



**TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DRESDEN**



*Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen*

**„Osteochondrales Tissue Engineering mit einem anisotropen Scaffold: ein bio-mimetisches Konzept zur beschleunigten Defektheilung“**

---

**- Abschlussbericht -**

# **1 Allgemeine Informationen**

## **1.1 Antragsteller**

Antragsteller 1 und Projektleiter:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Leiter des Zentrums für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung

Technische Universität Dresden und Universitätsklinikum Dresden

E-Mail: michael.gelinsky@tu-dresden.de

Tel.: (0351) 458 6695

Antragsteller 2 und Projektbearbeiter:

Dipl.-Ing. Kathleen Schütz

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung

Technische Universität Dresden und Universitätsklinikum Dresden

## **1.2 Förderzeitraum**

Aufgrund von Mutterschutz und Elternzeit der Projektbearbeiterin Kathleen Schütz unterteilt sich der Förderzeitraum in 2 Abschnitte:

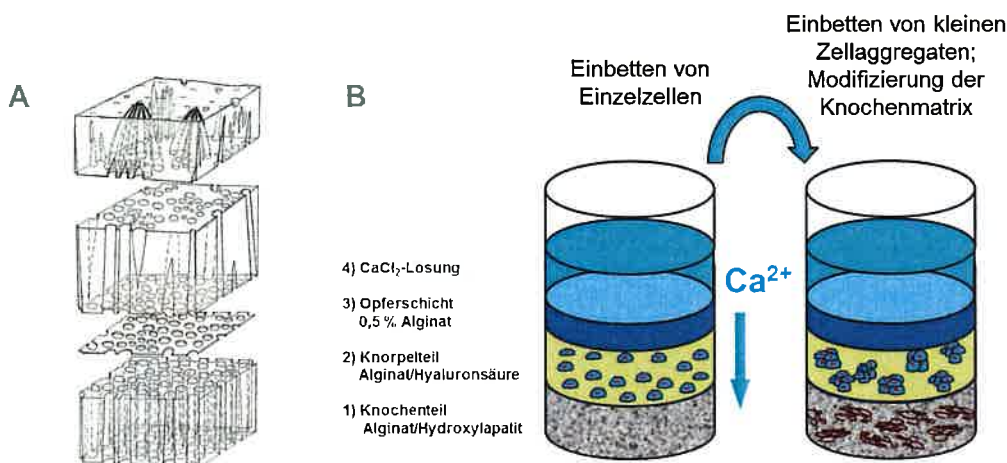
1. 4. 2015 - 10. 12. 2015

und

1. 1. 2017 - 2. 12. 2017

## 2 Zielstellung des Projektes / Ausgangssituation

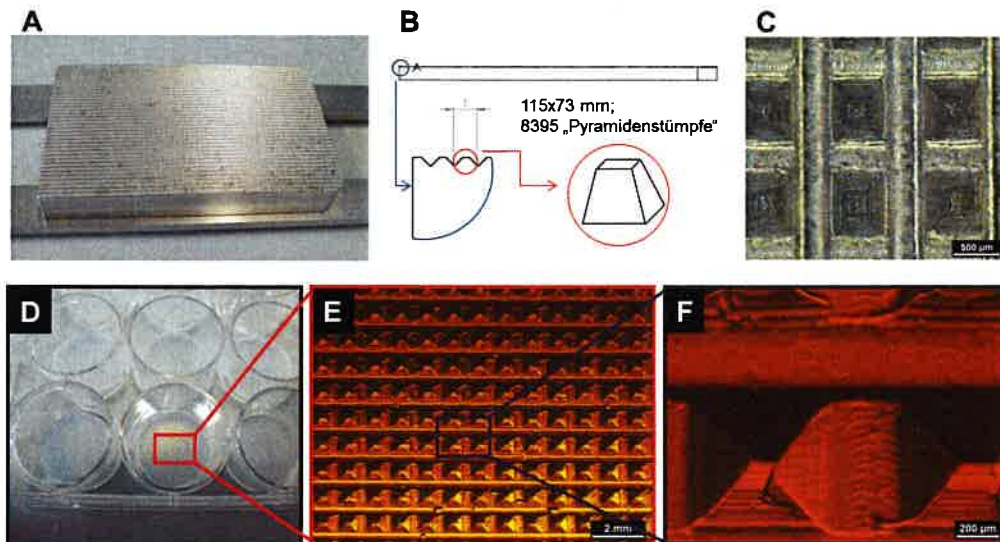
Derzeitige Therapieansätze zur Heilung von Knochen-Knorpel-Defekten führen bisher aus verschiedensten Gründen nicht zu einer tatsächlichen Regeneration von Knochen-Knorpel-Gewebe. Biphaseige Scaffolds sind attraktive Kandidaten, wenn es um die Suche nach einer Alternative zu bisherigen Methoden zur Regeneration von Knochen-Knorpel-Gewebe geht, da so auf die unterschiedlichen mechanischen, strukturellen und chemischen Eigenschaften der beschädigten Gewebetypen eingegangen wird. In der Arbeitsgruppe wurden biphaseige Scaffolds entwickelt, die im Knorpelteil aus Alginat und Hyaluronsäure und im mineralisierten Knochen teil aus Alginat und Hydroxylapatit bestehen. Diese Scaffolds wurden bereits soweit optimiert, dass eine Einbettung von Zellen in den Knorpelteil während der Herstellung möglich ist. Die eingebetteten Zellen können sich so aktiv an der Regeneration des beschädigten Gewebes beteiligen. Für die Herstellung der Scaffolds wurde das Prinzip der gerichteten ionotropen Gelbildung angewendet, was zur Ausbildung von Kanalporen führt, die sich über die gesamte Länge des Scaffolds erstrecken (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Ionotrope Gelbildung zur Herstellung biphasier Scaffolds mit Kanalporen. A) Prinzip der Gelbildung. B) Schematische Darstellung des Projektzieles: Einbettung von Zellaggregaten anstelle von Einzelzellen in den Knorpelteil der biphasischen Scaffolds zur Steigerung der Matrixsynthese und Modifikation des Knochen teils zur Förderung der Zelladhäsion.**

Diese Kanalporen eignen sich zum einen sehr gut für die Versorgung der im Knorpelteil eingebetteten Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zum anderen sind die Kanalporen auch eine günstige Leitstruktur für ein Einwachsen von Blutgefäßen und die Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark, was vor allem für eine Regeneration des Knochen teils von Bedeutung ist. Bisher wurden in den Knorpelteil Zellen als Einzelzellen eingebettet. Im nativen Knorpelgewebe liegen Zellen jedoch nicht als einzelne Zellen vor, sondern sind als sogenannte Chondronen, einem Verband aus ca. 10 eingekapselten Zellen, angeordnet. Eine Nachahmung dieser natürlichen Anordnung von Zellen in einer Matrix ist ein vielversprechender Ansatz, die oft geringe Synthese von extrazellulärer Knorpelmatrix zu steigern. Entsprechende Untersuchungen zur Steigerung der Matrixsynthese erfordern jedoch eine geeignete Methode, mit der die Generierung einer großen Menge kleiner Zellaggregate, bestehend aus 10 bis wenigen 100 Zellen, möglich ist. Herkömmliche Methoden zur Herstellung von üblicherweise eher größeren Zellaggregaten, darunter beispielsweise die Kultivierung von Zellen in Suspensionskulturplatten, in denen die Zellen nicht an der Zellkulturplastik ad-

härieren, sondern sich zu Aggregaten zusammenlagern, oder auch die Methode der hängenden Tropfen, eignen sich nicht zur Generierung einer großen Menge an kleinen Zellaggregaten, wie sie für eine adäquate Untersuchung jedoch nötig ist.



**Abbildung 2: Erzeugung kleiner Kavitäten (Microwells) in Agarosegelen mit Hilfe eines Edelstahlstempels. Der Stempel besteht aus vielen kleinen Pyramidenstümpfen, welche in Agarose abgeformt werden und so im Agarosegel kleine Vertiefungen, Microwells, erzeugen. A) Edelstahlstempel; B) Technische Details der Stempelgeometrie; C) Nahaufnahme der Pyramidenstümpfe des Stempels; D) Agarose-Inserts mit Microwells; E) Vergrößerte Aufnahme der Inserts; F) Nahaufnahme von Agarose-Microwells.**

Mit einem Edelstahlstempels (Abbildung 2 A-C), bestehend aus vielen kleinen Pyramidenstümpfen, konnten in Vorversuchen bereits Agarose-Einsätze (Inserts) für Zellkulturplatten (Abbildung 2 D) mit kleinen Kavitäten (Microwells) (Abbildung 2 E,F) hergestellt werden, in denen sich Zellen zu kleinen Zellaggregaten zusammenlagern. Ziel des Projektes war es zunächst, die bestehende Methode soweit zu optimieren bzw. weiterzuentwickeln, dass eine reproduzierbare Herstellung kleiner Zellaggregate möglich ist. Zellaggregate mit unterschiedlicher Zellzahl sollten mit der Methode generiert und hinsichtlich ihrer Größenverteilung bewertet werden. Ein wichtiges Kriterium für die anschließende Auswahl einer geeigneten Größe von Zellaggregaten für die Einbettung ist eine homogene Verteilung im Knorpelteil der biphasigen Scaffolds. Nach dieser Auswahl sollte das chondrogene Potential der eingebetteten Zellaggregate untersucht werden mit dem Ziel, die Matrixsynthese durch die Nachahmung der natürlichen Situation im Knorpelgewebe zu steigern, wenn Zellaggregate anstelle von Einzelzellen eingebettet werden.

Auch der Knochenteil sollte in diesem Projekt weiterentwickelt werden. Die vorhandenen Kanalporen sind ein ideales Leitsystem für die Einwanderung von Stammzellen aus dem Knochenmark, jedoch erlaubte die Oberfläche der bisherigen Scaffolds keine Adhäsion von Zellen, wie sie für die Regeneration eines Defektes im Knochenbereich von Vorteil wäre. Ziel des Projektes war es daher, die Zusammensetzung des Knochenteils bzw. die Oberfläche so zu modifizieren, dass Zellen an der Matrix zunächst adhären und schließlich auch proliferieren und differenzieren. Dabei war es jedoch wichtig, dass durch die Modifikation die Porenbildung nicht gehemmt wird und die mechanische Festigkeit nicht beeinträchtigt wird.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Reproduzierbare Herstellung von kleinen Zellaggregaten

Agarose-Inserts mit Microwells wurden mit Hilfe eines Edelstahlstempels, bestehend aus vielen kleinen Pyramidenstümpfen, hergestellt. Die Abformung des Stempels zur Erzeugung von Agarose-Inserts mit Microwells kann auf verschiedene Weise erfolgen. Es wurden folgende Varianten untersucht (siehe Abbildung 3):

- A) Auf den Stempel wurde eine Schablone mit entsprechenden Aussparungen platziert und diese anschließend mit Agarose ausgegossen. So entstanden scheibenförmige Inserts mit 22 mm Durchmesser, passend für 12-well-Zellkulturplatten.  
Varianten: 2 % Agarose, 3 % Agarose
- B) Agarose wurde in eine Gießform gegossen und der Stempel dann hineingedrückt, wobei eine Folie aus Silikon als Abstandhalter zwischen Stempel und Boden diente. Aus dem Gel wurden mit einem Stanzeisen 22 mm Inserts ausgestanzt.
- C) Als dritte Variante wurde der Stempel mit Aluminiumfolie abgedichtet und die Agaroselösung auf den Stempel gegossen. Anschließend wurden 22 mm Inserts mit einem entsprechenden Stanzeisen ausgestanzt.  
Varianten: 13 ml und 20 ml Agarose Gesamtvolumen.

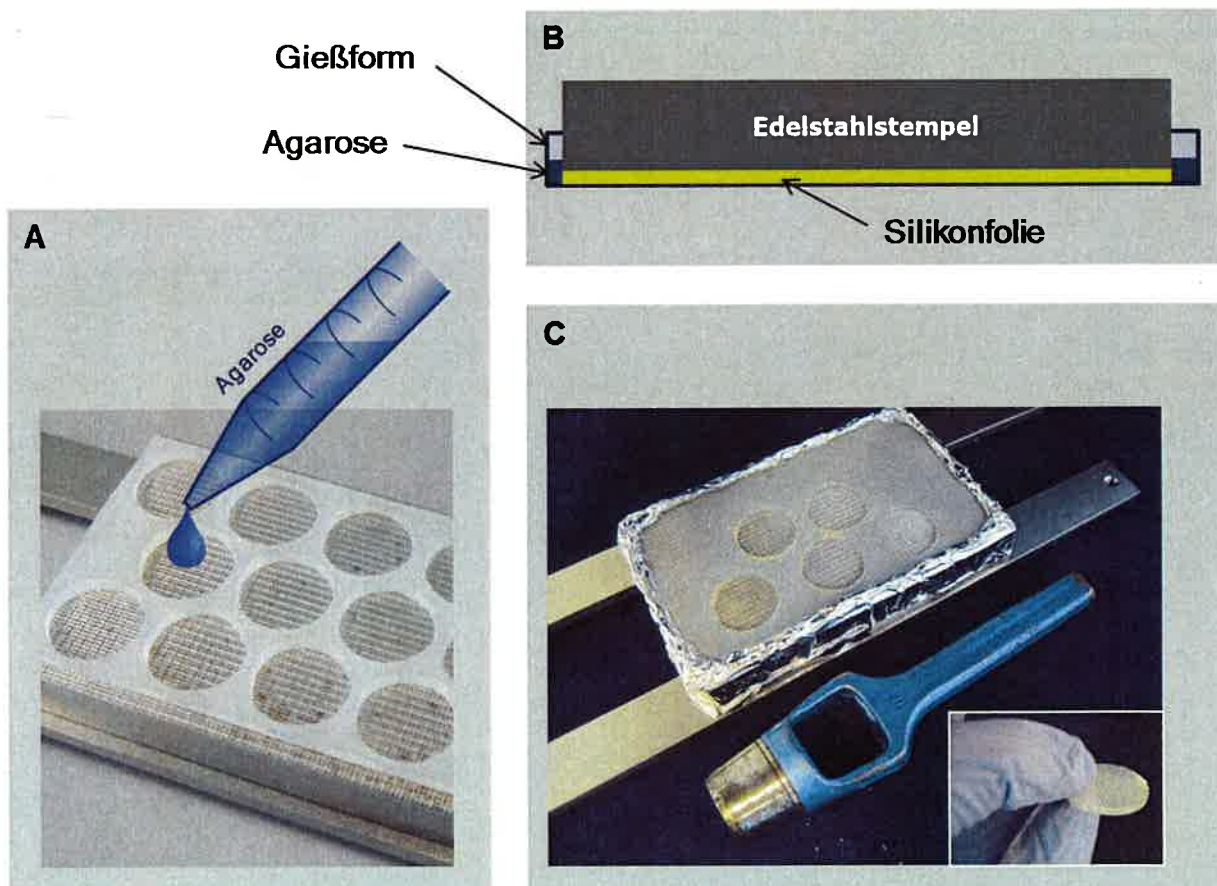
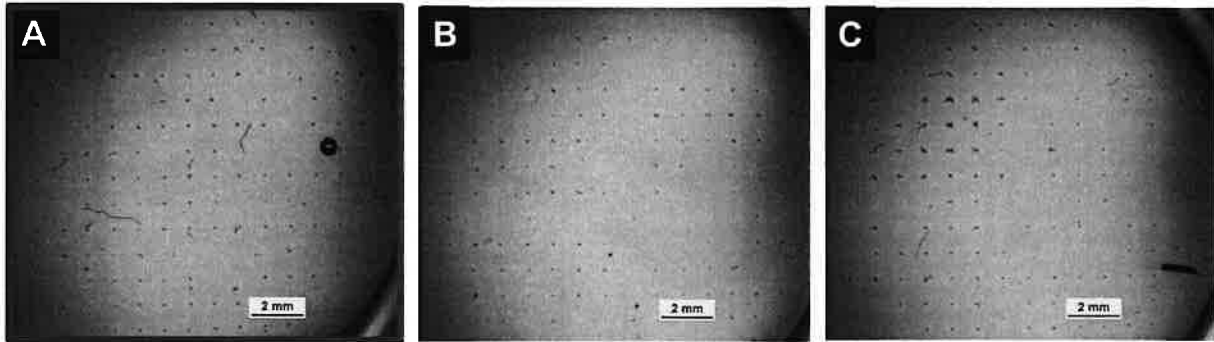
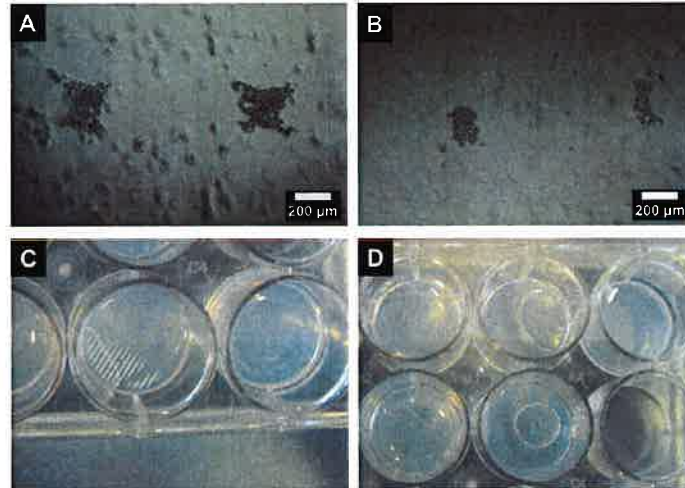


Abbildung 3: Herstellung von Agarose-Inserts mit Microwells mittels verschiedener Methoden: A) Gießen der Agarose in eine Schablone; B) Agarose in Gießform gießen und Stempel hineindrücken, Ausstanzen der Inserts mit Stanzeisen; C) Abdichten des Stempels, Agarose auf Stempel gießen und Ausstanzen der Inserts mit einem Stanzeisen.

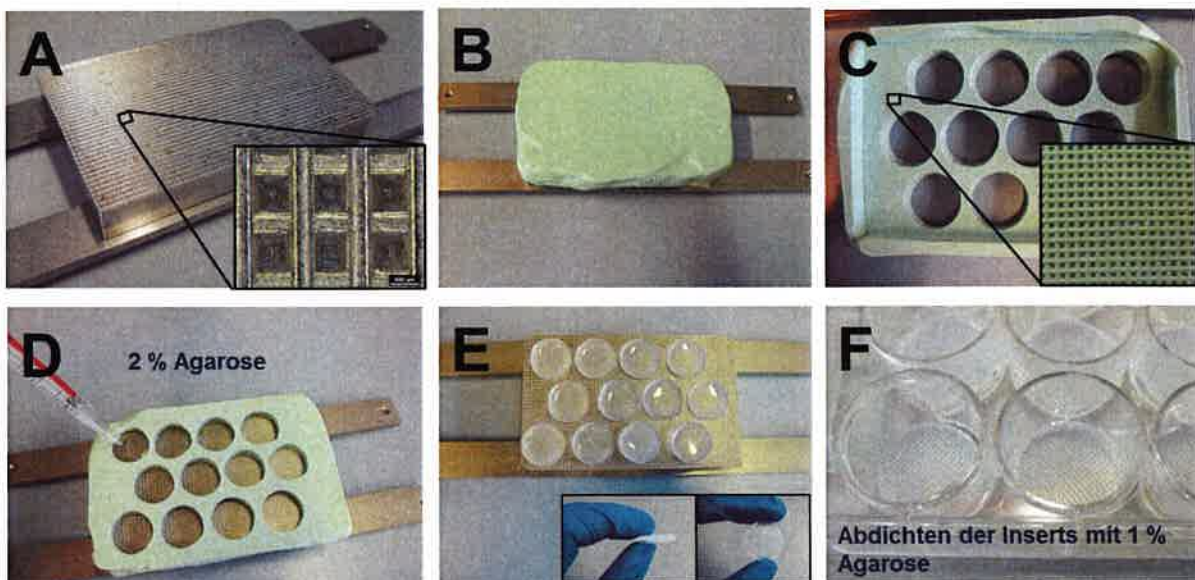


**Abbildung 4: Bildung von Zellaggregaten nach Erzeugung von Agarose-Inserts mit verschiedenen Varianten: A) Gießen der Agarose in eine Schablone; B) Agarose in Gießform gießen und Stempel hineindrücken, Ausstanzen der Inserts mit Stanzeisen; C) Abdichten des Stempels, Agarose auf Stempel gießen und Ausstanzen der Inserts mit einem Stanzeisen.**

Nachdem die Inserts in die 12-well-Platten platziert wurden, wurde der Spalt zwischen Insert und Wandung mit einer 1 %igen Agaroselösung abgedichtet. Es wurde anschließend eine Zellsuspension zugegeben und die Platten wurden zentrifugiert, um die Zellen gleichmäßig in den Kavitäten zu verteilen. Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und anschließend wurde die Bildung von Zellaggregaten mikroskopisch bewertet. Es zeigte sich, dass Variante A die gleichmäßigste Bildung von Zellaggregaten in den Inserts lieferte (Abbildung 4A). Ein Unterschied in der Verwendung von 2 % und 3 % Agarose war dabei nicht zu beobachten. Bei den Varianten B und C war zu beobachten, dass die Zellaggregate nicht in den Microwells verbleiben, sondern sich vor allem in der Mitte der Agarose-Inserts zusammenlagern (Abbildung 4 B, C), was dazu führen kann, dass mehrere kleine Aggregate zu größeren Aggregaten zusammenwachsen. Allerdings zeigten sich auch bei Variante A noch Probleme bei der Herstellung (Abbildung 5). Eine vollständige Verteilung der Zellen auf die Kavitäten war nicht immer gegeben. Auch nach Zentrifugation waren oft Zellen außerhalb der Kavitäten zu sehen (Abbildung 5 A, B). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass unter einigen Inserts aufgrund der herstellungsbedingten Form der Inserts (plankonkav) Luftblasen waren und durch eine unzureichende Abdichtung mit der Silikonfolie die Agarose zum Teil aus den Vertiefungen herausgelaufen ist und die Dicke der Inserts somit teilweise nicht konsistent war. So kam es auch bei Variante A, wenn auch in weitaus geringerem Maße als bei Variante B und C, zur Zusammenlagerung von Zellaggregaten. Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, eine perfekte Abdichtung der Schablone zu realisieren und so ein Auslaufen der Agarose zu vermeiden. Letztendlich konnte mit einer Silikonabdruckmasse aus dem zahnmedizinischen Bereich eine Schablone erstellt werden, die aufgrund ihrer exakten Anpassung an den Edelstahlstempel ein Auslaufen verhindert (Abbildung 6). Zur Herstellung dieser Schablone wurde die Silikonmasse zunächst gleichmäßig auf den Stempel aufgebracht. Nach dem Aushärten wurden in die Schablone Aussparungen entsprechend der Abmessungen der 12-well-Platte mit einem Stanzeisen gestanzt.



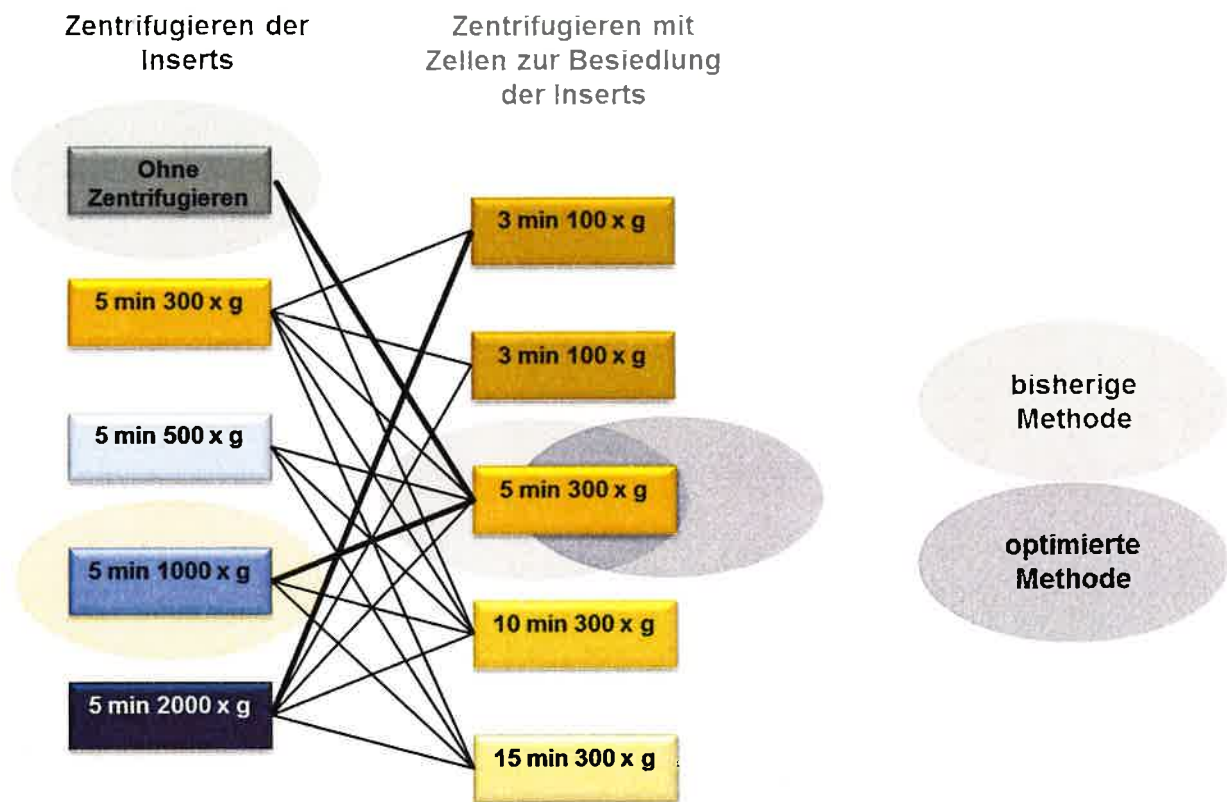
**Abbildung 5:** Weiterhin bestehende Probleme bei der Bildung von Zellaggregaten mit Methode A) und B) nicht alle Zellen befinden sich in den Microwells; C) Dicke der Agarose-Inserts ist nicht konsistent; D) Luftblasen unterhalb der Inserts



**Abbildung 6:** von Agarose-Inserts mit verbesserter Abdichtung der Schablone durch Verwendung einer zahnmedizinischen Silikonabdruckmasse: A) Edelstahlstempel; B) Edelstahlstempel mit Silikonabdruckmasse; C) Silikonabdruck als perfekter Negativabdruck des Stempels mit Aussparungen für die Agarose-Inserts; D) Befüllen der Aussparungen mit Agarose; E) Agarose-Inserts nach Entfernung der Schablone; F) Abdichten der Agarose-Inserts mit 1 %iger Agaroselösung.

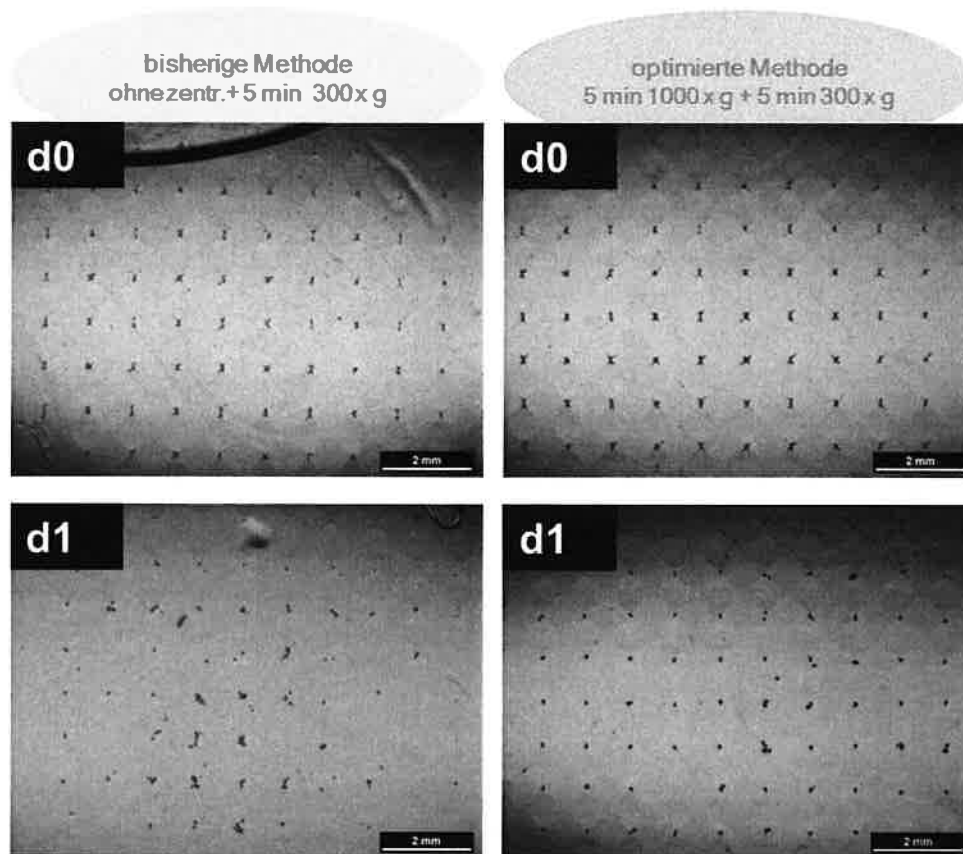
Die mit der neuen Schablone hergestellten Inserts zeichneten sich durch eine konsistente Dicke aus, allerdings befanden sich noch immer teilweise Luftblasen unter den Inserts. Dies wirkte sich zunächst zwar kaum störend auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Microwells aus, jedoch erwies es sich als problematisch bei der Kultivierung. Es wurde nach 24 h auch hier eine Zusammenlagerung der Zellaggregate in bestimmten Bereichen beobachtet. Daher sollte versucht werden, die störenden Luftblasen durch Zentrifugation der Inserts noch vor der Zellbesiedlung, zu entfernen. Weiterhin wurden auch die Geschwindig-

keiten und Zeiten für die Zentrifugation zur Besiedlung der Inserts variiert, um eine für die Zellen möglichst schonende, aber effiziente und gleichmäßige Besiedlung der Microwells zu realisieren. Bei der Auswahl der verschiedenen Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten wurde sich zunächst an einem Protokoll für die Besiedlung kommerziell erhältlicher PDMS Inserts (Aggrewell™) orientiert (5 min 2000 x g + 3 min 100 x g). Da die Inserts jedoch aus Agarose und nicht aus PDMS bestehen, wurden auch geringere Zentrifugationsgeschwindigkeiten, als in diesem Protokoll aufgeführt, untersucht, da zu hohe Geschwindigkeiten möglicherweise die Agarose-Inserts beschädigen könnten. Abbildung 7 veranschaulicht die verschiedenen Kombinationen der Vorbehandlung und Besiedlung der Inserts. Es wurden insgesamt 18 verschiedene Kombinationen der Zentrifugation zur Vorbehandlung und Zellbesiedlung getestet. Die beste Methode wurde anhand mikroskopischer Bilder zum Schluss ausgewählt. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Unterschiede der Behandlungen nach i) bisheriger Methode und ii) nach optimierter Methode.



**Abbildung 7: getestete Kombinationen zur Vorbehandlung und Besiedlung der Inserts mittels verschiedener Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten**

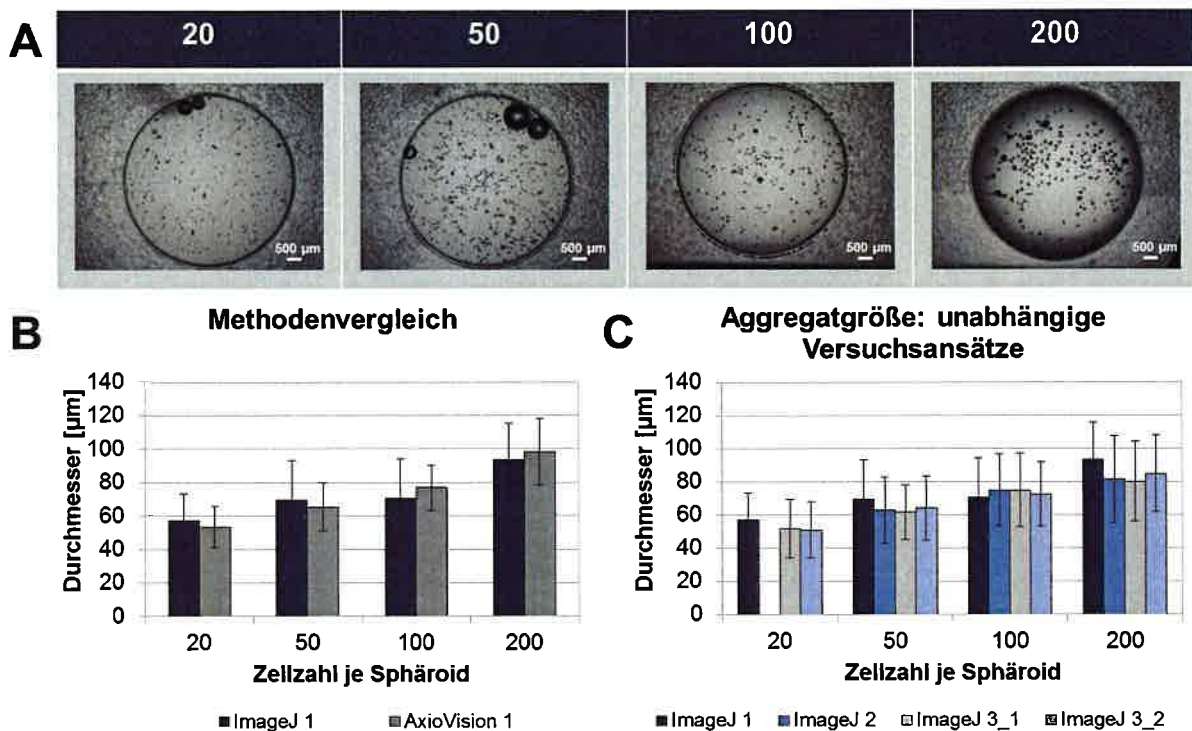




**Abbildung 8: Zellaggregatbildung: Vergleich von bisheriger und optimierter Methode**

Als beste Methode erwies sich eine Zentrifugation bei 1000 x g für 5 min als Vorbehandlung und eine Geschwindigkeit von 300 x g für 5 min zur Besiedlung der Microwells mit Zellen. Direkt nach der Besiedlung der Agarose-Inserts zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Varianten. Nach 24 h Kultivierung war jedoch deutlich erkennbar, dass sich nach Behandlung nach bisheriger Methode Zellaggregate in einigen Bereichen zusammenlagern. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellaggregate nach 24 h Kultivierung war nur bei der optimierten Methode zu beobachten. Mit dieser Methode wurden nun auch Zellaggregate verschiedener Größe (20-200 Zellen je Zellaggregat) hergestellt und hinsichtlich Ihrer Größenverteilung evaluiert. Dazu wurden die Zellaggregate nach 24 h geerntet, in speziellen Objektträgern vereint und es wurden mikroskopische Aufnahmen erstellt (Abbildung 9A). Die Evaluierung der Größe erfolgte anhand der mikroskopischen Aufnahmen im ersten Versuch sowohl manuell mittels AxioVision SE64 Rel. 4.9 ((Carl Zeiss Microscopy, Jena) als auch automatisiert mittels Image J (National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) (Abbildung 9B). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Auswertverfahren festgestellt werden, so dass in zwei weiteren Versuchen nur noch eine automatisierte Auswertung erfolgte (Abbildung 9C). Es zeigte sich, dass die ermittelte Größe der Zellaggregate sowohl innerhalb eines Versuches mit zwei Ansätzen (ImageJ 3\_1 und ImageJ 3\_2) als auch in unabhängigen Versuchen (Image J 1, ImageJ 2, ImageJ 3) sehr ähnlich ist, die Herstellung der Zellaggregate also hinsichtlich der Größe reproduzierbar ist. Mit der „besten Methode“ können somit Zellaggregate einheitlicher Größe hergestellt werden, wobei sich die Größe leicht durch entsprechende Konzentration der Zellsuspension einstellen lässt. In folgenden Versuchen wurde dann untersucht, welche Aggregatgröße sich am besten für die Einbettung in den Knorpelteil der biphasigen Scaffolds eignet. Das wichtigste Auswahlkriteri-

um war dabei eine gleichmäßige Verteilung der Zellaggregate im Knorpelteil. Die Bildung der Zellaggregate wurde mikroskopisch festgehalten und zeigt für alle 4 Aggregatgrößen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen nach der Besiedlung der Inserts und auch eine gleichmäßige Bildung von Zellaggregaten (Abbildung 10: d0, d1). Nach der Einbettung in den Knorpelteil biphasiger Scaffolds erfolgte eine MTT-Färbung der Zellaggregate und anschließende mikroskopische Analyse. Zellaggregate bestehend aus je 20 bzw. 50 Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung im Scaffold (Abbildung 10 biphasig). Bei Einbettung größerer Zellaggregate (100 bzw. 200 Zellen je Zellaggregat) war keine gleichmäßige Verteilung im Knorpelteil zu realisieren, außerdem es sinken auch viele Zellaggregate aufgrund der Schwerkraft während der Gelbildung in den Knochenteil ab und erfüllen damit nicht die geforderten Bedingungen. Für folgende Versuche zur Untersuchung des chondrogenen Potentials der Zellaggregate ist eine hohe Zellzahl und folglich auch eine hohe Anzahl an Zellaggregaten nötig, um ausreichende Messsignale zu erhalten. Daher wurden hier aufgrund der einfacheren Handhabung Zellaggregate mit je 50 Zellen verwendet.



**Abbildung 9: Größenbestimmung der Zellaggregate bestehend aus 20, 50, 100 und 200 Zellen je Aggregat. A) mikroskopische Aufnahme gesammelter Zellaggregate für die anschließende Größenbestimmung per Bildanalyse; B) vergleich von manueller (AxioVision) und automatisierter (Image J) Bildauswertung; C) Bestimmung der Zellaggregatgröße mit automatisierter Bildauswertung von verschiedenen Versuchsansätzen.**

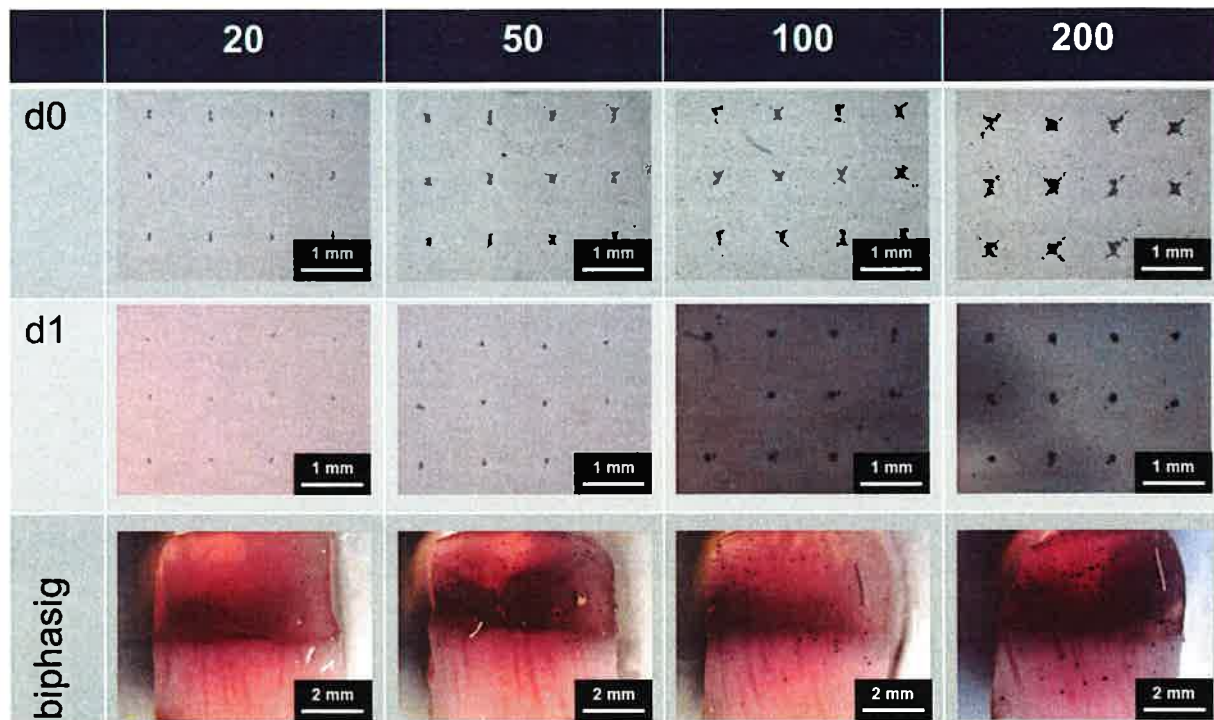


Abbildung 10: Mikroskopische Dokumentation der Besiedlung der Microwells (d0) und Bildung von Zellaggregaten unterschiedlicher Größe im Zeitraum von 24 h (d1). Nach 24 h wurden die Zellaggregate geerntet und in den Knorpelteil biphasiger Scaffolds eingebettet. Beurteilung der Verteilung im Scaffold nach MTT-Färbung der eingebetteten Zellaggregate.

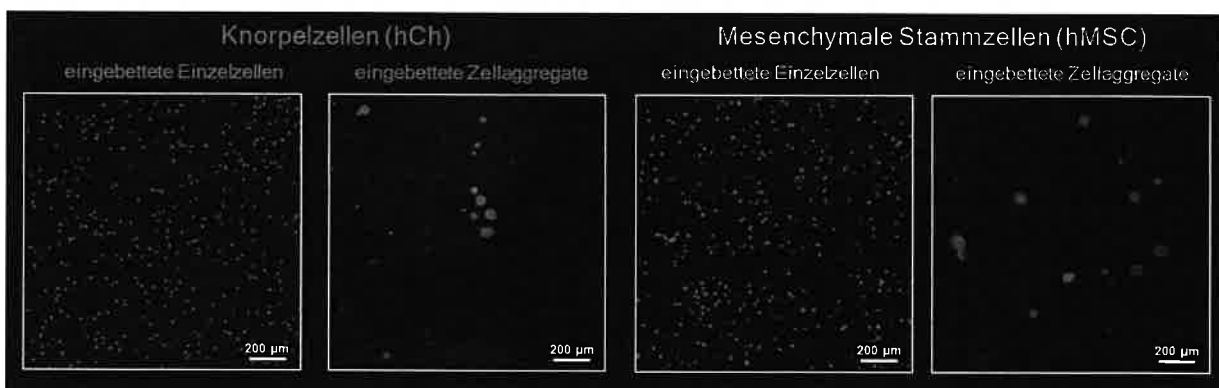
### 3.2 Chondrogenes Potential von eingebetteten Zellaggregaten

Für die Regeneration von Knorpelgewebe eignen sich zum einen Knorpelzellen (humane Chondrozyten; hCh) und zum anderen auch mesenchymale Stammzellen, welche *in vitro* zu Knorpelzellen differenziert werden können. Knorpelzellen sind hinsichtlich der Gewinnung einer für die Transplantation ausreichenden Menge an Zellen problematisch, da während der Expansion der Zellen oft eine Dedifferenzierung, Verlust des ausdifferenzierten Zelltyps und Rückentwicklung zu Vorläuferzellen, stattfindet. Zusätzlich ist die Gewinnung von Knorpelzellen immer mit der Erzeugung eines zusätzlichen Defektes verbunden. Mesenchymale Stammzellen können hingegen vergleichsweise einfach durch eine Knochenmarkspunktion gewonnen und anschließend vermehrt werden. Allerdings wird durch Knorpelzellen im Vergleich zu chondrogen differenzierten MSC oft eine größere Menge extrazellulärer Matrix synthetisiert. Daher wurde in folgenden Versuchen sowohl das chondrogene Potential von eingebetteten Zellaggregaten aus Knorpelzellen als auch von mesenchymalen Stammzellen (hMSC) untersucht. Die Zellen wurden zunächst *in vitro* expandiert und anschließend wurden von beiden Zelltypen Zellaggregate entsprechend der zuvor beschriebenen optimalen Methode mit 50 Zellen/Aggregat hergestellt, gesammelt und anschließend in den Knorpelteil biphasiger Scaffolds eingebettet. Um das chondrogene Potential der Zellaggregate zu beurteilen, wurden zum Vergleich von beiden Zelltypen auch Proben mit eingebetteten Einzelzellen hergestellt. Nach der Einbettung wurden die zellbeladenen Scaffolds entweder ohne (c-) oder mit (c+) chondrogenen Supplementen für 3 Wochen kultiviert, um eine (Re)Differenzierung der eingebetteten Zellen zu Knorpelzellen zu bewirken.

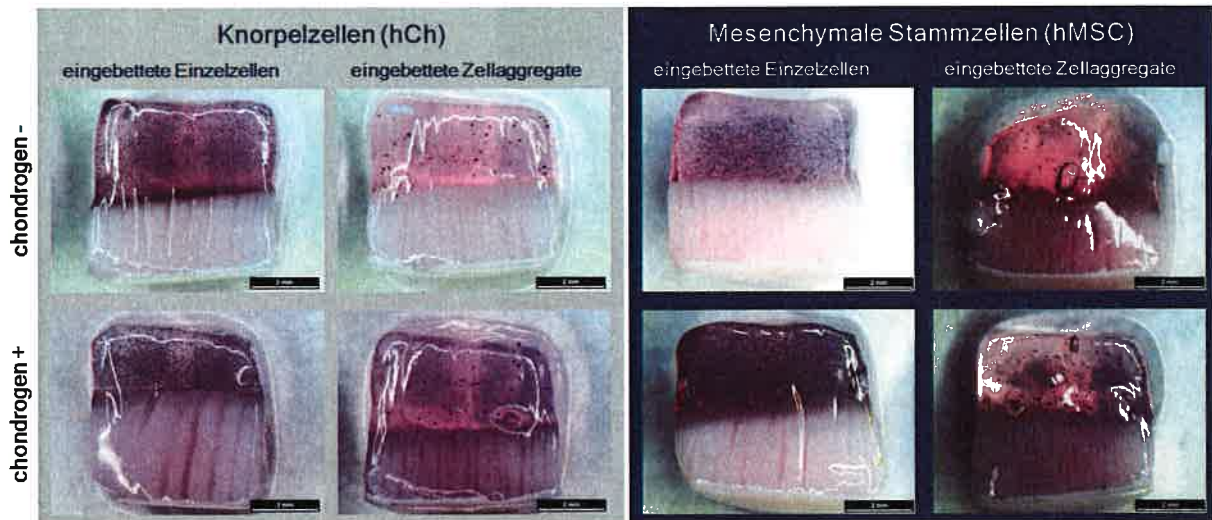
Es erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Vitalität der Zellen mittels Leben-Tot-Färbung (Abbildung 11) sowie mittels MTT-Färbung (Abbildung 12). Zur Evaluierung der chondrogenen Differenzierung der eingebetteten Zellaggregate bzw. Einzelzellen wurde die Expression relevanter Gene untersucht. Die Expression von Kollagen Typ II wurde zusätzlich auf Proteinebene mittels ELISA, einem antikörperbasierten Nachweisverfahren, untersucht. Die Expression von Aggrecan, ein Proteoglykan, welches ca. 10 % des Knorpelgewichtes ausmacht, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

Abbildung 11 zeigt eine Lebend-Tot-Färbung von Knorpelzellen bzw. mesenchymalen Stammzellen nach 4 Tagen Kultivierung ohne chondrogene Supplemente. Es ist zu erkennen, dass der Großteil der eingebetteten Einzelzellen eine Grünfärbung aufweist, also vital ist. Nur ein geringer Teil der Zellen weist eine Rotfärbung auf, die auf tote Zellen schließen lässt. Der Anteil an toten Zellen ist jedoch bei eingebetteten Stammzellen im Vergleich zu Knorpelzellen höher. Bei eingebetteten Zellaggregaten aus Knorpelzellen sind keine toten Zellen erkennbar. Alle Zellaggregate erscheinen grün, was auf eine hohe Vitalität schließen lässt. Bei den Zellaggregaten aus mesenchymalen Stammzellen sind in einigen Zellaggregaten auch wenige tote Zellen erkennbar.

Eine insgesamt hohe Vitalität ist auch am Tag 21 der Kultivierung anhand der MTT-Färbung (Abbildung 12) erkennbar. Es zeigte sich außerdem eine homogene Verteilung sowohl von den Einzelzellen als auch von den Zellaggregaten im Scaffold. Jedoch wurde festgestellt, dass die Intensität der Blaufärbung und auch die Anzahl der blau gefärbten Zellaggregate bei mesenchymalen Stammzellen, welche ohne chondrogene Supplemente kultiviert wurden, geringer ist als bei den anderen Varianten (hCh c- und c+; hMSC c+). Ein positiver Effekt der chondrogenen Differenzierung auf die Vitalität von eingebetteten Zellen konnte auch schon in früheren Untersuchungen für mesenchymale Stammzellen festgestellt werden [1]. Für die eingebetteten Einzelzellen sind nach MTT-Färbung mikroskopisch keine Unterschiede feststellbar.



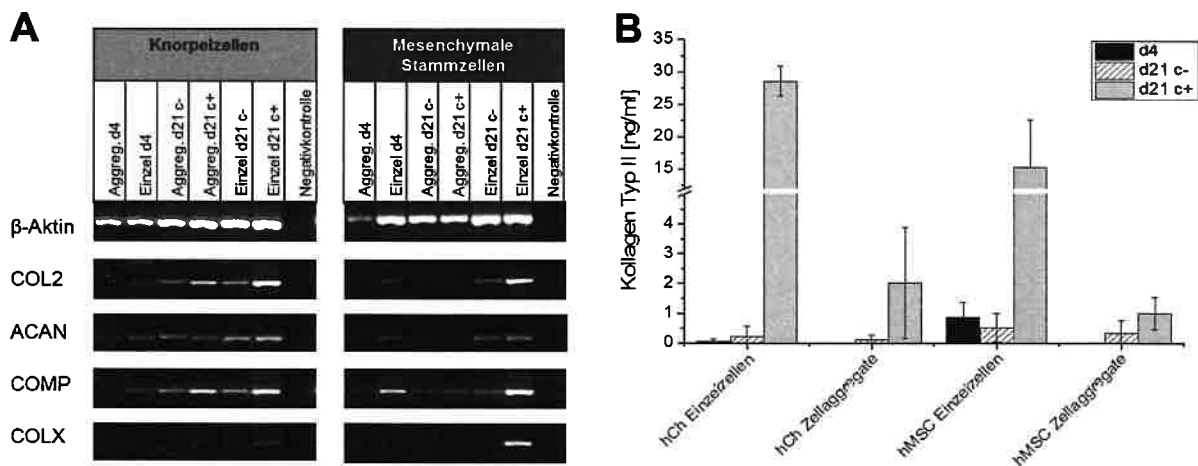
**Abbildung 11: Lebend-Tot-Färbung (Tag 4 der Kultivierung) von in biphasigen Scaffolds eingebetteten Einzelzellen und Zellaggregaten. Ein Vergleich zwischen Knorpelzellen und Mesenchymalen Stammzellen. Lebende Zellen sind in grün dargestellt, tote Zellen in rot.**



**Abbildung 12: MTT-Färbung (Tag 21) zur Visualisierung der Vitalität und Verteilung der eingebetteten Einzelzellen und Zellaggregate im Scaffold. Ein Vergleich zwischen Knorpelzellen und mesenchymalen Stammzellen, die ohne (chondrogen -) und mit (chondrogen +) chondrogenen Supplementen kultiviert wurden (Maßstabsbalken entspricht 2 mm).**

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sowie die Ergebnisse für die Expression von Kollagen Typ II, dem Hauptbestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix, auf Proteinebene. Zur Analyse der Expression der für die chondrogene Differenzierung relevanten Gene musste zunächst RNA aus den Proben isoliert werden. Für die Isolierung von RNA aus eingebetteten Einzelzellen existierte bereits ein Protokoll in der Arbeitsgruppe. Die Isolierung von RNA aus eingebetteten Zellaggregaten hingegen ist aufgrund der Kompaktheit der Zellaggregate problematisch. Hier erfolgten daher zunächst Untersuchungen, um eine geeignete Methode für die RNA-Isolierung zu finden. Im Vergleich verschiedener Isolationsmethoden lieferte die Verwendung eines speziellen RNA-Kits, der ursprünglich für die RNA-Isolierung aus Paraffinschnitten konzipiert ist, die besten Ergebnisse. Nach entsprechender Aufbereitung der Proben erfolgte eine Analyse der Genexpression mittels Gelelektrophorese (Abbildung 13A). Als Kontrollgen diente  $\beta$ -Aktin. COL2 wurde am Tag 21 sowohl von unstimulierten als auch von chondrogen stimulierten Knorpelzellen exprimiert, was darauf schließen lässt, dass die die Zellen umgebende Matrix bereits eine chondrogen stimulierend wirkt. Nach Kultivierung mit chondrogenen Supplementen war die Expression jedoch, wie zu erwarten war, höher. Im Vergleich zu eingebetteten Einzelzellen ist die Expression von COL2 von Zellaggregaten geringer. Die Ergebnisse sind für eingebettete Stammzellen im Falle der Einzelzellen vergleichbar mit denen der Knorpelzellen, bei den Zellaggregaten konnte hier aber keine Expression des Gens detektiert werden. Auch ACAN wurde von den Knorpelzellen sowohl ohne als auch mit chondrogener Stimulation exprimiert. Ein Unterschied ist hier allerdings kaum sichtbar. Die Expression ist jedoch für Einzelzellen höher als für die Zellaggregate. Bei den Stammzellen war erneut nur eine Expression für die Einzelzellen detektierbar. Zellaggregate zeigten keine entsprechende Expression. Bei eingebetteten Knorpelzellen war das COMP-Gen sowohl nach chondrogener Stimulation als auch ohne Stimulation aktiv, wobei es stärker nach erfolgter chondrogener Stimulation exprimiert wurde. Die Expression des Gens durch Einzelzellen ist geringfügig höher als bei Zellaggregaten. Bei eingebetteten Stammzellen konnte am Tag 21 in allen Proben ein aktives COMP-Gen detektiert werden. Dabei zeigten Zellaggregate und unstimulierte Einzelzellen nur eine geringe Expression des Gens, wohingegen eine starke Expression durch chondrogen stimulierte Stammzellen

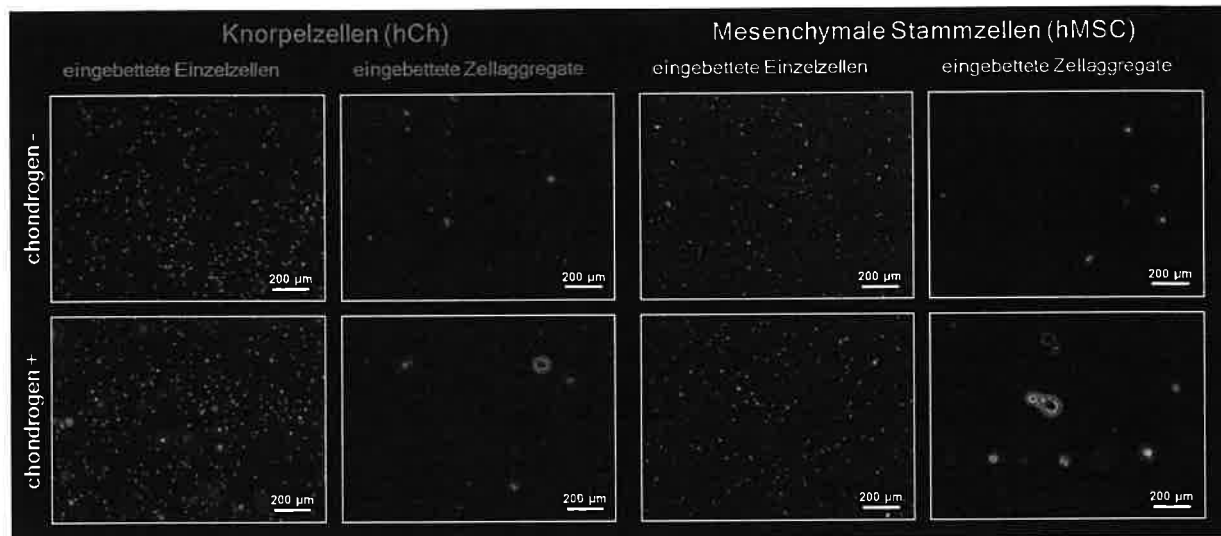
nachweisbar war. COLX als Hypertrophiemarker wurde von chondrogen stimulierten Knorpelzellen nur sehr schwach exprimiert. Im Falle von eingebetteten Einzelzellen zeigten chondrogen stimulierte Stammzellen im Vergleich zu Knorpelzellen eine deutlich stärkere Expression des Genes, was darauf schließen lässt, dass hier bereits ein Übergang zur Hypertrophie stattfand. Bei Zellaggregaten war die COLX-Expression bei Knorpelzellen geringer als bei Einzelzellen, bei Stammzellen konnte bei Zellaggregaten aus Stammzellen nach chondrogener Stimulation keine COLX-Expression detektiert werden. Die geringere Expression des COLX-Genes könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Anordnung der Zellen in Zellaggregaten möglicherweise die Entwicklung einer Hypertrophie verhindert oder zumindest verringert. Auf Proteinebene konnten die Ergebnisse der Genexpression von Kollagen Typ II bestätigt werden (Abbildung 13B). Die Expression von Kollagen Typ II durch Einzelzellen ist deutlich höher im Vergleich zu Zellaggregaten und Knorpelzellen exprimierten fast doppelt so viel Kollagen Typ II wie Stammzellen. Dennoch konnten auch für die chondrogen stimulierten Zellaggregate relevante Mengen an neugebildetem Kollagen Typ II detektiert werden.



**Abbildung 13: Genexpression (A) und Proteinexpression (B; Kollagen Typ II) von Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen. Die Zellen wurden insgesamt für 21 Tage entweder ohne (c-) oder mit (c+) chondrogenen Supplementen kultiviert.**

Neben Kollagen Typ II wurde auch die Expression von Aggrecan zusätzlich auf Proteinebene, allerdings mittels Fluoreszenzfärbung, analysiert. Mikroskopisch konnte eine Expression von Aggrecan nur bei chondrogen stimulierten Knorpelzellen detektiert werden (Abbildung 14). Eine erfolgreiche Färbung von Aggrecan war hier aber sowohl für Einzelzellen als auch für Zellaggregate nachweisbar.

Für die chondrogene



**Abbildung 14: Fluoreszenzfärbung von Zellkern (blau), Aktinfilamenten (grün) und Aggrekan (rot) (Tag 21) zur Visualisierung der Zellmorphologie und zur Beurteilung der chondrogenen Differenzierung. Ein Vergleich zwischen Knorpelzellen und mesenchymalen Stammzellen, die ohne (chondrogen -) und mit (chondrogen +) chondrogenen Supplementen kultiviert wurden.**

Differenzierung lässt sich zusammenfassen, dass entgegen der Erwartungen, die Differenzierung sowohl auf Genebene als auch auf Proteinebene im Falle der Zellaggregate geringer ist als bei eingebetteten Einzelzellen. In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob eine Anordnung der Zellen in Zellaggregaten von Vorteil oder Nachteil für die Chondrogenese ist. *Portier et al.* berichten beispielsweise, dass die Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen als kleine Zellaggregate keinen positiven Effekt auf die chondrogene Differenzierung hat [2]. Die Matrixsynthese von Zellaggregaten und Einzelzellen war vergleichbar, die Expression chondrogener Marker auf Genebene war jedoch bei Aggregaten reduziert. Nicht nur für Stammzellen sondern auch für Knorpelzellen wurde in Untersuchungen eine reduzierte Expression von COL2 für Zellaggregate gezeigt [3]. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen, dass durch die Anordnung von Stammzellen in Zellaggregaten der Stammzellphänotyp besser erhalten werden kann [4,5]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in anderen Untersuchungen ein positiver Effekt der Anordnung der Zellen in Zellaggregaten auf die Expression chondrogener Marker sowohl für mesenchymale Stammzellen [6] als auch für Knorpelzellen [7].

In den eigenen Untersuchungen konnte die Matrixsynthese zwar nicht gesteigert werden, jedoch war eine erfolgreiche chondrogene Redifferenzierung von Knorpelzellen sowohl für die Einzelzellen als auch für die Zellaggregate nachweisbar. Ebenso konnte eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung für eingebettete Stammzellen als Einzelzellen sowohl auf Genebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Für eingebettete Zellaggregate aus Stammzellen war dahingegen auf Genebene kein Nachweis einer erfolgten chondrogenen Differenzierung möglich, auf Proteinebene zeigte sich anhand einer vorhandenen, wenn auch geringen, Synthese an Kollagen Typ II eine erfolgreiche Differenzierung. Die chondrogene (Re)differenzierung der eingebetteten Knorpelzellen war stärker als bei Stammzellen und auch im Falle von eingebetteten Zellaggregaten war die Differenzierung sowohl auf Genebene als auch auf Proteinebene nachweisbar, chondrogene Marker waren jedoch schwächer exprimiert. Möglicherweise entspricht dies aber genau der natürlichen Situation im Knorpel. Zellen im Knorpel haben einen sehr langsamen Stoffwechsel und produzieren nur sehr we-

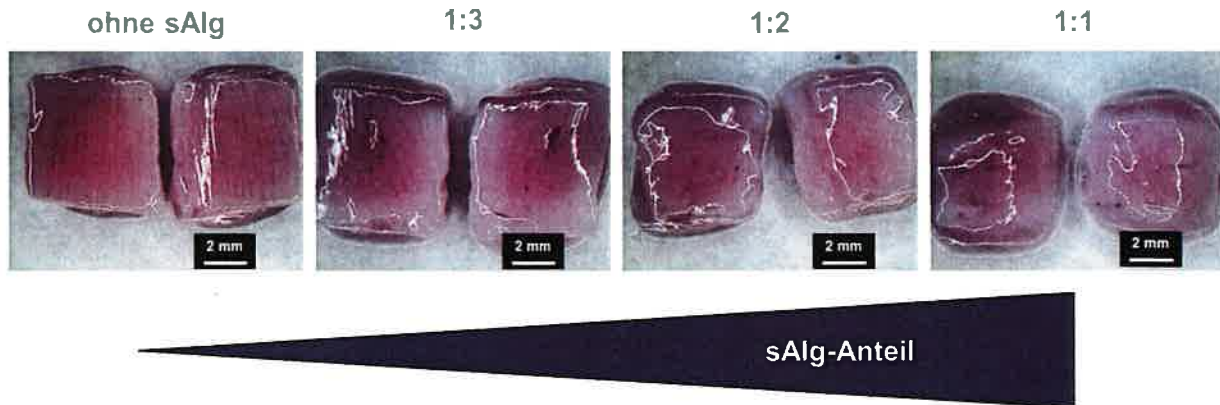
nig neue Knorpelmatrix, so dass es vorstellbar ist, dass eine Nachahmung dieser Anordnung durchaus auch von Nachteil sein könnte und eine Vorstufe dieser Anordnung, nämlich eine Einbettung als Einzelzellen, günstiger ist, wenn es um die Bildung von neuem Gewebe und nicht nur um Erhaltung des vorhandenen Gewebes geht. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine stärkere Expression chondrogener Marker durch eingebettete Einzelzellen auch mit einer stärkeren Expression des Hypertrophiemarkers COLX einhergeht. Hypertrophieren die eingebetteten Zellen, ist das neugebildete Gewebe nicht in der Lage, die Kräfte im Gelenk so aufzunehmen, wie es gesunder Gelenkknorpel kann. Eine Vermeidung einer Hypertrophieentwicklung ist daher wünschenswert. Es wurde gezeigt, dass die Anordnung der Zellen in Zellaggregaten in diesem Zusammenhang von Vorteil sein könnte, auch wenn dadurch die Synthese extrazellulärer Matrix vermindert wird.

### **3.3 Modifikation des Knochenteils der biphasigen Scaffolds**

Die biphasigen Scaffolds verfügen über kanalartige Poren, die sich über die gesamte Länge der Scaffolds erstrecken. Die Poren können nach einer Transplantation als Leitstruktur für das Einwachsen von Blutgefäßen und die Einwanderung von Stammzellen aus dem Knochenmark in den Scaffold dienen und so zu einer schnelleren Regeneration des Gewebes beitragen. Die bisherige Zusammensetzung des Knochenteils aus Alginat und Hydroxylapatit erlaubte jedoch keine Adhäsion der Zellen am Scaffoldmaterial. Daher war es nötig, die Zusammensetzung bzw. Oberflächenbeschaffenheit entsprechend zu ändern, ohne die Porenbildung und mechanische Stabilität dabei negativ zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden unter anderem das gelbildende Polysaccharid Gellan Gum oder Kollagen zusätzlich in den Knochenteil integriert, da diese Biomaterialien Sequenzen enthalten, die eine Adhäsion von Zellen ermöglichen. Auch die Verwendung von RGD-Alginat, einem mit Adhäsionssequenzen modifizierten Alginat, und Verwendung von sulfatiertem Alginat wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf Porenbildung und Zelladhäsion im Knochenteil untersucht.

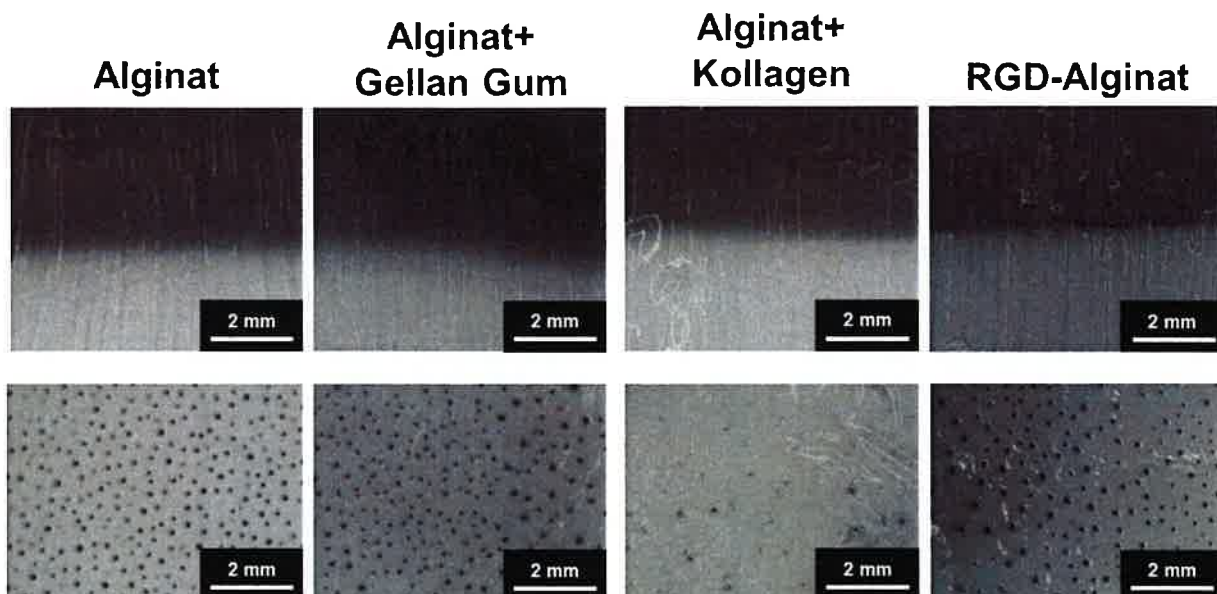
Die Verwendung von sulfatiertem Alginat (sAlg) war nur in Kombination mit unmodifiziertem Alginat möglich, da bei alleiniger Verwendung von sulfatiertem Alginat anstelle von unmodifiziertem Alginat keine oder nur eine unzureichende Gelbildung stattfand. Es wurden reine Knochenscaffolds (1,25 % Alginat, 4 % HAP) in folgenden Mischungen aus sulfatiertem:unmodifiziertem Alginat hergestellt: 1:1; 1:2 und 1:3. Als Kontrolle dienten die Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat. Nach der Gelbildung wurden die Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt. Abbildung 15 zeigt, dass die Porenbildung mit steigendem Anteil an sulfatiertem Alginat geringer und ungleichmäßiger ist. Um die Zelladhäsion beurteilen zu können, erfolgte eine Visualisierung der Zellen mittels MTT-Färbung. Alle Scaffolds zeigen keine oder nur geringe Besiedlung mit Zellen. Signifikante Unterschiede sind nicht feststellbar. Ein positiver Effekt von sulfatiertem Alginat konnte in diesem Versuchsaufbau nicht bestätigt werden.





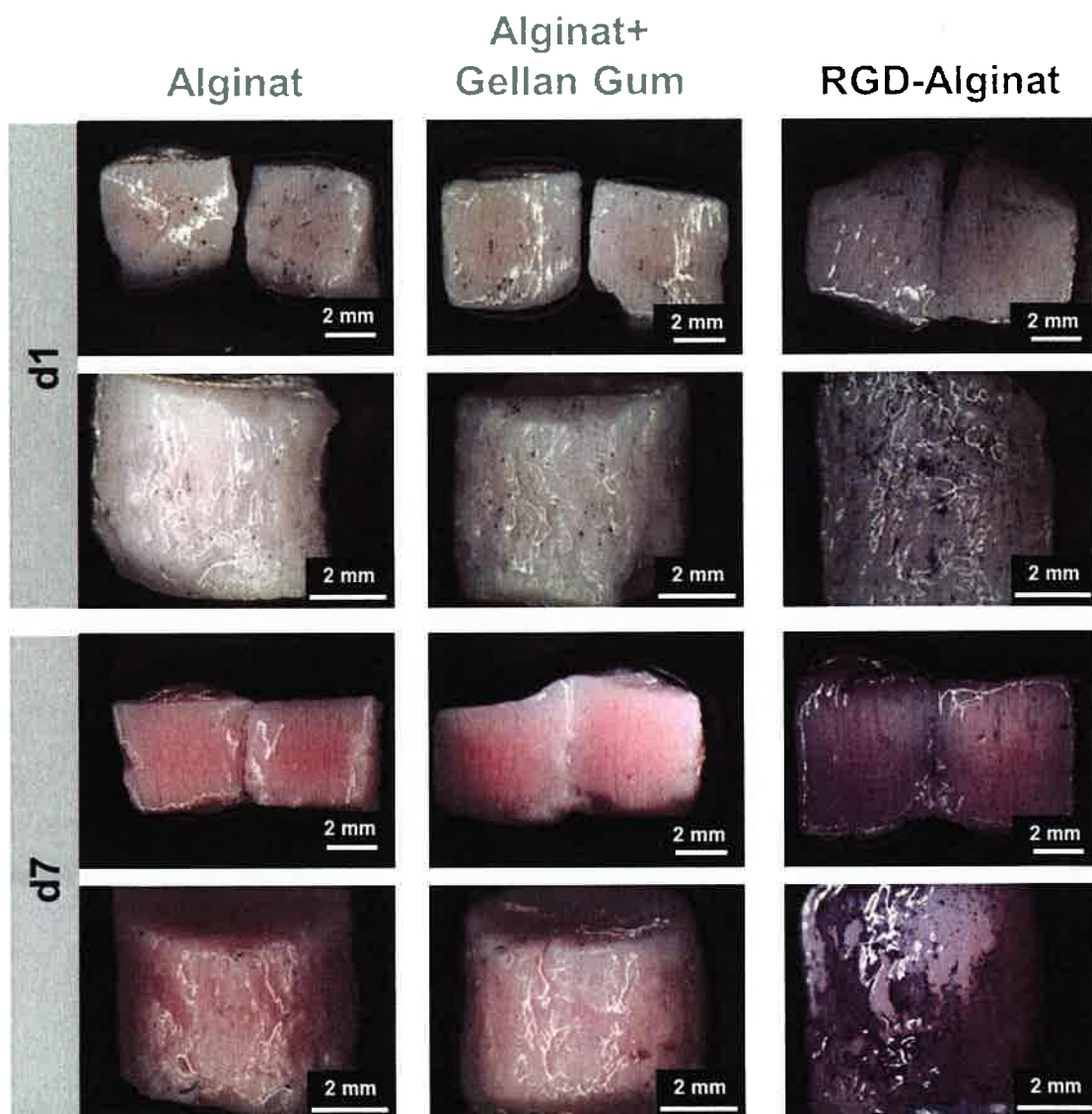
**Abbildung 15: Porenbildung und Besiedlungseffizienz von monophasigen Alginatscaffolds mit unterschiedlichen Anteilen an sulfatiertem Alginat (sAlg). Zur Beurteilung der Besiedlungseffizienz wurden die Zellen mittels MTT-Färbung angefärbt.**

Abbildung 16 zeigt die Porenbildung in biphasigen Scaffolds mit Alginat+Kollagen, Alginat+Gellan Gum bzw. RGD-Alginat im Knochen teil im Vergleich zu biphasigen Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat. Der Anteil an Hydroxylapatit wurde konstant bei 4 % gehalten. Die Integration von Gellan Gum und Verwendung von RGD-Alginat zeigten im Vergleich zur Verwendung von unmodifiziertem Alginat keinen merklichen Einfluss auf die Porenbildung, wohingegen eine deutliche Verschlechterung der Porenbildung nach Integration von Kollagen in den Knochen teil zu beobachten war. Es bildeten sich zum einen weniger Poren und die Poren erstreckten sich auch teilweise nicht über die gesamte Länge der Scaffolds. Daher wurde in folgenden Versuchen zur Beurteilung der Zelladhäsion nur Scaffolds mit Alginat+Gellan Gum und RGD-Alginat verwendet.



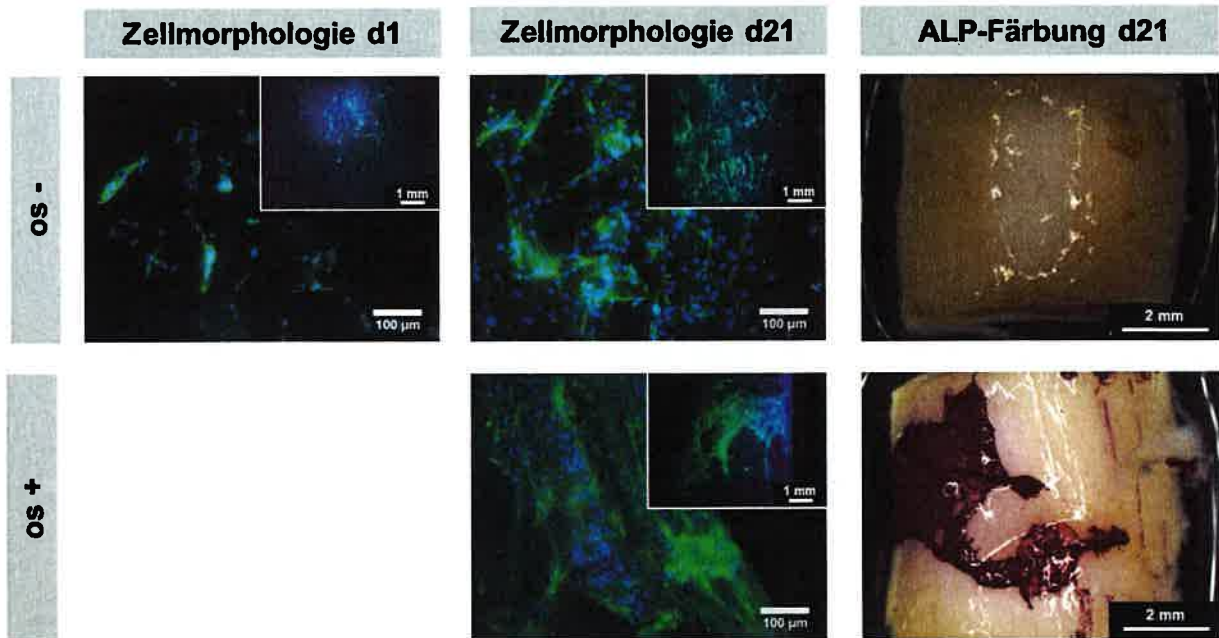
**Abbildung 16: Porenbildung in biphasigen Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat, Alginat+Gellan Gum, Alginat und Kollagen und RGD-Alginat. Die Alginat-Konzentration betrug in allen Scaffolds 1,25 %, der Anteil an Hydroxylapatit bei 4 %. Die Konzentrationen an Gellan Gum und Kollagen betragen in den jeweiligen Scaffolds 0,5 % bzw. 0,075 %. Die obere Reihe zeigt einen Längsschnitt der Scaffolds, die untere Bildreihe einen Querschnitt des Knochen teils.**

Da es in diesen Versuchen um eine Untersuchung der Adhäsion von Zellen im Knochenteil ging, wurden monophasige Scaffolds, d.h. Scaffolds ohne Knorpelteil, hergestellt und anschließend mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt. Als Kontrolle dienten auch hier Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat. Nach MTT-Färbung der besiedelten Scaffolds am Tag 1 der Kultivierung waren bei allen Varianten Zellen in den Poren der Scaffolds zu erkennen, wobei die Besiedlungseffizienz bei Scaffolds aus RGD-Alginat am höchsten war (Abbildung 17). Am Tag 7 der Kultivierung waren in Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat und Scaffolds mit Alginat+Gellan Gum kaum noch Zellen in den Scaffolds zu erkennen. Bei Scaffolds mit RGD-Alginat waren in den Poren der Scaffolds ebenso kaum Zellen vorhanden, jedoch wiesen diese Scaffolds eine hohe Besiedlung im Außenbereich auf, was darauf schließen lässt, dass die Zellen erfolgreich am Scaffold adhären. Ein Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7 zeigt außerdem eine stärkere Färbung der RGD-Alginat-Scaffolds am Tag 7. Die Zellen adhären also nicht nur am Scaffold, sondern proliferieren auch.



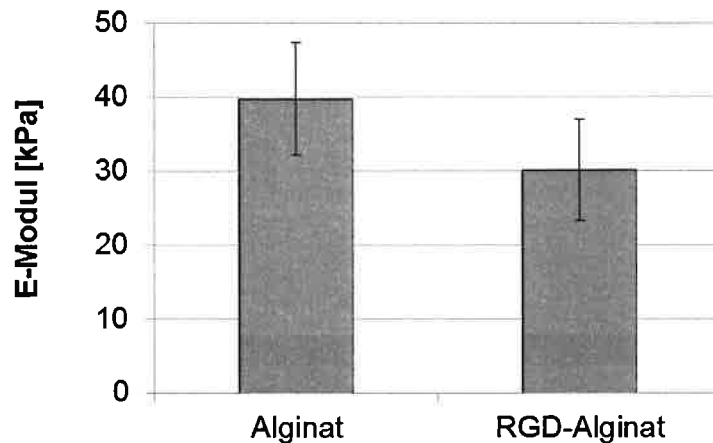
**Abbildung 17: Besiedlung des Knochenteils. MTT-Färbung besiedelter Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat, Alginat+Gellan Gum und RGD-Alginat nach 1 Tag und 7 Tagen Kultivierung. Die Alginat-Konzentration betrug in allen Scaffolds 1,25 %, der Anteil an Hydroxylapatit 4 %. Die obere Bildreihe von d1 und d7 zeigt jeweils einen Längsschnitt der besiedelten Scaffolds, die untere Bildreihe zeigt jeweils eine Seitenansicht der Scaffolds.**

Bei einer statischen Kultivierung, wie sie hier stattfand, ist die Versorgung von Zellen im Innenbereich der Scaffolds oft unzureichend und führt dazu, dass die Zellen in diesen Bereichen absterben oder in die Randregionen migrieren. *In vivo* ist durch den Blutstrom jedoch eine bessere Versorgung zu erwarten, so dass Zellen auch ins Scaffold-Innere einwandern können. Weitere Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung erfolgten nur für Scaffolds mit RGD-Alginat, da nur bei diesen Scaffolds eine erfolgreiche Besiedlung zu verzeichnen war. Nach der Gelbildung wurden die Scaffolds mit osteogenen Vorläuferzellen, welche aus humanen Hüftköpfen isoliert wurden, besiedelt. Am Tag 1 der Kultivierung wurde zunächst die Adhäsion der Zellen durch eine Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Zytoskelett näher bewertet (Abbildung 18, Zellmorphologie d1). Anhand der ausgebreiteten Morphologie lässt sich erkennen, dass die Zellen am Scaffold adhären konnten. Nach einem Tag Kultivierung wurden die besiedelten Scaffolds für weitere 20 Tage entweder ohne (os-) oder mit (os+) osteogenen Supplementen (Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat weiterkultiviert, um eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu Osteoblasten zu realisieren. Nach insgesamt 21 Tagen Kultivierung erfolgte erneut eine Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Zytoskelett zur Beurteilung der Zellmorphologie. Vom Tag 1 zum Tag 21 ist sowohl bei osteogen stimulierten als auch bei unstimulierten Zellen eine deutliche Zunahme der Anzahl ahärenter Zellen auf den Scaffolds zu verzeichnen (Abbildung 18, Zellmorphologie d21). Somit konnte auch eine Proliferation der Zellen auf den Scaffolds noch einmal bestätigt werden. Hinsichtlich der Morphologie zeigen sich keine Unterschiede zwischen osteogen stimulierten und unstimulierten Zellen. Zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung erfolgte eine ALP-Färbung, welche die Aktivität der alkalischen Phosphatase, einem starken Indikator für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der Zellen, durch einen Farbumschlag visualisiert. Zur Kontrolle erfolgte die Färbung auch mit Scaffolds, die ohne osteogene Supplemente kultiviert wurden. Scaffolds, die ohne osteogene Supplemente kultiviert wurden, zeigen keinen Farbumschlag (Abbildung 18, ALP-Färbung). Nach osteogener Stimulation hingegen ist ein deutlicher purpurner Farbumschlag zu erkennen. Die Zellen in den Scaffolds konnten also erfolgreich zu Osteoblasten differenziert werden.



**Abbildung 18: Zellmorphologie und osteogene Differenzierung von hOB auf monophasigen Alginat-Scaffolds (nur Knochenanteil, RGD-Alginat). Die besiedelten Scaffolds wurden für 21 Tage ohne (os-) bzw. mit (os+) chondrogenen Supplementen kultiviert. Zur Beurteilung der Zellmorphologie am Tag 1 und 21 der Kultivierung erfolgte eine Fluoreszenzfärbung von Zellkern (blau) und Zytoskelett (grün). Am Tag 21 der Kultivierung erfolgte außerdem eine ALP-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung.**

Für Scaffolds mit RGD-Alginat konnte eine erfolgreiche Porenbildung verzeichnet werden und auch eine erfolgreiche Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen in den Scaffolds wurde nachgewiesen. Eine zusätzliche Anforderung an den Scaffold war aber darüber hinaus auch eine ausreichende Stabilität der Scaffolds. Daher wurden mit RGD-Alginat-Scaffolds auch Druckversuche durchgeführt. Das E-Modul von RGD-Alginat-Scaffolds war dabei ca. 25 % geringer als das E-Modul von Scaffolds mit unmodifiziertem Alginat. Die Scaffolds waren dennoch gut mit einer Pinzette handhabbar. Darüber hinaus wäre auch im Fall der unmodifizierten Alginat-Scaffolds nach einer Transplantation der Scaffolds im Gelenkbereich eine zusätzliche Stabilisierung des Gelenkes erforderlich, so dass die Reduzierung des E-Moduls in dieser Größenordnung akzeptabel ist. Ist dennoch eine höhere mechanische Festigkeit gewünscht oder nötig, könnte diese jedoch durch Erhöhung des Alginatgehaltes erzielt werden.



**Abbildung 19: E-Modul von monophasigen Alginate-scaffolds (nur Knochenteil). Abmessungen:  $\varnothing$  6mm,  $h \approx 3$  mm.  $n=8$  (Alginate),  $n=9$  (RGD-Alginate)**

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Mithilfe einer simplen und vor allem kostengünstigen Methode ist es gelungen, Agarose-Inserts mit Microwells zu erzeugen, mit denen kleine Zellaggregate bestehend aus 20-200 Zellen reproduzierbar in großem Durchsatz generiert werden können. Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden zur Herstellung von Microwells ist, dass die Agarose-Inserts komplett unter sterilen Bedingungen hergestellt werden können, da alle nötigen Materialien (Stempel, Schablone, Agarose) vorab dampfsterilisiert werden können und somit keine nachträgliche Sterilisation nötig ist. Darüber hinaus können die Agarose-Einsätze mit dieser Methode in nur einem Schritt hergestellt werden, was die Methode kostengünstig und zeiteffektiv macht. Mit anderen Methoden ist die Erzeugung der Microwells deutlich aufwendiger: zunächst ein Master-Stempel aus PDMS durch Abformung eines Negativs erstellt und dieser dann dazu genutzt, entsprechende Microwells aus Agarose oder auch Polyethylenglycol herzustellen [6,8,9]. Im vorliegenden Projekt sollten die kleinen Zellaggregate die natürliche Zellanordnung im Knorpel imitieren und dadurch zu einer Steigerung der Matrixsynthese führen. Die Anwendung kleiner Zellaggregate ist jedoch nicht nur auf den Bereich Knorpel-Tissue Engineering begrenzt. Auch für die osteogene und adipogene sowie kardiale Differenzierung kann der Einsatz von Zellaggregaten sinnvoll sein [10–12]. Darüber hinaus gibt es auch Studien, die zeigen dass Zellaggregate auch zur Erhaltung des Stammzellphänotypes genutzt werden können [4,5]. Oftmals dienen Zellaggregate auch als Modell z.B. für die Testung von Medikamenten [13] oder um Zell-Zell-Interaktionen bzw. Signalwege zu studieren [4,14,15]. Eine kostengünstige Herstellung kleiner Zellaggregate in großem Durchsatz ist daher auch in vielen anderen Bereichen neben dem Tissue Engineering von Knorpel von großem Interesse.

Nach erfolgreicher Herstellung der Zellaggregate wurden diese in den Knorpelteil biphasiger Alginate-Scaffolds eingebettet und auf ihr chondrogenes Potential untersucht. Im Vergleich zu eingebetteten Einzelzellen war die Expression chondrogener Marker und die Synthese von Matrixbestandteilen bei eingebetteten Zellaggregaten geringer. Allerdings ergab die Untersuchung der Expression des Hypertrophiemarkers COLX einen Hinweis darauf, dass die Hypertrophieentwicklung der Zellen durch die Anordnung in Zellaggregaten geringer ist als bei Einzelzellen. Therapieansätze zur Heilung von Knorpelgewebe liefern bislang nur einen mäßigen Erfolg. Das neu gebildete Gewebe entspricht in seinen Eigenschaften nicht dem Ge-

lenkknorpel. Es bildet sich oft Faserknorpel oder es kommt zur Hypertrophie. Eine Vermeidung der Hypertrophieentwicklung durch Anordnung der Zellen in Zellaggregaten wäre daher für die Funktion von neu gebildetem Knorpelgewebe von großem Vorteil. Hierzu sollten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um diese Vermutung zu bestätigen.

Der Knochenteil sollte so modifiziert werden, dass eine Besiedlung mit Zellen möglich ist ohne Porenbildung und mechanische Eigenschaften dabei gravierend zu beeinträchtigen. Die Besiedlung des Knochenteils diene als Modell für Untersuchungen zur Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark in die Kanalporen, die anschließend aktiv an der Geweberegeneration mitwirken können. Ziel der Untersuchungen war es daher, zu untersuchen, ob die Zellen am Material adhären, proliferieren und differenzieren können. Durch Verwendung von RGD-Alginat konnten alle Bedingungen erfüllt werden, jedoch verblieben die Zellen nach Besiedlung nicht in den Kanalporen, sondern migrierten in die Randbereiche der Scaffolds, was durch die geringere Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr zu erklären ist. Wird ein Scaffold allerdings in den Gelenkbereich transplantiert, herrschen dort keine statischen Bedingungen wie im Versuchsaufbau. Der Scaffold wird stattdessen mechanisch belastet, wodurch eine bessere Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr gewährleistet ist. Mit solchen Bedingungen wäre eher ein Verbleiben der Zellen in den Kanalporen zu erwarten. Um die *in vivo* Situation zu simulieren, sollten die Scaffolds in einem Perfusionsreaktor kultiviert werden.

Eine Publikation der Ergebnisse in einer referierten, internationalen Fachzeitschrift wird angestrebt; aufgrund der unmittelbar bevorstehenden Mutterschutz-Zeit der Projektbearbeiterin wird sich die Fertigstellung des Manuskriptes aber noch etwas verzögern.

## 5 Referenzen

- [1] Schütz K, Despang F, Lode A and Gelinsky M 2016 Cell-laden biphasic scaffolds with anisotropic structure for the regeneration of osteochondral tissue *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 404–417
- [2] Potier E, Rivron N C, Van Blitterswijk C A and Ito K 2016 Micro-aggregates do not influence bone marrow stromal cell chondrogenesis *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10** 1021–32
- [3] Chameettachal S, Midha S and Ghosh S 2016 Regulation of Chondrogenesis and Hypertrophy in Silk Fibroin-Gelatin-Based 3D Bioprinted Constructs *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2** 1450–63
- [4] Frith J E, Thomson B and Genever P G 2010 Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential *Tissue Eng. Part C Methods* **16** 735–49
- [5] Sart S, Tsai A-C, Li Y and Ma T 2014 Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications *Tissue Eng. Part B Rev.* **20** 365–80
- [6] Leijten J, Teixeira L S M, Bolander J, Ji W, Vanspauwen B, Lammertyn J, Schrooten J and Luyten F P 2016 Bioinspired seeding of biomaterials using three dimensional microtissues induces chondrogenic stem cell differentiation and cartilage formation under growth factor free conditions *Sci. Rep.* **6**
- [7] Moreira Teixeira L S, Leijten J C H, Sobral J, Jin R, van Apeldoorn A A, Feijen J, van Blitterswijk C, Dijkstra P J and Karperien M 2012 High throughput generated micro-aggregates of chondrocytes stimulate cartilage formation in vitro and in vivo *Eur. Cell. Mater.* **23** 387–99
- [8] Cha J M, Park H, Shin E K, Sung J H, Kim O, Jung W, Bang O Y and Kim J 2017 A novel cylindrical microwell featuring inverted-pyramidal opening for efficient cell spheroid formation without cell loss *Biofabrication* **9** 035006
- [9] Jeon J E, Vaquette C, Klein T J and Huttmacher D W 2014 Perspectives in multiphasic osteochondral tissue engineering *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **297** 26–35
- [10] Kabiri M, Kul B, Lott W B, Futrega K, Ghanavi P, Upton Z and Doran M R 2012 3D mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis and autocrine signalling *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419** 142–7
- [11] Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung U, Yamasaki Y and Kataoka K 2009 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells *Biomaterials* **30** 2705–15
- [12] Dahlmann J, Kensah G, Kempf H, Skvorc D, Gawol A, Elliott D A, Dräger G, Zweigerdt R, Martin U and Gruh I 2013 The use of agarose microwells for scalable embryoid body formation and cardiac differentiation of human and murine pluripotent stem cells *Biomaterials* **34** 2463–71

- [13] Patra B, Peng C-C, Liao W-H, Lee C-H and Tung Y-C 2016 Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device *Sci. Rep.* **6**
- [14] Hsu S and Huang G-S 2013 Substrate-dependent Wnt signaling in MSC differentiation within biomaterial-derived 3D spheroids *Biomaterials* **34** 4725–38
- [15] Bartosh T J, Ylöstalo J H, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee R H, Choi H and Prockop D J 2010 Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** 13724–9

Dresden, den 6. Dezember 2017

Prof. Dr. Michael Gelinsky, Projektleiter