

In-vitro-Charakterisierung der zellulären Verteilungsmuster  
und der Glykosaminoglykan- und Pro-Collagen II  
C-Propeptid-Synthese in autologen Chondrozyten-  
Transplantaten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Baller, Sven-Eric

2016

In-vitro-Charakterisierung der zellulären Verteilungsmuster  
und der Glykosaminoglykan- und Pro-Collagen II  
C-Propeptid-Synthese in autologen Chondrozyten-  
Transplantaten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Baller, Sven-Eric

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Leichtle

## Widmung

Tiefe Dankbarkeit und die Widmung dieser Arbeit gilt meinen Eltern Detlev und Brigitte Baller, die mir erst das Studium der Humanmedizin und somit auch diese Doktorarbeit ermöglichten.

Ich danke euch von Herzen für eure Liebe, Unterstützung und Ratschläge während dieser gesamten Zeit.

In Liebe euer Sohn

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis .....	I
II	Abbildungsverzeichnis .....	III
III	Tabellenverzeichnis .....	IV
IV	Abkürzungsverzeichnis .....	V
1.	Einleitung .....	1
1.1.	Hyaliner Gelenknorpel .....	1
1.2.	Therapiemöglichkeiten bei Knorpeldefekten .....	4
1.3.	Ziele der Arbeit .....	7
2.	Material und Methoden .....	8
2.1.	Geräte .....	8
2.2.	Gebrauchsmaterialien .....	9
2.3.	Chemikalien .....	9
2.4.	CPII ELISA KIT .....	10
2.5.	Zellkulturmedium .....	10
2.6.	Autologe Chondrozyten-Transplantate (ACT) .....	11
2.7.	Humaner Gelenknorpel aus dem Kniegelenk .....	11
2.8.	Strukturanalyse der Chondrozyten in autologen Chondrozyten- Transplantaten .....	12
2.8.1.	Präparation der autologen Chondrozyten-Transplantate .....	12
2.8.2.	Färbung der autologen Chondrozyten-Transplantate .....	13
2.8.3.	Aufnahmen der autologen Chondrozyten-Transplantate .....	13
2.8.4.	Koordinatenbestimmung der autologen Chondrozyten-Transplantate .....	15
2.8.5.	Statistische Auswertung .....	17
2.9.	Bestimmung der Zellzahl u. Syntheseleistung anhand des CyQuant-, GAG- und CPII-Assay von homogenen und gruppierten Chondrozyten... 17	
2.9.1.	Knorpelverdauung .....	17
2.9.2.	Herstellung der Zellkultur .....	17
2.9.3.	Bestimmung der Zellzahlen der Knorpelproben .....	18
2.9.4.	Besiedlung der Kollagen-I-Matrix .....	18
2.9.5.	GAG-Assay .....	19
2.9.5.1.	Herstellung der DMMB-Färbelösung (500 ml) .....	19
2.9.5.2.	Herstellung des Standards .....	20
2.9.5.3.	Durchführung des GAG-Assay anhand des Standards .....	20
2.9.6.	CPII-Assay .....	21
2.9.6.1.	Herstellung des Waschpuffers .....	22
2.9.6.2.	Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe .....	22
2.9.6.3.	Herstellung der Antikörper-Verdünnung .....	22
2.9.6.4.	Herstellung der GAR-HRP-Konjugat-Lösung .....	22

2.9.7. CyQUANT-Assay .....	23
2.9.7.1. Kollagen-I-Matrix Verdau .....	23
2.9.7.2. Herstellung der Verdünnungsreihe .....	23
2.9.7.3. Herstellung der Reaktionslösung .....	23
2.9.7.4. Durchführung des CyQUANT-Assay .....	23
2.10. Bestimmung der GAG-Verteilung mittels Alcianblau-Färbung .....	24
2.10.1. Herstellung der Alcianblau-Färbelösung .....	24
2.10.2. Färbung der Kollagen-I-Matrix.....	24
3. Ergebnisse .....	25
3.1. Vergleich der Aufnahmequalitäten mit und ohne ApoTome bzw. ohne ApoTome mit verstärktem Kontrast.....	25
3.2. Unterschiede innerhalb der mA-Gruppe nach aufsteigendem Clark-Evans Index.....	26
3.3. Unterschiede innerhalb der oAk-Gruppe nach aufsteigendem Clark-Evans Index.....	27
3.4. Unterschiede innerhalb der mA-Gruppe nach aufsteigend normierter Zellzahl.....	27
3.5. Unterschiede innerhalb der oAk-Gruppe nach aufsteigend normierter Zellzahl.....	28
3.6. Besiedlung der Kollagen-I-Matrix .....	28
3.7. Flächenbestimmung der gruppiert und homogen verteilten Chondrozyte Areale.....	29
3.8. GAG-Assay .....	30
3.9. CPII-Assay .....	30
3.10. CyQUANT-Assay.....	31
3.11. Alcianblau-Färbung .....	32
4. Diskussion.....	34
5. Zusammenfassung.....	38
6. Literaturverzeichnis.....	40

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Danksagung

Curriculum Vitae

## **II    **Abbildungsverzeichnis****

Abbildung 1:	Histologische und schematische Darstellung von Gelenkknorpel .....	1
Abbildung 2:	Darstellung der verschiedenen Zellmuster der superfiziellen Schicht im Gelenkknorpel .....	3
Abbildung 3:	Synopse verschiedener Therapiemöglichkeiten bei Knorpeldefekten .....	6
Abbildung 4:	Einstellungen zur Aufnahme der Bilder am Axio Oberserver.Z1 .....	14
Abbildung 5:	Aufnahmetechniken im Vergleich .....	16
Abbildung 6:	Exemplarischer Verlauf der Bildbearbeitung .....	16
Abbildung 7:	Schematische Gegenüberstellung der Besiedlung von Kollagen-I-Matrices für die homogene und gruppierte Form .....	19
Abbildung 8:	GAG-Standard .....	21
Abbildung 9:	Synoptische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten ACT-Proben .....	25
Abbildung 10:	DAPI-Färbung der homogen besiedelten Kollagen-I-Matrix .....	28
Abbildung 11:	DAPI-Färbung der gruppiert besiedelten Kollagen-I-Matrix .....	29
Abbildung 12:	Mittelwert und Standardfehler der GAG-Syntheseleistung nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo) .....	30
Abbildung 13:	Mittelwert und Standardfehler der CPII-Syntheseleistung nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo) .....	30
Abbildung 14:	Mittelwert und Standardfehler der Zellzahl nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo) .....	31
Abbildung 15:	Alcianblau-Färbung einer vierfach besiedelten Kollagen-I-Matrix .....	32
Abbildung 16:	Alcianblau-Färbung einer einfach besiedelten Kollagen-I-Matrix .....	33

### **III Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Liste der ACT-Spender .....	11
Tabelle 2:	Liste der Knorpelspender .....	12
Tabelle 3:	Suspensionsmengen zur Besiedlung .....	19
Tabelle 4:	Standard-Reagenzien GAG-Assay .....	20
Tabelle 5:	Signifikanz der Aufnahmequalitäten bzgl. spezifischer Zellverteilungsmuster .....	26
Tabelle 6:	Signifikanz der mA-Aufnahmen nach aufsteigendem CE-Index .....	27
Tabelle 7:	Signifikanz der oAk-Aufnahmen nach aufsteigendem CE-Index .....	27
Tabelle 8:	Signifikanz der mA-Aufnahmen nach aufsteigend normierter Zellzahl .....	27
Tabelle 9:	Signifikanz der oAk-Aufnahmen nach aufsteigend normierter Zellzahl .....	28

## IV Abkürzungsverzeichnis

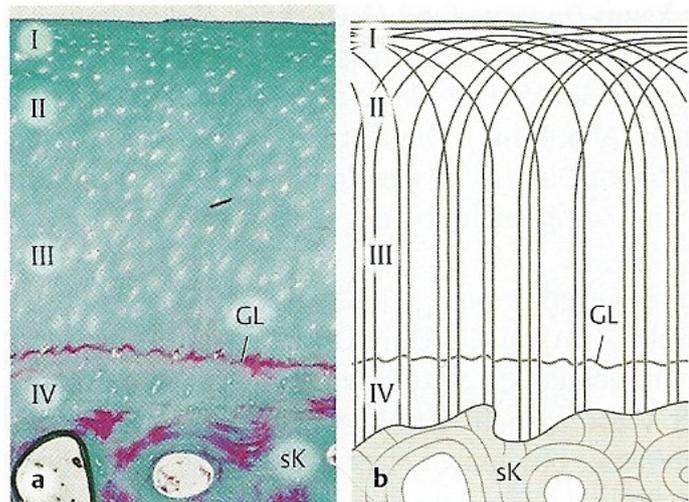
Abb.	Abbildung
ACT	Autologes Chondrozyten-Transplantat bzw. Transplantation
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Clark-Evans Index
CPII	Pro-Collagen II C-Propeptid
DAPI	4', 6'-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMMB	1,9-Dimethylmethylen Blau Chlorid
EZM	Extrazellulärmatrix
FM	Fluoreszenzmikroskop
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HCl	Salzsäure
mA	Aufnahmen mit ApoTome
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natrium-Azid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NND	Nearest Neighbor Distance
n.s.	nicht signifikant
oA	Aufnahmen ohne ApoTome

oAk	Aufnahmen ohne ApoTome mit verstärktem Kontrast
OCT	Osteochondrale Transplantation
PAT	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCF	Pair Correlation Function
PZM	Perizelluläre Matrix
rpm	revolutions per minute
rcf	relative centrifugal force
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1. Hyaliner Gelenkknorpel

Grundsätzlich unterscheidet man drei Arten von Knorpelgeweben, nämlich den Faserknorpel, den elastischen Knorpel und den hyalinen Knorpel. Letzterer bildet den Gelenkknorpel. Dieser stellt ein hypozelluläres, avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe dar [1], das aus Chondrozyten (1-10%) und Extrazellulärmatrix besteht, deren wichtigste Bestandteile Wasser (70-80%), Proteoglykane (7-9%, v.a. Aggrekan) und Kollagene (12-14%, v.a. Kollagen Typ II) sind [2]. Histologisch lässt sich der hyaline Knorpel in verschiedene Schichten unterteilen. Er besitzt eine superfizielle, transitionelle, radiäre und kalzifizierte Schicht (Abb. 1). Jede Schicht weist charakteristische Besonderheiten in Morphologie [1, 3, 4], Glykosaminoglykan- [5], Kollagen- [6], Wasser- [7] und Mineralgehalt [8] auf, die für die Gesamtfunktion des Knorpels von essentieller Bedeutung sind.



**Abbildung 1: Histologische und schematische Darstellung von Gelenkknorpel**  
a Gelenkknorpel (menschlicher Calcaneus) im Schnitt (Glodner). b Zoneneinteilung entsprechend dem Verlauf der Kollagenfibrillen: Superfiziell- (I), Transitionell- (II), Radiär- (III) und Kalzifizierungsschicht (IV). Darunter liegt der subchondrale Knochen (sK). Zwischen der III- und IV- Schicht liegt die deutlich sichtbare Grenzlinie (GL – „Tidemark“) [9].

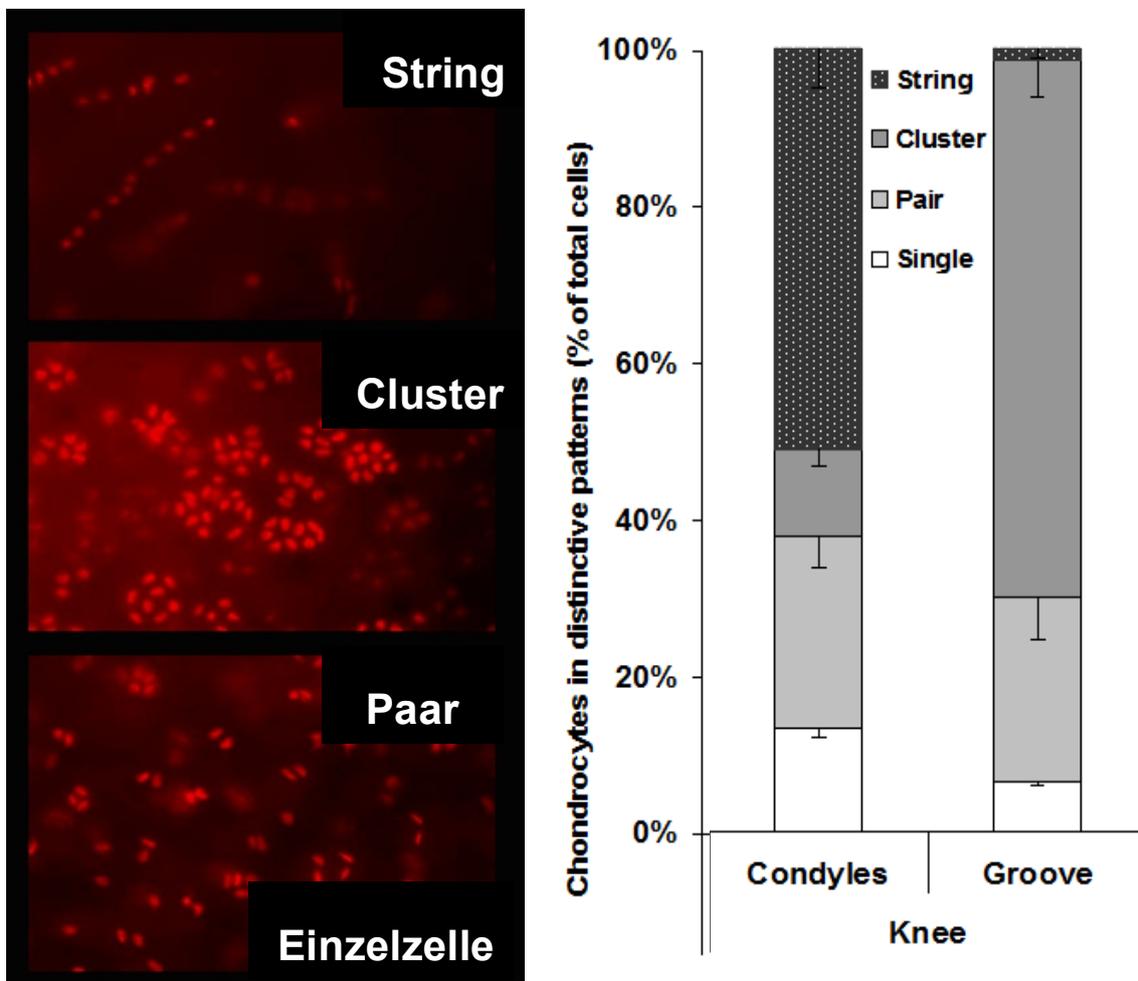
Dabei stellen die jeweiligen biochemischen, biomechanischen und bioelektrischen Unterschiede der einzelnen Schichten die Grundvoraussetzung für das hydrodynamische Dämpfungssystem des Gelenkknorpels dar, das einwirkende Kräfte absorbiert und umverteilt [10-12]. Diese Funktion beruht dabei auf Glykosaminoglykanen, die in einem Kollagenfibrillennetz eingeschlossen sind und durch ihre negative Ladung eine starke Wasserbindungskraft besitzen, da sich ansonsten in freier wässriger Lösung Proteoglykane und Hyaluronsäure durch die intra- und intermolekulare Wassereinlagerung riesig ausdehnen würden. Unter mechanischer Belastung führt die Kompression der EZM zu einem druckinduzierten Flüssigkeitsfluss des gebundenen Wassers in weniger komprimierte Areale der EZM.

Bei rückläufiger Belastung fließt die Flüssigkeit wegen der negativen Glykosaminoglykan-Ladung und des hohen osmotischen Druckes wieder zurück und verleiht dem hyalinen Knorpel durch den entstehenden hohen Schwelldruck seine ursprüngliche Form zurück [2, 13-16]. Dieses Funktionsprinzip stellt die reversible Komprimierbarkeit des Gelenkknorpels dar. Während in der superfiziellen Schicht primär die Kollagene I und III zu finden sind und die Chondrozyten flach und parallel entsprechend der trajektorialen Ausrichtung der Kollagenfasern ausgerichtet sind, finden sich dagegen in der radiären Schicht vor allem Kollagen Typ II und Aggrekan. Zudem liegen die Chondrozyten häufig in isogenen Gruppen von mehreren Zellen vor, die dem radiären Verlauf der Kollagenfasern folgen [2, 17]. Besonders Kollagen Typ II scheint eine bedeutsame Rolle mit dessen mechanischen Eigenschaften in Bezug auf Festigkeit und Haltbarkeit des Gelenkknorpels zu spielen [18, 19]. In einer Reihe von Arbeiten wird es als wesentlicher Marker für die In-vitro-Chondrozytenproliferation und -expansion angesehen [20].

Hervorzuheben ist vor allem die superfizielle Schicht in Bezug auf Regeneration und Funktion des hyalinen Knorpels, da sie den entstehenden Zugkräften als Membran entgegenwirkt, einen direkten Kontakt zum gegenüberliegenden Knorpel hat, zur Gelenklubrikation beiträgt und besondere proliferative und biosynthetische Reaktionen auf biomechanische Stimuli zeigt [21-24]. Entsprechend der Sonderstellung dieser Schicht wurden diverse Studien zur

Gestalt der darin enthaltenen Chondrozyten [4, 25], zur Zelldichte [4, 25, 26], zu deren Organisation entlang des Zytoskeletts [27] und auch dessen Metabolismus [28] publiziert.

Eine weitere Besonderheit der superfiziellen Schicht ist die unterschiedliche horizontale Anordnung der Chondrozyten parallel zur Oberfläche, die zum einen Unterschiede zur Verteilung der Chondrozyten in tieferen Schichten zeigt, und zum anderen sich auch in den verschiedenen Gelenken voneinander unterscheidet (Abb. 2). Diese spezifischen Zellmuster bestehen aus diffus verteilten Einzelzellen, aus Zellpaaren, Clustern zu drei oder mehreren Zellen und horizontalen Ketten („Strings“) [29].



**Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Zellmuster der superfiziellen Schicht im Gelenkknorpel.** Horizontale Zellmuster und prozentuale Anteile der einzelnen Zellmuster in der oberflächlichen Schicht von humanem Kniegelenkknorpel mit den vier physiologischen Zellmustern [26].

Die Verteilung dieser Zellmuster sowie der Anteil an Zellen insgesamt ist eng verbunden mit Form und Funktion des Gelenks, sodass man zu dem Schluss kommen kann, dass jedes Gelenk eine individuelle und spezialisierte Zusammensetzung, spezifisch auf die jeweilige Beanspruchung der Gelenkoberfläche, besitzt.

Als ein fünftes „pathologisches Zellmuster“ ist noch der Double-String zu nennen, der allerdings nur in Gelenkknorpel gefunden wurde, der sich in unmittelbarer Nähe fokaler Arthrose-Läsionen befand und somit als arthrose-assoziiertes Zellmuster angesehen werden muss. Entsprechend diesem pathologischen Muster zeigt sich ebenfalls eine Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der vier üblichen Muster in einem von Arthrose befallenen Gelenk [30].

## **1.2. Therapiemöglichkeiten bei Knorpeldefekten**

Als bradytrophes Gewebe besitzt der hyaline Gelenkknorpel ein nur limitiertes Regenerationspotential. Dies hat zur Folge, dass Schäden, wie z.B. ein Trauma oder Erkrankungen wie Osteochondrosis dissecans [31] oder andere Knorpeldefekte häufig sekundär in eine Arthrose münden [32-36]. Durch die neuroanatomische Besonderheit einer fehlenden Nervenversorgung des Knorpels bleiben Schädigungen im Frühstadium häufig asymptomatisch und klinisch inapparent. Für die Klassifikation von Knorpelschäden wird im Allgemeinen die Einteilung nach ICRS favorisiert [37], die eine Erweiterung der vierstufigen Outerbridge-Klassifikation (1961) darstellt.

Die Behandlungsmöglichkeiten können unter anderem eingeteilt werden in Transplantationsverfahren, zu denen die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) und die osteochondrale Transplantation (OCT, Mosaikplastik) zählen, und in knochenmarkstimulierende Verfahren wie Mikrofrakturierung [35]. Bei Letzterem wird ein Knorpelschaden induziert, der bis in den subchondralen Knochen reicht, was zum Einströmen von multipotenten Knochenmarksstammzellen führt, die ein Reparaturgewebe ausbilden, das vor allem aus Faserknorpel besteht. Dieser scheint aber im Vergleich hinsichtlich der histologisch-strukturellen Qualität dem mehr hyalinartigen

Regeneratknorpel nach ACT unterlegen zu sein [38-40]. Indikationen für Mikrofrakturierung sind vor allem fokale Knorpelschäden ohne Verlust von Knochen, die von normalem Knorpelgewebe umgeben sind [41, 42]. Den wichtigsten limitierenden Faktor stellt hierbei die Defektgröße dar.

Demgegenüber steht die ACT, die erstmalig 1994 beschrieben wurde [20] und bei der heute drei „Generationen“ von Verfahrenstechniken unterschieden werden. Als 1. Generation wird die periostlappenassoziierte ACT bezeichnet. Hierbei kommt es zur Defektdeckelung mit autologem Periost unter Verwendung einer Zellsuspension. Demgegenüber steht die 2. Generation mit Abdeckung durch eine Kollagenmembran, ebenfalls unter Verwendung einer Zellsuspension, und schließlich ist als 3. Generation die Implantation eines zellbesiedelten, dreidimensionalen Trägermaterials im Sinne des Tissue Engineering zu verstehen [43]. Diese proteinbasierten Biomaterialien, wie z.B. Novocart (TETEC, Reutlingen, Deutschland) basieren auf Kollagen Typ I und III [29]. Der Vorteil der 3. Generation im Vergleich zu den beiden früheren ACT-Generationen liegt zum einen im leichteren Umgang durch die fehlende Notwendigkeit einer wasserdichten Fixierung der Membran, die für das Unterspritzen der Zellsuspension unerlässlich ist, und zum anderen in der niedrigeren Komplikationsrate, speziell im Vergleich zur Periostlappentechnik [44, 45], sodass diese Einzug in den klinischen Alltag gehalten hat und derzeit als eine der fortschrittlichsten Behandlungen in der regenerativen Knorpeltherapie gilt.

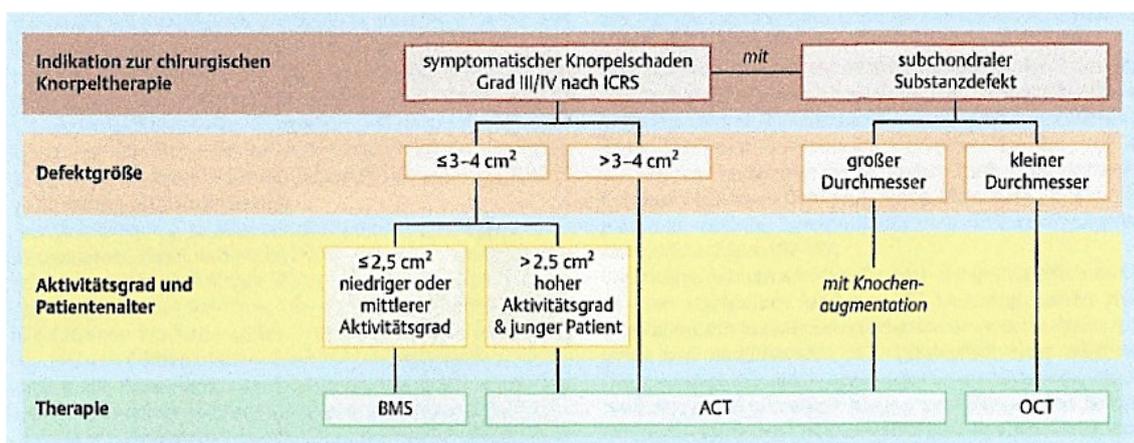
Klinisch wird dem Patienten in einer ersten Operation Knorpel aus vital-gesunden Zonen entnommen, die Chondrozyten werden isoliert und in Kultur gebracht. Nach Erreichen der entsprechenden Zellzahl (derzeit werden aufgrund empirischer Erfahrungswerte ca. 1-2 Millionen Zellen pro cm<sup>2</sup> Defektfläche empfohlen [35]) werden diese auf eine schwammähnliche dreidimensionale Matrix übertragen (Verfahren der 3. Generation). Nach entsprechender Anheftung der Zellen kann die Matrix in einer zweiten Operation in den Knorpeldefekt eingebracht werden.

Hierzu zeigen diverse Studien, dass der ausgebildete hyalinartige Knorpel im Vergleich zum hyalinen Gelenkknorpel weder klinisch noch histologisch eine

annähernde Qualität erreicht [39, 46, 47]. Verschiedene Studien zeigen darüber hinaus auch Vergleiche zu Alternativverfahren wie beispielsweise OCT [48-50] und Abrasion [51]. Unter Bezug auf erste veröffentlichte Langzeitergebnisse zeigen einige Arbeiten eine Verbesserung der Gelenkfunktion im Vergleich zum präoperativen Zustand sowie eine dauerhafte Haltbarkeit des Regeneratknorpels nach ACT [52-54].

Über die genaue Indikationsstellung der ACT wird sehr kontrovers diskutiert. Konsens besteht aber vor allem in dem Punkt, dass sie sich in erster Linie bei größeren Defekten ( $> 3\text{-}4\text{ cm}^2$ ) mit deutlich besserer Wirksamkeit gegenüber Verfahren wie Mikrofrakturierung und OCT zeigt [48, 55] und aktuell keine anderen biologisch rekonstruktiven Behandlungsalternativen dafür zur Verfügung stehen.

Eine mögliche Orientierungshilfe zeigt die Arbeit von Niemeyer, P. et al. (Abb. 3) bezüglich der geeigneten Auswahl der Verfahren im Hinblick auf Defektgröße, Aktivitätsgrad und Patientenalter. Ursprünglich wurde die ACT für Patienten zwischen dem 18. und 50. Lebensjahr empfohlen. Nach der derzeitigen Studienlage ist die Wirksamkeit der ACT-Therapie grundsätzlich auch bei Kindern und Jugendlichen [56, 57] sowie älteren Patienten gegeben [58].



**Abbildung 3: Synopse verschiedener Therapiemöglichkeiten bei Knorpeldefekten**  
Orientierungshilfe für die Auswahl des geeigneten Verfahrens zur biologischen Rekonstruktion isolierter Knorpelschäden des Kniegelenks in Abhängigkeit verschiedener Einflussfaktoren (BMS: Bone Marrow Stimulation, z.B. Mikrofrakturierung; ACT: autologe Chondrozytentransplantation; OCT: osteochondrale Transplantation) [35].

Weitere wichtige Determinanten des Behandlungsergebnisses nach autologer Chondrozyten-Transplantation stellen patientenspezifische Faktoren wie Body-Mass-Index [59, 60], Nikotinkonsum [61] und auch die Anzahl von Voroperationen am Kniegelenk dar [62-64]. Ebenso spielen Defektgröße, -anzahl und -lokalisierung eine tragende Rolle, da beispielsweise retropatellare Defekte im Vergleich zu Defekten der Femurkondyle mit einem schlechteren Behandlungserfolg einhergehen [65].

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die ACT als etablierte Methode und wichtiger Bestandteil knorpelregenerativer chirurgischer Therapie des Kniegelenks eine gute Behandlungsmöglichkeit darstellt, die ständig weiterentwickelt und verbessert wird, sodass sie in Zukunft u.a. auch Anwendung in anderen Gelenken wie Schulter und Hüfte finden wird, wozu bisher nur wenige Einzelfallberichte vorliegen [66-68].

### **1.3. Ziele der Arbeit**

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Residualanteile von bereits implantierten autologen Chondrozyten-Transplantaten unter folgenden Fragestellungen zu untersuchen: Unterscheiden sich die humanen ACTs in Parametern der räumlichen Verteilung wie Zellzahl, Zelldichte und Zellverteilung?

Lassen sich daraus resultierende Unterschiede in der biochemischen Syntheseleistung von Glykosaminoglykanen und Pro-Collagen II C-Propeptiden im nachfolgenden Laborexperiment darstellen und quantifizieren? Darüberhinaus sollten drei differente Mikroskopieaufnahmetechniken zur Visualisierung der räumlichen Verteilung mit Fokus auf Sensitivität, Abbildungsleistung und mögliche praktikable Umsetzung im klinischen Alltag vergleichend analysiert und bewertet werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Geräte**

- Abzug (Prutscher, Österreich)
- Analytische Waage (Max: 220 g, Min: 10 mg, Kern, Deutschland)
- Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Binder, Deutschland)
- Canon EF-S 60 mm 1:2,8 Makro USM Objektiv (Canon, Deutschland)
- Canon EOS 70D SLR-Digitalkamera (Canon, Deutschland)
- ELISA-Reader (Biotek, USA)
- Gefrierschrank – 24°C (Liebherr Premium, Deutschland)
- Kühlaggregat (Bachofer, Deutschland)
- Kühlschrank 4°C (Liebherr, Deutschland)
- Kühlschrank 4°C (Severin, Deutschland)
- Magnetrührer (IKA, Deutschland)
- Mikropipetten (Eppendorf, Deutschland)
- Mikroskop (Axio Observer.Z1 Carl Zeiss, Deutschland)
- Mikroskop (Leica DMIL, Leica, Deutschland)
- Monochromator infinite M200Pro (Tecan, Schweiz)
- Pipettierhilfe (Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland)
- pH-Meter (Mettler Toledo, Schweiz)
- Rüttelplatte (IKA, Deutschland)
- Sterilbank (BDK, Deutschland)
- Thermomixer (Eppendorf, Deutschland)
- Vakuum-Pumpe (Edwards, England)
- Vakuum-Zentrifuge (Bachofer, Deutschland)
- Wasserbad (Medingen, Deutschland)
- Zentrifuge (Eppendorf, Deutschland)

## 2.2. Gebrauchsmaterialien

- Blue Cap (15 ml, 50 ml, Greiner bio-one, Deutschland)
- Deckgläser für Objektträger (24x40 mm, 24x50 mm, 24x60 mm, R. Langenbrinck, Deutschland)
- Eppendorf-Tubes (1,5 ml, 2 ml, Eppendorf, Deutschland)
- Filterpapiere (ø 150 mm, Macherey-Nagel, Deutschland)
- Kollagen-I Matrix (Jotec, Deutschland)
- Neubauerzählkammer (Assistent, Deutschland)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, BD Falcon, Deutschland)
- Petrischale (145/20 mm, Greiner bio-one, Deutschland)
- Skalpell (Nr. 21 Surgical disposable scalpels, Feather, Japan)
- Well-Platten (Greiner bio-one, Deutschland)
- Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, BD Falcon, USA)
- Zellsieb (100 µm, BD Falcon, USA)

## 2.3. Chemikalien

- 1,9-Dimethylmethylen Blau Chlorid (DMMB, Polysciences, USA)
- 3%ige Essigsäure (Merck, Deutschland)
- 4', 6'-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Roche, Schweiz)
- Aceton (Merck, Deutschland)
- Alcianblau 8 GX (Merck, Deutschland)
- Chondroitin-Sulfat (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- CyQUANT NF dye reagent (life technologies, USA)
- Ethanol (Merck, Deutschland)
- Formaldehydlösung mind. 35% (Merck, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Deutschland)
- HBSS buffer (life technologies, USA)
- Natriumchlorid (Merck, Deutschland)
- Natriumazid (Merck, Deutschland)
- Phosphatpuffer (Dulbecco's PBS, PAA, Österreich)

- Proteinase K (Thermo Scientific, Deutschland)
- Sprühdeseinfektion (Descosept AF, Dr. Schumacher GmbH, Deutschland)
- Steriles Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Trypan Blue Solution (0,4%, Sigma-Aldrich, Deutschland)

## **2.4. CPII ELISA KIT**

- TMB (14 ml, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Stop Solution (14 ml, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Assay Buffer (8 ml, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Buffer III (20 ml, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Wash Buffer (50 ml, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- CPII Antibody (75 µl, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- GAR-HRP (75 µl, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- CPII Standard (200 µl, IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- CPII Elisa Plate (IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Mixing Plate (IBEX Pharmaceuticals Inc.)
- Plate Sealers (IBEX Pharmaceuticals Inc.)

## **2.5. Zellkulturmedium**

Chondrozytenmedium:

- F12 + GlutaMAX (250 ml, Gibco, Deutschland)
- DMEM + GlutaMAX (250 ml, Gibco, Deutschland)
- FCS (50 ml, Biochrom, Deutschland)
- PenStrep (10 ml, Gibco, Deutschland)
- Fungizone (6 ml, Gibco, Deutschland)
- Phosphitan (500 µl, Sigma-Aldrich, Deutschland)

## 2.6. Autologe Chondrozyten-Transplantate (ACT)

Die Reste aus klinisch verwendeten ACTs (Novocart 3D, Tetec, Deutschland) stammten aus der BG-Unfallklinik Tübingen und waren überschüssiges Material von ACTs, die Patienten aufgrund eines Knorpelschadens implantiert wurden. Die untersuchten ACTs wurden von der Firma Tetec in Reutlingen, Deutschland, hergestellt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Spenderdaten (mittleres Alter: 34,5 Jahre; Standardabweichung: 10,0 Jahre). Die ACT-Restgewebe wurden im Originalbehältnis samt Nährmedium ins Labor überführt.

**Tabelle 1: Liste der ACT-Spender**

Nummer	Alter (Jahre)	Geschlecht
# 1	31	männlich
# 2	49	männlich
# 3	42	männlich
# 4	26	weiblich
# 5	24	weiblich
# 6	49	männlich
# 7	31	männlich
# 8	31	männlich
# 9	38	weiblich
# 10	27	männlich
# 11	21	weiblich
# 12	52	weiblich
# 13	*	weiblich
# 14	28	weiblich
* konnte nicht eindeutig erfasst werden, da Patientenetikett fehlte		

## 2.7. Humaner Gelenkknorpel aus dem Kniegelenk

Der humane Gelenkknorpel für die Chondrozytenextraktion stammte aus der BG-Unfallklinik Tübingen und wurde im Rahmen diverser Operationen gewonnen. Er wurde in einer Lösung aus DMEM + GlutaMAX, PenStrep und

Fungizone bei einer Temperatur von + 4 °C postoperativ aufbewahrt. Der Knorpel wurde in der Sterilbank vom Knochen mit einem Skalpell gelöst und anschließend verdaut. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Spenderdaten (mittleres Alter: 79,0 Jahre; Standardabweichung: 3,2 Jahre)

**Tabelle 2: Liste der Knorpelspender**

Nummer	Alter (Jahre)	Geschlecht
# 1	81	männlich
# 2	80	weiblich
# 3	73	männlich
# 4	82	weiblich
# 5	79	weiblich

## **2.8. Strukturanalyse der Chondrozyten in autologen Chondrozyten-Transplantaten**

### **2.8.1. Präparation der autologen Chondrozyten-Transplantate**

Die ACT-Proben, die den Patienten bereits implantiert wurden und deren Reste uns zur Verfügung standen, waren konstant bei -25 °C im Gefrierschrank gelagert. Die weiteren Schritte der Präparation und Färbung fanden alle in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 1 statt. Für die Präparation wurde die Probe jeweils bei Raumtemperatur erwärmt, bis sich die Suspension, in der das ACT-Stück eingebettet war, verflüssigte.

Anschließend wurde der sogenannte Rest, der sich meist in der Form eines Ringes vorfand, mit einer anatomischen Pinzette aus dem Behälter entfernt und in eine Petrischale gelegt. Daraufhin wurden mit einem Einmal-Skalpell jeweils drei ca. 0,7x0,7 cm große Stücke nach Augenmaß, wenn möglich auf vier, acht und zwölf Uhr, aus dem Ring herausgeschnitten, die dann in ein 50 ml Blue Cap gegeben wurden. Die nach der Präparation übriggebliebenen ACT-Reste wurden für mögliche weitere Experimente in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wieder eingefroren und aufbewahrt.

### **2.8.2.Färbung der autologen Chondrozyten-Transplantate**

Für die Färbung wurden zunächst 5 ml phosphatgepufferte Salzlösung als Pufferlösung in die 50 ml Röhren mit den ACT-Stücken pipettiert. Im Anschluss daran wurde der Laborraum abgedunkelt und 5 µl DAPI als Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA im Zellkern der Chondrozyten bindet, hinzugegeben, sodass das Verhältnis beider Substanzen zueinander 1:1000 betrug. Im nächsten Schritt wurde das Röhren dann lichtundurchlässig in Alufolie eingewickelt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Laborschüttler gestellt.

### **2.8.3.Aufnahmen der autologen Chondrozyten-Transplantate**

Die Aufnahmen erfolgten am Axio Observer.Z1. Der angeschlossene Computer benutzte als Betriebssystem Windows XP®. Als Bearbeitungsprogramm wurde AxioVision Release 4.8.2 verwendet und die zehnfache Vergrößerung am Objektiv als Basiseinstellung. Im Bearbeitungsprogramm wurden die wie in Abbildung 4 dargestellten Grundeinstellungen vorgenommen.

Die ACT-Stücke wurden dabei mit der der Membran gegenüberliegenden Seite auf den Objektträger platziert. Grundlegend wurde für jedes der drei Stücke einer Probe eine Aufnahme ohne ApoTome (oA) angefertigt und unter bestimmten Voraussetzungen auch eine Aufnahme mit ApoTome (mA). Die Grenze für solche Aufnahmen wurde im Voraus anhand der Belichtungszeit festgesetzt, die 500 ms nicht überschreiten durfte, da die ACT-Stücke sonst während der Aufnahmen austrockneten.

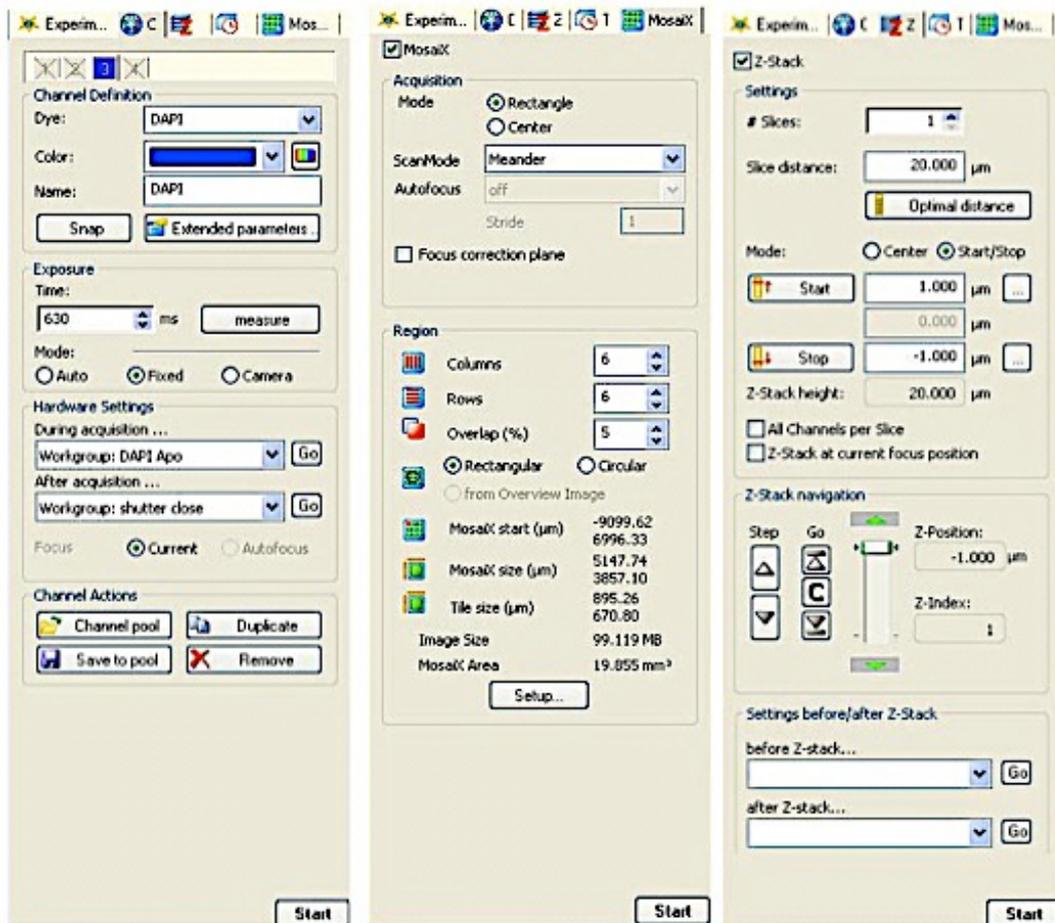


Abbildung 4: Einstellungen zur Aufnahme der Bilder am Axio Observer.Z1.

Bei dem Begriff ApoTome handelt es sich um eine extern hinzufügbare Lochblende, die dafür sorgt, dass lediglich Lichtinformationen aus der Fokusebene detektiert werden, sodass unscharfe Bereiche herausgefiltert werden und kein Signal abgeben.

Die Belichtungszeit wurde unter dem Programmpunkt *measure* individuell für jedes Stück neu eingestellt. Das Ziel war es, dass für jedes Stück mehrere Ebenen im z-Abstand von 20 µm aufgenommen wurden, wobei der *Start/Stop*-Programmpunkt so gewählt war, dass man jeweils in der tiefsten und höchsten erkennbaren scharfen Ebene war.

Ferner wurden die Kacheln im Programm so platziert, dass sie, wenn möglich, zentral im jeweiligen ACT-Stück zu liegen kamen, sodass die Ränder oder der Leerraum auf der Aufnahme nicht zu erkennen waren.

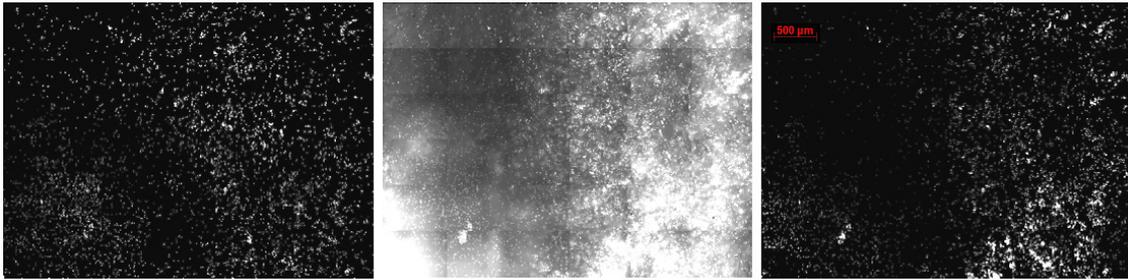
Im Anschluss an die Aufnahmen wurden die Bilder über den Programmpunkt *Convert Tile Image* konvertiert, sodass die einzelnen Kacheln der Bilder zusammengefügt und die Übergänge geglättet wurden. Es folgte die Abspeicherung im *.zvi-Format*.

#### **2.8.4. Koordinatenbestimmung der autologen Chondrozyten-Transplantate**

Die Koordinatenbestimmung erfolgte mit dem Programm ImageJ (Fiji, USA). Für die Bildbearbeitung wurden sowohl ImageJ als auch Photoshop CS6 (Adobe, USA) unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 7® (Microsoft Corporation, USA) verwendet.

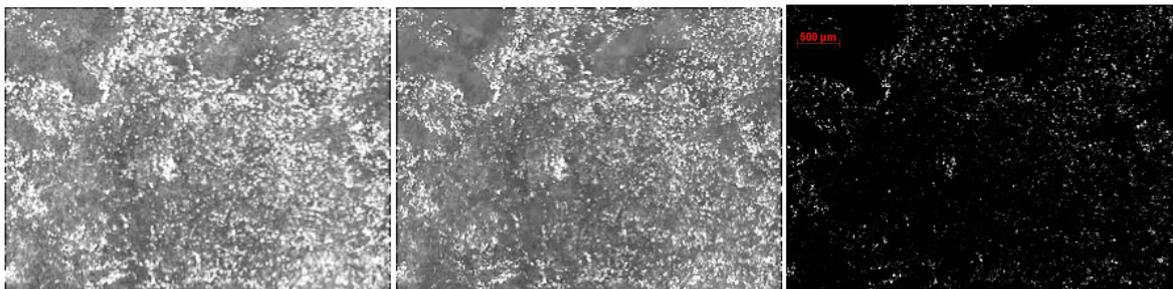
Zunächst wurden von jedem Stück drei Ebenen im Abstand von jeweils einer Ebene ausgewählt. Die Auswahl erfolgte dabei so, dass nur Ebenen aus dem mittleren Bereich des Stückes verwendet wurden, um so die Randbereiche mit wenig Zellen auszublenden. Hierbei wurden dann zwischen den Aufnahmen mit und ohne ApoTome immer entsprechend die äquivalenten Ebenen genommen, um später eine vergleichende Aussage treffen zu können. Bei den Proben ohne ApoTome richtete sich die Auswahl nach der Schärfe der Bilder. Die entsprechenden Programmpunkte bei ImageJ waren *Image* → *Stacks* → *Stack to Images*. Die Datei wurde als *.tif-Datei* abgespeichert.

Im Anschluss wurden die Bilddateien über das Programm Photoshop CS6 geöffnet und mithilfe des Programmpunktes „Gradationskurven“ in Bezug auf den Kontrast bearbeitet. Anhand dieser Bearbeitung wurden drei Klassen von Aufnahmen unterschieden (Abb. 5): Klasse 1 waren Aufnahmen mit ApoTome, Klasse 2 Aufnahmen ohne ApoTome, bei denen unscharfe Bereiche noch zu erkennen waren, und Klasse 3 Aufnahmen, bei denen der Kontrast so verstärkt wurde, dass die unscharfen Bereiche nicht mehr sichtbar waren.



**Abbildung 5: Aufnahmetechniken im Vergleich** mA (mit ApoTome), oA (ohne ApoTome) und oAk (ohne ApoTome mit Kontrastverstärkung) von links nach rechts jeweils aus derselben Ebene.

Im Anschluss wurden die Aufnahmen jeweils im Programm ImageJ geöffnet, wo die Koordinatenbestimmung stattfand. Hierzu wurden die Bilder zunächst über den Programmpunkt *Process* → *Filters* → *Gaussian Blur (Sigma Radius 2.00)* mit einem Weichzeichner, wie in Abbildung 6 dargestellt, behandelt. Daraufhin wurden die Aufnahmen nochmals in Helligkeit und Kontrast über den Programmpunkt *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast* bearbeitet.



**Abbildung 6: Exemplarischer Verlauf der Bildbearbeitung.** Jeweils Darstellung identischer Ebene in Form von Weichzeichnung, Helligkeit und Kontrast.

Im Folgenden wurden die Koordinaten über den Programmpunkt *Process* → *Find Maxima* ermittelt. Von wichtiger Bedeutung hierbei war die Einstellung der *Noise Tolerance*, die die Sensitivität angab, mit der das Programm die Lichtpunkte als Zellen identifizierte. Die Modifikation fand immer anhand von zwei verschiedenen Bildausschnitten in derselben Ebene jeweils für Aufnahmen mit und ohne ApoTome statt.

Dabei wurden für die Aufnahmen der Klasse 2 immer die Werte der *Noise Tolerance* der Aufnahmen der Klasse 3 in derselben Ebene übernommen.

Die errechneten Koordinaten wurden über *Analyze* → *Tools* → *Save XY* (*Background Value 0*) als *.txt-Datei* abgespeichert.

### **2.8.5. Statistische Auswertung**

Die Bestimmung der Daten wurde anhand von 14 Proben (N= 14) durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Zelldichte und Zellverteilung wurden die Programme R (R Foundation for Statistical Computing, Open Source Software), Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) sowie SigmaStat (Systat, USA) verwendet. Zur Berechnung der Signifikanz wurden hierbei bei normal verteilten Daten der t-Test und bei nicht normal verteilten Daten der Mann-Whitney Rank Sum-Test angewendet. Bei Analysen zur Syntheseleistung von Chondrozyten, die in unterschiedlichen Dichten eingebracht wurden, wurde der t-Test für verbundene Stichproben (Paired t-Test) benutzt.

## **2.9. Bestimmung der Zellzahl u. Syntheseleistung anhand des CyQuant-, GAG- und CPII-Assay von homogenen und gruppierten Chondrozyten**

### **2.9.1. Knorpelverdauung**

Hierzu wurde der Knorpel zunächst in zahlreiche kleine Stücke zerteilt und anschließend in ein 50 ml Blue Cap gegeben. Nachfolgend wurden die Stücke mehrmals mit PBS gespült, und zwar so lange, bis die blutigen Bestandteile herausgewaschen waren. Daraufhin wurden 5 ml Dispase, 2 ml Kollagenase XI und 8 ml Chondrozytenmedium hinzugegeben. Die Suspension lagerte dann für 24 Stunden auf einem Magnetrührer in einem Brutschrank bei 37 °C.

### **2.9.2. Herstellung der Zellkultur**

Die verdaute Suspension durchlief ein Zellsieb (100 µm) und wurde anschließend für sieben Minuten bei 7 °C und 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zusammen mit 10 ml Chondromedium in eine Zellkulturflasche überführt, die dann bei 37 °C im

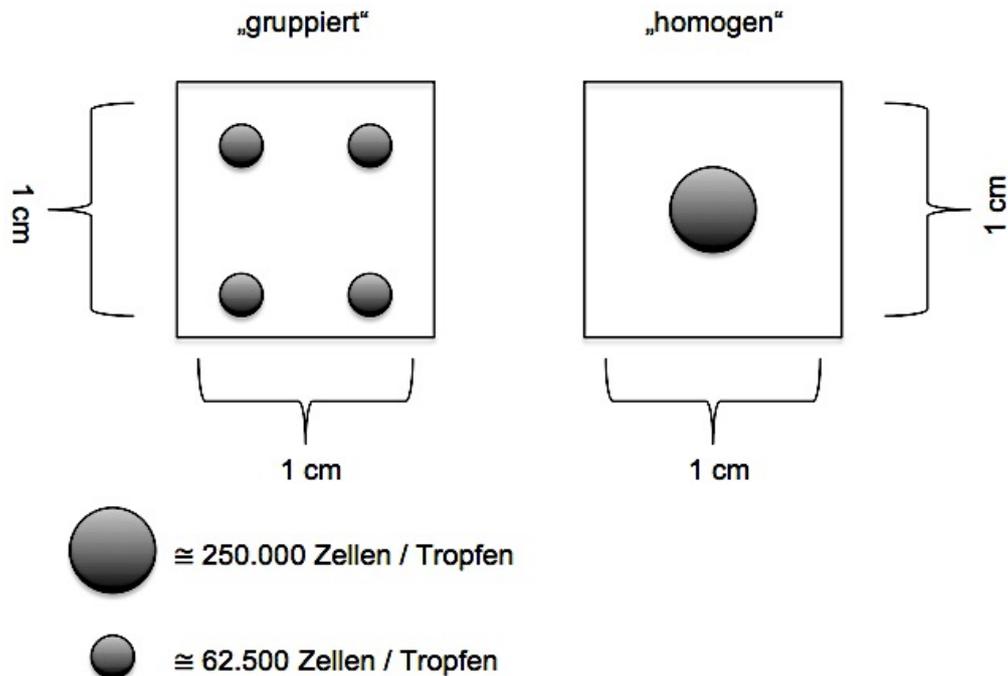
Brutschrank lagerte. Das Chondromedium wurde zweimal wöchentlich ausgetauscht. Dazu wurden 7 ml entfernt und 7 ml frisches Chondromedium wieder zugeführt.

### **2.9.3. Bestimmung der Zellzahlen der Knorpelproben**

Um die Zellzahl der Knorpelproben bestimmen zu können, wurde die gesamte Flüssigkeit aus der Zellkulturflasche abpipettiert (altes Chondromedium wurde gesammelt) und die Flasche wurde mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden 5 ml Trypsin hinzugeben, um die Chondrozyten vom Boden zu lösen. Nach ein paar Minuten wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, inwieweit sich die Zellen bereits vom Boden gelöst hatten. Im Anschluss wurde die Zellkulturflasche mit dem alten Chondromedium noch mehrmals durchgespült und die Suspension wurde dann in ein 50 ml Blue Cap gefüllt und anschließend für sieben Minuten bei 7 °C und 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zum Zellpellet wurde 1 ml Chondromedium hinzugefügt. Dann wurden 10 µl in eine Mikrotiterplatte gegeben und 10 µl Trypan-Blau Lösung beigefügt, um abgestorbene Chondrozyten zu färben, sodass diese bei der Auszählung nicht berücksichtigt werden. Anhand der vier manuell ausgezählten Quadrate innerhalb der Neubauerzählkammer wurde mit der Formel  $\text{Zellzahl}/2 \cdot 10.000$  die Zellzahl pro ml ermittelt.

### **2.9.4. Besiedlung der Kollagen-I-Matrix**

Nach Bestimmung der Zellzahl pro 1 ml und einer Aufkonzentrierung auf 500 µl, da das Fassungsvermögen der Kollagen-I-Matrix limitiert war, wurden diese, wie in Abbildung 7 dargestellt, mit jeweils 250.000 Zellen besiedelt. Für die homogene Gruppe wurde der „Zelltropfen“ zentral auf die Matrix pipettiert und für die gruppierte Gruppe jeweils in die 4 Ecken der quadratischen Matrix, sodass die Abstände zueinander maximal waren. Die jeweilige Suspensionsmenge findet sich in Tabelle 3.



**Abbildung 7: Schematische Gegenüberstellung der Besiedlung von Kollagen-I-Matrices für die homogene und gruppierte Form.**

**Tabelle 3: Suspensionsmengen zur Besiedlung** (auf 250.000 Zellen bezogen) der jeweiligen Patienten für die gruppierte und homogene Variante. Jeweils Aufkonzentrierung auf 500 µl.

Nummer	gruppiert	homogen
# 1	4 x 14,6 µl	58 µl
# 2	4 x 13,1 µl	52,4 µl
# 3	4 x 9,9 µl	39,9 µl
# 4	4 x 9,3 µl	37,2 µl
# 5	4 x 10,4 µl	41,8 µl

### 2.9.5. GAG-Assay

Sowohl für den GAG-, als auch den CPII-Assay wurden jeweils die Überstände der besiedelten Matrices eines jeweiligen Patienten über 4 Wochen gesammelt und in einer Vakuum-Zentrifuge auf 500 µl aufkonzentriert.

#### 2.9.5.1. Herstellung der DMMB-Färbelösung (500 ml)

Hierzu wurden zunächst 8 mg DMMB und 4 ml 100 %iges Ethanol in ein 50 ml Blue Cap gegeben und über Nacht auf einem Tischrüttler befestigt. Am folgenden Tag wurden 1,183 g NaCl, 1,52 g Glycin und 450 ml dH<sub>2</sub>O in einer

autoklavierten 500 ml Flasche als Suspension angelegt zu der dann noch 1 ml 10 %ige  $\text{NaN}_3$  hinzugeben wurden. Schließlich wurden die DMMB-Lösung und 4,35 ml 1 molare HCl hinzugefügt. Am pH-Meter wurde durch Titration mit HCl ein pH-Wert von 3,0 eingestellt und die restlichen 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  ergänzt. Nach Filtration mit Filterpapier ( $\varnothing$  150 mm) wurde die Suspension in zwei autoklavierte 250 ml Flaschen überführt.

#### 2.9.5.2. Herstellung des Standards

Zur Herstellung des Standards wurden 32 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  in ein 50 ml Blue Cap gegeben und 4  $\mu\text{g}$  Chondroitin-Sulfat ergänzt. Anschließend wurden 6 Reagenzien zu je 10 ml angelegt (Tab. 4):

	I	II	III	IV	V	VI
Standard (ml)	0	2	4	6	8	10
$\text{dH}_2\text{O}$ (ml)	10	8	6	4	2	0
Konzentration des Standards ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0	25	50	75	100	125

#### 2.9.5.3. Durchführung des GAG-Assay anhand des Standards

Für die Durchführung wurden jeweils 40  $\mu\text{l}$  der einzelnen Reagenzien in je 4 Kammern einer 96-Well Platte gegeben, sodass sich sechs mal vier Quadrate ergaben. Jede dieser Kammern wurde dann mit 360  $\mu\text{l}$  DMMB-Färbelösung aufgefüllt. Zusätzlich wurden noch 4 Kammern mit jeweils 360  $\mu\text{l}$  DMMB-Färbelösung als Leerwert befüllt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 515 nm mittels DMMB-Protokoll ausgewertet. Dazu wurde die Software Gen5 Data Analysis Software (Biotek, USA) unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 2000® (Microsoft Corporation, USA) verwendet. Die darauffolgende statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

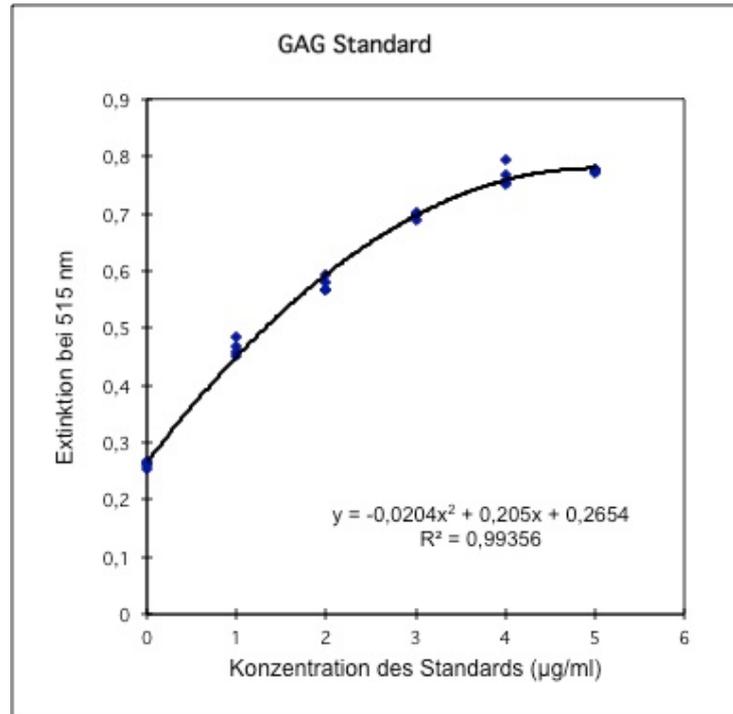


Abbildung 8: GAG-Standard

### 2.9.6.CPII-Assay

Beim CPII-Assay handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay. Hierbei wird die Konzentration des carboxyterminalen Propeptids von Pro-Kollagen-II mittels Antigen-Antikörper-Reaktion gemessen. Da Pro-Kollagen-II durch verschiedene Proteasen zu Kollagen-II gespalten wird, kann anhand der CPII-Konzentration das Ausmaß der Synthese von Kollagen-II abgeleitet werden.

In einem ersten Schritt kam es zur Antikörper-Bindung mit CPII. Hierfür werden Verdünnungsreihe, Standard und Antikörper-Verdünnung zusammengeführt (1 h Inkubation). Im zweiten Schritt wurde dann die Lösung auf eine mit Antikörpern beschichtete Platte übertragen. Nun band nur noch das freie CPII, das im ersten Schritt noch nicht gebunden wurde (2 h Inkubation). Anschließend wurde jedes Well jeweils sechsmal mit einem Waschpuffer gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die GAR-HRP-Konjugat-Lösung (100 µl pro Well) hinzugegeben. Diese bindet an die noch nicht besetzten Antikörper-Bindungsstellen auf der beschichteten Platte und emittierte später dann in Kombination mit dem TMB-Farbstoff das zu messende Signal; d.h. je weniger Signal, desto höher letztlich die CPII-Konzentration (umgekehrt proportional).

Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde wieder jedes Well sechsmal gewaschen. Daraufhin wurden jedem Well 100 µl TMB-Färbelösung hinzugegeben. Es fand es eine erneute Inkubation für 30 Minuten lichtgeschützt statt. Danach wurden jeweils 100 µl Stop Solution pro Well hinzugeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und zusätzlich einer Referenzwellenlänge von 620 nm mittels IBEX-Protokoll ausgewertet. Dazu wurde die Software Gen5 Data Analysis Software (Biotek, USA) unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 2000® (Microsoft Corporation, USA) verwendet. Die darauffolgende statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

#### **2.9.6.1. Herstellung des Waschpuffers**

Hierfür wurden 40 ml des Wash Buffer und 1 Liter dH<sub>2</sub>O zusammengeführt.

#### **2.9.6.2. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe**

Dazu wurden acht Eppendorf-Cups (2 ml) vorbereitet. In das erste Eppendorf-Cup wurden 320 µl Buffer III und 80 µl CPII Standard pipettiert. Anschließend wurden in die sieben verbliebenen Eppendorf-Cups jeweils 200 µl Buffer III gegeben. Die Verdünnungsreihe bildet sich nun durch Übertragung von 200 µl aus dem ersten Eppendorf-Cup in das zweite ab. Dieser Vorgang wurde weitere fünf mal jeweils für das nächste Eppendorf-Cup durchgeführt, sodass nur das letzte Eppendorf-Cup allein die Puffer-Lösung enthielt.

#### **2.9.6.3. Herstellung der Antikörper-Verdünnung**

Hierfür wurden 58 µl CPII Antibody und 7 ml Assay Buffer zusammengeführt.

#### **2.9.6.4. Herstellung der GAR-HRP-Konjugat-Lösung**

Hierfür wurden 50 µl GAR-HRP und 11 ml Buffer III zusammengeführt.

## **2.9.7. CyQUANT-Assay**

### **2.9.7.1. Kollagen-I-Matrix Verdau**

Dafür wurde die besiedelte Kollagen-I-Matrix zunächst von der Well-Platte in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 60 µl dH<sub>2</sub>O aufgefüllt bevor anschließend 5 µl Proteinase K zur Verdauung hinzugefügt wurden (Verhältnis 12:1). Nach 7 Minuten im Thermomixer bei 55 °C und 650 rpm wurde die Suspension anschließend nochmal für 7 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt und bis zur Durchführung des CyQUANT-Assay bei -24 °C im Gefrierschrank gelagert.

### **2.9.7.2. Herstellung der Verdünnungsreihe**

Hierfür wurde zunächst anhand einer verdauten ACT-Probe eines 24-jährigen männlichen Patienten die Zellzahl pro ml bestimmt. Anschließend wurde anhand dieser Werte eine 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 200000 Zellen pro 50 µl angelegt bei der die Zellen in HBSS buffer aufgenommen wurden. Es fand jeweils eine Doppelbestimmung statt

### **2.9.7.3. Herstellung der Reaktionslösung**

Zugabe von 8 µl CyQUANT NF dye reagent zu 2 ml HBSS buffer

### **2.9.7.4. Durchführung des CyQUANT-Assay**

Zugabe von jeweils zwei mal 50 µl der Verdünnungsreihe auf eine 96 Well-Platte sowie jeweils der in HBSS buffer aufgenommenen Zellpellets der Patienten. Anschließend wurden in jedes der Wells 50 µl Reaktionslösung gegeben. Daraufhin fand eine Inkubation über 60 Minuten im Brutschrank bei 37 °C statt.

Mittels Monochromator wurden bei einer Extinktion von 450 nm und einer Emission von 535 nm die einzelnen Wells ausgewertet. Verwendet wurde dabei die Software Magellan (Version 7.1, Tecan, Schweiz) unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 7® (Microsoft Corporation, USA)

## **2.10. Bestimmung der GAG-Verteilung mittels Alcianblau-Färbung**

### **2.10.1. Herstellung der Alcianblau-Färbelösung**

Dazu wurden 1 ml 1%ige Alcianblau-Lösung und 3%-ige Essigsäure in ein 50 ml Blue Cap überführt bis der pH-Wert der Lösung 2,5 betrug. Anschließend wurde das Blue Cap mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

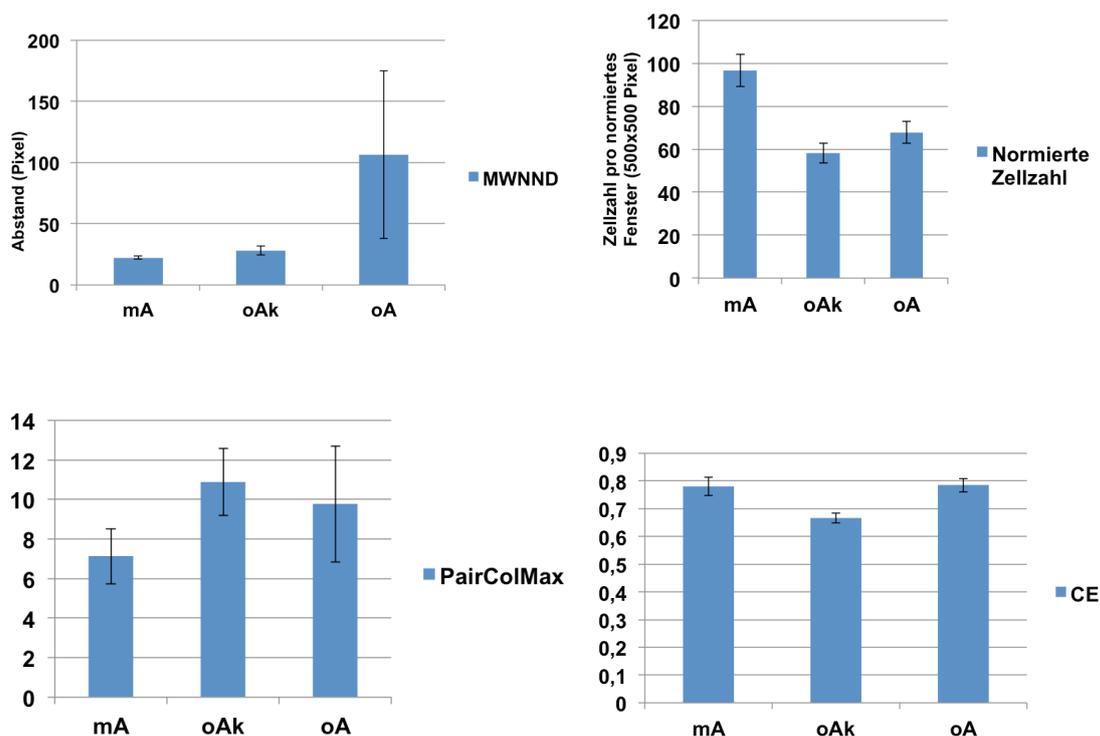
### **2.10.2. Färbung der Kollagen-I-Matrix**

Zunächst wurde die Matrix mehrmals mit PBS in der Well-Platte gewaschen. Daraufhin wurde soviel Alcianblau-Lösung in das Well gegeben, bis die Matrix komplett von der Lösung überdeckt war. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten. Im Anschluss wurde die gefärbte Matrix mehrmals mit PBS gewaschen bis die Flüssigkeit im Well wieder klar war. Nun wurde sie mit einer Canon SLR-Digitalkamera mit Marko-Objektiv fotografiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vergleich der Aufnahmequalitäten mit und ohne ApoTome bzw. ohne ApoTome mit verstärktem Kontrast

Alle drei Aufnahmetechniken konnten grundlegend die unterschiedlichen Parameter zur Beurteilung der ACT-Proben aufzeigen. Es zeigten sich sowohl Unterschiede in den normierten Zellzahlen, der Nearest Neighbor Distance (NND) als auch in den Indices für die Chondrozytenorganisation, die durch den Clark-Evans Index (CE) und die Pair Correlation Function (PCF) vermittelt werden (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Synoptische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten ACT-Proben (n = 14), bezogen auf ausgewählte Parameter: normierte Zellzahl, Clark-Evans Index (CE - einheitslos), Mittelwert der Nearest Neighbor Distance (MWNNND), wobei ein Pixel 0,65µm x 0,65µm entsprechen und PairColMax (Wert des Maximums der Paarkorrelationsfunktion). Die entsprechenden Signifikanz sind in Tabelle 5 aufgezeigt.

Umgerechnet auf 1 cm<sup>2</sup> ergibt sich aus den normierten Zellzahlen für die untersuchten ATC-Stücke eine Zellzahl zwischen approximativ 60.000 - 100.000 Zellen pro 1 cm<sup>2</sup> unabhängig von der Aufnahmequalität:

$$\frac{60 - 100 \text{ Zellen}}{325 \times 325 \mu\text{m}} = \frac{60 - 100 \text{ Zellen}}{325 * 10^{-4} \text{cm} \times 325 * 10^{-4} \text{cm}} = \frac{60 - 100 \text{ Zellen}}{325 \times 325 \text{ cm} * 10^{-8}}$$

$$= \frac{60 - 100 \text{ Zellen} * 10^{-8}}{325 \times 325 \text{ cm}^2} \approx 56800 - 94675 \text{ Zellen/cm}^2$$

Speziell die NND bei den oA-Aufnahmen verdeutlicht die gestreuten Signale, die im Zuge des Hintergrundrauschens bei Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop (FM) ohne ApoTome entstehen, die bei den anderen Bildqualitäten durch die Lochblende (mA) bzw. die Kontrastverstärkung (oAk) abgefangen werden. Letzteres erklärt u.a., warum die normierte Zellzahl bei den oAk-Aufnahmen geringer ist als bei den oA-Aufnahmen mit Rückblick, dass bei beiden dieselbe *Noise Tolerance* bei der Koordinatenerfassung verwendet wurde. Die signifikanten Unterschiede (p < 0,05) sind in Tabelle 5 dargestellt (n = 14).

**Tab. 5: Signifikanz der Aufnahmequalitäten bzgl. spezifischer Zellverteilungsmuster**

Vergleichspaar	MedianNND	MWNND	Normierte Zellzahl	xPairColMax	PairColMax	CE
mA → oAk	n.s.	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05
mA → oA	p < 0,05	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	n.s.
oAk → oA	p < 0,05	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,05	p < 0,05

### 3.2. Unterschiede innerhalb der mA-Gruppe nach aufsteigendem Clark-Evans Index

Im Folgenden wurden zum einen die 14 Proben anhand des CE und zum anderen bezüglich der normierten Zellzahl aufsteigend jeweils in 2 Gruppen aufgeteilt, um innerhalb dieser Gruppen nach signifikanten Unterschieden zu

suchen. Dieses Prozedere wurde sowohl mit den mA- als auch mit den oAk-Aufnahmen durchgeführt.

Tabelle 6 zeigt, dass, unabhängig von der räumlichen Anordnung der Chondrozytenkerne, die Zellzahl nicht signifikant unterschiedlich ist. Daher ist anzunehmen, dass sich die Proben primär in der Anordnung von gruppiert bis hin zu homogen unterscheiden und die Zellzahl als Einflussgröße zu vernachlässigen ist. Entsprechend finden sich signifikante Unterschiede im PairColMax, der ebenfalls ein Maß für die räumliche Anordnung ist.

<b>Tab. 6: Signifikanz der mA-Aufnahmen nach aufsteigendem CE-Index</b>					
Gruppe 1: CE von 0,45-0,85; Gruppe 2: CE von 0,88-0,99					
Vergleichspaar	MedianNND	MWNND	Normierte Zellzahl	xPairColMax	PairColMax
Gr. 1 → Gr. 2	p= 0,003	n.s.	n.s.	p= 0,006	p= 0,002

### **3.3. Unterschiede innerhalb der oAk-Gruppe nach aufsteigendem Clark-Evans Index**

Innerhalb der oAk-Gruppe zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied bezüglich der normierten Zellzahl, jedoch, wie auch in der mA-Gruppe, ein signifikanter Unterschied im PairColMax (Tab. 7).

<b>Tab. 7: Signifikanz der oAk-Aufnahmen nach aufsteigendem CE-Index</b>					
Gruppe 1: CE von 0,46-0,66; Gruppe 2: CE von 0,68-0,81					
Vergleichspaar	MedianNND	MWNND	Normierte Zellzahl	xPairColMax	PairColMax
Gr. 1 → Gr. 2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p= 0,002

### **3.4. Unterschiede innerhalb der mA-Gruppe nach aufsteigend normierter Zellzahl**

Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, dass der Faktor Zellzahl keinen signifikanten Einfluss auf die anderen Zellverteilungsparameter hat.

<b>Tab. 8: Signifikanz der mA-Aufnahmen nach aufsteigend normierter Zellzahl</b>					
Gruppe 1: CE von 15,3-96,9; Gruppe 2: CE von 97,9-163,3 Zellzahl pro normiertem Fenster					
Vergleichspaar	MedianNND	MWNND	CE	xPairColMax	PairColMax
Gr. 1 → Gr. 2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

### 3.5. Unterschiede innerhalb der oAk-Gruppe nach aufsteigend normierter Zellzahl

Ebenso zeigt sich hier, dass die Zellzahl keinen signifikanten Einfluss auf die restlichen Parameter nimmt, wie in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Signifikanz der oAk-Aufnahmen nach aufsteigend normierter Zellzahl					
Gruppe 1: CE von 5,9-54,4; Gruppe 2: CE von 60,2-94,0 Zellzahl pro normiertem Fenster					
Vergleichspaar	MedianNND	MWNND	CE	xPairColMax	PairColMax
Gr. 1 → Gr. 2	n.s.	n.s.	n.s.	p< 0,001	n.s.

### 3.6. Besiedlung der Kollagen-I-Matrix

Exemplarisch konnte anhand von zwei weiteren besiedelten Matrices fluoreszenzmikroskopisch mit einer DAPI-Färbung gezeigt werden, dass die Zellen am 23. Tag nach ihrer Besiedlung noch in ihrer homogenen (Abb. 10) bzw. ihrer gruppierten (Abb. 11) Gruppierung vorlagen, und dass es nicht zur Durchmischung auf der gesamten Matrix gekommen war. Somit ändert die Inkubationsdauer nicht die räumliche Verteilung.

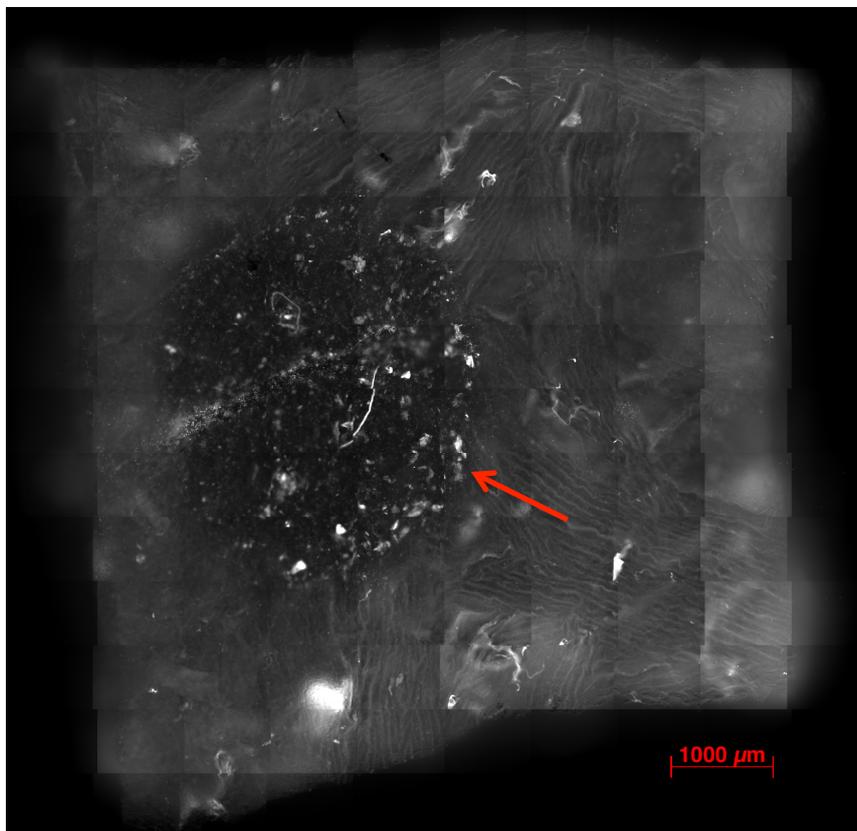


Abbildung 10: DAPI-Färbung der homogen besiedelten Kollagen-I-Matrix

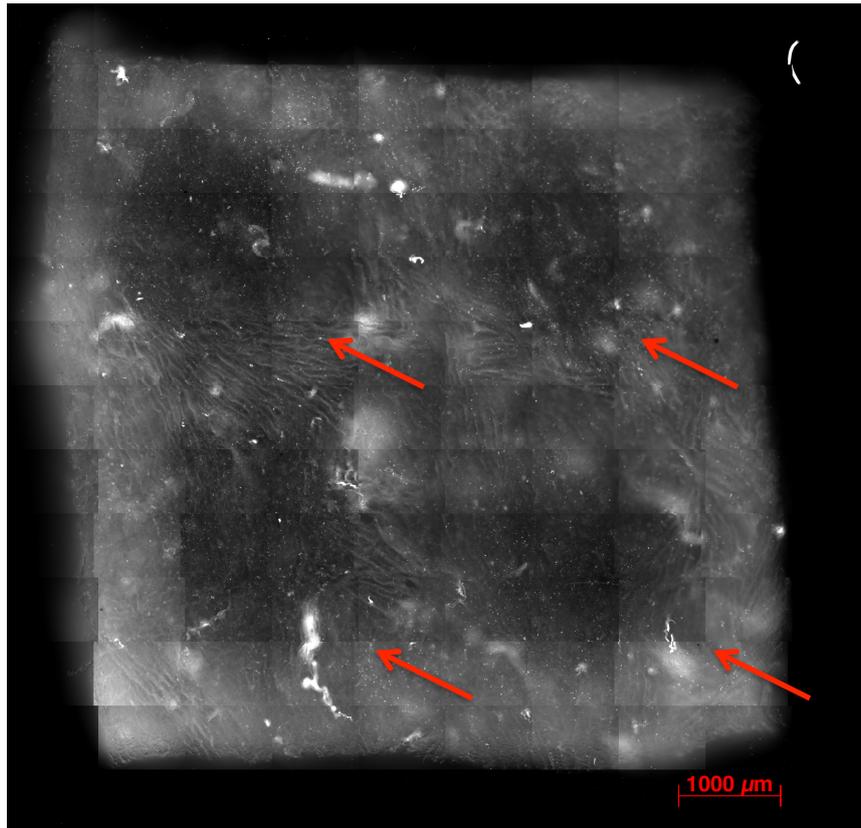


Abbildung 11: DAPI-Färbung der gruppiert besiedelten Kollagen-I-Matrix

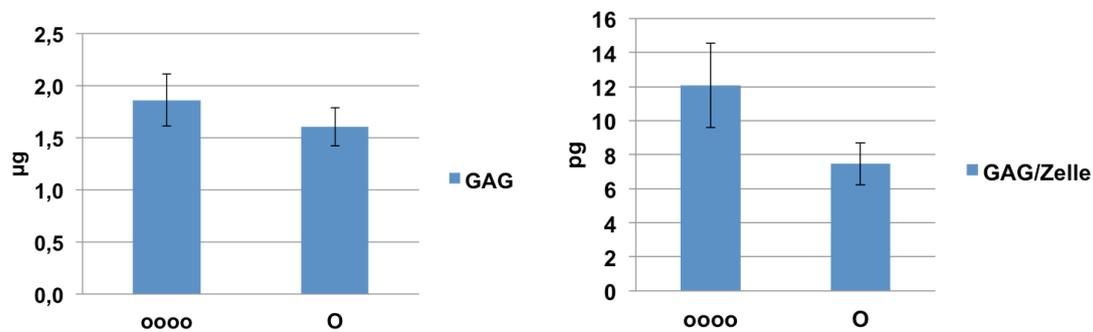
### 3.7. Flächenbestimmung der gruppiert und homogen verteilten Chondrozyten-Areale

Um die Größen der zellbesiedelten Areale in der Aufsicht zu bestimmen, wurde der Flächeninhalt anhand der Formel  $A = \pi * r^2$  der vier gruppierten Kreisflächen mit dem Flächeninhalt der homogen verteilten Kreisfläche verglichen. Da die vier homogenverteilten Areale anhand eines Volumens hergestellt wurden, welches ein Viertel des Volumens der gruppierten Areale betrug, wurde erwartet, dass die Summe der vier kleineren, homogen verteilten Flächeninhalte etwa dem Flächeninhalt der gruppierten Areale entsprach. Dies war jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich eine um den Faktor 1,25 größere Fläche für das homogene Verteilungsmuster. Anders gesagt, hatten die kleineren gruppierten Areale einen 0.8-fachen Flächeninhalt der homogenen Areale. Hierdurch lässt sich näherungsweise schließen, dass lokal unterschiedliche Zelldichten vorlagen, da die eingebrachten Volumina sich

anders verhielten als erwartet. Aufgrund der bestimmten Flächeninhalte schienen die gruppierten Verteilungsmuster aufgrund der relativ kleinen Fläche eine höhere Zelldichte zu haben. Dies ist jedoch nur eine Näherung, welche den 3D-Aspekt vernachlässigt.

### 3.8. GAG-Assay

Die GAG-Syntheseleistung zwischen den Verteilungsmustern homogen und gruppiert war signifikant unterschiedlich ( $p= 0,047$ ) für die GAG-Synthese pro Zelle, aber nicht für die absolute GAG-Menge (Abb. 12).



**Abbildung 12: Mittelwert und Standardfehler der GAG-Syntheseleistung nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo).** Zum einen gesamt betrachtet und zum anderen in Bezug auf eine einzelne Zelle bei  $n=5$ .

### 3.9. CPII-Assay

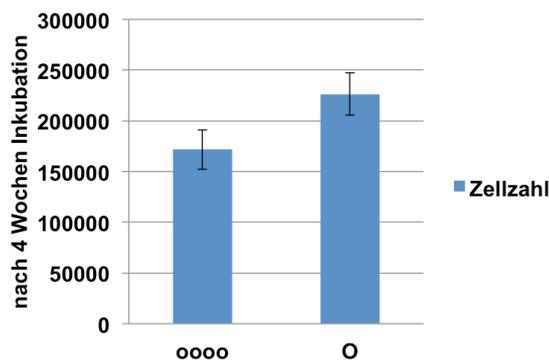
Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Syntheseleistung für CPII zwischen den Verteilungsmustern homogen und gruppiert gezeigt werden (absolute Menge:  $p= 0,100$ ; CPII pro Zelle:  $p= 0,103$ ) (Abb. 13).



**Abbildung 13: Mittelwert und Standardfehler der CII-Syntheseleistung nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo).** Zum einen gesamt betrachtet und zum anderen in Bezug auf eine einzelne Zelle bei n=5.

### 3.10. CyQUANT-Assay

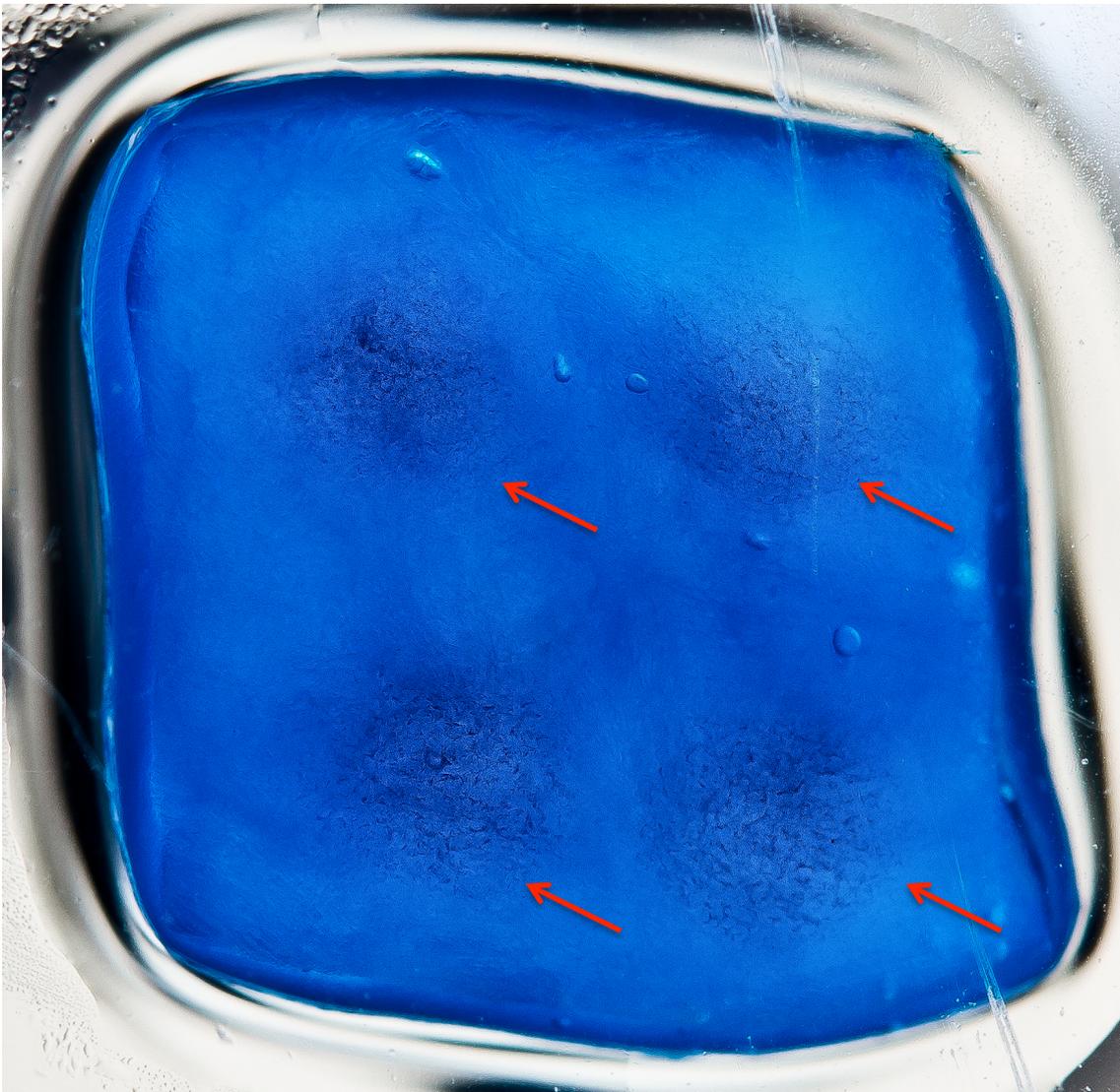
Mit diesem Assay konnte nachgewiesen werden, wie viele Zellen sich nach 4 Wochen Inkubationszeit noch in den jeweiligen Kollagen-I-Matrices befanden. Signifikante Unterschiede konnten trotz quantitativ unterschiedlicher mittlerer Zellzahlen in den beiden Varianten homogen und gruppiert nicht dargestellt werden ( $p > 0,05$ ). Festzuhalten ist, dass es ausgehend von den ursprünglich 250.000 besiedelten Zellen keinen Zuwachs, sondern einen Verlust von Chondrozyten gab (Abb. 14).



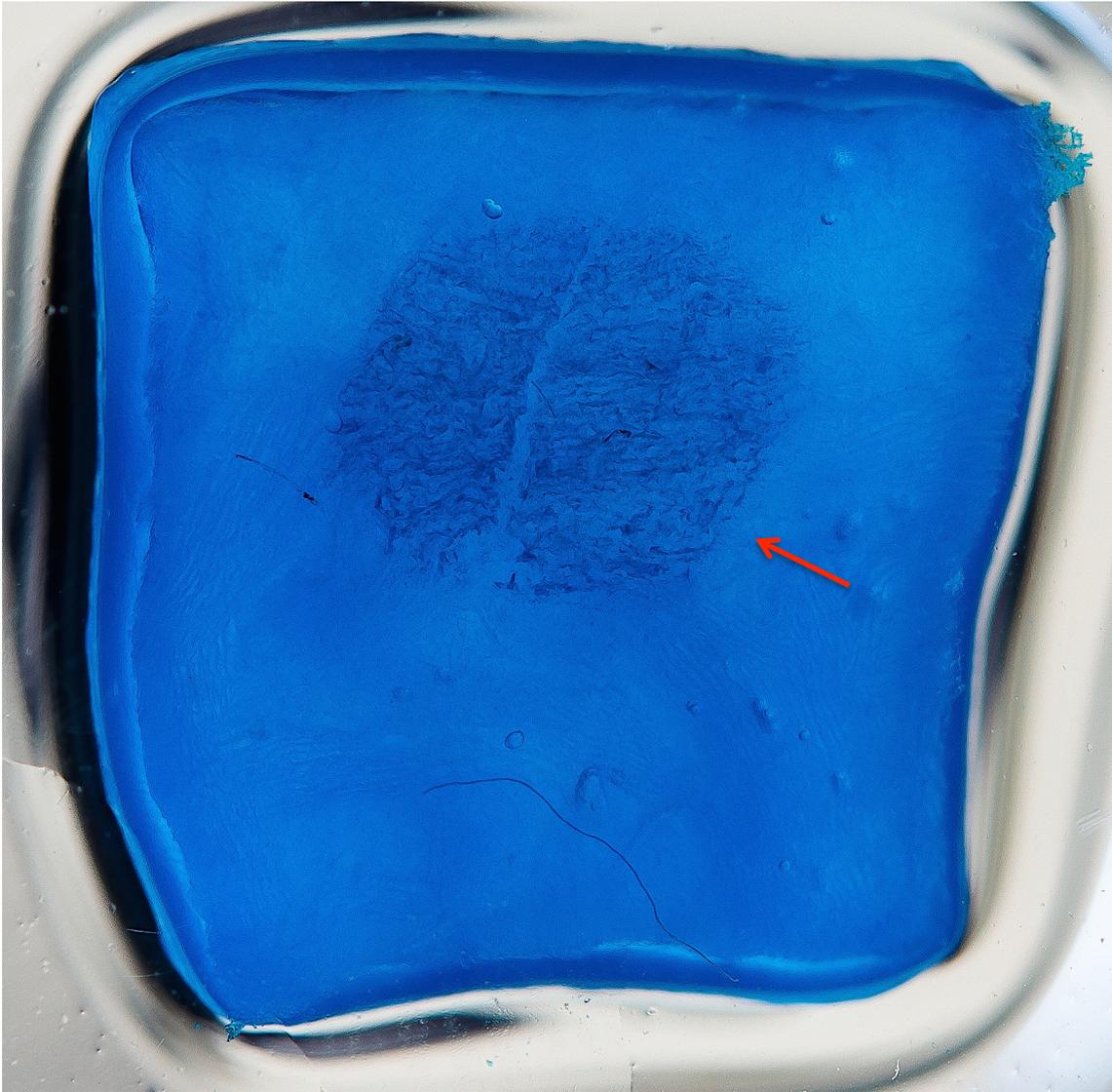
**Abbildung 14: Mittelwert und Standardfehler der Zellzahl nach 4 Wochen Inkubationszeit bei der homogenen Variante (O) und der gruppierten Variante (oooo).** Zum einen gesamt betrachtet und zum anderen in Bezug auf eine einzelne Zelle bei n=5.

### 3.11. Alcianblau-Färbung

In Zusammenschau mit den Ergebnissen unter Punkt 3.6 konnte hiermit gezeigt werden, dass die GAG-Synthese räumlich mit der Verteilung der Chondrozyten gekoppelt ist. Dies zeigt in unserem Experiment auch, dass die Zellen nach Implantation am selbigen Ort bleiben und es anschließend nicht zu einer homogenen Besiedlung kommt. In Abbildung 15 und 16 zeigen die jeweils dunkelblau gefärbten Areale GAG. Unter Berücksichtigung des Besiedlungsschemas aus Abbildung 7 ist dabei die Unterscheidung von gruppiert zu homogen zu erkennen.



**Abbildung 15: Alcianblau Färbung einer vierfach besiedelten Kollagen-I-Matrix.** Dunkelblau imponiert dabei die GAG-Färbung.



**Abbildung 16: Alcianblau Färbung einer einfach besiedelten Kollagen-I-Matrix. Dunkelblau imponiert dabei die GAG-Färbung.**

## **4. Diskussion**

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Residualanteile von bereits implantierten autologen Chondrozyten-Transplantaten unter folgenden Fragestellungen zu untersuchen: Unterscheiden sich die humanen ACTs in Parametern der räumlichen Verteilung wie Zellzahl, Zelldichte und Zellverteilung? Hierzu war es zunächst notwendig, drei differente Mikroskopieaufnahmetechniken zur Visualisierung der räumlichen Verteilung mit Fokus auf Sensitivität, Abbildungsleistung und mögliche praktikable Umsetzung im klinischen Alltag vergleichend zu analysieren und zu bewerten. Einleitend ist festzustellen, dass es gegenwärtig keinen etablierten Goldstandard für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von ACTs gibt.

Die in der vorgelegten Arbeit verwendeten Aufnahmetechniken konnten sämtliche Parameter wie Zellzahl und räumliche Organisation der Chondrozyten im Implantat herausarbeiten und analysieren. Summa summarum lassen sich nach aktuellem Erkenntnisstand die verschiedenen Aufnahmetechniken dahingehend bewerten, dass die mA-Aufnahmen aufgrund ihrer langen Belichtungszeit infolge der Verwendung des ApoTome für die klinische Anwendung eine untergeordnete Rolle spielen. Darüberhinaus zeigten die oA-Aufnahmen teils sehr häufig überbelichtete Areale, sodass sie partiell nicht auswertbar waren. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die oAk-Aufnahmen, sofern automatisierte Kontrastoptimierungen normalisiert etablierbar wären, die beste Methode zur retrospektiven Beurteilung der Qualität einer ACT-Probe darstellen, zumal sich in der statistischen Auswertung keine der drei Aufnahmetechniken als qualitativ hochwertigste herausstellte. Klinisch wünschenswert ist insbesondere die Ausarbeitung einer präzisen, präoperativen Bewertungsmethode, um ein möglichst optimales klinisches Outcome für den Patienten zu gewährleisten und möglicherweise gute ACTs von schlechten ACTs bereits vor der Implantation zu unterscheiden. Hier könnte zukünftig das Live Imaging eine Rolle spielen. Einerseits durch die Etablierung geeigneter Lebendfarbstoffe, die keinen Einfluss auf den Zellmetabolismus und deren Expression, sowie die Qualität der ACT nehmen, sodass auch nach Färbung und Durchsicht am Mikroskop, eine für den

Patienten hinreichend gute Implantation gewährleistet ist. Andererseits die Etablierung vielversprechender Techniken wie Second Harmonic Generation Multiphotonenmikroskopie, bei der sowohl die Zellen, als auch weitere Einflussgrößen wie EZM und PZM anhand unterschiedlich benutzter Wellenlänge im Gewebe ohne Färbung lebend dargestellt werden können [69]. In Bezug auf Parameter wie Zellzahl und Expression bestimmter biochemischer Stoffe mit Blick auf das Tissue Engineering ist die Datenlage aktuell noch überschaubar. In einer Studie von Pietschmann et al [70] wird berichtet, dass die Zellzahl implantierter Zellen für das klinische Outcome ein Jahr nach Implantation keine positive Korrelation aufzuweisen scheint. Dies passt zu unseren Beobachtungen, dass die Zellzahl eine nur untergeordnete Rolle spielt, da sich die untersuchten ACT-Proben nicht signifikant in ihrer Zellzahl unterscheiden haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk auf die räumliche Organisation der Chondrozyten gelegt. Es konnte herausgearbeitet werden, dass von ACT zu ACT vor allem Unterschiede in Form von stark gruppierten Chondrozyten vs. homogen verteilten Chondrozyten vorlagen. Diese Verteilungsmuster führten zu der Fragestellung, ob sich diese Unterschiede auch in der Ausbildung einer funktionierenden EZM zwischen diesen beiden Gruppen bemerkbar machen. Dafür wurden experimentell die CPII- und GAG-Synthese nach 4 Wochen Inkubationszeit der Chondrozyten in einer Kollagen-I-Matrix jeweils vergleichend zwischen den Varianten gruppiert und homogen bestimmt.

Einige Studien haben diesbezüglich als Indikator die CD44- und Aggrekan Expression sowie die Kollagen Typ-II-Synthese bestimmt und konnten einen positiven Einfluss auf die Funktion der autologen Chondrozyten-Transplantate unabhängig von der räumlichen Organisation in Bezug auf die allgemeine Zellqualität aufzeigen [71, 72].

Diese Arbeit zeigt, dass die GAG-Syntheseleistung pro Zelle in der gruppierten Verteilung signifikant höher als in der homogen verteilten Gruppe war. Die Gesamt-GAG-Syntheseleistung war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Daher ist eine Wiederholung dieses Experiments mit einer größeren Anzahl an

besiedelten Matrices wünschenswert. Trotz einer Zelldichte- und volumen-normalisierten Besiedlungstechnik unterschieden sich aus unbekanntem Gründen die homogen vs. gruppiert besiedelten ACTs nach 4 Wochen in der Größe der zellbesiedelten Flächen, was auf lokale Unterschiede in der Zelldichte hinwies. Möglicherweise könnte eine solche höhere Zelldichte in der gruppierten Verteilung einen Einfluss auf die quantitative Syntheseleistung haben, was auch in der Literatur beschrieben ist [73]. Die Kollagensynthese, gemessen an CPII, war weder absolut noch pro Zelle zwischen den beiden Verteilungen signifikant unterschiedlich. Dies zeigt in den hier gewählten Bedingungen, dass unterschiedliche Zellverteilungen keinen Einfluss auf die Kollagensynthese hatten.

Als Nächstes wurde die Frage gestellt, ob unterschiedliche Zellverteilungen einen Einfluss auf die Deposition neu synthetisierter Matrixmoleküle hatten. Eine wichtige, reproduzierbare Beobachtung war der Befund, dass die Chondrozyten jeweils am Implantationsort verblieben und eine sekundäre homogene Implantatbesiedlung in dieser Experimentalanordnung ausblieb. Dieses Verhalten der Chondrozyten generierte die konsequente Frage, ob es eine Analogie mit der EZM-Ausbildung gibt. So konnte durch die Alcianblau-Färbung der Nachweis erbracht werden, dass die GAG-Synthese streng räumlich mit der Verteilung der Chondrozyten assoziiert war.

Diese Befunde erlauben die Schlussfolgerung, dass die Synthese einer neuen EZM an zellbesiedelte Implantatareale gekoppelt ist. Zellfreie bzw. zellarme Areale können, basierend auf den hier vorgestellten Daten, mit deutlichen Unterschieden in der räumlichen Verteilung der neusynthetisierten EZM-Moleküle einhergehen. Dies könnte sich möglicherweise auf das klinische Outcome einer ACT-Implantation auswirken. Die Einflussgröße „räumliche Zellverteilung“ ist daher ein relevanter Faktor, der in der Zukunft weiterhin untersucht werden sollte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die räumliche Verteilung der Chondrozyten im Transplantat ein wesentlicher Faktor der zu erwartenden Verteilung neu synthetisierter Matrixkomponenten ist. Deshalb würde ein präoperatives Staging einer jeden ACT vor allem im Hinblick auf die räumliche

Verteilung der Chondrozyten in Verbindung mit dem resultierenden Langzeitverlauf vielversprechende Erkenntnisse bringen. Aufgrund der vorliegenden Arbeit ist die Aufnahmetechnik ohne ApoTome mit Kontrastoptimierung zur Visualisierung der räumlichen Verteilung im Transplantat hierzu die geeignetste Methode. In der Zukunft könnte dies klinisch z. B. mit modernen Methoden zum Live Imaging verwirklicht werden.

## **5. Zusammenfassung**

In der hier vorliegenden Arbeit wurden anhand von Residuen bereits implantierter humaner autologer Chondrozytentransplantaten die Unterschiede in Zellzahl, Zelldichte und Zellverteilung unter Berücksichtigung dreier differenter Mikroskopieaufnahmetechniken zur Visualisierung der räumlichen Verteilung mit Fokus auf Sensitivität, Abbildungsleistung und mögliche praktikable Umsetzung untersucht. Darüberhinaus entwickelte sich aus diesen Untersuchungsergebnissen die Fragestellung nach Unterschieden in der biochemischen Syntheseleistung von Glykosaminoglykanen und Pro-Collagen II C-Propeptiden zwischen zahlenmäßig äquivalent gruppiert und homogen verteilten Chondrozyten in einer Kollagen-I-Matrix.

Die hier untersuchten Parameter (Zellzahl, räumliche Organisation der Chondrozyten anhand des Clark-Evans Index, der Pair Correlation Function und der Nearest Neighbor Distances) konnten durch alle drei zum Einsatz gekommenen Aufnahmetechniken quantitativ im Implantat erfasst werden.

Aufnahmen ohne ApoTome waren, sofern automatisierte Kontrastoptimierungen normalisiert etablierbar wären, die beste Methode zur Beurteilung organisationsrelevanter Parameter in den ACTs. Bezüglich der GAG- und CPII-Syntheseleistung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Menge zwischen gruppierten und homogenen Verteilungsmustern. Ausnahme war die GAG-Syntheseleistung pro Zelle, bei der die Synthese in der gruppierten Verteilung höher war. Dies konnte auf Unterschiede in der lokalen Zelldichte zurückgeführt werden.

Von besonderer Bedeutung war der Beobachtung, dass die Deposition neu synthetisierter EZM-Moleküle an die lokale Zellverteilung gekoppelt war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine homogene Zellverteilung im Transplantat zu einer homogenen Verteilung neu synthetisierter EZM-Moleküle führen würde.

Zusammenfassend identifizierte die vorliegende Arbeit räumliche Unterschiede innerhalb der ACTs und damit auch einhergehend räumliche Unterschiede in der Deposition einer Neo-Matrix, die streng räumlich an die Chondrozytenverteilung gekoppelt waren. Zur mikroskopischen Quantifizierung der untersuchten Parameter eignet sich hierzu insbesondere die Aufnahmetechnik ohne ApoTome mit Kontrastoptimierung.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Kuettner, K.E., M.B. Aydelotte, and E.J. Thonar, Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl*, 1991. 27: p. 46-8.
2. Metz, J., Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. Gelenkknorpeldefekte. Steinwachs M (Hrsg.) Steinkoff, 2001: p. 3-14.
3. Aydelotte, M.B. and K.E. Kuettner, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res*, 1988. 18(3): p. 205-22.
4. Jadin, K.D., et al., Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3d imaging and analysis. *J Histochem Cytochem*, 2005. 53(9): p. 1109-19.
5. Maroudas, A. and M. Venn, Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. II. Swelling. *Ann Rheum Dis*, 1977. 36(5): p. 399-406.
6. Nieminen, M.T., et al., T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magn Reson Med*, 2001. 46(3): p. 487-93.
7. Venn, M. and A. Maroudas, Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. *Ann Rheum Dis*, 1977. 36(2): p. 121-9.
8. Burr, D.B., Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12 Suppl A: p. S20-30.
9. Lüllmann-Rauch, R., Taschenlehrbuch Histologie. Thieme Stuttgart, 2009. 3. Auflage: p. 142.
10. Chen, A.C., et al., Depth- and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression. *J Biomech*, 2001. 34(1): p. 1-12.
11. Klein, T.J., et al., Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *J Biomech*, 2007. 40(1): p. 182-90.

12. Schinagl, R.M., et al., Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *J Orthop Res*, 1997. 15(4): p. 499-506.
13. Buschmann, M.D. and A.J. Grodzinsky, A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *J Biomech Eng*, 1995. 117(2): p. 179-92.
14. Hosseini, S.M., et al., The importance of superficial collagen fibrils for the function of articular cartilage. *Biomech Model Mechanobiol*, 2014. 13(1): p. 41-51.
15. Lu, X.L. and V.C. Mow, Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc*, 2008. 40(2): p. 193-9.
16. Poole, C.A., et al., Chondrons from articular cartilage (II): Analysis of the glycosaminoglycans in the cellular microenvironment of isolated canine chondrons. *Connect Tissue Res*, 1990. 24(3-4): p. 319-30.
17. Rolauffs, B., et al., Regenerative Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, Thieme Stuttgart, 2009. 4: p. 339-54.
18. Martel-Pelletier, J., et al., Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008. 22(2): p. 351-84.
19. Responde, D.J., R.M. Natoli, and K.A. Athanasiou, Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Crit Rev Biomed Eng*, 2007. 35(5): p. 363-411.
20. Brittberg, M., et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 889-95.
21. Jay, G.D., et al., Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *J Orthop Res*, 2001. 19(4): p. 677-87.
22. Lee, D.A., et al., Response of chondrocyte subpopulations cultured within unloaded and loaded agarose. *J Orthop Res*, 1998. 16(6): p. 726-33.
23. Meachim, G. and R. Stockwell, *The matrix, in Adult Articular Cartilage*. Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1979: p. 1-67.

24. Schumacher, B.L., et al., A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 311(1): p. 144-52.
25. Hunziker, E.B., T.M. Quinn, and H.J. Hauselmann, Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(7): p. 564-72.
26. Stockwell, R.A., The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat*, 1967. 101(Pt 4): p. 753-63.
27. Kim, A.C. and M. Spector, Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res*, 2000. 18(5): p. 749-55.
28. Eger, W., et al., Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences. *J Orthop Res*, 2002. 20(3): p. 526-34.
29. Rolaufts, B., et al., Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *J Struct Biol*, 2008. 162(2): p. 335-44.
30. Rolaufts, B., et al., Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(2): p. 489-98.
31. Peterson, L., et al., Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A Suppl 2: p. 17-24.
32. Anderson, D.D., et al., Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*, 2011. 29(6): p. 802-9.
33. Chen, C.T., et al., Time, stress, and location dependent chondrocyte death and collagen damage in cyclically loaded articular cartilage. *J Orthop Res*, 2003. 21(5): p. 888-98.
34. Hunter, W., Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(317): p. 3-6.
35. Niemeyer, P., et al., [Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: a guideline by the working group "Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (DGOU)]. *Z Orthop Unfall*, 2013. 151(1): p. 38-47.

36. Pena, E., et al., Effect of the size and location of osteochondral defects in degenerative arthritis. A finite element simulation. *Comput Biol Med*, 2007. 37(3): p. 376-87.
37. Brittberg, M., ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation System. 3rd ICRS Meeting. Göteborg, Sweden, 2000.
38. Harris, J.D., et al., Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. 92(12): p. 2220-33.
39. Knutsen, G., et al., A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 2007. 89(10): p. 2105-12.
40. Saris, D.B., et al., Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med*, 2008. 36(2): p. 235-46.
41. Alford, J.W. and B.J. Cole, Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med*, 2005. 33(3): p. 443-60.
42. Steadman, J.R., et al., Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 2003. 19(5): p. 477-84.
43. Marlovits, S., et al., Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*, 2006. 57(1): p. 24-31.
44. Gooding, C.R., et al., A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee*, 2006. 13(3): p. 203-10.
45. Niemeyer, P., et al., Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med*, 2008. 36(11): p. 2091-9.
46. Knutsen, G., et al., Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2004. 86-a(3): p. 455-64.
47. LaPrade, R.F., et al., Histologic and immunohistochemical characteristics of failed articular cartilage resurfacing procedures for osteochondritis of the knee: a case series. *Am J Sports Med*, 2008. 36(2): p. 360-8.

48. Bentley, G., et al., A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 2003. 85(2): p. 223-30.
49. Dozin, B., et al., Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clin J Sport Med*, 2005. 15(4): p. 220-6.
50. Horas, U., et al., Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-a(2): p. 185-92.
51. Visna, P., et al., Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques--a randomized controlled study. *Acta Chir Belg*, 2004. 104(6): p. 709-14.
52. Beris, A.E., et al., Treatment of full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation: a functional evaluation with long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 2012. 40(3): p. 562-7.
53. Bhosale, A.M., et al., Midterm to long-term longitudinal outcome of autologous chondrocyte implantation in the knee joint: a multilevel analysis. *Am J Sports Med*, 2009. 37 Suppl 1: p. 131s-8s.
54. Vasiliadis, H.S., et al., Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. *Am J Sports Med*, 2010. 38(5): p. 943-9.
55. Bentley, G., et al., Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 2012. 94(4): p. 504-9.
56. Gudas, R., et al., A prospective, randomized clinical study of osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondritis dissecans in the knee joint in children. *J Pediatr Orthop*, 2009. 29(7): p. 741-8.
57. Schmal, H., et al., Autologous chondrocyte implantation in children and adolescents. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2013. 21(3): p. 671-7.
58. Rosenberger, R.E., et al., Repair of large chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation in patients 45 years or older. *Am J Sports Med*, 2008. 36(12): p. 2336-44.

59. Reijman, M., et al., Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip: the Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis*, 2007. 66(2): p. 158-62.
60. Rogers, M.W. and F.V. Wilder, The association of BMI and knee pain among persons with radiographic knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*, 2008. 9: p. 163.
61. Jaiswal, P.K., et al., Does smoking influence outcome after autologous chondrocyte implantation?: A case-controlled study. *J Bone Joint Surg Br*, 2009. 91(12): p. 1575-8.
62. Krishnan, S.P., et al., Who is the ideal candidate for autologous chondrocyte implantation? *J Bone Joint Surg Br*, 2006. 88(1): p. 61-4.
63. Minas, T., et al., Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med*, 2009. 37(5): p. 902-8.
64. Zaslav, K., et al., A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med*, 2009. 37(1): p. 42-55.
65. Hehne, H.J., Biomechanics of the patellofemoral joint and its clinical relevance. *Clin Orthop Relat Res*, 1990(258): p. 73-85.
66. Akimau, P., et al., Autologous chondrocyte implantation with bone grafting for osteochondral defect due to posttraumatic osteonecrosis of the hip--a case report. *Acta Orthop*, 2006. 77(2): p. 333-6.
67. Buchmann, S., et al., Early clinical and structural results after autologous chondrocyte transplantation at the glenohumeral joint. *J Shoulder Elbow Surg*, 2012. 21(9): p. 1213-21.
68. Fontana, A., et al., Arthroscopic treatment of hip chondral defects: autologous chondrocyte transplantation versus simple debridement--a pilot study. *Arthroscopy*, 2012. 28(3): p. 322-9.
69. Kiyomatsu, H., et al., Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomed Opt Express*, 2015. 6(2): p. 405-20.
70. Pietschmann, M.F., et al., Cell quality affects clinical outcome after MACI procedure for cartilage injury of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2009. 17(11): p. 1305-11.

71. Niemeyer, P., et al., Influence of cell quality on clinical outcome after autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med*, 2012. 40(3): p. 556-61.
72. Pestka, J.M., et al., In vitro cell quality of articular chondrocytes assigned for autologous implantation in dependence of specific patient characteristics. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2011. 131(6): p. 779-89.
73. Iwasa, J., et al., Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artif Organs*, 2003. 27(3): p. 249-55.

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut für unfallmedizinische Forschung unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs, Stellvertretender Leiter Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs und Frau Dr. Miriam Rothdiener von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Einarbeitung durch Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 02.09.2015

## Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs als Doktorvater für die Betreuung und Begleitung meiner Arbeit, die sowohl im fachlichen als auch vor allem im menschlichen Bereich nicht besser hätte sein können. Darüberhinaus waren für mich die gemeinsamen Fotoexkursionen und Weihnachtsessen bei seiner Familie stets eine sehr große Freude.

Ich danke Frau Dr. Miriam Rothdiener als Betreuerin dieser Doktorarbeit sehr für ihre Geduld und Erklärungskunst.

Ich danke Herrn Dr. Christian Arnscheidt sehr für die Vermittlung dieser Doktorarbeit und die tolle Zeit während jeder Famulatur bei ihm. Speziell sein tägliches Zitat „nur unter Druck wird aus Kohle ein Diamant“ wird mir unvergessen bleiben.

Ich danke Frau Dr. Tatiana Uynuk-Ool als stete Ansprechpartnerin bei vielen Fragen rund um den Laboralltag.

Ich danke Frau Karolin Struck und Frau Noelia Medrano für die hervorragende Hilfestellung bei Stochastischen Analysen.