

**Technische Universität München**  
**Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie**  
**der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie**  
**am Klinikum rechts der Isar**  
**Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. B. Imhoff**

**Elektromagnetische Stimulation und dynamisch-mechanische Belastung  
von 3-D Konstrukten zum Knorpel Tissue Engineering**

Florian Michael Laux

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. B. Imhoff
2. Priv.-Doz. Dr. K. Beitzel
3. apl. Prof. Dr. K. Wörtler

Die Dissertation wurde am 29.03.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2016 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

## A. Abkürzungsverzeichnis

## B. Publikationen und Kongressbeiträge

1.	Einleitung .....	9
1.1.	Ätiologie und Epidemiologie.....	9
1.2.	Knorpel als Gewebe mit fehlender endogener Heilungspotenz.....	10
1.3.	Therapie der Knorpeldefekte .....	12
1.4.	Mechanische und Elektromagnetische Stimulation.....	14
1.5.	Ziele dieser Arbeit .....	18
1.6.	Rechtliche Aspekte .....	18
2.	Material und Methoden .....	19
2.1.	Studienplan .....	19
2.2.	Zellisolierung.....	20
2.3.	Zellkultur .....	21
2.4.	Polyurethane Scaffold.....	22
2.5.	Scaffold Besiedelung .....	22
2.6.	Mechanische Stimulation.....	24
2.7.	Elektromagnetische Stimulation.....	26
2.8.	Stimulationsregime .....	28
2.9.	Molekularbiologische Auswertung.....	30

2.9.1. DNA Quantifizierung .....	30
2.9.2. Glykosaminoglykan Quantifizierung.....	31
2.10. Genexpressionsanalyse.....	33
2.10.1. RNA Extraktion .....	33
2.10.2. Quantitative Real-Time RT-PCR.....	34
2.11. Histologische Auswertung .....	38
2.11.1. Toluidinblau Färbung .....	38
2.11.2. Immunhistochemie.....	39
2.11.3. Statistik .....	40
3. Ergebnisse .....	42
3.1. DNA- und Glykosaminoglykangehalt .....	42
3.2. Geneexpressionsanalyse .....	43
3.2.1. Kollagen 2 zu Kollagen 1 Verhältnis.....	43
3.2.2. SOX9 .....	44
3.2.3. COMP .....	44
3.2.4. MMP3 .....	45
3.2.5. MMP13 .....	45
3.2.6. PRG4.....	46
3.3. Histologische Auswertung.....	48

3.3.1.	Toluidin-blau Färbung .....	48
3.3.2.	Immunhistochemie.....	48
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4.	Diskussion .....	52
4.1.	Mechanische Stimulation.....	52
4.2.	Elektromagnetische Stimulation.....	54
4.3.	Kombinierte Stimulation.....	56
4.4.	Knorpelgewebe .....	59
4.5.	3D Matrices.....	62
4.6.	Andere Ansätze zur Chondrozytenstimulation .....	65
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	66
6.	Abbildungsverzeichnis .....	68
7.	Danksagung .....	70
8.	Lebenslauf .....	71
9.	Literaturverzeichnis.....	72



## A - Abkürzungsverzeichnis

°C	- Grad Celsius
3D	- dreidimensional
ACT	- autologe Chondrozytentransplantation
AMIC	- autologe matrixinduzierte Chondrogenese
AO	- Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ARI	- AO Research Institute, Davos
BMP	- bone morphogenetic protein
cm	- Zentimeter
CO <sub>2</sub>	- Kohlendioxid
COMP	- cartilage oligomeric protein
d	- Tag
DMEM	- Dulbeccos modified Eagle medium
DMMB	- Dimethylethylenblau
DNA / DNS	- desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
FCS	- foetales Kälberserum
FRET	- Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	- Gramm
GAG	- Glykosaminoglykan
h	- Stunde
Hz	- Herz
ICH	- Immunhistochemie
l	- Liter
MACH	- Matrix associated chondroplasty
MACT	- matrixgestützte autologe Chondrozytentransplantation
min	- Minute
ml	- Milliliter
mm	- Millimeter
MMP	- Matrixmetalloproteinase
mT	- Millitesla
n	- Anzahl
NEAA	- nichtessenzielle Aminosäuren
ng	- Nanogramm
nm	- Nanometer
OATS	- osteochondrales autologes Transplantationssystem
PBS	- phosphatgepufferte Salzlösung
PC	- Personal Computer
PCR	- Polymerase Kettenreaktion
PEEK	- Poly-(ether-ether)-Keton
pH	- pH-Wert als negativer dekadischer Logarithmus der
PRG4	- proteoglycan 4
PRP	- plättchenreiches Plasma
PU	-Polyurethan
RNA	- ribonucleic acid
SA	- Standardabweichung
SF	- Standardfehler
SOX9	- sex determining region box 9

TBSS	- Tyrodes balanced salt solution
U	- Unit ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
UV	- Ultraviolett
$\mu\text{g}$	- Mikrogramm
$\mu\text{m}$	- Mikrometer

## **B - Publikationen und Kongressbeiträge**

### **Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:**

FM Hilz & P Ahrens \*, S Grad, M Stoddart, F Wilken, C Dahmani, M Sauerschnig, J Zwingmann P Niemeyer, R Burgkart, R von Eisenhart-Rothe, NP Südkamp, T Weyh, AB Imhoff, M Alini, GM Salzmann. Influence of Extremely Low Frequency Low Energy Electromagnetic Fields and Combined Mechanical Stimulation on Chondrocytes in 3-D Culture. Bioelectromagnetics. 2014 Feb;35(2):116-128.

\* FM Hilz & P Ahrens contributed equally to this publication.

FM Hilz, S Grad, M Stoddart, P Ahrens, C Dahmani, T Weyh, AB Imhoff, M Alini, GM Salzmann. Kombination niederfrequenter, niederenergetischer Magnetfelder und dynamischer Druck- und Scherbelastung auf 3-D Konstrukte zum Knorpel Tissue Engineering. BIOMaterialien 2009, 10(1/2)

FM Hilz, S Grad, M Stoddart, P Ahrens, C Dahmani, T Weyh, AB Imhoff, M Alini, GM Salzmann. Combination of Extremely Low Frequency, Low Energy Electromagnetic Fields and Dynamic Compression and Shear on 3-D Constructs for Cartilage Tissue Engineering. Annual Meeting Bioelectromagnetics Society, 2009, Davos, Schweiz.

FM Hilz, S Grad, M Stoddart, P Ahrens, C Dahmani, T Weyh, AB Imhoff, M Alini, GM Salzmann. Kombination niederfrequenter, niederenergetischer Magnetfelder und dynamischer Druck- und Scherbelastung auf 3-D Konstrukte zum Knorpel Tissue Engineering. Internationale Biomaterialtage München, 2009, München.

Gewidmet meiner Uroma - Paula Wittmann

(\* 25.05.1920 - †18.11.2012)

und meinen Eltern – Bernd und Heike Hilz.

In Dankbarkeit

## 1. EINLEITUNG

Die Schädigung des Gelenkknorpels zählt aus verschiedenen Gründen zu den herausforderndsten Erkrankungen im Bereich der muskuloskelettalen Medizin.

### 1.1. ÄTIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE

Aus epidemiologischer Sicht sind wir mit einer hohen Prävalenz chondraler Pathologien konfrontiert. Diese reichen vom ersten messbaren Knorpelschaden bis hin zur ausgeprägten Arthrose. Sie beschränken sich nicht nur auf den überwiegend degenerativen Aspekt des alternden Patienten sondern betreffen auch Jugendliche und junge Erwachsene (Streich, Gotterbarm et al. 2009). Es gibt einige, meist auf arthroskopischen Untersuchungen aufbauende Arbeiten, welche die Prävalenz chondraler Pathologien im Rahmen der Behandlung von überwiegend akut-traumatischen Erkrankungen untersucht haben. Hierbei zeigen sich beispielsweise bei ca. 65% aller Patienten, die sich einer Kniegelenksarthroskopie unterzogen, chondrale Defekte (Curl, Krome et al. 1997, Hjelle, Solheim et al. 2002, Aroen, Loken et al. 2004). Eine tatsächliche Aussage über die Prävalenz chondraler Erkrankungen ist nur sehr schwer möglich, da die Erfassung der ersten, noch asymptomatischen Schäden nur selten gelingt. Darüber hinaus besteht ein augenscheinlich hoher Bedarf operativer Behandlungen. Allein in den USA zählt man mehr als eine halbe Million Knorpelrekonstruktionen pro Jahr (Haasper, Zeichen et al. 2008). In Deutschland werden jährlich mehr als 280.000 arthroskopische Operationen am Gelenkknorpel und an den Menisken pro Jahr durchgeführt. Diese Eingriffe stellen in Deutschland mit dem OPS-Code 5-812 sogar den vierthäufigsten selbstständigen Schlüssel für operative Interventionen dar (280.770 Operationen nach Angabe des Statistischen Bundesamt für das Jahr 2014, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DRGOperationenInsgesamt.html>, Aufrufdatum 30.11.2015).

Wir sehen uns überwiegend zwei ätiologischen Hauptgruppen des Knorpelschadens gegenüber, erstens die akut-traumatischen und zweitens die chronisch-degenerativen Defekte. Darüber hinaus kann es natürlich auch aufgrund systemischer Erkrankungen zu ausgedehnten Schäden kommen. Insbesondere Stoffwechselerkrankungen, die z.B. mit Kristallarthropathien einhergehen zählen zu den führenden Grundleiden. Seltener sind genetische Erkrankungen mit gestörtem Knorpel- und Knochenaufbau sowie gestörter Homöostase und Erkrankungen mit Kollagensynthesstörungen (z.B. Marfan-Syndrom). Die im Folgenden vorgestellten knorpelregenerativen Therapieverfahren beziehen sich auf den scharf begrenzten fokalen Knorpeldefekt mit intakten Gelenkverhältnissen, der häufig bei akut-traumatischen Fällen zu sehen ist.

#### 1.2. KNORPEL ALS GEWEBE MIT FEHLENDER ENDOGENER HEILUNGSPOTENZ

Eine erste große Schwierigkeit in der Heilung chondraler Schäden besteht in der nahezu gänzlich fehlenden eigenen Heilungspotenz des Gelenkknorpels (Leunig, Beck et al. 2006, Bhosale and Richardson 2008). Bei Knorpel handelt es sich um bradytrophes und avaskuläres Gewebe mit nur sehr geringer Zellzahl. Die enthaltenen Zellen sind ausdifferenziert und postmitotisch. Somit ist eine echte Defektheilung aus dem knorpel-eigenen Zellpool nicht möglich (Schewe, Fritz et al. 2006). Ein vollständig umschließendes Perichondrium liegt beim Gelenkknorpel nicht vor, die Einwanderung mesenchymaler Progenitorzellen mit Heilungspotenz ist daher ebenfalls nicht ohne therapeutischen Eingriff möglich.

Gelenkknorpel zeichnet sich durch einen hochdifferenzierten Aufbau aus, der mit spezialisierten Eigenschaften und Funktionen einhergeht. Einerseits ist eine Unterstützung des möglichst reibungsfreien Gleitens beider Gelenkpartner notwendig, andererseits die Kraftaufnahme und kontrollierte Krafteinleitung in den subchondralen Knochen. Des Weiteren besitzt Gelenkknorpel dämpfende Eigenschaften, die bei impact-behafteten Bewegungen eine

entscheidende Rolle spielen (Poole, Rizkalla et al. 1993, Buckwalter 2002). Betrachtet man den Knorpel alleine zeigt sich ein dreischichtiger Aufbau mit der gelenkseitigen oberflächlichen – auch tangential genannte – Schicht (ca. 10-20% des Knorpels), der mittleren Schicht (40-60%) sowie der basalen Knorpelschicht (30-40%). Es besteht jeweils ein unterschiedlicher zonaler Aufbau der extrazellulären Matrix sowie auch eine veränderte Sekretion von weiteren Stoffen in die Umgebung, wie z.B. von friktionsverminderndem Lubricin (auch Proteoglykan 4 - PRG4) in den superficialen Schichten (Johnstone, Alini et al. 2013). Daran schließt sich knochenseitig die sog. Tide mark als Grenze zwischen der nicht-kalzifizierten und der kalzifizierten Matrix an. Hier wird die Verzahnung des Gelenkknorpels mit dem Knochen gewährleistet und über die sich anschließende subchondrale Platte der Übergang zum spongiösen Knochen hergestellt. Die Viscoelastizität ist ein weiteres charakteristisches Merkmal des Gelenkknorpels. Hierbei werden durch die an den Chondrozyten fixierten, negativ geladenen langen Proteoglykanketten große Mengen Wasser und positiver Ionen im Knorpel gebunden. Das sorgt in der Art für einen Großteil des viscoelastischen Elements der Knorpel elastizität in dem bei mechanischer Druckbelastung mit Flüssigkeitsverdrängung aus dem Knorpel sowohl ein onkotischer als auch elektrostatischer Ausgleichsdruck aufgebaut wird (Mow, Ratcliffe et al. 1992, Poole, Kojima et al. 2001). Während der Belastung entsteht hier eine zunehmende Versteifung des Gelenkknorpels (Park, Hung et al. 2004). Andererseits werden durch die bogenförmige Konfiguration der Kollagenfasern Druckbelastungen in Form von mechanischem Zug und Druck aufgenommen, die makroskopische Integrität auf mikroskopischem Niveau sichergestellt und durch die Quervernetzung ein elastisches Modul erzeugt. Dieser komplexe Aufbau mit den jeweils spezifischen biomechanischen Eigenschaften und der Gesamtkonstruktion als funktionelle Einheit ist bisher nicht artifiziell rekonstruiert. Zusammengefasst ergibt sich hier aufgrund der Pathophysiologie und der klinischen

Symptomatik die genannte Herausforderung an die muskuloskelettalen Forscher und Kliniker (Johnstone, Alini et al. 2013).

### 1.3. THERAPIE DER KNORPELDEFEKTE

Bisher gibt es unterschiedliche Therapieansätze bzgl. der verschiedenen Stadien des Knorpelschadens, jeweils unter Einbeziehung unterschiedlicher Faktoren wie z.B. Defektlokalisierung, Größe und Patientenalter (Alford and Cole 2005, Alford and Cole 2005, Vogt, Braun et al. 2007, Salzman, Niemeyer et al. 2011). Ab einem gewissen Fortschritt des Knorpeldefekts muss aber von einer unwiderruflichen Progression des primären Defekts in eine nicht mehr rekonstruierbare bzw. reparierbare Arthrose ausgegangen werden (Buckwalter 2002). Die Langzeitfolge des ersten Knorpelschadens, die manifeste Arthrose mit unwiederbringlichem Verlust der schmerzfreien physiologischen Gelenkfunktion stellt dann die gemeinsame Endstrecke sowohl der traumatischen als auch der degenerativen Knorpelschäden dar. Die endoprothetische Versorgung als letzte Therapieoption stellt hier eine der häufigsten orthopädischen Interventionen dar und zeigt auch mit mehreren Hunderttausend Eingriffen pro Jahr in Deutschland wie relevant die Problematik im klinischen Alltag ist (nach Angabe des Statistischen Bundesamt für das Jahr 2014, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DRGOperationenInsgesamt.html>, Aufrufdatum 30.11.2015).

Aktuelle gelenkerhaltende Therapieansätze gliedern sich vereinfachend in 4 verschiedene Lösungsansätze der mangelnden endogenen Heilungspotenz bei Bradytrophie, Avaskularität und niedriger Zellzahl:

1. Einbringen mesenchymaler Progenitorzellen zur endogenen Defektheilung
2. Einbringen differenzierter Zellpopulationen zur endogenen Defektheilung



3. Transplantation in-vitro präformierter Gewebe zur direkten Defektdeckung mit sekundärem Einheilen
4. Transplantation intakter autologer Knorpelzylinder

Die Anwendung mesenchymaler Progenitorzellen kann auf unterschiedliche Art erfolgen, eine der bekanntesten Formen dieser Therapie ist die sog. Mikrofrakturierung, bei der durch ein Durchbrechen der subchondralen Platte mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Knorpeldefekt einwandern können (Frisbie, Trotter et al. 1999, Steadman, Rodkey et al. 2001). Alternativ kann auch direkt ein Aspirat aus dem Knochenmark gewonnen werden und dieses nach Aufbereitung mit oder ohne zusätzlicher Mikrofrakturierung in den Defekt eingebracht werden (MACH) (Steinwachs, Waibl et al. 2014). Diese Methoden können jeweils mit Membranen oder Gelen zur Verbesserung des lokalen Verbleibs der Progenitorzellen und i.S. eines Grundgerüsts augmentiert werden (z.B. sog. AMIC Technik) (Benthien and Behrens 2010). Eine alternative Möglichkeit besteht in der direkten Anwendung differenzierter Chondrozyten wie sie bei der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) zu Anwendung kommen (Brittberg, Lindahl et al. 1994, Peterson, Minas et al. 2000, Burkart and Imhoff 2002). Nachdem in Studien herausgefunden wurde, dass postmitotische Chondrozyten nach enzymatischer Lösung aus dem Knorpelverband erneut die Fähigkeit zur Zellteilung erlangen wurden hier unterschiedliche Methoden erdacht. Allen Methoden gemeinsam ist, dass jeweils Knorpelteile entnommen, die enthaltenen Zellen herausgelöst, in-vitro kultiviert und vermehrt und mittels Matrices (MACT), Gelen oder wie in der erstmaligen Beschreibung durch Brittberg unter einem Periostlappen in den Defekt eingebracht und fixiert werden. Hierbei muss allerdings, so wie auch bei der folgend genannten Knorpeltransplantation ein Zweiteingriff sowie eine „donor site morbidity“, also einer Schädigung des intakten Gelenks an der Entnahmestelle in Kauf genommen werden (Desjardins, Hurtig et al. 1991, Imhoff, Ottl et al. 1999). Es sind allerdings

Methoden in der Erprobung, die Entnahmestellen für die Knorpeltransplantation nutzen wollen, die ohnehin im Rahmen der Therapie reseziert werden müssen. Z.b. zeigte Frauke Wilken in einer zellkulturbasierten Grundlagenarbeit eine ausreichende biologische Wertigkeit des Knorpels der CAM Deformität beim Hüft-Impingement für eine potentielle Transplantation (Wilken 2014). Zuletzt kann dann noch die direkte Transplantation intakter Knochen-Knorpelzylinder aus gesunden Arealen in den bestehenden Defekt genannt werden, diese Verfahren sind u.a. als Mosaikplastik oder OATS (Osteochondral Autologous Transfer System, ein Produkt der Firma Arthrex) bekannt. Prinzipiell handelt es sich hier um ein bereits 1964 beschriebenes Verfahren, das aber erst durch spezialisierte Instrumente den entsprechenden klinischen Erfolg feiern konnte. Dieses Verfahren unterscheidet sich durch die direkte Implantation eines körpereigenen funktionell intakten Knorpels von den vorherigen drei Verfahren (Wagner 1964, Wagner 1972).

#### 1.4. MECHANISCHE UND ELEKTROMAGNETISCHE STIMULATION

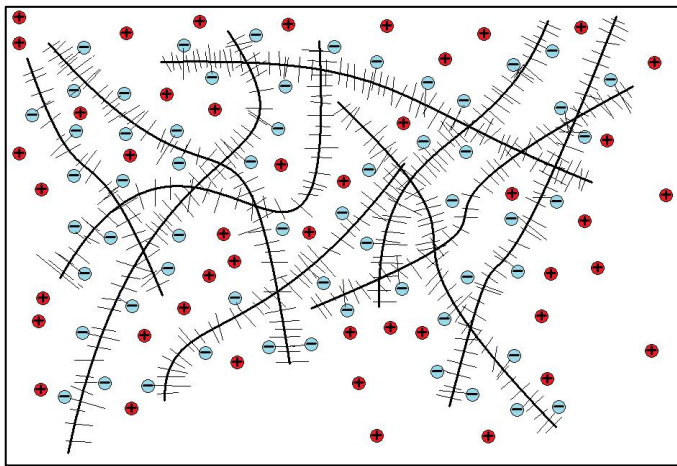
Die mechanische Stimulation ist das naheliegende Stimulationsverfahren für ein in-vivo ebenfalls mechanisch belastetes Gewebe wie der Gelenkknorpel. Es kann zwischen hydrostatischem Druck, Zug, Kompression und Scherkraftbelastung sowie Kombinationen davon unterschieden werden. Alle diese Methoden werden aktuell in der Forschung verwendet (Grad, Eglin et al. 2011). Die physiologische Belastung des Gelenkknorpels besteht überwiegend aus einer Kompression verbunden mit Scherkräften und Zugkräften auf die Oberfläche; durch Kompression des gesamten Gelenks auch kombiniert mit einem erhöhten hydrostatischen Druck (Heath and Magari 1996). Die Zugbelastung ist Folge der o.g. Kompression, Scherung und damit Verwindung des Knorpels unter stärkerer Belastung. In-vivo kommt eine reine Zugbelastung trotz der (geringen) Vorspannung des Gelenkknorpels kaum vor (Fan and Waldman 2010). Hydrostatischer Druck führt in-vitro je nach Belastungsintensität und v.a. Belastungsfrequenz teils zum Erhalt des Chondrozyten-

typischen Phänotyps und einer erhöhten Produktion von Matrixproteinen oder zumindest einer erhöhten Expression entsprechender Gene (Parkkinen, Ikonen et al. 1993, Carver and Heath 1999, Carver and Heath 1999, Elder and Athanasiou 2009, Elder and Athanasiou 2009). Ein Vorteil ist hier je nach System die Möglichkeit nicht mechanisch formstabile Konstrukte oder sogar Zellen im Monolayer zu stimulieren. Bioreaktoren, die eine Zugbelastung vermitteln sind selten. Mittels Stimulation durch Zug konnten vorwiegend eine Inhibition der Chondrozyten bzw. eine terminale Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten herbeigebracht werden (Fukuda, Asada et al. 1997, Wong, Siegrist et al. 2003, Connelly, Vanderploeg et al. 2004, Grad, Eglin et al. 2011). Kompression wird in den meisten Stimulationsverfahren verwendet (Grad, Eglin et al. 2011). Hierbei kann gezielt die physiologische Belastung hinsichtlich Eindringtiefe, Frequenz als auch Belastungszyklen nachgeahmt werden. In den dabei notwendigen 3D Matrices ist es entscheidend auch den Zellen die Möglichkeit zu geben der mechanischen Belastung tatsächlich ausgesetzt zu sein. Der Zell-Matrix-Kontakt ist also ein entscheidender Faktor im Studiendesign (Bryant, Chowdhury et al. 2004, Nicodemus and Bryant 2008). Die Kompression führt dann bei entsprechend gewählter Belastung zu vermehrter Matrixsyntheseleistung, wünschenswerten Genexpressionsprofilen und Differenzierung. Belastungsintensität im Sinne von Drucktiefe und Frequenz sowie Belastungszyklen spielen hier eine große Rolle (Buschmann, Kim et al. 1999, Mauck, Soltz et al. 2000, Chowdhury, Bader et al. 2003, Mauck, Wang et al. 2003, Grad, Eglin et al. 2011). Ohne ausreichenden Oberflächenkontakt können keine relevanten Scherkräfte an der Oberfläche übertragen werden. Scherbelastungen werden daher üblicherweise mit Kompression kombiniert. Die Kombination konnte eine differenziertere Stimulation mit vermehrter Matrixsyntheseleistung und positiven (chondrogenen) Genexpressionsprofilen zeigen, wobei sich hier durch die Kompression wie genannt eher die Matrixsyntheseleistung verbesserte und zusätzliche Scherbelastung oder Scherbelastung unter minimaler Kompression z.B. zur vermehrten Expression von Proteoglycan 4 führte (Grad,

Gogolewski et al. 2006, Grad, Lee et al. 2006, Li, Yao et al. 2007, Waldman, Couto et al. 2007, Grad, Eglin et al. 2011).

Elektrische, magnetische und elektromagnetische Stimulationsformen sind in der Medizin seit langem bekannt und finden unterschiedlichste Verwendung. In dieser Arbeit wird im speziellen nur auf die Anwendung elektromagnetischer Felder eingegangen. Klinisch werden elektromagnetische Felder überwiegend in der Orthopädie eingesetzt, insbesondere das zur Heilung von Frakturen und Pseudarthrosen entwickelte Verfahren nach Kraus und Lechner (Kraus and Lechner 1972), inzwischen als modifiziertes chirurgisches Verfahren „BISS“ (Bipolares Induktions-Schrauben System) nach dem neuen Magnetodyn Verfahren (Neue Magnetodyn, München, Deutschland) verwendet ist hier zu nennen. Die Anwendung von elektromagnetischen Feldern hat in Studien positive Effekte in Bezug auf Frakturheilung und Arthrose gezeigt (Aaron, Ciombor et al. 2004, Eriksson 2007, Funk, Monsees et al. 2009, Vavken, Arrich et al. 2009). Auch in-vitro Experimente und Versuche mit Kleintiermodellen konnten positive Effekte in Bezug auf Wachstumsfaktoren und Matrixsynthese zeigen (Ciombor, Lester et al. 2002, Ciombor, Aaron et al. 2003, De Mattei, Pasello et al. 2003, Aaron, Boyan et al. 2004, Fini, Giavaresi et al. 2005, De Mattei, Fini et al. 2007, Fini, Torricelli et al. 2008, Chang, Loo et al. 2010, Mayer-Wagner, Passberger et al. 2011, Ongaro, Pellati et al. 2011). Die theoretische und experimentelle Basis dieser Studien legten bereits 1987 Eliot Frank und Alan Grodzinsky mit ihren Arbeiten über die Elektromechanik des Knorpels (Frank and Grodzinsky 1987, Frank and Grodzinsky 1987). Sie beschrieben, dass durch fixierte negative Ladungen an den Matrixproteinen und den gelösten positiven Gegenionen bei einer mechanischen Belastung durch Verdrängung der Flüssigkeit aus den Belastungszonen ein elektrisches Potential entstehe – das sog. strömende Potential (streaming potential). Die elektromagnetischen Stimulationsverfahren basieren auf der Hypothese, dass dieses physiologisch auftretende elektrische Potential auch ohne die mechanische Belastung

um die entsprechenden Chondrozyten induziert werden kann (z.B. durch elektromagnetische Induktion) und als Stimulus fungiert. Die physikalischen Betrachtungen zur Stimuluswahrnehmung durch die Zellen gehen hier von einer Auslenkung von Oberflächenproteinen aus. Bei Chondrozyten handelt es sich hierbei besonders um lange Proteoglykane. Die rechnerische Auslenkung dieser Membranstrukturen bei elektromagnetischer Stimulation entspricht der experimentell gemessenen Auslenkung bei mechanischer Stimulation (Hart 2010). Die elektromagnetische Stimulation kann in der Theorie also vergleichbare Stimuli auf einzelne Zellen aufbringen wie die mechanische



Stimulation ohne jedoch die mechanische Integrität der umgebenden Matrix wesentlich zu kompromittieren oder durch direkten Kontakt eine Kontaminationsgefahr zu bieten.

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Knorpels mit fixierten negativen Ladungen am Kollagengerüst und freien positiven Gegenladungen in Lösung. Basis der Theorie der strömenden Potentiale (übernommen aus Hilz et al., 2009)

In der Literatur ist bisher keine Arbeit beschrieben, die elektromagnetische und mechanische Stimulation von Chondrozyten unter identischen Bedingungen verglichen hat. Ebenso ist in der Literatur die Kombination aus elektromagnetischer und mechanischer Stimulation und deren Effekt bisher nicht beschrieben.

### 1.5. ZIELE DIESER ARBEIT

Als Grundlagenexperiment mit Übertragungsmöglichkeit in die Klinik kann in Zukunft ggf. durch Tissue Engineering höherwertig präformiertes Gewebe erzeugt werden. Das Outcome der matrixgestützten Chondrozytentransplantation kann dadurch verbessert werden. Durch kontaktfreie Stimulationsverfahren mittels elektromagnetischer Stimulation sinkt das Kontaminationsrisiko während der in-vitro Konditionierungsphase.

In dieser Studie wurde der Einfluss mechanischer Stimulation, elektromagnetischer Stimulation und der Kombination von beidem auf bovine Chondrozyten in einer Matrix aus Polyurethan und Fibrin untersucht. Es wird die Hypothese eines positiven Effekts auf die Matrixsynthese und das Genexpressionsprofil der beiden Stimuli aufgestellt. Ein synergistischer Effekt wird untersucht. Es sollen theoretisch die Vor- und Nachteile präklinischer und klinischer 3D Matrices im Vergleich zur verwendeten PU/Fibrinmatrix aufgezeigt werden. Ebenfalls soll ein kurzer theoretischer Vergleich mit Regeneratknorpel aus bisher üblichen klinischen Anwendungen gezogen werden und der in dieser Studie erzeugte Knorpelersatz eingeordnet werden.

### 1.6. RECHTLICHE ASPEKTE

Die laborexperimentellen Arbeiten wurden in der Schweiz am Labor des Research Institutes der AO Foundation (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen) in Davos durchgeführt. Die vorbereitenden Arbeiten, die Studienplanung, die Berechnung und Konstruktion der elektromagnetischen Stimulation sowie die abschließende statistische Auswertung wurde an der Technischen Universität München in Deutschland durchgeführt. Es wurden zu jedem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung die lokalen schweizerischen als auch die deutschen juristischen Gegebenheiten insbesondere in Bezug auf die Verwendung der bovinen Zellen beachtet.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. STUDIENPLAN

Es wurden für diese Studie Zellen von insgesamt 4 Kälbern genutzt und jeweils der gleiche Versuchsablauf mit diesen 4 Zellreihen nacheinander wiederholt. In Abbildung 2 ist der entsprechende Versuchsablauf schematisch dargestellt. Zur besseren statistischen Auswertbarkeit wurde, wie von Stoddart und Richards et al. beschrieben (Stoddart, Richards et al. 2012) auf ein sog. Zellpooling, also eine Mischung der Zellen der einzelnen Tiere verzichtet. Es konnten jeweils ausreichend primäre Zellen pro Versuchstier gewonnen werden um alle geplanten Analysen durchzuführen (siehe Punkt 2.2. Zellisolierung). Die Zellen wurden wie weiter unten beschrieben enzymatisch aufgereinigt und aus dem Knorpel gelöst, in 3-D Kultur gebracht und nach initialer Inkubationsphase nach unten gezeigtem Schema zufällig entweder einer unstimulierten Kontrollgruppe oder einem entsprechenden Stimulationsregime zugeordnet und für jeweils 2 Wochen stimuliert. Anschließend fand eine Analyse der vorab gewählten Zielparameter mittels biochemischen und histologischen Methoden statt sowie jeweils die statistische Auswertung der entsprechenden Ergebnisse.

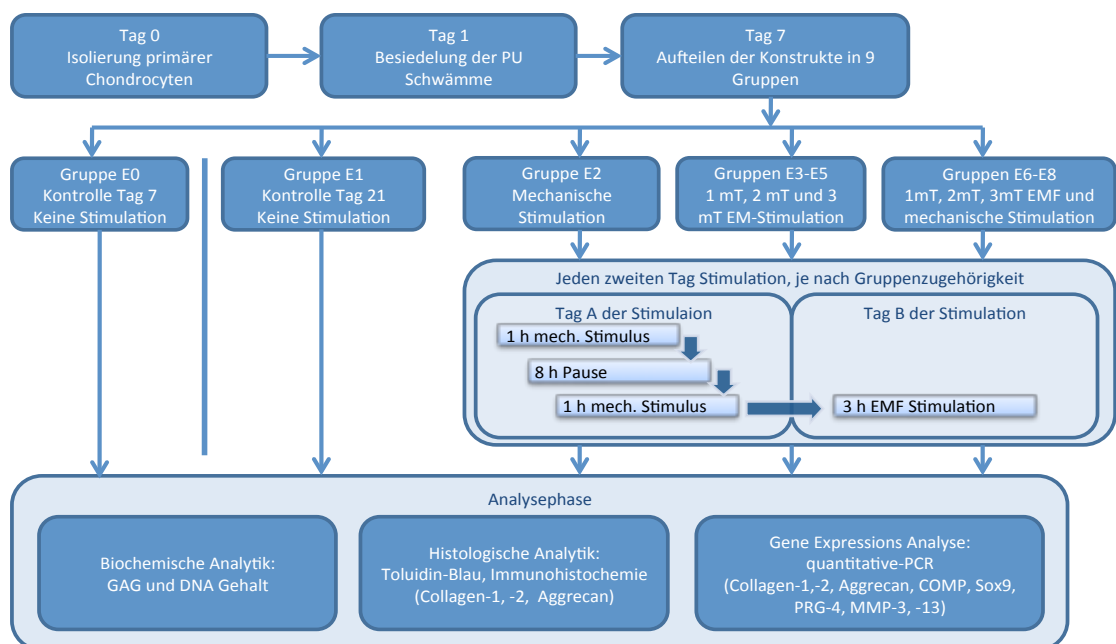


Abbildung 2: Flussdiagramm des Versuchsablaufes, adaptiert übernommen aus (Hilz, Ahrens et al. 2014)

## 2.2. ZELLISOLIERUNG

Die Isolation und Kultur der Zellen, der gesamte experimentelle Ablauf bis zum Zeitpunkt der geplanten Beendigung des Experiments und dem Übergang zur Analysephase wurden in einem dezidierten Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe S2 am AO Research Institute (ARI) in Davos durchgeführt. Primäre bovine Chondrozyten für alle Versuche wurden von 2-3 Monate alten Schlachtkälbern aus der Region Davos, Schweiz gewonnen. Unmittelbar nach Schlachtung der Tiere wurden die distalen Anteile einer Extremität entfernt und im Labor unter sterilen Kautelen das Metacarpophalangealgelenk (Fesselgelenk) eröffnet. Anschließend wurde Knorpelmaterial in voller Schichtdicke entnommen. Das Nassgewicht des entnommenen Knorpelmaterials lag jeweils zwischen 2,9 und 4,5g.

Alle Wasch- oder Inkubationsprozesse wurden in üblichen Laborbrutschränken bei 37°C, unter 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte durchgeführt. Direkt nach der Entnahme und manuellen Zerkleinerung der Knorpelstücke auf ein Volumen ca. 10-25mm<sup>2</sup> wurden die Knorpelchips in 50ml Tubes (Falcon) mit 40ml Tyrode's balanced salt solution und 10x Penicillin/Streptomycin (TBSS/PS) gegeben; anschließend wurden die Knorpelchips zweimalig für 45 Minuten mit 60 ml TBSS/PS in sogenannten Spinnerflasks (sterile Glasflaschen mit automatisiertem Glasrührstab) gewaschen. Im weiteren Verlauf erfolgte die enzymatische Aufschließung mit 0,1% Pronase in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) für 120 Minuten bei 37°C im Brutschrank in Spinnerflasks. Nach dreimaligem Auswaschen der Pronaselösung mit jeweils 60ml TBSS/PS pro Spinnerflask wurden die Knorpelchips mit Kollagenase II (gelöst in DMEM zu 600 U/ml, ebenfalls 60ml pro Spinnerflask) für weitere 14 Stunden enzymatisch verdaut bis makroskopisch keine Knorpelstücke mehr sichtbar waren. Durch Zugabe von 40ml DMEM mit 25% FCS Anteil pro Spinnerflask wurde die Kollagenase inaktiviert, das Gesamtvolumen von 100ml pro Flask wurde mit einem 40µm Zellfilter filtriert und bei 565 G für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert.



Wurden mehrere Spinnerflasks pro Tier angelegt und sollte ein Zellpooling erfolgen so wurden die Pellets nach dem Zentrifugieren mit DMEM mit 10% FCS resuspendiert und in ein gemeinsames Tube überführt. Im Verlauf zweimalig Resuspendieren mit DMEM (10 % FCS) / Zentrifugieren; der Überstand wurde jeweils verworfen. Im Anschluss erfolgte eine finale Suspension in DMEM mit 10% FCS und die Zellzählung mittels Neubauer improved Zählkammer; es wurden nur vitale Zellen erfasst. Durchschnittlich wurden 180 Millionen Zellen pro Gelenk gewonnen und für die weiteren Versuche entsprechend aufbereitet.

### 2.3. ZELLKULTUR

Die Analytik wurde ebenfalls am AO Research Institute in eigens dafür eingerichteten Räumen unter speziellen Sicherheits- und Sauberheitskriterien (u.a. DNase- und RNAase-freie Arbeitsplätze) durchgeführt. Alle Prozesse erfolgten unter sterilen Laborbedingungen. Im Weiteren wird der Begriff Brutschrank für handelsübliche Laborbrutschränke verwendet, die eine konstante Atmosphäre von 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte aufbieten konnten. Alle verwendeten Brutschränke durchliefen vor dem experimentellen Teil einen Sterilisationsprozess.

Es erfolgte keine Monolayerkultur der Zellen sondern jeweils direkt nach Isolation die 3-D Kultur im Scaffold. Den speziellen Haltevorrichtungen mit jeweils einem Scaffold bestückt wurden je 3ml Medium bestehend aus 13,38g/l DMEM (4.5 g Glukose/l), 3,7g/l Natriumhydrogencarbonat, 0,11g/l Natriumpyruvat, 20ml/l HEPES 1M Pufferlösung, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 10ml/l Penicillin/Streptomycin, 3ml/l Gentamicin, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), 40µg/ml L-Prolin, 50µg/ml Ascorbinsäure und 500U/ml Aprotinin in Milli-Q-Wasser zugefügt. Dieses Medium wurde jeden zweiten Tag frisch hergestellt und zur Sterilisation filtriert. Während des Kulturprozesses im Scaffold erfolgte für alle Scaffolds ein voller Medienwechsel nach 48 Stunden. Von allen Medienwechseln wurden

aus allen Gruppen bei 2 von 4 Scaffolds je 1ml Nährmedium für spätere Analysen entnommen und bei -20°C konserviert. Beim Wechsel des Mediums wurde das alte Medium abgesaugt, einmalig mit TBSS gewaschen und anschließend wieder 3ml auf 37°C angewärmtes Medium pro Scaffold hinzugefügt.

#### 2.4. POLYURETHANE SCAFFOLD

Polyurethan (PU) Scaffolds (“Schwämme”) wurden nach einem in der Literatur beschriebenen Verfahren aus Hexamethylendiisocyanat und Poly-( $\epsilon$ -caprolacton)-diol sowie Isosorbiddiol (1,4:3,6-dianhydro-D-Sorbitol) als Kettenverlängerer (chain extender) synthetisiert (Gorna and Gogolewski 2002, Grad, Kupcsik et al. 2003). Die durchschnittliche interkonnektierte Porengröße betrug 90 bis 300 $\mu$ m, die Scaffolds wurden in Zylinder von 4mm Höhe und 8mm Durchmesser geschnitten, um diese Zylinder wurden passgenaue Ringe aus identischem PU Material zur weiteren Fixierung in speziellen Haltevorrichtungen aus PEEK (Poly-(ether-ether)-Keton) platziert (Wimmer, Grad et al. 2004). Diese Haltevorrichtung diente zur exakten Positionierung im Bioreaktor für die mechanische Stimulation und wurde für alle Gruppen (Kontrollen, mechanische, elektromagnetische und kombinierte Stimulationszyklen) identisch verwendet.

Vor einem Einsatz in der Zellkultur erfolgte jeweils für PU-Zylinder und PU-Ringe ein kalter Sterilisationszyklus mit Ethylenoxid und anschließendem Evakuationsprozess bei 45°C und 150mbar für 7 Tage. Die PEEK Haltevorrichtungen wurden ebenfalls einem üblichen Sterilisationsprozess unterzogen.

#### 2.5. SCAFFOLD BESIEDELUNG

Die Besiedelung der Scaffolds erfolgte mit jeweils ca. 3,6 Millionen Zellen. Nach einer „pre-wetting“ Phase, in der die Scaffolds mit üblichem Zellkulturmedium in einer Unterdruckkammer benetzt wurden erfolgte der Transfer der Zellen mit einem

Fibrinogen/Thrombin Prozess (Baxter Biosurgery, Wien, Österreich; Fibrinogen 33mg/ml, Thrombin 1 U/l, jeweils in Pufferlösungen). Es wurden jeweils ca. 3,6 Millionen Chondrozyten in 75µl einer Fibrinogenlösung suspendiert, diese in ein kleines Gefäß („cap“) gegeben und unmittelbar nach Zugabe der Thrombinlösung den entsprechenden Scaffold in das "cap" gepresst, um die Zellsuspension in die Poren des Scaffolds aufzuziehen. Nach der Polymerisation der Zell-Fibrinogen-Thrombin Lösung wurden die Zylinder zusammen mit den entsprechenden Ringen in den Haltern platziert und mit dem üblichen Zellkulturmedium bedeckt (Grad, Kupcsik et al. 2003, Grad, Zhou et al. 2003, Lee, Grad et al. 2005).

## 2.6. MECHANISCHE STIMULATION

Die mechanische Stimulation erfolgte mittels eines 4-Stationen Bioreaktors, der in einem dezidierten Brutschrank verbaut ist (Wimmer, Grad et al. 2004). Während der Stimulation wirkt dabei ein Keramikhüftkopf, wie in der Hüftendoprothetik üblich, durch mehrere PC-gesteuerte Aktuatoren auf den Scaffold im Halter ein. Dabei sind unterschiedliche Bewegungen möglich:

- Kompression durch Bewegung des Hüftkopfes auf der Zylinderachse des Scaffolds
- Rotation des Hüftkopfes auf einer Achse rechtwinklig zur Zylinderachse des Scaffolds
- Rotation des Scaffoldhalters mit Scaffold um die Zylinderachse des Scaffolds

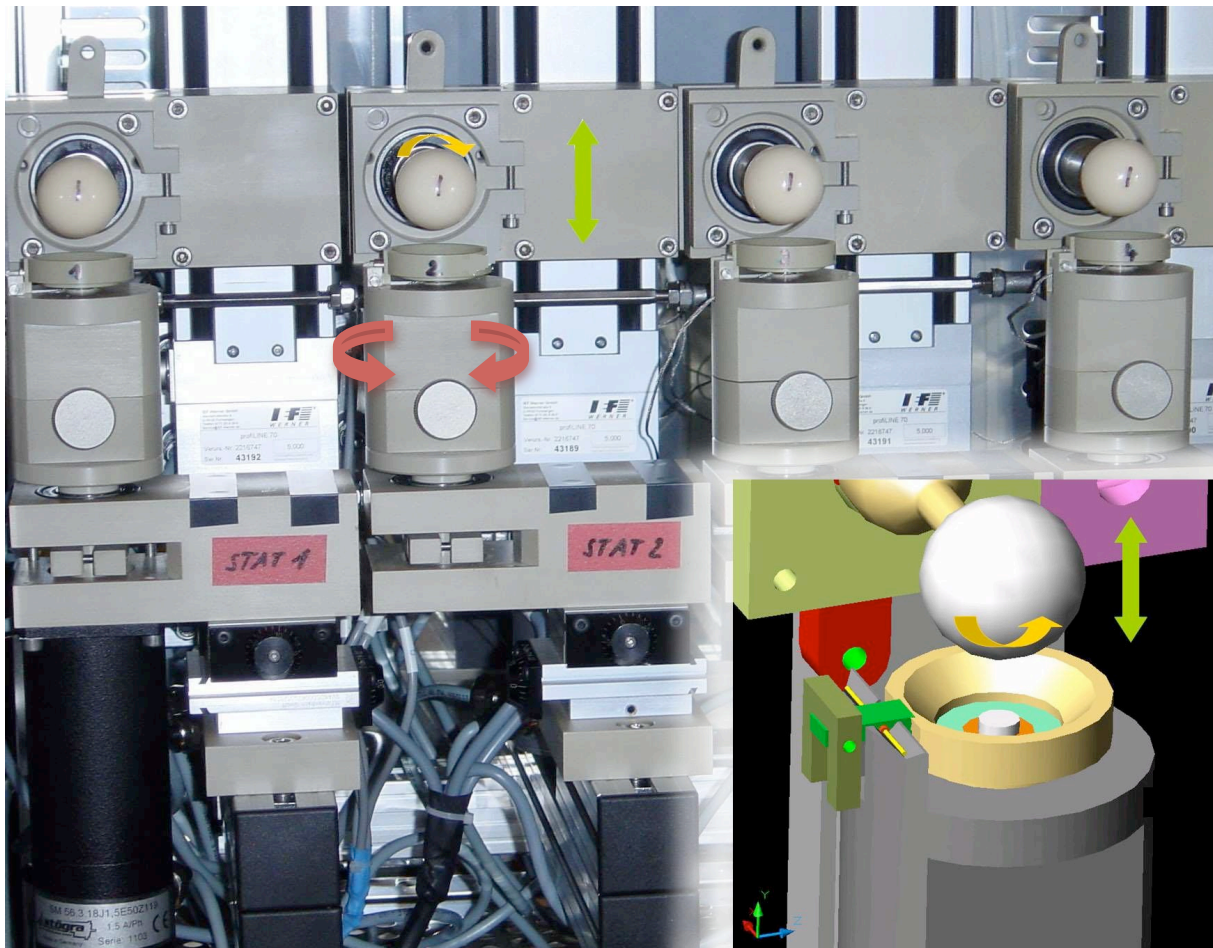


Abbildung 3: Bioreaktor mit 4 Stationen zur mechanischen Stimulation. Durch Pfeile gekennzeichnete Bewegungsrichtungen. Mit schwarzen senkrechten Strichen gekennzeichnet sind die Hüftköpfe zur Stimulation, darunter mit Zahlen von 1-4 die speziellen Haltevorrichtungen. Das Bild im Bild zeigt eine CAD Simulation eines einzelnen Simulationsplatzes (Hilz, Ahrens et al. 2014).

In Abbildung 3 sieht man den Bioreaktor im Brutschrank bei geöffneter Tür des Brutschrankes. Durch farbige Pfeile sind die möglichen Bewegungsrichtungen gekennzeichnet. Außerdem sieht man, durch schwarze senkrechte Striche markiert die eingesetzten Hüftköpfe, diese wurden vor jedem neuen Versuch und auch im Verlauf eines Experiments mehrfach im Dampfsterilisator aufbereitet und neu eingesetzt. Während der Versuche wurden diese Hüftköpfe und die darunterliegenden Halter und Scaffolds zur Sicherheit durch hier nicht dargestellte spezielle, ebenfalls sterilisierbare Glasglocken abgedeckt um eine Kontamination der Versuche zu vermeiden.

Die Stimulation erfolgte nach festgelegtem Schema jeden zweiten Tag. Nach dem Einsetzen der Halter mit den Scaffolds wurde PC-gesteuert Kompression entlang der Zylinderachse des Scaffolds durch den keramischen Hüftkopf auf den Scaffold ausgeübt. Dabei wurde zuerst ein sogenannter Preload von 5% der Scaffold Höhe, 0,2mm appliziert. Dann oszillierte der Hüftkopf sinusförmig zwischen dieser Position und einer Position 0,4mm tiefer im Scaffold (zwischen 5% und 15% der Scaffoldhöhe) mit einer Frequenz von 1Hz. Gleichzeitig rotierte der Hüftkopf um seine eigene Achse rechtwinklig zur Zylinderachse des Scaffolds zwischen  $+25^\circ$  und  $-25^\circ$  um oberflächliche Scherkräfte zu generieren, ähnlich wie in früheren Arbeiten von Grad, Wernike und Salzmann beschrieben (Grad, Lee et al. 2005, Grad, Gogolewski et al. 2006, Grad, Lee et al. 2006, Wernike, Li et al. 2008, Salzmann, Nuernberger et al. 2009, Salzmann, Buchberger et al. 2010, Grad, Loparic et al. 2012).

## 2.7. ELEKTROMAGNETISCHE STIMULATION

Die verwendete Konstruktion zur elektromagnetischen Befeldung wurde für diese Arbeit neu konstruiert und evaluiert. Die Auslegung und Berechnung einer elektromagnetischen Stimulationseinheit erfordert die Festlegung verschiedener Zielparameter. Einerseits die gewünschten Stimationsparameter; diese Parameter wurden in Hinblick auch auf Daten der in der Einleitung genannten in-vitro und in-vivo Studien festgelegt, andererseits aber auch bezüglich der Nebeneffekte wie Wärmeentwicklung und Ansteuerbarkeit der Stimulationseinheit sowie Flexibilität in Bezug auf die Stimationsparameter. Um insbesondere der Flexibilität und der Ansteuerbarkeit gerecht zu werden wurde ein System entworfen, dessen wesentlichen Feld- und Impulseigenschaften mittels eines handelsüblichen Computers (Lifebook S7110, FSC Fujitsu-Siemens, München, Deutschland) gesteuert werden können. Da die leistungsstarken Ausgabemöglichkeiten an Computern begrenzt sind und keine direkte Ausgabe eines geeigneten Signals an die Spule möglich war wurde ein Hi-Fi Verstärker (t.amp TA1050 MK-X, Thomann, Burgebrach, Deutschland) als Zwischenkomponente verwendet um die nötige Stromstärke und damit Feldstärke zu modulieren. Als Feldgenerator wurde eine speziell berechnete Spulenanordnung im Sinne einer angepassten Helmholtz Anordnung verwendet. Nebenkomponente des Systems war die aktive temperaturkontrollierte Kühlung der Spulenanordnung; diese erfolgte mittels unter Isoliermaterial angebrachten Kühlschläuchen um die Spulen, die von einer 50%igen Ethanol/Wasserlösung durchströmt wurden. Diese Kühlflüssigkeit wurde in ein Radiatorsystem außerhalb des Inkubators gepumpt. Dort erfolgte durch ein temperaturgesteuertes Wasserkühlsystem aus dem Computerbereich (Tribe CL-W0020, Thermaltake, Taiphe, Taiwan) die gezielte Temperierung und Rückführung der Flüssigkeit an die Spulen. Mit diesem System konnte eine konstante Temperatur von  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  während der Stimulation aufrechterhalten werden.

Anhand der o.g. veröffentlichten Studien und Experimente und der Berechnungen von Hart wurden für das elektromagnetische Feld folgende Zielparameter definiert: Spitzenflussdichte 0,9-3,5mT, sinusförmige Funktion als Impuls (keine Einzelpulse), Frequenz der Sinusfunktion 60 Hz. Der homogene Bereich des erzeugten Feldes sollte mindesten Raum von 10 cm x 10 cm x 6 cm umfassen um die notwendige Anzahl an Proben zeitgleich befelden zu können. Es wurde die Flussdichteverteilung berechnet. Es wurden dabei folgende Annahmen gemacht. Nach dem Gesetz von Biot-Savart steht die elektrische Stromdichte  $J$  und die magnetische Feldstärke  $H$  in Zusammenhang, über die magnetische Permeabilität lässt sich ein Zusammenhang zwischen magnetischer Flussdichte  $B$  und der Feldstärke  $H$  beschreiben, daraus ergibt sich auch ein Zusammenhang zwischen der elektrischen Stromdichte  $J$  und der Flussdichte  $B$ . Diese Annahme beruht auf der Voraussetzung, dass sich der Raum im Inneren der Spule isotrop verhält. Die magnetische Permeabilität der verwendeten Zellkulturen und der daraus folgenden Anisotropie des Felds im Inneren der Spule durch Einbringen der Zellkulturen wurde bei den Berechnung nicht berücksichtigt. Unter dieser Annahme wurde die magnetische Permeabilität  $\mu_r$  für Luft durch die Permeabilität  $\mu_v = 1$  von Vakuum angenähert. Man erhält so die integrale Form des Biot-Savart Gesetzes für einen infinitesimal kleinen Leiterabschnitt am Ort  $r'$  und die zugehörige integrale magnetische Flussdichte am Ort  $r$ .

Anhand dieser Formel konnte eine mathematische Abschätzung der praktischen Parameter zur Spulenkonstruktion vorgenommen werden. Die endgültigen Parameter während der Stimulation wurden schließlich empirisch mittels eines tragbaren Gaussmeters (FWD-5180 Gaussmeter, F.W. Bell, Orlando, FL) sowohl vor den Experimenten als auch regelmäßig zwischen den Experimenten geprüft und verifiziert. Dabei wurden die Messungen zur Minimierung des Fehlers in Bezug auf die tatsächlichen Experimente ebenfalls im Inkubator mit vergleichbaren Zellkulturen durchgeführt.

## 2.8. STIMULATIONSREGIME

Wie in 2.1. beschrieben erfolgte eine Unterteilung der Scaffolds in 9 Gruppen E0-E8. Die Gruppe E0 wurde nicht stimuliert und diente als Kontrollgruppe zum Startzeitpunkt der Stimulation nach der ersten Kulturphase von 7 Tagen post-Zellisolation. Die Gruppe E1 wurde ebenfalls nicht stimuliert und diente als Kontrollgruppe zum Endpunkt des Experiments nach 21 Tagen post-Zellisolation. Gruppe E2 wurde rein mechanisch nach folgendem Regime stimuliert: Ab Tag 7 post-Zellisolation jeden zweiten Tag eine Stunde am Morgen und eine Stunde am Abend (8 Stunden freies Intervall zwischen den mechanischen Stimulationen) mechanische Stimulation wie im Unterpunkt 2.6. Mechanische Stimulation detailliert beschrieben.



Abbildung 4: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, rot = mechanische Stimulation für eine Stunde, grün = freies Intervall ohne mechanische Stimulation von 8 Stunden

Die Gruppen E3, E4 und E5 wurden einer elektromagnetischen Stimulation unterzogen, jedoch keiner mechanischen Stimulation. Diese Gruppen wurden ähnlich der mechanischen Stimulation ab dem 7. Tag post-Zellisolation jeden zweiten Tag einmal für 3 Stunden mit einem elektromagnetischen Wechselfeld stimuliert. Bei Gruppe E3 hatte dieses Feld eine maximale magnetische Feldstärke von 1mT, bei Gruppe E4 von 2mT und bei Gruppe E5 von 3mT.



Abbildung 5: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, orange = elektromagnetische Stimulation für drei Stunde



Die Gruppen E6, E7 und E8 erhielten eine kombinierte Stimulation. Sie wurden ab dem 7. Tag post-Zellisolation jeden zweiten Tag mechanisch und elektromagnetisch stimuliert. Die mechanische Stimulation erfolgte analog zur Gruppe E2, die elektromagnetische Stimulation analog den Gruppen E3, E4, E5, hierbei wurde die Gruppe E6 mit 1mT, die Gruppe E7 mit 2mT und die Gruppe E8 mit 3mT maximaler Feldstärke stimuliert. Die elektromagnetische Stimulation erfolgte direkt im Anschluss an die erste mechanische Stimulation.



Abbildung 6: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, rot = mechanische Stimulation für eine Stunde, orange = elektromagnetische Stimulation für drei Stunde, grün = freies Intervall von 8 Stunden zwischen mechanischen Stimulationszyklen

## 2.9. MOLEKULARBIOLOGISCHE AUSWERTUNG

### 2.9.1. DNA QUANTIFIZIERUNG

Zur Einschätzung der Zellzahl bzw. der Veränderung der Zellzahl über den Verlauf des Experiments wurde die Menge an DNA pro Scaffold bestimmt. Da in einem 3-D Konstrukt keine Auszählung der Zellen wie in üblichen Monolayerkulturen möglich ist wurde auf die Methode der DNA Quantifizierung zurückgegriffen. Andere Ergebnisse, wie z.B. die Menge als Glykosaminoglykanen wurden dann jeweils auf den entsprechenden DNA Gehalt normiert.

Die DNA Quantifizierung erfolgte nach der Methode von Labarca und Paigen (Labarca and Paigen 1980) mittels der Fluoreszenzveränderung von Bisbenzimid bei Bindung an DNA. Bisbenzimid bindet spezifisch an A-T Regionen der doppelsträngigen DNA (dsDNA) und vermeidet dabei Probleme durch Kontaminationen mit RNA oder Proteinen, nach Bindung verstärkt es nach Anregung mit UV Licht der Wellenlänge 360nm seine Emission von Fluoreszenzlicht bei der Emissionswellenlänge 465nm. Durch den Vergleich der Messwerte mit einer Standardkurve können exakte dsDNA Mengen berechnet werden. Da die Emission einerseits von der Menge, andererseits von dem Verhältnis A-T zu G-C Stellen in der DNA abhängig ist wurde als Vergleichsprobe für diese Versuche ebenfalls bovine Thymus-dsDNA verwendet (A-T zu G-C Verhältnis beträgt ca. 60:40 in bovinen Proben). Vor den Messungen wurden die Proben nach identischem Schema vorbereitet. Für die Analyse wurde pro Gruppe pro Versuchsdurchführung von zwei verschiedenen Scaffolds (gesamt n=8) jeweils ein halber Scaffold mit phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, bestehend aus 3,402g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 3,55g/l Natriumdihydrogenphosphat und 116,88g/l Natriumchlorid in Milli-Q Wasser, pH angepasst auf 7,4) einmalig gewaschen und anschließend mit 0,5mg/ml Proteinase K in Phosphatpufferlösung (10,68g/l Natriumphosphatdihydrat, 8,45g/l Natriumphosphat-heptahydrat, und 3,36g/l Dinatrium-EDTA in Milli-Q

Wasser) bei pH 6,5 für 14h bei 56°C verdaut. Nach diesem Prozess ist die enthaltene dsDNA der enthaltenen Zellen in Lösung übergegangen und es kann aus der Phosphatpufferlösung die Gesamtmenge bestimmt werden. In Standard 96-well white plates für Fluoreszenzmessungen wurde jeweils im Duplikat eine Eichkurve erstellt (extended range assay, Eichkurve von 100ng/well bis 4000ng/well) sowie ebenfalls im Duplikat 40µl einer Probe zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 160µl der Assay Lösung bestehend aus 1µg/ml Bisbenzimid (Hoechst 33258) in DPBS. Anschließend erfolgte die lichtdichte Verpackung und Inkubation von 20 Minuten zur besseren Bindung und die unmittelbare Auswertung mit einem PE HTS 7000 Bio Assay Reader bei 360nm Anregungswellenlänge und 465nm Emissionswellenlänge. Mit Hilfe der bekannten Standardlösungen aus bovinem Thymus wurde eine Standardgerade erstellt und damit die Probenmesswerte auf DNA Mengen/well bezogen.

Anhand der DNA Menge erfolgte ein Vergleich hinsichtlich der Zellzahl und damit Proliferation in den einzelnen Gruppen. Außerdem diente die DNA Menge auch zur Normierung der Matrixsyntheseleistung in Form der Glykosaminoglykanproduktion.

#### 2.9.2. GLYKOSAMINOGLYKAN QUANTIFIZIERUNG

Glykosaminoglykane (GAG) der festen extrazellulären Matrix des Knorpels sind in der Regel schwefelhaltige Zuckerverbindungen, eine große Ausnahme bildet hier die nicht sulfatierte Hyaluronsäure (Kuettner and Kimura 1985). Bereits 1884 untersuchte Krukenberg diese sulfathaltigen Verbindungen (Krukenberg 1884) und identifizierte sie als Hauptbestandteil des Knorpels. Als Parameter der Matrixsyntheseleistung der Chondrozyten wurden sulfatierte Glykosaminoglykane in unserem Experiment quantitativ mittels direkter photospektrometischer Messung mit dem Dimethylmetylenblau (DMMB) Assay bestimmt wie von Farndale vorbeschrieben (Farndale, Buttle et al. 1986). Für die Analyse wurde pro Gruppe pro Versuchsdurchführung von zwei verschiedenen Scaffolds jeweils ein halber

Scaffold mit phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, bestehend aus 3,402g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 3,55g/l Natriumdihydrogenphosphat und 116,88g/l Natriumchlorid in Milli-Q Wasser, pH angepasst auf 7,4) einmalig gewaschen und anschließend mit 0,5mg/ml Proteinase K in Phosphatpufferlösung (10,68g/l Natriumphosphatdihydrat, 8,45g/l Natriumphosphat-heptahydrat, und 3,36g/l Dinatrium-EDTA in Milli-Q Wasser) bei pH 6,5 für 14h bei 56°C verdaut. Da die Analyse nur wenig Material erfordert und die Werte im späteren Verlauf in Relation gesetzt wurden wurde die Bestimmung der DNA Menge und der GAG Menge aus den gleichen Ansätzen gemacht. Die Quantifizierung erfordert eine Standardlösung zur Herstellung einer Eichkurve, hierzu wurden Lösungen von Chondroitin-4-sulfat aus ebenfalls bovinem Trachealknorpel in Milli-Q Wasser in Konzentrationen zwischen 0,078µg/well bis zu 2,5µg/well in einer 96-well Assay Platte (Typ Costar #3590) verwendet. Es wurden jeweils Duplikate von 20µl der Eichreihe sowie der Proben in die einzelnen Kavitäten einer Platte pipettiert. Anschließend wurden 200µl DMMB Farblösung, bestehend aus 16mg/l 1,9-Dimethyl-methylenblau, 3,04g/l Glycin und 2,37g/l Natriumchlorid in Milli-Q Wasser dazugegeben und direkt die Absorption bei einer Wellenlänge von 535nm gemessen. Anhand der Eichlösungen wurde eine Standardkurve auf Basis der Absorptionswerte erstellt und die Messwerte der Proben auf µg/well umgerechnet.

Die GAG Mengen wurden anschließend auf die respektiven DNA Mengen der entsprechenden Probe bezogen um eine Normierung der Matrixproduktion auf die Zellzahl zu erreichen. Somit konnte auf die Syntheseleistung der Chondrozyten dieser Probe rückgeschlossen werden und es konnten Veränderungen aufgrund einer ggf. vorhandenen erhöhten oder verminderten Zellzahl ausgeschlossen werden.

## 2.10. GENEXPRESSIONSANALYSE

### 2.10.1. RNA EXTRAKTION

Zur Analyse der Gen-Expressionsmuster der verwendeten Chondrozyten werden ausreichend große und hinreichend reine Mengen an RNA benötigt was hohe Anforderungen an die Extraktionsverfahren stellt. Insbesondere da Knorpelgewebe hohe Anteile an Proteoglykanen enthält sind hier spezielle Extraktionsmethoden, in diesem Fall die Nutzung einer High-Salt-Precipitation notwendig. Es wurde die von Chomczynski und Sacchi beschriebene Phenol-Chloroform Methode benutzt und anhand des Protokolls des Herstellers des TRI Reagenz, Molecular Research Center (Cincinnati, OH) angepasst (Chomczynski and Sacchi 1987, Chomczynski 1993, Chomczynski and Mackey 1995, Chomczynski and Mackey 1995, Chomczynski and Sacchi 2006).

Es wurden zur Extraktion vertikal halbierte Scaffolds verwendet. Diese Hälften wurden jeweils einzeln in 2ml Eppendorftubes in einem TissueLyzer Homogenisator (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) zusammen mit 1ml TRI Reagenz („TRI“, Molecular Research Center) sowie 3µl Polyacryl Carrier<sup>TM</sup> lysiert, bei 12000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, der klare Überstand in neue Cryotubes überführt und dieser anschließend bei -80°C gelagert. Zur Isolation wurden die entsprechenden Proben bei Raumtemperatur (20°C) aufgetaut und anschließend 0,1 ml 1-Bromo-3-chloropropan (BCP) pro Milliliter verwendetem TRI Reagenz zugegeben. Diese Mischung wurde für 15 Sekunden intensiv vermischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann direkt für 10 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Das Gemisch aus TRI und BCP separiert sich bei der Zentrifugation in zwei Phasen. Einmal die schwerere, rote organische Phenol-Chloroform Phase und eine leichtere, klare wässrige Phase. Dazwischen bildet sich eine mehr oder weniger stark vermischte Zwischenphase aus. RNA ist exklusiv in der wässrigen Phase vorhanden während DNA und Proteine in der organischen Phase und teils auch der Interphase vorhanden sind. Zur RNA

Extraktion wird im Weiteren nur die wässrige Phase verwendet, dazu überführt man diese in neue Tubes. Zur wässrigen Phase wird pro ursprünglichem Milliliter TRI jetzt 0,25 ml Isopropanol gegeben, da es sich um proteoglykanreiches Ursprungsgewebe handelt wird außerdem die gleiche Menge von 0,25 ml pro Milliliter ursprünglichem TRI an sog. High-Salt-Precipitation-Solution zugegeben. Diese Salzlösung besteht aus 1,2molarer Natriumchlorid und 0,8 molarer Natriumcitrat Lösung. Die Mischung aus wässriger Phase, Isopropanol und Salzlösung wird ebenfalls für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 8 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Am Boden des Tubes entwickelt sich während der Zentrifugation ein RNA Pellet. Nach Entfernen des Überstandes wird dieses mit 75% Ethanol gewaschen, und anschließend erneut bei 7500g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das RNA Pellet ist in Ethanol bei -20°C stabil und kann so erneut gelagert werden. Zur weiteren Verwendung der RNA wird der Ethanol im Überstand abgenommen und das Pellet kurz luftgetrocknet. Das minimal feuchte RNA Pellet wird anschließend in 40 µl Milli-Q Wasser gelöst, das zuvor mit DEPC behandelt wurde um Ribonukleasen zu inaktivieren. Mit Hilfe der Absorption im Photospektrometer bei den Wellenlängen 260nm und 280nm wurde einerseits die Reinheit und andererseits die Menge an RNA gemessen. Reine RNA liefert  $A_{260}/A_{280}$  Ratiowerte im Bereich 1,6-2,1, während eine Verunreinigung mit Proteinen Werte  $<1,6$  liefert. Die Menge wurde mittels einer Verdünnung mit Tris-EDTA Puffer durchgeführt; eine Absorption  $A_{260}$  von 1,0 bedeutet hier eine Menge von 40µg/ml RNA in der gemessenen Lösung.

#### 2.10.2. QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR

Zur Verwendung der extrahierten RNA für die Real-Time PCR (rt-PCR) muss diese zuerst in komplementäre DNA umgewandelt werden. Dies erfolgte mit dem „TaqMan reverse transcription Kit“ (Applied Biosystems, Foster, CY, USA) in einem ersten reversen Transkriptionsschritt. Dazu wurden jeweils 1µg RNA je nach Konzentration nach der

Extraktion in insgesamt 7,7µl Volumen DEPC Wasser gelöst. Diese 7,7µl wurden dann zusammen mit TaqMan reverse transcription MasterMix (enthält 100mM dNTPs incl. dTTP, 50U/µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 10-fach Reverse Transcription Buffer und 20U/µl RNase Inhibitor in nucleasefreiem Wasser) aus o.g. Kit zu 20µl Volumen aufgefüllt und in Tubes entsprechend folgendem Protokoll inkubiert:

- I. 10 Minuten bei 25°C
- II. 30 Minuten bei 48°C
- III. 5 Minuten bei 95°C

Die gewonnene cDNA kann direkt nach der Reaktion bei -20° bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode, die auf die Idee der Vervielfältigung von DNA des Norwegers Kleppe zurückgeht (Kleppe, Ohtsuka et al. 1971) und dann von Mullis (Mullis, Faloona et al. 1986) als Polymerase Kettenreaktion publiziert wurde. Die quantitative rt-PCR unterscheidet sich von anderen PCR Formen durch einen fluoreszierenden Farbstoff, der sich an bestimmte entstehende DNA Produkte anlagern kann und über diese Fluoreszenz bereits während des Ablaufs des PCR-Prozesses über die Intensität der Fluoreszenz auf die Menge an PCR Produkten und damit auf die Menge der Ausgangsstoffe geschlossen werden kann. Bei der Endpunkt PCR werden zuerst alle Thermozyklen durchlaufen und anschließend über eine Gelelektrophorese die Produkte sowie deren Mengen grob bestimmt; sie dient oftmals weniger der direkten Analytik sondern vermehrt der Produktion spezifischer identischer DNA Abschnitte.

Bezüglich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zur Analyse gibt es unterschiedliche Varianten. Für alle Analysen in dieser Studie wurden TaqMan- bzw. Hydrolyse-Sonden nach dem FAM-TAMRA Prinzip verwendet, einer Untergruppe der FRET (fluorescence resonance energy transfer) Sonden. Dabei wird eine Sonde bestehend aus Quencher und Reporter durch

eine spezielle Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität während der Gegenstrangsynthese abgebaut und dadurch ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz induziert. Dieser Fluoreszenzanstieg wird in jedem Zyklus gemessen und durch Vergleichskurven können einerseits relative, durch Kurven bekannter Proben mit bekannter Kopienzahl sogar definitiv-quantitative Aussagen bzgl. der zu Beginn der PCR vorhandenen Kopienzahl der zu untersuchenden cDNA gemacht werden. In dieser Untersuchung wurde ein relativ-quantitativer Ansatz mit dem Vergleich eines sog. Housekeeping Gens verwendet. Dabei wird ein Gen als Referenzgen verwendet, bei dem eine konstante Expression auch unter unterschiedlichsten Umständen gesichert ist, für Chondrozyten ist bei dieser Fragestellung nach eigenen und externen Untersuchungen das ribosomale Gen 18S sehr gut für diesen Zweck geeignet (Lee, Grad et al. 2005, Grad, Gogolewski et al. 2006, Grad, Lee et al. 2006, Peng, Zhao et al. 2012). Für den Versuchsansatz wurden jeweils 20µl Reaktionsvolumen genutzt, diese 20µl setzten sich wie folgt zusammen: 10µl TaqMan Universal Master Mix (2-fach konzentriert), 0,4µl 45µM Vorwärts-Primer, 0,4µl 45µM Rückwärts-Primer, 0,4µl 12,5µM TaqMan-Sonde, 2µl cDNA Lösung (wie oben beschrieben) und 6,8µl DEPC Wasser. Abweichend davon wurde bei der Untersuchung des Housekeeping-Gens 18S ein fertiger, absolut standardisierter Primer-Sonden Mix verwendet: 10µl TaqMan Universal Master Mix (2-fach konzentriert), 1µl 18S-Primer-Sonden-Mix, 2µl cDNA Lösung und 7µl DEPC Wasser.

Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte in Anbetracht einer limitierten Analysemöglichkeit bei geringen Mengen von Genmaterial anhand Erfahrungen aus früheren Versuchen sowie der Relevanz einzelner Genprodukte auf die Funktion, Differenzierung und enzymatische Homöostase des hyalinen Gelenkknorpels.



Kollagen 2 ist zusammen mit Aggrecan das überwiegende Protein der extrazellulären Matrix im gesunden Gelenkknorpel, Kollagen 1 stellt quasi seinen Gegenpart im biomechanisch deutlich schlechteren fibrösen Knorpel dar. Aus dem Verhältnis lässt sich ein Vergleich der Konstrukte hinsichtlich des extrazellulären Zustands in Richtung hyalinem Gelenkknorpel ziehen; dieser Index wurde initial durch Untersuchungen gesunden und arthrotischen Knorpels geprägt (Martin, Jakob et al. 2001). Als nicht-kollagenes Matrixprotein spielt das cartilage oligomeric matrix protein (COMP) eine relevante Rolle im Aufbau der Extrazellulärmatrix gesunden Gelenkknorpels (Newton, Weremowicz et al. 1994, Petersen, Saxne et al. 2010). Lubricin bzw. PRG 4 hat seine Rolle wie bereits oben beschrieben in der Verbesserung der Gleitfähigkeit der Knorpeloberfläche (Schmidt and Sah 2007, Ludwig, McAllister et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor SOX-9 (sex determining region box 9) ist ein wichtiger Faktor der Chondrozytendifferenzierung als auch der Redifferenzierung während der in-vitro Kultur (DeLise, Fischer et al. 2000, Tallheden, Karlsson et al. 2004). Die Matrixmetalloproteinasen MMP3 und MMP13 sind Schlüsselenzyme des Matrixabbaus im Knorpel, insbesondere auch durch Aktivierung enzymatischer Kaskaden (Cawston and Wilson 2006, Echtermeyer, Bertrand et al. 2009, Wang, Sampson et al. 2013, Wang, Duan et al. 2013)

## 2.11. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

Die Histologie und Immunhistochemie wurde zur Bestätigung der bereits molekularbiologisch quantifizierten Proteine und zur Untersuchung des Aufbaus der 3-D Konstrukte gewählt. Hier erfolgte einerseits die direkte optische Beurteilung, sowie auch der semiquantitative Nachweis mittels standardisiertem Scoringverfahren. Zur Untersuchung wurden pro Stimulationsgruppe Hälften von zwei verschiedenen Scaffolds für die weiteren Schritte wie folgt fixiert, geschnitten und auf Objektträgern konserviert:

1. Immersion in 70% Methanollösung und Aufbewahrung bei 4°C
2. 24 h vor der Weiterverarbeitung Abwaschen der Methanollösung und Immersion in 5%iger Saccharose-Phosphatpuffer-Salzlösung (5%iges Saccharose-PBS)
3. Einbetten in Jung-Cryogel (Jung Einbettmedium, Leica, Nussloch) für mindestens 30 min
4. Schneiden von 14µm Schnitten mit dem Cryotom, Aufbringen der Schnitte auf Objektträgern und weitere Aufbewahrung bei -20°

Die so vorbehandelten Schnitte wurden im Weiteren entweder mit Toluidinblau gefärbt oder immunhistochemisch untersucht.

### 2.11.1. TOLUIDINBLAU FÄRBUNG

Zur Toluidinblau Färbung wurden die entsprechenden Objektträger auf Raumtemperatur gebracht, die aufgetragenen Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für wenige Sekunden eine Toluidinblau Lösung (0,1g Toluidinblau gelöst in 100ml aqua dest.) aufgebracht. Ausgiebiges Spülen mit aqua dest., anschließend Dehydratation durch eine ansteigende Alkoholreihe: 1 min Ethanol 70%, 1 min Ethanol 90%, 1 min Ethanol 95%, 2 mal 1 min Ethanol 99%, 2 mal 2min Ethanol 100%. Anschließend nochmaliges entwickeln der

Schnitte mit Xylol (2 mal 5 min Xylol 100%) und eindecken der Objektträger mit Dibutyl-Phtalat-Xylol (DPX, Sigma-Aldrich) und Deckgläsern – 48 h Aushärten des DPX unter dem Abzug vor der mikroskopischen Auswertung.

#### 2.11.2. IMMUNHISTOCHEMIE

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte für die 3 wichtigen Matrixproteine Kollagen 1, Kollagen 2 und Aggrecan. Das Procedere erfolgte ebenso wie bei der Toluidinblau Färbung mit auf Raumtemperatur gebrachten Objektträgern mit 14µm Schnitten der Scaffolds nach folgendem Schema:

1. Spülen der Objektträger mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)
2. 30 min Inkubation der Schnitte mit Hyaluronidase (0.25 U/ml, Sigma-Aldrich)
3. 60 min Blockieren der enzymatischen Aktivität der Schnitte mit Pferdeserum (1:20 mit PBS)
4. Aufbringen der Primärantikörper über Nacht bei 4°C.  
Kollagen 1 Antikörper erworben von Sigma Aldrich,  
Kollagen 2 und Aggrecan Antikörper erworben von der Development Studies Hybridoma Bank, University Iowa, IA
5. 3x 5min Waschen mit Tween/PBS (0.1% Tween in 1-facher PBS Lösung)
6. Aufbringen des Sekundärantikörpers für 30 min bei Raumtemperatur
7. 3x 5min Waschen mit Tween/PBS
8. Aufbringen des Avidin-Biotin-Komplexes (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) bei Raumtemperatur für 30 min
9. 3x 5min Waschen mit Tween/PBS
10. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 15 sec
11. Differenzierung der Färbung in Leitungswasser (Spülen / Waschen für 10min)

12. Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol-basiertes Eindecken wie unter  
 Unterpunkt 2.11.1. bei der Toluidin Blau Färbung beschrieben

Die so gefärbten Präparate wurden standardisiert mikroskopiert und nach dem adaptierten semi-quantitativen Remmele-Score ausgewertet. Somit konnte ein statistischer Vergleich durchgeführt werden (Remmele and Stegner 1987, Remmele and Schicketanz 1993). Der Remmele-Score setzt sich wie in Abbildung 7 gezeigt zusammen. Für die Auswertung wurden für jede Stimulationsgruppe 3 Objektträger ausgewählt und dort jeweils 3 Gesichtsfelder unter

<b><u>Adaptierter Remmele-Score</u></b>		dem Mikroskop ausgewertet, sodass
Färbeintensität (FI):	Keine Anfärbung – 0 Punkte Mäßige Anfärbung – 1 Punkt Mittlere Anfärbung – 2 Punkte Starke Anfärbung – 3 Punkte	am Ende pro Stimulations- oder
Extrazelluläre Matrix (ECM):	Keine Matrix – 0 Punkte bis zu 10% Matrix – 1 Punkt 11-30% Matrix – 2 Punkte 31-60% Matrix – 3 Punkte 61-100% Matrix – 4 Punkte (% der Fläche des Gesichtsfeldes)	Kontrollgruppe 9 Gesichtsfelder
		ausgewertet wurden. Die Daten
		wurden dann für jede Gruppe
		gemittelt und werden im Folgenden
	<b>Remmele-Score = Punkte [FI] x Punkte [ECM] (0-12 Punkte)</b>	als Mittelwert +/-

Abbildung 7: Bewertungsschema des adaptierten Remmele-Scores. Standardabweichung präsentiert.

2.11.3. STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel (Version 14.5 für Mac, Microsoft, Redmond, WA) sowie SPSS (Version 20, SPSS, Chicago, IL). Alle Datensätze wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht, es erfolgte ebenso nach Fahrmeier die Anwendung des „Zentralen Grenzwert Satzes der Mathematik“ bzgl. der Normalverteilung (Ludwig Fahrmeir 2012). Bzgl. der Genexpressionsanalyse erfolgte eine logarithmische Transformation um die bekannte schiefe Verteilung der Messwerte zu normalisieren. Die einzelnen Datensätze wurden dann mit dem zweiseitigen

Students-t-Test und dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test verglichen, gruppenweise Vergleiche über die Gesamtdaten hinweg wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die gesamte Studie wurde vorab ein Signifikanzniveau von  $P < 0.05$  definiert, ein  $P < 0.1$  wurde als Trend festgelegt und wird im Text so benannt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit bewusst keine Anpassung des Signifikanzniveaus für mehrfache Testung vorgenommen (Rothman 1990). Alle Daten werden in dieser Arbeit als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SA) oder Standardfehler (SF) vorgestellt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. DNA- UND GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT

Der DNA Gehalt zeigte sich über alle Konstrukte hinweg – ob stimuliert oder unstimuliert - annähernd konstant. Die GAG-Syntheseleistung war in allen stimulierten Gruppen der Kontrollgruppe signifikant überlegen ( $p < 0,05$ ). Die Gruppen mit einfacher Stimulation (nur mechanische Last oder ausschließliche elektromagnetische Stimulation) bewegten sich auf einem Niveau ohne signifikanten Unterschied mit einem Minimalwert in der 1mT

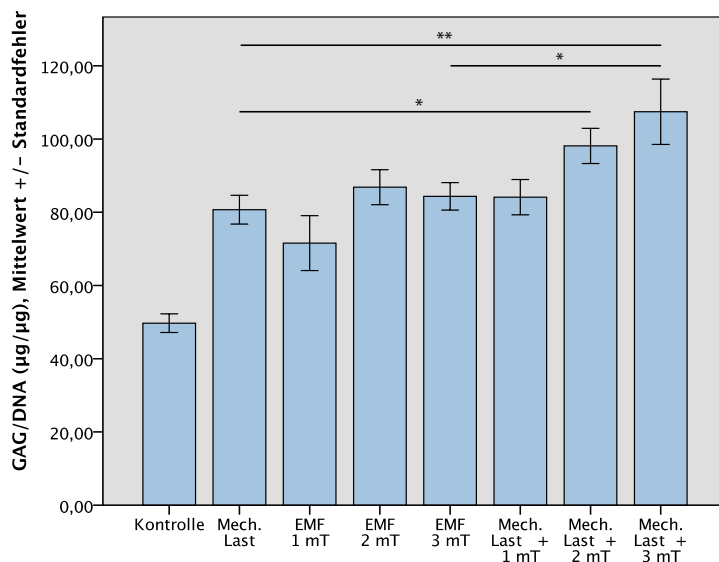


Abbildung 8: GAG Gehalt auf DNA Gehalt normiert. Alle stimulierten Gruppen signifikant der Kontrolle überlegen ( $p < 0,05$ ). Mechanische Belastung und 2mT Feld signifikant der mech. Belastung überlegen (\*,  $p < 0,05$ ). Mech. Belastung und 3mT jeweils mech. Belastung und 3mT als Einzelstimuli signifikant überlegen (\*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,005$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=8$ .

Stimulation. Die Kombinierte Stimulation präsentierte sich bei mechanischer Last und einem Feld von 1mT ebenfalls auf diesem Niveau. Die kombinierte Stimulation mit mechanischer Last und 2mT zeigte sich der reinen mechanischen Belastung gegenüber signifikant überlegen ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch der reinen Stimulation mit 2mT Feld ( $p > 0,1$ ); an der Spitze konnte bei kombiniert stimulierten

Konstrukten der Gruppe 3mT und mechanische Belastung mehr als doppelt so hohe Werte wie in der Kontrolle vorgefunden werden, hier zeigte sich auch ein signifikant höherer Glykosaminoglykangehalt pro DNA als bei den jeweiligen Einzelstimuli ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ).

### 3.2. GENEEXPRESSIONSANALYSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für PRG4, COMP, MMP3, MMP13 und SOX9 sowie das Verhältnis der Expressionen von Kollagen 2 zu Kollagen 1 dargestellt. Die Vertikale auf dem Niveau 1,0 dient als Referenzlinie bei Normierung aller Messwerte auf die Kontrolle. Eine vermehrte oder verminderte Expression lässt sich als „n-faches der Kontrolle“ direkt aus dem Balkendiagramm ablesen.

#### 3.2.1. KOLLAGEN 2 ZU KOLLAGEN 1 VERHÄLTNIS

Das Verhältnis Kollagen 2 zu Kollagen 1 zeigte bei mechanischer Belastung jeweils signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ). Dieser Effekt war unabhängig davon ob ein zusätzlicher elektromagnetischer Stimulus vorhanden war oder nicht. Im besten Fall der reinen mechanischen Stimulation und bei der Kombination mit einem 3mT Feld konnte eine annähernd verdreifachte Expression gemessen werden (2,9- und 2,8-fache Ratio gegenüber der Kontrolle). Die rein elektromagnetisch stimulierten Gruppen wiesen keine signifikante Abweichung von der Kontrolle auf ( $p > 0.1$ ). Der stärkste Effekt trat hier bei der 2mT Stimulation auf (1,45-fache Ratio).

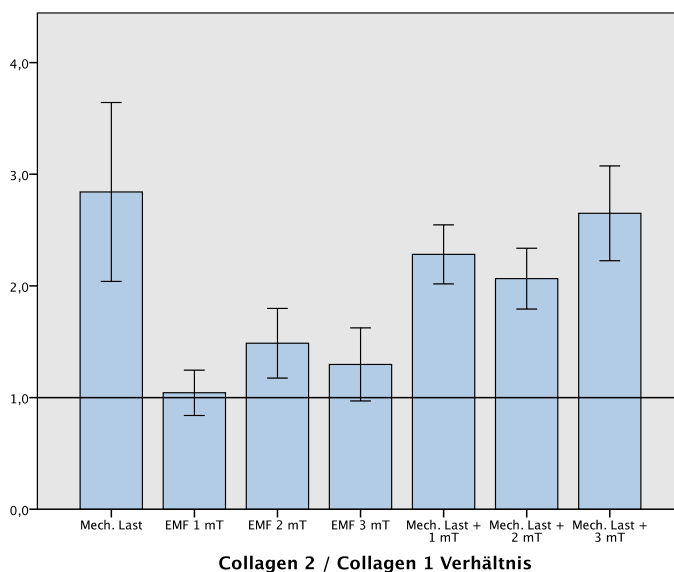


Abbildung 9: Kollagen 2 / Kollagen 1 Genexpressionsratio. Mechanische Belastung und Mech. Belastung und 1mT, 2mT oder 3mT signifikant der Kontrolle überlegen ( $p < 0,05$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

### 3.2.2. SOX9

In der Expression von SOX9 zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zur Kontrolle ( $p > 0.1$  für alle Gruppen). Insgesamt sind leicht erniedrigte Werte bei allen Gruppen mit Ausnahme der kombinierten Stimulation mit 1mT Feld zu beobachten. Es zeigte sich insgesamt ein Niveau auf etwa 70% des Kontrollniveaus.

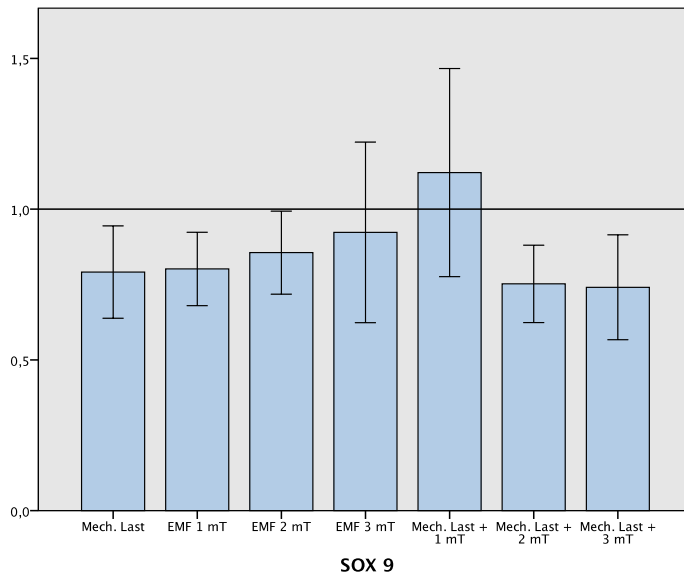


Abbildung 10: SOX9 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

### 3.2.3. COMP

Auch bei der COMP Expression zeigen sich keine signifikanten Abweichungen ( $p > 0.1$  für alle Gruppen). In allen mechanisch belasteten zeigen sich leicht erhöhte Expressionswerte. Maximal wurde dieser Wert für die mechanischen Stimulation (1,9-fache Expression). Die elektromagnetische Stimulation alleine zeigte keinen wesentlichen Einfluss, hier kann allenfalls bei der 3mT Stimulation eine leichte Erhöhung und bei der 1mT Stimulation eine leichte Erniedrigung der Genexpression beobachtet werden.



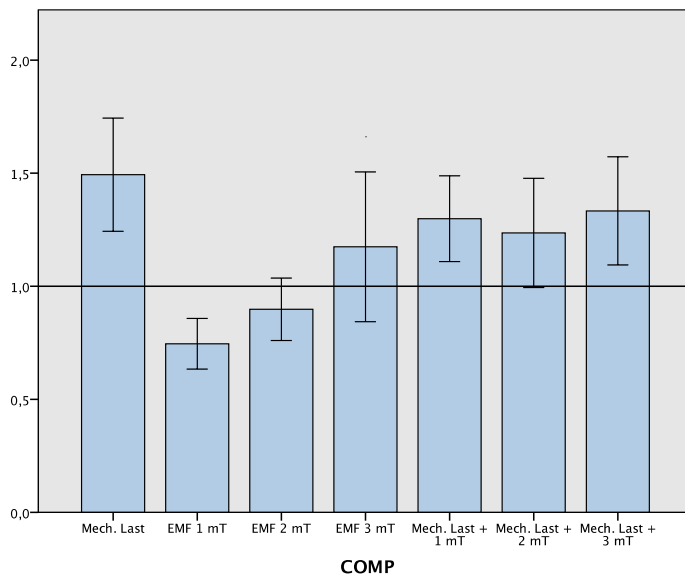


Abbildung 11: COMP Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;  $n=9$ .

### 3.2.4. MMP3

Die Expression von MMP3 zeigte sich über alle stimulierten Konstrukte hinweg vermindert. Für die 1mT, die 3mT und die kombinierte Stimulation mit mechanischer Belastung und 2mT oder 3mT Feld konnte hier ein Trend ( $p < 0,1$ ) gezeigt werden.

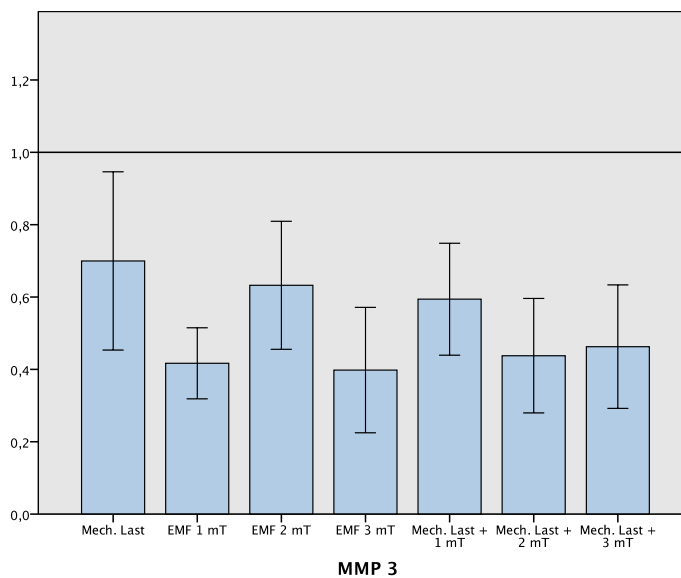


Abbildung 12: MMP3 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Trend zu verminderter Expression für 1mT, 3mT und mech. Last und 2mT oder 3mT ( $p < 0,1$ ).

### 3.2.5. MMP13

MMP13 zeigte eine signifikant verminderte Expression für die kombinierten Stimuli aus mechanischer Last und 1mT, 2mT und 3mT Feld ( $p < 0,05$ ). Mechanische Last alleine zeigte

eine verminderte Expression ohne Signifikanz oder Trend ( $p>0.1$ ). Die elektromagnetischen Stimuli ohne mechanische Last zeigten sich leicht vermindert bis annähernd unverändert gegenüber der Kontrolle ( $p>0.1$ ).

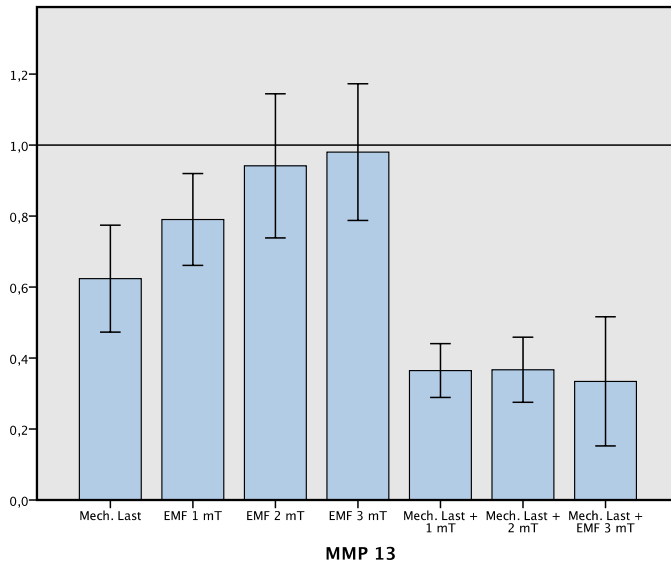


Abbildung 13: MMP13 Genexpression. Jeweils erniedrigte Expression ohne signifikante Abweichungen vom Kontrollwert für mech. Last sowie 1mT, 2mT und 3mT. Signifikante Suppression für die drei kombinierten Stimuli

### 3.2.6. PRG4

Die Expression von PRG4 war in allen Stimulationsgruppen - abgesehen vom niedrigen elektromagnetischen Stimulus mit 1mT jeweils erhöht gegenüber der Kontrolle. Es konnte aber kein statistischer Trend oder eine Signifikanz beobachtet werden ( $p>0.1$ ). Im Bestfall konnte jedoch sowohl bei der mechanischen Stimulation allein als auch bei der Kombination mit 3mT Feld eine mehr als doppelte Expression (2,2-fache Expression) von PRG4 gemessen werden.

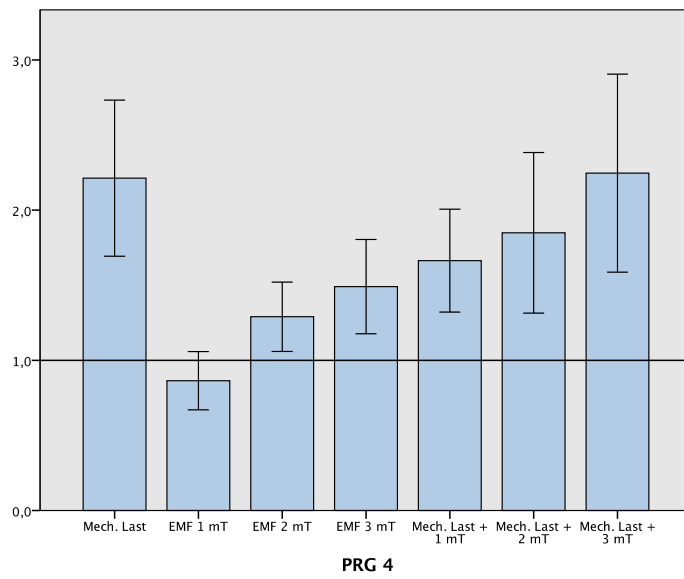


Abbildung 14: PRG4 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ), jedoch mechanisch stimulierte Gruppe mit bis zu 2,3-facher Expression. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;  $n=9$ .

### 3.3. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

#### 3.3.1. TOLUIDIN-BLAU FÄRBUNG

In der histologischen Auswertung zeigte sich generell über alle Versuchsgruppen hinweg ein Erhalt eines chondrozytenspezifischen runden Phänotyps, lediglich einige sehr wenige Zellen, insbesondere in den nicht stimulierten Kontrollgruppen zeigten ein spindelförmiges Erscheinungsbild. Insgesamt war eine homogene Verteilung der geseedeten Chondrozyten über jeweils das gesamte Knorpelkonstrukt zu bemerken. Allerdings zeigten die untersuchten Konstrukte tendenziell eine dichtere Extrazellulärmatrix in Richtung der Ränder, während sich im Zentrum der Konstrukte eine weniger dichte Matrix fand. Dieses Bild war in den elektromagnetisch stimulierten Gruppen weniger ausgeprägt, sie wiesen jeweils auch eine homogener wirkende Verteilung von Extrazellulärmatrix auf. Betrachtet man die Oberfläche der Scaffolds, so zeigen die mechanisch stimulierten Gruppen eine glattere und organisierter wirkende oberflächliche Zone in Richtung der mechanisch stimulierten Oberfläche.

#### 3.3.2. IMMUNHISTOCHEMIE

Alle mechanisch stimulierten Konstrukte zeigten – ganz unabhängig vom Stimulus – eine geringere Kollagen 1 und höhere Kollagen 2 und Aggrecan-spezifische Färbung verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe. Die alleine elektromagnetisch stimulierten Gruppen zeigten ein differenzierteres Bild, es lassen sich hier mit steigender Feldstärke höhere Werte im Remmele-Score für Kollagen 2 sowie Aggrecan und niedrigere Werte für Kollagen 1 finden, wobei das 1mT Feld ähnliche Remmele-Score Werte in Bezug auf Kollagen 1, Kollagen 2 und Aggrecan erzielt wie die unstimulierte Kontrolle, das alleinige 3mT Feld erzielt jedoch Scores im Bereich der mechanischen Stimulationsgruppe. Höchste Werte erzielte die kombinierte Stimulation mittels 3mT Feld sowie mechanischer Belastung; im Mittel traten hier mehr als 5-mal so hohe Scores für Kollagen 2 und Aggrecan auf, der

Kollagen 1 Wert lag im Mittel bei weniger als der Hälfte bezogen auf die Kontrollgruppe.

Aufgrund der Datenbeschaffenheit erfolgte keine Signifikanztestung.

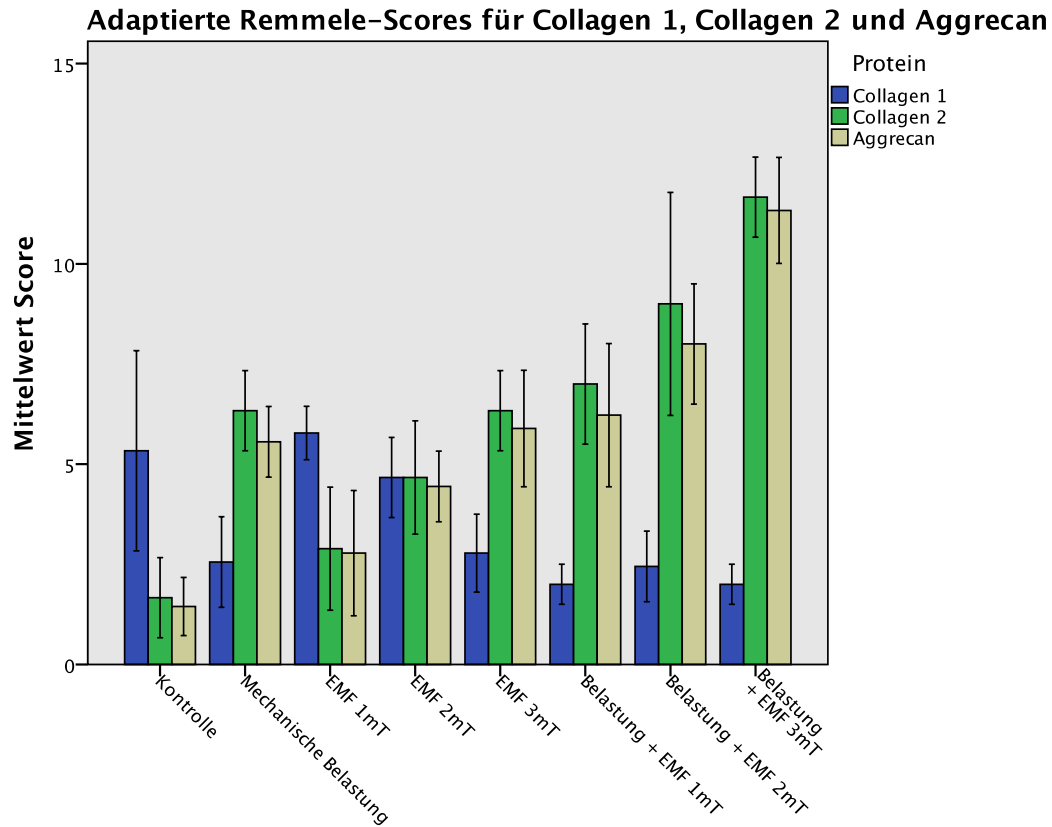


Abbildung 15: Adaptierte Remmele Scores präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung; Tabelle angepasst übernommen (Hilz, Ahrens et al. 2014).

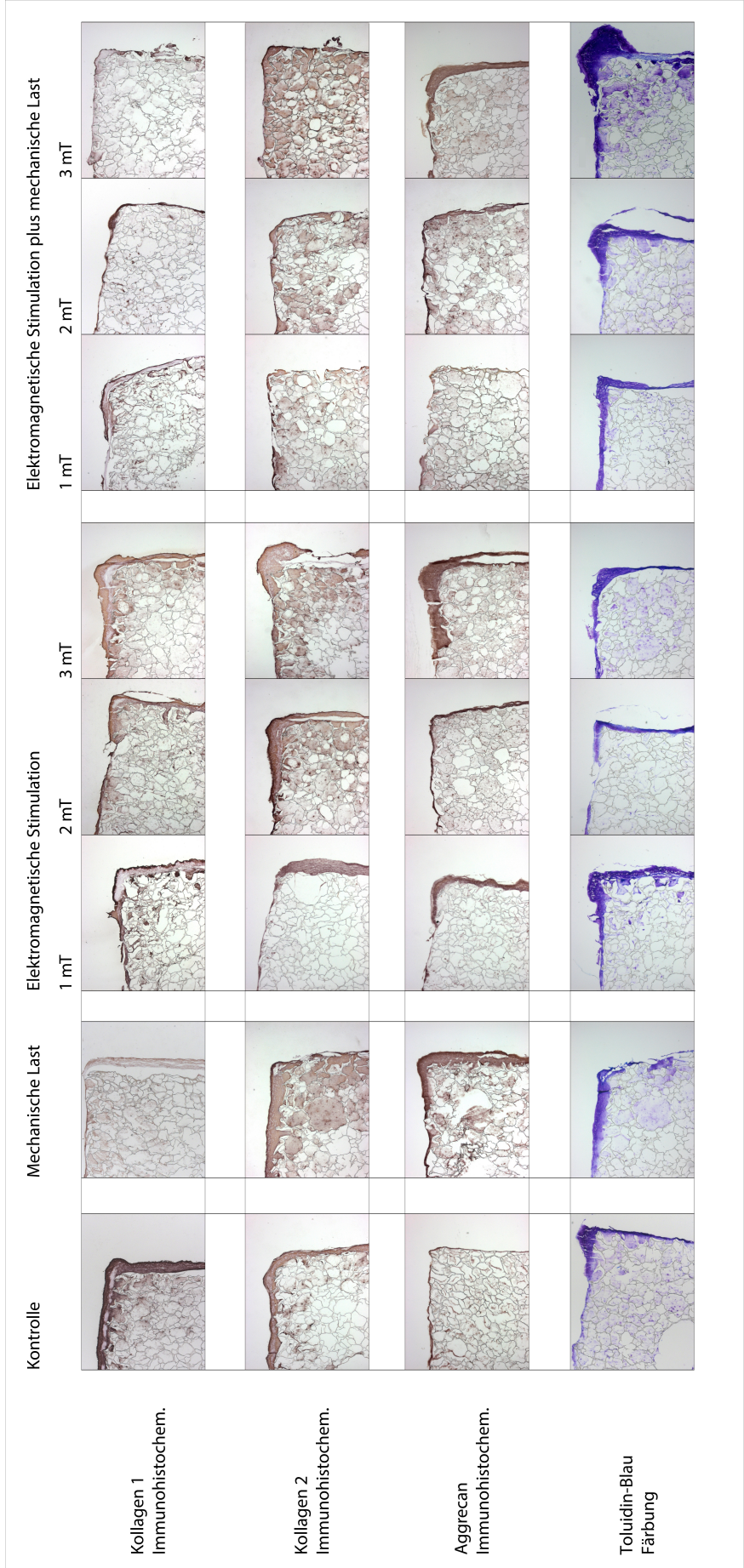


Abbildung 16: Histologische Übersicht über alle Gruppen, jeweils vergleichbare mikroskopische Gesichtsfelder. Erste Zeile - Kollagen 1 ICH; 2. Zeile - Kollagen 2 IHC; 3. Zeile - Aggrecan ICH; 4. Zeile - Toluidin-Blau Färbung. Spaltenweise die Stimuli, von links nach rechts: Unstimulierte Kontrolle; mech. Last; EMF 1mT, 2mT und 3mT; EMF 1mT, 2mT, 3mT und mech. Last.

### 3.4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Kurz zusammenfassend lassen sich folgende Kernaussagen treffen. Alle stimulierten Gruppen zeigten einen signifikant höheren GAG / DNA Gehalt sowie den Erhalt eines chondrozytenspezifischen Phänotyps in der Toluidin-Blau Färbung. Konstrukte mit mechanischer Stimulation ohne Kombination mit elektromagnetischem Feld (Mech. Last) ergaben einen signifikant erhöhten Kollagen 2 / Kollagen 1 Quotienten, dazu vermehrte Kollagen 2 und Aggrecan spezifische Anfärbung in der IHC und geringere Anfärbung bzgl. Kollagen 1. Die allein elektromagnetisch stimulierten Gruppen (1mT, 2mT und 3mT EMF) präsentierten stärkere Effekte bei höheren Feldstärken, gegenüber der Kontrolle ebenfalls eine vermehrte Anfärbung bzgl. Kollagen 2 und Aggrecan und eine geringere Färbeintensität bzgl. Kollagen 1 in der IHC. In der Genexpressionsanalyse zeigten die alleinig elektromagnetisch stimulierten Gruppen keine signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Kombination aus mechanischer Last und elektromagnetischer Stimulation ergab nach Feldstärke gestaffelte Ergebnisse. Die 3mT Befeldung erzielte jeweils Höchstwerte für den GAG / DNA Gehalt, für die Remmele-Score Werte von Kollagen 2 und Aggrecan sowie die Genexpression von PRG4. Insgesamt zeigten sich - feldstärkeabhängig - bei der kombinierte Stimulation hohe Quotienten für Kollagen 2 / Kollagen 1 und eine niedrige Expression von Matrixmetalloproteinasen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. MECHANISCHE STIMULATION

Die mechanische Stimulation, insbesondere die Kompression war Bestandteil vieler Untersuchungen im Tissue Engineering von Knorpel. Zunehmend geraten in der letzten Dekade durch verbesserte mechanische Möglichkeiten komplexere Bioreaktoren in den Fokus der Wissenschaft. Hier wird oftmals auch die Kombination von Kompression und Scherbelastung bzw. als weniger definierter Begriff die oberflächlich gleitende Belastung (sliding surface motion) realisiert und deren Effekte untersuchbar.

Vergleicht man die Matrixsyntheseleistung der einzelnen Gruppen mittels GAG Messungen und der Immunhistochemie so zeigt die mechanische Stimulation in der vorliegenden Studie eine vermehrte Synthese von Glykosaminoglykanen, Kollagen 2 und Aggrecan. Auf Genexpressionsebene wird dieses Bild durch eine signifikant erhöhte Kollagen 2 / Kollagen 1 Expressionsratio bestätigt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Arbeiten unter vergleichbaren Bedingungen (Grad, Kupcsik et al. 2003, Grad, Gogolewski et al. 2006, Salzmann, Nuernberger et al. 2009, Salzmann, Buchberger et al. 2010, Grad, Eglin et al. 2011). Die mechanisch nicht stimulierte Kontrolle wies insgesamt sowohl eine niedrigere Matrixsyntheseleistung als auch ein zu Kollagen 1 verschobenes Expressionsprofil auf. Hier zeigte sich tendenziell ein fibrokartilaginöser Phänotyp (Martin, Jakob et al. 2001). Bzgl. der Genexpression von Matrixmetalloproteinase wurde entgegen der vorliegenden Arbeit von Nicodemus und Bryant eine erhöhte Expression berichtet (Nicodemus and Bryant 2008). Allerdings bestätigen Arbeiten sowohl mit adulten Chondrozyten aus arthrotischen Gelenken als auch juvenilen bovinen Chondrozyten unter mechanischer Belastung jeweils eine verringerte Genexpression der Metalloproteinasen (Theodoropoulos, DeCroos et al. 2014, Halbwirth, Niculescu-Morzsa et al. 2015). Die Rolle dieser Matrixproteinase bleibt jedoch weiterhin strittig. MMP-knock-out Mäuse konnten trotz fehlender Proteinaseaktivität eine



Knorpeldegeneration entwickeln, wohingegen Wang et al. eine Verlangsamung bis hin zu einer Verhinderung der Knorpeldegeneration besonders bei niedriger MMP13 Expression zeigen konnte (Haro, Crawford et al. 2000, Wang, Sampson et al. 2013). Denkbar ist hier, dass ein gewisses Maß an MMP Aktivität zu intaktem Knorpel notwendig ist und hier Umbauprozesse gezielt im Rahmen einer Homöostase gesteuert werden. Dies wäre vergleichbar dem gesunden Knochen-auf und -abbau im Sinne eines Adaptationsprozesses und damit dem dauerhaften Funktionserhalt gewidmet. Die erhöhte PRG4 Expression (trotz fehlender Signifikanz) wird in mehreren Arbeiten bestätigt: Die Applikation von oberflächlichen Belastungen im Sinne von Scherbelastungen führte jeweils zu erhöhter Expression (Grad, Lee et al. 2005, Grad, Gogolewski et al. 2006, Li, Yao et al. 2007, Kaupp, Tse et al. 2013). COMP als Kollagen 2 vernetzendes und stabilisierendes Protein zeigte sich von mechanischer Kompression hingegen nahezu unbeeinflusst. Diesbezüglich stehen in der Literatur nur wenige Studien zur Verfügung. Allerdings zeigte sich eine gesteigerte Expression bei Zugbelastung und unter zyklischer hydrostatischer Druckbelastung (Puetzer, Williams et al. 2013, Bleuel, Zaucke et al. 2015). Hier kann durch die verwendete mechanische Druck- und Scherbelastung jeweils kein ausreichendes Moment übertragen worden sein um eine wirksame Zugbelastung zu generieren, hydrostatischer Druck kann in dem vorliegenden offenen System nicht relevant entstehen.

Insgesamt bestätigt die vorliegende Arbeit im Bereich der mechanischen Stimulation einige frühere Studien und zeigt positive Ergebnisse. Vor allem durch die kombinierte Stimulation aus Kompression und Scherbelastung kann ein chondrozytentypisches Expressionsprofil und Matrixsynthese erreicht werden. Im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle zeigt sich eine klare Abgrenzung vom fibrokartilaginösen Phänotyp. Eine weitere Optimierung der Stimulationsparameter im gezeigten Bioreaktor (z.B. Eindringtiefe, Frequenz,

Scherkraftstimulation mit erhöhter Kontaktfläche, veränderte Stimulationszyklen) kann Gegenstand weiterer Studien sein.

#### 4.2. ELEKTROMAGNETISCHE STIMULATION

Die reine elektromagnetische Stimulation mit 1mT, 2mT oder 3mT zeigte insgesamt einen klaren Trend zu verstärkten Effekten bei höherer elektromagnetischer Befeldung. In der molekularbiologischen Auswertung des Glykosaminoglykangehalts konnte in allen elektromagnetisch stimulierten Gruppen eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Die Werte befanden sich circa auf dem Niveau der alleinigen mechanischen Stimulation. Höhere Feldstärken zeigten hier wie bereits oben genannt jeweils einen höheren GAG-Gehalt. Dies steht im Einklang mit Arbeiten an adultem Knorpel (De Mattei, Pasello et al. 2003, De Mattei, Fini et al. 2007, Ongaro, Pellati et al. 2011, Veronesi, Fini et al. 2015) sowie Arbeiten an der Knorpel-Knochenreifung von neugeborenen Mäusen (Hinsenkamp and Rooze 1982). Eine messbare Wirksamkeit elektromagnetischer Felder ab einem Grenzwert, in dieser Studie für Felder >1mT, konnte von Sakai et al. ebenso gezeigt werden (Sakai, Suzuki et al. 1991). Auf einen Zusammenhang zwischen elektromagnetischer Stimulation und Matrixsynthese weisen Studien von Salzmann und Hinsenkamp hin. Sie erzielten vergleichbare Effekte auf die extrazelluläre Matrix durch Stimulation mit BMP2 bzw. durch elektromagnetische Stimulation eine erhöhte Expression von BMP2 (Salzmann, Nuernberger et al. 2009, Hinsenkamp and Collard 2011). Die Kollagen 2/1 Ratio zeigte in der vorliegenden Arbeit zwar leicht erhöhte Werte aber keine signifikante Veränderung in der Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe. Jedoch wurden in der Immunhistochemie für die 3mT Stimulation ähnliche Werte für Kollagen 1, 2 und Aggrecan ermittelt wie sie die mechanische Belastung zeigte. Die 1mT Befeldung wies auch in der Immunhistochemie keine wesentlichen Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe auf. Somit wird das Dosis-Wirkungs-Prinzip mit dem bereits genannten Schwellenwert um 1mT bzgl. der

elektromagnetischen Stimulation bestätigt. Es muss jedoch nach den vorliegenden Daten differenziert werden, dass sehr wohl bereits bei 1mT Stimulation Effekte auf die GAG Synthese auftraten jedoch weitere Effekte auf z.B. die Kollagensynthese oder Genexpression ausblieben. Die 1mT Stimulation scheint zumindest im vorliegenden Versuchsaufbau somit keine adäquate biologische Wirksamkeit im Knorpel Tissue Engineering zu erzielen. Es wurden in dieser Arbeit jedoch insgesamt geringere Effekte auf Kollagen 1 und 2 gemessen als sie z.B. von Mayer-Wagner bei mesenchymalen Stammzellen beschrieben wurden (Mayer-Wagner, Passberger et al. 2011). Beschrieben sind des weiteren starke Effekte vergleichbarer elektromagnetischer Felder in Bezug auf Kollagen 1 und 2 im Rahmen der chondrogenen Differenzierung von Fettstammzellen (Chen, Lin et al. 2012). Hier kann im Sinne eines Erklärungsversuches eine stärkere Wirkung der elektromagnetischen Feldkomponenten auf pluripotente Zellen im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten hypothetisiert werden. Im Einklang mit Arbeiten von Okada und Ciombor zeigt sich eine erhöhte Deposition von Aggrecan in der Immunhistochemie (Ciombor, Lester et al. 2002, Ciombor, Aaron et al. 2003, Okada, Kim et al. 2011). Beide Autoren beschreiben jeweils eine vermehrte Genexpression von Aggrecan sowie eine tatsächlich vermehrte Synthese. MMP3 präsentiert eine deutlich reduzierte Expression unter elektromagnetischer Stimulation. Bei MMP13 ist dieser Effekt in den alleinig elektromagnetisch stimulierten Gruppen schwächer ausgeprägt jedoch noch vorhanden. Diese Ergebnisse unterstützen bisherige Studien, in denen durch EMF Stimulation ein verminderter Proteoglykanabbau sowie eine Suppression der Matrixproteinasen gezeigt wurde (Liu, Abbott et al. 1996, Ciombor, Aaron et al. 2003). Wie bereits oben genannt ist der Einfluss auf die Knorpelhomöostase der MMPs jedoch nicht abschließend geklärt. PRG4 zeigte keine ausgeprägten Veränderungen durch alleinige elektromagnetische Stimulation. Auch in der aktuellen Literatur werden keine beschrieben. Bzgl. der Expression von COMP finden sich ebenfalls keine Studien anderer Arbeitsgruppen. Hier kann allenfalls von minimalen Effekten ausgegangen werden.

Zusammenfassend bestätigen die hier beobachteten Effekte der elektromagnetischen Stimulation frühere Studien. In den differenzierten Chondrozyten der vorliegenden Studie wurden jedoch geringere Effekte beobachtet als in Stammzellexperimenten der Studien von Mayer-Wagner et al. oder Chen et al.. Vergleichbar dazu wurde durch elektromagnetische Knochenstimulation ein stärkerer osteoanaboler Effekt auf frühe Differenzierungsstufen der Osteoblasten beobachtet (Diniz, Shomura et al. 2002) Ein Erklärungsversuch kann eine erhöhte Suszeptibilität von Stammzellen gegenüber elektrischen Stimuli darstellen, wie sie z.B. von Hunt und Funk in Grundlagenarbeiten über die elektrische und elektromagnetische Stimulation biologischer Systeme hypothetisiert wurde (Funk, Monsees et al. 2009, Hunt, Zavalin et al. 2009). Der Stimulus mit 1mT mag also für differenzierte Chondrozyten bereits grenzwertig niedrig sein, für pluripotente Zellen kann er sich dennoch als ausreichend wirksam erweisen.

#### 4.3. KOMBINIERTE STIMULATION

In den Gruppen mit kombinierter Stimulation konnten nahezu durchweg verstärkte Effekte im Vergleich zu den jeweiligen Einzelstimuli beobachtet werden. Studien anderer Arbeitsgruppen mit vergleichbaren Stimulationskombinationen existieren aktuell nicht. So müssen die Erklärungen und Vergleiche jeweils auf Studien der Einzelstimulationen mechanische Belastung oder elektromagnetische Stimulation bezogen werden wie sie größtenteils bereits in der Diskussion genannt wurden.

Den größten Effekt auf die Matrixsyntheseleistung haben die – nach Stärke der elektromagnetischen Stimulation gestaffelt – kombinierten Stimuli. In der Quantifizierung der Glykosaminoglykansynthese sowie im immunhistologischen Scoring zeigen sich unter kombinierter Belastung/Stimulation signifikant höhere Werte als in der Kontrolle bzw. gegenüber den jeweiligen Einzelstimuli (Mechanische Belastung + 3mT Feld vs. 3mT Feld

vs. Mechanische Belastung). Hier kann aufgrund der Höhe am ehesten von additiven Effekten ausgegangen werden, d.h. ein Synergismus im Sinne einer Potenzierung der Effekte findet nicht statt. Bei der Gabe von Wachstumsfaktoren und mechanischer Stimulation werden synergistische Effekte v.a. aufgrund einer verbesserten Pharmakokinetik der Faktoren vermutet (Bonassar, Grodzinsky et al. 2001, Mauck, Nicoll et al. 2003). Allerdings zeigt z.B. Salzmann et al. für eine Kombination aus gentechnischer Stimulation via BMP2 Synthese durch transfizierte Chondrozyten und mechanischer Belastung ebenfalls synergistische Effekte ohne auf die Pharmakokinetik angewiesen zu sein (Salzmann, Buchberger et al. 2010). Dies wurde mit ähnlichen Signaltransduktionswegen begründet, die bei vermehrter Stimulation zu genanntem Synergismus in der Endstrecke führte (Jin, Emkey et al. 2003, Salzmann, Nuernberger et al. 2009). Zielt man jetzt auf eine Hypothese der Signaltransduktionswege der elektromagnetischen Stimulation ab so kann man Maurice Hinsenkamps Studie mit erhöhter Expression von BMP2 durch elektromagnetische Stimulation und die gentechnischen Arbeiten von Gian Salzmann mit vermehrter Matrixsynthese unter BMP2 Stimulation in Bezug setzen und ähnliche Signalwege postulieren (Salzmann, Nuernberger et al. 2009, Hinsenkamp and Collard 2011). Ein Synergismus der elektromagnetischen Stimulation und der mechanischen Belastung über die gezeigten additiven Effekte hinaus ist allein durch die vorliegende Arbeit nicht ausgeschlossen. Besonders im Scoring der Immunhistochemie zeigt sich ein Aufwärtstrend in Bezug auf Kollagen 2 und Aggrecan. Bei der elektromagnetischen Stimulation kann hier neben einem kritischen unteren Grenzwert ohne wesentliche Effekte auch ein weiterer Grenzwert hypothetisiert werden ab dem ggf. deutlich verstärkte Effekte bis hin zum Synergismus auftreten können. Da sich die Literatur hierzu auf die unteren Grenzwerte, unterhalb derer keine messbaren Effekte beobachten waren beschränkt sind weitere Untersuchungen notwendig (Sakai, Suzuki et al. 1991). Interessanterweise ist trotz der ausgeprägten Effekte auf die tatsächliche Matrixsyntheseleistung die Genexpression von

Kollagen 2 und Kollagen 1 gegenüber der alleinigen mechanischen Belastung kaum verändert bzw. sogar erniedrigt. Der immunhistologische Nachweis von Kollagen 1 zeigte sich über alle Stimulationsgruppen hinweg auf konstant niedrigem Niveau. Daher kann somit von einer ausreichend differenzierenden Wirkung auf die Chondrozyten mit einhergehender Suppression der Kollagen 1 Synthese ausgegangen werden. Vorliegendes Kollagen 1 wird vermutlich am ehesten in der frühen Phase des Untersuchungszeitraums während der Redifferenzierung gebildet (Benya and Shaffer 1982, Dell'Accio, De Bari et al. 2001, Salzmann, Buchberger et al. 2010).

Ein weiterer bemerkenswerter Effekt ist die Suppression der Matrixmetalloproteinasen, insbesondere von MMP3. Hier zeigen sich gegenüber der Kontrolle nur für kombinierte Stimuli signifikante Effekte. Entsprechende Studien zu den Einzelstimuli wurden bereits genannt, vergleichbare Arbeiten mit kombinierten Stimuli aus mechanischer Belastung und elektromagnetischer Stimulation wurden bisher noch nicht durchgeführt. Hier kann jedoch aufgrund der ähnlichen Effektivität aller drei elektromagnetischen Feldstärken bereits von einer annähernden Vollstimulation ausgegangen werden. Zudem könnte ein Synergismus vorliegen, da insbesondere die Einzelstimulation mit elektromagnetischem Feld keine starke Suppression bewirkte und der Effekt des kombinierten Stimulus über der Summe der Einzeleffekte lag. Über den vermutlichen Signaltransduktionsweg liegen keine Studien vor. Bei PRG4, COMP und SOX9 sind keine starken Effekte der kombinierten Stimulation zu beobachten, was letztlich das Bild der alleinigen mechanischen Stimulation bestätigt. In der Literatur finden sich hier ebenfalls keine bestätigenden oder gegenteiligen Studien für vergleichbare kombinierte Stimulationen.

Insgesamt zeigt sich die kombinierte Stimulation als stärkste Variante dieser Studie. Sie weist in der Kombination mechanischer Stimulus und 3mT Feld die höchste Matrixsyntheseleistung

auf, kann knorpeltypische Genexpressionsmuster generieren und auch die Expression der unerwünschten Proteinase und Kollagen 1 supprimieren. Sie zeigt im Vergleich zu den anderen verwendeten Stimuli in dieser Studie auch am ehesten funktionell wichtige Aspekte wie z.B. die Expression von PRG4 und ein besser geordnetes histologisches Bild als die Vergleichsgruppen.

#### 4.4. KNORPELGEWEBE

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels verschiedener Stimuli ein matrixgestützter Regeneratknorpel im Labor angezüchtet. Hierbei wurde von sehr jungen Chondrozyten ausgehend ein Konstrukt geschaffen, das eine gelenkknorpeltypische Matrix aus Glykosaminoglykanen, Kollagen 2 und Aggrecan sowie wünschenswerte Genexpressionsprofile (Kollagen 2 / Kollagen 1 Ratio, PRG4, MMP3 und MMP13) bot. Histologisch zeigte sich jedoch nur eine mäßige Organisation der mikroskopischen Struktur dieser Konstrukte. Nur in den mechanisch stimulierten Gruppen konnte eine glatter wirkende Oberfläche beobachtet werden, die zum Teil den oberflächlichen tangentialen Schichten des natürlichen Gelenkknorpels nahe kommt (Johnstone, Alini et al. 2013). Die vorgestellten Stimulationsformen in dieser Arbeit führten somit zwar zu einer verbesserten Einzelfunktion der Chondrozyten, konnten die räumliche Struktur unter mikroskopischer Begutachtung jedoch nur eingeschränkt beeinflussen. Die biologische zonale Strukturierung wurde in dieser Arbeit mittels Immunhistologie untersucht. Die Untersuchung der Kollagen 1 und 2 sowie Aggrecan Apposition zeigte hier besonders oberflächennah vermehrte extrazelluläre Matrix jedoch insgesamt eine homogene Verteilung von Kollagen 2 und Aggrecan in allen mechanisch stimulierten Konstrukten. Alleinige elektromagnetische Stimulation führte wie beschrieben zu weniger glatten Oberflächen und einer geringeren Synthese der Matrixproteine. Weiterführende Untersuchungen über den zonalen Aufbau, z.B. mittels optischer Messung der Kollagenorientierung wurden in der vorliegenden Arbeit nicht

durchgeführt geraten aber zunehmend in den Fokus der Grundlagenforschung (Chaudhary, Campbell et al. 2015). Zhen Li konnte auf molekularbiologischer Ebene differenziert strukturierte Knorpelkonstrukte nachweisen. Sie zeigte eine generalisierte Matrixsynthese durch Kompression und eine oberflächliche PRG4 Expression vermittelt durch Scherbelastung wie sie als kombinierte mechanische Stimulation auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Li, Yao et al. 2007). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass entsprechende Effekte auch in der vorliegenden Arbeit vorhanden sein können. Nach Guilak ist der nicht-lineare funktionelle Aufbau des Gelenkknorpels entscheidend für seine physiologische Funktion und dauerhafte mechanische Integrität in-vivo (Guilak, Butler et al. 2001). Nach seinem Vorschlag sollten die makroskopische nicht-lineare Grundstruktur durch ebensolche möglichst funktionellen Matrices vermittelt werden. Der molekularbiologische Aufbau kann jedoch auch nach wenigen Wochen Kultur und Stimulation bereits eine deutliche Differenzierung der einzelnen Anteile des Konstruktes aufweisen.

In der klinischen Anwendung konnten in den bisher etablierten Therapieansätzen auch nur ein dem nativen Knorpel nicht biomechanisch vergleichbarer Regeneratknorpel etabliert werden. Dieser weist in der Regel dennoch eine langjährige gute klinische Funktion auf (Brittberg and Winalski 2003, Knutsen, Drogset et al. 2007, Ferruzzi, Buda et al. 2008, Laupattarakasem, Laopaiboon et al. 2008, Gobbi, Kon et al. 2009, Kon, Gobbi et al. 2009, Mithoefer, McAdams et al. 2009, Abdel-Sayed and Pioletti 2015, Campbell, Pineda et al. 2015). Man wird also mit einer zunehmend verbesserten in-vitro Konditionierung vermutlich ein weiter verbessertes klinisches Outcome beobachten können. Die klinisch entscheidenden Faktoren werden hier wohl die biomechanische Qualität sowie die schnelle und v.a. dauerhafte Integration und Belastungsresilienz sein (Hunziker 2002, Salzmann, Niemeyer et al. 2010, Boettcher, Kienle et al. 2015).



Der in der vorliegenden Studie gezüchtete Knorpelersatz zeichnet sich durch ein gutes Genexpressionsprofil mit verminderter Kollagen 1, MMP3 und MMP13 Expression und erhöhter Kollagen 2 und PRG4 Expression sowie gelenknorpelähnlicher Matrix aus. Obwohl er damit nicht als fibröses Regenerat gelten kann, ist er funktionell dennoch deutlich unterhalb nativem Knorpel einzuordnen. Eine entsprechend detaillierte biomechanische Vergleichsmöglichkeit ist hier allerdings momentan nur sehr limitiert verfügbar wird aber durch vermehrte standardisierte biomechanische Testung und durch Vorschläge zu vergleichbaren Nomenklaturen und molekularbiologischen Analysen in Zukunft vielleicht möglich (Fohr, Hautmann et al. 2012, Johnstone, Alini et al. 2013, Martinez, Obst et al. 2013). Im direkten biomechanischen und molekularbiologischen Vergleich mit anderen Regeneratknorpeln würde der vorliegende komplex stimulierte Knorpelersatz mit großer Wahrscheinlichkeit gut abschneiden.

#### 4.5. 3D MATRICES

In dieser Studie wurden Hybridmatrices aus Polyurethan und Fibringel benutzt. Diese Kombination bewährte sich in früheren Untersuchungen hinsichtlich ihrer mechanischen Grundstabilität, die zur mechanischen Stimulation über 2 Wochen Dauer notwendig ist, als auch hinsichtlich der biologischen Kompatibilität, welche differenziertes Chondrozytenwachstum erlaubt (Grad, Kupcsik et al. 2003, Grad, Zhou et al. 2003, Lee, Grad et al. 2005, Gorna and Gogolewski 2006, Gogolewski, Gorna et al. 2008). Die mechanische Stabilität über den gesamten Versuchszeitraum wurde auch in diesen Versuchen bestätigt. Die Besiedelung der PU Schwämme mittels der Fibrin-Zell-Mischung war komplikationslos. In der Histologie zeigte sich eine annähernd homogene Verteilung der Zellen mit extrazellulärer Matrix in den Konstrukten. Es zeigte sich aber u.a. in Arbeiten von Thevenot et al., dass bewegungsunterstützte Besiedelungsverfahren wie z.B. Rotationsbesiedelung in Hinblick auf die homogene Besiedelung überlegen sein können (Thevenot, Nair et al. 2008). Ebenso zeigte eine Grundlagenuntersuchungen, dass eine Modifikation der verwendeten Polyurethangrundstruktur mit Farnesol eine weitere Verbesserung der Verteilung der Zellen im Schwamm erreichen kann (Eglin, Grad et al. 2010).

Insgesamt ergibt sich unabhängig vom Besiedelungsverfahren bei jeder 3D Kultur die Herausforderung bzgl. einer ausreichenden Versorgung der Zellen durch das Nährmedium. Knorpel bietet hier als bradytrophes Gewebe Vorteile, da auch in-vivo die Versorgung der Chondrozyten durch Diffusion erfolgt und keine Blutgefäße an der Versorgung beteiligt sind (Strangeways 1920, Brodin 1955). Durch Kompression und Entlastung wie in einem Gelenk üblich kann die entsprechende Diffusionstiefe ausgedehnt werden, was Maroudas veranschaulichen konnte. Hier konnte in einem Diffusionsversuch Färbelösung im Schweinmodell am Kniegelenk von ca. 2,5mm Eindringtiefe am immobilisierten Gelenk auf über 4mm am belasteten Gelenkgebracht werden (Maroudas, Bullough et al. 1968). Einerseits

wurde in unseren Versuchen die natürliche Unterstützung der Versorgung durch intermittierende Belastung des Knorpels in den mechanisch stimulierten Gruppen zusätzlich auf physiologische Art und Weise unterstützt, andererseits kann man auch in den nicht mechanisch stimulierten Gruppen von einer ausreichenden Versorgung der zentralen Anteile ausgehen, da im vorliegenden Versuchsaufbau die Diffusion in die zentralen Bereiche prinzipiell von allen Seiten aus möglich war und somit kein Bereich der Konstrukte mehr als 2mm von der Oberfläche entfernt war. Größere Konstrukte mit mehr als 4mm Durchmesser in allen Richtungen des Raumes stellen auch in Zukunft noch die Herausforderung der ausreichenden Nährstoffversorgung.

Die Verwendung anderer Matrices zur Anzucht von Geweben in-vitro ist vielfältig verbreitet. Man unterscheidet zwischen üblicherweise mechanisch formstabilen polymeren Schwämmen, mehr oder weniger mechanisch stabilen hydrogel-basierten Varianten und Hybridvarianten aus den beiden Konstruktionsformen (Grad, Eglin et al. 2011). Ohne eindeutige Überlegenheit einzelner Substanzen sind weitere übliche Matrices im Bereich der Knorpelforschung Gele und Schwämme aus Alginat, Hyaluronsäure, Agarose, Fibrin, Kollagenen (insbesondere Typ 1 und 2), Milchsäure und (Polyethylen-)Glycolsäure (Itay, Abramovici et al. 1987, Vacanti, Langer et al. 1991, Buschmann, Gluzband et al. 1992, Hauselmann, Aydelotte et al. 1992, Goa and Benfield 1994, Frenkel, Toolan et al. 1997, Nehrer, Breinan et al. 1998, Ting, Sims et al. 1998). Wie bereits beschrieben wurden in den vorliegenden Experimenten polymere Schwämme zur primären Stabilisierung und Formgebung mit einem Fibrinnetz zur homogenen Besiedelung und Fixierung der Zellen im Konstrukt kombiniert. Eine Fibrinfixierung der Chondrozyten zeigte dabei gute Ergebnisse im Sinne funktioneller Zell-Matrix-Kontakte (Nicodemus and Bryant 2008). Die mechanische Fixierung der Zellen bzw. ein ausreichender Kontakt zwischen Zellen und dem Grundgerüst der Matrix ist für ein differenziertes Wachstum ein entscheidendes Kriterium; dieser

ausreichende Kontakt stellt außerdem die geeignete Brücke zur Mechanotransduktion dar, also zur Übertragung der mechanischen Stimuli auf die Zelle und damit zur Wirkung des mechanischen Stimulus (Bosnakovski, Mizuno et al. 2006, Bosnakovski, Mizuno et al. 2006, Appelman, Mizrahi et al. 2009, Villanueva, Gladem et al. 2010). In Fall unserer Studie kann von ausreichender mechanischer Integration ausgegangen werden, da einerseits keine ausgeprägten Apoptosen in den Konstrukten zu verzeichnen waren und andererseits die mechanischen Stimulation die der Literatur bereits bekannte Wirkung bestätigen konnte (siehe im Folgenden unter 4.3). In der Klinik ist das Bild auch aufgrund juristischer Gegebenheiten eingeschränkter. Ursprünglich wurde für die ACT keine Matrix verwendet sondern die Zellen unter einem eingenähten Periostlappen eingebracht (Brittberg, Lindahl et al. 1994). Zur Verbesserung der lokalen Zellintegration sowie als (biologisch abbaubares) Grundgerüst werden heutzutage bei der matrixgestützten ACT meist fibrin-, kollagen- oder hyaluronsäurebasierte 3-D Matrices (Schwämme / Gele) verwendet (Grigolo, Roseti et al. 2001, Haddo, Mahroof et al. 2004). Ein vielversprechender aktuell jedoch noch präklinischer Ansatz, der insbesondere die unterschiedlichen Konfigurationen der Knorpeldefekte mit einbezieht, ist ein modifiziertes thermosensibles Hyalurongel, dass bei Körpertemperatur aushärtet und bei kälteren Temperaturen flüssig und somit injizierbar ist (Mortisen, Peroglio et al. 2010). Dies stellt in der arthroskopischen Anwendung besonders bei komplexen Defekten einen großen Vorteil dar. Durch volle Anpassungsfähigkeit an den Defekt muss weder ein Zuschnitt des Transplantats noch des Defekts durch den Operateur erfolgen. So wird kaum Material verworfen und es muss auch kein gesundes Material entfernt werden. Dabei kann jedoch keine organisierte Matrixbildung in-vitro erzielt werden, da bei jedem Verflüssigungsvorgang, wie er z.B. vor der klinischen Applikation erfolgen würde diese Organisation im Konstrukt ebenfalls verschwimmen würde.

#### 4.6. ANDERE ANSÄTZE ZUR CHONDROZYTENSTIMULATION

Im Bereich des Knorpel Tissue Engineering haben sich neben den mechanischen Stimulationsformen überwiegend Methoden zur Anreicherung von Wachstumsfaktoren etabliert. Es handelt sich hier vor allem um folgende Faktoren aus der Gruppe der Bone-morphogenetic-proteins (BMPs) mit den Hauptvertretern BMP2, BMP4 und BMP7, der Insulin-ähnlichen Faktor 1 (IGF1), der Transforming-growth-factor-beta (TGF-beta) oder aus der Gruppe der Interleukine (z.B. IL4) (Salter, Nuki et al. 1996, Lubberts, Joosten et al. 1999, Martinek, Ueblacker et al. 2003, Toh, Liu et al. 2005, Jenniskens, Koevoet et al. 2006, Salzman, Nuernberger et al. 2009, van Meegeren, Roosendaal et al. 2013, Blaney Davidson, Vitters et al. 2015). Bei der Anwendung wiederum gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Formen: Die Applikation des Faktors über das Nährmedium, die Beladung der 3D-Konstrukte bzw. der Zellkulturoberflächen mit fixierten Faktoren oder die gentechnische Manipulation der Zellen sodass es zu einer Expression und Synthese der entsprechenden Faktoren kommt. Alle Ansätze zeigen in-vitro jeweils deutliche Wirkung und führen überwiegend zu gewünschten Effekten im Sinne einer Differenzierung oder Matrixsynthese. Wichtig ist hier auch Wege zur Beendigung der Stimulation zu finden, dies trifft insbesondere auf fixierte Pharmaka und gentechnische Methoden zu. Die Anwendung in der Klinik ist allerdings auch im Bereich der Wachstumsfaktoren schwierig. Hier stehen oftmals hohe Therapiekosten, ein komplexer rechtlicher Rahmen (besonders bei genmanipulativen Techniken) mit daraus folgender schlechter Verfügbarkeit und auch medizinisch manchmal schwierig vorhersagbare Langzeitwirkungen einer bewiesenen starken Wirkung der Faktoren entgegen. Die elektromagnetische Induktion der Expression von z.B. BMP2 wäre hier eine wahrscheinlich kostengünstige und sicher anwendbare Alternative. Jedoch müssen hier gerade auch noch klinisch orientierte Studien eine Wirksamkeit und besonders auch eine genaue Wirkungsweise aufzeigen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit werden unterschiedliche Stimulationsverfahren für bovine Chondrozyten in einer 3D Matrix verglichen. Damit werden grundlegende Untersuchungen für einen verbesserten Therapieansatz im Rahmen einer Knorpeltherapie mittels Matrix-gestützter Knorpelzelltransplantation durchgeführt. Erstmals wurden sowohl ein mechanischer Stimulus als auch verschiedene elektromagnetische Stimuli verwendet und die Kombination beider Verfahren auf Synergieeffekte in Bezug auf ihre Chondrogenität untersucht. Als Zielparameter wurde sowohl die Matrixsyntheseleistung mittels molekularbiologischer Quantifizierung, mittels Immunhistochemie und Genexpressionsanalysen untersucht als auch eine erweiterte Genexpressionsanalyse in Bezug auf knorpelrelevante Proteine und Faktoren durchgeführt. Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass ein alleiniger mechanischer Stimulus mit komplexen Anteilen (Kompression und oberflächliche Scherkraftbelastung) einer alleinigen elektromagnetischen Stimulation grundsätzlich überlegen ist. Die alleinige elektromagnetische Stimulation zeigt dazu auch eine Dosisabhängigkeit mit besseren Effekten durch stärkere Stimulation mittels höherer Feldstärke. Eine Kombination beider Ansätze zeigt positive additive wenn nicht synergistische Effekte und im Rahmen der untersuchten Parameter keine relevanten nachteiligen Effekte. Die genannten Effekte stehen jeweils im Einklang mit der aktuellen Literatur soweit sie bereits Gegenstand anderer Studien waren. Sollten sich diese Ergebnisse auch auf humane Chondrozyten übertragen lassen kann das Primärziel der verbesserten in-vitro Präkonditionierung erreicht werden. Die mechanische Stimulation bietet jedoch durch den direkten physikalischen Kontakt ein erhebliches Kontaminationspotential in der klinischen Anwendung. Die elektromagnetische Stimulation alleine weist hier deutliche Vorteile auf jedoch ohne durchschlagende chondrogene Effekte zu zeigen. Daher sollten weitere Studien eine Verbesserung dieser Stimulation im Blick haben. Im Sinne einer klinischen Anwendung sollten auch weitere Untersuchungen in Hinblick auf eine

Kombination der elektromagnetischen Stimulation mit Wachstumsfaktoren untersucht werden. Dabei könnte die mechanische Belastung mit ihren Nachteilen zu Gunsten einer chemischen Stimulation ersetzt werden und diese gepaart mit den additiv/synergistischen Effekten der elektromagnetischen Stimulation auch für einen klinischen Einsatz entscheidende Vorteile bringen. Die elektromagnetische Stimulation hat darüber hinaus auch das Potential weiter auf ihre positiven Effekte bei einer in-vivo Anwendung untersucht zu werden. Kombiniert mit einer entsprechender physiotherapeutischen Beübung als Ersatz für die in-vitro Belastung der vorliegenden Studie könnte somit beispielsweise ein nicht-operativer Therapieansatz vorstellbar sein.

## 6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Knorpels mit fixierten negativen Ladungen am Kollagengerüst und freien positiven Gegenladungen in Lösung. Basis der Theorie der strömenden Potentiale (übernommen aus Hilz et al., 2009)

Abbildung 2: Flussdiagramm des Versuchsablaufes

Abbildung 3: Bioreaktor mit 4 Stationen zur mechanischen Stimulation. Durch Pfeile gekennzeichnete Bewegungsrichtungen. Mit schwarzen senkrechten Strichen gekennzeichnet sind die Hüftköpfe zur Stimulation, darunter mit Zahlen von 1-4 die speziellen Haltevorrichtungen. Das Bild im Bild zeigt eine CAD Simulation eines einzelnen Stimulationsplatzes (aus Hilz et al. 2013).

Abbildung 4: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, rot = mechanische Stimulation für eine Stunde, grün = freies Intervall ohne mechanische Stimulation von 8 Stunden

Abbildung 5: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, orange = elektromagnetische Stimulation für drei Stunde

Abbildung 6: Tag 1 – keine Stimulation; Tag 2 Stimulation, rot = mechanische Stimulation für eine Stunde, orange = elektromagnetische Stimulation für drei Stunde, grün = freies Intervall von 8 Stunden zwischen mechanischen Stimulationszyklen

Abbildung 7: Bewertungsschema des adaptierten Remmele-Scores.

Abbildung 8: GAG Gehalt auf DNA Gehalt normiert. Alle stimulierten Gruppen signifikant der Kontrolle überlegen ( $p < 0,05$ ). Mechanische Belastung und 2mT Feld signifikant der mech. Belastung überlegen (\*,  $p < 0,05$ ). Mech. Belastung und 3mT jeweils mech. Belastung und 3mT als Einzelstimuli signifikant überlegen (\*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,005$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=8$ .

Abbildung 9: Kollagen 2 / Kollagen 1 Genexpressionsratio. Mechanische Belastung und Mech. Belastung und 1mT, 2mT oder 3mT signifikant der Kontrolle überlegen ( $p < 0,05$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

Abbildung 10: SOX9 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

Abbildung 11: COMP Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

Abbildung 12: MMP3 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ). Trend zu verminderter Expression für 1mT, 3mT und mech. Last und 2mT oder 3mT ( $p < 0,1$ ) Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .



Abbildung 13: MMP13 Genexpression. Jeweils erniedrigte Expression ohne signifikante Abweichungen vom Kontrollwert für mech. Last sowie 1mT, 2mT und 3mT. Signifikante Suppression für die drei kombinierten Stimuli ( $p < 0,05$ ). Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

Abbildung 14: PRG4 Genexpression. Keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert ( $p > 0,1$ ), jedoch mechanisch stimulierte Gruppe mit bis zu 2,3-facher Expression. Mittelwerte +/- Standardfehler;  $n=9$ .

Abbildung 15 Adaptierte Remmele Scores präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung (Tabelle angepasst übernommen aus Hilz & Ahrens et.al. 2013).

Abbildung 16: Histologische Übersicht über alle Gruppen, jeweils vergleichbare mikroskopische Gesichtsfelder. Erste Zeile - Kollagen 1 ICH; 2. Zeile - Kollagen 2 IHC; 3. Zeile - Aggrecan ICH; 4. Zeile – Toluidine-Blau Färbung. Spaltenweise die Stimuli, von links nach rechts: Unstimulierte Kontrolle; mech. Last; EMF 1mT, 2mT und 3mT; EMF 1mT, 2mT, 3mT und mech. Last

## 7. DANKSAGUNG

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andreas Imhoff für seine großzügige Unterstützung und die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Im Weiteren gilt mein großer Dank Prof. Dr. Gian Salzman, meinem Betreuer und Mentor, der mir Vieles ermöglichte und weit über diese Arbeit hinaus als Ratgeber zur Verfügung stand. Ebenso danke ich den vielen Kollegen und Freunden, die mir während der Vorbereitung dieser Arbeit, während der Zeit im Labor als auch danach durch ihre dauerhafte Unterstützung sehr geholfen haben und mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführten. Namentlich erwähnen möchte ich hier einen Teil des Teams des AO Research Instituts in Davos, meine Betreuer Prof. Dr. Mauro Alini, Dr. Sibylle Grad, Prof. Dr. Martin Stoddart, Prof. Dr. Geoff Richards und besonders auch den leitenden Labortechniker, Robert Peter. Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Weyh und Dr. Chiheb Dahmani für Rat und Tat bei der Berechnung und dem Aufbau der elektromagnetischen Stimulation.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung auf meinem Lebensweg, meinen Eltern, Großeltern, Onkel und Tanten, meinem Bruder und meiner Schwester, insbesondere aber meiner Frau Christina für all ihr Verständnis, ihre unermüdliche Unterstützung und Liebe, die mein Leben jeden Tag aufs Neue bereichert.

## 8. LEBENSLAUF

Florian Michael Laux, ehem. Hilz

Geboren am 08.09.1984 als Florian Michael Schickor in Dachau bei München

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Verheiratet mit Christina Laux, Ärztin, eine gemeinsame Tochter.

### **BERUFLICHER WERDEGANG**

Seit 01/2016	Assistenzarzt Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen Eberhard-Karls-Universität Tübingen ÄD Prof. Dr. U. Stöckle
10/2015 – 12/2015	Assistenzarzt / Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinikum rechts der Isar, TU München Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie Direktor Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe
04/2015 – 09/2015	Assistenzarzt / Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinikum rechts der Isar, TU München Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Direktor Prof. Dr. E. Kochs
01/2013 – 03/2015	Assistenzarzt / Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinikum rechts der Isar, TU München Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie Direktor Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe
09/2008 – 04/2009	Medical research fellow AO Foundation Davos AO Research Institute Prof. Dr. G. Richards / Prof. Dr. M. Alini

### **STUDIUM UND SCHULISCHE AUSBILDUNG**

01/2013	Approbation als Arzt, Regierung von Oberbayern
10/2007 – 11/2012	Studium der Humanmedizin –Klinischer Abschnitt 2. medizinisches Staatsexamen TU München
10/2005 – 09/2007	Studium der Humanmedizin –Vorklinischer Abschnitt 1. medizinisches Staatsexamen Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2004 – 09/2005	Studium der Elektro- und Informationstechnik TU München
09/1995 – 06/2004	Allgemeine Hochschulreife Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching bei München

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaron, R. K., B. D. Boyan, D. M. Ciombor, Z. Schwartz and B. J. Simon (2004). "Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields." Clin Orthop Relat Res(419): 30-37.
- Aaron, R. K., D. M. Ciombor and B. J. Simon (2004). "Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields." Clin Orthop Relat Res(419): 21-29.
- Abdel-Sayed, P. and D. P. Pioletti (2015). "Strategies for improving the repair of focal cartilage defects." Nanomedicine (Lond) **10**(18): 2893-2905.
- Alford, J. W. and B. J. Cole (2005). "Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options." Am J Sports Med **33**(2): 295-306.
- Alford, J. W. and B. J. Cole (2005). "Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions." Am J Sports Med **33**(3): 443-460.
- Appelman, T. P., J. Mizrahi, J. H. Elisseeff and D. Seliktar (2009). "The differential effect of scaffold composition and architecture on chondrocyte response to mechanical stimulation." Biomaterials **30**(4): 518-525.
- Aroen, A., S. Loken, S. Heir, E. Alvik, A. Ekeland, O. G. Granlund and L. Engebretsen (2004). "Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies." Am J Sports Med **32**(1): 211-215.
- Benthien, J. P. and P. Behrens (2010). "Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing." Cartilage **1**(1): 65-68.
- Benya, P. D. and J. D. Shaffer (1982). "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels." Cell **30**(1): 215-224.
- Bhosale, A. M. and J. B. Richardson (2008). "Articular cartilage: structure, injuries and review of management." Br Med Bull **87**: 77-95.
- Blaney Davidson, E. N., E. L. Vitters, M. B. Bennink, P. L. van Lent, A. P. van Caam, A. B. Blom, W. B. van den Berg, F. A. van de Loo and P. M. van der Kraan (2015). "Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage." Ann Rheum Dis **74**(6): 1257-1264.
- Bleuel, J., F. Zaucke, G. P. Bruggemann, J. Heilig, M. L. Wolter, N. Hamann, S. Firner and A. Niehoff (2015). "Moderate cyclic tensile strain alters the assembly of cartilage extracellular matrix proteins in vitro." J Biomech Eng **137**(6): 061009.
- Boettcher, K., S. Kienle, J. Nachtsheim, R. Burgkart, T. Hugel and O. Lieleg (2015). "The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration." Acta Biomater.
- Bonassar, L. J., A. J. Grodzinsky, E. H. Frank, S. G. Davila, N. R. Bhaktav and S. B. Trippel (2001). "The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I." J Orthop Res **19**(1): 11-17.
- Bosnakovski, D., M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumur and T. Fujinag (2006). "Gene expression profile of bovine bone marrow mesenchymal stem cell during spontaneous chondrogenic differentiation in pellet culture system." Jpn J Vet Res **53**(3-4): 127-139.
- Bosnakovski, D., M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura and T. Fujinaga (2006). "Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis." Biotechnol Bioeng **93**(6): 1152-1163.
- Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-895.
- Brittberg, M. and C. S. Winalski (2003). "Evaluation of cartilage injuries and repair." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 58-69.

- Brodin, H. (1955). "Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs." Acta Orthop Scand **24**(3): 177-183.
- Bryant, S. J., T. T. Chowdhury, D. A. Lee, D. L. Bader and K. S. Anseth (2004). "Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels." Ann Biomed Eng **32**(3): 407-417.
- Buckwalter, J. A. (2002). "Articular cartilage injuries." Clin Orthop Relat Res(402): 21-37.
- Burkart, A. and A. B. Imhoff (2002). "Treatment of articular cartilage defects with the autologous chondrocyte transplantation (ACT)." Surg Technol Int **10**: 255-260.
- Buschmann, M. D., Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky, J. H. Kimura and E. B. Hunziker (1992). "Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix." J Orthop Res **10**(6): 745-758.
- Buschmann, M. D., Y. J. Kim, M. Wong, E. Frank, E. B. Hunziker and A. J. Grodzinsky (1999). "Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow." Arch Biochem Biophys **366**(1): 1-7.
- Campbell, A. B., M. Pineda, J. D. Harris and D. C. Flanigan (2015). "Return to Sport After Articular Cartilage Repair in Athletes' Knees: A Systematic Review." Arthroscopy.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure." Biotechnol Bioeng **62**(2): 166-174.
- Carver, S. E. and C. A. Heath (1999). "Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage." Tissue Eng **5**(1): 1-11.
- Cawston, T. E. and A. J. Wilson (2006). "Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(5): 983-1002.
- Chang, C. H., S. T. Loo, H. L. Liu, H. W. Fang and H. Y. Lin (2010). "Can low frequency electromagnetic field help cartilage tissue engineering?" J Biomed Mater Res A **92**(3): 843-851.
- Chaudhary, R., K. R. Campbell, K. B. Tilbury, R. Vanderby, Jr., W. F. Block, R. Kijowski and P. J. Campagnola (2015). "Articular cartilage zonal differentiation via 3D Second-Harmonic Generation imaging microscopy." Connect Tissue Res **56**(2): 76-86.
- Chen, C. H., Y. S. Lin, Y. C. Fu, C. K. Wang, S. C. Wu, G. J. Wang, R. Eswaramoorthy, Y. H. Wang, C. Z. Wang, Y. H. Wang, S. Y. Lin, J. K. Chang and M. L. Ho (2012). "Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro." J Appl Physiol.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**(3): 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P. and K. Mackey (1995). "Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources." Biotechniques **19**(6): 942-945.
- Chomczynski, P. and K. Mackey (1995). "Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation." Anal Biochem **225**(1): 163-164.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." Nat Protoc **1**(2): 581-585.
- Chowdhury, T. T., D. L. Bader, J. C. Shelton and D. A. Lee (2003). "Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression." Arch Biochem Biophys **417**(1): 105-111.

- Ciombor, D. M., R. K. Aaron, S. Wang and B. Simon (2003). "Modification of osteoarthritis by pulsed electromagnetic field--a morphological study." Osteoarthritis Cartilage **11**(6): 455-462.
- Ciombor, D. M., G. Lester, R. K. Aaron, P. Neame and B. Caterson (2002). "Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins." J Orthop Res **20**(1): 40-50.
- Connelly, J. T., E. J. Vanderploeg and M. E. Levenston (2004). "The influence of cyclic tension amplitude on chondrocyte matrix synthesis: experimental and finite element analyses." Biorheology **41**(3-4): 377-387.
- Curl, W. W., J. Krome, E. S. Gordon, J. Rushing, B. P. Smith and G. G. Poehling (1997). "Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies." Arthroscopy **13**(4): 456-460.
- De Mattei, M., M. Fini, S. Setti, A. Ongaro, D. Gemmati, G. Stabellini, A. Pellati and A. Caruso (2007). "Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields." Osteoarthritis Cartilage **15**(2): 163-168.
- De Mattei, M., M. Pasello, A. Pellati, G. Stabellini, L. Massari, D. Gemmati and A. Caruso (2003). "Effects of electromagnetic fields on proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage explants." Connect Tissue Res **44**(3-4): 154-159.
- DeLise, A. M., L. Fischer and R. S. Tuan (2000). "Cellular interactions and signaling in cartilage development." Osteoarthritis Cartilage **8**(5): 309-334.
- Dell'Accio, F., C. De Bari and F. P. Luyten (2001). "Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo." Arthritis Rheum **44**(7): 1608-1619.
- Desjardins, M. R., M. B. Hurtig and N. C. Palmer (1991). "Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse." Vet Surg **20**(6): 434-445.
- Diniz, P., K. Shomura, K. Soejima and G. Ito (2002). "Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts." Bioelectromagnetics **23**(5): 398-405.
- Echtermeyer, F., J. Bertrand, R. Dreier, I. Meinecke, K. Neugebauer, M. Fuerst, Y. J. Lee, Y. W. Song, C. Herzog, G. Theilmeyer and T. Pap (2009). "Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis." Nat Med **15**(9): 1072-1076.
- Eglin, D., S. Grad, S. Gogolewski and M. Alini (2010). "Farnesol-modified biodegradable polyurethanes for cartilage tissue engineering." J Biomed Mater Res A **92**(1): 393-408.
- Elder, B. D. and K. A. Athanasiou (2009). "Effects of temporal hydrostatic pressure on tissue-engineered bovine articular cartilage constructs." Tissue Eng Part A **15**(5): 1151-1158.
- Elder, B. D. and K. A. Athanasiou (2009). "Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration." Tissue Eng Part B Rev **15**(1): 43-53.
- Eriksson, E. (2007). "Can pulsed electromagnetic fields protect joint cartilage?" Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **15**(7): 829.
- Fan, J. C. and S. D. Waldman (2010). "The effect of intermittent static biaxial tensile strains on tissue engineered cartilage." Ann Biomed Eng **38**(4): 1672-1682.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle and A. J. Barrett (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue." Biochim Biophys Acta **883**(2): 173-177.
- Ferruzzi, A., R. Buda, C. Faldini, F. Vannini, F. Di Caprio, D. Luciani and S. Giannini (2008). "Autologous chondrocyte implantation in the knee joint: open compared with arthroscopic technique. Comparison at a minimum follow-up of five years." J Bone Joint Surg Am **90 Suppl 4**: 90-101.

- Fini, M., G. Giavaresi, A. Carpi, A. Nicolini, S. Setti and R. Giardino (2005). "Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: review of experimental and clinical studies." Biomed Pharmacother **59**(7): 388-394.
- Fini, M., P. Torricelli, G. Giavaresi, N. N. Aldini, F. Cavani, S. Setti, A. Nicolini, A. Carpi and R. Giardino (2008). "Effect of pulsed electromagnetic field stimulation on knee cartilage, subchondral and ephyseal trabecular bone of aged Dunkin Hartley guinea pigs." Biomed Pharmacother **62**(10): 709-715.
- Fohr, P., V. Hautmann, P. Prodingler, F. Pohlig, C. Kaddick and R. Burgkart (2012). "[Design of a high-dynamic closed-loop controlled cartilage test system]." Orthopade **41**(10): 820-826.
- Frank, E. H. and A. J. Grodzinsky (1987). "Cartilage electromechanics--I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength." J Biomech **20**(6): 615-627.
- Frank, E. H. and A. J. Grodzinsky (1987). "Cartilage electromechanics--II. A continuum model of cartilage electrokinetics and correlation with experiments." J Biomech **20**(6): 629-639.
- Frenkel, S. R., B. Toolan, D. Menche, M. I. Pitman and J. M. Pachence (1997). "Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair." J Bone Joint Surg Br **79**(5): 831-836.
- Frisbie, D. D., G. W. Trotter, B. E. Powers, W. G. Rodkey, J. R. Steadman, R. D. Howard, R. D. Park and C. W. McIlwraith (1999). "Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses." Vet Surg **28**(4): 242-255.
- Fukuda, K., S. Asada, F. Kumano, M. Saitoh, K. Otani and S. Tanaka (1997). "Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase C activity." J Lab Clin Med **130**(2): 209-215.
- Funk, R. H., T. Monsees and N. Ozkucur (2009). "Electromagnetic effects - From cell biology to medicine." Prog Histochem Cytochem **43**(4): 177-264.
- Goa, K. L. and P. Benfield (1994). "Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing." Drugs **47**(3): 536-566.
- Gobbi, A., E. Kon, M. Berruto, G. Filardo, M. Delcogliano, L. Boldrini, L. Bathan and M. Marcacci (2009). "Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with second-generation autologous chondrocyte implantation: results at 5 years' follow-up." Am J Sports Med **37**(6): 1083-1092.
- Gogolewski, S., K. Gorna, E. Zaczynska and A. Czarny (2008). "Structure-property relations and cytotoxicity of isosorbide-based biodegradable polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration." J Biomed Mater Res A **85**(2): 456-465.
- Gorna, K. and S. Gogolewski (2002). "Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders." J Biomed Mater Res **60**(4): 592-606.
- Gorna, K. and S. Gogolewski (2006). "Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration." J Biomed Mater Res A **79**(1): 128-138.
- Grad, S., D. Eglin, M. Alini and M. J. Stoddart (2011). "Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review." Clin Orthop Relat Res **469**(10): 2764-2772.
- Grad, S., S. Gogolewski, M. Alini and M. A. Wimmer (2006). "Effects of simple and complex motion patterns on gene expression of chondrocytes seeded in 3D scaffolds." Tissue Eng **12**(11): 3171-3179.
- Grad, S., L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski and M. Alini (2003). "The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations." Biomaterials **24**(28): 5163-5171.
- Grad, S., C. R. Lee, K. Gorna, S. Gogolewski, M. A. Wimmer and M. Alini (2005). "Surface motion upregulates superficial zone protein and hyaluronan production in chondrocyte-seeded three-dimensional scaffolds." Tissue Eng **11**(1-2): 249-256.

- Grad, S., C. R. Lee, M. A. Wimmer and M. Alini (2006). "Chondrocyte gene expression under applied surface motion." *Biorheology* **43**(3-4): 259-269.
- Grad, S., M. Loparic, R. Peter, M. Stolz, U. Aebi and M. Alini (2012). "Sliding motion modulates stiffness and friction coefficient at the surface of tissue engineered cartilage." *Osteoarthritis Cartilage*.
- Grad, S., L. Zhou, S. Gogolewski and M. Alini (2003). "Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation." *J Biomed Mater Res A* **66**(3): 571-579.
- Grigolo, B., L. Roseti, M. Fiorini, M. Fini, G. Giavaresi, N. N. Aldini, R. Giardino and A. Facchini (2001). "Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits." *Biomaterials* **22**(17): 2417-2424.
- Guilak, F., D. L. Butler and S. A. Goldstein (2001). "Functional tissue engineering: the role of biomechanics in articular cartilage repair." *Clin Orthop Relat Res*(391 Suppl): S295-305.
- Haasper, C., J. Zeichen, R. Meister, C. Krettek and M. Jagodzinski (2008). "Tissue engineering of osteochondral constructs in vitro using bioreactors." *Injury* **39 Suppl 1**: S66-76.
- Haddo, O., S. Mahroof, D. Higgs, L. David, J. Pringle, M. Bayliss, S. R. Cannon and T. W. Briggs (2004). "The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation." *Knee* **11**(1): 51-55.
- Halbawth, F., E. Niculescu-Morza, H. Zwickl, C. Bauer and S. Nehrer (2015). "Mechanostimulation changes the catabolic phenotype of human dedifferentiated osteoarthritic chondrocytes." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **23**(1): 104-111.
- Haro, H., H. C. Crawford, B. Fingleton, J. R. MacDougall, K. Shinomiya, D. M. Spengler and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption." *J Clin Invest* **105**(2): 133-141.
- Hart, F. X. (2010). "Cytoskeletal forces produced by extremely low-frequency electric fields acting on extracellular glycoproteins." *Bioelectromagnetics* **31**(1): 77-84.
- Hauselmann, H. J., M. B. Aydelotte, B. L. Schumacher, K. E. Kuettner, S. H. Gitelis and E. J. Thonar (1992). "Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads." *Matrix* **12**(2): 116-129.
- Heath, C. A. and S. R. Magari (1996). "Mini-review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro." *Biotechnol Bioeng* **50**(4): 430-437.
- Hilz, F. M., P. Ahrens, S. Grad, M. J. Stoddart, C. Dahmani, F. L. Wilken, M. Sauerschnig, P. Niemeyer, J. Zwingmann, R. Burgkart, R. von Eisenhart-Rothe, N. P. Sudkamp, T. Weyh, A. B. Imhoff, M. Alini and G. M. Salzmann (2014). "Influence of extremely low frequency, low energy electromagnetic fields and combined mechanical stimulation on chondrocytes in 3-D constructs for cartilage tissue engineering." *Bioelectromagnetics* **35**(2): 116-128.
- Hilz, F. M. G., S.; Stoddart, M.J.; Ahrens, P.; Dahmani, C.; Weyh, T.; Imhoff, A.B.; Alini, M. and Salzmann, G.M. (2009). Combination of Extremely Low Frequency, Low Energy Electromagnetic
- Fields and Dynamic Compression and Shear on 3-D Constructs
- for Cartilage Tissue Engineering. BioEM 2009, Davos, Switzerland.
- Hinsenkamp, M. and J. F. Collard (2011). "Bone Morphogenic Protein--mRNA upregulation after exposure to low frequency electric field." *Int Orthop* **35**(10): 1577-1581.
- Hinsenkamp, M. G. and M. A. Rooze (1982). "Morphological effect of electromagnetic stimulation on the skeleton of fetal or newborn mice." *Acta Orthop Scand Suppl* **196**: 39-50.



- Hjelle, K., E. Solheim, T. Strand, R. Muri and M. Brittberg (2002). "Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies." Arthroscopy **18**(7): 730-734.
- Hunt, R. W., A. Zavalin, A. Bhatnagar, S. Chinnasamy and K. C. Das (2009). "Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications." Int J Mol Sci **10**(10): 4515-4558.
- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 432-463.
- Imhoff, A. B., G. M. Ottl, A. Burkart and S. Traub (1999). "[Autologous osteochondral transplantation on various joints]." Orthopade **28**(1): 33-44.
- Itay, S., A. Abramovici and Z. Nevo (1987). "Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage." Clin Orthop Relat Res(220): 284-303.
- Jenniskens, Y. M., W. Koevoet, A. C. de Bart, H. Weinans, H. Jahr, J. A. Verhaar, J. DeGroot and G. J. van Osch (2006). "Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2." Osteoarthritis Cartilage **14**(11): 1136-1146.
- Jin, M., G. R. Emkey, P. Siparsky, S. B. Trippel and A. J. Grodzinsky (2003). "Combined effects of dynamic tissue shear deformation and insulin-like growth factor I on chondrocyte biosynthesis in cartilage explants." Arch Biochem Biophys **414**(2): 223-231.
- Johnstone, B., M. Alini, M. Cucchiari, G. R. Dodge, D. Eglin, F. Guilak, H. Madry, A. Mata, R. L. Mauck, C. E. Semino and M. J. Stoddart (2013). "Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art." Eur Cell Mater **25**: 248-267.
- Kaupp, J. A., M. Y. Tse, S. C. Pang, G. Kenworthy, M. Hetzler and S. D. Waldman (2013). "The effect of moving point of contact stimulation on chondrocyte gene expression and localization in tissue engineered constructs." Ann Biomed Eng **41**(6): 1106-1119.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux and H. G. Khorana (1971). "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." J Mol Biol **56**(2): 341-361.
- Knutsen, G., J. O. Drogset, L. Engebretsen, T. Grontvedt, V. Isaksen, T. C. Ludvigsen, S. Roberts, E. Solheim, T. Strand and O. Johansen (2007). "A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years." J Bone Joint Surg Am **89**(10): 2105-2112.
- Kon, E., A. Gobbi, G. Filardo, M. Delcogliano, S. Zaffagnini and M. Marcacci (2009). "Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years." Am J Sports Med **37**(1): 33-41.
- Kraus, W. and F. Lechner (1972). "[Healing of pseudoarthrosis and spontaneous fractures with structure-forming electrodynamic potentials]." Munch Med Wochenschr **114**(42): 1814-1819.
- Krukenberg, C. (1884). "Die chemischen Bestandtheile des Knorpels." Zeitschrift für Biologie(20): 307-326.
- Kuettner, K. E. and J. H. Kimura (1985). "Proteoglycans: an overview." J Cell Biochem **27**(4): 327-336.
- Labarca, C. and K. Paigen (1980). "A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure." Anal Biochem **102**(2): 344-352.
- Laupattarakasem, W., M. Laopaiboon, P. Laupattarakasem and C. Sumananont (2008). "Arthroscopic debridement for knee osteoarthritis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005118.
- Lee, C. R., S. Grad, K. Gorna, S. Gogolewski, A. Goessl and M. Alini (2005). "Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis." Tissue Eng **11**(9-10): 1562-1573.
- Lee, C. R., S. Grad, J. J. Maclean, J. C. Iatridis and M. Alini (2005). "Effect of mechanical loading on mRNA levels of common endogenous controls in articular chondrocytes and intervertebral disk." Anal Biochem **341**(2): 372-375.

- Leunig, M., M. Beck, C. Dora and R. Ganz (2006). "[Femoroacetabular impingement: trigger for the development of coxarthrosis]." Orthopade **35**(1): 77-84.
- Li, Z., S. Yao, M. Alini and S. Grad (2007). "Different response of articular chondrocyte subpopulations to surface motion." Osteoarthritis Cartilage **15**(9): 1034-1041.
- Liu, H., J. Abbott and J. A. Bee (1996). "Pulsed electromagnetic fields influence hyaline cartilage extracellular matrix composition without affecting molecular structure." Osteoarthritis Cartilage **4**(1): 63-76.
- Lubberts, E., L. A. Joosten, L. van Den Bersselaar, M. M. Helsen, A. C. Bakker, J. B. van Meurs, F. L. Graham, C. D. Richards and W. B. van Den Berg (1999). "Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction." J Immunol **163**(8): 4546-4556.
- Ludwig Fahrmeir, R. K., Iris Pigeot und Gerhard Tutz (2012). Statistik - Der Weg zur Datenanalyse. Springer Verlag.
- Ludwig, T. E., J. R. McAllister, V. Lun, J. P. Wiley and T. A. Schmidt (2012). "Diminished cartilage-lubricating ability of human osteoarthritic synovial fluid deficient in proteoglycan 4: Restoration through proteoglycan 4 supplementation." Arthritis Rheum **64**(12): 3963-3971.
- Maroudas, A., P. Bullough, S. A. Swanson and M. A. Freeman (1968). "The permeability of articular cartilage." J Bone Joint Surg Br **50**(1): 166-177.
- Martin, I., M. Jakob, D. Schafer, W. Dick, G. Spagnoli and M. Heberer (2001). "Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints." Osteoarthritis Cartilage **9**(2): 112-118.
- Martinek, V., P. Ueblacker and A. B. Imhoff (2003). "Current concepts of gene therapy and cartilage repair." J Bone Joint Surg Br **85**(6): 782-788.
- Martinez, H., T. Obst, H. Ulbrich and R. Burgkart (2013). "A novel application of direct force control to perform in-vitro biomechanical tests using robotic technology." J Biomech **46**(7): 1379-1382.
- Mauck, R. L., S. B. Nicoll, S. L. Seyhan, G. A. Ateshian and C. T. Hung (2003). "Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering." Tissue Eng **9**(4): 597-611.
- Mauck, R. L., M. A. Soltz, C. C. Wang, D. D. Wong, P. H. Chao, W. B. Valhmu, C. T. Hung and G. A. Ateshian (2000). "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels." J Biomech Eng **122**(3): 252-260.
- Mauck, R. L., C. C. Wang, E. S. Oswald, G. A. Ateshian and C. T. Hung (2003). "The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading." Osteoarthritis Cartilage **11**(12): 879-890.
- Mayer-Wagner, S., A. Passberger, B. Sievers, J. Aigner, B. Summer, T. S. Schiergens, V. Jansson and P. E. Muller (2011). "Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." Bioelectromagnetics **32**(4): 283-290.
- Mithoefer, K., T. McAdams, R. J. Williams, P. C. Kreuz and B. R. Mandelbaum (2009). "Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis." Am J Sports Med **37**(10): 2053-2063.
- Mortisen, D., M. Peroglio, M. Alini and D. Eglin (2010). "Tailoring thermoreversible hyaluronan hydrogels by "click" chemistry and RAFT polymerization for cell and drug therapy." Biomacromolecules **11**(5): 1261-1272.
- Mow, V. C., A. Ratcliffe and A. R. Poole (1992). "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures." Biomaterials **13**(2): 67-97.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

- Nehrer, S., H. A. Breinan, A. Ramappa, H. P. Hsu, T. Minas, S. Shortkroff, C. B. Sledge, I. V. Yannas and M. Spector (1998). "Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model." *Biomaterials* **19**(24): 2313-2328.
- Newton, G., S. Weremowicz, C. C. Morton, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and J. Lawler (1994). "Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein." *Genomics* **24**(3): 435-439.
- Nicodemus, G. D. and S. J. Bryant (2008). "The role of hydrogel structure and dynamic loading on chondrocyte gene expression and matrix formation." *J Biomech* **41**(7): 1528-1536.
- Okada, M., J. H. Kim, W. C. Hutton and S. T. Yoon (2011). "Upregulation of Intervertebral Disc-Cell Matrix Synthesis by Pulsed Electromagnetic Field Is Mediated by Bone Morphogenetic Proteins." *J Spinal Disord Tech.*
- Ongaro, A., A. Pellati, F. F. Masieri, A. Caruso, S. Setti, R. Cadossi, R. Biscione, L. Massari, M. Fini and M. De Mattei (2011). "Chondroprotective effects of pulsed electromagnetic fields on human cartilage explants." *Bioelectromagnetics* **32**(7): 543-551.
- Park, S., C. T. Hung and G. A. Ateshian (2004). "Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels." *Osteoarthritis Cartilage* **12**(1): 65-73.
- Parkkinen, J. J., J. Ikonen, M. J. Lammi, J. Laakkonen, M. Tammi and H. J. Helminen (1993). "Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants." *Arch Biochem Biophys* **300**(1): 458-465.
- Peng, X. X., R. L. Zhao, W. Song, H. R. Chu, M. Li, S. Y. Song, G. Z. Li and D. C. Liang (2012). "Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in cartilage tissue injury and repair in rabbits." *Int J Mol Sci* **13**(11): 14344-14355.
- Petersen, S. G., T. Saxne, D. Heinegard, M. Hansen, L. Holm, S. Koskinen, C. Stordal, H. Christensen, P. Aagaard and M. Kjaer (2010). "Glucosamine but not ibuprofen alters cartilage turnover in osteoarthritis patients in response to physical training." *Osteoarthritis Cartilage* **18**(1): 34-40.
- Peterson, L., T. Minas, M. Brittberg, A. Nilsson, E. Sjogren-Jansson and A. Lindahl (2000). "Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee." *Clin Orthop Relat Res*(374): 212-234.
- Poole, A. R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi and S. Laverty (2001). "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair." *Clin Orthop Relat Res*(391 Suppl): S26-33.
- Poole, A. R., G. Rizkalla, M. Ionescu, A. Reiner, E. Brooks, C. Rorabeck, R. Bourne and E. Bogoch (1993). "Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization." *Agents Actions Suppl* **39**: 3-13.
- Puetzer, J., J. Williams, A. Gillies, S. Bernacki and E. G. Lobo (2013). "The effects of cyclic hydrostatic pressure on chondrogenesis and viability of human adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional agarose constructs." *Tissue Eng Part A* **19**(1-2): 299-306.
- Remmele, W. and K. H. Schicketanz (1993). "Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS)." *Pathol Res Pract* **189**(8): 862-866.
- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." *Pathologie* **8**(3): 138-140.
- Rothman, K. J. (1990). "No adjustments are needed for multiple comparisons." *Epidemiology* **1**(1): 43-46.
- Sakai, A., K. Suzuki, T. Nakamura, T. Norimura and T. Tsuchiya (1991). "Effects of pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells." *Int Orthop* **15**(4): 341-346.
- Salter, D. M., G. Nuki and M. O. Wright (1996). "IL-4 inhibition of cartilage breakdown in bovine articular explants." *J Rheumatol* **23**(7): 1314-1315.

Salzmann, G. M., M. S. Buchberger, M. J. Stoddart, S. Grad, S. Milz, P. Niemeyer, N. P. Sudkamp, A. B. Imhoff and M. Alini (2010). "Varying Regional Topology Within Knee Articular Chondrocytes Under Simulated In Vivo Conditions." Tissue Eng Part A.

Salzmann, G. M., P. Niemeyer, M. Steinwachs, P. C. Kreuz, N. P. Sudkamp and H. O. Mayr (2010). "Cartilage repair approach and treatment characteristics across the knee joint: a European survey." Arch Orthop Trauma Surg.

Salzmann, G. M., P. Niemeyer, M. Steinwachs, P. C. Kreuz, N. P. Sudkamp and H. O. Mayr (2011). "Cartilage repair approach and treatment characteristics across the knee joint: a European survey." Arch Orthop Trauma Surg **131**(3): 283-291.

Salzmann, G. M., B. Nuernberger, P. Schmitz, M. Anton, M. J. Stoddart, S. Grad, S. Milz, T. Tischer, S. Vogt, B. Gansbacher, A. B. Imhoff and M. Alini (2009). "Physicobiochemical synergism through gene therapy and functional tissue engineering for in vitro chondrogenesis." Tissue Eng Part A **15**(9): 2513-2524.

Schewe, B., J. Fritz, C. Gaissmaier and K. Weise (2006). "[Cartilage cell transplant: surgical technique with matrix-associated chondrocytes]." Unfallchirurg **109**(7): 577-582.

Schmidt, T. A. and R. L. Sah (2007). "Effect of synovial fluid on boundary lubrication of articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **15**(1): 35-47.

Steadman, J. R., W. G. Rodkey and J. J. Rodrigo (2001). "Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S362-369.

Steinwachs, M. R., B. Waibl, S. Wopperer and M. Mumme (2014). "Matrix-associated chondroplasty: a novel platelet-rich plasma and concentrated nucleated bone marrow cell-enhanced cartilage restoration technique." Arthrosc Tech **3**(2): e279-282.

Stoddart, M. J., R. G. Richards and M. Alini (2012). "EDITORIAL: In vitro experiments with primary mammalian cells: To Pool or not to Pool?" Eur Cell Mater **24**: i-ii.

Strangeways, T. S. (1920). "Observations ON THE NUTRITION OF ARTICULAR CARTILAGE." Br Med J **1**(3098): 661-663.

Streich, N. A., T. Gotterbarm, A. Barie and H. Schmitt (2009). "Prognostic value of chondral defects on the outcome after arthroscopic treatment of acetabular labral tears." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **17**(10): 1257-1263.

Tallheden, T., C. Karlsson, A. Brunner, J. Van Der Lee, R. Hagg, R. Tommasini and A. Lindahl (2004). "Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **12**(7): 525-535.

Theodoropoulos, J. S., A. J. DeCroos, M. Petrera, S. Park and R. A. Kandel (2014). "Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.

Thevenot, P., A. Nair, J. Dey, J. Yang and L. Tang (2008). "Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds." Tissue Eng Part C Methods **14**(4): 319-331.

Ting, V., C. D. Sims, L. E. Brecht, J. G. McCarthy, A. K. Kasabian, P. R. Connelly, J. Elisseeff, G. K. Gittes and M. T. Longaker (1998). "In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes." Ann Plast Surg **40**(4): 413-420; discussion 420-411.

Toh, W. S., H. Liu, B. C. Heng, A. J. Rufaihah, C. P. Ye and T. Cao (2005). "Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation." Growth Factors **23**(4): 313-321.

Vacanti, C. A., R. Langer, B. Schloo and J. P. Vacanti (1991). "Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation." Plast Reconstr Surg **88**(5): 753-759.

van Meegeren, M. E., G. Roosendaal, K. Coeleveld, L. Nieuwenhuizen, S. C. Mastbergen and F. P. Lafeber (2013). "A single intra-articular injection with IL-4 plus IL-10 ameliorates blood-induced cartilage degeneration in haemophilic mice." Br J Haematol **160**(4): 515-520.

Vavken, P., F. Arrich, O. Schuhfried and R. Dorotka (2009). "Effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in the management of osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials." J Rehabil Med **41**(6): 406-411.

Veronesi, F., M. Fini, G. Giavaresi, A. Ongaro, M. De Mattei, A. Pellati, S. Setti and M. Tschon (2015). "Experimentally induced cartilage degeneration treated by pulsed electromagnetic field stimulation; an in vitro study on bovine cartilage." BMC Musculoskelet Disord **16**(1): 308.

Villanueva, I., S. K. Gladem, J. Kessler and S. J. Bryant (2010). "Dynamic loading stimulates chondrocyte biosynthesis when encapsulated in charged hydrogels prepared from poly(ethylene glycol) and chondroitin sulfate." Matrix Biol **29**(1): 51-62.

Vogt, S., S. Braun and A. B. Imhoff (2007). "[Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation]." Z Rheumatol **66**(6): 493-503; quiz 504.

Wagner, H. (1964). "[Surgical Treatment of Osteochondritis Dissecans, a Cause of Arthritis Deformans of the Knee]." Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **50**: 335-352.

Wagner, H. (1972). "[Possibilities and experiences with cartilage transplantation]." Z Orthop Ihre Grenzgeb **110**(6): 705-708.

Waldman, S. D., D. C. Couto, M. D. Grynblas, R. M. Pilliar and R. A. Kandel (2007). "Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: review." Eur Cell Mater **13**: 66-73; discussion 73-64.

Wang, M., E. R. Sampson, H. Jin, J. Li, Q. H. Ke, H. J. Im and D. Chen (2013). "MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis." Arthritis Res Ther **15**(1): R5.

Wang, S., C. Duan, F. Zhang, W. Ma and X. Guo (2013). "Regulatory gene networks and signaling pathways from primary osteoarthritis and Kashin-Beck disease, an endemic osteoarthritis, identified by three analysis software." Gene **512**(1): 89-96.

Wernike, E., Z. Li, M. Alini and S. Grad (2008). "Effect of reduced oxygen tension and long-term mechanical stimulation on chondrocyte-polymer constructs." Cell Tissue Res **331**(2): 473-483.

Wimmer, M. A., S. Grad, T. Kaup, M. Hanni, E. Schneider, S. Gogolewski and M. Alini (2004). "Tribology approach to the engineering and study of articular cartilage." Tissue Eng **10**(9-10): 1436-1445.

Wong, M., M. Siegrist and K. Goodwin (2003). "Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes." Bone **33**(4): 685-693.