

Anika Krase

Dr. sc. hum.

Funktionelles Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe: Strategien zur Analyse und Optimierung biomechanischer Eigenschaften von Knorpel Tissue Engineering Konstrukten

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. W. Richter

Eine der größten Herausforderungen des Knorpel Tissue Engineering (TE) ist es, neben der morphologisch einwandfreien knorpeligen Ausprägung *in vitro* generierter Konstrukte, eine Funktionalität zu generieren, die der von nativem Gewebe gleicht. Nur so wäre das Regenerationsgewebe in der Lage, den biomechanischen Ansprüchen in der Gelenkumgebung standzuhalten. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst ein sensitives biomechanisches Testverfahren zu identifizieren, mit dem TE Konstrukte auf ihre Funktionalität geprüft werden können. Hauptziel war die Weiterentwicklung bisheriger Strategien zur Generierung von Knorpel TE Konstrukten unter funktionellen Gesichtspunkten, um biochemische und biomechanische Eigenschaften von natürlichem Knorpelgewebe soweit wie möglich zu erreichen.

Mit der Digi-Test-II Testeinheit (Bareiss) wurde ein biomechanisches Testsystem etabliert, mit dem im Folgenden alle generierten Knorpel TE Konstrukte auf ihre Härte nach dem *Very Low Rubber Hardness* (VLRH) -Prinzip analysiert wurden. Der Vorteil dieses Testsystems gegenüber den bislang verwendeten Prüfgeräten war einerseits die einfache, effiziente Handhabung. So wurde ohne aufwändige Auswertungsalgorithmen direkt nach der Prüfung von TE Konstrukten ihr Härtewert festgestellt. Ein weiterer Vorteil bestand in der sterilen Anwendbarkeit, die bislang mit keinem der gängigen Testsysteme gegeben war. Im Vergleich zum bereits etablierten *confined compression* Prinzip erwies es sich als deutlich sensitiver bei der Detektion von biomemechanischen Konsequenzen durch Unterschiede im Gehalt an Extrazellulärmatrix (EZM). Somit sollte das Digi-Test-II Testsystem zukünftig einen hohen Stellenwert bei der Analyse von Knorpel TE Konstrukten einnehmen. Zudem sollte die VLRH als bedeutender Parameter zur Qualitätsbeurteilung dienen. Im Zuge der Identifizierung eines optimalen Trägersystems unter Analyse von fünf unterschiedlichen

Matrices (Chondro-Gide®, Corgel® BioHydrogel, Kollagen Typ I/III-Matrix, Kollagen Typ II-Matrix, Optimaix 3D) wurde die Optimaix 3D mit ihren parallelen Kollagenfasern ausgewählt, die den Chondrozyten als Leitstruktur diente und so eine gleichmäßige Besiedlung und Ablagerung von EZM erlaubte. Über die Kulturperiode von sechs Wochen nahmen Konstruktdicke und EZM-Ablagerung signifikant zu, was mit einer Erhöhung der Härtewerte der TE Konstrukte korrelierte, die in 68 % der Härte von nativem Knorpel resultierte. Somit wurde ein Struktur-Funktionszusammenhang zwischen abgelagerten Glykosaminoglykanen (GAG) und der VLRH nachgewiesen. Die ektope Implantation von TE Konstrukten in die *severe combined immunodeficiency* (SCID) -Maus ergab keine Verbesserung von EZM-Ablagerung und funktionellen Eigenschaften in der ektope Umgebung. Während die Aktivierung der Wnt- β -Catenin Signalkaskade mittels Lithiumchlorid *in vitro* kaum Wirkung zeigte, erwies sich erstmalig BMP-4/-7 Heterodimer als höchst effektiv zur Steigerung der Expression knorpelrelevanter Gene, der EZM-Neusynthese und -Ablagerung sowie der biomechanischen Eigenschaften von TE Konstrukten, die bereits nach vier Wochen etwa 83 % der Härte von nativem Gewebe aufwiesen. Diese Werte würden unter Standardbedingungen erst nach etwa neun Wochen erreicht. Im Hinblick auf eine zeit- und kosteneffiziente Generierung von TE Konstrukten ermöglicht die Behandlung mit BMP-4/-7 somit zukünftig die Halbierung der Kulturdauer. Trotz ihrer erhöhten EZM-Ablagerung zeigten optimierte TE Konstrukte unter tribologischer Belastung einen Verlust von etwa 90 % ihrer abgelagerten EZM, während natives Gewebe etwa 13 % verlor.

Insgesamt ist durch Stimulation mit BMP-4/-7 Heterodimer eine Optimierung biochemischer und funktioneller Eigenschaften gelungen. Zudem wurde deutlich, dass nicht nur die gesteigerte Produktion von EZM-Molekülen für das funktionelle TE relevant sein sollte, sondern auch die Retention der Proteine im Konstrukt sollte im Fokus der Analysen stehen. Für die biomechanische Untersuchung von Konstrukten bedeuten die Ergebnisse, dass ein und dasselbe Konstrukt nur einem einzigen biomechanischen Test unterzogen werden sollte, da strukturelle Eigenschaften durch die Messung verändert werden. Für eine weitere Verbesserung funktioneller Charakteristika ist anzuraten, neben der Erhöhung des GAG-Gehaltes durch biologische Faktoren auch die Vernetzung der Proteoglykanmoleküle mit weiteren EZM-Komponenten wie Kollagen im Konstrukt zu stimulieren, um eine Verankerung im Gewebe und damit die Retention der Moleküle unter Belastung zu stärken.