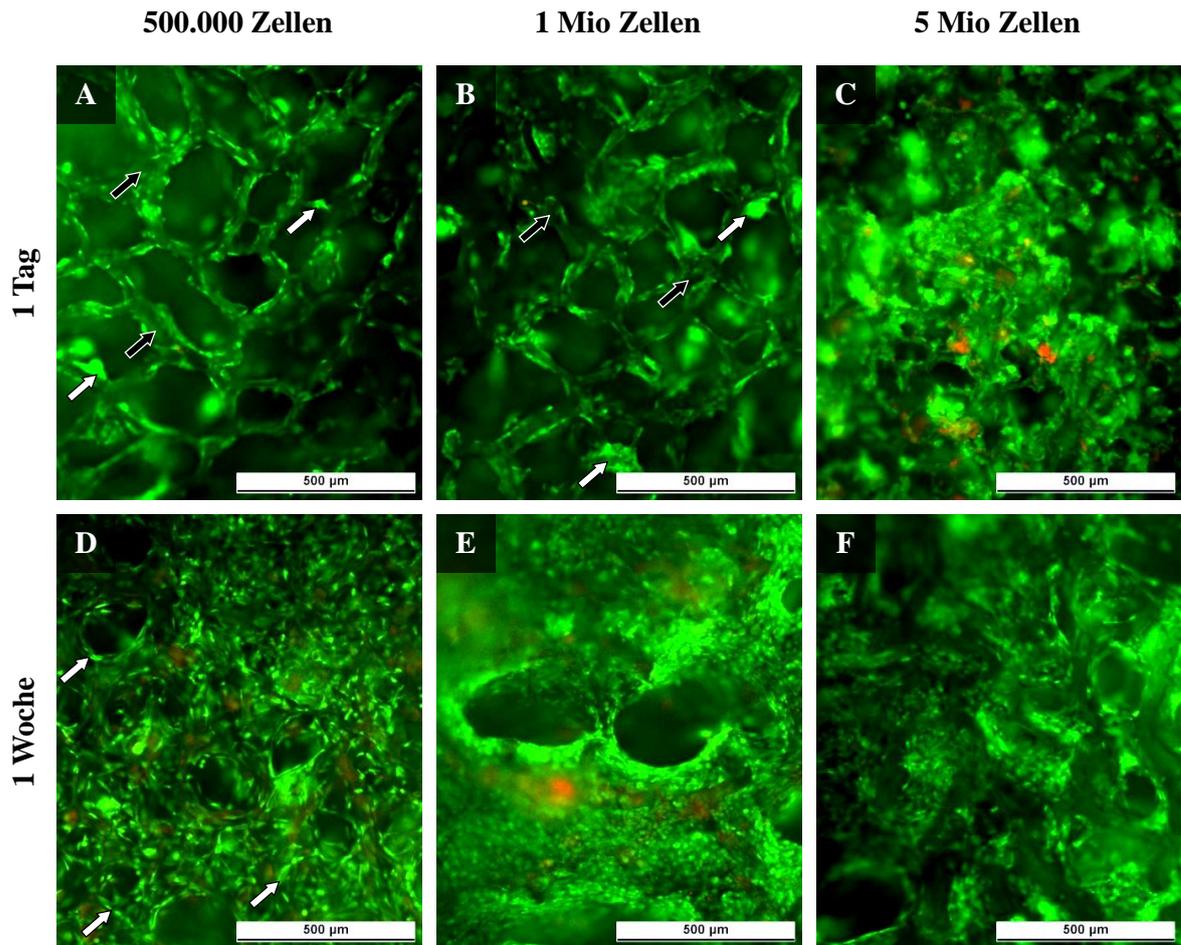
able und unzureichende Besiedlungseffizienz sowie Zellverteilung zeigten, wurde zu dynamischen Ansätzen übergegangen.

Dafür wurde die einzusäende Zellzahl in einem passenden Volumen zusammen mit dem Gelatine-PLGA-Konstrukt in ein kleines Reaktionsgefäß überführt und über 24 h langsam entlang der Längsachse des Gefäßes rotiert. Auf diese Weise war es dem porösen Material möglich, einen Großteil der Zellen siebartig aus der Suspension zu filtern, wodurch eine Besiedlungseffizienz von 89 bis 99 % erreicht wurde. Die Vitalität der Zellen wurde dabei trotz teilweise starker Absenkung des pH-Wertes während der Rotationskultur nicht beeinflusst und lag durchschnittlich bei 98 %. Um die pH-Verschiebung trotzdem zu umgehen, wurde die Methode analog mit einem Ansatz von 50 ml durchgeführt, wobei jedoch Zellakkumulationen auftraten, aufgrund derer keine akzeptable Besiedlung erreicht werden konnte. Dementsprechend erfolgte die Besiedlung der Konstrukte in allen folgenden Versuchen mit Hilfe der dynamischen Methode in einem 2 ml-Ansatz.

### **3.4.1 Optimierung der Zelldichte**

Um die optimale Besiedlungsdichte des Gelatine-PLGA-Scaffolds zu ermitteln, wurden unterschiedliche Zellzahlen auf die Konstrukte aufgebracht und direkt nach der Besiedlung sowie nach einer Woche Kultur mittels Vitalfluoreszenzfärbungen hinsichtlich der oberflächlichen Zellverteilung beurteilt (Abbildung 26).

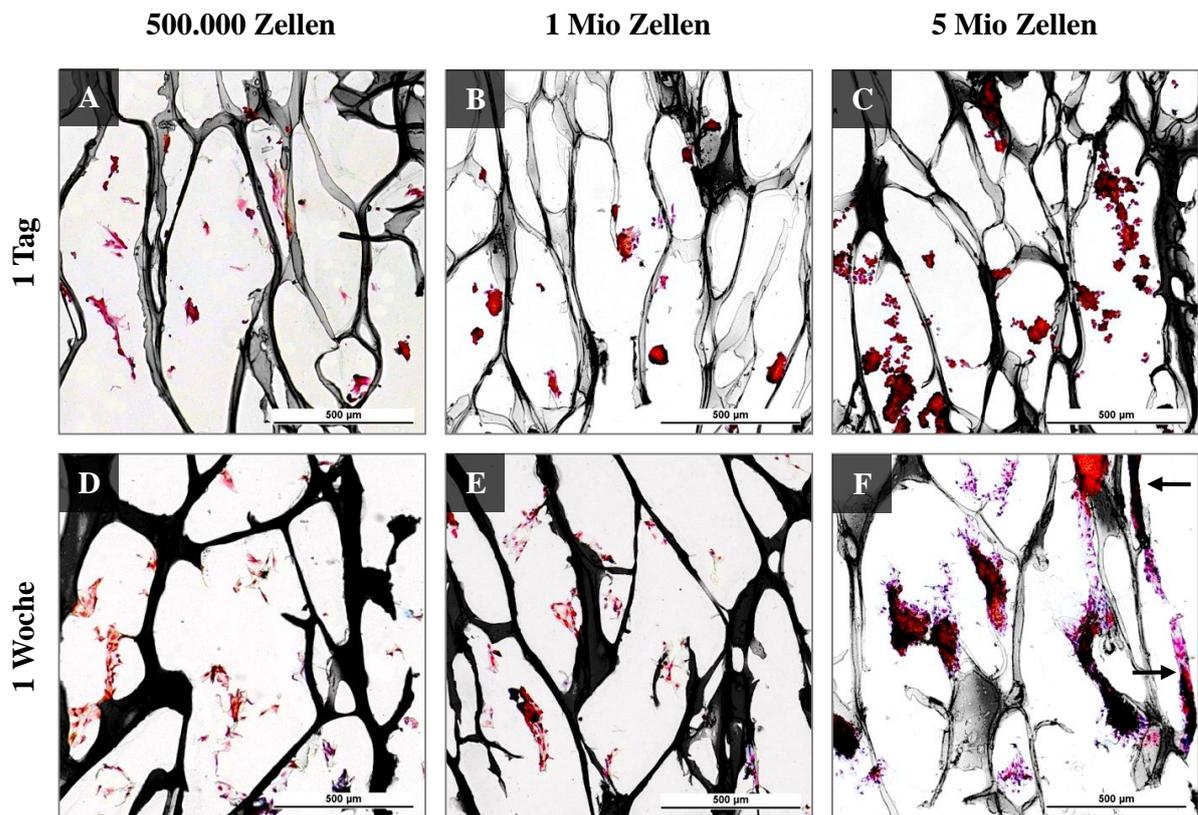
Nach der 24 stündigen Besiedlungsphase zeigten die Konstrukte, die mit 500.000 und 1 Mio primären Chondrozyten besiedelt worden waren, gleichmäßig verteilte einzelne Zellen und kleinere Zellakkumulationen auf dem Material, wobei die zugrunde liegende Porenstruktur der Scaffolds noch gut erkennbar war (Abbildung 26, A und B). Nach Besiedlung mit 5 Mio Zellen konnte dagegen ein dichter Zellrasen auf dem Konstrukt beobachtet werden, so dass die oberflächliche Struktur völlig von den Chondrozyten ausgefüllt wurde (Abbildung 26, C). Dabei waren vermehrt tote Zellen detektierbar, die wahrscheinlich wegen unzureichender Nährstoffversorgung aufgrund der hohen Zelldichte abgestorben sind. Ein Abschluss der Poren durch eine dicke oberflächliche Zellschicht könnte außerdem zur Unterversorgung der Zellen im Inneren des Materials führen.



**Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellzahlen auf dem Gelatine-PLGA-Scaffold nach einem Tag und einer Woche.** Scaffolds wurden initial mit 500.000, 1 Mio und 5 Mio primären Gelenkchondrozyten (pGCs) besiedelt und nach einem Tag (A-C) sowie einer Woche (D-F) mit FDA-EB gefärbt. Vitale Zellen fluoreszieren dabei grün, tote und stark geschädigte Zellen rot. Weiße Pfeile zeigen exemplarisch vitale Zellen oder Zellakkumulationen, schwarze Pfeile markieren das Scaffold-Material (Maßstab: 500 µm).

Nach einer Woche waren auf der Probe, die mit 500.000 Zellen besiedelt worden war, Chondrozyten mit gestreckter, fibroblastärer Morphologie anstelle der normalen runden Form zu erkennen (Abbildung 26, D). Die Konstrukte mit initial 1 Mio und 5 Mio Chondrozyten zeigten dagegen durchgängig kugelförmige Zellen, die so stark proliferiert waren, dass ein Großteil der Poren bereits zugewachsen war (Abbildung 26, E und F). Die größeren, rot fluoreszierenden Objekte könnten dabei durch eine Ansammlung toter Zellen, wahrscheinlicher jedoch durch die Eigenfluoreszenz der PLGA-Partikel im Material verursacht worden sein. Auf den Proben mit der höchsten Zelldichte bildete sich nach einer Woche eine oberflächliche Schicht extrazellulärer Matrix, die eine diffuse Streuung der FDA-Fluoreszenz bewirkte und somit Ursache für die verschwommene Darstellung der Zellen war.

Um auch die Zellverteilung innerhalb der Konstrukte zu untersuchen, wurden an denselben Proben Gefrierschnitte parallel zur Porenausrichtung angefertigt. Abbildung 27 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der zentralen Scaffold-Bereiche jedes Präparats nach der histologischen Färbung. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das Scaffold-Material grau dargestellt.

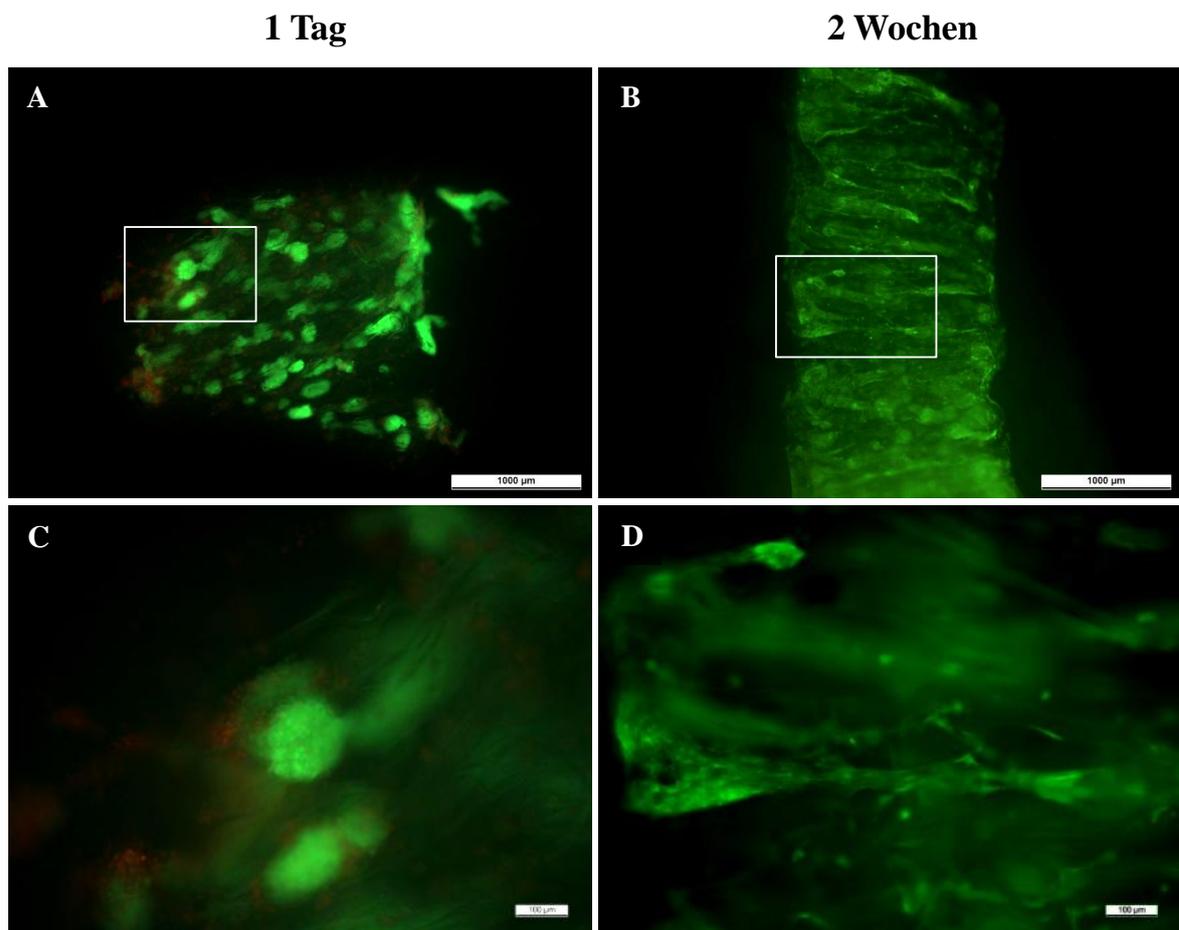


**Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellverteilung in unterschiedlich dicht besiedelten Gelatine-PLGA-Scaffolds nach einem Tag und einer Woche.** Scaffolds wurden initial mit 500.000, 1 Mio und 5 Mio primären Gelenkchondrozyten (pGCs) besiedelt. Nach einem Tag (A, B und C) sowie einer Woche (D, E und F) in Kultur wurden Gefrierschnitte der Proben angefertigt und gefärbt. Zellen sind orange bis rot dargestellt, von den Zellen synthetisierte Matrix bläulich bis lila, das Scaffold-Material wurde nachträglich digital grau eingefärbt. Schwarze Pfeile markieren eine dichte Zellschicht auf der Außenseite der Scaffolds (modifizierte Masson-Goldner-Färbung, Maßstab: 500 µm). Stärkere Vergrößerung der Zellmorphologie siehe Anhang.

Demnach erreichten die Chondrozyten mit Hilfe des dynamischen Besiedlungsansatzes in allen Proben die mittleren Bereiche der Konstrukte, wobei die Zellen mit zunehmender Zelldichte akkumulierten und daher ungleichmäßiger verteilt waren. Nach einer Woche in Kultur hatten sich diese Zellklumpen aufgelöst, wodurch sich die Chondrozyten in einem feingliedrigen Netzwerk anordnen konnten. Die ursprüngliche Anordnung der Zellen und Matrixbe-

standteile scheint dabei während des Schneidevorgangs zerrissen und zusammengeschoben worden zu sein.

Trotz der entstandenen Artefakte konnte nach einer Woche eine relativ geringe Zelldichte sowie Matrixbildung in den Proben, die mit 500.000 und 1 Mio Chondrozyten besiedelt wurden, beobachtet werden (Abbildung 27, D und E). Die Zellproliferation und Matrixsynthese reichte nicht aus, um die Poren in dieser Zeitspanne mit Gewebe aufzufüllen. Dagegen zeigten die Proben mit initial 5 Mio Zellen nach einer Woche eine starke Akkumulation von Chondrozyten im Scaffold-Inneren sowie auf der Außenseite (Abbildung 27, F). Außerdem konnte eine leicht bläuliche Färbung saurer Mukosubstanzen durch Alzianblau und somit eine beginnende Matrixbildung beobachtet werden. Bei längeren Kulturzeiträumen könnte es allerdings aufgrund der hohen Zelldichte zur Unterversorgung der Chondrozyten im Inneren des Materials kommen.



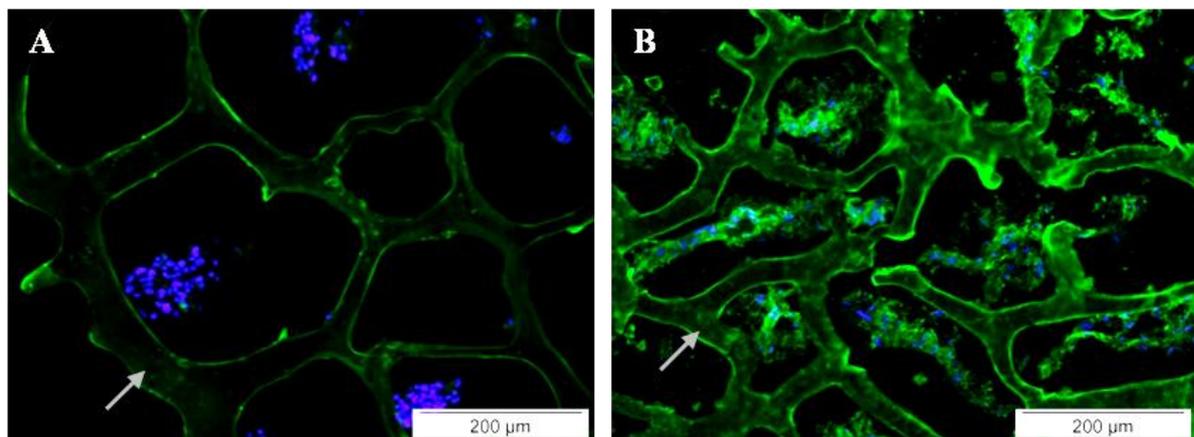
**Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Chondrozyten im Gelatine-PLGA-Scaffold nach einem Tag und 2 Wochen.** Scaffolds wurden mit 2 Mio pGCs besiedelt, nach einem Tag (A, C) sowie 2 Wochen (B, D) mit FDA-EB gefärbt, parallel zur Porenausrichtung geschnitten und mikroskopiert (Maßstab: 1000 µm (A, B) und 100 µm (Ausschnitte C, D)).

Zusammenfassend kann eine Zellzahl von 2 bis 3 Mio pro Konstrukt (entspricht 25.000 bis 37.500 Zellen/mm<sup>3</sup>) als sinnvoll angesehen werden, um eine geeignete Zelldichte und somit Zell-Zell-Interaktionen bei gleichzeitig ausreichender Nährstoffdiffusion zu erhalten.

Versuche mit 2 Mio pGCs zeigten anschließend gute Ergebnisse bezüglich Zelldichte und Zellverteilung. Direkt nach der Besiedlung konnten ebenfalls starke Akkumulationen der Zellen beobachtet werden, wobei die gebildeten Zellhaufen gleichmäßig im Material verteilt vorlagen. Anhand der Vitalfluoreszenzfärbung eines besiedelten Konstrukts nach 14 Tagen in Kultur war eine gleichmäßige Zellverteilung im Inneren des Materials feststellbar (Abbildung 28).

### 3.4.2 Kollagen II-Nachweis

Da primäre Chondrozyten in Monolayer-Kulturen ihre typischen morphologischen, funktionellen und biochemischen Eigenschaften verlieren, werden im *Tissue Engineering* von Knorpel vermehrt dreidimensionale Trägermaterialien eingesetzt, die diese Dedifferenzierung verhindern sollen. Um zu überprüfen, ob der Gelatine-PLGA-Scaffold als dreidimensionaler Zellträger die Redifferenzierung von primären Knorpelzellen unterstützt und somit zur Bildung einer knorpelspezifischen Matrix beiträgt, wurden immunhistologische Färbungen von Kollagen II durchgeführt.



**Abbildung 29: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II in besiedelten Gelatine-PLGA-Konstrukten nach 2 Tagen (A) und 2 Wochen (B).** Scaffolds wurden mit 2 Mio primären Gelenkchondrozyten besiedelt und bis zu 2 Wochen kultiviert. An Gefrierschnitten (Querschnitte) der Probe erfolgte die immunhistologische Färbung von Kollagen II (grün) und den Zellkernen (blau), die Gelatine wurde dabei unspezifisch angefärbt (graue Pfeile, Maßstab: 200 µm).

Abbildung 29 zeigt den immunhistologischen Nachweis von Kollagen II anhand von Querschnitten besiedelter Gelatine-PLGA-Konstrukte nach 2 und 14 Tagen Kultur. Dabei wurde

das Material aufgrund unspezifischer Bindung des Antikörpers an die strukturell ähnliche Gelatine ebenfalls angefärbt. Weitere Aufnahmen, die Proben nach 7 Tagen Kultur sowie den Vergleich zu besiedelten Ethisorb®-Vliesen zeigen, sind im Anhang aufgeführt.

Nach 2 Tagen war erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Menge an Kollagen-II-haltiger Matrix im unmittelbaren Umfeld der Chondrozyten zu beobachten. Die Zellen waren dabei relativ gleichmäßig, jedoch wiederum in Form von Zellakkumulationen in den Poren verteilt. Nach 14 Tagen in Kultur waren die Zellhaufen dagegen aufgelöst, so dass die pGCs einen Verbund mit der vermehrt synthetisierten, extrazellulären Matrix bildeten. Diese zeigte eine starke grüne Fluoreszenz, was auf einen hohen Gehalt an Kollagen II schließen lässt.

## 4 Diskussion

Aufgrund der schwachen regenerativen Fähigkeiten des Knorpelgewebes führen Verletzungen meist zur Bildung von funktionell minderwertigem Narbengewebe. Zur Unterstützung dieser mangelhaften Regeneration wurden bereits verschiedene konventionelle Techniken und *Tissue Engineering* Strategien entwickelt, von denen dreidimensionale Zellträger einen vielversprechenden Ansatz aufzeigen. Allerdings stellt Knorpel wegen seiner komplexen Geometrie und mechanischen Belastbarkeit eine Herausforderung in der Rekonstruktion von Gewebe dar (Raghunath *et al.* 2007), so dass die Anforderungen an Zellträger dementsprechend hoch sind (siehe Kapitel 1.4.1). Solche Trägermaterialien können als Hydrogel, Schwamm oder Vlies konstruiert werden, die Auswahl an Komponenten und Herstellungsverfahren ist dabei enorm vielfältig (Chung und Burdick 2008, Sachlos und Czernuszka 2003).

### 4.1 Konstruktion und Herstellung des Trägermaterials

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Testung eines Scaffold-Materials, das den genannten Anforderungen möglichst weitgehend entspricht. Als Hauptkomponente und Gerüst des Materials wurde für diesen Zweck das natürliche Polymer Gelatine gewählt. Dieses wird durch Hydrolyse aus Kollagen, dem in tierischen und menschlichen Geweben am häufigsten vorkommenden Strukturprotein, gewonnen. Es existieren verschiedene Kollagentypen, die aufgrund von Variationen in ihrer Tertiärstruktur unterschieden werden können, allen gemeinsam ist jedoch der tripelhelicale Aufbau, für den drei Polypeptidketten aus mehr als 1000 Aminosäuren in Form einer rechtsgängigen Helix umeinander gewunden werden (Babel 1996, Friess 1998).

Für die Gelatineherstellung am bedeutendsten ist das in Knochen und Haut vorkommende Kollagen I. Die Tripelhelix des Proteins wird während der kalkalkalischen oder sauren Aufbereitung durch chemisch-thermische Prozesse zerstört, so dass am Ende der Herstellung hauptsächlich einsträngige, verknäuelte Peptidketten vorliegen, deren Aminosäuresequenzen dem ursprünglichen Kollagen weitgehend entsprechen (Babel 1996, Ward und Courts 1977). Kollagen und Gelatine bestehen zu etwa einem Drittel aus Glyzin und zu weiteren 22 % aus den Iminverbindungen Prolin und Hydroxyprolin; die restlichen 45 % nehmen vor allem polare Aminosäuren wie Asparagin- und Glutaminsäure sowie Lysin und Arginin ein (Babel 1996). Für die Bildung der Tripelhelix in Kollagen ist vor allem die repetitive Tripeptid-Folge Gly-X-Y verantwortlich, wobei in 35 % der Abfolgen Prolin (meist in X-Position) und Hydroxyprolin (hpts. in Y-Position) vorkommen (Babel 1996, Friess 1998).

Im Gegensatz zu Kollagen weist Gelatine nur eine geringe Antigenizität auf, behält dabei allerdings Signalstrukturen bei, die die Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung beeinflussen können. Zudem kann Gelatine leicht extrahiert und verarbeitet werden, wodurch das Polymer im Gegensatz zu Kollagen günstiger und in größerer Menge verfügbar ist. Aufgrund der guten Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit findet Gelatine bereits eine breite Anwendung in der Geweberekonstruktion von Haut, Knochen und Knorpel (Banerjee *et al.* 2009, Lien *et al.* 2009, Rohanizadeh *et al.* 2008).

Als stabilisierende Komponente, sowohl bezüglich der Degradation als auch der biomechanischen Eigenschaften, sollte zusätzlich das synthetische Copolymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA) in die Gelatinelösung integriert werden. Das verwendete Resomer® RG 503 H gehört zu der Familie der Poly( $\alpha$ -hydroxysäuren) und besteht zu jeweils etwa 50 % aus D, L-Lactid und Glycolid. Die Synthese dieser linearen Makromoleküle erfolgt über eine katalysierte Ringöffnungspolymerisation bei Temperaturen von 140 bis 180 °C. Das resultierende PLGA kann in chlorierten Lösungsmitteln, Tetrahydrofuran oder Ethylacetat gelöst werden (Wintermantel und Ha 2008).

Da die Monomere Milchsäure und Glycolsäure auch in Blut und Organen von Säugetieren bzw. Nahrungsmitteln vorkommen, zeigen die Polymere und ihre Abbauprodukte eine gute Biokompatibilität (Vert *et al.* 1992). Jedoch führt die Degradation des Polymers zu einem starken Absinken des pH-Wertes und daher zu einem mitunter sehr sauren Milieu in der Mikroumgebung, welches sich negativ auf Zellen in diesem Bereich auswirken kann (Kohn *et al.* 2002, Vert *et al.* 1994). Um diesen Effekt gering zu halten, wurde mit 16,6 % PLGA bezogen auf die Trockenmasse des Scaffolds ein relativ geringer Anteil gewählt.

Als Herstellungsverfahren wurde das gerichtete Einfrieren mit anschließender Gefriertrocknung favorisiert, da bereits erste Erfahrungswerte bezüglich dieser Methode in der Arbeitsgruppe existierten. Zudem ist das Gefriertrocknen im *Tissue Engineering* ein weit verbreitetes Verfahren, vor allem für die Präparation von Trägermaterialien aus natürlichen Polymeren wie Gelatine, Kollagen und Chitosan (Huang *et al.* 2005, Madhally 1999, Sheu 2001).

Der größte Vorteil dieser Methode, insbesondere im Hinblick auf die Biokompatibilität des resultierenden Konstrukts, ist die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel, welches rückstandslos durch den Trocknungsprozess entfernt werden kann. Zudem kann durch Variation der Parameter eine Vielzahl an Porenmorphologien und Nanostrukturen erzeugt werden (Qian und Zhang 2011), welche die Eignung der Schwammstrukturen als Zellträger beeinflussen (Chung und Burdick 2008, siehe Kapitel 4.2.1).

Andere Herstellungsverfahren, die ebenfalls zur Ausbildung von Schwammstrukturen führen, sind z.B. *Solvent-casting Particulate-leaching* und Gas-Schäumen. Bei diesen Techniken können allerdings die Größe, Geometrie und räumliche Verteilung der Poren sowie die Ausbildung der Porenkanäle nicht immer präzise kontrolliert werden (Sachlos und Czernuszka 2003). Beim *Solvent-casting Particulate-leaching* wird ein synthetisches Polymer wie PLLA in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. Chloroform) aufgelöst und anschließend mit Salzpartikeln vermischt. Das Lösungsmittel wird durch Evaporation entfernt, wodurch eine kompakte Polymer-Matrix mit eingebetteten Salzpartikeln entsteht, welche im Anschluss durch Wasser aufgelöst werden (Mikos *et al.* 1993). Allerdings kann die Interkonnektivität der gebildeten Poren nicht garantiert werden, da diese davon abhängig ist, ob sich die benachbarten Salzpartikel berühren. Zudem wird die Porengröße durch Agglomeration von Salzpartikeln oder die Ausbildung dünner Häutchen bei der Evaporation beeinflusst und kann demnach nicht exakt vorbestimmt und reproduziert werden (Hutmacher *et al.* 2001). Mit Hilfe dieses Verfahrens können außerdem nur dünne Konstrukte produziert werden, da andernfalls die Auflösung der Partikel im Inneren des Materials erschwert bzw. unmöglich wird (Sachlos und Czernuszka 2003).

Beim Gas-Schäumen werden dagegen Polymere unter großem Druck in CO<sub>2</sub> gelöst. Durch Ablassen des Drucks entstehen Glasblasen, die Poren von 100-500 µm im Polymer zurücklassen, jedoch konnte gezeigt werden, dass nur 10 bis 30 % dieser Poren untereinander in Kontakt standen (Mooney 1996).

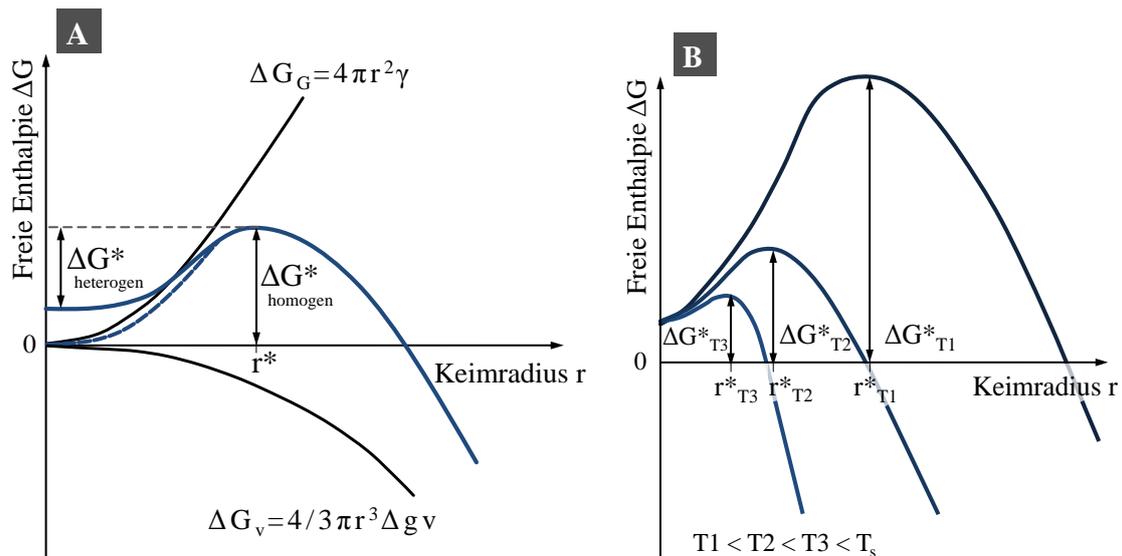
Abgesehen vom Gas-Schäumen müssen bei den meisten übrigen Herstellungsverfahren organische Lösungsmittel eingesetzt werden, um die verwendeten Polymere zu lösen. Reste dieser Lösungsmittel können zur Toxizität oder Karzinogenität des Materials führen und stellen daher ein signifikantes Problem dieser Verfahren dar (Sachlos und Czernuszka 2003).

#### **4.1.1 Einfluss des Herstellungsverfahrens auf die Scaffold-Struktur**

Das Gefriertrocknen besteht aus drei Schritten: Einfrieren, Haupttrocknung und Nachtrocknung, wobei der Einfrierschritt maßgeblich die Ausbildung der gewünschten Porenstruktur beeinflusst. Mit Hilfe des unidirektionalen bzw. gerichteten Einfrierens ist es möglich, die Orientierung der Eiskristalle zu bestimmen (Gutiérrez *et al.* 2008, Schoof *et al.* 2001). Dazu wird die Probe einem Temperaturgradienten ausgesetzt, so dass die Eiskristalle von der niedrigen Temperatur ausgehend in Richtung der hohen Temperatur wachsen (Qian und Zhang 2011).

Für die Herstellung der Gelatine-PLGA-Scaffolds wurde daher ein speziell angefertigter Aufbau verwendet, der zur Ausbildung des benötigten Temperaturgradienten diente (siehe Abbildung 8). Zentrales Element des Aufbaus war ein Peltier-Element, das mit der wärmenden Seite auf einen Kühlblock montiert wurde. Dadurch war es möglich, ein relativ breites Temperaturspektrum vor allem im niedrigen Temperaturbereich abzudecken. Das Peltier-Element wurde für eine möglichst genaue Steuerung der Temperatur und der Abkühlgeschwindigkeit an einen Software-gesteuerten Regler angeschlossen, zudem wurde der ganze Aufbau mit Hilfe eines Teflonrings gegen die Raumtemperatur abgeschirmt. Auf diese Weise konnte ein regelbarer, vertikal ausgerichteter Temperaturgradient erzeugt werden.

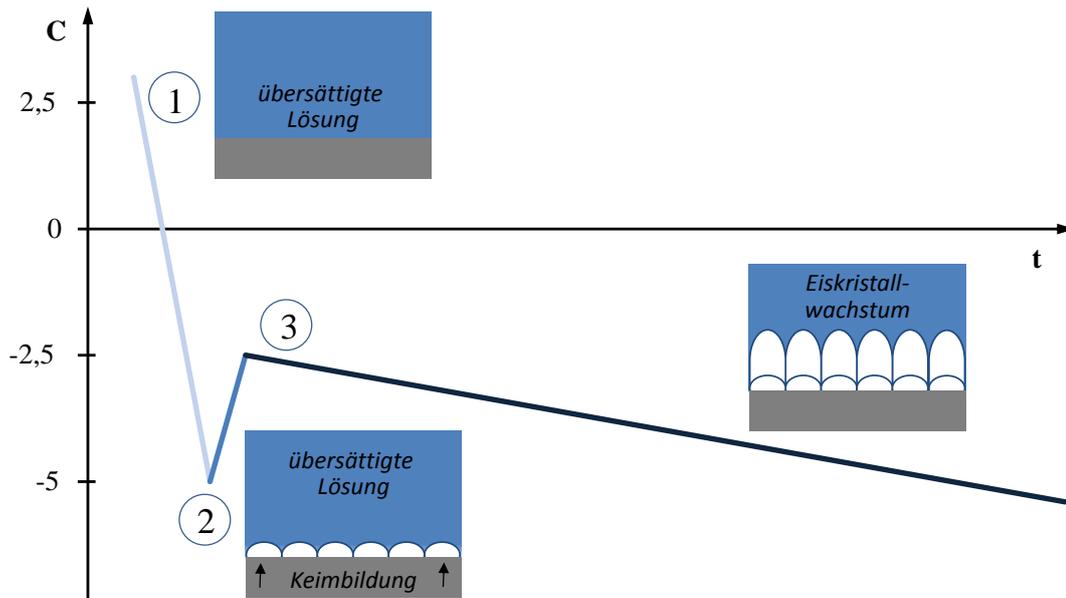
Nachdem die Gelatine-PLGA-Lösung in die vorbereitete Silikonform gefüllt wurde, erfolgte das Abkühlen der Suspension zum Gefrierpunkt bei etwa  $-5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der anschließende Phasenübergang wurde durch eine heterogene Keimbildung ausgelöst, bei der sich Eiskristallkeime an der Oberfläche ungelöster Partikel oder der Einfrierform bilden. Die Entstehung der Keime ist dabei mit einer Änderung der freien Enthalpie des Systems ( $\Delta G$ ) verbunden, die sich aus zwei gegenläufigen Anteilen zusammensetzt: Auf der einen Seite steht die Umwandlungsenergie ( $-\Delta G_v$ ), die zum Volumen des Keims proportional ist und durch den Phasenübergang gewonnen wird. Auf der anderen Seite muss für die Bildung des Keims Energie aufgewendet werden ( $\Delta G_G$ ), die dem Phasenübergang entgegensteht (Abbildung 30, A). Der Verlauf der Funktion  $\Delta G$  zeigt, dass die gebildeten Keime erst einen kritischen Radius ( $r^*$ ) erreichen müssen, um eine thermodynamische Stabilität zu erreichen. Um diese Keimbildungsbarriere zu erreichen, muss jedoch eine entsprechende Keimbildungsarbeit ( $\Delta G^*$ ) aufgewendet werden, die z.B. durch eine Unterkühlung der Suspension erreicht werden kann. Zudem sinkt bei steigender Unterkühlung der kritische Keimradius, so dass bereits kleinere Keime wachstumsfähig sind (Abbildung 30, B; Schatt 1996).



**Abbildung 30: Verlauf der freien Bildungsenthalpie  $\Delta G$  bei der Keimbildung.** A:  $\Delta G$  als Funktion des Keimradius  $r$  bei homogener und heterogener Keimbildung. B:  $\Delta G$  als Funktion des Keimradius  $r$  bei heterogener Keimbildung und unterschiedlichen Temperaturen der Lösung ( $T_1$ - $T_3$ ).  $r^*$  = kritische Keimgröße,  $\Delta G^*$  = Keimbildungsarbeit,  $\Delta G_G$  = Keimbildungsenergie,  $\Delta G_v$  = Umwandlungsenergie,  $T_s$  = Schmelztemperatur.

Die Unterkühlung der Gelatine-PLGA-Lösung führte zu einem schlagartigen Einfrieren der untersten Suspensionsschicht, wodurch sich sehr kleine Eiskristalle bildeten. Um diese Schicht möglichst dünn zu halten, wurde die Unterkühlung genau kontrolliert und die Eiskristallbildung gegebenenfalls durch Bewegung der Form stimuliert. Anschließend erfolgte das gerichtete Einfrieren der restlichen Suspension unter definierten Bedingungen.

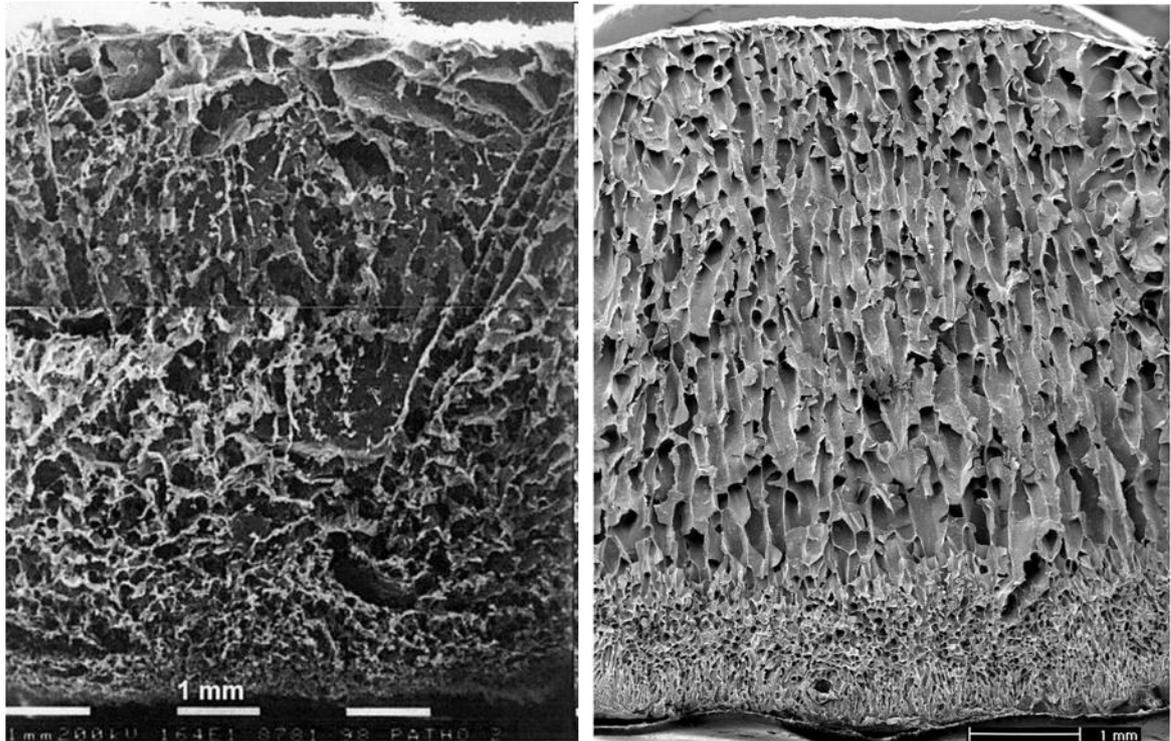
Ein Absinken der Abkühlrate kann dabei an der Unterseite der Probe zu kleineren Poren führen, die nach oben hin immer größer werden. Dieser Effekt kann z.B. bei der industriellen Produktion von Kollagenschwämmen beobachtet werden. Die Kollagensuspension wird dabei in Aluminium- oder Plastikgefäße gefüllt, welche daraufhin in ein Kühlbad mit einer Temperatur von  $-25$  bis  $-40$  °C gestellt werden. Durch das schlagartige Einfrieren der Probe an der Unterseite und die Veränderungen in der Abkühlrate entsteht ein Porengradient. Zudem sind die Porenkanäle nicht ausschließlich vertikal ausgerichtet (siehe Abbildung 32 links; Schoof *et al.* 2001).



**Abbildung 31: Temperaturverlauf der Gelatine-PLGA-Lösung während des Einfrierprozesses.** 1: Abkühlen der Lösung von Raumtemperatur auf  $-5\text{ °C}$  ( $9\text{ °C/min}$ ). 2: Einsetzen der Eiskristallbildung mit anschließender Erwärmung der Lösung auf  $-2,5\text{ °C}$  ( $9\text{ °C/min}$ ), Eisschicht intakt. 3: Langsames Abkühlen der restlichen Lösung mit  $0,1\text{ °C/min}$  auf  $-10\text{ °C}$ .

Um die Ausbildung eines Porengradienten in den Gelatine-PLGA-Konstrukten zu verhindern, musste demnach die Abkühlrate nach dem initialen Einfrieren der Probe möglichst konstant gehalten werden. Dazu wurde das Peltier-Element nach dem initialen Erstarren der untersten Suspensionsschicht leicht erwärmt, um eine zu schnelle Abkühlung der darüber liegenden Lösung zu vermeiden (Abbildung 31). Daraufhin konnte die restliche Probe in einem stetigen Temperaturgradienten einfrieren. Um möglichst große Poren zu erzeugen, wurde eine sehr geringe Abkühlrate von  $0,1\text{ °C/min}$  gewählt; die Eisfrontgeschwindigkeit lag dementsprechend bei etwa  $2,5$  bis  $3,5\text{ }\mu\text{m/sec}$ .

Die resultierenden Konstrukte zeigten aufgrund des schlagartigen Einfrierens der untersten Schicht in diesem Bereich eine dichte Porenstruktur, die später verworfen wurde (Abbildung 32, rechts). Im gesamten darüber liegenden Bereich bildete sich wegen der konstanten Einfrierbedingungen eine gleichmäßige Porenstruktur mit vertikaler Anordnung sowie durchgängigen Poren. Demnach wurde ein Gerüst erzeugt, das die säulenartig aufgebaute und ebenfalls vertikal ausgerichtete Knorpelstruktur der tiefen Zone nachahmt. Anhand von Querschnitten des Materials wurde eine wabenartige Anordnung der Poren festgestellt, die zudem über die gesamte Höhe des Materials einen annähernd gleichen Durchmesser zeigten. Demnach konnte durch die temporäre Erwärmung der Proben nach dem initialen Einfrieren die Entstehung eines Porengradienten effizient verhindert werden.



**Abbildung 32: REM-Aufnahmen der Porenstrukturen eines industriell hergestellten Kollagenschwamms und eines Gelatine-PLGA-Scaffolds.** Links: Längsschnitt eines kommerziell erhältlichen Kollagenschwamms mit ungleichmäßiger Porenstruktur aufgrund von sinkender Abkühlrate (Opragen®, Fa Lohmann aus Schoof *et al.* 2001). Rechts: Längsschnitt der vertikal ausgerichteten und durchgängigen Poren eines optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds aufgrund von konstanter Abkühlrate.

#### 4.1.2 Einfluss von Lösemitteln auf Struktur und Biokompatibilität der Scaffolds

In den anfänglichen Rezepturversuchen wurden Ethylacetat und Essigsäure als Lösemittel für das PLGA verwendet. Daraus resultierten zwei verschiedene Rezepturen: Rezeptur 1, bei der das PLGA nur durch Ethylacetat gelöst wurde und Rezeptur 2, die zusätzlich Essigsäure enthält. Da solche Additive die Porengröße beeinflussen (Schoof *et al.* 2001) bildeten sich in Konstrukten der Rezeptur 1 sehr viel größere Poren (271  $\mu\text{m}$ ) als in Scaffolds der Rezeptur 3 (160  $\mu\text{m}$ ). Konstrukte der Rezeptur 2 zeigten allerdings trotz der zusätzlich enthaltenen Essigsäure eine Verkleinerung des Porendurchmessers auf 125  $\mu\text{m}$ . Banerjee *et al.* vermuteten diesbezüglich, dass sich hydrophobe Zusätze in hydrophilen Polymeren auf die Größe und Verteilung der Eiskristalle auswirken (Banerjee *et al.* 2009). Da Essigsäure sowohl in Ethylacetat als auch in Wasser löslich ist, wurden durch deren Zugabe möglicherweise die hydrophoben Eigenschaften der PLGA-Phase in der Emulsion verändert. Somit könnten die unterschiedlich hydrophoben Partikel in den beiden Rezepturen die Ursache für die variierende Porenmorphologie sein.

Bei beiden Rezepturen wurden außerdem horizontal verlaufende, lamellenartige Strukturen festgestellt, die die Porenkanäle teilweise oder ganz verschlossen haben. Ähnliche Strukturen können auch bei den gefriergetrockneten Kollagensuspensionen von Schoof *et al.*, denen unterschiedliche Mengen an Essigsäure zugesetzt wurden, beobachtet werden (Schoof *et al.* 2001). Da die entstandenen Lamellen die Diffusion von Nährstoffen, Gasen und Stoffwechselprodukten sowie die Zellverteilung behindern, sind die aus Rezeptur 1 und 2 hergestellten Konstrukte ungünstig für die Anwendung als Zellträger. Zudem besitzen Gewebe, die auf einer gleichmäßigen Porenstruktur wachsen, eine höhere biomechanische Belastbarkeit als Gewebe, die auf ungleichmäßigen Konstrukten gebildet werden (Hollister 2002).

Verbleiben Lösemittelreste in Biomaterialien, können diese einen zytotoxischen und karzinogenen Effekt haben (Sachlos und Czernuszka 2003). Da die Zytotoxizitätstests von Konstrukten aus den Rezepturen 1 und 2 eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität ergaben, sollten die möglicherweise ursächlichen Lösemittelreste mittels FTIR-Spektroskopie detektiert werden. In Rezeptur 1 konnten die enthaltenen Ethylacetat-Reste mittels ATR-Messungen nachgewiesen werden, für Rezeptur 2 gelang jedoch kein eindeutiger Nachweis von Essigsäure oder Ethylacetat. Daher wurden Differenz-Thermoanalysen durchgeführt, bei denen die Probe bis auf 200 °C erhitzt wurde, um die entweichenden Gase mittels FTIR-Spektroskopie zu bestimmen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bis 140 °C nur Wasser aus den Konstrukten der Rezeptur 2 freigesetzt wurde, allerdings ab etwa 160 °C Essigsäure entwich.

Ursache für diese verzögerte Freisetzung könnte eine chemische Reaktion der Essigsäure mit den Komponenten der Gelatine sein. Denkbar wäre auch, dass der Zusatz von Essigsäure zu einer Auffaltung der Peptid-Sekundärstruktur durch Beeinflussung der inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken führt. Bei der anschließenden Gefriertrocknung werden die Ketten aufgrund des Wasserverlusts wieder komprimiert, was möglicherweise einen Einschluss einiger Essigsäuremoleküle in die Sekundärstruktur der Gelatine bedingt.

Die Lösungsmittelreste führten zusammen mit der langwierigen Herstellung, der hohen Ausschussrate der produzierten Konstrukte und der ungeordneten Porenmorphologie zum Ausschuss beider Rezepturen.

## 4.2 Charakterisierung der optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds

Für die optimierte Rezeptur 3 wurde das PLGA lösemittelfrei durch Mörsern in die Gelatine-lösung integriert. Die Analyse der daraus resultierenden Partikelgrößen zeigte, dass das PLGA-Pulver auf diese Weise gleichmäßig und homogen in der Gelatinelösung verteilt werden konnte. Der Zusatz von insgesamt 16,6 % PLGA bezogen auf die Trockenmasse der Scaffolds sollte dabei zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften sowie Verlängerung der Degradation führen.

Banerjee *et al.* konnten diesbezüglich durch Zugabe verschiedener Mengen an PLGA-Mikrokugeln (0,1 %; 1 % und 10 %) zu Gelatine-Scaffolds zwar eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften beobachten, eine direkte Korrelation zur PLGA-Menge konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zudem führte ein höherer Anteil an Mikrokugeln nach drei Tagen in PBS zu einer beschleunigten Degradation, vermutlich aufgrund von zunehmender Autokatalyse (siehe Kapitel 4.2.3; Banerjee *et al.* 2009). Dagegen konnten durch Zugabe größerer Mengen von PLGA-Mikrokugeln (30 %; 50 % und 70 %;) zu einem Gelatine-Hyaluronsäure-Chitosan-Konstrukt, sowohl eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften als auch eine Verringerung der Degradationsrate im Vergleich zu Konstrukten ohne PLGA beobachtet werden. Diese Effekte korrelierten zudem mit dem Anteil an Mikrokugeln und zeigten ab Zugabe von 50 % PLGA einen signifikanten Einfluss (Tan *et al.* 2009).

Aufgrund des relativ geringen Anteils von 16,6 % PLGA in den Gelatine-PLGA-Scaffolds ist fraglich, ob die mechanischen und hydrolytischen Eigenschaften des Scaffolds positiv durch das PLGA beeinflusst werden können. Da die größtenteils kleinen Partikel im Konstrukt schnell degradieren, könnte die Degradation der Scaffolds durch Zugabe der PLGA-Partikel beschleunigt werden und somit das Gegenteil vom gewünschten Effekt auslösen. Analysen bezüglich der Degradation und der mechanischen Stabilität wurden bereits durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.3), allerdings müssen noch analoge Versuche mit Scaffolds aus reiner Gelatine erfolgen, um den genauen Einfluss der PLGA-Partikel auf die Eigenschaften der Konstrukte bestimmen zu können.

### 4.2.1 Porosität und Porengröße

Porosität und Porengröße haben einen entscheidenden Einfluss auf das Leistungsvermögen eines Trägermaterials und müssen optimal an die zu verwendenden Zellen angepasst werden. Die Porosität der optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds wurde daher mit Hilfe des Archimedisches Verfahrens untersucht. Es konnte eine Gesamtporosität von 94,5 % in den Scaffolds

festgestellt werden, zudem war ein Großteil der Poren (93,8 %) offen und somit von außen für Nährstoffe und Zellen zugänglich. Um eine Veränderung der Porenmorphologie durch ein Aufquellen der Gelatine zu verhindern, erfolgten die Messungen nicht in einem wässrigen Medium, sondern in DMSO. Da dieses allerdings auch in der Lage ist, PLGA aufzulösen, könnte die Verwendung von DMSO möglicherweise zu einer Verfälschung der Porositätsmessung geführt haben. Aufgrund des geringen Anteils und der feinen Verteilung der PLGA-Partikel sollte diese jedoch relativ gering ausfallen.

Zeltinger *et al* konnten für verschiedene Zelltypen zeigen, dass ein hoher Grad an Porosität nicht nur für die Zelladhäsion, sondern auch für die Proliferation und Matrixbildung wichtig ist. So wurde in besiedelten L-PLA-Scaffolds mit 90 %iger Porosität im Vergleich zu Scaffolds mit einer Porosität von 75 % eine höhere Stoffwechselaktivität, Zellinfiltration und Produktion von Kollagenen und Glykosaminoglykanen festgestellt (Zeltinger *et al.* 2001). Auch andere Arbeitsgruppen konnten beobachten, dass eine hohe Porosität die Zelladhäsion begünstigt (Maquet und Jerome 1997, Wake *et al.* 1994).

Ein weiterer Parameter mit entscheidendem Einfluss auf die Besiedelbarkeit von schwammförmigen Zellträgern ist die Porengröße. Diese muss auf jeden Zelltyp abgestimmt sein, da zu kleine oder zu große Poren zur Dedifferenzierung der verwendeten Zellen führen können (Grad *et al.* 2003, Lien *et al.* 2009, Oh *et al.* 2007). Große Poren sorgen dabei einerseits für einen besseren Austausch an Nährstoffen, Gasen und Stoffwechselprodukten als kleine Poren, andererseits sind geringere Oberflächen für die Zelladhäsion und verminderte Zell-Zell-Interaktionen die Folge (El-Ayoubi *et al.* 2011, Oh *et al.* 2007). Auch auf die Menge und Zusammensetzung des gebildeten Gewebes hat die Porengröße vermutlich Einfluss (Bhardwaj *et al.* 2001).

Lien *et al.* besiedelten Gelatine-Scaffolds unterschiedlicher Porengröße (50-150  $\mu\text{m}$ , 100-200  $\mu\text{m}$ , 250-350  $\mu\text{m}$  und 350-500  $\mu\text{m}$ ) mit artikulären Chondrozyten von Ratten und konnten mit steigendem Porendurchmesser eine Zunahme des Zellwachstums, der Glykosaminoglykan-Produktion sowie der Expression von Aggrekan und Kollagen Typ I, II und X nachweisen (Lien *et al.* 2009). Andere Studien an Chondrozyten zeigten dagegen, dass Scaffolds mit sehr großen Poren (über 300-450  $\mu\text{m}$ ) zu einer Dedifferenzierung der Zellen führen (Grad *et al.* 2003). LiVecchi *et al* konnten bei fötalen, bovinen Chondrozyten auf einem Scaffold mit 115-335  $\mu\text{m}$  Porengröße die Beibehaltung des Phänotyps und die Synthese von Kollagen II beobachten (LiVecchi *et al.* 1994). In einer weiteren Studie mit porcinen Chondrozyten wurde für eine Porengröße von 70 - 150  $\mu\text{m}$  eine höhere Zellzahl sowie ein gesteigerter Gehalt an

Kollagen II und GAGs in der Matrix ermittelt als für Konstrukten mit kleineren Poren (< 10 µm, 10-50 µm). Zudem wurde vermutet, dass große interkonnektierende Poren die Zellularität und den Matrixgehalt positiv beeinflussen (Griffon *et al.* 2006).

Für die Gelatine-PLGA-Scaffolds konnte anhand von Gefrierschnitten eine durchschnittliche Porengröße von 160 µm ermittelt werden, wobei über 65 % der gesamten Poren im Bereich zwischen 25 und 175 µm liegen. Die restlichen 35 % der Poren sind ausschließlich größer und erreichen Werte von bis zu 600 µm. Demnach liegt der Großteil der Poren in einem Bereich, der die Dedifferenzierung der Chondrozyten verhindern sowie angemessene Zell-Zell-Interaktionen und somit die Produktion von knorpelspezifischer Matrix ermöglichen sollte.

Zwar führt die Vorbereitung der Konstrukte für die Kryoschnitte zum Aufquellen der Gelatine, die Präparate wurden jedoch vor der mikroskopischen Analyse an der Luft getrocknet, so dass der Messfehler bezüglich der Porengröße minimal ausfallen sollte. Zudem konnte mit dieser Methode eine sehr viel höhere Anzahl an Poren analysiert werden als anhand der REM-Bilder möglich war. Demnach sind die Daten zur Porengröße, die mit Hilfe der Gefrierschnitte ermittelt wurden, aussagekräftiger.

Zusammenfassend sind die Gelatine-PLGA-Scaffolds aufgrund der sehr hohen Porosität, der gleichmäßigen und durchgängigen Porenstruktur sowie einem optimalen Porengrößenbereich sehr gut für die Besiedelung mit Chondrozyten geeignet. Diese Aussage wurde zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe von *in vitro* Kultivierung primärer Chondrozyten auf dem Material überprüft (siehe Kapitel 4.4).

#### 4.2.2 Vernetzung und Sterilisation

Für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Anwendungen mussten die Konstrukte für einen längerfristigen Gebrauch in wässrigen Medien stabilisiert sowie sterilisiert werden. Da die kovalenten Bindungen, die während des Gefriertrocknungsprozesses zwischen den Peptidketten entstanden sind, keine ausreichende Stabilisierung boten, sollte eine stärkere Vernetzung der Gelatine erfolgen. Dadurch wird nicht nur das Auflösen der Konstrukte verhindert, die Vernetzung führt außerdem zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften, der Oberflächeneigenschaften und der Resistenz gegenüber der enzymatischen Degradation des Proteins (Paul und Bailey 2003, Sionkowska *et al.* 2010).

Gelatine kann mit Hilfe von verschiedenen chemischen Agenzien, wie Aldehyden, Isocyanaten oder Epoxiden, sowie über physikalische Verfahren, wie UV-Strahlung oder trockene Hitze, vernetzt werden (Paul und Bailey 2003, Pulieri *et al.* 2008). Bezüglich der chemischen Agenzien existieren in der Literatur jedoch Bedenken, dass nicht umgesetzte Mole-

küle oder toxische Reaktionsprodukte während der Degradation des Polymers freigesetzt werden und die Zellvitalität beeinflussen (Pulieri *et al.* 2008, Sung *et al.* 1999, Weadock *et al.* 1995).

Da UV-Strahlung aufgrund seiner geringen Eindringtiefe in 3D-Strukturen hauptsächlich für die Oberflächenvernetzung geeignet scheint, wurde die Vernetzung mittels trockener Hitze, dem sogenannten *dehydrothermal treatment*, gewählt. Dazu wurden die Gelatine-PLGA-Scaffolds für 24 h bei 140 °C im Trockenschrank inkubiert, was die Stabilität der Konstrukte in wässrigen Medien wesentlich verbesserte.

Wie bereits 1967 von Yannas und Tobolski beschrieben, bilden sich durch eine extensive Dehydrierung von Gelatine kovalente Amidbindungen zwischen Carboxyl- und Amino-Seitengruppen, wodurch die einzelnen Peptidketten vernetzt werden (Yannas und Tobolsky 1967). Zwar ist der Prozess mitunter sehr langwierig (Pulieri *et al.* 2008) und führt zur Degradation des verwendeten Proteins, jedoch entstehen keine zytotoxischen Reaktionsprodukte (Weadock *et al.* 1983). Zudem kann eine stärkere Belastbarkeit und eine verlängerte Resorptionsrate des Proteins festgestellt werden (Haugh *et al.* 2009).

Um die Auswirkungen der Vernetzung auf die Struktur der Gelatine-PLGA-Scaffolds zu untersuchen, wurden infrarotspektroskopische Messungen durchgeführt. Der Vergleich der Spektren von unbehandelter Gelatine und vernetzten Gelatine-PLGA-Scaffolds mit Beobachtungen aus der Literatur ließ nicht nur auf einen höheren Grad an Vernetzung, sondern auch auf eine stärkere Denaturierung sowie strukturelle Veränderung der Gelatine durch die Hitzevernetzung schließen. Der Grad der Denaturierung der Probe wurde dabei über das Verhältnis der Wellenzahlen 1235/1450 bestimmt. Die Bandenintensität bei 1235 cm<sup>-1</sup> gab dabei den Anteil an Triple-Helices und somit den Grad der strukturellen Ordnung an, während die CH<sub>3</sub>-Bande bei 1450 cm<sup>-1</sup> nicht durch Vernetzung oder Denaturierung beeinflusst wurde (Haugh *et al.* 2009). Bei der unbehandelten Gelatine konnte ein Wert von 0,93 festgestellt werden, was auf eine Denaturierung und damit einhergehende geringer geordnete Struktur verglichen mit Kollagen hindeutet, bei dem das Verhältnis<sub>1235/1450</sub> bei 1,1 oder darüber liegen sollte (Cahn und Kyriakides 2008). Für die vernetzten Gelatine-PLGA-Konstrukte konnte jedoch nur ein Wert von 0,8 ermittelt werden, was auf eine zusätzliche Denaturierung durch das dehydrothermale Vernetzen schließen lässt. Vermutlich werden durch den Prozess die verbliebenen tripelhelicalen Strukturen der Gelatine weiter aufgebrochen, wobei möglicherweise auch Verkürzungen der Peptidketten auftreten, welche sich anschließend zu *random coils* zusammenlagern. Genauere Strukturanalysen diesbezüglich könnten mit Hilfe der Röntgen-Diffraktion oder NMR-Spektroskopie erfolgen (Surewicz *et al.* 1993, Wess 2000).

Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zur Fragestellung, inwiefern die Applikation von trockener Hitze auch zur Sterilisation der Trägermaterialien führt. Die Untersuchung der hitzere-sistenten Keime *Bacillus atrophaeus* und *Geobacillus stearothermophilus* nach einer 24stündigen Inkubation bei 140 °C konnte die sterilisierende Wirkung des Vernetzungsprozesses nachweisen. Zudem wurden auch während der *in vitro* Kultivierung der Konstrukte keine Probleme mit der Sterilität festgestellt. Demnach können die Vernetzung der Gelatine und die Sterilisation der Konstrukte in einem einzigen Prozessschritt erfolgen.

### 4.2.3 *In vitro* Degradation und biomechanische Stabilität

Die Degradation und biomechanische Stabilität eines Trägermaterials sind wichtige Parameter, die an jedes Gewebe individuell angepasst werden müssen. Die Zeitspanne bis zum vollständigen Abbau des Materials kann z.B. anhand von *in vitro* Versuchen unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

Der wichtigste Abbaumechanismus für biodegradierbare Polymere ist die chemische Degradation über Hydrolyse oder enzymatischen Abbau (Göpferich 1996, Vert *et al.* 1992). Bei der passiven Degradation über Hydrolyse dringen Wassermoleküle in die Polymermasse ein und führen dort zur zufälligen Spaltung der instabilen Ester- oder Amidbindungen unter Bildung von Säureendgruppen und Alkohol- bzw. Aminogruppen (Göpferich 1996, Wintermantel und Ha 2008). Die daraus resultierenden Oligomere und Monomere mit endständigen Carboxygruppen verursachen ein Absinken des pH-Werts in der Mikroumgebung der Polymere, wodurch die Degradationsrate über Autokatalyse weiter beschleunigt wird (Göpferich 1996, Vert *et al.* 1994).

Die enzymatische Spaltung von Polymeren findet dagegen ausschließlich an charakteristischen Bindungen statt, die vom Enzym erkannt werden (Wintermantel und Ha 2008). Dieser Abbaumechanismus ereignet sich meist nur bei natürlichen Polymeren, für die entsprechende Enzyme existieren (Göpferich 1996). Kollagenase spaltet beispielsweise die Peptidbindungen in der Triple-Helix-Struktur des Proteins, speziell in der Pro-Gly-Pro-Y-Region (Harper *et al.* 1972). Zwar existieren solche Erkennungsstellen nicht in synthetischen Polymeren, jedoch wird davon ausgegangen, dass die späte Degradationsphase durch Enzyme, vor allem Esterasen, beeinflusst werden kann. So können z.B. Abbauprodukte *in vivo* nach Endozytose durch Makrophagen im Zellinneren enzymatisch verdaut und somit entfernt werden, wodurch die Abbaurate zusätzlich beschleunigt werden kann (Vert *et al.* 1992).

Die Untersuchungen zur Degradation der Gelatine-PLGA-Konstrukte erfolgten in unterschiedlichen Lösungen, um die verschiedenen Abbaumechanismen zu simulieren. Durch den Vergleich der Degradation in ungepuffelter Ringerlösung mit der in Phosphatpuffer konnte der Einfluss des pH-Werts und eine mögliche Autokatalyse untersucht werden, während der Zusatz von verschiedenen Kollagenase-Konzentrationen die enzymatische Degradation simulieren sollte.

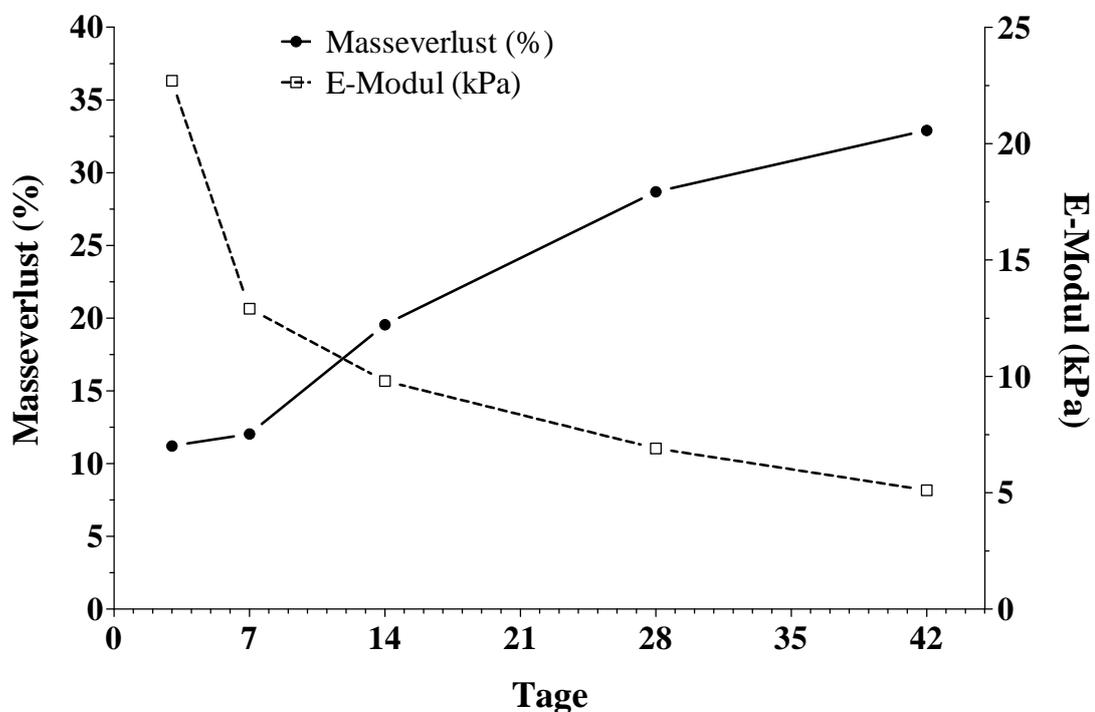
In der Literatur sind diesbezüglich sehr variable Enzymkonzentrationen zu finden, ausgehend von relativ geringen Mengen wie 500 ng/ml bis zu Konzentrationen, die mehr als 100fach höher sind, weshalb die Ergebnisse der Studien untereinander schlecht zu vergleichen sind (Choi 1999, Lee *et al.* 2005, Liu *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen von 373 ng/ml und 1 µg/ml Kollagenase in PBS gewählt, um die Enzymaktivität im osteoarthritischen Gelenk (siehe Holland *et al.* 2005) sowie in anderen Geweben mit höherer Kollagenase-Aktivität zu simulieren.

Die Ergebnisse zeigten für die Degradation in PBS eine relativ geringe Abbaurate, so dass nach 10 Wochen noch über 60 % der Ausgangsmasse vorhanden waren. Mithilfe einer logarithmischen Kurvenanpassung konnte für den gepufferten Abbau eine Halbwertszeit von 28 Wochen abgeschätzt werden. In der ungepufferten Ringerlösung waren die Konstrukte dagegen bereits nach 8 Wochen komplett abgebaut, wobei sich die Degradationsrate mit sinkendem pH-Wert beschleunigte. Demnach war für die zunehmende Degradation der Gelatine-PLGA-Scaffolds in der ungepufferten Lösung hauptsächlich eine Autokatalyse des Materials verantwortlich, die durch den abfallenden pH-Wert bedingt war. Dieser Umstand wurde dagegen beim Abbau in PBS durch das Abpuffern saurer Abbauprodukte vermieden, was zusammen mit der starken Vernetzung der Gelatinefasern zu einer relativ langsamen Hydrolyse führte. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diesbezüglich bereits den Zusammenhang zwischen einer starken Vernetzung von Gelatine und Kollagen und der Verlängerung der Degradation feststellen (Angele 2004, Choi 1999, Liu *et al.* 2007, Weadock *et al.* 1983). Zudem beobachteten Wu und Ding, dass auch eine hohe Porosität (95 %) zu einer Verringerung der Degradationsrate führt, was womöglich durch eine bessere Diffusion der sauren Abbauprodukte bedingt ist (Wu und Ding 2005).

Anhand der beschleunigten Degradation durch den Zusatz von Kollagenase zeigte sich, dass selbst geringe Konzentrationen des Enzyms bereits zu einer starken Verkürzung der Degradation auf 4 Wochen (373 ng/ml Kollagenase) bzw. 2 Wochen (1 µg/ml Kollagenase) führten. Demnach waren vor allem Enzyme, insbesondere Kollagenasen, für eine schnelle Zersetzung des Materials verantwortlich.

Zusammenfassend zeigt das Material in gepufferten Umgebungen mit niedriger Kollagenase-Aktivität eine gute Stabilität. Aufgrund dieser Erkenntnis kann vermutet werden, dass der Gelatine-PLGA-Scaffold im Knorpeldefekt ebenfalls ausreichend stabil ist, da Kollagenasen im adulten Knorpelgewebe nicht oder nur in geringem Maß produziert werden (Aigner *et al.* 2003, Billingham *et al.* 1997). Die *in vitro* Ergebnisse können allerdings nicht direkt auf die *in vivo* Resorption übertragen werden, da sehr viel komplexere Vorgänge im Gewebe stattfinden als unter *in vitro* Bedingungen. So kann z.B. aufgrund des Abtransports der Degradationsprodukte über das Blut- oder Lymphsystem die Abbau-Kinetik zusätzlich beschleunigt werden (Vert *et al.* 1992). Insgesamt ist es daher noch fraglich, ob der Degradationszeitraum der Scaffolds für die Auffüllung eines Knorpeldefekts mit neu synthetisierter Matrix ausreicht.

Für die Untersuchung der biomechanischen Stabilität erfolgten an den degradierten Konstrukten entsprechende Messungen. Dazu wurden die Druck-Stauchungskurven von jeweils vier Proben aus der gepufferten Abbaulösung (PBS) und den Zeitpunkten bis sechs Wochen mittels einer Materialprüfmaschine (Zwick Z005, Zwick GmbH) und einem speziell angefertigten Messaufbau aufgenommen.



**Abbildung 33: Graphische Darstellung des Masseverlustes und des E-Modulverlaufs während der Degradation der Gelatine-PLGA-Scaffolds.** Durchschnittlicher Masseverlust und E-Modul wurden an den Proben des Degradationsversuchs in PBS ermittelt ( $n = 4$ ).

Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rolf Zehbe vom Institut für Werkstoffwissenschaften der TU Berlin zur Verfügung gestellt (Abbildung 33). Der ermittelte Elastizitätsmodul für die jeweiligen Zeitpunkte zeigte erwartungsgemäß eine Abnahme der Stabilität bei steigendem Masseverlust. Nach drei Tagen in PBS und einem Masseverlust von 11 % lag der Wert für den E-Modul bei 22,7 kPa, nach sechs Wochen fand aufgrund des erhöhten Masseverlusts von 33 % eine Verringerung des E-Moduls auf 5,1 kPa statt.

Die mechanische Stabilität der Gelatine-PLGA-Scaffolds liegt demnach deutlich unter der von nativem Knorpel (gemessener E-Modul: 1-2 MPa), was vor allem durch die geringe Stabilität der Gelatine sowie die hohe Porosität und Porengröße bedingt ist. Lien *et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass Scaffolds mit kleineren Poren (50 - 150  $\mu\text{m}$ ) eine höhere Stabilität aufwiesen als Scaffolds mit größeren Poren (350 - 500  $\mu\text{m}$ ). Außerdem wurde beobachtet, dass sich die Stabilität nach *in vitro* Besiedelung der Konstrukte mit Chondrozyten maßgeblich durch die Bildung von knorpelartigem Gewebe verbessert werden konnte, insbesondere bei Scaffolds mit größeren Poren (Lien *et al.* 2010).

Die Druck-Stauchungskurven der Gelatine-PLGA-Scaffolds zeigten zudem, dass die Werte für den gemessenen Druck im Bereich zwischen 15 und 40 % Stauchung des Materials stagnierten, was auf eine gute Lastkompensation der Scaffold hinweist. Mit Hilfe von computer-tomographischen Analysen konnten zudem nur leichte morphologische Veränderungen des Porennetzwerks bei 28 %iger Stauchung von Scaffolds ohne PLGA-Anteil beobachtet werden, während die Poren ab einer Stauchung von etwa 48 % kollabieren. Alle morphologischen Veränderungen waren dabei aufgrund der hohen Flexibilität der Scaffolds komplett reversibel (Thiem *et al.* 2010). Die Gelatine-PLGA-Scaffolds zeichnen sich demnach vor allem durch eine gute Lastkompensation und hohe Flexibilität aus.

### **4.3 Biokompatibilität der Gelatine-PLGA-Scaffolds**

Für die Zulassung eines Biomaterials als Medizinprodukt müssen verschiedene Prüfungen durchgeführt werden, die durch die international geltende DIN-Norm 10993 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ vorgegeben sind. Diese Prüfungen reichen von *in vitro* Testungen der Zytotoxizität, Genotoxizität, Hämokompatibilität und anderem bis hin zu Analysen der Gewebeverträglichkeit und systemischen Toxizität *in vivo*.

### 4.3.1 *In vitro* Zytotoxizität

Um die *in vitro* Zytotoxizität der Gelatine-PLGA-Konstrukte zu beurteilen, wurden Extrakttests gemäß Teil 5 der DIN-Norm durchgeführt. Durch Verwendung der Extraktionsmethode können zytotoxische Agenzien aus dem Konstrukt in das Extraktionsmedium überführt werden, um nachfolgend deren Einfluss auf Monolayer-Kulturen zu überprüfen.

Für diesen Zweck werden etablierte Zelllinien meist gegenüber primären Zellen bevorzugt, da Morphologie und Wachstumseigenschaften der Zelllinien bereits bekannt und beschrieben sind, so dass sich zytotoxische Effekte leicht erkennen lassen (Lau 2005). Zudem sind die Ergebnisse reproduzierbarer als bei Verwendung primärer Zellen, da deren Eigenschaften häufig spenderabhängig sind (Johnson *et al.* 1985). Die verwendete L929-Fibroblastenzelllinie wird von der Norm empfohlen und ist somit gut für die Toxizitätstests geeignet. Für die quantitative Auswertung des Versuchs wurde der MTT-Assay angewandt, mit dem die Stoffwechselaktivität der Zellen festgestellt werden kann. Für eine Verifizierung der Ergebnisse wurden außerdem Vitalfluoreszenzfärbungen nach Inkubation der Zellen mit dem Extrakt durchgeführt.

Das Ergebnis des MTT-Assays zeigte eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität der Fibroblasten nach Inkubation mit dem unverdünnten Scaffold-Extrakt um etwa 20 %. Dieselbe Aktivitätsabnahme war auch bei verschiedenen Verdünnungen des Extrakts zu beobachten, was auf eine dosisunabhängige Hemmung schließen lässt. Als Ursache für die verminderte Aktivität wurden toxische Substanzen in den Konstrukten oder der leicht abgesenkte pH-Werts des Scaffold-Extrakts vermutet.

Um toxische Reaktionsprodukte auszuschließen, die aus Gelatine und PLGA während der Vernetzung entstehen könnten, wurde der Versuch mit reinen Gelatine-Scaffolds wiederholt. Auch bei dieser Analyse wurde eine ähnliche Verringerung der Zellstoffwechselaktivität durch den reinen Gelatine-Extrakt sowie dessen Verdünnungen festgestellt. Somit können toxisch wirkende Reaktionsprodukte aus PLGA und Gelatine als Ursache ausgeschlossen werden, was bereits durch die Ergebnisse der FTIR-Analyse angedeutet worden war. Zudem wurde der pH-Wert des Zellkulturmediums durch Extraktion der reinen Gelatinekonstrukte nicht beeinflusst, weshalb die Ursache für den verringerten pH-Wert des Scaffold-Extrakts die Degradation von PLGA-Partikeln sein muss. Das leicht saure Milieu ist allerdings nicht für die Hemmung der Stoffwechselaktivität verantwortlich.

Demnach bleibt die Vermutung, dass toxische Substanzen oder Verunreinigungen die Ursache für die Verminderung der Stoffwechselaktivität sind. Dazu zählen z.B. Ölreste, die beim Ge-

friertrocknen in das Material gelangt sein könnten oder Endotoxine, die aufgrund einer bakteriellen Kontamination der Lösung gebildet worden sein könnten. Letzteres ist weitgehend ausgeschlossen worden, indem Scaffolds aus einer frisch angesetzten Gelatinelösung hergestellt worden sind, so dass Mikroorganismen keine Gelegenheit hatten, Toxine zu bilden. Die Ergebnisse des anschließenden Zytotoxizitätstests zeigten dabei keine kennzeichnenden Unterschiede zu den bisherigen Werten.

Um festzustellen, ob tatsächlich zytotoxische Substanzen in den Konstrukten vorhanden waren, die zum Absterben von Zellen geführt hatten, erfolgten Vitalfluoreszenzfärbungen. Mit Hilfe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe FDA und EB war es möglich, tote Zellen eindeutig von vitalen zu unterscheiden. Die Ergebnisse der Bildanalysen zeigten dabei in den Extrakt-haltigen Kulturen einen signifikant geringeren Anteil toter Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle. Demnach waren in den Gelatine-PLGA-Konstrukten keine zytotoxischen Substanzen enthalten.

Allerdings konnte in den Extraktproben eine verminderte absolute Zellzahl ermittelt werden, was vermutlich die Ursache für die geringere Stoffwechselaktivität war. Während jedoch im MTT-Assay eine 20 %ige Abnahme der Stoffwechselaktivität beobachtet wurde, war mit Hilfe der Bildanalysen eine Verringerung der Zellzahl um 50 % feststellbar. Beide Ergebnisse zusammen könnten demnach auf eine erhöhte Stoffwechselrate der Fibroblasten in den Extrakt-haltigen Kulturen hindeuten.

Zudem zeigten Zellen nach Inkubation mit dem Extrakt eine stärkere Spreitung sowie eine geringere Zirkularität und somit eine gute Adhärenz. Dies könnte auf eine verminderte Teilungsaktivität der Zellen in den Extraktproben hindeuten, während einige Zellen aus der Negativkontrolle aufgrund von Mitosen eine kugelige Form annahmen. Dieser Vermutung würde auch der geringere Anteil an toten Zellen entsprechen, denn durch Verlangsamung oder Arrest des Zellzyklus existieren weniger Zellen, die in den programmierten Zelltod übergehen.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass der MTT-Test nur bedingt für die Quantifizierung der Zytotoxizität geeignet ist, da mit dieser Methode die Stoffwechselaktivität gemessen wird, welche nicht proportional zum Anteil an toten Zellen sein muss.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests wurden anschließend durch ein externes, akkreditiertes Prüflabor (Fa HygCen, Schwerin) mittels Extrakttest und gekoppeltem LDH-Test überprüft. Bei diesem Assay wird die Aktivität der zytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH) im

Medium gemessen, welche bei toten Zellen aufgrund der Zerstörung der Zellmembran im Überstand erhöht ist. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Zellvitalität von 95 % bezogen auf die Negativkontrolle ermittelt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Scaffold-Extrakt keine zytotoxischen Substanzen enthält, jedoch möglicherweise zu einer Verringerung des Zellwachstums führt. Da auch reiner Gelatine-Extrakt in einer Abnahme der Stoffwechselaktivität resultierte, wurde die Hemmung der Zellproliferation wahrscheinlich durch die Gelatine ausgelöst. Möglicherweise führte die Hitzevernetzung zu Einbußen in der Biokompatibilität der Gelatine, jedoch war eine vergleichende Analyse mit unbehandelter Gelatine schwierig, da diese unvernetzt und unsteril ist, was zum Gelieren des Extrakts und zu ungewollten Kontaminationen führen kann. In der Literatur existieren bezüglich der Biokompatibilität von hitzevernetzter Gelatine nur sehr wenige Studien. Während Lau an dehydrothermal vernetzten Kollagenschwämmen keine Beeinträchtigung der Stoffwechselaktivität beobachten konnte (Lau 2005), zeigten Achilli *et al.*, dass eine starke Vernetzung von zweidimensionalen Kollagengelen durch hochdosierte UV-C-Strahlung die Stoffwechselaktivität von Fibroblasten signifikant verringern kann (Achilli *et al.* 2010).

Dies deutet darauf hin, dass der hemmende Effekt eventuell durch die relativ stark denaturierte Struktur der Gelatine bedingt war. Beispielsweise könnte eine Interaktion der Gelatine mit den Wachstumsfaktoren im Serum dazu führen, dass diese nicht mehr den Zellen zur Verfügung stehen. Ein Entzug von Wachstumsfaktoren kann im frühen Stadium der G1-Phase zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führen (Knippers 2006), was das verminderte Zellwachstum erklären würde. Allerdings wäre dieser Effekt vermutlich dosisabhängig, so dass mit höherer Verdünnung des Scaffold-Extrakts eine Steigerung der Stoffwechselaktivität feststellbar sein müsste. Andererseits könnten auch kurze denaturierte Peptidketten der Gelatine in die Zelle aufgenommen werden und dort mit zelleigenen Proteinen interagieren bzw. akkumulieren und dadurch den Zellzyklus stören. Dies könnte möglicherweise auch zu einer dosisunabhängigen Hemmung des Stoffwechsels führen. Denkbar wäre auch, dass die Fibroblasten durch die Interaktion mit der Gelatine ein Signal erhalten, wodurch sie von Proliferation auf Proteinsynthese umschalten. Dies würde zu einer verminderten Zellzahl führen, könnte aber gleichzeitig auch die möglicherweise erhöhte Stoffwechselaktivität erklären und zu einem dosisunabhängigen Effekt führen.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich der Zellzyklus durch den Scaffold-Extrakt beeinflusst wird, könnte der Anteil an DNA-replizierenden Zellen z.B. mit Hilfe des modifizierten Nukleotids Bromodeoxyridin bestimmt werden, welches anstelle von Thymidin bei der Replikation in

die DNA eingebaut und mittels Antikörperbindung detektiert werden kann. Weiterhin könnten Genexpressionsanalysen der an Proliferation und Proteinsynthese beteiligten Gene der Fibroblasten erfolgen.

Weitere Tests bezüglich der Genotoxizität, Karzinogenität, Reproduktionstoxizität und der Hämokompatibilität der Gelatine-PLGA-Scaffolds sowie die Prüfung auf Hautirritationen wurden ebenfalls gemäß der entsprechenden DIN-Normen (DIN EN ISO 10993-3, -4 und -10) von dem bereits erwähnten Prüflabor (Fa. HygCen, Schwerin) durchgeführt. Zudem wurde die Sterilität der Proben überprüft und es erfolgte der quantitative Nachweis von Pyrogenen (nach 10993-11), wie z.B. Bakterien-Endotoxinen oder anderen Verunreinigungen, die Entzündungen verursachen können. Alle durchgeführten Tests zeigten positiv zu bewertende Ergebnisse, die Proben waren zudem steril und enthielten keine Pyrogene. Dementsprechend gelangten während des Herstellungsprozesses keine Verunreinigungen in das Material.

#### **4.3.2 Gewebeverträglichkeit und Resorption nach subkutaner Implantation**

Im Anschluss an die *in vitro* Tests erfolgte gemäß DIN EN ISO 10993-6 eine Studie zur Gewebeverträglichkeit und Resorption der Gelatine-PLGA-Scaffolds nach subkutaner Implantation. Die Prozesse, die nach der Implantation an der Grenze von Zelle zu Implantat sowie in dessen Umgebung ablaufen, sind wichtige Anhaltspunkte für die Bestimmung der Biokompatibilität des Materials (Ziats *et al.* 1988).

Nach einer Implantation lagern sich als erstes, analog zu den Abläufen bei der Wundheilung, Proteine aus dem Blut als vorläufige Matrix auf dem Implantat an. Dadurch gelangen Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere bioaktive Substanzen in den Implantationsbereich, die die Proliferation und Aktivierung verschiedener Zellpopulationen, wie z.B. Makrophagen, beeinflussen. Nachfolgend bildet sich eine akute Entzündung, die vor allem durch neutrophile Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten) gekennzeichnet ist und nach einigen Tagen in eine chronische Entzündung übergeht. Diese wird dagegen durch das Auftreten von mononukleären Zellen, wie Monozyten bzw. Makrophagen und Lymphozyten, charakterisiert. Nach etwa zwei Wochen dominiert die granulierende Reaktion, welche durch die Anwesenheit von Makrophagen, Riesenzellen und Fibroblasten sowie durch Neovaskularisation gekennzeichnet ist; sie bildet außerdem den Vorläufer einer fibrösen Kapsel um das Implantat. Die Gewebereaktion auf eine Implantation kann dabei durch den Gewebetyp sowie Materialgröße und -form beeinflusst werden (Anderson *et al.* 2008).

Für die Langzeitimplantationsstudie wurden als Prüfkörper jeweils vier Scaffolds in subkutane Taschen auf dem Rückenmuskel von 42 Wistar-Ratten festgenäht, nach unterschiedlichen Zeitspannen zwischen zwei und 26 Wochen wieder entfernt und anschließend anhand von histologischen Schnitten bezüglich der Gewebereaktion und Degradation beurteilt. Analog wurde mit Ethisorb®-Vliesen als Referenzmaterial verfahren, da für die normkonforme Auswertung der Studie der Vergleich mit einem bereits zugelassenen Medizinprodukt mit bekannter Biokompatibilität erfolgen musste.

Nach zwei Wochen *in vivo* konnte eine gute Gewebebildung in dem Scaffold-Material festgestellt werden, so dass manche Prüfkörper bereits vollständig durchwachsen waren, während das Referenzmaterial nur zu etwa 25 bis 50 % mit Gewebe gefüllt war. Dabei schien vor allem die hochporöse, durchgängige Struktur der Scaffolds im Gegensatz zur Vliesstruktur eine schnellere Integration von Gewebe zu ermöglichen.

Die Degradation des gelatinebasierten Prüfmaterials erfolgte bereits innerhalb von vier bis acht Wochen. Die Polyglactin-Fasern der Ethisorb-Vliese waren dagegen bis zu zwölf Wochen nachweisbar, während der sehr langsam degradierende Polydioxanon-Anteil nach 26 Wochen noch erkennbar war. Dieses Ergebnis entspricht den Herstellerangaben, der eine Degradationsspanne von 90 Tagen für den Polyglactin-Anteil bzw. 180 Tage für das Polydioxanon anführt.

Ursache für den schnelleren Abbau des Scaffold-Materials war wahrscheinlich der enzymatische Angriff auf die Gelatine durch Hydrolasen und oxydative Enzyme, die von Fibroblasten und Makrophagen gebildet werden (Anderson *et al.* 2008, Weng *et al.* 2008). Vergleicht man die Stabilität der Konstrukte *in vivo* mit den Ergebnissen der *in vitro* Degradation, liegt die Zeitspanne der vollständigen Zersetzung zwischen dem hydrolytischen (acht Wochen) und dem enzymatischen Abbau (373 ng/ml Kollagenase: vier Wochen). Die Resorptionszeit des Scaffold-Materials ist demnach unerwartet hoch, da die Enzymkonzentration im subkutanen Gewebe wahrscheinlich einen höheren Wert erreicht als 373 ng/ml und die Degradation womöglich durch den Abtransport der Abbauprodukte zusätzlich beschleunigt wird.

Studien an chemisch vernetzten Gelatine-Hyaluronsäure-Konstrukten zeigten nach subkutaner Implantation eine starke Degradation innerhalb der ersten vier Tage mit einem Masseverlust von etwa 35 %. Anschließend erfolgte allerdings eine Stagnation des Abbaus, so dass nach 15 Tagen noch 60 % der Ausgangsmasse vorhanden waren. Nach zehn Tagen führte nach Aussage der Arbeitsgruppe die vermehrte Integration von Fibroblasten und insbesondere die Bildung von extrazellulärer Matrix zu einer Stabilisierung der Konstrukte (Hong *et al.* 2004),

wodurch sich auch die Degradationsspanne der Gelatine-PLGA-Scaffolds verlängert haben könnte.

Die beschleunigte Degradation durch den enzymatischen Angriff entfällt dagegen beim Polyglactin-basierten Ethisorb®, da synthetische Polymere keine Erkennungsstellen für Proteinase besitzen und daher hauptsächlich durch Hydrolyse bzw. Autokatalyse degradieren (siehe Kapitel 4.2.3).

Die histologische Beurteilung der Gewebereaktion zeigte zusammen mit der semiquantitativen Auswertung gemäß DIN-Norm nach zwei Wochen einen geringen Anteil an polymorphkernigen Zellen in beiden Versuchsgruppen, der wahrscheinlich durch eine akute Entzündung bedingt war. Diese konnte allerdings aufgrund der Verringerung der entsprechenden Zellpopulationen nach vier Wochen nicht mehr detektiert werden. Die Anwesenheit von Lymphozyten nach zwei und vier Wochen sowie von Plasmazellen nach vier Wochen deutet dagegen auf die Ausbildung einer chronischen Entzündung in diesem Zeitraum hin. Die leichte Erhöhung der jeweiligen Zellzahlen in der Prüfgruppe könnte dabei auf eine geringe immunologische Reaktion auf die xenogene Gelatine hindeuten.

Während des Fortschreitens der Entzündung migrieren Makrophagen aufgrund von chemotaktischen Signalen in den Implantationsbereich. Dort adhären sie an der Materialoberfläche und tragen zur Degradation des Materials durch Sekretion von Enzymen oder Phagozytose von kleinen Partikeln ( $< 5 \mu\text{m}$ ) bei. Sind größere Partikel vorhanden ( $> 10 \mu\text{m}$ ), fusionieren die Makrophagen zu Riesenzellen, um diese umschließen und abbauen zu können (Anderson *et al.* 2008). Die Fremdkörperreaktion war aufgrund der signifikant höheren Anteile an Makrophagen und Riesenzellen nach zwei und vier Wochen im Kontrollmaterial stärker ausgeprägt als im Prüfmaterial. Die bessere Abbaubarkeit der Gelatine durch die vorhandenen Enzyme könnte dabei zu der geringer ausgeprägten Zellreaktion geführt haben.

Nach der vollständigen Degradation der Scaffolds innerhalb von acht Wochen war hauptsächlich zellarmes, fibröses Gewebe in den ehemaligen Porenstrukturen erkennbar. Ein optimales Ergebnis wäre zwar eine minimale Ausbildung von Fibrose, jedoch führen Wundheilungen oft zu einem zellarmen und avaskulären Bindegewebe und somit zur Narbenbildung (Ziats *et al.* 1988). Bei der Anwendung der Gelatine-PLGA-Scaffolds in Knorpeldefekten ist dagegen die Ausbildung eines zellarmen, matrixreichen Gewebes erwünscht, da auch natives Knorpelgewebe einen solchen Aufbau zeigt (Buckwalter und Mankin 1998a).

Zusammenfassend konnten im Vergleich zum Kontrollmaterial Ethisorb® eine schnellere Bildung von Gewebe in dem Scaffold-Material, jedoch auch dessen schnellerer Abbau beobachtet werden. Die in den Poren gebildete extrazelluläre Matrix schien dabei den Abbau der Konstrukte hinauszuzögern. Zwar war die Stabilität des Scaffolds ausreichend, um zumindest im subkutanen Bereich die Auffüllung von Defekten mit neuem Gewebe zu ermöglichen, offen bleibt jedoch, ob das Material auch für die Regeneration von Defekten im Knorpelgewebe hinreichend stabil ist. Die Fremdkörperreaktion auf das Scaffold-Material zeigte eine signifikant geringere Ausprägung verglichen mit dem bereits zugelassenen Polyglactin-basierten Kontrollmaterial. Insgesamt weisen die Gelatine-PLGA-Scaffolds demnach eine gute Biokompatibilität auf und sind sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Anwendungen geeignet.

## **4.4 Funktionalität der Gelatine-PLGA-Scaffolds**

### **4.4.1 *In vitro* Untersuchungen zur Anwendbarkeit des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger**

Die physikochemischen Charakterisierungen der Scaffolds ließen eine optimale Struktur für die Kultur von Knorpelzellen vermuten. Um dies zu überprüfen, erfolgten die Besiedelung der Gelatine-PLGA-Scaffolds mit primären Chondrozyten sowie die anschließende Analyse der Zellreaktion auf das Material. Die Besiedelung von dreidimensionalen Zellträgern ist dabei ein entscheidender Schritt des *Tissue Engineerings*, insbesondere wegen der Auswirkungen dieses Prozesses auf die nachfolgende Zelldifferenzierung und Gewebebildung (Shahin und Doran 2011). Meist werden für die Besiedelung autologe Zellen verwendet, welche zuvor isoliert und expandiert werden müssen, da oftmals nur kleine Gewebeproben entnommen werden können (Bonassar und Vacanti 1998). Für eine Transplantation von Chondrozyten werden beispielsweise mindestens 10 Mio Zellen benötigt, was nur durch eine etwa zehnfache Expansion der isolierten Chondrozyten in Kultur ermöglicht werden kann (Schulze-Tanzil 2009).

Problematisch ist dabei, dass Chondrozyten bei längerer Monolayer-Kultur ihre morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften verlieren, was zur Dedifferenzierung der Zellen führt (Benya und Shaffer 1982, Gosset *et al.* 2008, Schulze-Tanzil 2009, Watt 1988). Frisch isolierte Chondrozyten zeichnen sich durch eine runde oder polygonale Form aus, die nach längerer zweidimensionaler Kultur in eine fibroblastenförmige Gestalt übergeht. Zudem nehmen die knorpelspezifischen Kollagene Typ II und IX sowie große Proteoglykane wie Aggrecan ab, während kleine Proteoglykane (Decorin, Biglykan), das große Proteoglykan

Versican und das Glykoprotein Fibronectin vermehrt gebildet werden. Auch das für Knorpel untypische Kollagen I, sowie die Kollagene III und IV werden exprimiert (Cournil-Henrionnet *et al.* 2008, Marlovits *et al.* 2004a, Schulze-Tanzil 2009). Der Wechsel in der Synthese von Kollagen II zu Kollagen I findet nach etwa 21 Tagen (Marlovits *et al.* 2004a) bzw. nach Passage 4 statt (Gosset *et al.* 2008, Kang *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007).

Der Verlauf der Dedifferenzierung kann dabei z.B. durch hohe Zelldichten (Amadio *et al.* 1983, Kuettner 1982, Watt 1988) und Suspensionskulturen (Benya und Shaffer 1982, Srivastava *et al.* 1974, Vinall 2002) verhindert bzw. verlangsamt werden. Auch dreidimensionale Kulturen, bei denen die Zellen in Pellets, Hydrogelen oder Zellträgern wachsen, sind eine effiziente Maßnahme für die Redifferenzierung von Chondrozyten, da dadurch die natürlich vorkommende Umgebung nachgeahmt wird und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte unterstützt werden (Benya und Shaffer 1982, Loty *et al.* 2000).

Die Dedifferenzierung primärer Chondrozyten stellt demnach eines der Hauptprobleme bei der Kultivierung dieser Zellen dar. Eine anfängliche *in vitro* Kultur ist allerdings unabdingbar, da die Zellen für eine autologe Transplantation erst expandiert werden müssen. Dreidimensionale Kulturbedingungen, z.B. durch Besiedelung eines entsprechenden Zellträgers, können die Dedifferenzierung der Chondrozyten jedoch verhindern. Um die Eignung des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger diesbezüglich zu untersuchen, wurden *in vitro* Analysen zur optimalen Zelldichte und der Matrixsynthese von Chondrozyten auf dem Material durchgeführt. Zuerst erfolgte allerdings die Evaluierung der effizientesten Besiedelungsmethode, da diese einen entscheidenden Aspekt in der Herstellung funktioneller Knorpelimplantate darstellt. Mit Hilfe der richtigen Methode können sowohl eine optimale Zell-Zell-Interaktion als auch eine gleichmäßige Zellverteilung erreicht werden, die nachfolgend zu einer homogenen Matrixbildung führen (Chung und Burdick 2008, Shahin und Doran 2011). Trägermaterialien, die eine gleichmäßige Zell- und Matrixverteilung aufweisen, sind dabei insbesondere beim Einsatz in mechanisch beanspruchtem Gewebe erwünscht, da diese einen größeren Widerstand gegen Belastungen bieten als heterogene Konstrukte (Shahin und Doran 2011).

Die anfänglichen statischen Besiedelungsversuche, bei denen die Zellsuspension auf das Trägermaterial pipettiert wurde, ermöglichten zwar eine einfache und zeiteffiziente Durchführung, führten im Ergebnis jedoch zu einer schlechten Besiedelungseffizienz und ungleichmäßigen Zellverteilung im Material. Daher wurde zu dynamischen Ansätzen übergegangen, die aufgrund der entstehenden hydrodynamischen Kräfte einen maßgeblichen Einfluss auf die Morphologie, biochemische Zusammensetzung und biomechanischen Eigenschaften von

künstlich gezüchtetem Knorpelgewebe ausüben können (Vunjak-Novakovic *et al.* 1996). Ein typischer dynamischer Besiedelungsansatz ist die Verwendung von Spinnerflaschen, in denen ein großes Volumen Zellsuspension rotiert wird, während der zu besiedelnde Scaffold an Nadeln fixiert in die Suspension getaucht wird. Die Besiedelungseffizienz ist bei dieser Methode relativ hoch, jedoch akkumuliert ein Großteil der Zellen aufgrund der Hydrodynamik innerhalb der Spinnerflasche an der Oberseite der Scaffolds, was wiederum zu einer ungleichmäßigen Zellverteilung führt (Freed *et al.* 1994a, Mahmoudifar und Doran 2005, Shahin und Doran 2011).

Um dies zu vermeiden, wurde eine Besiedelungsmethode entwickelt, bei der sich die Konstrukte innerhalb der Zellsuspension frei bewegen konnten. Dazu wurde jeweils ein Scaffold in einem kleinen Reaktionsgefäß über 24 h mit der Zellsuspension entlang der Längsachse der Gefäße rotiert. Auf diese Weise konnten die Konstrukte aufgrund ihrer kontinuierlichen Bewegung durch die Zellsuspension die Chondrozyten siebartig herausfiltern, wodurch eine hohe Besiedelungseffizienz und eine gleichmäßige Zellverteilung erreicht werden konnte. Zwar wurde der pH-Wert des Zellkulturmediums während der Rotationskultur stark abgesenkt, jedoch konnte keine Beeinträchtigung der Zellvitalität beobachtet werden. Da zudem Versuche in größeren Ansätzen zu einer unerwünschten Akkumulation der Chondrozyten führten, wurden alle Besiedelungen der nachfolgenden Versuche mit Hilfe dieser optimierten, praktikablen Methode durchgeführt.

Im Anschluss erfolgten Versuche zur optimalen Zelldichte, da diese Einfluss auf die Dedifferenzierung und auf die Matrixproduktion der Zellen hat. Höhere initiale Zelldichten scheinen dabei zur verstärkten Synthese von extrazellulärer Matrix zu führen, wahrscheinlich aufgrund von besseren Zell-Zell-Interaktionen (Freed *et al.* 1994a, Huang *et al.* 2004, Iwasa *et al.* 2003). Die Scaffolds wurden daher mit 500.000, 1 Mio und 5 Mio primären Chondrozyten besiedelt und mittels Vitalfluoreszenzfärbung hinsichtlich der oberflächlichen Zellverteilung und -morphologie nach einem Tag sowie einer Woche in Kultur beurteilt. Zudem wurden von den Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und histologisch gefärbt, um die Zellverteilung im Inneren der Scaffolds zu untersuchen.

Problematisch war dabei jedoch, dass der Schneidprozess anscheinend ein Verschieben der Zell- und Matrixanordnung verursachte. Ursache war vermutlich eine zu geringe Eindringtiefe des Kryoschnittmediums aufgrund seiner Viskosität, so dass die Strukturen in den Poren während des Schneidprozesses nicht ausreichend stabilisiert waren. Dieses Problem besteht allerdings bei den meisten histologischen Einbettmedien (Paraffin, PMMA, GMA, Epoxidharz),

da alle eine relativ hohe Viskosität aufweisen, wodurch sich das Schneiden von *in vitro*-Konstrukten als schwierig gestaltet. Zudem würde die obligatorische Entwässerung der Proben über eine ansteigende Alkoholreihe ein massives Schrumpfen der Präparate verursachen, wodurch ebenfalls Artefakte entstehen.

Die Chondrozyten, die auf dem Konstrukt mit der niedrigsten initialen Zelldichte (500.000 Zellen) gewachsen waren, zeigten mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung nach einer Woche eine langgestreckte, fibroblastenähnliche Morphologie, welche auf eine Dedifferenzierung der Zellen hindeutet. Auch in den Längsschnitten der Präparate konnte nach einer Woche nur eine geringe Zelldichte und Matrixbildung im Material festgestellt werden. Die mit 1 Mio Chondrozyten besiedelten Scaffolds ließen dagegen eine starke Proliferation der Zellen innerhalb einer Woche erkennen, zudem waren aufgrund ihrer abgerundeten Morphologie keine phänotypischen Dedifferenzierungsmerkmale beobachtbar. Allerdings waren sowohl die Zelldichte innerhalb des Materials als auch die Matrixsynthese nach einer Woche noch nicht ausreichend, um dem Scaffold Stabilität zu verleihen.

Die Konstrukte mit 5 Mio Zellen zeigten bereits direkt nach der Besiedelung eine dichte Zellschicht auf der Oberfläche, die einen Abschluss der Poren und somit eine geringe Zellzahl im Material vermuten ließ. Anhand der Längsschnitte konnte jedoch auch bei dieser hohen Zelldichte eine gleichmäßige Verteilung der Chondrozyten innerhalb des Materials aufgrund der dynamischen Besiedelungsmethode festgestellt werden. Nach einer Woche in Kultur waren eine deutliche Zellproliferation sowie die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks aus Zellen und extrazellulärer Matrix innerhalb der Scaffold-Poren erkennbar. Allerdings könnte die hohe Zelldichte bei einer weiterführenden Kultivierung zu einer Unterversorgung der Zellen im Scaffold-Inneren führen, da die Nährstoffdiffusion zunehmend behindert wird.

Daher wurde eine Zellzahl von 2 bis 3 Mio Chondrozyten pro Scaffold (entspricht 25.000 bis 37.500 Zellen/mm<sup>3</sup>) als sinnvoll erachtet, um angemessene Zell-Zell-Interaktionen bei gleichzeitig ausreichender Nährstoffdiffusion zu gewährleisten. Diese Zelldichte stimmt zudem annähernd mit der von nativem Knorpel (etwa 40.000 Zellen/mm<sup>3</sup>) überein (Zehbe *et al.* 2009). Die FDA/EB-gefärbten Längsschnitte von Scaffolds, die mit 2 Mio Chondrozyten besiedelt und anschließend über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert wurden, konnten eine gleichmäßige Zellverteilung und sehr gute Zellvitalität im Inneren des Zellträgers nachweisen, was für eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen spricht.

Anhand von immunhistologischen Färbungen gelang außerdem der Nachweis von Kollagen II-haltiger und somit knorpelspezifischer Matrix, was zusammen mit der abgerundeten Zell-

morphologie auf einen differenzierten Status der Chondrozyten schließen ließ. Erste Quantifizierungen der synthetisierten Proteoglykane zeigten zudem, dass im Gelatine-PLGA-Scaffolds innerhalb von zwei Wochen insgesamt mehr extrazelluläre Matrix gebildet wurde als in Ethisorb®-Vliesen. Die hohe Porosität sowie gleichmäßige Porenstruktur scheinen demnach bezüglich der Matrixbildung und -deposition vorteilhafter zu sein als das begrenzte Leervolumen von Vliesstrukturen.

Bei allen Besiedelungsversuchen war allerdings die Ausbildung von Zellakkumulationen in den Gelatine-PLGA-Scaffolds unmittelbar nach der Besiedelung der Konstrukte auffällig, was möglicherweise auf eine verminderte Zelladhäsion an das Trägermaterial zurückzuführen ist. Die Zelladhäsion an Substrate wird normalerweise durch die Bindung von Integrin-Rezeptoren der Zellmembran an spezielle Aminosäuresequenzen der extrazellulären Matrixproteine vermittelt (Lanza *et al.* 2007, Ruoslahti und Pierschbacher 1987). Zu diesen Sequenzen gehört unter anderem das RGD-Motiv (R = Arginin, G = Glyzin, D = Asparaginsäure), welches auch in Gelatine vorkommt und dort für die guten Zelladhäsion-Eigenschaften des Polymers sorgt (Gong *et al.* 2007, Rohanizadeh *et al.* 2008, Ruoslahti und Pierschbacher 1987). Gong *et al.* konnten dementsprechend in besiedelten PLLA-Scaffolds mit Gelatine-Anteil eine höhere Zellzahl und Vitalität nach drei Tagen verzeichnen als in PLLA-Scaffolds ohne Gelatine-Zugabe (Gong *et al.* 2007). Die schlechte initiale Zelladhäsion in den Gelatine-PLGA-Scaffolds ist dagegen vermutlich durch die starke Vernetzung der Gelatine bedingt. Eine vermehrte Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den Aminosäureresten der Gelatine könnte demnach zu einer Reduzierung der Bindungsstellen für die Integrine führen, wodurch sich die Zell-Substrat-Interaktion verringert. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass dieser Effekt nicht langfristig auftritt und trotzdem eine gute Besiedelung der Scaffolds ermöglicht wird. Eventuell könnte eine geringere Vernetzungstemperatur oder -zeitspanne zu einer Verbesserung der Zelladhäsion führen. Alternativ könnten chemische Vernetzungsreagenzien verwendet werden, die die Biokompatibilität nicht oder nur gering beeinflussen, wie z.B. EDC aus der Gruppe der Carbodiimide (Paul und Bailey 2003). Dies kann jedoch auch zu Einbußen bezüglich der chemischen sowie mechanischen Stabilität der Konstrukte führen.

Mit Hilfe der entwickelten Besiedelungsmethode konnte demnach eine gleichmäßige Zellverteilung auf der Scaffold-Oberfläche sowie im Inneren des Materials erreicht werden. Eine gute initiale Besiedelungsdichte für *in vitro* Versuche, welche die Diffusion von Nährstoff- und Stoffwechselprodukten, ausreichende Zell-Zell-Interaktionen, die Differenzierung der

Chondrozyten und die Bildung knorpelspezifischer Matrix gewährleistet, konnte bei etwa 2 Mio Chondrozyten pro Scaffold beobachtet werden. Der Gelatine-PLGA-Scaffold ist dementsprechend aufgrund dieser positiven Ergebnisse bezüglich der *in vitro* Kultivierung ebenso für die Verwendung als Trägermaterial bei der Matrix-assoziierten autologen Chondrozyten-Transplantation (MACT) sowie der Matrix-induzierten autologen Chondrogenese (AMIC) geeignet.

#### 4.4.2 *In vivo* Funktionalitätsstudie

Anhand der durchgeführten Charakterisierungen sowie der *in vitro* Versuche konnten überwiegend positive Ergebnisse bezüglich der Leistungsfähigkeit des Gelatine-PLGA-Scaffolds festgestellt werden. Da aufgrund dieser Ergebnisse jedoch nicht auf die Funktionalität des Materials im Knorpeldefekt geschlossen werden konnte, erfolgten *in vivo* Studien am AO Research Institut (Davos, Schweiz). Dazu wurde jeweils ein osteochondraler Defekt im medialen und lateralen Femur-Rollkamm im rechten Hinterlauf von zehn weiblichen Saanen-Ziegen gesetzt. Die Defekte wurden zusätzlich mit Mikrofrakturierungen versehen, bevor jeweils ein Scaffold randomisiert in einen der beiden Defekte eingesetzt und mit Fibrinkleber fixiert wurde. Im Prüfdefekt wurde demnach das neu entwickelte AMIC-Verfahren angewandt (siehe auch Behrens 2005), während die Kontrolldefekte durch konventionelle Mikrofrakturierung behandelt wurden. Der Vergleich der Knorpelregeneration beider Defekte erfolgte makroskopisch und histologisch nach drei und sechs Monaten. Die histologische Aufbereitung und Auswertung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph Brochhausen am REPAIR-Lab, Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Wie bereits bei der *in vivo* Testung der Biokompatibilität festgestellt wurde, waren auch bei dieser Studie keine schweren Entzündungsreaktionen oder entartete Gewebeveränderungen durch den Scaffold beobachtbar. Bezüglich der makroskopischen Beurteilung konnte nach drei und sechs Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen den Defekten, die nur mit Mikrofraktur behandelt worden sind und den Defekten mit zusätzlich eingesetztem Scaffold festgestellt werden.

Histologisch wurde nach drei Monaten in den Defekten, die mit Scaffold behandelt worden sind, eine deutlich bessere Geweberegeneration, insbesondere des subchondralen Knochens, sowie eine bessere Integration in den angrenzenden nativen Knorpel nachgewiesen. Zudem waren die vermehrte Bildung von hyalinem, gelenktypischem Knorpelgewebe sowie ein geringerer Grad an Neovaskularisation in diesen Präparaten erkennbar. Die Defekte waren jedoch in beiden Gruppen noch nicht vollständig mit Gewebe gefüllt. Nach sechs Monaten

zeigten beide Gruppen eine gute, jedoch immer noch nicht komplette Regeneration mit hyalinartigem Knorpel. Wiederum waren in der Scaffold-Gruppe eine bessere Regeneration des subchondralen Knochens sowie eine stärkere Integration des Regenerats in das ortsständige Gewebe zu verzeichnen. Die Kontrollgruppe zeigte abermals eine vermehrte Ausbildung von Blutgefäßen, die im nativen Knorpelgewebe nicht vorhanden sind und daher als negativ bewertet wurden (Abbildungen siehe Anhang).

Insgesamt konnten demnach durch den Einsatz des Scaffolds einige Vorteile bezüglich der Knorpelregeneration, vor allem im frühen Stadium der Heilung beobachtet werden. Die relativ kurze Resorptionszeit von unter drei Monaten hatte dabei anscheinend keine negativen Effekte auf die Ausbildung eines funktionellen Geweberegenerats. Das endgültig entstandene Gewebe konnte allerdings aufgrund des relativ kurzen Beobachtungszeitraums von sechs Monaten nicht abschließend bewertet werden.

Das bei der Studie angewandte AMIC-Verfahren stellte dabei eine nützliche und kosteneffiziente Behandlungsalternative zu anderen Verfahren wie der autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT) und der matrix-assoziierten autologen Chondrozyten-Transplantation (MACT) dar (siehe Kapitel 1.4).

#### **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Biomaterialien als biologische und biokompatible Werkstoffe haben inzwischen in den unterschiedlichsten Branchen einen hohen Stellenwert. Das mit Abstand größte Segment für den Einsatz von Biomaterialien ist der Gesundheitsmarkt, wobei die Wundversorgung mit Nahtmaterialien, Bioklebern oder Hautäquivalenten mit 65 % den größten Anteil hat. Dem folgt der Orthopädiemarkt mit Knochenersatzmaterialien und *in vitro* gezüchteten Knorpeltransplantaten (Marx 2011). Der Einsatz von resorbierbaren Biomaterialien, die eine dreidimensionale Struktur bieten, birgt dabei enorme Vorteile, wie eine initiale mechanische Stabilität, ein sicheres Handhaben während der Operation, den Einsatz arthroskopischer Techniken und eine sichere Fixierung des Transplantats (Kaps und Sittinger 2011). Aufgrund dieser Vorteile lösen Zellträger zunehmend die bisher verwendeten autogenen und allogenen Transplantate ab (Marx 2011). Trotz eines ständig wachsenden Markts und umfangreicher Forschung weltweit wurde ein optimales Trägermaterial bisher noch nicht gefunden (Chung und Burdick 2008, Hunziker 1999, Hunziker 2002a, Schneider 2003).

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen dreidimensionalen Kompositmaterials, das die Anforderungen an ein Trägermaterial weitest-

gehend erfüllt. Durch das optimierte und kosteneffiziente Herstellungsverfahren ist es dabei gelungen, ein dreidimensionales, gelatinebasiertes Scaffold-System zu erzeugen, dessen gleichmäßige, durchgängige und parallel angeordnete Porenstruktur den Aufbau der tiefen Zone von nativem Knorpelgewebe nachahmt. Aufgrund der Applikation von trockener Hitze konnte das resultierende Gelatinegerüst anschließend gleichzeitig vernetzt und sterilisiert werden, wodurch die Voraussetzung für *in vitro* sowie *in vivo* Anwendungen des Materials geschaffen wurde. Die einzelnen Prozessschritte führten dabei zu keinerlei unerwünschten Verunreinigung oder Kontamination der Proben.

Bei der physikochemischen Charakterisierung der optimierten Gelatine-PLGA-Scaffolds zeigte sich, dass vor allem die Anforderungen an das Trägermaterial bezüglich der Porenstruktur erfüllt wurden. Sowohl Porengröße als auch Porosität der Konstrukte konnten optimal an die Bedürfnisse von Chondrozyten angepasst werden. Durch eine Anpassung der Porenmorphologie an die Ansprüche anderer Zelltypen könnte das Material möglicherweise auch für die Regeneration anderer Gewebedefekte, z.B. der Haut oder der Schleimhaut eingesetzt werden. Aufgrund der durchgehenden, parallel angeordneten Poren ist der Scaffold möglicherweise auch für den Einsatz im Muskel- oder Nervengewebe geeignet.

Die Degradation des Scaffold-Materials *in vitro* war primär von den vorherrschenden Umgebungsbedingungen, insbesondere dem Gehalt an Kollagenasen und dem pH-Wert abhängig. In gepufferten und Kollagenase-freien Umgebungen konnte demnach eine gute Stabilität der Scaffolds festgestellt werden. Untersuchungen zur mechanischen Stabilität der degradierten Proben zeigten erwartungsgemäß mit zunehmendem Masseverlust eine Verringerung der biomechanischen Eigenschaften. Insgesamt blieb jedoch unklar, ob sowohl chemische als auch mechanische Stabilität der Scaffolds für den Einsatz im Knorpeldefekt ausreichend sein würden. Eine optionale Verbesserung beider Parameter könnte z.B. durch Erhöhung des PLGA-Anteils erfolgen (siehe Kapitel 4.2). Allerdings müssten bei Änderungen des Herstellungsverfahrens oder der Rezeptur alle Untersuchungen hinsichtlich einer Zulassung des Materials als Medizinprodukt wiederholt werden.

Im Anschluss an die Charakterisierung der Konstrukte erfolgte die Testung der Zytotoxizität anhand von verschiedenen *in vitro* Methoden. Aufgrund einer signifikant geringeren Anzahl toter Zellen in der Scaffold-Probe konnten im Vergleich zur Kontrolle keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden. Trotzdem wurden Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Zellwachstums, vermutlich bedingt durch die Vernetzung der Gelatine, gefunden. Diese hatten

zwar keinen maßgeblichen Einfluss auf die langfristige Leistungsfähigkeit des Materials als Zellträger, sollten jedoch genauer untersucht werden. Da sich die starke kovalente Vernetzung der Gelatine möglicherweise auch auf die Zelladhärenz auswirkt (siehe Kapitel 4.4.1), könnte alternativ eine chemische Vernetzung durch Carbodiimide untersucht werden. Diese chemischen Vernetzungs-Reagenzien weisen dabei zwar eine bessere Biokompatibilität als beispielsweise Aldehyde auf, könnten aber zu einer geringeren chemischen und mechanischen Stabilität führen.

Durch die nachfolgende subkutane Langzeitimplantation konnte die insgesamt gute Biokompatibilität der Konstrukte bestätigt werden. Zudem wurde im Vergleich zum vliesartigen Kontrollmaterial eine bessere Gewebeintegration, bedingt durch die durchgängige Struktur, festgestellt. Eine geringere Fremdkörperreaktion sowie Reizung des Gewebes durch den Gelatine-PLGA-Scaffold wurde nach der Auswertung der histologischen Präparate gemäß DIN-Norm ebenfalls beobachtet. Dabei wurde ein vollständiger Abbau des Materials ohne Rückstände innerhalb von vier bis acht Wochen festgestellt, so dass abermals fraglich war, ob die Langzeitstabilität der Scaffolds hinreichend für die Anwendung in Knorpeldefekten sei.

Die insgesamt positiven Ergebnisse der *in vitro* Zytotoxizität und der Gewebeverträglichkeit *in vivo* bilden entsprechend der DIN Norm 10993 zusammen mit den Testergebnissen des unabhängigen Prüflabors die Voraussetzung für eine CE-Kennzeichnung der Gelatine-PLGA-Scaffolds.

Die Anwendbarkeit des Gelatine-PLGA-Scaffolds als Zellträger wurde anschließend anhand von verschiedenen *in vitro* Versuchen mit primären Chondrozyten sowie einer *in vivo* Funktionalitätsstudie untersucht. Die verschiedenen *in vitro* Analysen zeigten, dass das Material den Differenzierungsstatus der Chondrozyten aufrecht erhält und eine knorpelspezifische, Kollagen-II-haltige Matrix von den Zellen synthetisiert wird. Initial war dabei meist eine verringerte Zelladhäsion an das Substrat zu beobachten, welche möglicherweise durch die starke Vernetzung des Gelatinegerüsts bedingt war. Dieses Ergebnis konnte zwar bereits nach kurzen Kultivierungszeiträumen nicht mehr festgestellt werden, eine Verbesserung der initialen Adhäsion, möglicherweise durch eine vorhergehende Inkubation mit Serum, wäre jedoch sinnvoll für das Erreichen der bestmöglichen Besiedlungseffizienz.

Für eine zusätzliche Unterstützung der Zelldifferenzierung und der Chondrogenese im Trägermaterial könnten die PLGA-Partikel der Scaffolds durch wirkstoffbeladene Mikrosphären ersetzt werden. Dies würde jedoch den Zulassungsprozess erheblich komplexer gestalten. Auch der Einsatz anderer stimulierender Faktoren, wie z.B. ein geringer Sauerstoffpartial-

druck, eine Kultivierung im Bioreaktor, eine Applikation von hydrostatischem Druck oder eine dynamische Kompression der Proben könnte die Ausbildung eines funktionellen, knorpelartigen Gewebes *in vitro* unterstützen (siehe Chung und Burdick 2008).

Anhand einer weiterführenden *in vivo* Funktionalitätsstudie konnten nach Applikation des Gelatine-PLGA-Scaffolds in einen subchondralen Knorpeldefekt, trotz eines Abbauzeitraums von weniger als drei Monaten, bessere Ergebnisse bezüglich der Geweberegeneration festgestellt werden als in den Kontrolldefekten ohne Trägermaterial. Der Degradationszeitraum und die mechanische Stabilität der Gelatine-PLGA-Scaffolds im Knorpeldefekt schienen demnach ausreichend für den Aufbau eines funktionellen Ersatzgewebes. Die Regeneration war allerdings im gewählten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten noch nicht abgeschlossen, weshalb das endgültig gebildete Gewebe nicht beurteilt werden konnte. Um dies zu verifizieren, sollte jedoch eine längerfristige Beobachtung der Gewebeentwicklung bis zur vollständigen Regeneration erfolgen.

Zusammenfassend erfüllt der entwickelte Gelatine-PLGA-Scaffold einen Großteil der Anforderungen an ein Zellträgermaterial. Die Labor- und Tierversuche der präklinischen Phase zeigten insgesamt positive und vielversprechende Ergebnisse. Einige Aspekte, insbesondere die Auswirkungen der Vernetzungsmethode könnten weitergehend untersucht werden, um die Herstellung gegebenenfalls anzupassen und somit die initiale Zellreaktion auf das Material zu verbessern. Außerdem wäre eine Untersuchung der langfristigen Stabilität und Funktionalität der Scaffolds anhand von weiterführenden tierexperimentellen Studien sinnvoll. Anschließend könnten erste Klinische Studien der Phase I zur Sicherheit und Verträglichkeit sowie der Phase III zum Wirksamkeitsnachweis erfolgen. Die Studien der Phase III sind dabei zusammen mit den Ergebnissen der präklinischen Evaluation Grundlage für einen Zulassungsantrag bei den entsprechenden Behörden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Achilli, M.; Lagueux, J.; Mantovani, D. (2010): On the effects of UV-C and pH on the mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering. In: *Macromol Biosci* 10 (3), S. 307–316.
- Aigner, T.; Hemmel, M.; Neureiter, D.; Gebhard, P. M.; Zeiler, G.; Kirchner, T.; McKenna, L. (2001): Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. In: *Arthritis & Rheumatism* 44 (6), S. 1304-1312.
- Aigner, T.; Eger, W.; Dimmler, A. W. (2003): Morphologie und Biochemie des Gelenkknorpels. In: *Biomaterialien* 4 (1), S. 6–10.
- Amadio, P. C.; Ehrlich, M. G.; Mankin, H. J. (1983): Matrix synthesis in high density cultures of bovine epiphyseal plate chondrocytes. In: *Connect. Tissue Res* 11 (1), S. 11–19.
- Amiel, D.; Coutts, R. D.; Abel, M.; Stewart, W.; Harwood, F.; Akeson, W. H. (1985): Rib perichondrial grafts for the repair of full-thickness articular-cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits. In: *J Bone Joint Surg Am* 67 (6), S. 911–920.
- Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. (2008): Foreign body reaction to biomaterials. In: *Seminars in Immunology* 20 (2), S. 86–100.
- Angele, P. (2004): Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. In: *Biomaterials* 25 (14), S. 2831–2841.
- Arem, A. (1985): Collagen modifications. In: *Clin Plast Surg* 12 (2), S. 209–220.
- Babel, W. (1996): Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer. In: *Chem. Unserer Zeit* 30 (2), S. 86–95.
- Ball, S. T.; Jadin, K.; Allen, R. T.; Schwartz, A. K.; Sah, R. L.; Brage, M. E. (2007): Chondrocyte viability after intra-articular calcaneal fractures in humans. In: *Foot Ankle Int* 28 (6), S. 665–668.
- Banerjee, I.; Mishra, D.; Maiti, T. K. (2009): PLGA Microspheres Incorporated Gelatin Scaffold: Microspheres Modulate Scaffold Properties. In: *International Journal of Biomaterials* 2009, S. 1–9.
- Behrens, P. (2005): Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. In: *Arthroskopie* 18 (3), S. 193–197.
- Benya, P. D.; Shaffer, J. D. (1982): Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. In: *Cell* 30 (1), S. 215–224.
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, S. an (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. In: *Biotechnol Annu Rev* 11, S. 127–152.
- Bhardwaj, T.; Pilliar, R. M.; Grynepas, M. D.; Kandel, R. A. (2001): Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro. In: *J. Biomed. Mater. Res* 57 (2), S. 190–199.
- Billinghurst, R. C.; Dahlberg, L.; Ionescu, M.; Reiner, A.; Bourne, R.; Rorabeck, C.; Mitchell, P.; Hambor, J.; Diekmann, O.; Tschesche, H.; Chen, J.; van Wart, H.; Poole, A. R. (1997): Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. In: *J. Clin. Invest* 99 (7), S. 1534–1545.
- Bobic, V. (1999): Osteochondral autologous graft transplantation in the treatment of focal articular cartilage lesions. In: *Seminars in Arthroplasty* 10 (21-29).

- Bonassar, L. J.; Vacanti, C. A. (1998): Tissue engineering: the first decade and beyond. In: *J. Cell. Biochem. Suppl* 30-31, S. 297–303.
- Bös, L.; Ellermann, A. (2003): Arthroskopische Diagnostik und Klassifikation von Knorpelschäden. Arthroscopic diagnosis and classification of articular cartilage lesions. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (6).
- 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. In: *N. Engl. J. Med* 331 (14), S. 889–895.
- Brittberg, M. (1999): Autologous Chondrocyte Transplantation. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 367, S. S147-S155.
- Bruns, J.; Behrens, P.; Silbermann, M. (1997): Das Prinzip der Transplantation autogenen Rippenperichondriums zur Behandlung von tiefen Gelenkknorpeldefekten. In: *Z Orthop Unfall* 135 (02), S. 138–144.
- Bruns, J.; Steinhagen, J. (2000): Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität – Biologische Grundlagen. Lesions of articular cartilage and osteoarthritis. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2), S. 42–47.
- Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998a): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. In: *Instr Course Lect* 47, S. 477–486.
- Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998b): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. In: *Instr Course Lect* 47, S. 487–504.
- Cahn, F.; Kyriakides, T. R. (2008): Generation of an artificial skin construct containing a non-degradable fiber mesh: a potential transcutaneous interface. In: *Biomed. Mater* 3 (3), S. 34110.
- Caplan, A. I. (1984): Cartilage. In: *Sci. Am* 251 (4), S. 84-7, 90-4.
- Chang, R. W.; Falconer, J.; David Stulberg, S.; Arnold, W. J.; Manheim, L. M.; Dyer, A. R. (1993): A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. In: *Arthritis & Rheumatism* 36 (3), S. 289–296.
- Chen, G.; Wang, W. (2007): Role of Freeze Drying in Nanotechnology. In: *Drying Tech* 25 (1), S. 29–35.
- Choi, Y. (1999): Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. In: *Biomaterials* 20 (5), S. 409–417.
- Chu, C. R.; Douchis, J. S.; Yoshioka, M.; Sah, R. L.; Coutts, R. D.; Amiel, D. (1997): Osteochondral Repair Using Perichondrial Cells: A 1-Year Study in Rabbits. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 340, S. 220–229.
- Chung, C.; Burdick, J. (2008): Engineering cartilage tissue. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2), S. 243–262.
- Cournil-Henrionnet, C.; Huselstein, C.; Wang, Y.; Galois, L.; Mainard, D.; Decot, V.; Netter, P.; Stoltz, J.-F.; Muller, S.; Gillet, P.; Watrin-Pinzano, A. (2008): Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion. In: *Biorheology* 45 (3-4), S. 513–526.
- Deutsche Arthrose-Hilfe e. V. (Hg.) (2011): Wie häufig ist Arthrose? Online verfügbar unter [www.arthrose.de](http://www.arthrose.de), zuletzt geprüft am 23.05.2011.

- DIN-Norm DIN EN ISO 10993-5, November 1999: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 5: Prüfungen auf in vitro-Zytotoxizität. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN-Norm DIN EN ISO 10993-6, August 2007: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- El-Ayoubi, R.; DeGrandpre, C.; DiRaddo, R.; Yousefi, A.-M.; Lavigne, P. (2011): Design and Dynamic Culture of 3D-Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. In: *Journal of Biomaterials Applications* 25 (5), S. 429–444.
- Erggelet, C.; Mandelbaum, B.; Lahm, A. (2000): Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe – Klinische Grundlagen. The therapy of cartilage defects - clinical concepts. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2), S. 48–54.
- Evans, P.; Miniaci, A.; Hurtig, M. (2004): Manual punch versus power harvesting of osteochondral grafts<sup>1</sup>. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 20 (3), S. 306–310.
- Eyre, D. R.; Wu, J. J. (1995): Collagen structure and cartilage matrix integrity. In: *J Rheumatol Suppl* 43, S. 82–85.
- Ficat, R. P.; Ficat, C.; Gedeon, P.; Toussaint, J. B. (1979): Spongialization: A New Treatment for Diseased Patellae. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 144, S. 74–83.
- Freed, L. E.; Marquis, J. C.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Emmanuel, J. (1994a): Composition of cell-polymer cartilage implants. In: *Biotechnol. Bioeng* 43 (7), S. 605–614.
- Freed, L. E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R. J.; Eagles, D. B.; Lesnoy, D. C.; Barlow, S. K.; Langer, R. (1994b): Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. In: *Nat Biotechnol* 12 (7), S. 689–693.
- Friess, W.; Lee, G. (1996): Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. In: *Biomaterials* 17 (23), S. 2289–2294.
- Friess, W. (1998): Collagen – biomaterial for drug delivery. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (2), S. 113–136.
- Gong, Y.; He, L.; Li, J.; Zhou, Q.; Ma, Z.; Gao, C.; Shen, J. (2007): Hydrogel-filled polylactide porous scaffolds for cartilage tissue engineering. In: *J. Biomed. Mater. Res* 82B (1), S. 192–204.
- Göpferich, A. (1996): Mechanisms of polymer degradation and erosion. In: *Biomaterials* 17 (2), S. 103–114.
- Gosset, M.; Berenbaum, F.; Thirion, S.; Jacques, C. (2008): Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. In: *Nat Protoc* 3 (8), S. 1253–1260.
- Grad, S.; Zhou, L.; Gogolewski, S.; Alini, M. (2003): Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: A biochemical evaluation. In: *J. Biomed. Mater. Res* 66A (3), S. 571–579.
- Grande, D. A.; Pitman, M. I.; Peterson, L.; Menche, D.; Klein, M. (1989): The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. In: *J. Orthop. Res* 7 (2), S. 208–218.
- Gray, M. L.; Pizzanelli, A. M.; Grodzinsky, A. J.; Lee, R. C. (1988): Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. In: *J. Orthop. Res* 6 (6), S. 777–792.

- Griffon, D.; Sedighi, M.; Schaeffer, D.; Eurell, J.; Johnson, A. (2006): Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. In: *Acta Biomaterialia* 2 (3), S. 313–320.
- Grigolo, B. (2005): Molecular and Immunohistological Characterization of Human Cartilage Two Years Following Autologous Cell Transplantation. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* 87 (1), S. 46–57.
- Gutiérrez, M. C.; Ferrer, M. L.; del Monte, F. (2008): Ice-Templated Materials: Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing and Ice-Segregation-Induced Self-Assembly. In: *Chem. Mater* 20 (3), S. 634–648.
- Hangody, L.; Kish, G.; Karpati, Z.; Szerb, I.; Udvarhelyi, I.; Udvarhelyi, I. (1997): Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 5 (4), S. 262–267.
- Hangody, L.; Ráthonyi, G. K.; Duska, Z.; Vásárhelyi, G.; Füles, P.; Módis, L. (2004): Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. In: *J Bone Joint Surg Am* 86-A Suppl 1, S. 65–72.
- Hardmeier, R.; Redl, H.; Marlovits, S. (2010): Effects of mechanical loading on collagen propeptides processing in cartilage repair. In: *J Tissue Eng Regen Med* (4), S. 1–11.
- Harper, E.; Berger, A.; Katchalski, E. (1972): The hydrolysis of poly (L-prolyl-glycyl-L-prolyl) by bacterial collagenase. In: *Biopolymers* 11 (8), S. 1607–1612.
- Haugh, M. G.; Jaasma, M. J.; O'Brien, F. J. (2009): The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. In: *J Biomed Mater Res A* 89 (2), S. 363–369.
- Holland, T.; Tabata, Y.; Mikos, A. (2005): Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. In: *Journal of Controlled Release* 101 (1-3), S. 111–125.
- Hollister, S. (2002): Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. In: *Biomaterials* 23 (20), S. 4095–4103.
- Hong, S. R.; Chong, M. S.; Lee, S. B.; Lee, Y. M.; Song, K. W.; Park, M. H.; Hong, S. H. (2004): Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. In: *J biomater sci polym ed* 15 (2), S. 201–214.
- Horas, U.; Pelinkovic, D.; Herr, G.; Aigner, T.; Schnetzler, R. (2003): Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint: A Prospective, Comparative Trial. In: *J Bone Joint Surg Am* 85 (2), S. 185–192.
- Huang, C. C.-Y.; Reuben, P. M.; D'Ippolito, G.; Schiller, P. C.; Cheung, H. S. (2004): Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. In: *Anat. Rec* 278A (1), S. 428–436.
- Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. (2005): In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. In: *Biomaterials* 26 (36), S. 7616–7627.
- Hubbard, M. J. (1996): Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. In: *J Bone Joint Surg Br* 78 (2), S. 217–219.
- Hunt, S. A.; Jazrawi, L. M.; Sherman, O. H.: Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. In: *J Am Acad Orthop Surg* 10 (5), S. 356–363.

- Hunziker, E. (2002b): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (7), S. 564–572.
- Hunziker, E. (1999): Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? In: *Osteoarthritis and Cartilage* 7 (1), S. 15–28.
- Hunziker, E. B. (2002a): Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. In: *Osteoarthr. Cartil* 10 (6), S. 432–463.
- Hutmacher, D. W.; Schantz, T.; Zein, I.; Ng, K. W.; Teoh, S. H.; Tan, K. C. (2001): Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. In: *J. Biomed. Mater. Res* 55 (2), S. 203–216.
- Insall, J. (1974): The Pridie Debridement Operation for Osteoarthritis of the Knee. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 101, S. 61–67.
- Iwasa, J.; Ochi, M.; Uchio, Y.; Katsube, K.; Adachi, N.; Kawasaki, K. (2003): Effects of Cell Density on Proliferation and Matrix Synthesis of Chondrocytes Embedded in Atelocollagen Gel. In: *Artificial Organs* 27 (3), S. 249–255.
- Jadin, K. D. (2005): Depth-varying Density and Organization of Chondrocytes in Immature and Mature Bovine Articular Cartilage Assessed by 3D Imaging and Analysis. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53 (9), S. 1109–1119.
- Jakob, R. P.; Franz, T.; Gautier, E.; Mainil-Varlet, P. (2002): Autologous Osteochondral Grafting in the Knee: Indication, Results, and Reflections. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 401, S. 170–184.
- Johnson, H. J.; Northup, S. J.; Seagraves, P. A.; Atallah, M.; Garvin, P. J.; Lin, L.; Darby, T. D. (1985): Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro II. Objective methods of toxicity assessment. In: *J. Biomed. Mater. Res* 19 (5), S. 489–508.
- Johnson, L. L. (2001): Arthroscopic Abrasion Arthroplasty: A Review. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391, S. S306–S317.
- Kang, S.-W.; Yoo, S. P.; Kim, B.-S. (2007): Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. In: *Biomed Mater Eng* 17 (5), S. 269–276.
- Kaps, C.; Sittinger, M. (2011): Neue Therapien zur Regeneration des Gelenkknorpels. In: Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) BioTOP Berlin-Brandenburg (Hg.): Technologiereport. Regenerative Medizin in Berlin-Brandenburg, S. 38–40.
- Knippers, Rolf (op. 2006): Molekulare Genetik. 9., komplett überarbeitete Aufl. Stuttgart ; New York: G. Thieme; ISBN 9783134770094.
- Knudson, C.; Knudson, W. (2001): Cartilage proteoglycans. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12 (2), S. 69–78.
- Knutsen, G.; Engebretsen, L.; Ludvigsen, T. C.; Drogset, J. O.; Grontvedt, T.; Solheim, E.; Strand, T.; Roberts, S.; Isaksen, V.; Johansen, O. (2004): Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. A Randomized Trial. In: *J Bone Joint Surg Am* 86 (3), S. 455–464.
- Kohn, D. H.; Sarmadi, M.; Helman, J. I.; Krebsbach, P. H. (2002): Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone. In: *J. Biomed. Mater. Res* 60 (2), S. 292–299.

- Kuberka, M.; Heschel, I.; Glasmacher, B.; Rau, G. (2004): Herstellung resorbierbarer Kollagenscaffolds für das Tissue Engineering. In: *Biomaterialien* 5 (4).
- Kuettner, K. E. (1982): Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. In: *The Journal of Cell Biology* 93 (3), S. 751–757.
- Lanza, R. P.; Langer, Robert S.; Vacanti, Joseph (2007): Principles of tissue engineering. 3rd. Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press; ISBN 978-0-12-370615-7.
- Lau, C. U. (2005): Biologische und physikochemische Charakterisierung sowie 3D-Wachstum von Zellen auf Matrices aus nativem Kollagen für den Einsatz in der Medizin. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften.
- Lavik, E.; Langer, R. (2004): Tissue engineering: current state and perspectives. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (1).
- Lee, C. (2001): Biomedical applications of collagen. In: *International Journal of Pharmaceutics* 221 (1-2), S. 1–22.
- Lee, S.; Kim, Y.; Chong, M.; Hong, S.; Lee, Y. (2005): Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. In: *Biomaterials* 26 (14), S. 1961–1968.
- Lien, S.; Ko, L.; Huang, T. (2009): Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. In: *Acta Biomaterialia* 5 (2), S. 670–679.
- Lien, S.-M.; Ko, L.-Y.; Huang, T.-J. (2010): Effect of crosslinking temperature on compression strength of gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. In: *Materials Science and Engineering: C* 30 (4), S. 631–635.
- Linn, F. C.; Sokoloff, L. (1965): Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. In: *Arthritis & Rheumatism* 8 (4), S. 481–494.
- Liu, J.; Meisner, D.; Kwong, E.; Wu, X.; Johnston, M. (2007): A novel trans-lymphatic drug delivery system: Implantable gelatin sponge impregnated with PLGA–paclitaxel microspheres. In: *Biomaterials* 28 (21), S. 3236–3244.
- Liu, J. (2006): Physical Characterization of Pharmaceutical Formulations in Frozen and Freeze-Dried Solid States: Techniques and Applications in Freeze-Drying Development. In: *Pharmaceutical Development and Technology* 11 (1), S. 3–28.
- LiVecchi, A. B.; Tombes, R. M.; LaBerge, M. (1994): In vitro chondrocyte collagen deposition within porous HDPE: Substrate microstructure and wettability effects. In: *J. Biomed. Mater. Res* 28 (8), S. 839–850.
- Livesley, P. J.; Doherty, M.; Needoff, M.; Moulton, A. (1991): Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. In: *J Bone Joint Surg Br* 73-B (6), S. 922–926.
- Loty, S.; Foll, C.; Forest, N.; Sautier, J.-M. (2000): Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of rat nasal septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation. In: *Arch Oral Biol* 45 (10), S. 843–856.
- Madhally, S. (1999): Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. In: *Biomaterials* 20 (12), S. 1133–1142.

- Mahmoudifar, N.; Doran, P. M. (2005): Tissue engineering of human cartilage in bioreactors using single and composite cell-seeded scaffolds. In: *Biotechnol. Bioeng* 91 (3), S. 338–355.
- Mankin, H. J. (1982): The response of articular cartilage to mechanical injury. In: *J Bone Joint Surg Am* 64 (3), S. 460–466.
- Maquet, V.; Jerome, R. (1997): Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation. In: *MSF* 250, S. 15–42.
- Marlovits, S.; Hombauer, M.; Truppe, M.; Vécsei, V.; Schlegel, W. (2004a): Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 86 (2), S. 286–295.
- Marlovits, S.; Kutscha-Lissberg, F.; Aldrian, S.; Resinger, C.; Singer, P.; Zeller, P.; Vécsei, V. (2004b): Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks Techniken und Ergebnisse. In: *Radiologe* 44 (8), S. 763–772.
- Marlovits, S.; Zeller, P.; Singer, P.; Resinger, C.; VECSEI, V. (2006): Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. In: *European Journal of Radiology* 57 (1), S. 24–31.
- Martinek, V. (2003): Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (6), S. 166–170.
- Marx, U. (2011): Aktuelle Markttrends für Biomaterialien. In: Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) BioTOP Berlin-Brandenburg (Hg.): Technologiereport. Regenerative Medizin in Berlin-Brandenburg, S. 86–88.
- Mikos, A. G.; Sarakinos, G.; Vacant, J. P.; Longer, R. S.; Cima, L. G. (1993): Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures am 01.02.1993. Anmeldenr: 12270. Veröffentlichungsnr: 5514378
- Mitchell, N.; Shepard, N. (1976): The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. In: *J Bone Joint Surg Am* 58 (2), S. 230–233.
- Mitchell, N.; Lee, E. R.; Shepard, N. (1992): The clones of osteoarthritic cartilage. In: *J Bone Joint Surg Br* 74-B (1), S. 33–38.
- Mithoefer, K. (2006): Chondral Resurfacing of Articular Cartilage Defects in the Knee with the Microfracture Technique. Surgical Technique. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* 88 (Suppl 1 Part 2), S. 294–304.
- Mohr, W. (1986): Pathomorphologische Aspekte zur konservativen Therapie der Arthrose. In: *Orthopäde* 15, S. 366–378.
- Mooney, D. (1996): Novel approach to fabricate porous sponges of poly(?-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. In: *Biomaterials* 17 (14), S. 1417–1422.
- Morton, D. B. (1997): A scheme for the recognition and assessment of adverse effects in animals. In: L. F. M. van Zutphen und Michael Balls (Hg.): Animal alternatives, welfare, and ethics. Proceedings of the 2nd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, held in Utrecht, the Netherlands, 20-24 October 1996. Amsterdam; New York: Elsevier, S. 235–240, zuletzt geprüft am 20.02.2011.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J. Immunol. Methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Mow, V. C.; Holmes, M. H.; Michael Lai, W. (1984): Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. In: *Journal of Biomechanics* 17 (5), S. 377–394.

- Muyonga, J. (2004): Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). In: *Food Chemistry* 86 (3), S. 325–332.
- Netuschil, L.; Reich, E.; Brex, M. (1989): Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. In: *J. Clin. Periodontol* 16 (8), S. 484–488.
- Noyes, F. R.; Bassett, R. W.; Grood, E. S.; Butler, D. L. (1980): Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. In: *J Bone Joint Surg Am* 62 (5), S. 687–695.
- Oetjen, Georg-Wilhelm; Haseley, Peter (2004): Freeze-drying. 2nd, completely rev. and extended ed. Weinheim: Wiley-VCH; ISBN 352730620x.
- O'Driscoll, S. W. (1999): Articular Cartilage Regeneration Using Periosteum. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 367, S. S186-S203.
- Oh, S.; Park, I.; Kim, J.; Lee, J. (2007): In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. In: *Biomaterials* 28 (9), S. 1664–1671.
- Otte, P. (1983): Ätiologische und pathogenetische Vorstellungen bei der Arthrose. In: *Z Rheumatol* 42, S. 242–248.
- Outerbridge, R. E. (1961): The Etiology Of Chondromalacia Patellae. In: *J Bone Joint Surg Br* 43 (4), S. 752–757.
- Paul, R. G.; Bailey, A. J. (2003): Chemical Stabilisation of Collagen as a Biomimetic. In: *TheScientificWorldJOURNAL* 3, S. 138–155.
- Pavesio, A.; Abatangelo, G.; Borrione, A.; Brocchetta, D.; Hollander, A. P.; Kon, E.; Torasso, F.; Zanasi, S.; Marcacci, M. (2008): Hyaluronan-Based Scaffolds (Hyalograft® C) in the Treatment of Knee Cartilage Defects: Preliminary Clinical Findings. In: *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: John Wiley & Sons, Ltd*, S. 203-217.
- Payne, K. J.; Veis, A. (1988): Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. In: *Biopolymers* 27 (11), S. 1749–1760.
- Pelttari, K.; Wixmerten, A.; Martin, I. (2009): Do we really need cartilage tissue engineering? In: *Swiss Med Wkly* 139 (41-42), S. 602–609.
- Peterson, L.; Brittberg, M.; Kiviranta, I.; Åkerlund, E. L.; Lindahl, A. (2002): Autologous Chondrocyte Transplantation. Biomechanics and Long-Term Durability. In: *The American Journal of Sports Medicine* 30 (1), S. 2–12.
- Peterson, L.; Minas, T.; Brittberg, M.; Nilsson, A.; Sjögren-Jansson, E.; Lindahl, A. (2000): Two- to 9-Year Outcome After Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 374, S. 212–234.
- Poole, A. R. (2003): What Type of Cartilage Repair Are We Attempting to Attain? In: *J Bone Joint Surg Am* 85 (suppl\_2), S. 40–44.
- Poole, C. A. (1997): Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. In: *J Anatomy* 191 (1), S. 1–13.
- Pridie, K. H. (1959): A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. In: *J Bone Joint Surg Br* 41, S. 618–619.

- Pulieri, E.; Chiono, V.; Ciardelli, G.; Vozzi, G.; Ahluwalia, A.; Domenici, C.; Vozzi, F.; Giusti, P. (2008): Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. In: *J. Biomed. Mater. Res* 86A (2), S. 311–322.
- Qian, L.; Zhang, H. (2011): Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol* 86 (2), S. 172–184.
- Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K. M.; Butler, P. E.; Seifalian, A. M. (2007): Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. In: *Biotechnol. Appl. Biochem* 46 (2), S. 73.
- Redman, S. N.; Oldfield, S. F.; Archer, C. W. (2005): Current strategies for articular cartilage repair. In: *Eur Cell Mater* 9, S. 23–32.
- Roberts, S.; McCall, I. W.; Darby, A. J.; Menage, J.; Evans, H.; Harrison, P. E.; Richardson, J. B. (2003): Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. In: *Arthritis Res Ther* 5 (1), S. R60.
- Rohanizadeh, R.; Swain, M. V.; Mason, R. S. (2008): Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts. In: *J Mater Sci: Mater Med* 19 (3), S. 1173–1182.
- Roth, V.; Mow, V. C. (1980): The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. In: *J Bone Joint Surg Am* 62 (7), S. 1102–1117.
- Rotman, B.; Papermaster, B. W. (1966): Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55 (1), S. 134–141.
- Roughley, P. J.; Lee, E. R. (1994): Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. In: *Microsc. Res. Tech* 28 (5), S. 385–397.
- Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. (1987): New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. In: *Science* 238 (4826), S. 491–497.
- Sachlos, E.; Czernuszka, J. T. (2003): Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. In: *Eur Cell Mater* 5, S. 29-39; discussion 39-40.
- Sanford, K. K.; Earle, W. R.; Likely, G. D. (1948): The growth in vitro of single isolated tissue cells. In: *J. Natl. Cancer Inst* 9 (3), S. 229–246.
- Schatt, Werner (1996): *Werkstoffwissenschaft*. 8., neu bearb. Stuttgart: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie; ISBN 3-342-00675-7.
- Schmidt, C. (2000): Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. In: *Biomaterials* 21 (22), S. 2215–2231.
- Schneider, U. (2003): Perspektiven des Tissue Engineerings am Gelenkknorpel. In: *Akt Rheumatol* 28 (06), S. 322–327.
- Schneider, U.; Breusch, S.; Mark, K. von der (1999): Aktueller Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation. In: *Z Orthop Unfall* 137 (05), S. 386–392.
- Schoof, H.; Apel, J.; Heschel, I.; Rau, G. (2001): Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. In: *J. Biomed. Mater. Res* 58 (4), S. 352–357.
- Schulze-Tanzil, G.; Souza, P.; Castrejon, H.; John, T.; Merker, H.-J.; Scheid, A.; Shakibaei, M. (2002): Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. In: *Cell and Tissue Research* 308 (3), S. 371–379.

- Schulze-Tanzil, G. (2009): Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 191 (4), S. 325–338.
- Schumacher, B. L.; Su, J.-L.; Lindley, K. M.; Kuettner, K. E.; Cole, A. A. (2002): Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. In: *Anat. Rec* 266 (4), S. 241–248.
- Seal, B. (2001): Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. In: *Materials Science and Engineering: R: Reports* 34 (4-5), S. 147–230.
- Sgaglione, N. (2005): Biologic Approaches to Articular Cartilage Surgery: Future Trends. In: *Orthopedic Clinics of North America* 36 (4), S. 485–495.
- Sgaglione, N. A. (2003): Decision-Making and Approach to Articular Cartilage Surgery. In: *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 11 (3), S. 192–201.
- Shahin, K.; Doran, P. M. (2011): Improved seeding of chondrocytes into polyglycolic acid scaffolds using semi-static and alginate loading methods. In: *Biotechnol Progress* 27 (1), S. 191–200.
- Sheu, M. (2001): Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. In: *Biomaterials* 22 (13), S. 1713–1719.
- Sionkowska, A.; Skopinska-Wisniewska, J.; Gawron, M.; Kozłowska, J.; Planecka, A. (2010): Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 47 (4), S. 570–577.
- Sommer, Karl (1990): *Der Mensch. Anatomie, Physiologie, Ontogenie*. 11. Aufl. Berlin: Volk und Wissen; ISBN 3-06-012542-2.
- Srivastava, V. M.; MaleMud, C. J.; Sokoloff, L. (1974): Chondroid expression by lapine articular chondrocytes in spinner culture following monolayer growth. In: *Connect. Tissue Res* 2 (2), S. 127–136.
- Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Singleton, S. B.; Briggs, K. K. (1997): Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. In: *Operative Techniques in Orthopaedics* 7 (4), S. 300–304.
- Steadman, J.; Briggs, K.; Rodrigo, J.; Kocher, M.; Gill, T.; Rodkey, W. (2003): Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 19 (5), S. 477–484.
- Sung, H. W.; Huang, D. M.; Chang, W. H.; Huang, R. N.; Hsu, J. C. (1999): Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. In: *J. Biomed. Mater. Res* 46 (4), S. 520–530.
- Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. (1993): Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. In: *Biochemistry* 32 (2), S. 389–394.
- Tan, H.; Wu, J.; Lao, L.; Gao, C. (2009): Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. In: *Acta Biomaterialia* 5 (1), S. 328–337.
- Thiem, A.; Lum, V.; Grupp, R.; Riesemeier, H.; Bordia, R.; Schubert, H.; Zehbe, R. (2010): Synchrotron  $\mu$ CT Investigation of the Collapsing Pore-Network of Gelatin Scaffolds under Compression. In: *AMR* 89-91, S. 551–555.

- Tins, B. J.; McCall, I. W.; Takahashi, T.; Cassar-Pullicino, V.; Roberts, S.; Ashton, B.; Richardson, J. (2005): Autologous Chondrocyte Implantation in Knee Joint: MR Imaging and Histologic Features at 1-year Follow-up. In: *Radiology* 234 (2), S. 501–508.
- Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guerin, P. (1992): Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. In: *J Mater Sci: Mater Med* 3 (6), S. 432–446.
- Vert, M.; Mauduit, J.; Li, S. (1994): Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. In: *Biomaterials* 15 (15), S. 1209–1213.
- Vinall, R. (2002): Regulation of Articular Chondrocyte Phenotype by Bone Morphogenetic Protein 7, Interleukin 1, and Cellular Context Is Dependent on the Cytoskeleton. In: *Experimental Cell Research* 272 (1), S. 32–44.
- Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L. E.; Biron, R. J.; Langer, R. (1996): Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. In: *AIChE J* 42 (3), S. 850–860.
- Wake, MC; Patrick, CW Jr; Mikos, AG (1994): Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. In: *Cell Transplant* 3 (4), S. 339–343.
- Ward, A.G; Courts, A. (1977): The science and technology of gelatine. London [etc.]: Academic Press; ISBN 0127350500.
- Watt, F. M. (1988): Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. In: *J. Cell. Sci* 89 (Pt 3), S. 373–378.
- Weadock, K. S.; Miller, E. J.; Bellincampi, L. D.; Zawadsky, J. P.; Dunn, M. G. (1995): Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. In: *J. Biomed. Mater. Res* 29 (11), S. 1373–1379.
- Weadock, K.; Olson, R. M.; Silver, F. H. (1983): Evaluation of Collagen Crosslinking Techniques. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 11 (4), S. 293–318.
- Weng, L.; Pan, H.; Chen, W. (2008): Self-crosslinkable hydrogels composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin: In vitro and in vivo responses. In: *J. Biomed. Mater. Res* 85A (2), S. 352–365.
- Wess, T. (2000): Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. In: *Thermochimica Acta* 365 (1-2), S. 119–128.
- Wintermantel, Erich; Ha, Suk-Woo (2008): Medizintechnik. Life Science Engineering ; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Business. 4. überarbeitete und erw. Berlin: Springer; ISBN 978-3-540-74924-0.
- Wu, L.; Ding, J. (2005): Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. In: *J. Biomed. Mater. Res* 75A (4), S. 767–777.
- Xia, W.; Liu, W.; Cui, L.; Liu, Y.; Zhong, W.; Liu, D.; Wu, J.; Chua, K.; Cao, Y. (2004): Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. In: *J. Biomed. Mater. Res* 71B (2), S. 373–380.
- Yannas, I. V.; Tobolsky, A. V. (1967): Cross-linking of gelatine by dehydration. In: *Nature* 215 (5100), S. 509–510.
- Zehbe, R.; Haibel, A.; Riesemeier, H.; Gross, U.; Kirkpatrick, C. J.; Schubert, H.; Brochhausen, C. (2009): Going beyond histology. Synchrotron micro-computed tomography as a methodology for biological tissue characterization: from tissue morphology to individual cells. In: *Journal of The Royal Society Interface* 7 (42), S. 49–59.

Zehbe, R.; Thiem Annette; Schubert, H.; Lum, V. (2010): Verfahren zur Herstellung eines biokompatiblen und abbaubaren Kompositmaterials, das danach erhältliche Kompositmaterial sowie dessen Verwendung als Medizinprodukt. Angemeldet durch Dritte Patentportfolio Beteiligungsgesellschaft mbH & CO. KG am 13.08.2010. Anmeldenr: WO2010EP61846. Veröffentlichungsnr: WO 2011018520 (A2).

Zehbe, R.-D.; Schubert, H. (2004): Hydrogelhaltiges Kompositmaterial, hergestellt durch elektrisch-ausgelöste Präzipitation einer Festphase. Angemeldet durch Dritte Patentportfolio Beteiligungsgesellschaft mbH & CO. KG am 05.11.2004. Anmeldenr: WO2004EP12564. Veröffentlichungsnr: WO 2005044325 (A1).

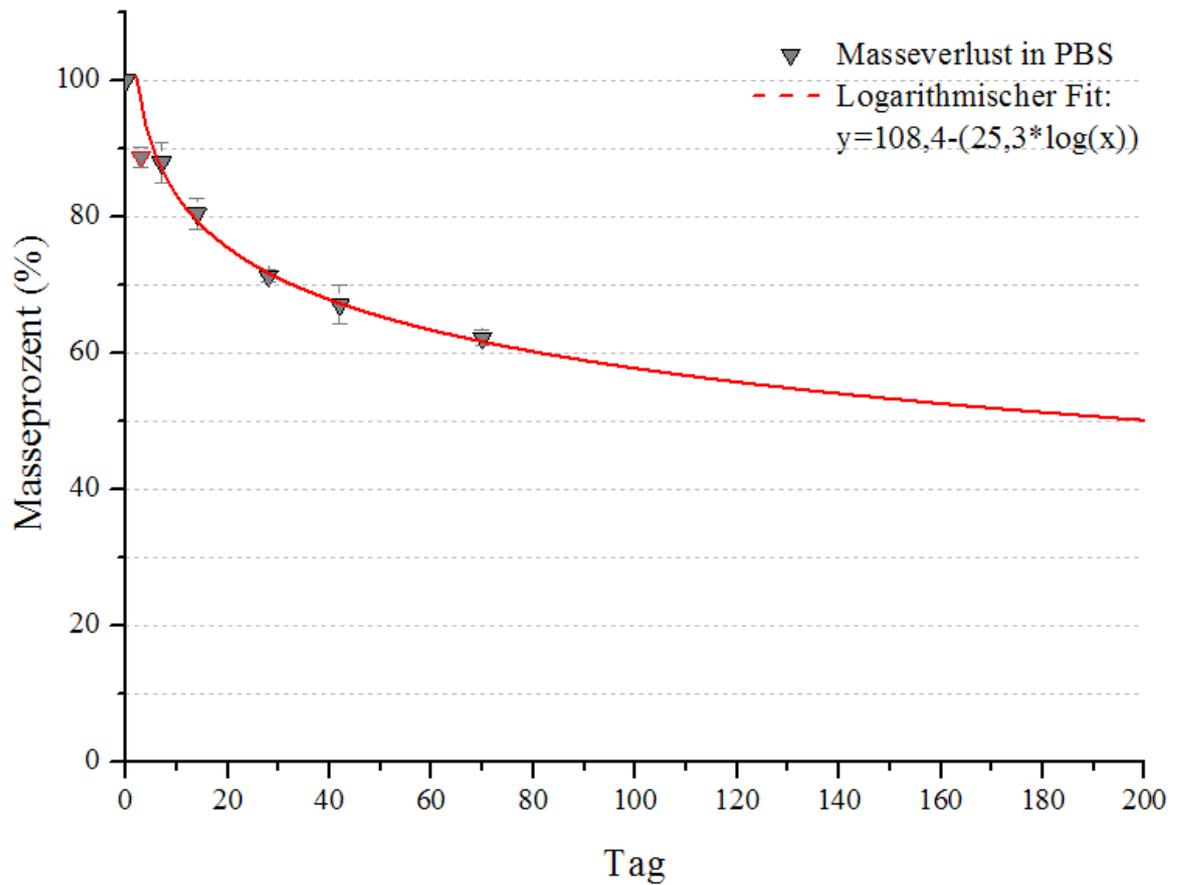
Zeltinger, J.; Sherwood, J. K.; Graham, D. A.; Mueller, R.; Griffith, L. G. (2001): Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. In: *Tissue Engineering* 7 (5), S. 557–572.

Zhang, Y.; Chai, G.; Liu, W.; Zhou, G.-d.; Cui, L.; Cao, Y.-l. (2007): [Microarray analysis of dedifferentiation related gene expression of human chondrocytes cultured in vitro]. In: *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 23 (4), S. 331–334.

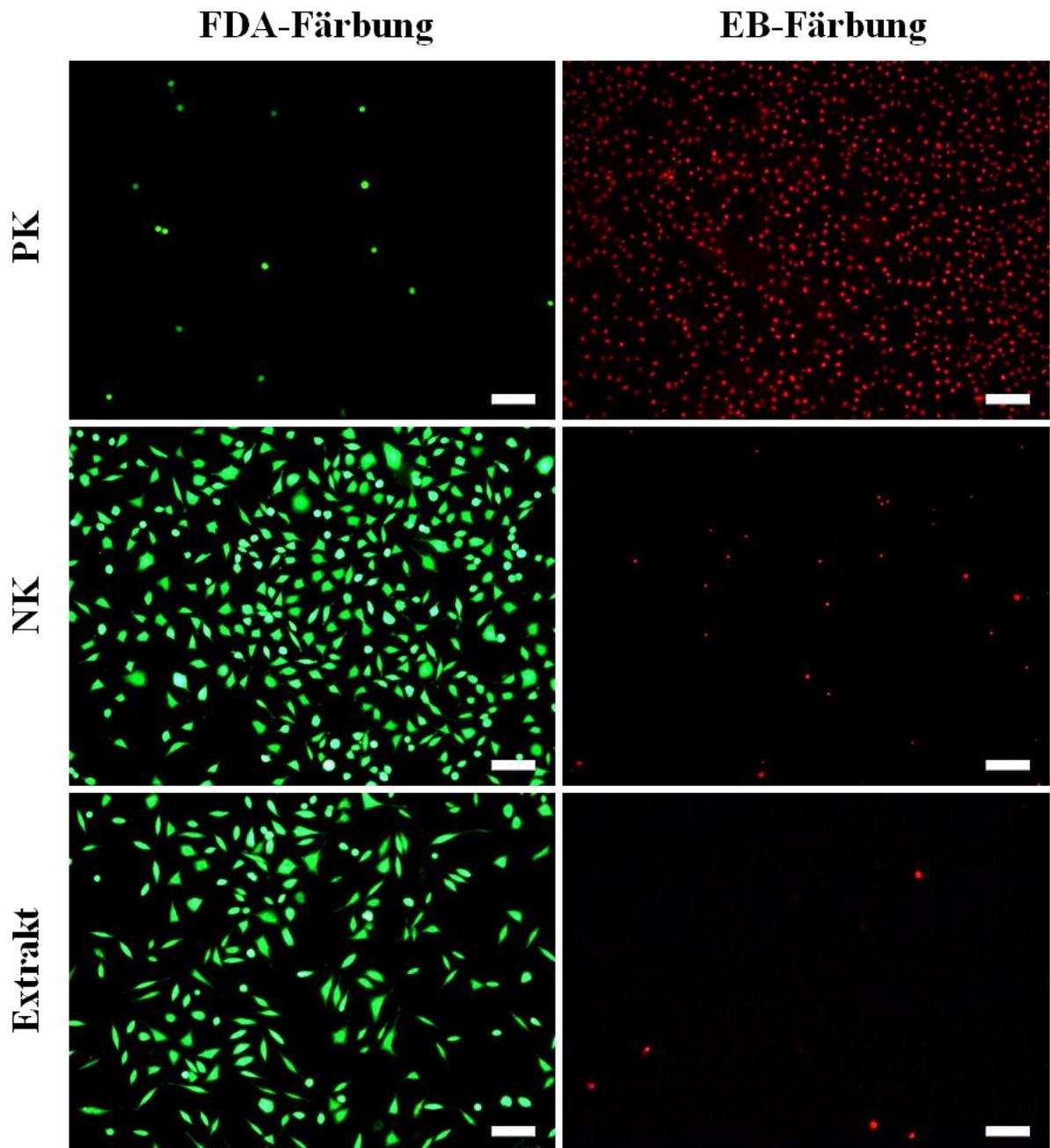
Ziats, N.; Miller, K.; Anderson, J. (1988): In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. In: *Biomaterials* 9 (1), S. 5–13.

## 6 Anhang

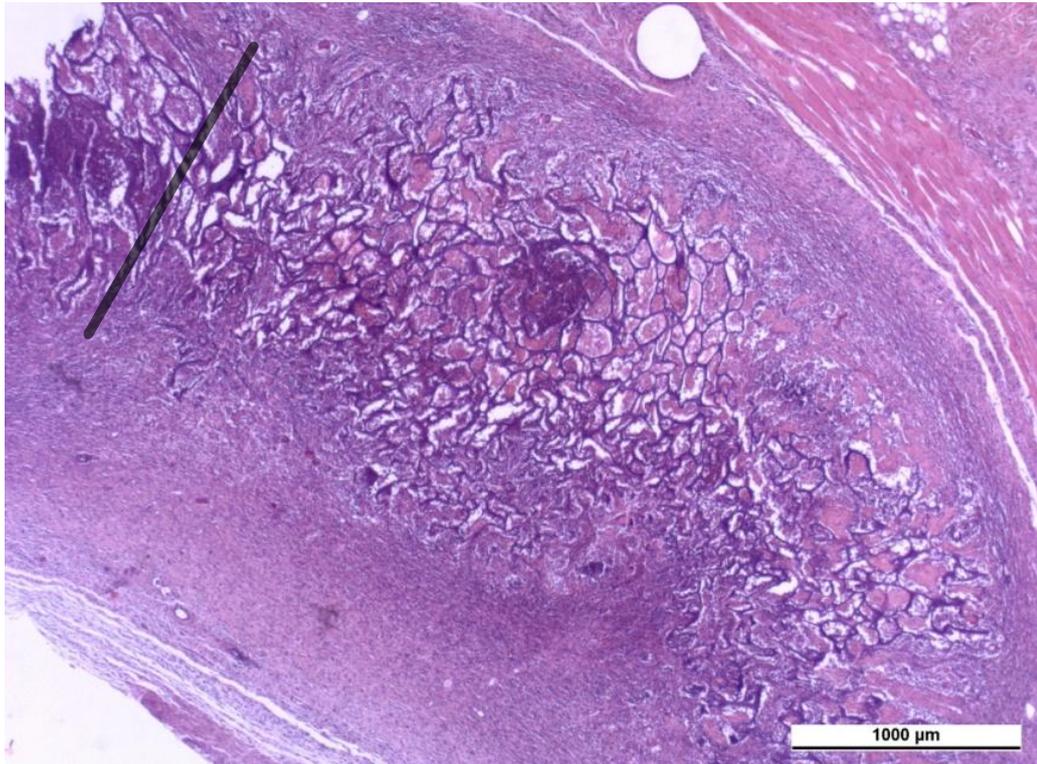
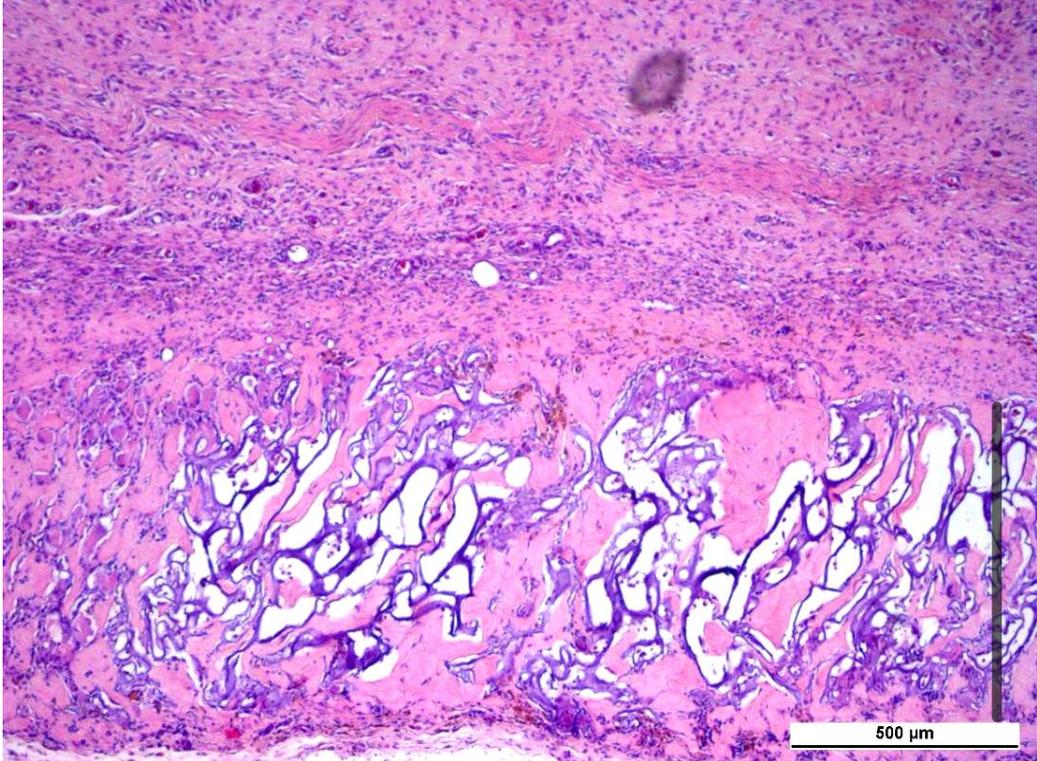
|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| Abbildung 34: | Logarithmische Kurvenanpassung an den Degradationsverlauf der Gelatine-PLGA-Scaffolds in gepufferter Abbaulösung (PBS).   | 118 |
| Abbildung 35: | Mikroskopische Aufnahmen der FDA/EB-Vitalfärbung von L929-Fibroblastenzellen nach der Inkubation mit dem Extrakt der Gelatine-PLGA-Scaffolds.                               | 119 |
| Abbildung 36: | Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.  | 120 |
| Abbildung 37: | Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Ethisorb® 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.   | 121 |
| Abbildung 38: | Zellmorphologie von primären Chondrozyten nach einem Tag und einer Woche auf dem Gelatine-PLGA-Scaffold.  | 123 |
| Abbildung 39: | Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II in besiedelten Gelatine-PLGA- sowie Ethisorb®-Konstrukten nach 2 Tagen, einer Woche und 2 Wochen.                              | 124 |
| Abbildung 40: | Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten <i>in vivo</i> (H&E-Färbung).   | 125 |
| Abbildung 41: | Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten <i>in vivo</i> (Alzianblau-Färbung).                                      | 126 |
| Tabelle 4:    | Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 2 Wochen. | 122 |
| Tabelle 5:    | Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 4 Wochen. | 122 |



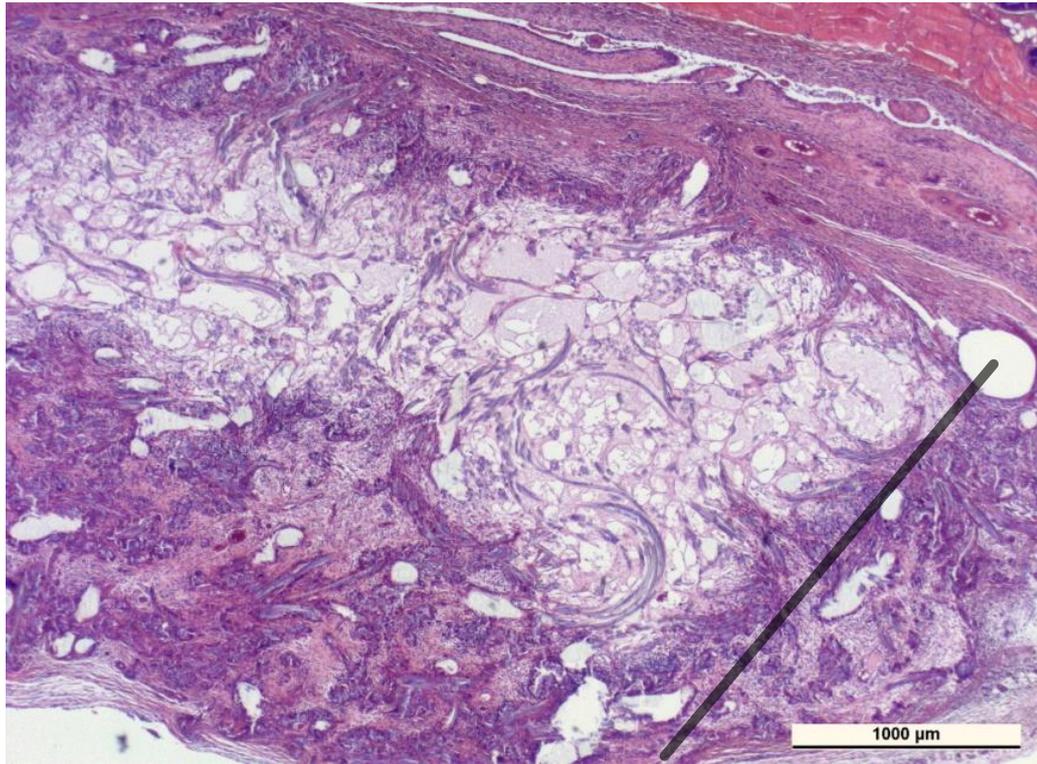
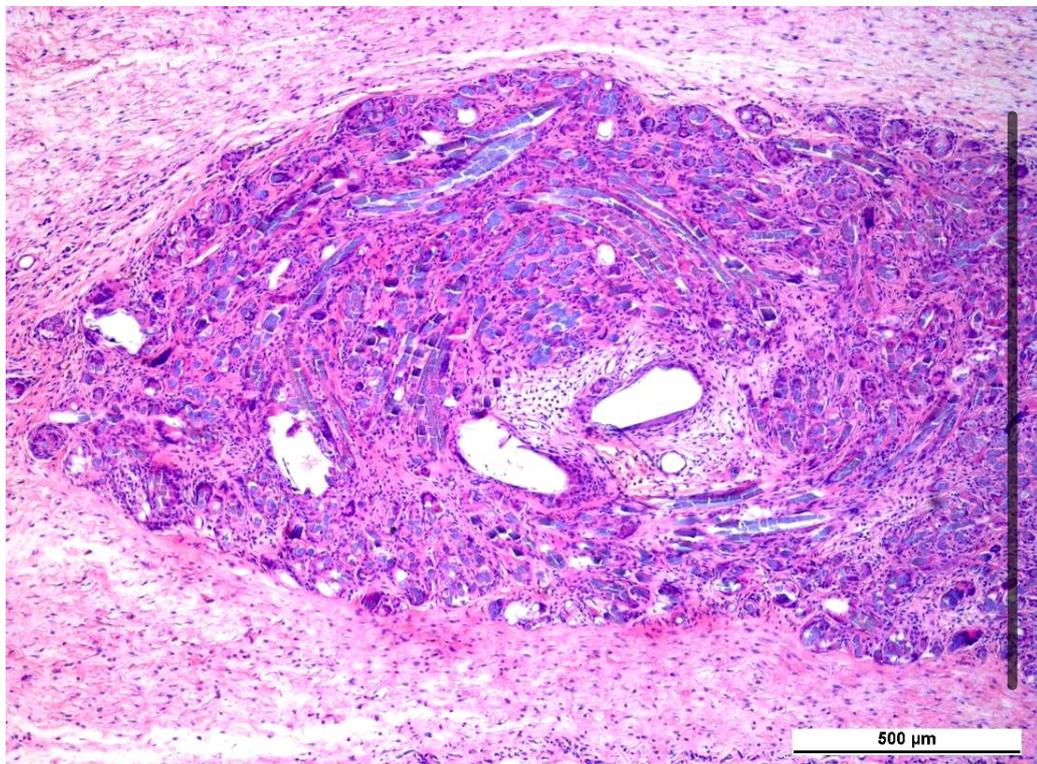
**Abbildung 34: Logarithmische Kurvenanpassung an den Degradationsverlauf der Gelatine-PLGA-Scaffolds in gepufferter Abbaulösung (PBS).** Der zweite Messwert wurde aus der Berechnung ausgeschlossen. Ergänzende Darstellung zu Abbildung 19.



**Abbildung 35:** Mikroskopische Aufnahmen der FDA/EB-Vitalfärbung von L929-Fibroblastenzellen nach der Inkubation mit dem Extrakt der Gelatine-PLGA-Scaffolds. Fibroblasten wurden nach 24stündiger Inkubation mit dem Scaffold-Extrakt sowie mit Positiv- und Negativkontrolle (PK, NK) mit FDA/EB gefärbt. Vitale Zellen fluoreszieren grün, tote Zellen rot (Maßstab: 100  $\mu$ m). Ergänzende Darstellung zu Abbildung 22.

Gelatine-PLGA-Scaffold nach 2 Wochen *in vivo*Gelatine-PLGA-Scaffold nach 4 Wochen *in vivo*

**Abbildung 36: Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Gelatine-PLGA-Scaffold 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.** Balken markieren den Bereich mit dem Scaffold-Material. (H&E-Färbung; 2,5x; Maßstab: 1000 µm). Ergänzende Darstellung zu Abbildung 23.

Ethisorb® nach 2 Wochen *in vivo*Ethisorb® nach 4 Wochen *in vivo*

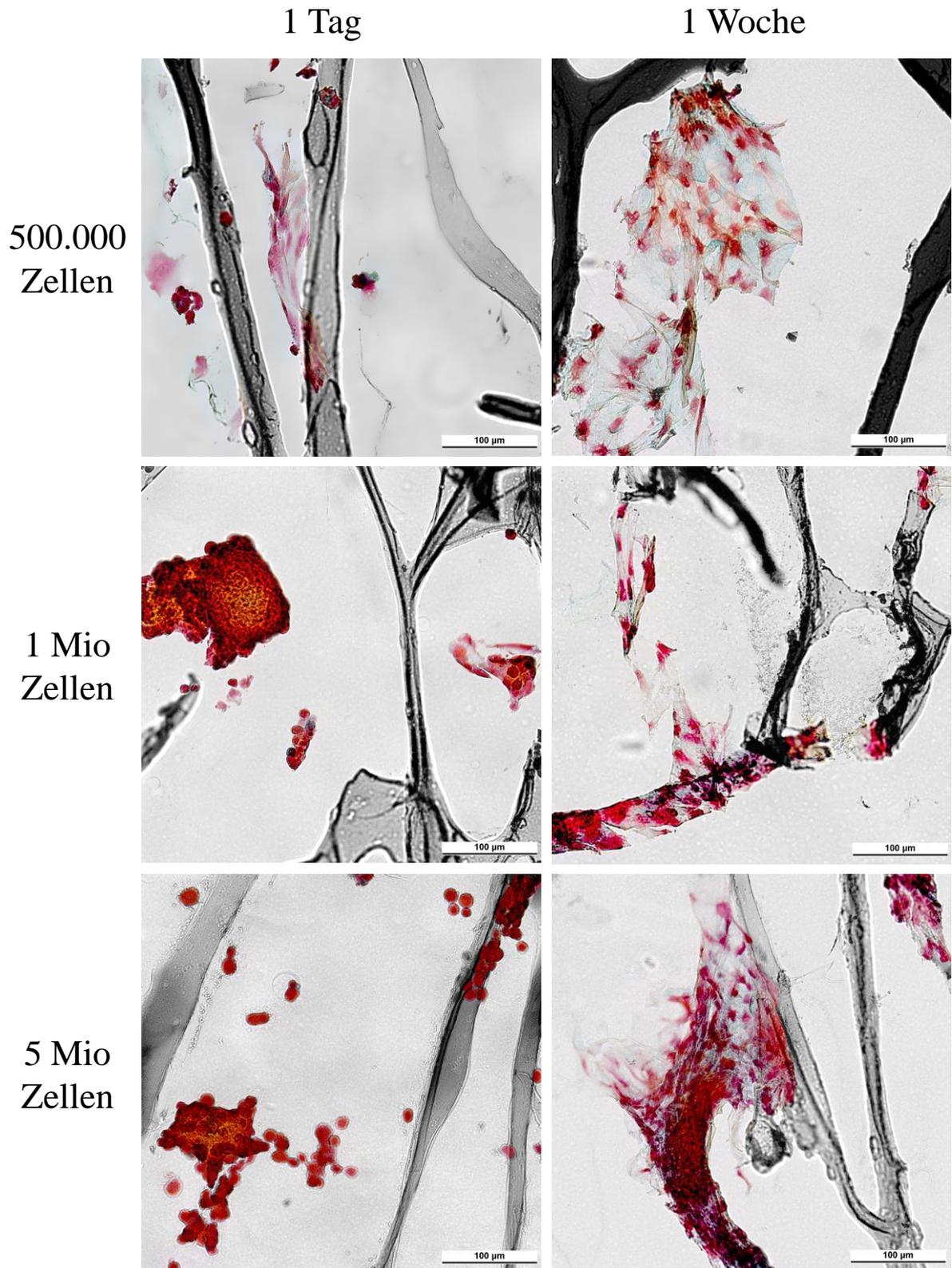
**Abbildung 37: Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate von Ethisorb® 2 und 4 Wochen nach subkutaner Implantation.** Balken markieren den Bereich mit dem Ethisorb®-Material. (H&E-Färbung; 2,5x; Maßstab: 1000 µm). Ergänzende Darstellung zu Abbildung 23.

**Tabelle 4: Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold (Prüfkörper) und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 2 Wochen.** Nach DIN EN ISO 10993-6, ergänzende Darstellung zu Abbildung 25.

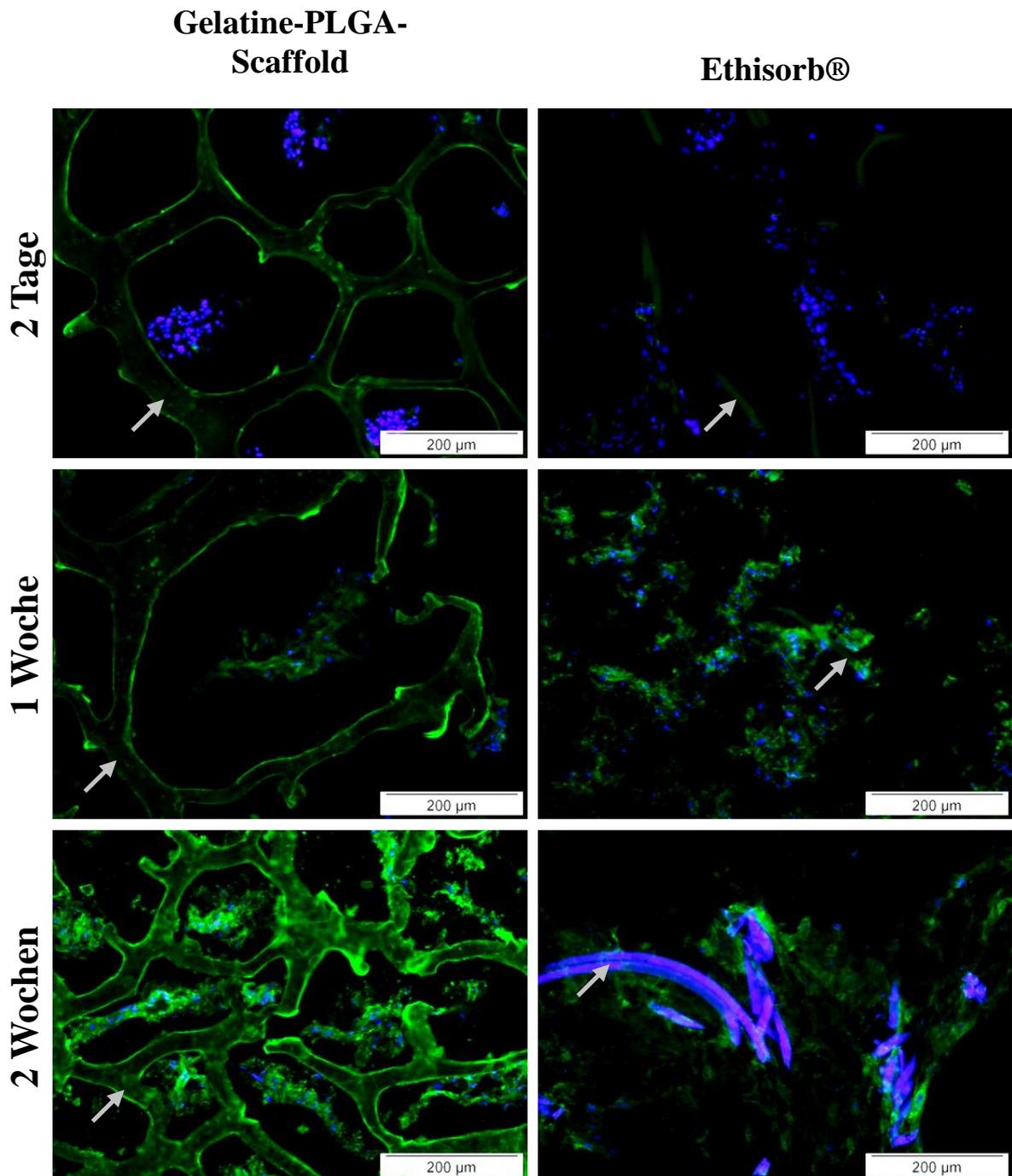
|   | Kontrollgruppe  |             |             |             |             |             |             | Prüfgruppe |            |            |             |             |             |             |
|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Tiernummer                                      | 71              | 72          | 73          | 74          | 75          | 76          | 77          | 78         | 79         | 80         | 81          | 82          | 83          | 84          |
| Polymorphkernige Zellen                         | 1,00            | 0,75        | 0,75        | 1,00        | 1,00        | 0,50        | 0,50        | 0,25       | 0,50       | 0,25       | 1,00        | 0,75        | 1,00        | 1,00        |
| Lymphozyten                                     | 3,00            | 2,00        | 2,00        | 1,25        | 1,50        | 2,25        | 1,50        | 1,50       | 2,50       | 1,00       | 2,50        | 2,75        | 2,75        | 3,00        |
| Plasmazellen                                    | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| Makrophagen                                     | 3,00            | 2,75        | 3,00        | 3,00        | 3,00        | 2,50        | 3,00        | 0,75       | 1,00       | 0,25       | 1,25        | 3,00        | 3,00        | 2,75        |
| Riesenzellen                                    | 1,25            | 1,75        | 2,00        | 1,75        | 1,50        | 1,00        | 0,50        | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| Nekrose   | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| <b>(SUBTOTAL1) x 2</b>                          | <b>16,5</b>     | <b>14,5</b> | <b>15,5</b> | <b>14,0</b> | <b>14,0</b> | <b>12,5</b> | <b>11,0</b> | <b>5,0</b> | <b>8,0</b> | <b>3,0</b> | <b>9,5</b>  | <b>13,0</b> | <b>13,5</b> | <b>13,5</b> |
| Neovaskularisation                              | 0,75            | 1,00        | 1,00        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,50        | 0,50       | 0,75       | 0,25       | 1,00        | 0,75        | 0,75        | 0,50        |
| Fibrose   | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,50        | 0,00        | 0,00        | 0,50       | 0,25       | 1,00       | 0,00        | 0,50        | 0,25        | 0,25        |
| Fettinfiltration                                | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,25        | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| <b>SUBTOTAL2</b>                                | <b>0,8</b>      | <b>1,0</b>  | <b>1,0</b>  | <b>0,8</b>  | <b>1,3</b>  | <b>0,8</b>  | <b>0,8</b>  | <b>1,0</b> | <b>1,0</b> | <b>1,3</b> | <b>1,0</b>  | <b>1,3</b>  | <b>1,0</b>  | <b>0,8</b>  |
| <b>TOTAL</b><br>(Subtotal1+Subtotal2)           | <b>17,3</b>     | <b>15,5</b> | <b>16,5</b> | <b>14,8</b> | <b>15,3</b> | <b>13,3</b> | <b>11,8</b> | <b>6,0</b> | <b>9,0</b> | <b>4,3</b> | <b>10,5</b> | <b>14,3</b> | <b>14,5</b> | <b>14,3</b> |
| <b>Gruppe total</b><br>(Mittelwert)             | 14,9            |             |             |             |             |             |             | 10,4       |            |            |             |             |             |             |
| <b>Differenz</b><br>(Prüfgruppe-Kontrollgruppe) | <b>-4,5 ≤ 0</b> |             |             |             |             |             |             |            |            |            |             |             |             |             |

**Tabelle 5: Semiquantitatives Punktbewertungsschema für die vergleichende Bewertung der Gewebereaktion auf den Gelatine-PLGA-Scaffold (Prüfkörper) und das Kontrollmaterial Ethisorb® nach 4 Wochen.** Nach DIN EN ISO 10993-6, ergänzende Darstellung zu Abbildung 25.

|   | Kontrollgruppe  |             |             |             |             |             | Prüfgruppe |             |            |             |             |             |
|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Tiernummer                                      | 2               | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           | 8          | 10          | 11         | 12          | 13          | 14          |
| Polymorphkernige Zellen                         | 0,00            | 0,25        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00       | 0,00        | 0,25       | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| Lymphozyten                                     | 1,00            | 2,00        | 2,50        | 1,50        | 2,50        | 1,25        | 2,00       | 2,75        | 1,00       | 2,50        | 2,00        | 2,75        |
| Plasmazellen                                    | 0,25            | 0,00        | 0,50        | 0,00        | 0,00        | 0,50        | 1,00       | 0,25        | 0,50       | 0,50        | 0,25        | 0,50        |
| Makrophagen                                     | 3,00            | 3,00        | 3,00        | 3,00        | 3,00        | 3,00        | 1,00       | 2,75        | 2,00       | 2,25        | 1,50        | 2,25        |
| Riesenzellen                                    | 2,75            | 2,50        | 2,75        | 3,00        | 3,00        | 2,25        | 0,50       | 1,25        | 0,25       | 1,00        | 1,50        | 0,50        |
| Nekrose   | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00       | 0,00        | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| <b>(SUBTOTAL1) x 2</b>                          | <b>14,0</b>     | <b>15,5</b> | <b>17,5</b> | <b>15,0</b> | <b>17,0</b> | <b>14,0</b> | <b>9,0</b> | <b>14,0</b> | <b>8,0</b> | <b>12,5</b> | <b>10,5</b> | <b>12,0</b> |
| Neovaskularisation                              | 0,50            | 0,25        | 0,00        | 0,00        | 0,25        | 0,00        | 0,75       | 0,00        | 0,00       | 0,25        | 0,00        | 0,00        |
| Fibrose   | 0,25            | 0,75        | 1,00        | 0,75        | 0,75        | 0,50        | 0,00       | 1,25        | 1,00       | 1,75        | 1,00        | 1,00        |
| Fettinfiltration                                | 0,00            | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00       | 0,00        | 0,00       | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| <b>SUBTOTAL2</b>                                | <b>0,8</b>      | <b>1,0</b>  | <b>1,0</b>  | <b>0,8</b>  | <b>1,0</b>  | <b>0,5</b>  | <b>0,8</b> | <b>1,3</b>  | <b>1,0</b> | <b>2,0</b>  | <b>1,0</b>  | <b>1,0</b>  |
| <b>TOTAL</b><br>(Subtotal1+Subtotal2)           | <b>14,8</b>     | <b>16,5</b> | <b>18,5</b> | <b>15,8</b> | <b>18,0</b> | <b>14,5</b> | <b>9,8</b> | <b>15,3</b> | <b>9,0</b> | <b>14,5</b> | <b>11,5</b> | <b>13,0</b> |
| <b>Gruppe total</b><br>(Mittelwert)             | 16,3            |             |             |             |             |             | 12,2       |             |            |             |             |             |
| <b>Differenz</b><br>(Prüfgruppe-Kontrollgruppe) | <b>-4,2 ≤ 0</b> |             |             |             |             |             |            |             |            |             |             |             |



**Abbildung 38: Zellmorphologie von primären Chondrozyten nach 1 Tag und 1 Woche auf dem Gelatine-PLGA-Scaffold.** Scaffolds wurden initial mit 500.000, 1 Mio und 5 Mio pGCs besiedelt und bis zu einer Woche kultiviert, um anschließend Gefrierschnitte anzufertigen. Zellen sind orange-rot gefärbt, synthetisierte Matrix ist leicht bläulich dargestellt, Scaffold-Material wurde nachträglich grau gefärbt (modifizierte Masson-Goldner-Färbung; Maßstab: 100 µm). Ergänzende Darstellung zu Abbildung 27.

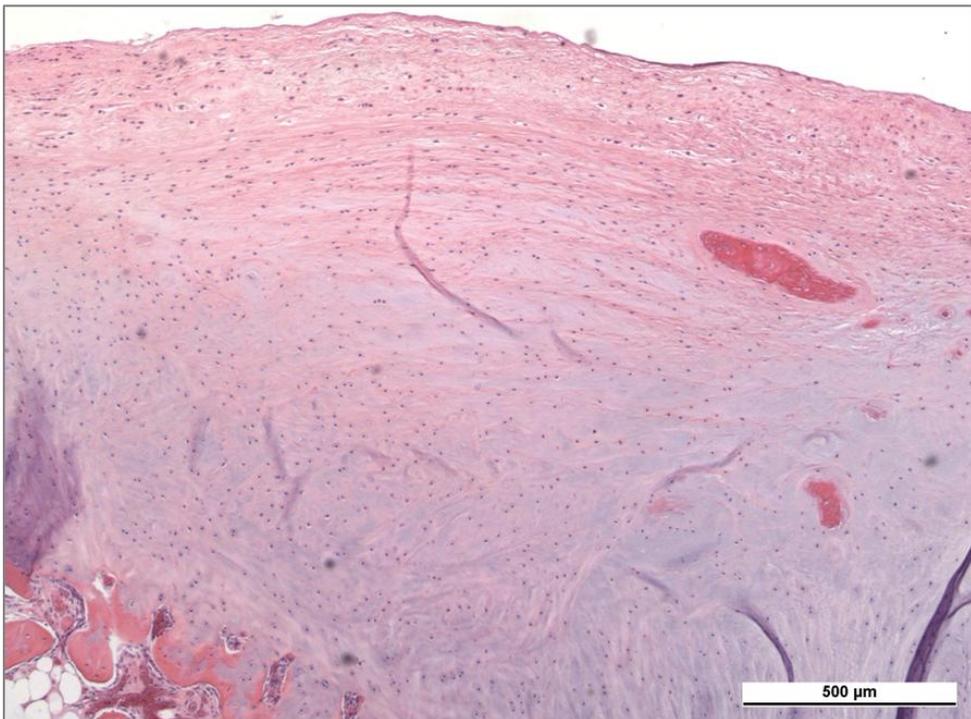


**Abbildung 39: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II in besiedelten Gelatine-PLGA- sowie Ethisorb®-Konstrukten nach 2 Tagen (oben), 1 Woche (Mitte) und 2 Wochen (unten).** Zellträger wurden mit 2 Mio primären Gelenkchondrozyten besiedelt und bis zu 2 Wochen kultiviert. An Gefrierschnitten (Querschnitte) der Proben erfolgte die immunhistologische Färbung von Kollagen II (grün) und den Zellkernen (blau), die Gelatine und die Ethisorb®-Fasern wurden dabei unspezifisch angefärbt (graue Pfeile, Maßstab: 200 µm). Ergänzende Darstellung zu Abbildung 29.

## Mikrofrakturierung + Scaffold

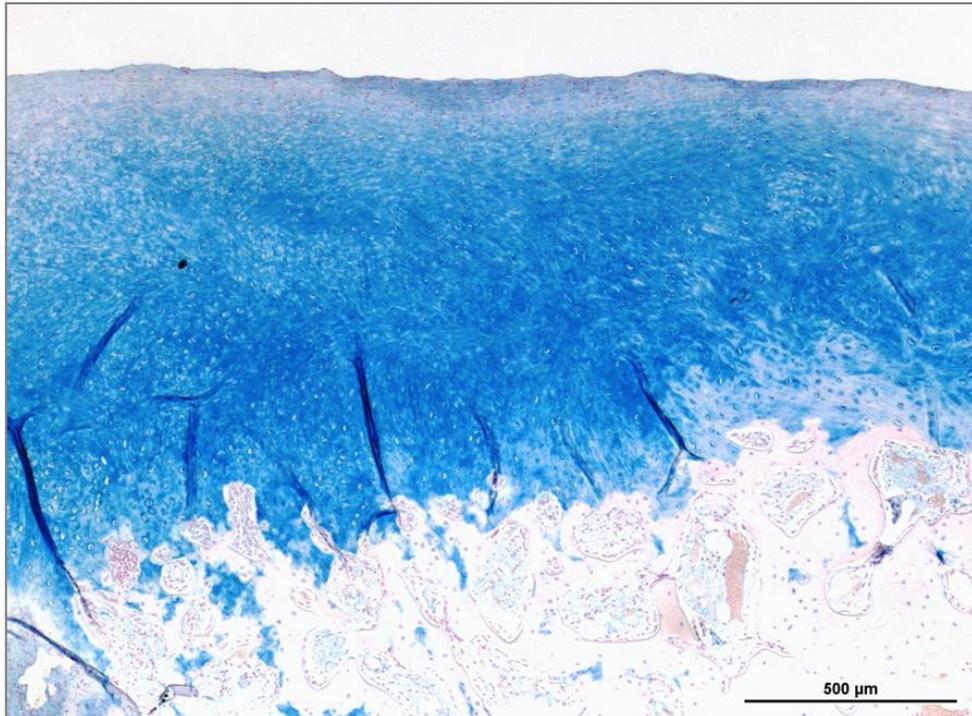


## Mikrofrakturierung (Kontrolle)

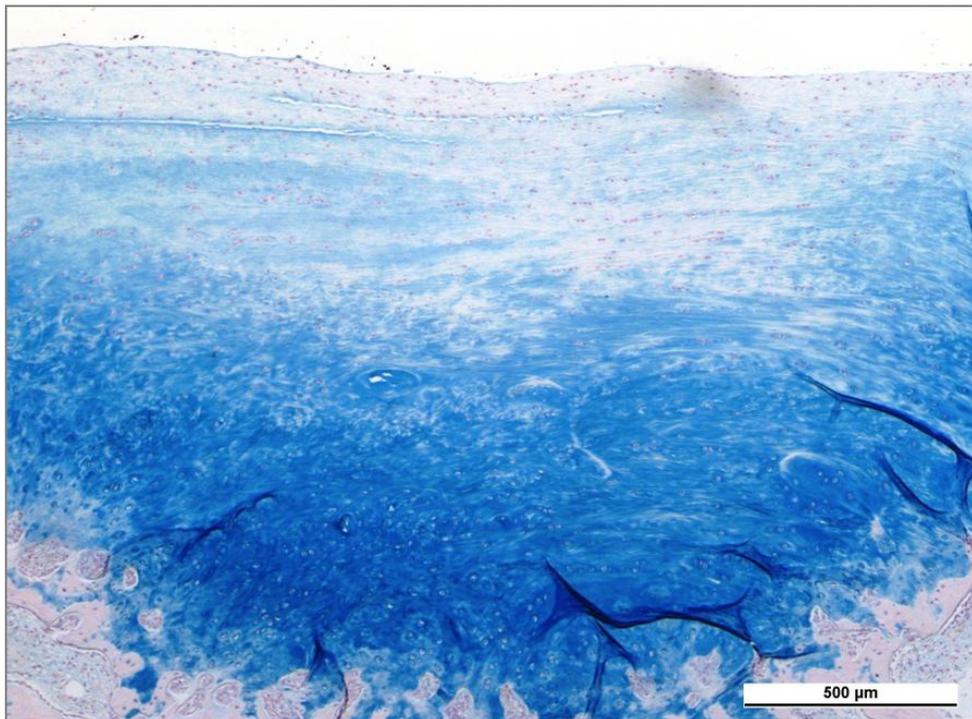


**Abbildung 40: Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten *in vivo*.** Künstlich gesetzte Knorpeldefekte in Kniekondylen von Ziegen wurden randomisiert mit Mikrofrakturierung (unten) sowie Mikrofrakturierung und Gelatine-PLGA-Scaffold behandelt (oben) und bezüglich der Geweberegeneration nach 6 Monaten beurteilt (H&E-Färbung; Maßstab: 500 µm). Die Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rolf Zehbe zur Verfügung gestellt.

## Mikrofrakturierung + Scaffold



## Mikrofrakturierung (Kontrolle)



**Abbildung 41: Exemplarische Aufnahmen der histologischen Präparate aus der Funktionalitätsstudie nach 6 Monaten *in vivo*.** Künstlich gesetzte Knorpeldefekte in Kniekondylen von Ziegen wurden randomisiert mit Mikrofrakturierung (unten) sowie Mikrofrakturierung und Gelatine-PLGA-Scaffold behandelt (oben) und bezüglich der Geweberegeneration nach 6 Monaten beurteilt (Alzianblau-Färbung; Maßstab: 500 µm). Die Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rolf Zehbe zur Verfügung gestellt.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Weiter erkläre ich, dass ich anderweitig keine weitere Promotionsabsicht angemeldet oder ein anderes Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Veröffentlichungen von Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden:

### *Publikationen in Fachzeitschriften:*

Thiem, A.; Lum, V.; Grupp, R.; Riesemeier, H.; Bordia, R.; Schubert, H.; Zehbe, R. (2010): Synchrotron  $\mu$ CT Investigation of the Collapsing Pore-Network of Gelatin Scaffolds under Compression. In: *AMR* 89-91, S. 551–555.

### *Poster auf Fachkonferenzen:*

Thiem, A.; Lum, V.; Grupp, R.; Riesemeier, H.; Bordia, R.; Schubert, H.; Zehbe, R. (2010): Synchrotron  $\mu$ CT Investigation of the Collapsing Pore-Network of Gelatin Scaffolds under Compression. Thermec-Konferenz 2009 in Berlin.

Thiem, A.; Schubert, H.; Zehbe, R.: Entwicklung eines resorbierbaren Polymer-Komposit-Scaffolds zur artikulären Knorpelregeneration. Workshop des Fraunhofer-Instituts für Angewandte Polymerforschung 2010 in Potsdam Golm.

Thiem, A.; Jeuthe, S.; Brochhausen, C.; Gross, U.; Kirkpatrick, C. J.; Große-Siestrup, C.; Zehbe, R.; Schubert, H.: Biokompatibilität eines Polymer-Komposit-Scaffolds nach subkutaner Implantation im Rattenmodell. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) 2010 in Bad Heiligenstadt.

Berlin, 23.06.2011

Annette Thiem