

## Redaktion

V. Ewerbeck, Heidelberg

H. Schmal<sup>1</sup> · A.T. Mehlhorn<sup>1</sup> · C. Kurze<sup>1</sup> · J. Zwingmann<sup>1</sup> · P. Niemeyer<sup>1</sup> ·  
 G. Finkenzeller<sup>2</sup> · M. Dauner<sup>3</sup> · N.P. Südkamp<sup>1</sup> · W. Köstler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department für Orthopädie und Traumatologie,  
 Universitätsklinik Freiburg, Freiburg im Breisgau

<sup>2</sup> Abteilung für Hand- und Plastische Chirurgie,  
 Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg im Breisgau

<sup>3</sup> ITV Institute for Textile Technology and Process Engineering, Denkendorf

## In-vitro-Studie zum Einfluss von Fibrin in Knorpelkonstrukten auf der Basis von PGA-Vliesstoffen

### Hintergrund und Fragestellung

Umschriebene Knorpelschäden sind eine inzwischen behandelbare präarthrotische Deformität, wobei nach Einführung der Methode der autologen Chondrozytentransplantation durch Brittberg [5] diese Technik inzwischen durch eine zusätzliche Matrixkomponente weiterentwickelt wurde. Trägermaterialien dienen hierbei zur Bereitstellung des dreidimensionalen (3D-)Gerüsts für die variable zelluläre Komponente eines Knorpelkonstrukts. Porosität, Adhäsivität, Biodegradierbarkeit, Volumenstabilität, Biokompatibilität, Einbindungsfähigkeit („bonding“), innere Kohäsion, Elastizität und mechanische Festigkeit, strukturelle Anisotropie und ein möglicher Wechsel der Aggregatzustände sind erwünschte Eigenschaften einer solchen artifiziellen Matrix, wobei keine der bisher verwendeten Stoffklassen bis jetzt ideale Voraussetzungen hat [15]. Im Optimalfall entspricht die Degradations- und Resorptionsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit, mit der das neue Gewebe bei erhaltener Volumenstabilität aufgebaut wird.

Für die Besiedelung optimale Eigenschaften besitzen auf Carbohydraten basierende Polymere wie Polyglykolid (PGA) hinsichtlich Porosität, Adhäsivität und Rauigkeit, was das Ein- und Durchdringen sowie die Haftung der Chondro-

zyten begünstigt. Die Möglichkeit zur Koppelung bioreaktiver Substanzen wie z. B. von Wachstumsfaktoren an die Matrix kann die Adhäsions- und Wachstumseigenschaften weiter verbessern. Die Einflussnahme auf die Vernetzung innerhalb des Vliesstoffes eröffnet die Möglichkeit, die Porosität und somit die Migrationseigenschaften zu variieren [15]. Kompositematrizes als Kombination einer proteinbasierten Matrix wie Fibrin mit einem Carbohydratpolymer könnten positive Eigenschaften ergänzen und werden bereits experimentell untersucht [8].

Die Festigkeit von Fibrin gegenüber biomechanischer Belastung ist gering, aber es besitzt hervorragende reparaturinduktive Eigenschaften [3, 4, 29]. Dabei wirkt es entzündungsunterhaltend und induziert den eigenen Abbau sowie die Substitution durch zelluläre Komponenten der extravaskulären Geweberäume. Die Polymerisierung des Fibrinogens ist abhängig von der Konzentration und der Einwirkungszeit des Thrombins, Abbauhemmer wie Aprotinin werden bei der klinischen Anwendung zugesetzt. Da Fibrin ein körpereigener Stoff ist, sind die Degradationsprodukte generell biokompatibel, allerdings wurden immunologische Reaktionen beobachtet [12, 18]. Als Folge der gesteigerten natürlichen Reparatursprozesse kommt es zur Ausbildung eines narbenähnlichen Reparaturgewe-

bes [27, 31]. Bei Gelenkknorpelschäden in Tierversuchen, wobei Chondrozyten mit der Fibrinkomponente als „injectable cartilage“ eingesetzt wurden, konnte jedoch eine Unterstützung bzw. Verbesserung des Heilungsprozesses nicht bestätigt werden [30]. Als möglicher Grund wird die ungenügende subchondrale biomechanische Unterstützung für die Knorpelreparation aufgeführt [30].

Negativ auf den Heilungsprozess wirkt sich wahrscheinlich auch die unphysiologisch hohe Konzentration an Proteinen aus [15]. Die wichtigsten auf Carbohydraten basierenden Polymere sind Polylactid, Polyglykosid, Agarose, Alginat, Hyaluronan und Chitosan. Polyglykosid zählt zu den  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren und wird synthetisch hergestellt, wobei es verschiedene Arten der Vliesherstellung (z. B. das „Melt-blow-Verfahren“ oder das Spinnvliesverfahren) gibt [7, 9, 19].

Die Generierung von Kompositkonstrukten soll die positiven Eigenschaften von zwei verschiedenen Matrices kombinieren, um z. B. eine bessere Immobilisierung der Chondrozyten im Transplantat, eine bessere initiale Stabilität und eine Bindung von Mediatoren zu ermöglichen [1]. Die prinzipielle Machbarkeit der Anwendung von verschiedenen Matrices auf Carbohydratbasis wurde bereits mehrfach erfolgreich gezeigt und untersucht [8, 23]. Kompositkonstrukte aus Carbohydrat-

Hier steht eine Anzeige.



dratmatrices und Fibrin werden bereits klinisch angewendet [22], wobei Untersuchungen zum Einfluss der Fibrinkomponente auf die Zelldifferenzierung noch ausstehen und Gegenstand dieser Studie sind.

## Material und Methoden

### Chemikalien

Alle verwendeten Medien und Medienzusätze (einschließlich der verwendeten Wachstumsfaktoren) wurden (soweit nicht speziell angegeben) von Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, USA) erworben.

### Isolierung der Knorpelzellen

Die Knorpelzellen wurden von Hüftköpfen isoliert, welche bei der Implantation von Duokopfprothesen nach medialer Schenkelhalsfraktur gewonnen wurden. Nach der Resektion erfolgte die Aufbewahrung gepuffert bei 4°C. Der Arthroseggrad wurde anhand des Röntgenbildes nach dem von Croft modifizierten Kellgren-Lawrence-Score eingeschätzt [24]. Die Zellen von Patienten mit einer fortgeschrittenen Arthrose ( $\geq$ Grad 3) wurden nicht für die Experimente verwendet. Auch schließt sich bei fortgeschrittener Arthrose das Versorgungsverfahren der Duokopfprothese meist aus.

Insgesamt wurden für diese Versuche Spendermaterial von 14 Patienten im Alter von 46–96 Jahren verwendet (Durchschnittsalter 70 Jahre). Innerhalb von 8 h postoperativ wurde der Knorpel vom Knochen separiert, in kleine Stücke zerlegt und in Kollagenase CLS Typ II (Fa. Biochrom, Berlin) bei einer Konzentration von 2 mg/ml (320 U/l) im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit) auf einem orbitalen Rüttler bei 50 rpm inkubiert und verdaut. Als Grundmedium diente OptiPro™ SFM (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) mit 1% Penicillin/Streptomycin (Fa. Invitrogen). Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurden die Zellen gefiltert, gewaschen und für die Experimente vorbereitet. Diese Vorgehensweise wurde bei der Ethikkommission der Universität Freiburg im Rahmen der „Gewebebank

für Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineerings“ angemeldet.

### Expansion der Chondrozyten

Die Chondrozyten wurden in 225-cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen in einer Konzentration von ca.  $2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> mit 30 ml Medium kultiviert. Es wurde eine serumfreie Wachstums Umgebung verwendet, wobei das Nährmedium aus OptiPro™ SFM mit EGF („epidermal growth factor“, 10 ng/ml gelöst in 10 mM Essigsäure), bFGF („basic fibroblast growth factor“, 10 ng/ml gelöst in Grundmedium), IGF („Insulin-like growth factor“, 10 ng/ml gelöst in 10 mM Essigsäure), PDGF-BB („platelet derived growth factor“, 3 ng/ml gelöst in 10 mM Essigsäure), DXA (Dexamethason, 40 ng/ml gelöst in PBS), Glutamin (4 mM gelöst in PBS) und Penicillin/Streptomycin bestand.

Das Medium wurde jeden 2. Tag zu zwei Drittel gewechselt und die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Mit Erreichen einer subtotalen Konfluenz von ca. 80% wurden die Chondrozyten 2-mal mit PBS gespült und mit Hilfe von 15 ml 0,25% Trypsin-EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) vom Boden abgelöst. Nach der üblichen Zellwaschung wurden die gewonnenen P<sub>1</sub>-Zellen kryokonserviert, um zu einem späterem Zeitpunkt bei der nächsten Passagephase gepoolt zu werden. Innerhalb der 2. Passage wurden die Zellen von jeweils 5 Spendern gepoolt und vor der Vliesbesiedelung bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert.

### Besiedelung der Vliesstoffe

Die gepoolten, 2-malig passagierten Zellen wurden in einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Der untersuchte Vliesstoff aus Polyglykosid wurde durch das Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) in Denkendorf hergestellt [28]. Als Vliesstoff wurde PGA 91 mit einer mittleren Porengröße von 80 (20–300) µm, einer Filamentdicke von 13 µm, einer mittleren Degradationszeit von 4–5 Wochen und einer Resorptionszeit zwischen 7 und 20 Wochen verwendet. Für jedes Konstrukt standen  $2 \times 10^6$  Chondrozyten zur Verfügung. 100 µl der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen pipettiert

und anschließend ein Konstrukt unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Unter Zuhilfenahme einer Kanüle wurde der Vliesstoff in der Suspension geschwenkt und anschließend 60 min im Brutschrank inkubiert. Die so besiedelten Matrices wurden steril in 12-Well-Plates transferiert und in 3 ml serumfreiem Grundmedium kultiviert. Alle 2 Tage fand ein 2/3-Wechsel des Mediums statt.

### Herstellung einer Kompositematrix aus Fibrin und Vliesstoff

Die Fibrinmatrix wurde mit Hilfe des „TissueCol® duo S-Kits“ (Fa. Baxter, Unterschleißheim) nach Herstelleranweisung hergestellt. 10 µl Fibrinogenlösung wurden mit 90 µl Zellsuspension vermischt, sodass die Anzahl der Chondrozyten  $2 \times 10^6$  betrug. Nach der 60-minütigen Inkubation zur Vliesbesiedelung wurden die Konstrukte auf einen 10 µl großen Tropfen Thrombinlösung (1:20) gelegt und 10 µl der gleichen Lösung darüber pipettiert. Nach 10 s wurde die besiedelte Matrix in 1:75 verdünnter Thrombinlösung 1 min inkubiert. Die Kulturumgebung bestand wieder aus mit 3 ml serumfreiem Grundmedium. Die Messung des Kultur-pH-Wertes erfolgte jeweils vor Durchführung des üblichen Mediumwechsels. Der pH-Wert in den Kulturen der Konstrukte auf Basis der unbehandelten PGA 91-Vliesstoffe schwankte über die 14 Tage zwischen 7,08 und 7,83 (Mittelwert  $7,43 \pm 0,029$ ). Bei den fibrinbehandelten Vliesen war der mittlere pH-Wert mit  $7,58 \pm 0,025$  (7,27–7,84) im Vergleich leicht basischer, es konnte keine signifikante Differenz nachgewiesen werden.

### Bestimmung des zellulären Metabolismus mit dem CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTT-Assay)

Die Reagenzien wurden bei Promega (Fa. Madison, WI, USA) erworben und der Assay nach den Herstelleranweisungen durchgeführt. Prinzipiell wird hierbei die MTS-Tetrazolium-Komponente von den vitalen Zellen aufgenommen, reduziert und hierdurch in das kolorierte und lösliche Formazan umgewandelt, das dann über die Absorption quantifiziert werden

kann. Die Konstrukte wurden in eine mit 300 µl zusatzfreiem OptiPro™ SFM-Medium gefüllte 48-Well-Platte gegeben und 30 µl MTT-Reagenz dazu pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37°C unter üblichen Kulturbedingungen. Die Konstrukte wurden nach mehrmaligem Waschen in PBS wieder in die 12-Well-Platte transferiert und die entstandene Farblösung mit dem Zytofluorometer (TECAN, SpectrafluorPlus microplate reader, Tecan Trading AG, Schweiz) bei 490 nm analysiert. Diese Untersuchung fand an den Tagen 2, 5, 7, 10 und 14 statt. Über eine Standardkurve konnte die Zellzahl mit der entsprechenden optischen Dichte korreliert werden.

### DNA-Quantifizierung: Picogreen-Assay

Die spektrometrische DNA-Messung erfolgte unter Verwendung des Picogreen-Kits (Picogreen dsDNA-Kit, Fa. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach den Instruktionen des Herstellers. Die Homogenisierung der einzelnen Konstrukte erfolgte in 1 ml TE-Puffer unter Verwendung eines Homogenisiergeräts (Ultra-Turrax T25, Fa. IKA-Labortechnik, Staufen). Je Well wurden 100 µl der Proben und 100 µl Picogreen dsDNA-Reagenz (1:200 Verdünnung in TE-Puffer) in Duplets pipettiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einer DNA-Standardreihe. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit dem ELISA-Reader die Extinktion bei 480 nm und die Emission bei 520 nm gemessen.

### Real-time-PCR

Die RNA-Proben wurden nach 7 und 14 Tagen gewonnen, wobei die Konstrukte mit einem Homogenisiergerät (Ultra-Turrax T25, Fa. IKA-Labortechnik) zerkleinert und mit TRIZOL®-Reagenz (Fa. Invitrogen) aufgearbeitet wurden. Die RNA wurde spektrophotometrisch quantifiziert und qualitativ mit einer Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese analysiert. Mittels Real-time-PCR wurde die Expression von Aggrecan, Kollagen Typ II (α1-Kette) und Kollagen Typ I (α2-Kette) bestimmt. 1 µg RNA wurde mit 1 IU Desoxyribonuclease I (DNase I, Fa. Invitro-

Orthopäde 2008 · 37:424–434 DOI 10.1007/s00132-008-1258-9  
© Springer Medizin Verlag 2008

H. Schmal · A.T. Mehlhorn · C. Kurze · J. Zwingmann · P. Niemeyer · G. Finkenzeller · M. Dauner · N.P. Südkamp · W. Köstler

### In-vitro-Studie zum Einfluss von Fibrin in Knorpelkonstrukten auf der Basis von PGA-Vliesstoffen

#### Zusammenfassung

**Fragestellung.** Die Matrixkomponente spielt bei der autologen Chondrozytentransplantation eine zentrale Rolle. Gegenstand dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses einer Fibrinphase in Knorpelkonstrukten auf der Basis von Polyglykolsäure (PGA).

**Methoden.** Humane Chondrozyten wurden von Hüftköpfen isoliert und serumfrei expandiert. PGA-91-Vliesstoffe wurden mit Zellen allein oder in einer Fibrinphase besiedelt und für 14 Tage in vitro kultiviert. Neben der Untersuchung von Zellviabilität, DNA-Gehalt, Kultur-pH-Wert und Aggrecanproduktion wurde mittels Real-time-PCR die mRNA-Expression von Typ-I- und -II-Kollagen sowie von Aggrecan bestimmt. Außerdem wurden die Konstrukte histologisch verglichen.

**Ergebnisse.** Alle Konstrukte enthielten über den untersuchten Zeitraum vitale, metabolisch aktive Zellen. Eine Zellproliferation innerhalb des Knorpeltransplantats fand nicht statt, der DNA-Gehalt war abnehmend. Der pH-Wert war im Untersuchungszeitraum physiologisch konstant. Die Alcian-Blau-Färbung

zeigte die Proteoglykanproduktion sowie die homogene Zellverteilung. Es fand sich eine signifikant geringere Aggrecanreicherung im Überstand der Fibrinkonstrukte (–24%), was mit den mRNA-Expressionsdaten korrelierte (–80%). Die mRNA-Expression von Kollagen Typ II war in den fibrinfreien Konstrukten im Kulturverlauf ansteigend und um 57% höher als in den Fibrinkonstrukten. Der immunhistologische Nachweis von Typ-II-Kollagen war in allen Konstrukten möglich.

**Schlussfolgerung.** Knorpelkonstrukte auf der Basis von Vliesstoffen sind aus zellbiologischer Sicht zum Einsatz für die matrixassoziierte Chondrozytenimplantation geeignet. Die Ergebnisse weisen auf einen partiell inhibitorischen Effekt der Fibrinkomponente auf die chondrogene Differenzierung bei der Kombination mit PGA-Vliesstoffen hin.

#### Schlüsselwörter

Knorpelrekonstruktion · Chondrozyt · Matrix · Polyglycosid · MACI

### In vitro study on the influence of fibrin in cartilage constructs based on PGA fleece materials

#### Abstract

**Background.** The matrix component in autologous chondrocyte implantation plays an important role. In this study the influence of an additional fibrin component in cartilage constructs based on polyglycolide polymers (PGA) was investigated.

**Methods.** Human chondrocytes of femoral heads were isolated and cultured using a serum-free technique. The cells were seeded on PGA-91 scaffolds with and without an additional fibrin component; the constructs were cultured for 2 weeks in vitro. Besides cell viability, DNA content, pH, aggrecan production, mRNA expression of aggrecan, and collagen types I and II were determined by real-time PCR. Furthermore, cartilage grafts were histologically analyzed.

**Results.** All constructs contained viable, metabolically active cells in the investigated time period. There was no cell proliferation within the graft, and the DNA content was decreased over time. The pH level constantly remained within a physiologic range. The Alcian blue staining of the constructs showed

the homogeneous cell distribution and a cell-associated proteoglycan production. Aggrecan concentration in the supernatants of fibrin-containing constructs was significantly lower compared to fibrin-free grafts (–24%), a result that correlated with diminished aggrecan mRNA expression (–80%). mRNA expression of collagen type II increased in the fibrin-free constructs over time and was 57% higher than in the fibrin-containing grafts. The immunohistochemical detection of collagen type II was possible in all constructs.

**Conclusion.** Cartilage constructs based on carbohydrate matrices are suitable for matrix-associated chondrocyte implantation. The results of this study suggest a partially inhibitory effect of an additional fibrin component in PGA constructs for chondrogenic differentiation.

#### Keywords

Cartilage engineering · Chondrocyte · Matrix · Carbohydrate · MACI

**Tab. 1** Sequenzen von Primern und Proben für die Real-time-PCR (TaqMan™) [26]

| Gene   | Primer 1                           | Primer 2                   | Probe                                      |
|--|------------------------------------|----------------------------|--|
| Kollagen Typ I $\alpha_2$                        | CAG CCA AGA ACT GGT ATA GGA<br>GCT | TCA AAC TGG CTG CCA GCA T  | CAA GGA CAA GAA ACA CGT CTG GCT AGG<br>AGA |
| Kollagen Typ II $\alpha_1$                       | GAG ACA GCA TGA CGC CGA G          | GCG GAT GCT CTC AAT CTG GT | TGG ATG CCA CAC TCA AGT CCC TCA AC         |
| Aggrecan (Chondroitinsulfate-<br>proteoglycan 1) | AGC CTG CGT TCC AAT GACT           | TGG AAC ACG ATG CCT TTC AC | CGC TGC GAG GTG ATG CAT GGC                |

gen) behandelt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Die reverse Transkription wurde nach dem Protokoll des „ProSTAR First Strand RT-PCR Kits“ (Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA) unter Verwendung von „random primern“ und 50 IU „StrataScript Reverser Transcriptase“ durchgeführt. Die TaqMan™-PCR wurde in optisch permeablen 96-Well-Platten mit einem „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ (Fa. Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) unter Benutzung von dem „Absolute QPCR ROX Mix“ (Fa. Abgene, Hamburg) entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt.

Die Primer und die fluoreszenzmarkierten Proben (■ **Tab. 1**) wurden mit dem Programm „Primer Express“ (Fa. Applied Biosystems) nach den Richtlinien des Herstellers entworfen. Die PCR begann mit einem 15-minütigen Schritt bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für je 15 s und 60°C für je 1 min. Die Daten wurden mit der Methode der relativen Standardkurve unter Normalisierung jeder Probe zur GAPDH-Aktivität als Housekeeping-Gen analysiert, um die Differenzen in mRNA-Qualität und -Quantität zu korrigieren. Da die Quantitäten relativ zur GAPDH-Aktivität errechnet wurden, erfolgt die Darstellung ohne Einheit. Humane Fibroblasten-mRNA diente als Negativkontrolle für die chondrogene Genexpression.

### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde als Standard- und Übersichtsfärbung verwendet. Die Proben wurden in 4% phosphatgepuffertem Formalin fixiert und anschließend in einer Alkoholserie dehydriert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5- $\mu$ m-Schnitte mit einem Mikrotom (Leica RM 2165, Fa. Leica Instruments, Nussloch) angefertigt. Die entparaffinierten Schnitte wurden 2 min in Häma-

laun-Lösung eingetaucht und anschließend 10 min mit fließendem Wasser gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit dem Eindeckmedium „Roti Histokitt“ (Carl Roth GmbH und Co.).

### Alcian-Blau-/Kernecht Färbung

Alcian-Blau bildet mit den sauren Mukopolysacchariden eine charakteristische blaue Verbindung. Die Kerne wurden durch Kernechtrot rötlich angefärbt. Die entparaffinierten Schnitte wurden 30 min in Alcian-Blau-Lösung (1% Alcian-Blau 8GX in 3% Essigsäure; pH=1) inkubiert, anschließend kurz gewässert, für 1–3 min unter mikroskopischer Kontrolle mit Kernechtrot gegengefärbt und 30 min unter fließendem Wasser gewaschen. Die Fixierung erfolgte wie beschrieben.

### Konfokale Lasermikroskopie

Die Konstrukte wurden nach 14-tägiger Kultur und 3-maligem Waschen in PBS (phosphate-buffered saline) direkt in Plastikammern (Lab-TEKII chambered coverglass system, Fa. Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) überführt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Konstrukte für 30 min in 5% Ziegen Serum inkubiert. Dann wurden Lösungen aus DAPI (1:100-Verdünnung) und monoklonalem Maus-Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörper (Clone 6B3; Fa. Chemicon, Temecula, CA, USA, 1:100-Verdünnung) in 5% Ziegen Serum hergestellt, welche 1 h einwirkten. Das anschließende Waschen erfolgte mit PBS. Die folgende Inkubation erfolgte mit einem FITC-markiertem Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (Fa. Sigma, Taufkirchen, 1:500-Verdünnung) für ebenfalls 1 h in Dunkelheit. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Präparate unverzüglich unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIRE2, Fa. Leica Instruments) analysiert. Die Exzitati-

onswellenlänge der FITC-Markierung lag bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 510–525 nm. Die optischen Schnitte wurden bei 20facher Vergrößerung mit einer Dicke von 4–6  $\mu$ m gewählt, wobei 50–70 Schnitte in einer Summenprojektion unter Verwendung des Programms „Auto-Visualize Software“ (AutoQuantImaging, Waterliet, NY, USA) zur Darstellung kamen.

### Rasterelektronenmikroskopie

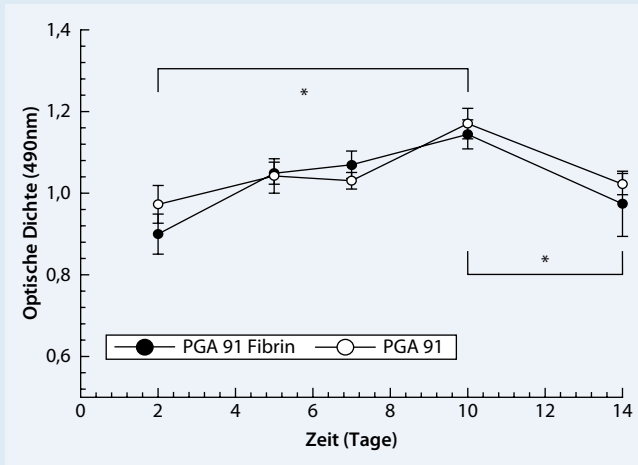
Die Konstrukte wurden für 3 Tage in 8% Formol bei 4°C fixiert. Die Dehydrierung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe. Der Austausch des Alkohols gegen flüssiges Kohlendioxid erfolgte in einem Kritisch-Punkt-Trockner (Bal Tec Ltd., Balzers, Liechtenstein) bei 7°C. Nach Erhöhung der Temperatur auf 42°C bei einem Überdruck von 90 bar wurde das Kohlendioxid in die Gasphase überführt und über ein Ventil aus der Trockenkammer abgelassen. Die getrockneten Konstrukte wurden mit Silberlack auf Objektträgern befestigt und in einem Sputtergerät mit einer 7–10 nm dicken Goldschicht überzogen (Model MED 020 High Vacuum Coating System, Bal Tec Ltd.). Im Vakuum betrug die Besputterungszeit 70 s bei 70 mA. Die Bildgebung erfolgte anschließend mit einem Rasterelektronenmikroskop (Leo Electron Microscopy 435 VP, Fa. Carl Zeiss), welches mit einer Spannung zwischen 5,1 kV und 15 kV betrieben wurde. Übersichts- und Detailaufnahmen mit Vergrößerungsfaktoren zwischen 15 und 1000 gestatteten die Oberflächenanalyse der Konstrukte.

### Aggrecan-ELISA

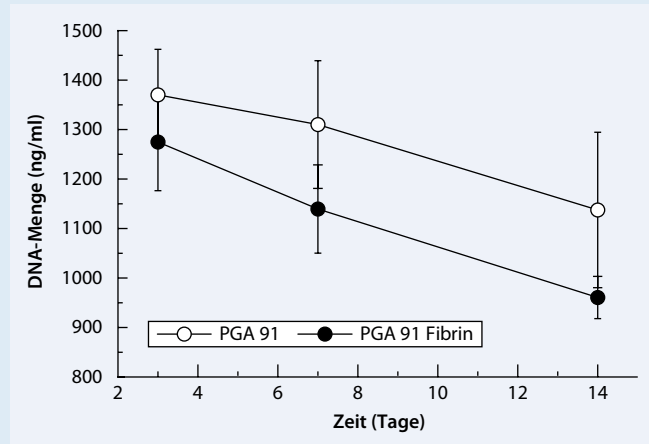
Zur spezifischen Aggrecanquantifizierung wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA verwendet (BioSource GmbH, Solingen). Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers.

Hier steht eine Anzeige.

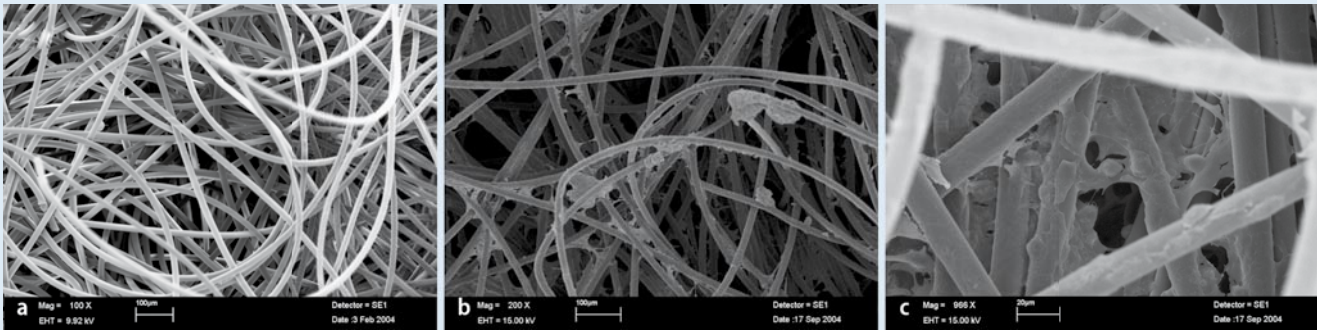




**Abb. 1** ▲ Einfluss der Fibrinkomponente auf den Zellmetabolismus: Darstellung der optischen Dichte nach Durchführung des MTT-Assays (PGA 91-Fibrin gegen unbehandelte Vliese). Unterschiede fanden sich nur innerhalb der Gruppen im Zeitverlauf, die metabolische Aktivität zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant verschieden (\* $p < 0,05$ )



**Abb. 2** ▲ Darstellung der DNA-Menge in den Konstrukten bestimmt mit dem Picogreen-Assay (PGA 91-Fibrin gegen unbehandelte Vliese). Unterschiede fanden sich innerhalb der Gruppen im Zeitverlauf (Abfall um 17% in den unbehandelten Vliesen und um 25% in den Fibrinvliesen,  $p < 0,05$ ), aber nicht zwischen den Gruppen (nicht signifikant)



**Abb. 3** ▲ Elektronenmikroskopische Untersuchung der PGA 91-Vliese mit (Vergr. **b** 200:1, **c** 1000:1) und ohne Zellen (**a**), Maßstab und Vergrößerung sind auf den Bildern direkt indiziert. Es zeigte sich die hohe Porosität und Interkonnektivität sowie die Adhärenz der Zellen auf dem Vliesstoff

Zusammenfassend handelt es sich um einen quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay. Die zu analysierenden Überstände der Konstrukte wurden auf mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Mabs) beschichteten Platten pipettiert, wobei die Verwendung mehrerer verschiedener Antikörper Hyperspezifität vermeidet und die Inkubationszeit verringert. Nach üblichem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundäntikörper. Über eine chromogene Reaktion (TMB und  $H_2O_2$ ) mit photometrischer Messung mit dem ELISA-Reader (TECAN, SpectrafluorPlus microplate reader, Tecan Trading AG, Schweiz) bei 450 nm gegen 650 nm und bei 490 nm gegen 650 nm wurden die Konzentrationen

bestimmt. Standards und Proben wurden in Duplets pipettiert.

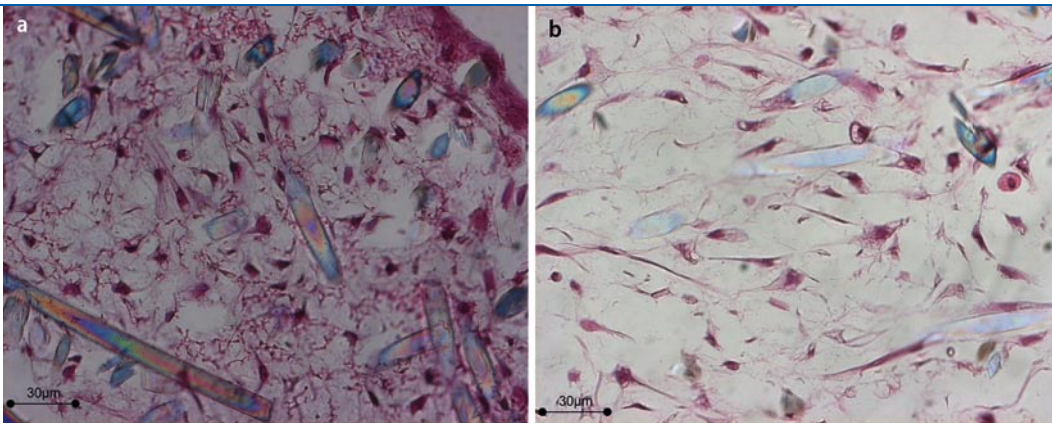
### Statistik

Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein explorativer Mann-Whitney-U-Test und der Wilcoxon-Test wurden ausgewählt, um die Unterschiede zwischen den Gruppen ohne  $\alpha$ -Justierung zu untersuchen. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede wurde bei  $p < 0,05$  angegeben, die Analyse wurde mit SPSS for Windows 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

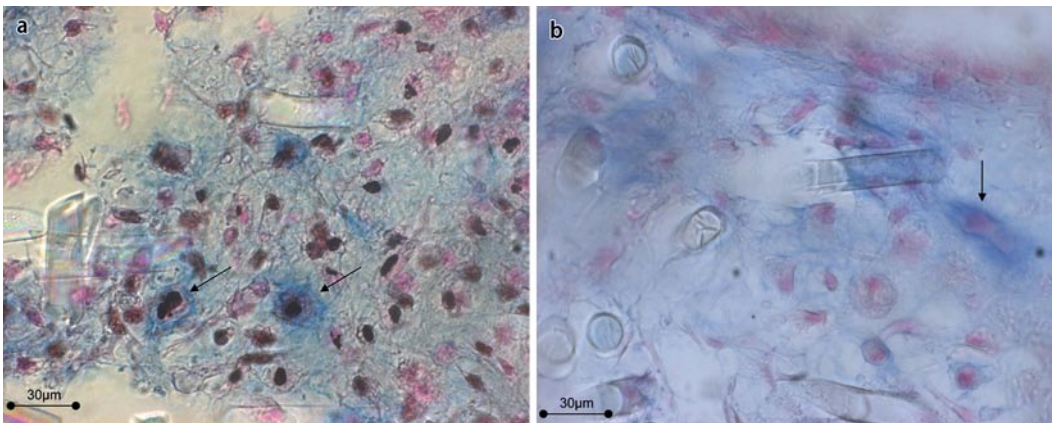
## Ergebnisse

### Zellmetabolismus: MTT-Assay

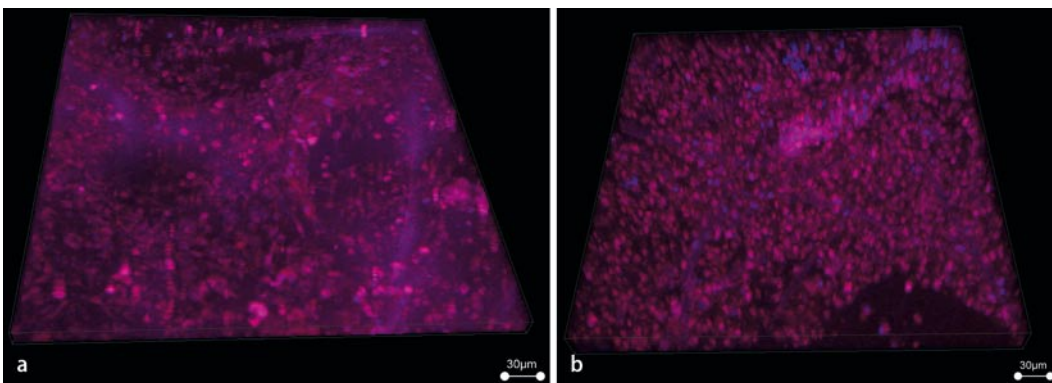
Der MTT-Assay wurde mit allen besiedelten Vliesstoffen an den Tagen 2, 5, 7, 10 und 14 durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Vliesstoffe ohne Zellen mit und ohne Fibrinbehandlung, die beobachtete Farbentwicklung entsprach dem Assayhintergrund ( $0,18275 \pm 0,004$ ). Innerhalb der PGA 91-Gruppe ohne Fibrin kam es vom Tag 2 (1,042) zu Tag 10 (1,171) zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), anschließend kam es wieder zu einem Abfall am Tag 14 (1,022;  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ). Der prinzipielle Verlauf der metabolischen Aktivität in den Kompositvliesen entsprach dem der Vliesstoffe ohne Zusatz. Die optische Dichte zeigte



**Abb. 4** ◀ HE-Färbung nach 14 Tagen von PGA 91-Vliesen mit (a) und ohne Fibrin (b): Blaue Färbung der Vliesfasern, Zellen (teilweise mit Bearbeitungsartefakten) und extrazelluläre Matrix stellen sich überwiegend rot gefärbt dar (Vergr. 63:1)



**Abb. 5** ◀ Alcian-Blau-Färbung nach 14 Tagen von PGA 91-Vliesen mit (a) und ohne Fibrin (b): Blaue Färbung der extrazellulären Matrix (Proteoglykane) mit zellassoziierter Intensitätszunahme (Pfeile, Vergr. 63:1)



**Abb. 6** ◀ CLSM nach 14 Tagen von PGA 91-Vliesen mit (a) und ohne Fibrin (b): Blaue Färbung der Zellkerne (DAPI), zellassoziierte rötliche Färbung des Kollagen Typ II

von Tag 2 (0,900) zu Tag 5 (1,049;  $p < 0,05$ ;  $n=6$ ) und zu Tag 10 (1,144;  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) einen signifikanten Anstieg. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Konstrukten auf der Basis der Kompositematrix und der Vliesstoffe in natura gab es nicht (■ **Abb. 1**).

### DNA-Gehalt: Picogreen-Assay

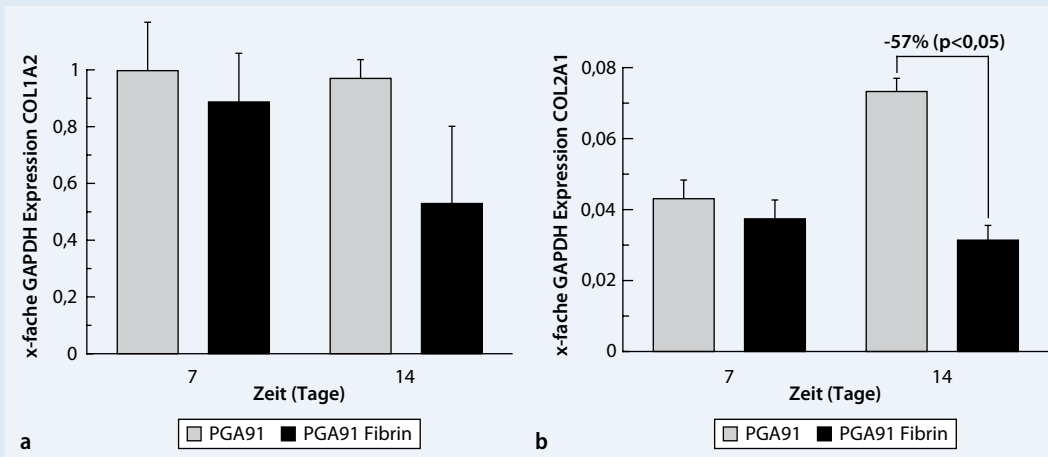
In der Gruppe der unbehandelten PGA 91-Vliese kam es zwischen Tag 3 (1370,15 ng/ml) und Tag 14 (1137,52 ng/ml) zu einem signifikanten Abfall des DNA-Gehalts um 17% ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). Die gleiche Ten-

denz fand sich bei Untersuchung der Kompositenvliese, die optische Dichte am Tag 14 (960,64 ng/ml) des mit Fibrin behandelten PGA 91-Vlieses war um 24,6% ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) geringer als der Wert am Tag 3 (1274,85 ng/ml) und um 15,7% niedriger ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) als der Wert am Tag 7 (1139,40 ng/ml). Bei der Gegenüberstellung der Kompositematrix gegen den Naturvliesstoff zeigte sich eine um 15% (n.s.,  $n=6$ ) höhere DNA-Menge in unbehandelten PGA 91-Vliesen an Tag 7 und eine um 15,7% höhere DNA-Menge an Tag 14 (n.s.,  $n=6$ ) im Vergleich zum PGA 91-Vlies mit Fibrin (■ **Abb. 2**).

### Elektronenmikroskopie (scanning electron microscopy, SEM)

Die Untersuchung der PGA 91-Vliese erfolgte ohne und mit Zellen nach 2-wöchiger Kultivierung. Die Untersuchung wurde zur Klärung der Ultrastruktur des untersuchten Vliesstoffes PGA 91 sowie der Interaktion mit den Chondrozyten durchgeführt. Aufgrund der hohen Porosität mit aufgrund der Herstellung bedingter Interkonnektivität handelt es sich um eine für das Knorpel-Tissue-Engineering geeignete Matrix. Es ließ sich die Anordnung der hochgradig adhären-





**Abb. 7** ▲ Untersuchung der Konstrukte mittels Real-time-PCR hinsichtlich der Expression der Kollagen-Typ-I- (a) und der Kollagen-Typ-II- (b) mRNA nach 7 und 14 Tagen: Bei statistisch unveränderter Expression von Kollagen Typ I zeigte sich eine Zunahme der Kollagen-Typ-II-Expression nach 14 Tagen in den fibrinfreien Konstrukten. Sowohl der Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen innerhalb der Gruppe als auch der Unterschied zwischen den Gruppen nach 14 Tagen war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Chondrozyten entlang der Spinnfasern beobachten. Bei enger räumlicher Beziehung zweier Fasern entstanden „Zellnester“. Insgesamt fanden sich sowohl Knorpelzellen mit ausgezogenem, fibroblastenartigem Aussehen als auch Zellen von einem sphärozytären Phänotyp, wobei die Zellen an den verschiedensten Stellen Verbindungen aufwiesen (■ **Abb. 3**).

### Histologische Untersuchung: HE-Färbung und Alcian-Blau-Färbung

Die Übersichtsfärbung zeigte die Fasern des Vliesstoffes (überwiegend blau) sowie die Zellen mit dazwischen liegender Extrazellulärmatrix (überwiegend rot). Diese stellt sich in den Kompositestrukturen dichter dar, ansonsten fand sich in beiden Konstrukten eine relativ gleichmäßige Zellverteilung (■ **Abb. 4**). Beim Schneiden der in Paraffin eingebetteten Objekte kam es partiell zu erheblichen Zerreißungen mit Artefakten. Bei der Alcian-Blau-Färbung stellten sich in beiden Konstrukten die Proteoglykane dar, die Intensität der Blaufärbung korrelierend mit der Menge der Proteoglykane war direkt um die Zellen herum zunehmend (■ **Abb. 5**). Die Zellkerne sind durch die rote Färbung (Kernechtrot) zu erkennen. Die Darstellung insgesamt war ohne Fibrin akzentuierter, wobei keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden konnten.

### Konfokale Lasermikroskopie

Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff DAPI (bläulich), die Färbung des Typ-II-Kollagens erfolgte spezifisch immunhistologisch, die rötliche Färbung entstand durch den FITC-Label des Sekundärantikörpers (■ **Abb. 6**). Wiederum zeigt sich in beiden Konstrukten die gleichmäßige Zellverteilung. Unabhängig von der Fibrinphase wird Kollagen Typ II exprimiert und lagert sich zellassoziiert in der extrazellulären Matrix an. Bei dieser Untersuchung zeigt sich der chondrogene Phänotyp der Konstrukte, wobei keine qualitativen Unterschiede in Abhängigkeit der Fibrinphase festgestellt werden konnten.

### Real-time-PCR (Taqman™)

Die untersuchten Gene Aggrekan, Kollagen Typ I und II wurden in allen Konstrukten exprimiert.

### Typ-I-Kollagen

Statistisch signifikante Unterschiede der Typ-I-Kollagen-Expression zeigten sich weder zwischen den verschiedenen Konstrukten noch zwischen den Zeitpunkten 7 und 14 Tage. Tendenziell konnte man eine Abnahme in beiden Gruppen beobachten, die in der Kompositegruppe etwas stärker ausgeprägt war (■ **Abb. 7a**).

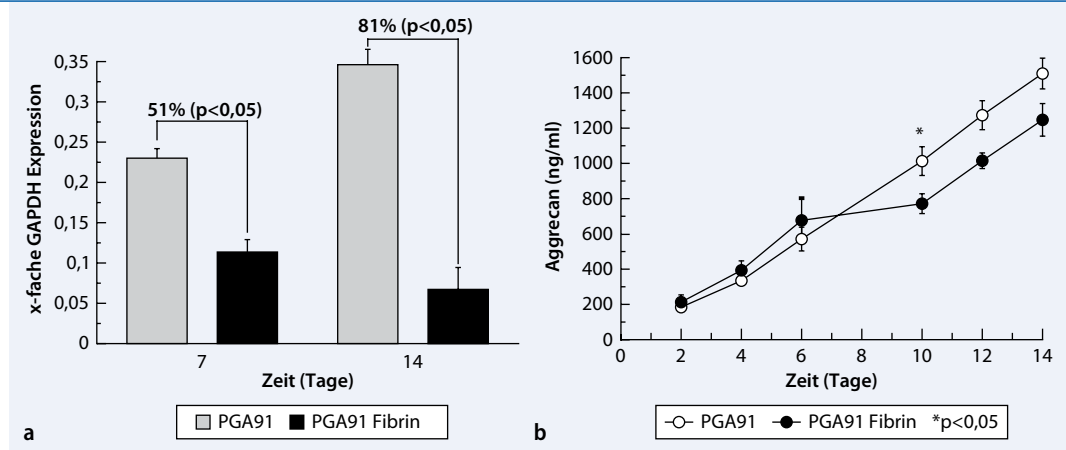
### Typ-II-Kollagen

In den fibrinfreien Konstrukten auf PGA 91-Basis nahm die Typ-II-Kollagen-Expression im Kulturverlauf zu (Tag 7 0,0431fache GAPDH-Expression vs. Tag 14 0,0733fache GAPDH-Expression;  $p < 0,01$ ;  $n=3$ ), während sie in den Kompositestrukturen statistisch unverändert blieb. Nach 2 Wochen ergab sich dann der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Gruppen, so war Kollagen Typ II in den fibrinfreien Matrices um das 2,34fache höher exprimiert als in den Kompositestrukturen (0,0733fache GAPDH-Expression vs. 0,0314fache GAPDH-Expression;  $p < 0,01$ ;  $n=3$ ; ■ **Abb. 7b**).

### Aggrekan

Am 7. Kulturtag war die Aggrekanexpression im unbehandelten Vliesstoff PGA 91 um das 2,02fache höher als in den Kompositestrukturen (0,2301fache GAPDH-Expression vs. 0,1137fache GAPDH-Expression;  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ). Dieser Trend verstärkte sich nach 2 Wochen, wobei es zu einer 1,50fachen Zunahme der Aggrekanexpression in den Konstrukten auf PGA 91-Basis kam (Tag 7 0,2301fache GAPDH-Expression vs. Tag 14 0,3461fache GAPDH-Expression;  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ), die Expression in den Kompositestrukturen war hingegen unverändert. Somit verstärkte sich auch der Unterschied auf das

**Abb. 8** ▶ Aggrekan-mRNA wird in den fibrinfreien PGA 91-Konstrukten nach 7 und 14 Tagen (a) stärker exprimiert als in den Kompositkonstrukten. Hiermit korreliert die Proteinexpression (b) in den Überständen, die am 10. Tag einen statistisch signifikanten Unterschied zeigt



5,14fache (0,3461fache GAPDH-Expression vs. 0,0673fache GAPDH-Expression;  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ) (Abb. 8a).

### Aggrekan ELISA

Signifikante Unterschiede der Aggrekankonzentrationen in den Überständen der Konstrukte zeigten sich ab dem 10. Tag, wobei in Abb. 8b die kumulativen Werte aufgetragen wurden. Am Tag 10 lag die kumulative Expression im Überstand der fibrinfreien Konstrukte um 24% ( $1012,85 \pm 81,69$  ng/ml vs.  $771,41 \pm 56,14$  ng/ml;  $n=5$ ;  $p < 0,05$ ) höher, am Tag 12 um 20% ( $1273,2 \pm 82,19$  ng/ml vs.  $1014,88 \pm 44,24$  ng/ml;  $n=5$ ; nicht signifikant (n.s.)) und am Tag 14 um 17% ( $1509,77 \pm 87,40$  ng/ml vs.  $1246,94 \pm 92,57$  ng/ml;  $n=5$ ; n.s.) höher als bei den Kompositkonstrukten.

### Diskussion

Polymere auf Carbohydratbasis werden seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts in der Chirurgie als Nahtmaterial eingesetzt, d. h. es gibt keine Stoffklasse mit einer längeren klinischen Erfahrung. Grundsätzlich bestätigen unsere Ergebnisse die Möglichkeit des Einsatzes dieser Stoffklasse als Matrix, die eine dreidimensionale (3D-)Umgebung für die Zellen bei der matrixassoziierten Chondrozytenimplantation zur Verfügung stellt. Beim Einsatz im Gelenk bestehen besondere Erfordernisse in Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften, weshalb die verwendeten Vliesstoffe wiederum eher geeignet waren, wobei diese Stoffklasse zusätzlich eine einfache Handhabbarkeit und Modifi-

zierung mit Proteinen oder chemischen Substanzen erlaubt [2, 16, 25].

Ein generelles Problem ist die Verträglichkeit der beim Abbau entstehenden Produkte. Da hierauf multiple Parameter wie Temperatur, Hydrophilie, Wasserverfügbarkeit, Umgebungs-pH, Geometrie des Konstruktes, Polymerzusammensetzung und die daraus resultierende Kristallinität und das Molekulargewicht die Dauer der hydrolytischen Spaltung beeinflussen [10], kann die genaue Wirkung oder auch Schädigung prinzipiell immer nur unter genauer Definition der Anwendung erfolgen. Eine pH-Wert-Änderung in einem zellphysiologisch relevanten Bereich konnte in der Zellkultur nicht nachgewiesen werden, was Ergebnissen anderer Arbeiten entspricht [17, 20]. Dies ist bei Vliesstoffen mit einer Porosität von  $>95\%$  auch bei deutlichem Überwiegen der zellulären Komponente im Transplantat unwahrscheinlich. Eine Aussage über kurzzeitige pH-Wert-Änderungen innerhalb des Konstruktes kann allerdings aus den Experimenten nicht abgeleitet werden.

Eine Abnahme des DNA-Gehalts innerhalb der ersten 2 Wochen in den 3D-Konstrukten konnte auch durch Grad et al. [11] in PLDLA-Konstrukten beobachtet werden, die mit bovinen Chondrozyten besiedelt und mit 10% FCS-Zusatz kultiviert wurden. Gleichzeitig konnte durch den MTT-Assay gezeigt werden, dass die Stoffwechselaktivität der Konstruktzellen primär zunahm. Erklärend ist die Besiedelung der Vliese mit einer sehr hohen Zelldichte, wodurch die Proliferation gestoppt und sehr wahrscheinlich die Redifferenzierung mit Matrixbildung in der 3D-Struktur der PGA 91-Vliese induziert

wurde. Hinweisend hierfür ist die Anreicherung von Kollagen Typ II und Proteoglykanen in der extrazellulären Umgebung. Die Anwendung von Fibrin hat sich bereits zum festen Bestandteil der Techniken im „Tissue Engineering“ entwickelt, so wurde auch die Anwendung von Carbohydratmatrices und Fibrin als Komposittransplantat bereits gezeigt [13, 23].

Untersuchungen zur Auswirkung auf die Zelldifferenzierung liegen bisher nur in begrenztem Umfang vor, allerdings wurde bereits auf die bessere Volumstabilität der Konstrukte hingewiesen [14]. Die orientierende histologische Untersuchung einschließlich der Immunfärbung für Kollagen Typ II zeigte keine wesentlichen Unterschiede. So waren die Zellen in beiden Konstrukten gleichmäßig verteilt, die chondrogenen Marker ließen sich qualitativ gut nachweisen. Erst die quantitative Analyse auf mRNA und Proteiniveau konnte Differenzen aufzeigen. Sowohl der geringere Aggrekangehalt als auch die verminderte Typ-II-Kollagen-mRNA-Expression in den Fibrinkompositkonstrukten lassen auf eine verminderte Fähigkeit zur Redifferenzierung der Zellen bei Kombination von Fibrin mit PGA schließen. Dieser Effekt scheint abhängig vom gewählten experimentellen Aufbau zu sein, da bei der Kombination von Fibrin mit Kollagen eine Verstärkung der Typ-II-Kollagen-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte [21]. Hierbei sind offensichtlich weitere Faktoren neben der verwendeten Matrix wie die Besiedlungsdichte, die Zellpassage, das Expansionsmedium, welches in den dargestellten Experimenten serumfrei gewählt

wurde, und die Herkunft der verwendeten Fibrinkomponente von Bedeutung.

Die Differenzen der Aggregatkonzentrationen in den Überständen könnte partiell durch eine vermehrte Absorption am Fibringerüst erklärt werden, demgegenüber steht allerdings die geringere mRNA-Expression von Aggrecan in den Fibrinkonstrukten. Aufgrund der guten adhäsiven Eigenschaften des PGA 91 kommt es zur Immobilisierung einer gleich starken Zellfraktion in den reinen Polycarbonattransplantaten wie in den Kompositkonstrukten, worauf die Ergebnisse des MTT-Assays, der DNA-Gehalt und durchgeführte Adhäsionsassays [32] hinweisen. Somit scheint die Zugabe von der zusätzlichen Fibrinkomponente keine wesentlichen Vorteile zu bieten und ist zumindest bei der untersuchten experimentellen Anordnung und Knorpel-Transplantat-Generierung entbehrlich.

### Fazit für die Praxis

**Die klinischen Fortschritte beim Knorpelersatz zeigen, dass die Techniken bereits das Stadium des „proof of principle“ verlassen haben und inzwischen sogar Langzeitstudien mit einem Follow-up bis 3 Jahren vorliegen [6]. Für den endgültigen Erfolg dieses Verfahrens ist jedoch eine weitere Feinabstimmung zwischen den einzelnen Komponenten des Knorpeltransplantats notwendig, dies betrifft insbesondere die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Matrix. Knorpelkonstrukte auf der Basis von Vliesstoffen sind aus zellbiologischer Sicht zum Einsatz für die matrixassoziierte Chondrozytenimplantation geeignet. Allerdings scheint die zusätzliche Fibrinkomponente in Kombination mit PGA einen negativen Effekt auf die chondrogene Differenzierung auszuüben.**

### Korrespondenzadresse

**Dr. H. Schmal**

Department für Orthopädie und Traumatologie,  
Universitätsklinik Freiburg  
Hugstetter Straße 55, 79106 Freiburg i. Br.  
hagen.schmal@freenet.de

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

### Literatur

- Andree C, Voigt M, Wenger A et al. (2001) Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system. *Tissue Eng* 7: 757–766
- Banu N, Banu Y, Sakai M et al. (2005) Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes. *J Artif Organs* 8: 184–191
- Brandstedt S, Olson PS, Ahonen J (1980) Effect of defibrinogenation on collagen synthesis in granulation tissue. A study in the rabbit. *Acta Chir Scand* 146: 551–553
- Brandstedt S, Rank F, Olson PS (1980) Wound healing and formation of granulation tissue in normal and defibrinogenated rabbits. An experimental model and histological study. *Eur Surg Res* 12: 12–21
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895
- Clar C, Cummins E, McIntyre L et al. (2005) Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 9: 1–82
- Dauner M (2002) Eigenschaften von Spinnfaservliesstoffen für das Tissue Engineering. *Vliesstoffe & Technische Textilien* 2: 45–48
- Endres M, Neumann K, Schroder SE et al. (2007) Human polymer-based cartilage grafts for the regeneration of articular cartilage defects. *Tissue Cell* 39: 293–301
- Enomoto K, Ajioka M, Yamaguchi A (1994) Polymer Communication. US Patent 5.310.865
- Gerlach KL (2000) Resorbable polymers as osteosynthesis material. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4(Suppl 1): 91–102
- Grad S, Zhou L, Gogolewski S, Alini M (2003) Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 66: 571–579
- Haisch A, Groger A, Radke C et al. (2000) Protection of autogenous cartilage transplants from resorption using membrane encapsulation. *HNO* 48: 119–124
- Haisch A, Schultz O, Perka C et al. (1996) Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carriers. *HNO* 44: 624–629
- Hokugo A, Takamoto T, Tabata Y (2006) Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials* 27: 61–67
- Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 432–463
- Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC et al. (2007) Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56: 177–187
- Kang SW, Yoon JR, Lee JS et al. (2006) The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed* 17: 925–939
- Kawabe N, Yoshino M (1991) The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop* 268: 279–293
- Lunt J (1998) Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polym Degrad Stab* 59: 145–152
- Mahmoudifar N, Doran PM (2006) Effect of seeding and bioreactor culture conditions on the development of human tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 12: 1675–1685
- Malicev E, Radosavljevic D, Velikonja NK (2007) Fibrin gel improved the spatial uniformity and phenotype of human chondrocytes seeded on collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 96: 364–370
- Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC et al. (2007) Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Ther* 9: 41
- Perka C, Schultz O, Sittlinger M, Zippel H (2000) Chondrocyte transplantation in PGLA/polydioxanone fleece. *Orthopäde* 29: 112–119
- Reijman M, Hazes JM, Koes BW et al. (2004) Validity, reliability, and applicability of seven definitions of hip osteoarthritis used in epidemiological studies: a systematic appraisal. *Ann Rheum Dis* 63: 226–232
- Ryu W, Min SW, Hamrick KE et al. (2007) The construction of three-dimensional micro-fluidic scaffolds of biodegradable polymers by solvent vapor based bonding of micro-molded layers. *Biomaterials* 28: 1174–1184
- Schmal H, Zwingmann J, Fehrenbach M et al. (2007) bFGF influences human articular chondrocyte differentiation. *Cytotherapy* 9: 184–193
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75: 532–553
- Sittlinger M, Reitzel D, Dauner M et al. (1996) Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 33: 57–63
- Hinsbergh VW van, Collen A, Koolwijk P (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann NY Acad Sci* 936: 426–437
- Susante JL van, Buma P, Homminga GN et al. (1998) Chondrocyte-seeded hydroxyapatite for repair of large articular cartilage defects. A pilot study in the goat. *Biomaterials* 19: 2367–2374
- Whatley JS, DeJardin LM, Arnoczky SP (2000) The effect of an exogenous fibrin clot on the regeneration of the triangular fibrocartilage complex: an in vivo experimental study in dogs. *Arthroscopy* 16: 127–136
- Zwingmann J, Mehlhorn AT, Südkamp NP et al. (2007) Chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes differs in biodegradable PGA/PLA-scaffolds. *Tissue Eng* 13(9): 2335–2343