Die Knorpelchipsplastik (MCI) im Inflammationsmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lisa Grede

aus Bonn

2026

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Frank Schildberg
2. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Stilla Frede

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	**Einleitung**	9
1.1	Aufbau und Funktion von hyalinem Knorpel	9
1.2	Läsionen des Knorpels und Regeneration	13
1.3	Arthrose	14
1.4	TNFα	18
1.5	Knorpelregenerative Verfahren	19
1.6	Minced Cartilage Implantation (MCI)	24
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Studie	28
2.	**Material und Methoden**	29
2.1	Versuchsaufbau	29
2.2	Biochemische Analyse	31
2.3	Histologie und Immunhistochemie	34
2.4	Statistik	36
3.	**Ergebnisse**	37
3.1	Chondrogene Marker	37
3.2	Hypertrophie und Dedifferenzierung	41
3.3	Katabole Marker	44
3.4	Inflammatorische Marker	46
4.	**Diskussion**	51
4.1	Inflammationsmodell	51
4.2	Vergleich der ACT und MCI im in-vitro Modell	53
4.2.1	Katabole Wirkungen von TNFα: Beeinträchtigung der Matrixproduktion	54

4.2.2	Katabole Marker	56
4.2.3	Dedifferenzierung	57
4.2.4	Inflammation	58
4.3	Einfluss der perizellulären Matrix auf MCI-Konstrukte	61
4.4	Mincing	63
4.5	Einfluss von Co-Stimulantien	65
4.6	ACT und Passagierung	68
4.7	Kultivierung und Inflammation	69
4.8	Klinik MCI	71
4.9	Limitationen und zukünftige Perspektiven	73
5.	**Zusammenfassung**	75
6.	**Abbildungsverzeichnis**	76
7.	**Literaturverzeichnis**	78
8.	**Anhang**	102
9.	**Erklärung zum Eigenanteil**	110
10.	**Veröffentlichungen**	111
11.	**Danksagung**	111

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALP	Alkalische Phosphatasen
CaCl2	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COMP	Knorpel-spezifisches oligomeres Matrixprotein
COX	Cyclooxygenase
Ct	Threshold Cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGOU	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
dH2O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco’s phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	Fötales bovines Serum
GAG	Glykosaminoglykane
HA	Hyaluronsäure
H2O2	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ICRS	International Cartilage Research Society
MACT	Matrixgestützte Autologe Chondrozyten-Transplantation
MCI	Minced Cartilage-Implantation
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOCART	Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure

MRT	Magnetresonanztomographie
MT1	Membrantyp 1
MULV	Murine Leukämievirus
NaCl	Natriumchlorid
NED	N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OCT	Osteochondrale Transplantation
OD	Osteochondrosis dissecans
P3	Passage 3
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE2	Prostaglandin E2
PK	Proteinkinase
PRG-4	Proteoglykan 4
PRP	Platelet Rich Plasma
PZM	Perizelluläre Matrix
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
TACE	TNFα Converting Enzyme
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion von hyalinem Knorpel

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpelgewebe, welches sich sehr resistent gegenüber im Gelenk wirkenden Kräften zeigt und für die mechanische Verteilung der Lasten verantwortlich ist. Gemeinsam mit der Synovialflüssigkeit ermöglicht der Gelenkknorpel so eine reibungs- und schmerzfreie Bewegung (Sophia Fox et al. 2009). Beim adulten Gelenkknorpel machen Chondrozyten etwa 5 % des gesamten Knorpelvolumens aus (Hunziker et al. 2002). Sie sind der einzige Zelltyp im Knorpel, Hauptregulator der Homöostase des hyalinen Knorpelgewebes und regulieren den Umsatz der extrazellulären Matrix (Fortier et al. 2011; Goldring et al. 2008; Kapoor et al. 2011). Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Gelenkknorpels besteht aus Wasser und einem makromolekularen Gerüst, das in erster Linie aus Kollagenen und großen aggregierten Proteoglykanen besteht. Kollagene sind die wichtigsten Strukturproteine der Matrix und für die funktionelle Integrität des Knorpelgewebes verantwortlich. Die Kollagenkomponenten bestehen überwiegend aus Kollagenfasern des Typs II (mindestens 90-95 %) mit geringeren Mengen an Kollagen VI, IX, X und XI (Eyre 2002).

Weiterhin gibt es zwei Hauptklassen von Proteoglykanen im Knorpel: große aggregierende Proteoglykanmonomere (Aggrecan) und kleine Proteoglykane wie Decorin, Biglycan und Fibromodulin. Die Untereinheiten der Proteoglykane werden Glykosaminoglykane (GAGs) genannt und in Abbildung 1 dargestellt. Dabei handelt es sich um Disaccharidmoleküle mit zwei Haupttypen, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Aggrecan, das vor allem in Knorpelgewebe vorkommt, besteht aus einem großen Kernprotein und kovalent gebundenen GAGs. Die Proteoglykane verleihen dem Knorpelgewebe Druckfestigkeit und stoßdämpfende Eigenschaften (Stoddart et al. 2009).

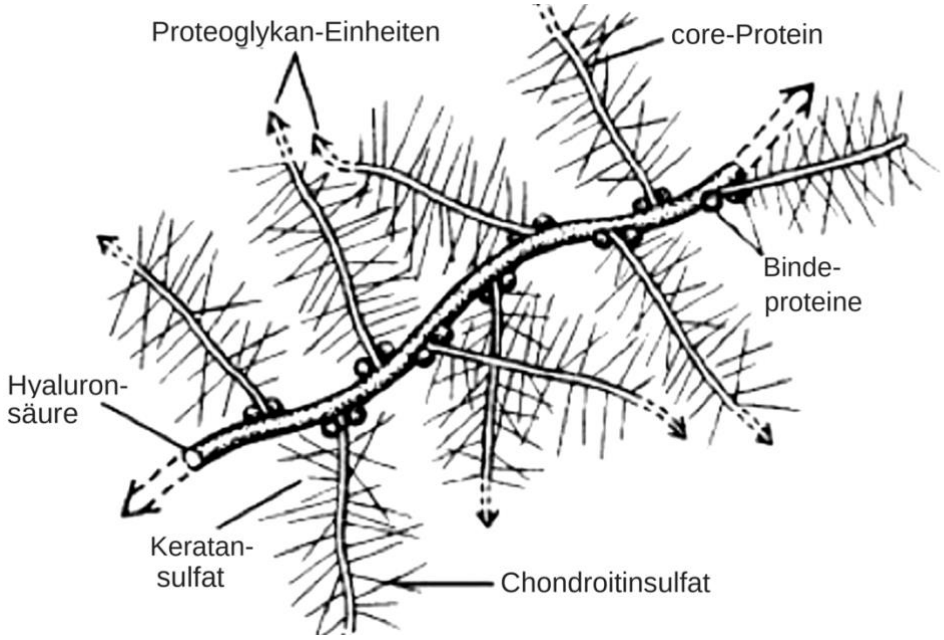

Abb. 1: Aufbau der Proteoglykane in der Knorpelmatrix (Bild modifiziert nach: Spektrum Lexikon Biologie; https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteoglykane/54187)

Die extrazelluläre Matrix bildet nicht nur den Großteil des hyalinen Knorpels aus, sondern stellt weiterhin ein Milieu für die mikromechanische Unterstützung, den Nährstofftransfer und den Stoffwechsel der Chondrozyten dar (Guilak und van Mow 2000). Ein etwa 2-4 µm schmaler Matrixbereich der die Chondrozyten umgibt unterscheidet sich in Zusammensetzung und Struktur von der umgebenden EZM und wird als "perizelluläre Matrix" (PZM) bezeichnet. Die PZM integriert sich in das umgebende Gewebe und verbindet es mit der extrazellulären Matrix. Der Chondrozyt und seine PZM werden zusammen als "Chondron" bezeichnet (Vanden Berg-Foels et al. 2012). Zu den Bestandteilen der perizellulären Matrix gehören charakteristischerweise Kollagene des Typs VI, Fibronektin 1 und die Proteoglykane Perlecan und Nidogen (Kvist et al. 2008). Zahlreiche Daten zeigen, dass insbesondere die PZM als entscheidender Regulator biochemischer und biomechanischer Signale für die Chondrozyten fungiert und dazu beiträgt, das Gleichgewicht der Stoffwechselaktivität der Chondrozyten als Reaktion auf Umweltsignale stabil zu halten (Michalek und Iatridis 2007; Guilak et al. 2018; Guilak und Mow 2000). Durch Modulation von Spannung und Dehnung, Osmose und Flüssigkeitsfluss im Umfeld der Chondrozyten dient die PZM vermutlich als zusätzlicher Regulator des Mechanotransduktionsprozesses von Chondrozyten (Clark et al. 2010; Lee et al. 2014; Vincent 2013). Zusätzlich zu diesen biomechanischen und

mechanobiologischen Funktionen kommt es in der PZM zur Bindung von Zell-Matrix-Liganden, sowie der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Enzymen (Leddy et al. 2008; Xu et al. 2011). Veränderungen epigenetischer, genetischer, metabolischer oder biomechanischer Art der perizellulären Matrix werden als auslösende oder fortschreitende Faktoren für Arthrose diskutiert (Guilak et al. 2018).

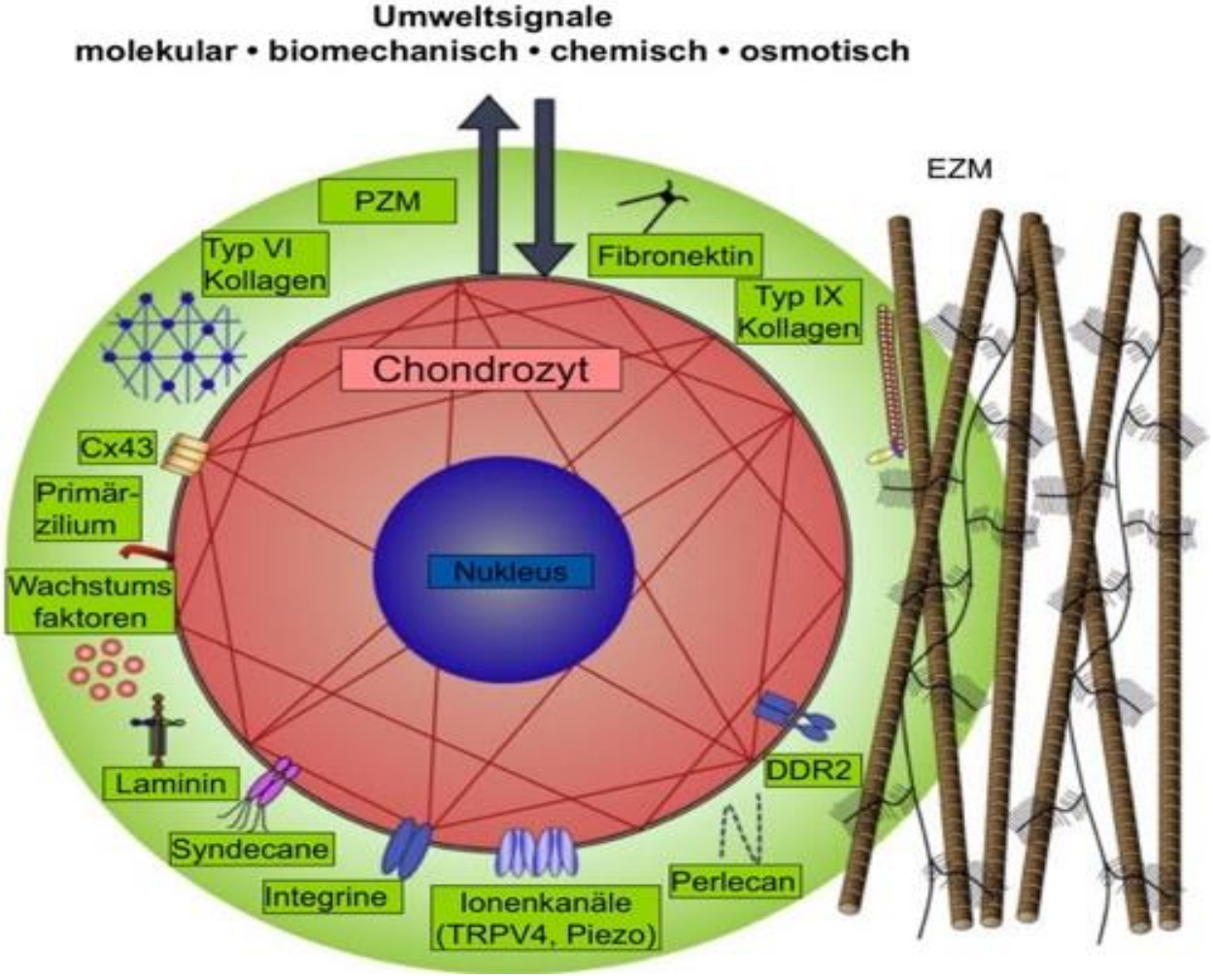

Abb. 2: Schematische Darstellung des Chondrozytens, der zusammen mit der ihn umgebenden perizellulären Matrix (PZM) ein Chondron bildet, das in die chondrozytäre EZM eingebettet ist. Modifiziert nach Guilak et al. 2018.

Der Gelenkknorpel lässt sich in verschiedene Zonen einteilen, wobei die oberflächliche Zone hauptsächlich aus parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichteten Kollagen-II-Fasern besteht, um Scherkräften standhalten zu können. Gleichzeitig liegt hier eine hohe Dichte von Chondrozyten vor, die abgeflacht und parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichtet sind. Ein geringer Proteoglykan-Gehalt sorgt für eine relative Steifigkeit und ermöglicht die Verteilung einer Belastung an der Oberfläche, zum Schutz tieferer Schichten.

Die Kollagenfasern der mittleren und tiefen Schichten sind senkrecht zur Knochenschnittstelle ausgerichtet, um bestmöglich Druckbelastungen aufnehmen zu können. Eine hohe Konzentration an Proteoglykanen führt zu einer vermehrten Resistenz gegenüber Kompression (Sophia Fox et al. 2009) . Die Schichten mit den entsprechenden Bestandteilen sind in Abbildung 3 dargestellt.
Die Chondrozyten verändern ihre Morphologie in der oberen Region und erhöhen ihre synthetische Aktivität und Größe entlang des gesamten Knorpelquerschnitts (Akkiraju und Nohe 2015)

Bei Belastung der Gelenkoberflächen kommt es aufgrund diesen Aufbaus zu Flüssigkeitsbewegungen in der Gelenkknorpelmatrix, die für eine Dämpfung und gleichmäßige Verteilung innerhalb des Knorpels und des subchondralen Knochens sorgen (Buckwalter 1998).

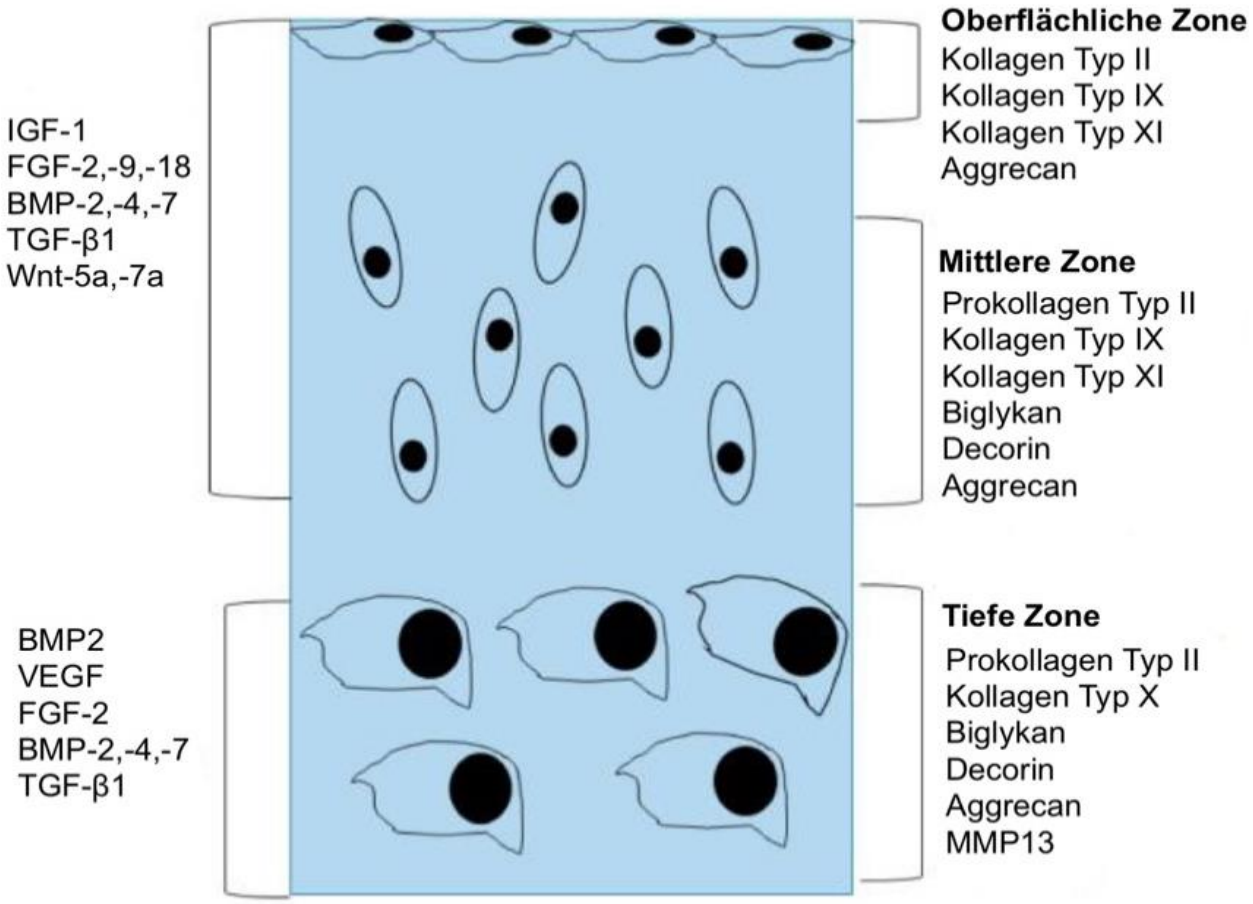

Abb. 3: Aufbau der Knorpelzonen modifiziert nach Akkiraju und Nohe 2015.

1.2 Läsionen des Knorpels und Regeneration

Schädigungen des Knorpels und der subchondralen Region können bedingt sein durch direkte stumpfe Traumata, eine indirekte Stoßbelastung oder auch Torsionsbelastungen eines Gelenks. Bei schnellem Auftreten der Belastung, wie bei einem plötzlichen Aufprall oder einer solchen Torsionsbelastung, kann keine ausreichende Verformung des Gewebes ermöglicht werden. Bei zu großer Belastung kann es so zu einer Destruktion des makromolekularen Matrixgerüsts mit konsekutiver Zellschädigung und unzureichender Verhinderung von Schäden am subchondralen Knochen durch Dämpfung und Verteilung der Lasten kommen (Buckwalter 2002). Ein signifikanter Verlust an Matrixproteoglykanen verringert die Festigkeit des Knorpels und erhöht seine Durchlässigkeit, was zu einer stärkeren Belastung des verbleibenden makromolekularen Gerüsts, einschließlich der Kollagenfibrillen, führt und die Anfälligkeit des Gewebes für weitere Schäden durch Belastung erhöhen könnte (Buckwalter 1992).

Auch Mikrotraumata können zu Veränderungen mit Rupturen im Matrixgerüst führen. Gemeinsam mit degenerativen Abriebprozessen am Knorpel bewirken sie die Induktion eines synovialen Reizzustandes, der unter anderem über TNFα und IL-1 eine Entzündungsreaktion mit konsekutiven Prozessen der Knorpeldestruktion in Gang setzen kann (Nehrer und Neubauer 2021).
Allgemein sind Verletzungen des Gelenkknorpels, beispielsweise im Kniegelenk, sehr häufig. Im Rahmen einer retrospektiven Studie von Widuchowski et al. wurden 25.124 Kniearthroskopien analysiert, die zwischen 1989 und 2004 durchgeführt wurden. Dabei wurden bei über 60 % der Patienten chondrale Läsionen festgestellt (Widuchowski et al. 2007). Das Vorliegen chondraler Defekte ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arthrose assoziiert (Christensen et al. 2016). Gelenkknorpeldefekte erhöhen dabei nicht nur das Risiko für das Auftreten einer Arthrose, sondern korrelieren auch mit Symptomen und Progress der Erkrankung. Insbesondere bei jungen Menschen könnten biomechanische Faktoren aufgrund von Traumata an der Entstehung von chondralen Läsionen mit konsekutiver Entwicklung einer Arthrose im späteren Leben beteiligt sein (Lee et al. 2005). Postpubertär ist eine signifikante Abnahme des Potenzials zur Autoregeneration von hyalinem Knorpel zu beobachten, die durch seine aneurale, avaskuläre und alymphatische Qualität erklärbar ist (Gentili und Cancedda 2009).

Ein grundlegendes Problem bei jeglichen Arten von Verletzungen des Gelenkknorpels stellt somit eine limitierte Regenerationsfähigkeit zur Reparatur schwerer Gewebedefekte dar; Defekte führen letztlich zu einem chronischen Verlust von Knorpelgewebe (Guo et al. 2023; Gentili und Cancedda 2009).
Chondrozyten können Veränderungen in der Zusammensetzung der Matrix zwar erfassen und neue Moleküle synthetisieren, vermutlich ist diese Wiederherstellung der Matrix allerdings nur möglich, solange der Verlust an Matrix-Proteoglykan nicht die Synthesekapazität der Zellen überschreitet, das fibrilläre Kollagengeflecht intakt bleibt und genügend Chondrozyten vital bleiben (Buckwalter et al. 2005).
Die Fähigkeit des Gelenkknorpels spontan zu heilen ist demnach sehr limitiert, sodass in den meisten Fällen nach Verletzung ein knorpelrekonstruktiver chirurgischer Eingriff notwendig ist (Acevedo et al. 2020). Die Auffassung, dass der geschädigte Knorpel eine limitierte Fähigkeit zur intrinsischen Selbstreparatur besitzt, hat dabei zu einer Vielzahl von Behandlungsoptionen für fokale Knorpeldefekte mit unterschiedlichem Erfolg geführt. Das gemeinsame Ziel ist die Expansion und Reimplantation von Gewebe, das dem Ursprünglichen so weit wie möglich entsprechen kann und eine weitere Degeneration verhindert.

1.3 Arthrose

Die Arthrose ist eine weit verbreitete Krankheit mit hoher sozioökonomischer Relevanz. Insbesondere in Industrienationen spielt sie eine außergewöhnliche Rolle in der orthopädischen Patientenversorgung, da große Teile der Bevölkerung von dem Krankheitsbild betroffen sind. Bei Personen über 65 Jahren sind laut Daten des Robert Koch Instituts (RKI) knapp die Hälfte der Frauen (48,1 %) und knapp ein Drittel der Männer (31,2 %) betroffen. Das Robert Koch-Institut (RKI) geht weiterhin davon aus, dass in Anbetracht der Alterung der Bevölkerung die Arthroseprävalenz in Deutschland weiter steigen wird (Fuchs et al. 2017). Initial manifestiert sich die Arthrose als molekulare Störung mit veränderten metabolischen Prozessen, erst im weiteren Verlauf folgen anatomische und physiologische Veränderungen (Knorpelabbau, knöcherne Veränderungen, Synovialitis).

Arthrose kann mit Schmerzsymptomatik, sowohl akuter als auch chronischer Natur, Entzündungsreaktionen und einer eingeschränkten Gelenkbeweglichkeit einhergehen (Bortoluzzi et al. 2018).
Weiterhin ist sie assoziiert mit reduzierter Lebensqualität, dem Verlust an sozialer Teilhabe und einer Beeinträchtigung der mentalen Gesundheit (Hunter et al. 2008).
Auch als degenerative Gelenkerkrankung bezeichnet, ist die Arthrose eine chronische Erkrankung, die hauptsächlich den Gelenkknorpel betrifft. Sie wird durch fortschreitenden Knorpelverschleiß und Veränderungen im umgebenden Gelenkgewebe charakterisiert. Laut der Osteoarthritis Research Society International (OARSI) ist sie durch Mikro- bzw. Makroverletzungen, fehlregulierte Reparaturmechanismen und ausgelöste pro-inflammatorische Signalwege des unspezifischen Immunsystems definiert (Kraus et al. 2015). Es kommt zu einem Abbau der EZM, sowie subchondralen Knochenveränderungen und verstärkten inflammatorischen Reaktionen in Synovium und Knorpel, assoziiert mit einer Minderung anaboler Faktoren, vermehrt vorliegenden katabolen Faktoren und schließlich einer grundsätzlich gestörten Gelenkhomöostase.
Dabei lassen sich charakteristisch vier Phasen beschreiben: Die erste Phase, die auch als die stille molekulare Phase bezeichnet wird, geht mit einer Verschiebung der Knorpelhomöostase hin zu vermehrt katabolen Prozessen einher. Die folgende präradiografische Phase zeigt erste strukturelle Veränderungen im Gelenk und kann einer frühen Diagnostik durch Magnetresonanztomographie (MRT) zugänglich sein. In der dritten, radiografischen Phase ist die Degeneration des Gelenks auch in der Strahlenbildgebung mittels Röntgen sichtbar. Im Verlauf der Arthrose kommt es zur Bildung von Osteophyten (Knochenspornen) an den Rändern der Gelenke und zur Verdichtung des darunterliegenden Knochens. Die letzte Phase stellt das Endstadium der Erkrankung mit vollständiger Zerstörung des Gelenks dar (Kraus 2010).
Häufig wird in diesem Kontext auch der Begriff „Früharthrose“ angeführt. Diese bezeichnet den initialen Zustand vor dem vollständigen Ausbruch der klassischen Arthrose. Sie ist durch anfängliche Knorpelschäden und strukturelle Veränderungen in den Gelenken gekennzeichnet, die jedoch noch nicht den Grad erreicht haben, um als manifeste Arthrose diagnostiziert zu werden (Luyten et al. 2012). Sie lässt sich somit etwa in die präradiografische Phase einordnen. Die genaue Definition der Früharthrose wird weiterhin kontrovers diskutiert. Aus klinischer Sicht lassen sich als Kriterien für die Diagnose

Schmerzphasen (mindestens zwei von zehn Tagen Dauer im letzten Jahr), in Kombination mit objektiven Parametern wie röntgenologischen Befunden (Kellgen-Lawrence-Grad 0-2), Arthroskopiebefunden (ICRS-Grad 1- 4 in mindestens einem Kompartiment) und spezifischen Veränderungen im MRT anführen (Luyten et al. 2012). In einer Übersichtsarbeit von Madry et al. wurde eine Beteiligung von weniger als 50 % der Knorpeldicke als Früharthrose definiert (Madry et al. 2016).

Als weitere Unterkategorie lässt sich die fokale Arthrose nennen. Diese bezieht sich auf eine Form der Arthrose, bei der degenerative Veränderungen auf einen begrenzten Bereich eines Gelenks beschränkt sind. Im Gegensatz zur generalisierten Arthrose, die das gesamte Gelenk betrifft, konzentriert sich die fokale Arthrose auf bestimmte Regionen innerhalb des Gelenks. Diese Form der Arthrose tritt besonders häufig aufgrund von lokalen Belastungen, Verletzungen oder anatomischen Besonderheiten auf und kann ebenso zu einer Degeneration des gesamten Knorpels mit konsekutiver Arthrose des gesamten Gelenks führen. (Southworth et al. 2019; Haseeb und Haqqi 2013).

Verschiedene genetische, metabolische, mechanische oder umweltbedingte Faktoren können zu einer Schädigung des Knorpels führen. Diese geht einher mit der Freisetzung knorpelspezifischer Autoantigene, die wiederum eine Immun-/Entzündungsreaktion im Sinne einer Arthrose aktivieren können. Dabei ist eine vermehrte Infiltration von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in das geschädigte Gewebe zu beobachten. Die aktivierten Immunzellen setzen verschiedene Moleküle wie Zytokine, Chemokine und weitere katabole Faktoren, wie MMPs und PGE2 frei, die weitergehend zu einem Knorpelabbau führen können (Haseeb und Haqqi 2013). Abbildung 4 verdeutlicht die zentrale Rolle, die die Immunpathologie innehält und zu einem komplexen immunologischen Krankheitsbild führt.

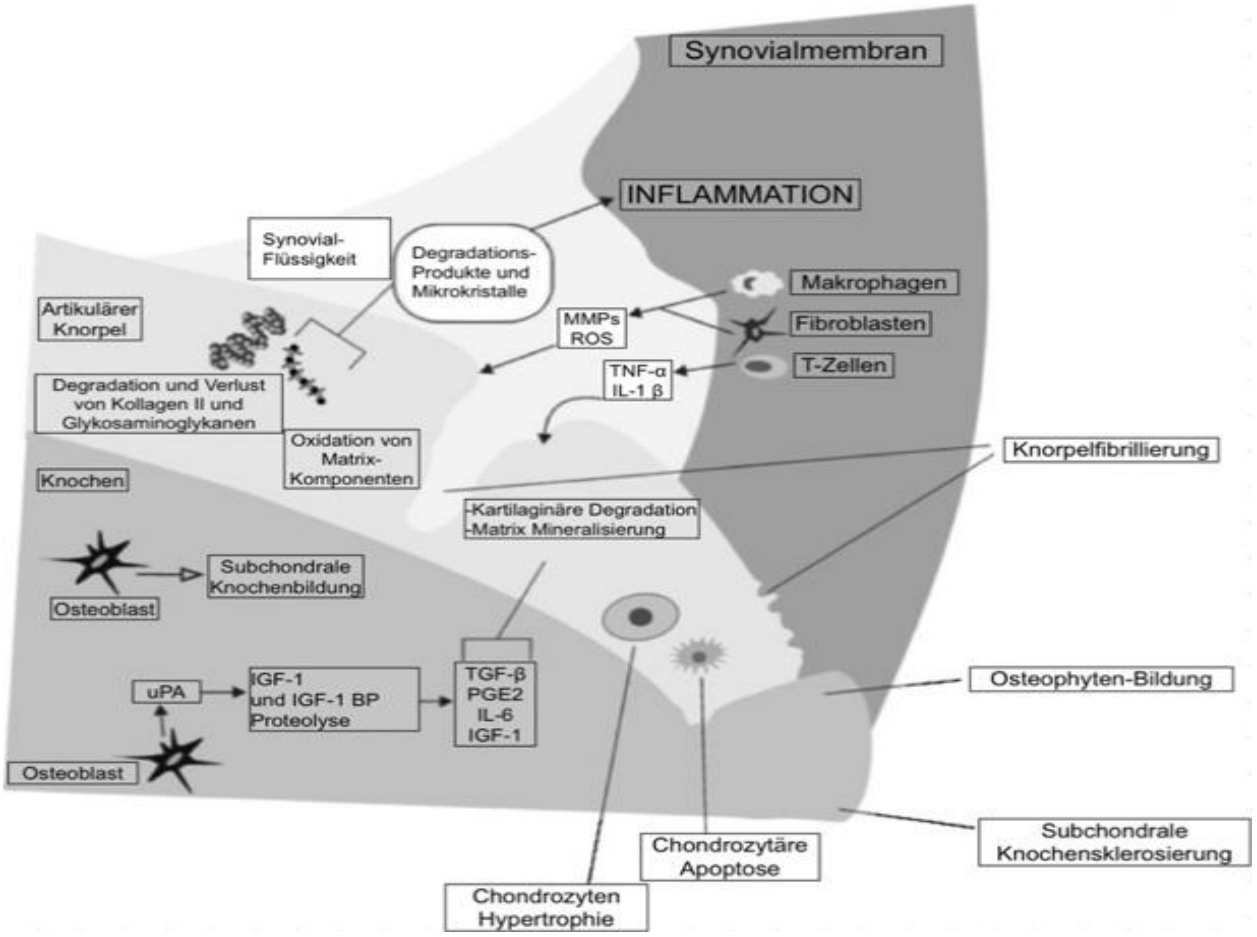

Abb. 4: Die wichtigsten molekularen und zellulären Veränderungen, die im Synovialspalt bei Arthrose und Synovitis auftreten. Das Schema verdeutlicht die Wirkungen der verschiedenen inflammatorischen Zellen und Mediatoren. ROS: reaktive Sauerstoffspezies, modifiziert nach Mobasheri et al. 2014.

Zytokine sind eine heterogene Gruppe kleiner löslicher und unlöslicher Proteine, die von Zellen sekretiert werden und eine spezifische Wirkung auf die Interaktion zwischen Zellen haben. Sie sind von großer Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Gelenk-Homöostase. Zu den Zytokinen zählen Lymphokine (von Lymphozyten gebildete Zytokine), Monokine (von Monozyten gebildete Zytokine), Chemokine (Zytokine mit chemotaktischer Wirkung) und Interleukine (von einem Leukozyten gebildete Zytokine, die auf andere Leukozyten wirken). Zytokine können autokrin, parakrin oder seltener endokrin wirken (Liu et al. 2021). Es existieren sowohl inflammationsfördernde Zytokine als auch inflammationshemmende Zytokine. Weiterhin gibt es klare Hinweise darauf, dass bestimmte Zytokine/Chemokine nicht nur an der Auslösung, sondern auch an der Aufrechterhaltung pathologischer Schmerzen beteiligt sind, indem sie nozizeptive sensorische Neuronen direkt aktivieren

(Zhang und An 2007). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass drei Arten von Zytokinen einen großen Einfluss auf den Gelenkknorpel haben. Dazu zählen anabole Zytokine, z. B. Wachstumsfaktoren, katabole Zytokine, die zum Abbau von Knorpelgewebe führen können und antikatabole Zytokine, die katabole Effekte hemmen. Bei vorliegender physiologischer Homöostase interagieren Zytokine lokal und treten aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit nur begrenzt in Entzündungsprozessen auf. Bei bestimmten Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis ist ein systemisches Auftreten zu beobachten (Pablos und Cañete 2013; Sellam und Berenbaum 2012).

1.4 TNFα

Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) gilt zusammen mit IL-1β als eines der wichtigsten entzündlichen Zytokine, die an den pathophysiologischen Prozessen im Verlauf der Arthrose beteiligt sind. Kou et al. zeigten in einer Meta-Analyse, dass der Polymorphismus TNFalpha-G308A mit einem erhöhten Risiko für Arthrose verbunden ist (Kou und Wu 2014). TNFα ist einer der 19 Liganden innerhalb der Tumor-Nekrose-Faktoren-Superfamilie (TNF-Superfamilie) und wird ursprünglich als homotrimeres Transmembranprotein vom Typ II (mTNFα) gebildet, das in einem nächsten Schritt unter Beteiligung der Metalloproteinase TACE/ADAM17 freigesetzt wird, wobei eine freie Form von TNFα (sTNFα) entsteht.

Sowohl sTNFα als auch tmTNFα sind biologisch aktiv und können mit TNFα Rezeptor 1 (TNFR1) und TNFα Rezeptor 2 (TNFR2) interagieren. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Membran-Glykoproteine, die sich auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen befinden (Tracey et al. 2008). Zahlreiche immunologische, aber auch nicht-immunologische Zellen haben die Fähigkeit, TNFα zu produzieren. Im Knorpelgewebe wird das Zytokin hauptsächlich von Makrophagen aus der Synovia, sowie artikulären Chondrozyten gebildet (Lange-Brokaar et al. 2012). Erhöhte Konzentrationen von TNFα werden weiterhin in denselben Komponenten beobachtet, in denen auch erhöhte IL-1β-Werte festgestellt werden, beispielsweise in der Synovialflüssigkeit, der Synovialmembran, dem Knorpel und der subchondralen Knochenschicht (Wojdasiewicz et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-1β die Expression von TNFα stimuliert und umgekehrt (Kobayashi et al. 2005). Beide Zytokine haben eine

synergistische, katabole Wirkung auf den Knorpel und induzieren die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Prostaglandin E2, NO und anderen katabolen Markern. Weitere inflammatorische Mediatoren wie NO, COX-2, Fibronektin oder Phospholipase A2 stimulieren zusätzlich die Produktion von TNFα. Chen et al. zeigten, dass TNFα das Potenzial hat, die mechanischen Eigenschaften der Chondrozyten zu verändern (Chen et al. 2015). Aufgrund seines Stellenwerts in der Pathophysiologie der Arthrose wird TNFα auch als diagnostischer Biomarker der Arthrose in frühen Stadien diskutiert, wo eine Degeneration des Gelenks meist röntgenologisch noch nicht nachweisbar ist.
TNFα als biochemischer Marker für die Kniearthrose hat sich dabei als vielversprechend für die Evaluation der Wirksamkeit von Therapien erwiesen. Weiterhin wird TNFα als Marker für den Progress einer Arthrose aufgeführt (Mabey und Honsawek 2015).
Die Therapie der Arthrose basiert im Allgemeinen auf Schmerzlinderung und dem Erhalt der Gelenkfunktion, gefolgt von verschiedenen chirurgischen Eingriffen und schließlich dem Gelenkersatz. Pharmakologisch werden im Rahmen klinischer Studien zahlreiche "krankheitsmodifizierende Wirkstoffe" getestet, darunter unter anderem Entzündungshemmer, sowie Hemmer der katabolen Enzyme wie MMP-Inhibitoren, IL1-Inhibitoren, TNFα-Inhibitoren oder plättchenreiches Plasma (PRP). Ein nachhaltiger therapeutischer Erfolg im Sinne eines Aufhaltens der Degeneration des Knorpelgewebes konnte bisher nicht erreicht werden (Matsushita und Kuroda 2014).
Bei mittelschwerer Form der Arthrose sind nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs) als Therapieoption indiziert, welche mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil und geringen Kosten einhergehen (Niemeyer et al. 2013).

1.5 Knorpelregenerative Verfahren

Die Techniken, die für die Behandlung fokaler Knorpeldefekte zur Verfügung stehen sind zahlreich und variieren bezüglich Evidenz und klinischer Anwendungserfahrung.
Der symptomatische, vollschichtige, fokale Knorpelschaden bei fehlender Arthrose stellt die klassische Indikation zur knorpelregenerativen Therapie dar. Daten aus dem Knorpelregister der DGOU weisen jedoch auf eine degenerative Genese in etwa 60 % der behandelten Fälle hin (Niemeyer et al. 2022; Niemeyer 2016). Die Behandlungsstrategien werden aktuell auf Größe und Lage der Läsion, der Beteiligung des subchondralen Knochens und besonderen Ansprüchen des Patienten abgestimmt (Hinckel et al. 2021).

Das Empfehlungsschreiben der deutschen AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk nennt als Kriterien zur Auswahl eines Verfahrens die beste (Langzeit-) Prognose und die geringste Invasivität der Behandlung. Sie betont weiterhin auch einen Einbezug der Wirtschaftlichkeit. Die Defektgröße wird auch hier als bester Parameter zur Entscheidungsfindung herangezogen und das Prinzip der Zuordnung von Therapien in Abhängigkeit von verschiedenen Defektgrößen designiert, wie Abbildung 5 zeigt (Niemeyer et al. 2022)

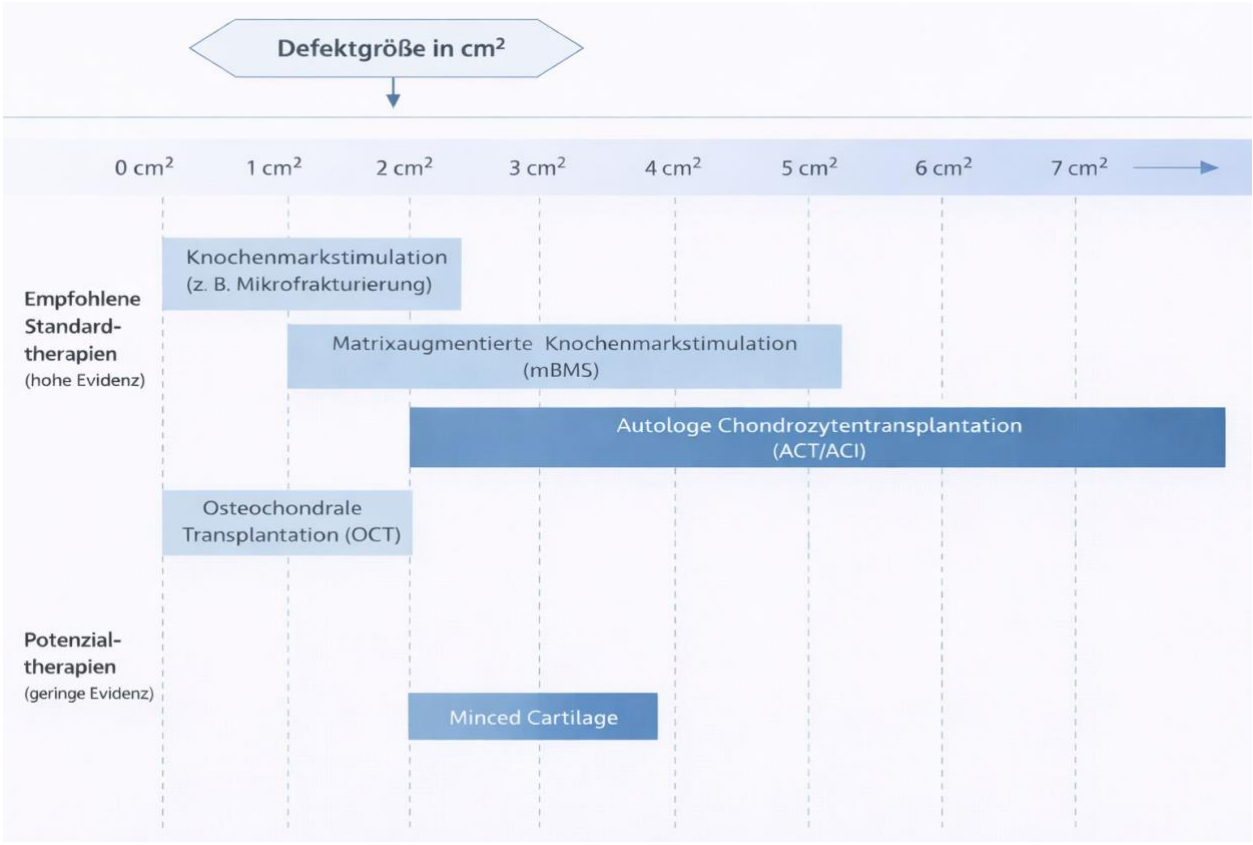

Abb. 5: Auswahl eines knorpelregenerativen Verfahrens anhand der Defektgröße, modifiziert nach Niemeyer et al. 2022.

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), stellt den aktuellen Goldstandard für die Reparatur großer (2 cm^2) chondraler Defekte dar (Niemeyer et al. 2022; Niemeyer et al. 2013). Weiterhin aufzuführen sind Mikrofrakturierung, matrixaugmentierte Knochenmarkstimulation, deren klinische Anwendung derzeit überwiegend im Grenzbereich zwischen der Indikation zur autologen Chondrozytentransplantation und den matrixfreien knochenmarkstimulierenden Techniken liegt, der Einsatz von

osteochondralen Auto- und Allografts, sowie die Transplantation von mikrofragmentiertem Knorpelgewebe als Minced Cartilage (Niemeyer et al. 2022).

Eine Übersichtsarbeit von Deng et al. zeigte, dass zellbasierte Knorpelbehandlungen grundsätzlich eine signifikant bessere Wirksamkeit aufwiesen als zellfreie Behandlungen (Deng et al. 2016). Die arthroskopische Mikrofrakturierung, bei der gezielt auf der Kortikalis unterhalb der Knorpelläsion kleine Verletzungen gesetzt werden, hat in den letzten Jahren aufgrund ihrer im Vergleich zu anderen Methoden unterlegenen Regeneratsqualität und, als Folge der Perforation entstehender, subchondraler Pathologien an Bedeutung verloren. Auch histologisch weist die Mikrofrakturierung schlechtere Ergebnisse als andere Knorpelreparaturtechniken auf. Dennoch wird sie als Standardmethode für die Behandlung von Knorpelschäden bis zu einer Fläche von 2 cm^2 empfohlen (DiBartola et al. 2016). In einer Studie von Ossendorff et al. konnten jedoch keine kohärenten statistischen Unterschiede zwischen autologer Chondrozytentransplantation und Mikrofrakturierung bei kleinen Defekten in Bezug auf die Regeneratqualität festgestellt werden (Ossendorff et al. 2019). Auch die osteochondrale Transplantion (OCT) hat bei rein chondralen Knorpelschäden aufgrund der invasiven Entnahme der benötigten Gewebe-Zylinder und konsekutiver Entnahmemorbidität in Deutschland an Bedeutung verloren (Niemeyer et al. 2022).

Die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) ist eine zellbasierte, bereits etablierte Technik zur Reparatur symptomatischer isolierter Läsionen des Gelenkknorpels und wurde 1987 von M. Brittberg und L. Peterson eingeführt (Peterson et al. 2002). Das Verfahren umfasst dabei zwei operative Schritte. Zunächst wird das Gelenk arthroskopisch untersucht und bei Vorliegen einer geeigneten Läsion erfolgt die Entnahme einer kleinen Menge Knorpel aus einem gering belasteten Bereich des Gelenks (Brittberg et al. 1994). Das entnommene Gewebe wird in speziellen Labors enzymatisch verdaut und die Chondrozyten in einer Monolayer-Zellkultur expandiert.

Diese Expansion ist notwendig, um eine ausreichende Zellzahl für die Durchführung des Verfahrens zu erhalten. Zeitgleich gibt es jedoch Hinweise darauf, dass der Kultivierungsprozess zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten führen könnte (Darling und Athanasiou 2005; Hong und Reddi 2013). Die zweite Phase umfasst eine Arthrotomie oder einen arthroskopischen Eingriff mit direkter Beurteilung der Läsion, folgender

Abtragung des beschädigten Knorpels und Einbringen des Transplantats, entsprechend angepasst an die Defektform (Biant und Bentley 2007).

Die ACT lässt sich in verschiedene Generationen einteilen. Bei der ersten Generation der ACT-Technik wird ein Lappen aus Periost über dem Defekt vernäht und die Versiegelung mit Gewebekleber verstärkt. Die expandierten Chondrozyten werden dann darunter injiziert. In der zweiten Generation kommt anstatt des Periostlappens eine Membran (z.B. aus Kollagen) zum Einsatz. (Bentley et al. 2003)

Die Matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT) lässt sich als jüngste Entwicklung der ACT einordnen. Hierbei werden die Chondrozyten bereits zuvor auf eine Matrix aufgetragen, die dann auf den Defekt zugeschnitten wird. Im Bereich der natürlichen Matrizen sind insbesondere Kollagenscaffolds relevant, deren Nutzung aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und Chondrozytenanhaftung attraktiv ist (Irawan et al. 2018).

Weiterhin besteht die Möglichkeit der Anwendung der gelbasierten matrixassoziierten Knorpelzelltransplantation. Ein mit Chondrozyten angereichertes Albumin-Hyaluronsäuregel wird hierbei arthroskopisch oder durch eine Miniarthrotomie in den Knorpelschaden injiziert, wo sich so nach kurzer Zeit ein resorbierbares Hydrogel bildet, welches dafür sorgt, dass die Chondrozyten am Ort der Applikation verbleiben (Selmi et al. 2008).

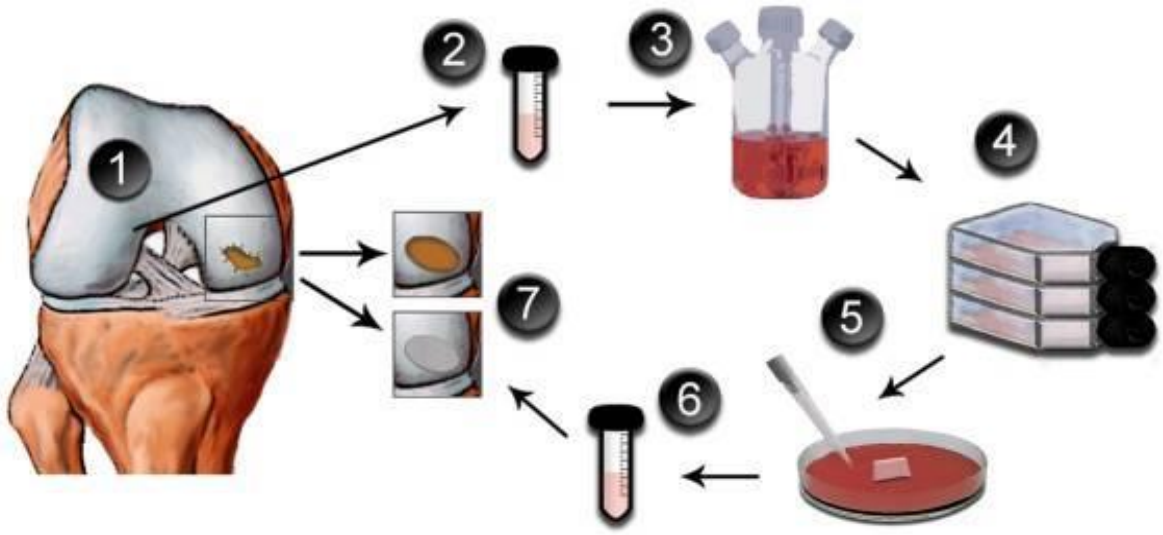

Abb. 6: Verfahren der matrixunterstützten autologen Chondrozytenimplantation (MACT): (1) 1. Operation: Entnahme von Gelenkknorpel aus gering belasteten Regionen des Gelenks; (2) Überführung ins Labor; (3) enzymatischer Aufschluss; (4) Kultur und Expansion auf Monolayer; (5) Auftragung auf Matrix; (6) Überführung in den Operationssaal; (7) 2. Operation: Reimplantation. Modifiziert nach Jacobi et al. 2011.

Das Einbringen des Transplantates in arthroskopischem Vorgehen kann sich technisch sehr anspruchsvoll gestalten und die Zellviabilität der eingebrachten Chondrozyten beeinträchtigen. So wurde in einer Studie von Biant et al. festgestellt, dass die Zellviabilität in arthroskopisch eingebrachten Transplantaten um 16-fach niedriger war als in offen implantierten (Biant et al. 2017).

Um diese Einschränkung zu überwinden, kann eine Anzüchtung der Chondrozyten in Form von 3D-Aggregaten erfolgen. Dies führt zur Bildung von sogenannten Sphäroiden, autologen Chondrozyten, die in ihrer eigenen extrazellulären Matrix verkapselt und selbsthaftend sind. Aufgrund dieser Eigenschaften, lassen sie sich sehr gut arthroskopisch einbringen und haften innerhalb von 20 Minuten auf dem Grund eines Defekts (Vonk et al. 2021). Danach kann die chirurgische Wunde ohne zusätzliche Abdeckung des behandelten Bereichs oder Fixierung der Sphäroide mit Fibrinkleber geschlossen werden (CHMP). Der sonstige Ablauf entspricht weitgehend der herkömmlichen MACT.

Aufgrund der hohen Spendermorbidität und der Notwendigkeit von zwei Operationen muss die klinische Indikation für ACT sorgfältig gestellt werden. Diese ist gegeben bei

Vorliegen eines vollschichtigen symptomatischen Knorpelschadens Grad III-IV nach ICRS und OD-Stadium 3 und 4 nach ICRS mit einer Defektgröße ab 2,5 cm² und einem Patientenalter zwischen 15 bis 55, wobei die Anwendung bei Kindern und Jugendlichen individuell möglich ist. Kontraindikationen stellen eine generalisierte Arthrose, entzündliche Gelenkerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, Achsfehlstellung >3-5 Grad und ursächliche Begleitpathologien, die nicht mitbehandelt werden, dar (Peterson et al. 2002). Die ACT führt in histologischer, mechanischer und klinischer Hinsicht zu einem großen Anteil an hyalinartigem Gewebe. Sie wirkt sich vorteilhaft auf die Haltbarkeit aus und scheint bei größeren Läsionen wirksam zu sein (Richter et al. 2016). Pareek et al. wiesen in einer systematischen Übersichtsarbeit ein erfolgreiches klinisches Ergebnis von etwa 82 % nach 10 Jahren nach (Pareek et al. 2016). Allerdings kann es zwei bis drei Jahre nach der Transplantation dauern, bis das Implantat morphologisch dem reifen Knorpelgewebe ähnelt (DiBartola et al. 2016). Die größte Problematik der ACT stellt der mit der Expansion der Zellen einhergehende Dedifferenzierungsprozess der Chondrozyten dar.

Weitere wichtige Einschränkungen der ACT sind bisher eher kurze Nachbeobachtungszeiten in Studien (unter 5 Jahren), sowie das Vorliegen zahlreicher Daten aus veralteten ACT-Generationen, die inzwischen nicht mehr angewandt werden (Mistry et al. 2017).

1.6 Minced Cartilage Implantation (MCI)

Der Verwendung von zerkleinerten oder partikulierten Knorpelchips (Minced Cartilage Implantation) wurde in letzter Zeit vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet. Dabei kam es auch zu vermehrten Aufkommen klinischer Studien. So zeigten sich in 5 Jahres Daten von Runer et al. gute Ergebnisse nach Angaben der Patienten, niedrige Komplikationsraten und eine lange Lebensdauer des Transplantats (Runer et al. 2023). Massen et al. und Cole et al. publizierten jeweils 2 Jahres Daten, die insgesamt ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse nach Einsatz des Minced Cartilage Verfahrens mit Alternativpotenzial zur standardmäßigen autologen Chondrozytentransplantation oder Mikrofrakturierung zeigten (Massen et al. 2019; Cole et al. 2011). Insbesondere im Vergleich zu anderen Verfahren ist jedoch von einer begrenzten klinischen Evidenz zu sprechen. Die Technik wurde erstmals bereits 1983 von Albrecht beschrieben (Albrecht

1983) und stellt eine einzeitige chirurgische Option dar, die frisches, lebensfähiges autologes Gewebe mit minimaler Morbidität und geringen Kosten liefern könnte (Evuarherhe et al. 2022). Ein entscheidender Unterschied zu anderen zellbasierten Verfahren ist, dass nicht nur autologe Zellen, sondern Chondronen-Strukturen, mit Chondrozyten und extrazellulärer Matrix transplantiert werden.

Von der deutschen AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden wird die Knorpelchipsplastik derzeit als Potenzialmethode aufgeführt (Niemeyer et al. 2022).

Bei der Methode der Minced Cartilage Implantation wird das betreffende Gelenk nach erfolgter Bildgebung häufig zunächst arthroskopisch inspiziert und die endgültige Indikation gestellt. Die Technik variiert je nach betroffenem Gelenk und kann arthroskopisch oder offen erfolgen (Schneider et al. 2021) . Der geschädigte Bereich wird debridiert und die Läsion ausgemessen. Die darauffolgende Entnahme von gesundem Knorpelgewebe kann aus verschiedenen Quellen erfolgen: Nach der Präparation und Debridements des Knorpeldefekts kann gesunder Knorpel mit einer Ringkürette oder einem Shaver vom Defektrand entnommen werden. Dabei wird der Defektdurchmesser nur geringfügig vergrößert und zeitgleich sichergestellt, dass die verbleibenden Knorpelränder defektfrei sind (Salzmann et al. 2020). Weitere Möglichkeiten stellen sogenannte „Loose Bodies“ (freie Gelenkkörper in der Gelenkkapsel), die rein chondral sind und makroskopisch gesund erscheinen dar, oder es können Fragmente von Osteochondritis dissecans (OCD) genutzt werden. Wenn die zuvor aufgeführten Optionen nicht durchführbar sind, kann die Entnahme aus nicht belasteten Bereichen, beispielsweise interkondylär erfolgen. Die Morbidität an der Entnahmestelle ist dabei minimal (Salzmann et al. 2020).

Aurich et al. wiesen eine bessere Redifferenzierung von Chondrozyten, die vom Rand des Defekts entnommen wurden, als von Chondrozyten aus nicht belasteten Regionen nach. Weiterhin zeigte sich in dieser Studie ein erhöhtes Redifferenzierungspotenzial von Chondrozyten, die mit einer Knorpelläsion assoziiert sind, was insgesamt für die Entnahme von Knorpelläsionsrändern spricht (Aurich et al. 2018).

Der entnommene Knorpel wird fragmentiert, zum Beispiel mittels Skalpells, üblicherweise der Größe 10, oder eines Shavers mit sogenannten „Tissue Collector“. Optimal ist die Herstellung einer Knorpelpaste oder kleiner Knorpelchips <1mm³. Als Vorteile des

Einsatzes eines Shavers gegenüber eines Skalpells werden eine schnellere Zerkleinerung und eine homogenere Fragmentierung des Knorpels angeführt (Schneider et al. 2021). Häufig wird bei der Minced Cartilage Implantation zunächst eine dünne Schicht Fibrinkleber in den Defekt gegeben und darauffolgend die Paste aus Knorpelfragmenten aufgetragen. Die Fixierung der Fragmente erfolgt meist mittels einer zweiten Schicht Fibrinkleber.

Fibrin ist ein hochmolekulares, nicht wasserlösliches Protein, das bei der Blutgerinnung durch die enzymatische Wirkung von Thrombin aus Fibrinogen (Gerinnungsfaktor I) gebildet wird. Es wird aufgrund seiner Rolle bei der Blutstillung und Gewebereparatur, sowie seiner vollständigen biologischen Abbaubarkeit in großem Umfang als Gewebeversiegelung eingesetzt (Sproul et al. 2018).

Fibrinkleber können dabei sowohl autologen, als auch allogenen Ursprungs sein, wobei autologe Varianten aus Vollblut oder konzentrierten Blutfraktionen wie Platelet Rich Plasma (PRP; deutsch: plättchenreiches Plasma) gewonnen werden. Auf den aufgefüllten Defekt wird im Anschluss eine Membran platziert und mit dem umliegenden vitalen Knorpelgewebe vernäht (Salzmann et al. 2017; Schneider et al. 2021).

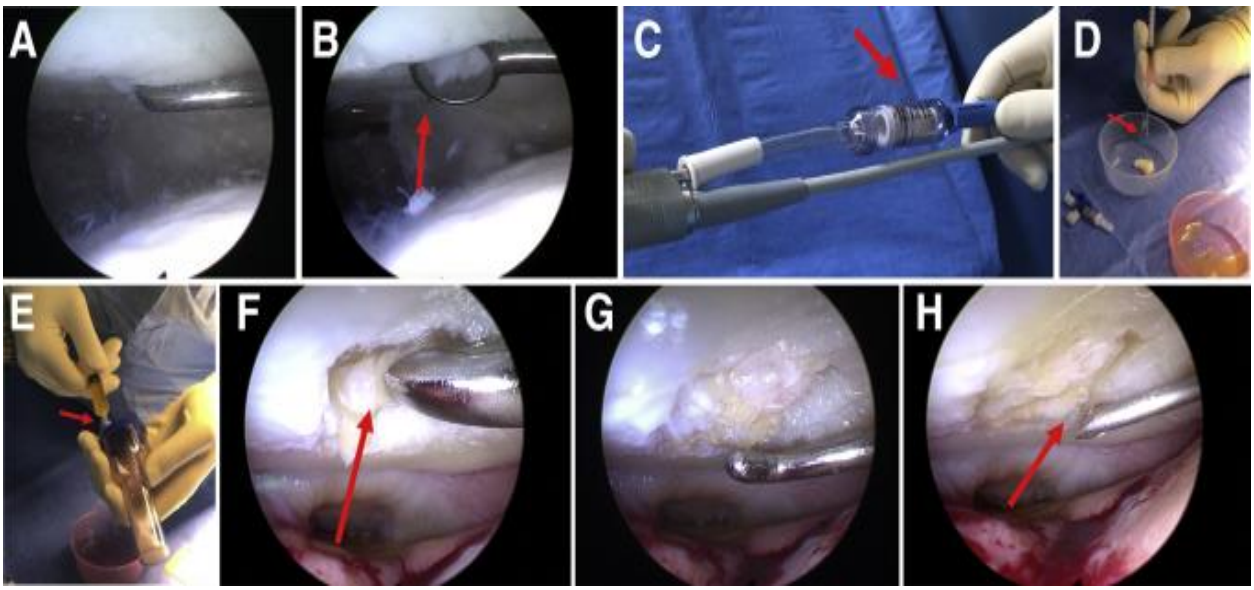

Abb. 7: Arthroskopische Versorgung eines retropatellaren chondralen Defekts mittels Tissue Collectors und Thrombin im Sinne der MCI, modifiziert nach Schneider et al. 2021.

Viele grundlegende Fragestellungen, wie z. B. eine potenzielle Kombination des Verfahrens mit autologen Blutprodukten (wie etwa beim Autocart-Verfahren der Firma Arthrex), der Einsatz von Matrizen ähnlich wie bei der MACT oder die Notwendigkeit der Defektdeckung mit einem Biomaterial oder mit autologem ortsständigen Gewebe sind noch nicht gänzlich geklärt. Diese fehlenden Informationen werden von der deutschen AG Klinische Geweberegeneration als Grund für die Einstufung als Potenzialmethode angeführt. Die aktuellen Indikationskriterien für die Minced Cartilage Implantation beinhalten das Vorliegen von nicht refixierbaren „Flakes“ (osteochondralen Knorpel-Knochenfragment im Gelenk), rein chondralen Verletzungen, nicht refixierbaren Osteochondrosis Dissecans-Läsionen oder chronischen osteochondralen Defekten mit einer Defektgröße von 1-1,5 cm² bis 8-10 cm². Weiterhin sollten die Gelenke bandstabil sein, die Beinachse varus/valgus maximal 2-3 Grad betragen und ein intakter Umgebungsknorpel mit maximaler Chondromalazie von Grad zwei nach ICRS, sowie ohne „Kissing-Lesions“ vorliegen. Kontraindikationen liegen analog zur MACT vor (Zimmerer et al. 2023).

Das Minced Cartilage-Verfahren ist kostengünstig (kein Bedarf an Allotransplantaten oder teuren Instrumenten/Biomaterialien/Techniken), einfach und schnell mittels Arthrotomie durchführbar und sicher, denn durch die Verwendung von patienteneigenem Gewebe, Zellen und Plasma besteht nur eine sehr geringe Gefahr, dass es zu einer Abstoßungsreaktion kommt (Domínguez Pérez et al. 2019).

Weiterhin ist es einzeitig und somit für den Patienten von geringerer Invasivität als eine ACT. Ein Kultivierungsprozess ist nicht von Nöten.

Studien haben belegt, dass Knorpelchips eine chondrogene Funktion bei der Behandlung osteochondraler Defekte einnehmen. So förderte ihre Anwesenheit, verglichen mit einer reinen autologen Knorpelzelltransplantation, nach der Behandlung eines osteochondralen Defekts im Tiermodell die Bildung von Faserknorpel anstelle von fibrösem Gewebe, es zeigte sich eine Förderung der Chondrogenese und eine solide Regeneration des hyalinen Knorpels, sowie reifes Knorpelgewebe im Defekt und ein Kollagenexpressionsmuster im neu gebildeten Knorpel, das dem des angrenzenden gesunden Gelenkknorpels in der histologischen Untersuchung ähnelt. (Domínguez Pérez et al. 2019; Frisbie et al. 2009; Marmotti et al. 2013b; Christensen et al. 2016).

Eine Übersichtsstudie aus dem Jahr 2020 von Christensen et al. kam zu dem Schluss, dass die Implantation von allogenem und autologem partikulierten Knorpel eine kostengünstige und wirksame Behandlungsalternative zur Mikrofrakturierung und zur Transplantation autologer Chondrozyten darstellt (Christensen et al. 2020).
In klinischen Anwendungen zeigten Minced Cartilage Verfahren zufriedenstellende mittelfristige Ergebnisse und führen zu einer signifikanten Verbesserung gemessen an klinischen Scores (Massen et al. 2019; Tseng et al. 2020; Wodzig et al. 2022).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Daten aus dem Knorpelregister der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) zeigten, wie zuvor bereits angeführt, dass Knorpelreparaturen in 60 % aller Fälle bei degenerativen, nicht-traumatischen Läsionen durchgeführt werden (Niemeyer 2016). Folglich kommen knorpelregenerative Verfahren häufig in frühen Phasen der Arthrose und damit in einer gestörten Gelenk-Homöostase zur Anwendung. Angele et al. wiesen nach, dass die Rate von Transplantatversagen in degenerativer Umgebung ansteigt, was mit proinflammatorischen Zytokinen in Verbindung gebracht wurde (Angele et al. 2015). Erhöhte Konzentrationen von Zytokinen wie TNFα können dabei zur Destruktion von Knorpelgewebe, Synovitis und anhaltenden Schmerzen führen (Mabey und Honsawek 2015). Der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine führt zu einer katabolen Verschiebung, die möglicherweise die progressive Kaskade der Arthrose auslöst. Es ist notwendig die Potenziale knorpelregenerativer Verfahren unter inflammatorischen Bedingungen besser einschätzen zu können, um die Wahrscheinlichkeit eines Behandlungserfolgs zu erhöhen (Angele et al. 2015). Wir stellten die Hypothese auf, dass die Reifung eines Transplantats zur Knorpelrekonstruktion durch ein inflammatorisches Milieu negativ beeinflusst wird. TNFα wurde den Chondrozyten-Kulturen, beziehungswiese den Minced Cartilage Präparaten zugesetzt, um ein inflammatorisches Milieu wie bei Arthrose zu simulieren, welches die Chondrogenese hemmen könnte. Weiterhin nahmen wir an, dass diese negative Beeinflussung bei autologen Chondrozyten mit zunehmender Passagierung durch Dedifferenzierungsprozesse zunimmt. Außerdem stellten wir die Hypothese auf, dass die katabole Wirkung von TNFα in den Minced Cartilage Präparaten schwächer ausfallen würde, als in denen der autologen Chondrozytentransplantation.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Artikuläre Chondrozyten wurden aus Rinderfesselgelenken isoliert. Bei den Spendern handelte es sich um 6-24 Monate alte Kälber, die am selben Tag von einem örtlichen Metzger für die Nahrungsmittelproduktion geschlachtet wurden.

Nach der Entnahme von Gelenkknorpel wurden die Chondrozyten unterschiedlich weiterverarbeitet, um die verschiedenen Gruppen herzustellen. P0 (Passage 0) beschreibt den Zustand der primären Zellen direkt nach dem Aufschluss und P3 (Passage 3) den Zustand der Zellen nach drei Passagen der in vitro Monolayer-Expansion (Populationsverdopplungsrate 5-7). Knorpelchips (MC) liegen in Form nativen Knorpels mit mehreren Zell-Matrix-Fragmenten vor. Es folgte eine Ruhephase von einer Woche, in der lediglich das Medium gewechselt wurde, um in den entsprechenden Pelletkulturen eine chondräre Redifferenzierung ermöglichen zu können. Nach Ablauf der sieben Tage, erfolgte die Gewinnung von Samples in allen Subgruppen für den Tag 0, sowie eine Einteilung der übrig gebliebenen Samples in Kontroll- und TNFα-Gruppe in allen 3 Subgruppen (P0, P3, Minced Cartilage). In der TNFα-Gruppe wurde dem Medium 1 µl/ml TNFα zugesetzt. Während der gesamten Zeit des Experiments wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Nach 14 Tagen endete der experimentelle Durchlauf und die Proben wurden den einzelnen Analysen zugeführt. Dieser experimentelle Ablauf wurde viermal mit verschiedenen Spendern wiederholt. Anschließend erfolgte die weitere Analyse.

Zellisolation:

Nach Entfernung der Haut des Fesselgelenks erfolgte unter sterilen Bedingungen eine Arthrotomie. Der Gelenkknorpel wurde in Stücken mit einer Größe <10 mm² entnommen und in 30 ml PBS-P/S 10 % überführt. Für die Minced Cartilage-Gruppe wurde das Knorpelgewebe in Gegenwart von PBS mit einem chirurgischen Skalpell in kleinere Fragmente (~1mm^3) geschnitten und nicht weiter verdaut. Es erfolgte nach Ermittlung des Nassgewichts die Zugabe von Fibrin/Thrombin Kleber auf eine 48 Well Platte verteilt. Die restlichen entnommenen Gewebestücke wurden gewogen und 2-mal für 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie mit Pronase (0,1 %) für 105-120 Minuten bei 37°C,

5 % CO2 und 95 % Luftfeuchtigkeit verdaut. Vorverdauter Knorpel wurde dann 3x mit 60 ml PBS-P/S 1 % gewaschen und anschließend in 600 U/ml Kollagenase 2 in 60 ml DMEM über Nacht (14 h) bei 37°C, 5 % CO2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in einer Spinnerflasche verdaut. Die isolierten Chondrozyten in Suspension wurden mit 40 ml DMEM mit 25 % FBS verdünnt. Diese Suspension wurde durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert und bei 565G für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, in 25 ml DMEM 10 % FBS resuspendiert und zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml DMEM 10 % FBS suspendiert und in einem Hämozytometer gezählt. 50 µl der Zellsuspension wurden in 50 µl Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Ungefähr 5 Millionen Chondrozyten wurden in einer T300-Kulturflasche mit 50 ml DMEM 10 % FBS für die weitere Zellkultur ausgesät.

Subkultur von konfluenten Monolayern (P3):
Die Zellablösung und Passagierung wurde eingeleitet, wenn die Monolayerkulturen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten. Das Medium wurde entfernt und die Monolayer-Zellen wurden zweimal mit PBS-1 % P/S gewaschen. Kollagenase 2 300 U/ml und 0,5 mg/ml Trypsin in 10 ml PBS wurden hinzugefügt. Die Zellen wurden etwa 30 Minuten lang bei 37°C, 5 % CO2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um den Verdau zu stoppen, wurde die Suspension mit 10 ml DMEM 10 % FBS verdünnt und bei 565 G, 10 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen gewaschen und zentrifugiert.
Nach Entfernen des Zellüberstandes wurden die Zellen in 10 ml DMEM/10 % FBS 2-mal resuspendiert und erneut zentrifugiert und dann mit einem Hämozytometer gezählt. Eine Suspensionsmenge von 5 Millionen Chondrozyten wurde in T300-Kulturflaschen ausgesät und erneut kultiviert, bis eine Konfluenz von 80-90 % erreicht war. Dieser Vorgang wurde bis zum 3. Durchgang über eine Gesamtdauer von etwa 3 Wochen wiederholt. Die in einem CO2-Inkubator (37,5°C, 5 % CO2, 95 % Luftfeuchtigkeit) aufbewahrten Flaschen wurden täglich inspiziert und das Nährmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

2.2 Biochemische Analyse

Das gesammelte Medium wurde vor der Analyse in einem Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Die für die Quantifizierung von DNA, GAG und Hydroxy-Prolin ausgewählten Proben wurden in Röhrchen (1,5 ml) überführt, die 1 ml Proteinase K in einer Konzentration von 0,5 mg/ml enthielten. Sie wurden für den Verdau über Nacht bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K 10 Minuten lang bei 95°C durch Hitze inaktiviert und die Proben bei -20°C gelagert.

DNA-Quantifizierung:

Die DNA-Quantifizierung erfolgte mittels Hoechst-Spektrofluorometrie.

Diese Methode basiert auf der Verstärkung der Fluoreszenz bei Bindung von Bisbenzimidazol (Hoechst 33258) an die DNA. Rohe Homogenate, in denen das Chromatin mit einem Hochsalzpuffer dissoziiert wurde, können innerhalb weniger Minuten direkt und zuverlässig untersucht werden. Die Dissoziation des Chromatins ist entscheidend für die genaue Bestimmung der DNA in biologischen Materialien mit dieser Methode. Mit dem Assay können bereits 10 ng DNA mit relativ einfachen Instrumenten nachgewiesen werden (Labarca und Paigen 1980) . Für die Standardkurve wurde die Kalbsthymus-DNA-Stammlösung mit DPBS in einer seriellen Verdünnung von 2000/1000/500/250/125/62,5ng pro Well einer 96-Well-Platte verdünnt. DPBS mit einer hohen Salzkonzentration wurde hinzugefügt, um Fluoreszenzinteraktionen zu reduzieren. 40 µl DNA-Standard oder PK-verdaute Probe und 160 µl Assay-Lösung wurden in jede Vertiefung gegeben und 20 Minuten lang reagieren gelassen. Alle Proben wurden in Duplikaten bei 360 nm Anregung und 565 nm Fluoreszenzemission gemessen.

GAG-Quantifizierung:

Zur Bestimmung von sulfatierten Glykosaminoglykanen wurde ein spektrophotometrisches Verfahren angewandt. Der Papain-Verdau des Gewebes oder Kulturmediums lieferte Glykosaminoglykane in Lösung für den Test; ein Aliquot des Verdaus wurde mit dem Farbstoff 1,9-Dimethylmethylenblau gemischt. Der Test basiert auf der metachromatischen Verschiebung des Absorptionsmaximums, die auftritt, wenn der Farbstoff mit sulfatierten Glykosaminoglykanen komplexiert wird. Das Reagenz ist

stabil, die Methode ist im Wesentlichen störungsfrei und empfindlich auf weniger als 1 Mikrogramm (4 Mikrogramm/ml) Chondroitinsulfat (Farndale et al. 1982).
Eine Standardkurve wurde durch Verdünnung von Chondroitinsulfat mit 2,5/ 1,25/ 0,625/ 0,3125/ 0,156/ 0,078 µg pro Vertiefung einer 96-Well-Platte erstellt. Als Verdünnungsreagenzien wurden PBS für PK-verdaute Proben und DMEM-10 % FBS für das Medium verwendet. 50 µl der Proben wurden in jede Vertiefung gegeben und 200 µl DMMB-Reagenz hinzugefügt. Jede Probe wurde bei 535 nm in zweifacher Ausführung gemessen.

Hydroxy-Prolin-Assay:
Der Gesamtkollagengehalt wurde anhand der Hydroxyprolin-Konzentration bestimmt. Dazu wurden Proben in Proteinase K über Nacht säurehydrolysiert und nach der Neutralisierung die Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Chloramin-T gemessen.

IL-6 ELISA:
Nach Zugabe einer IL-6 Capture-Antikörper-Arbeitslösung auf eine Platte wurde diese bei Raumtemperatur für 12-24 Stunden inkubiert. Es folgte ein Verwerfen der Capture-Antikörper-Arbeitslösung und die Zugabe eines Blockierungspuffers, der für 1-3 Stunden inkubiert und danach ebenfalls verworfen wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Standard/Probe in die entsprechenden Wells, wobei eine Standardreihe mit den Verdünnungen 25/12,5/6,25/3,13/1,56/0,78/0,39 ng/ml, sowie die gesammelten Medium-Proben genutzt wurden. Nach einstündiger Inkubation und viermaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurden 100 µl der Detektionsantikörper-Arbeitslösung zugegeben und der einstündige Inkubations-und Waschprozess wiederholt. 100 µl Streptavidin-HRP und TMB-Substratlösung wurden nacheinander zugegeben, wobei dazwischen wieder ein viermaliger Waschprozess nach 30-minütiger Inkubation stattfand. Nach abschließender 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mittels Stopplösung gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

NO-Assay (Griess-Reaktion):

Das Griess-Reagenzsystem basiert auf der chemischen Reaktion von Sulfanilamid und N-1-Napththylethylendiamindihydrochlorid (NED) unter sauren Bedingungen und kann die Menge von Nitrit (NO2-), einem von zwei primären, stabilen und nichtflüchtigen Abbauprodukten von Stickstoffmonoxid, quantifizieren.

Eine Standardkurve wurde durch Verdünnung eines 0,1 M Nitrit-Standards mit dem verwendeten Medium mit 100/ 50/ 25/ 12,5/ 6,25/ 3,13/ 1,56 µM auf einer 96-Well Platte erstellt. 50µl der Proben wurden in jede Vertiefung gegeben und 50µl Sulfanilamid, sowie 50 µl NED-Lösung hinzugefügt. Jede Probe wurde in einem Plattenlesegerät mit einem Filter zwischen 520 und 550 nm in zweifacher Ausführung gemessen.

RNA-Extraktion:

Für diesen Versuch wurden Proben in Eppendorf-Röhrchen (2 ml) gegeben, die 1 ml TRI, ein RNA-Isolierungsreagenz, und 5µl Polyacrylträger enthielten. Die Proben wurden mit einem Gewebe-Lyzer-System bei 25 Hz für 3 mal 15 Minuten homogenisiert (MCI 3x15 Minuten, P0 und P3-Konstrukte 1-2x 5 Minuten). Die RNA-Extraktion erfolgte mit TRI-Reagenz nach der modifizierten Fällungsmethode mit Fällungslösung. Zur Phasentrennung wurde Bromchlorpropan (100µl) genutzt. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase, die RNA enthielt, in neue Eppendorf-Röhrchen überführt. Dieser wurde das äquivalente Volumen 70 %-igen Ethanols zugesetzt. Bis zu 700 µl der Probe wurden auf ein RNeasy MINI-Kit-Spin-Säule in einem 2 ml-Sammelröhrchen gegeben und für 30 Sekunden bei 10000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 700 µl Puffer RW1 mit Zentrifugation bei 10000 g bei Raumtemperatur und 500 µl Puffer RPE mit anschließender Zentrifugation bei 10000 g bei Raumtemperatur. Nach Trocknung der Membran durch 2-minütige Zentrifugation (Raumtemperatur, 10000 g) erfolgte die Zugabe von 22 µl DEPC-Wasser direkt auf die Spinsäulenmembran und eine letzte Zentrifugation bei 10000 g zur Elution der RNA. Die RNA-Quantifizierung erfolgte mit Nano-Drop Software Die Verhältnisse A260/A280 (1) und A260/A230 (2) wurden als Indikator für die Reinheit der RNA herangezogen. Das erforderliche Volumen von 1 µg RNA für die reverse Transkription wurde beachtet.

Reverse Transkription:

Bei der reversen Transkription (RT) wurde cDNA aus RNA unter Verwendung von TaqMan-Reagenzien für die reverse Transkription und 1 µg RNA-Probe in einem Gesamtvolumen von 20 µl erzeugt. Als Primer wurden random-Hexamere hinzugefügt. Gemessen wurden die Proben mit einem Implen Nanophotometer, das einen ersten Schritt der Primer-Inkubation bei 25°C für 10 Minuten, die reverse Transkription für 30 Minuten bei 48°C und die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C für 5 Minuten umfasste.

Taq-man RT-PCR:

Die TaqMan Real Time PCR wurde mit dem QuantStudio 6 Flex von Applied Biosystems auf 384 Well-Platten durchgeführt. 2µl der cDNA-Probe wurden mit 8 µl Master Mix gemischt, bestehend aus TaqMan Master Mix, Primer, Sonde und DEPC-Wasser. Genexpression von bovinem Kollagen 1, Kollagen 2, Kollagen 10, COMP (oligomeres Knorpelmatrixprotein), PRG-4 (Proteoglykan), MMP 3 (Matrix-Metallo-Proteinase), MMP 13, IL-6, IL-8 und TNFα und wurden gemessen. Genutzt worden sind Primer und Sonden mit definierten bovinen Sequenzen.

In der Vergleichsmethode wurden die gemessenen CT-Werte auf die durchschnittlichen CT-Werte von 18S (CT) und auf Tag 0 (CT) normiert. Die relative mRNA-Expression wurde mit der 2^-CT-Methode berechnet. Das PCR-Verfahren bestand aus 10 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen mit Dissoziation bei 95°C (15 Sekunden) und Annealing/Extension bei 60°C (1 Minute)

2.3 Histologie und Immunhistochemie

Proben, die einer histologischen und immunhistochemischen Analyse unterzogen wurden, wurden zur Fixierung in Fläschchen mit 70 % Methanol überführt. Vor der Analyse wurden sie bei 4°C gelagert. Die Proben wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen, in Flaschen mit PBS überführt und bei 4°C gelagert. Anschließend wurde jede Probe in ein Gewebegefriermedium gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Proben in eine Halterung überführt und mit einem Kryostat-Mikrotom kryotechnisch präpariert. Die 10-µm-Kryoschnitte wurden bei -20°C gelagert.

Safranin O/Fast Green:

Die Safranin O/Fast Green-Färbung wurde zum Nachweis der Ablagerung von extrazellulärer Matrix (Proteoglykane: rot, Muzine und Kollagene: grün) durchgeführt. Die Objektträger wurden zehn Minuten lang mit entionisiertem Wasser gewaschen, um das Gefriermedium zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger zehn Minuten in Weigerts Hämatoxylin und zehn Minuten in Leitungswasser blau gefärbt, um die Chondrozyten (dunkelviolett bis schwarz) zu färben. Nach dem Spülen in deionisiertem Wasser wurden die Schnitte sechs Minuten lang mit Fast Green gefärbt, gefolgt von einer Differenzierung in 1 %-iger Essigsäure. Die Färbung mit Safranin O (0,1 %) erfolgte für 12 Minuten. Es folgten mehrere Dehydratisierungsschritte von 70 % auf 96 % Ethanol (einige Sekunden) und schließlich auf absoluten Alkohol (2x 2 Minuten). Nach Xylol-Inkubation (2x 2min) wurden die Objektträger mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt.

Immunhistochemie von Kollagen Typ 1 und 2:

Zum Nachweis von Kollagen Typ 1 und 2 als Bestandteil der Extrazellularmatrix verwendeten wir das Vectastain Elite ABC Kit als Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-basierte indirekte Färbemethode. Die Kryoschnitte der mit Methanol fixierten Proben wurden mit dH2O gewaschen, um die Kryoverbindung zu entfernen, und 30 Minuten lang in 99 %-igem Methanol mit 0,3% H2O2 inkubiert. Nach der Hyaluronidase-Behandlung (0,1 U/ml) wurde Pferdeserum zugesetzt, um die Bindung an unspezifische Komponenten zu blockieren. Primäre Antikörper gegen Kollagen 1 (2,35 µg/ml) oder 2 (10,88 µg/ml) und PBS als Negativkontrolle wurden für 30 Minuten zugegeben, gefolgt von sekundären biotinylierten (kovalente Bindung Biotin) Anti-Maus-IgG-Antikörpern und schließlich einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Anschließend färbte 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) das spezifisch gebundene Zielantigen durch mehrere Peroxidase-Enzymmoleküle braun. Als Gegenfärbung wurde Mayersches Hämatoxylin verwendet.

Aktive Caspase 3-Färbung:

Die Apoptose wurde durch Immunfärbung von anti-aktiver Caspase 3 mit ABC und DAB in einer Immunfärbung über Nacht analysiert. Die Kryoschnitte wurden gewaschen und mit Ziegenserum 1:20 verdünnt mit PBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Der primäre Antikörper gegen aktive Caspase 3, ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper, wurde über Nacht in einer feuchten Kammer mit PBS-T und Ziegenserum 1:200 verdünnt.

Der zweite Antikörper war biotinyliertes Anti-Kaninchen-IgG (H+L) 1:200 in PBS-T. Die Reaktion wurde mit dem ABC-Komplex und ImmPACT DAB-Lösung sichtbar gemacht. Als Gegenfärbung ist Mayer‘s Hämatoxylin verwendet worden.

2.4 Statistik

Für die Statistik wurde die Software SPSS (Version 27.0) verwendet. Mittels Kruskal Wallis Test wurden die Werte auf Normalverteilung geprüft.

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde als nichtparametrischer Test angewandt, um signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen als unabhängige Variablen und relative mRNA, GAG, NO, IL-6 und DNA als abhängige Variablen zu ermitteln. $P < 0{,}05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Die Diagramme für die Genexpression sind als Boxplots dargestellt. Die Daten der Genexpression wurden durch natürlichen Logarithmus transformiert, um eine Verzerrung zu vermeiden.

3. Ergebnisse

3.1 Chondrogene Marker

Zur Untersuchung der Qualität des Knorpelgewebes wurden sogenannte chondrogene Marker wie Kollagen 2 und Proteoglykane, sowie Glykosaminoglykane herangezogen. Diese zeigten Einflüsse durch das zugesetzte proinflammatorische Zytokin TNFα, sowie unterschiedliche Expressions- bzw. Synthesemuster in den verschiedenen Vergleichsgruppen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Die Kontrollgruppe der Minced Cartilage Konstrukte entspricht histologisch nativem Knorpel. Für die histologische Aufarbeitung von artikulärem Knorpelgewebe wird auf die Arbeit: „Autologous Chondrocyte Implantation in Osteoarthritic Surrounding“ von Ossendorff et al. verwiesen (Ossendorff et al. 2018).

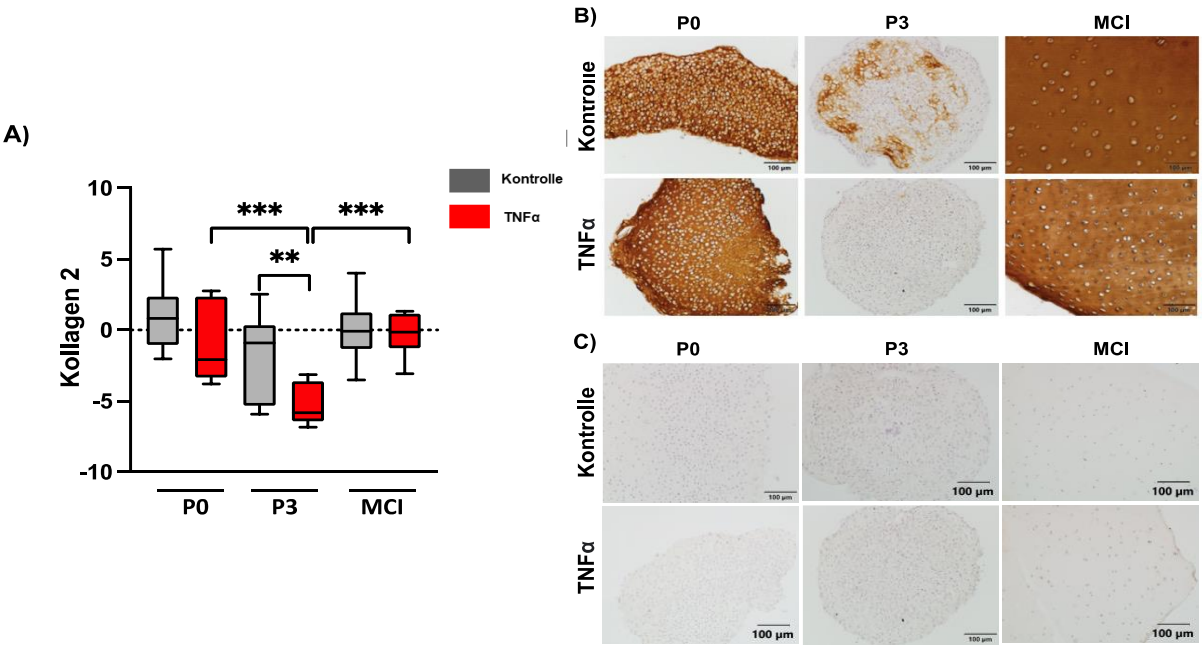

Abb. 8: A) Kollagen-2-Expression von artikulären Chondrozyten aus einem Rinderfesselgelenk im Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus dargestellt und in Boxplots abgebildet. *p <.05 **p<.01. *** p<.001. B): Immun-histochemie für Kollagen 2 von bovinen Chondrozyten der Passage 0 und 3 und Minced Cartilage Präparate. C): Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung. Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα, Maßstab: 100 µm, TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha. P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Wie Abbildung 8 zeigt, fiel bei Untersuchung der Genexpression des knorpelspezifischen Markers Kollagen 2 eine signifikant verminderte Synthese in der TNFα-Gruppe der P3 Spheroidkultur im Vergleich zu der Kontrollgruppe P3 auf (p= 0.006). Die Expression der P3 TNFα-Gruppe war ebenfalls im Vergleich mit den TNFα-Gruppen der Spheroidkultur P0, sowie der Minced Cartilage Präparate signifikant niedriger (p= 0.001 und p<0.001). In der P0 Spheroidkultur, sowie in den Minced Cartilage Präparaten konnten im Vergleich zwischen Kontroll- und TNFα-Gruppe keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Kollagen 2 ist eine Kollagenform, die insbesondere in hyalinem Knorpel vorkommt. Das fibrilläre Netzwerk des Kollagentyps ist entscheidend für die Viskoelastizität des Gewebes, da es Proteoglykane einbindet (Jeffery et al. 1991). Eine verminderte Synthese von Kollagen Typ 2 ist hinweisend für eine Dedifferenzierung des Gewebes. In der immunhistologischen Kollagen 2 Färbung konnten die auf Genexpressionsebene festgestellten Effekte durch eine vermindere Einlagerung von Kollagen 2 in den Spheroidkonstrukten der Passage 3 Chondrozyten bestätigt werden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe der P3 Spheroidkultur zeigt die P3 TNFα-Gruppe eine verminderte Synthese. In der P0 Spheroidkultur sowie in der Minced Cartilage fiel keine verminderte Kollagen 2 Synthese durch Zugabe von TNFα auf, weiterhin wiesen auch die Kontrollgruppen bereits einen höheren Gehalt als die P3 Kontrollgruppe auf.

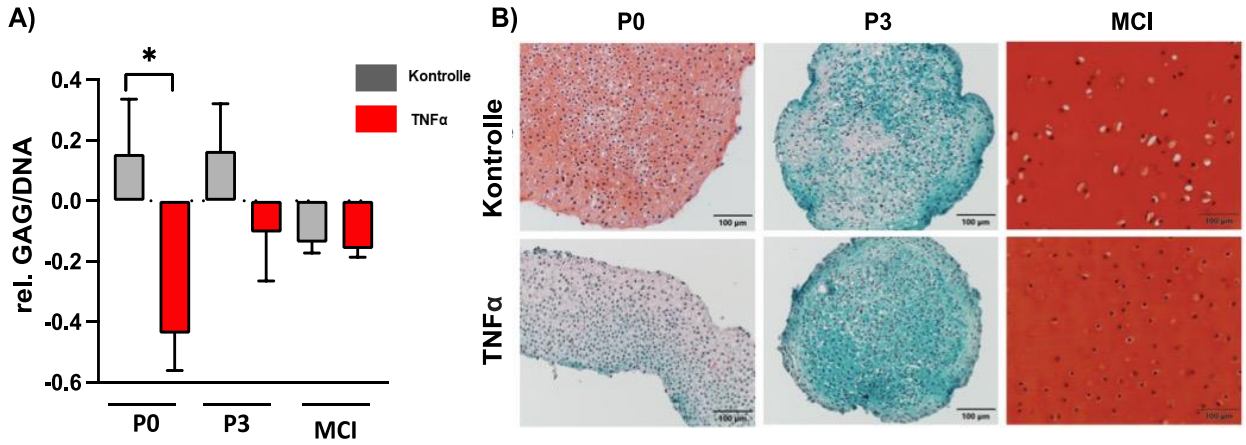

Abb. 9: A): GAG-Quantifizierung von bovinen artikulären Chondrozyten in einem Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) relativ zur DNA und referenziert auf Tag 0. Konzentrationen angegeben in GAG/DNA-Verhältnis (µg/µg). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± 2 SE von 5 Spendern. *p <.05. **p<.01. *** p<.001. B): Safranin O / Fast Green Histologie von bovinen Chondrozyten der Passage 0 und 3, sowie Minced Cartilage Konstrukten Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα, Maßstab 100 µm. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha. P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten

Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Die biochemische Analyse des Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalts aus dem Pellet bzw. dem Knorpelchipskonstrukt ist referenziert auf die DNA der Probe, sowie auf das Verhältnis von GAG und DNA an Tag 0 und in Abbildung 9 A dargestellt. Dieser Referenzwert ist in der P0-TNFα-Gruppe signifikant reduziert (p=0.029), sodass von einem Verlust an GAG ausgegangen werden kann.

Bei der histologischen Untersuchung auf Proteoglykane, die strukturell aus 40-60 O-glykosidisch mit Proteinen verknüpften Gykosaminoglykanen bestehen, zeigten sich, dargestellt in Teil B der Abbildung 9, Differenzen hinsichtlich des Gehalts in allen 3 Subgruppen.

Ein grundsätzlich verminderter Gehalt fiel in der P3 Spheroidkultur auf. Die stärkste Einlagerung von Proteoglykanen in der Matrix zeigte sich mit einer stark rötlichen Einfärbung in Minced Cartilage Präparaten, vergleichbar mit hyalinem Knorpel.

Passage 0 Chondrozyten wiesen eine verringerte Synthese von Proteoglykanen in der TNFα-Gruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dieser Effekt war bei Passage 3 Chondrozyten, sowie den Knorpelchips nicht nachweisbar.

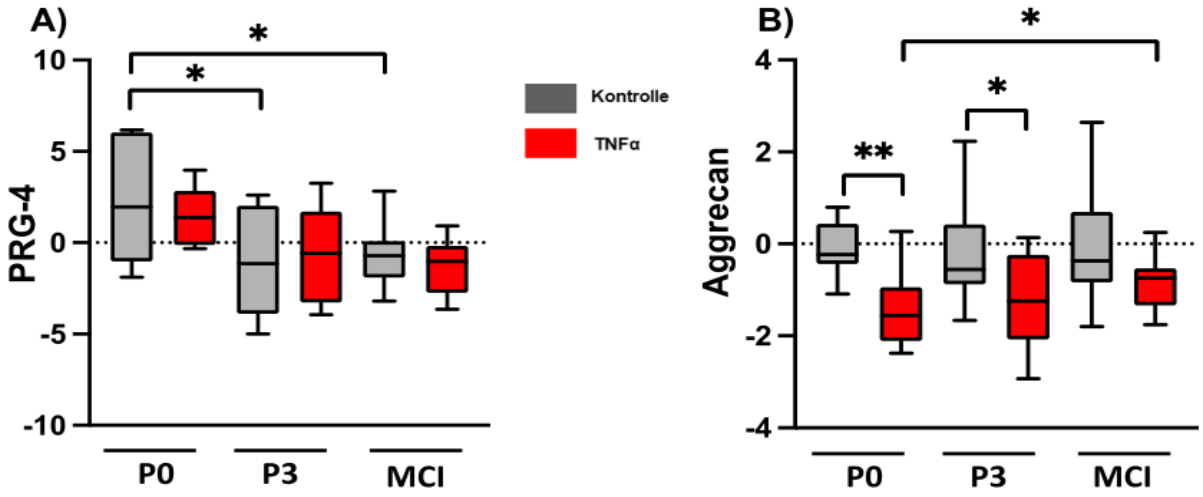

Abb. 10: TNFα-Einfluss (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) auf die Genexpression der chondrogenen Differenzierungsmarker A) PRG4 (Proteoglycan 4) und B) Aggrecan referenziert auf Tag 0. Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus dargestellt und in Boxplots abgebildet. *p <0.05. **p<0.01. ***p < 0.001. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Proteoglykan-4, oder Lubricin, ist ein Proteoglykan, das beim Menschen als Gelenk-Lubrikant wirkt und somit eine Rolle in der physiologischen Funktion von Gelenken einnimmt (Qiao et al. 2020). Abbildung 10 A zeigt: unpassagierte (P0) Chondrozyten wiesen in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Genexpression von PRG-4 auf, als die Chondrozyten der Kontrollgruppen P3 ($p=0.037$) und Minced Cartilage ($p=0.017$). Dieser Effekt war in den TNFα-Gruppen nicht nachzuweisen. Grundsätzlich fiel kein signifikanter Einfluss von TNFα auf die Expression von Proteoglykan-4 auf.

Die Genexpression von Aggrecan, einem Proteoglykan, welches aus den Glykosaminoglykanen Chondroitinsulfat und Keratansulfat besteht und charakteristisch in Knorpel vorkommt (Luo et al. 2017), zeigt in Abbildung 10 B eine signifikante Verminderung in den TNFα-Gruppen der Passage 3- und Passage 0-Chondrozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($p=0.026$ und $p=0.002$). Einzig die Expression in der Minced Cartilage Gruppe schien durch den Zusatz von TNFα nicht beeinflusst zu werden.

3.2 Hypertrophie und Dedifferenzierung

Die Beurteilung von Dedifferenzierung sowie hypertrophischer Prozesse erfolgte anhand einer PCR-Analyse von Kollagen 1 und 10, sowie der immunhistochemischen Färbung von Kollagen 1, dargestellt in Abbildung 11.

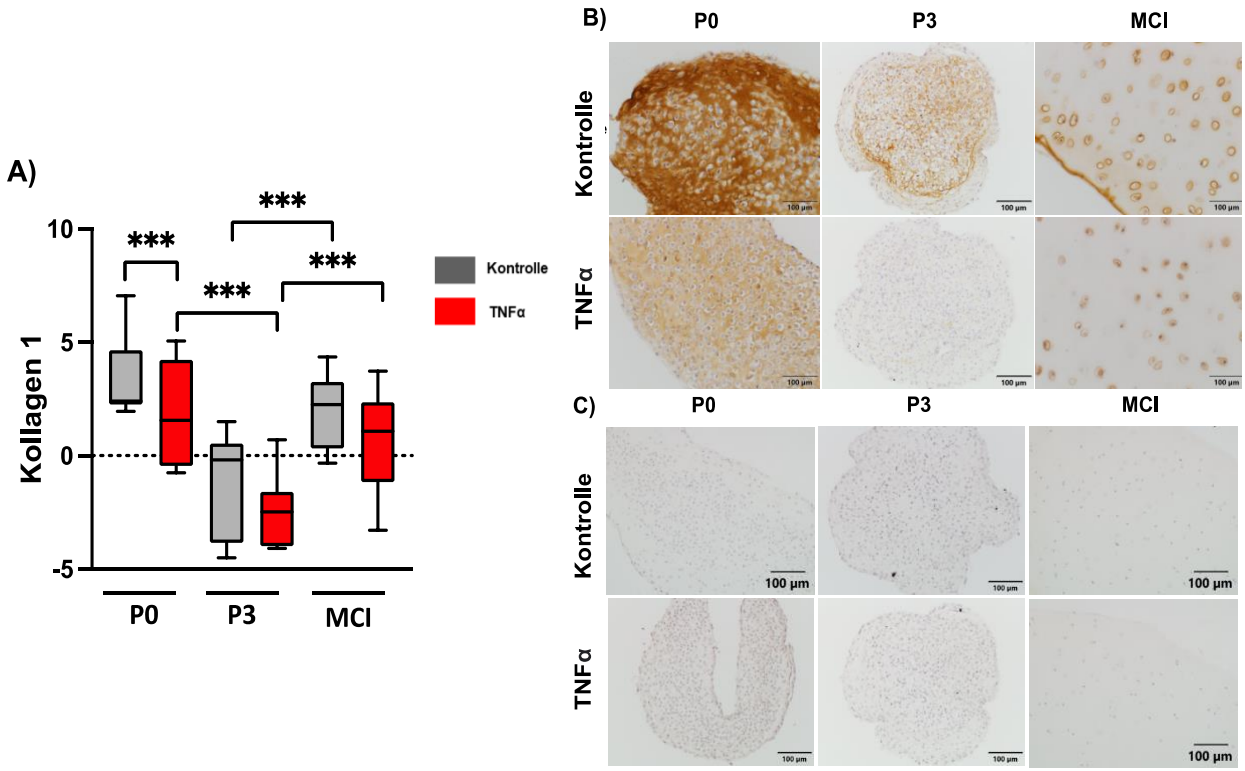

Abb. 11: A) Kollagen-1-Expression von artikulären Chondrozyten aus einem Rinderfesselgelenk im Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα). Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus dargestellt und in Boxplots abgebildet. *p <.05. ** p<.01. *** p<.001 B): Immunhistochemie für Kollagen 1 von bovinen Chondrozyten der Passage 0 und 3 und Minced Cartilage Präparate. C) Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung. Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα, Maßstab: 100 µm. Die Abbildungen fokussieren auf den jeweiligen Befund. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha, P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Die Expression von Kollagen 1 im Gelenkknorpel ist nur geringgradig physiologisch. Kollagen 1 ist wichtig für Strukturbildung und Festigkeit und ein typischer Bestandteil des Faserknorpels. Der Gehalt von Kollagen 1 nimmt mit dem Grad der Degeneration im Gelenkknorpel zu (Styczynska-Soczka et al. 2021).

Die Untersuchung der Genexpression von Kollagen 1 zeigte eine signifikant verminderte Expression in der TNFα-Gruppe der P0-Kultur im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0.001$).

Dieser Zytokin-Effekt war in den Subgruppen P3 und Minced Cartilage nicht nachweisbar. Es zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Expression von Kollagen 1 in der TNFα-Gruppe der P3 Spheroidkultur im Vergleich zu den TNFα-Gruppen der P0 Spheroidkultur und der Minced Cartilage Präparate (p=0.001 und p=0.001).

Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Kollagen 1 deckten sich mit dem Kollagen-1-Genexpressionsmuster. So war in der P0 Spheroidkultur als Zeichen einer insgesamt erniedrigten Matrixsynthese eine geringere Einlagerung von Kollagen Typ 1 nach Zugabe von TNFα erkennbar. Weiterhin zeigte die Extrazellulärmatrix der P3 Chondrozyten einen geringeren Kollagen 1 Gehalt im Vergleich zu der von unpassagierten Chondrozyten. In der P3 Kultur fiel ebenfalls eine Abnahme des Kollagen 1 Gehalts nach Zytokinzugabe auf, die auf Genexpressions-Ebene jedoch nicht nachweisbar gewesen war. In den Minced Cartilage Präparaten war keine Änderung der Kollagen-1-Einlagerung durch TNFα sichtbar.

Kollagen-10 hingegen wird insbesondere der Wachstumszone von Knorpel zugeordnet und als Hypertrophie-Marker herangezogen (Walker et al. 1995).
Ein Einfluss von TNFα auf Kollagen-10 ließ sich auf Genexpressions-Ebene nicht nachweisen, jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Spheroidkulturen und den Minced Cartilage-Präparaten, wie Abbildung 12 darstellt.
Sowohl die Kontroll-, als auch die TNFα-Gruppe zeigten hier eine verminderte Expression im Vergleich zu den Spheroid-Kulturen. Die MCI-Kontrollgruppe wies eine signifikant verminderte Expression von Kollagen-10 im Vergleich zu der P0-Kontrollgruppe (p=0.001) und der P3 Kontrollgruppe auf (p=0.001). Die Minced Cartilage TNFα-Gruppe wies eine signifikant verminderte Kollagen-X-Expression verglichen mit der P3 TNFα-Gruppe auf (p=0.047).

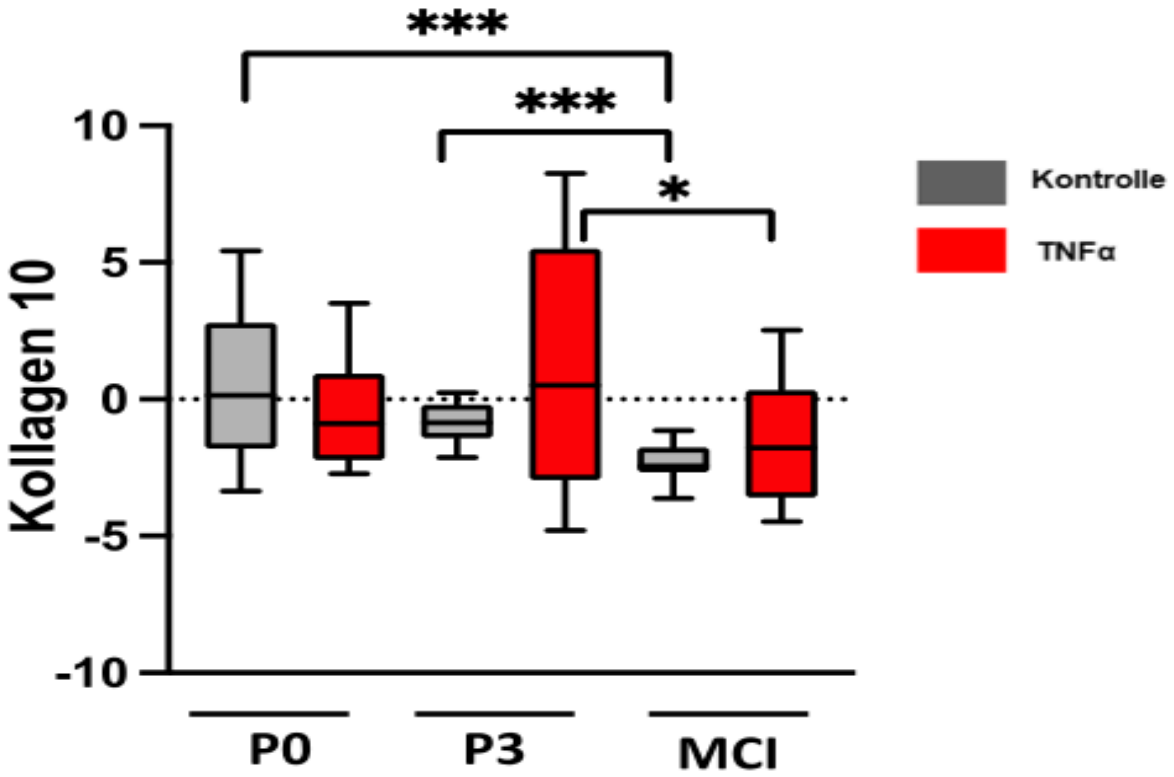

Abb. 12: Kollagen-10-Expression von artikulären Chondrozyten im Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus dargestellt und in Boxplots abgebildet. *p <.05. **p<.01. *** p<.001. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha, P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate.

3.3 Katabole Marker

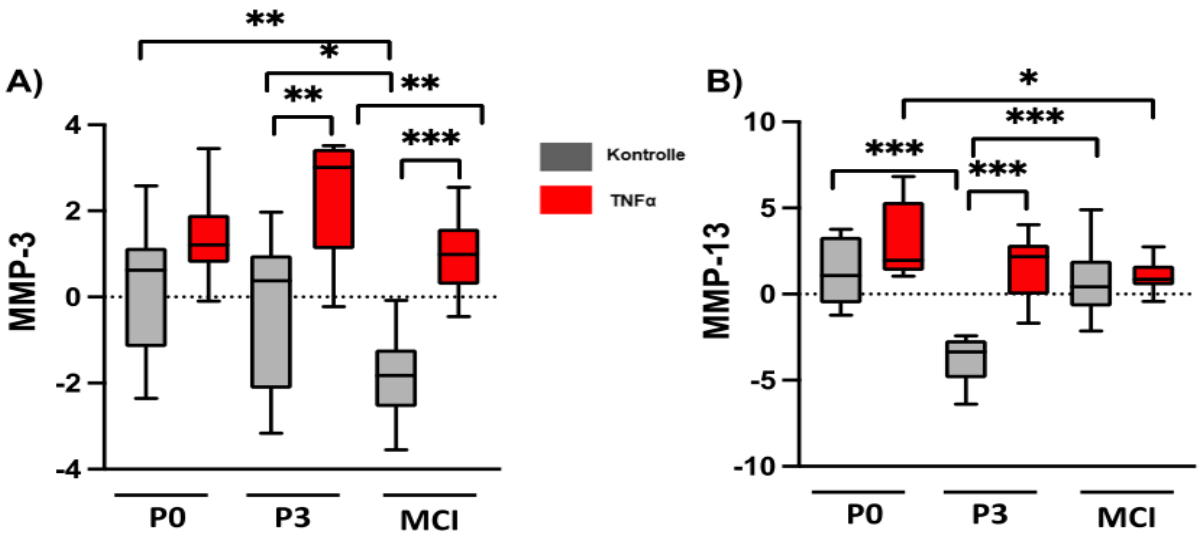

Abb. 13: Einfluss von TNFα (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) auf die Genexpression der katabolen Marker A) MMP3 und B) MMP 13, referenziert auf Tag 0. Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus angegeben und werden in Boxplots dargestellt. *p<.05. **p<.01. *** p<.001. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha, P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0) P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Proteine der Matrix-Metalloproteinase-Familie (MMP) sind am Abbau von extrazellulären Matrixproteinen beteiligt. Eine vermehrte Expression der MMP-3 (Stromelysin-1) und MMP-13 (Kollagenase 3) ist assoziiert mit einem vermehrten unphysiologischen Abbau der Extrazellulärmatrix des Knorpelgewebes. Die aktive Form von MMP-3 ist ein Marker für die Entzündung der Synovialis und den Knorpelumsatz bei entzündlichen Gelenkerkrankungen (Sun et al. 2014).

MMP-13 wird auch als hypertrophischer Marker deklariert und mit der Entwicklung von Arthrose assoziiert (Charlier et al. 2019).

Abbildung 13 stellt die Genexpression von MMP-3 und MMP-13 dar. In der Genexpression von MMP-3 war eine durch TNFα induzierte Hochregulierung in der P3 ($p=0.002$), sowie der Minced Cartilage Gruppe zu erkennen ($p<0.001$), wobei diese in den MCI-Proben signifikant geringer war, als bei P3 ($p=0.006$).

Die P0-Chondrozyten zeigten keine vermehrten katabolen, MMP-3 vermittelten Prozesse durch Zugabe von TNFα. Minced Cartilage wies bezogen auf die Kontrollgruppe eine signifikant geringere Expression von MMP-3 auf, als die Spheroidkulturen P3 ($p=0.031$) und P0 ($p=0.005$).

P0-Chondrozyten zeigten auch in der Genexpression von MMP-13 keinen signifikanten Anstieg in der TNFα-Gruppe und auch die Minced Cartilage Präparate wurden durch die TNFα-Zugabe in ihrem MMP-13 Genexpressionsmuster nicht beeinflusst. In der P3 Gruppe war ähnlich zu MMP-3 ein signifikanter Anstieg in der TNFα-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu bemerken ($p<0.001$). Zeitgleich wies die Kontrollgruppe der P3 Spheroidkultur eine signifikant geringere Expression von MMP-13 auf, als die der Minced Cartilage Präparate ($p<0.001$) und der P0 Spheroidkultur ($p=0.001$). Somit zeigte sich die Expression von MMP-13 in P3 Konstrukten grundsätzlich zwar gegenüber der MCI-Konstrukte verringert, der TNFα Einfluss war jedoch zugleich bei passagierten Chondrozyten signifikant stärker ausgeprägt. Dies wirkte sich entsprechend auf Proteinebene besonders in den P3 Konstrukten durch eine verringerte Matrixeinlagerung aus. Es erfolgte die Analyse von Glykosaminoglykanen (GAG) im Medium, deren Ergebnisse Abbildung 14 zeigt. GAG sind als unphysiologische Abbauprodukte im Medium Hinweis auf katabole Prozesse (Lohmander 1988). Der katabole Effekt des proinflammatorischen Zytokins TNFα mit vermehrter Freisetzung von Gykosaminoglykanen fiel in der P0 Spheroidkultur, sowie bei den Minced Cartilage Präparaten beim Vergleich der TNFα-Gruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe auf ($p<0.001$). Bei passagierten Chondrozyten kam es zu einem gegensätzlichen Effekt und die TNFα-Gruppe zeigte eine signifikant geringere Freisetzung, als die Kontrollgruppe ($p=0.005$). Die Kontrollgruppe Minced Cartilage zeigte eine signifikant geringere Freisetzung von GAG als die Kontrollgruppen der Spheroidkulturen P3 ($p<0.001$) und P0 ($p=0.011$).

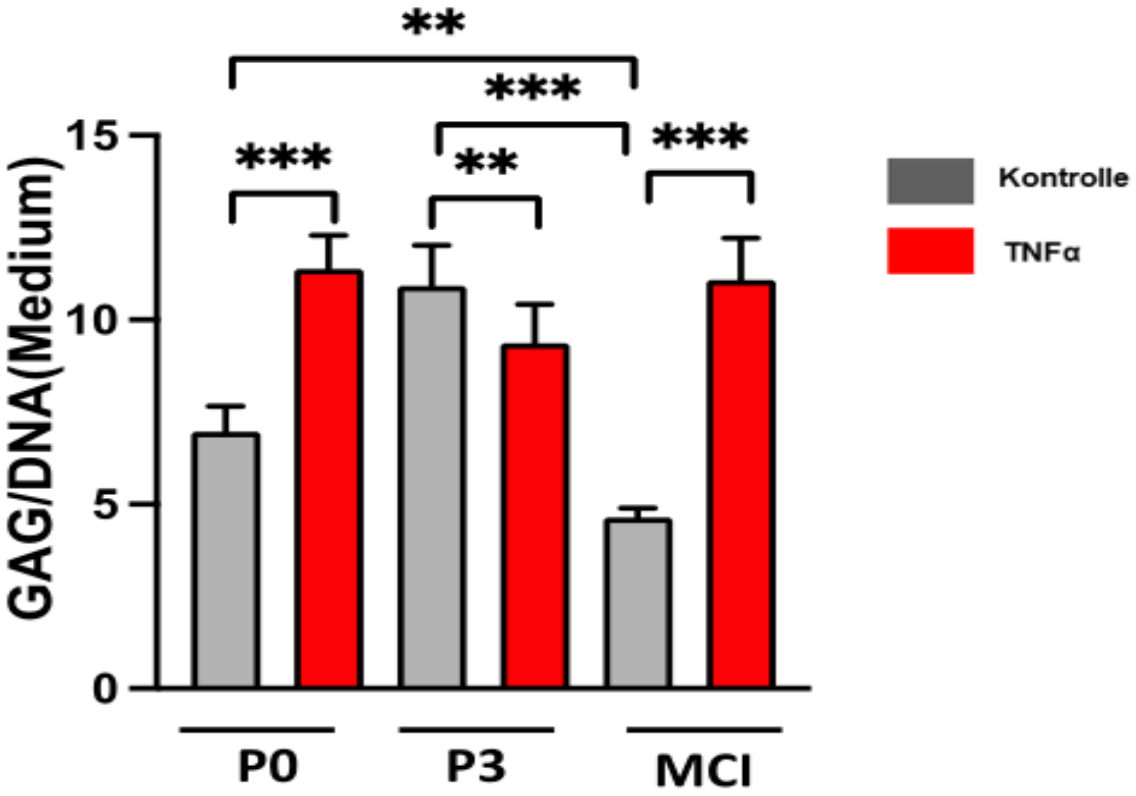

Abb. 14: GAG-Quantifizierung von bovinen artikulären Chondrozyten in einem Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα). Konzentration von GAG/DNA-Verhältnis im Medium (µg/µg). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± 2 SE von 5 Spendern. *p <.05. **p<.01. *** p<.001 P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate.

3.4 Inflammatorische Marker

Zur Beurteilung inflammatorischer Prozesse wurde das Genexpressionsprofil der Zytokine IL-6 und IL-8 untersucht. Weiterhin erfolgte eine Beurteilung des IL-6 und Stickstoffmonoxid-Gehaltes im Medium. An der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, jedoch auch der Arthrose ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Zytokine und Zellen beteiligt, die die Proliferation von Synovialzellen auslösen und Knorpel und Knochen schädigen können. Hierbei nimmt IL-6 eine zentrale Rolle ein (Kondo et al. 2021). Weiterhin ist die bioaktive Form von IL-8 ein wichtiger von Chondrozyten sezernierter neutrophiler chemotaktischer Faktor. Artikuläre Chondrozyten können durch Induktion mittels IL-1β, oder auch TNFα, dazu angeregt werden, das IL-8-Gen zu exprimieren und biologisch aktives IL-8 abzusondern, das die durch Neutrophile vermittelte Inflammation und Destruktion von Knorpelgewebe fördern kann (Lotz et al. 1992).

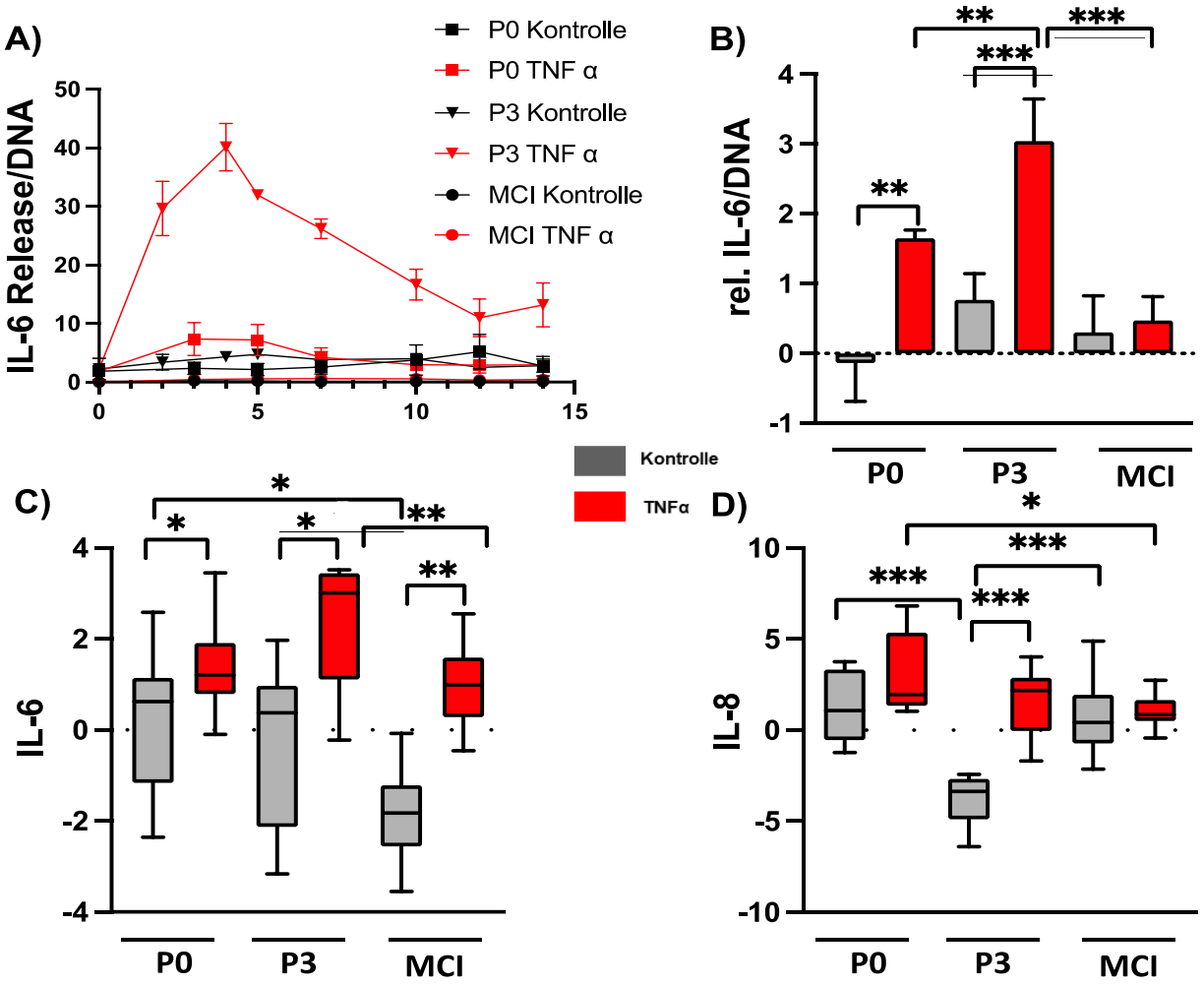

Abb. 15: A) Zeitliche Dynamik der IL-6 Ausschüttung über 14 Tage in das Medium, referenziert auf die DNA- Menge (ng/µg) (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± 2 SE von 5 Spendern B) IL-6 Quantifizierung aus dem Nährmedium (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) relativ zur DNA und referenziert auf Tag 0. Konzentrationen angegeben in IL-6/DNA-Verhältnis (ng/µg). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± 2 SE von 5 Spendern C) IL-6 und D) IL-8-Expression von artikulären Chondrozyten im Inflammationsmodell. Die Ergebnisse sind als natürlicher Logarithmus dargestellt und in Boxplots abgebildet. *p <0.05. **p<0.01. ***p < 0.001. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha, P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate, modifiziert nach Ossendorff et al., 2024.

Auf Genexpressions-Ebene zeigte sich bei beiden genannten Zytokinen eine Reaktion auf TNFα, im Sinne einer signifikanten Erhöhung der Zytokin-Expression, wie Abbildung 15 zu entnehmen ist. In beiden Spheroidkulturen, sowie bei Minced Cartilage Konstrukten war eine signifikante Hochregulation der IL-6-Genexpression im Vergleich zwischen Kontroll- und TNFα-Gruppe festzustellen. (p=0.011, p=0.022 und p=0.003). Die

zytokininduzierte verstärkte Expression war jedoch bei Minced Cartilage signifikant geringer ausgeprägt als in der P3 Spheroidkultur (p=0.002).
Des Weiteren fiel bei Vergleich mit der Kontrollgruppe der P0-Spheroidkultur eine verminderte Expression in der Minced Cartilage Kontrollgruppe auf (p=0.012).
Die P0, sowie die Minced Cartilage Gruppe wiesen hinsichtlich der Expression von IL-8 keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und TNFα-Gruppe auf. Die P3 Spheroidkultur zeigte eine signifikant höhere Expression von IL-8 durch Zugabe von TNFα (p=0.001). Auffällig war jedoch zeitgleich die verminderte Expression von IL-8 in der Kontrollgruppe im Vergleich zu der P0-Spheroidkultur (p=0.001) und Minced Cartilage Konstrukten (p<0.001).
Die biochemische Quantifizierung bestätigte die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und zeigte eine signifikant vermehrte Freisetzung von IL-6 in das Medium bei Zytokinzugabe in der P3-Spheroidkultur (p<0.001). Auch in der P0-Spheroidkultur fiel eine signifikant erhöhte Liberation von IL-6 auf (p=0.01). Eine zytokininduzierte erhöhte Freisetzung konnte bei Minced Cartilage nicht festgestellt werden. Die IL-6-Ausschüttung war bei TNFα zugesetzten, passagierten Chondrozyten signifikant höher als bei Zytokin-exponierten unpassagierten Chondrozyten (p=0.004) und Minced Cartilage Präparaten (p<0.001). Bei Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der IL-6 Sekretion in das Medium konnte ein deutlicher Peak der Ausschüttung, insbesondere in der P3 TNFα-Gruppe, an Tag 4 festgestellt werden.

Abbildung 16 zeigt den Gehalt an Stickstoffmonoxid aus dem gesammelten Medium, der auf den DNA-Gehalt der Probe referenziert worden ist. Die induzierbare NO-Synthase und das von ihr produzierte NO können bei chronischen, nicht erregerbedingten Entzündungen von Bedeutung sein (Guzik et al. 2003) und wurden im Rahmen dieses Experimentes als inflammatorische Marker gewertet.
Eine signifikante Steigerung der NO-Synthese und der Freisetzung in das Medium konnte in der P0, sowie in der Minced Cartilage Subgruppe durch Zugabe von TNFα bemerkt werden (p<0.001). In der P3-Spheoridkultur war dieser Zytokin-Effekt nicht nachweisbar. Weiterhin fiel eine signifikant niedrigere NO-Produktion bei Minced Cartilage Konstrukten auf, sowohl im Vergleich mit den Kontroll-, (p<0.001) als auch den TNFα-Gruppen der Spheroidkulturen (p<0.001).

Die P0 Spheroidkultur zeigte dabei eine geringere Liberation im Vergleich mit der Kontroll- (p=0.001), sowie der TNFα-Gruppe der passagierten Kultur (p=0.021). Auch die zeitliche Dynamik der NO-Freisetzung wurde beobachtet, wobei ein Peak an Tag 3 in der P0 TNFα-Gruppe auffiel.

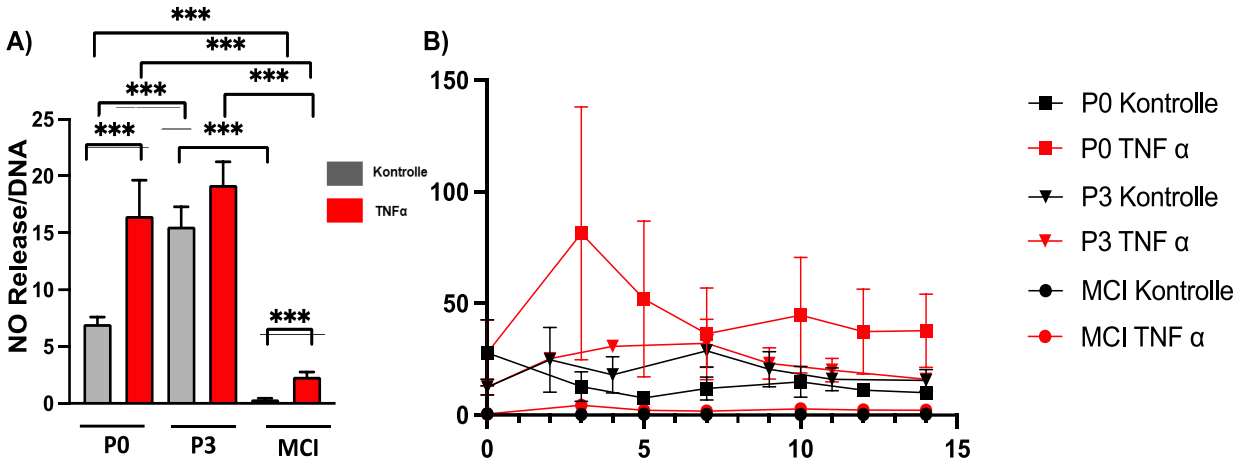

Abb. 16: Quantifizierung der NO-Freisetzung von bovinen artikulären Chondrozyten in einem Inflammationsmodell (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα). A) NO-Quantifizierung aus dem Nährmedium relativ zur DNA. Konzentrationen angegeben in NO/DNA-Verhältnis (µM/µg). B) Zeitliche Dynamik der NO-Ausschüttung über 14 Tage in das Medium, referenziert auf die DNA- Menge (µM/µg). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± 2 SE von 5 Spendern dargestellt. *p <.05. **p<.01. *** p<.001. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha, P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate.

Zur Identifizierung von apoptotischen Zellen wurde eine immunhistochemische Untersuchung auf den Apoptose-Marker Caspase 3 durchgeführt, dargestellt in Abbildung 17. Caspase 3 ist eine Protease und Effektor-Caspase, die nach Aktivierung über Proteinspaltung einen Zellabbau einleitet. In den TNFα-Gruppen der Passage 0 und Passage 3 Chondrozyten konnte eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. In den Minced Cartilage Gruppen konnten keine apoptotischen Effekte von TNFα nachgewiesen werden.

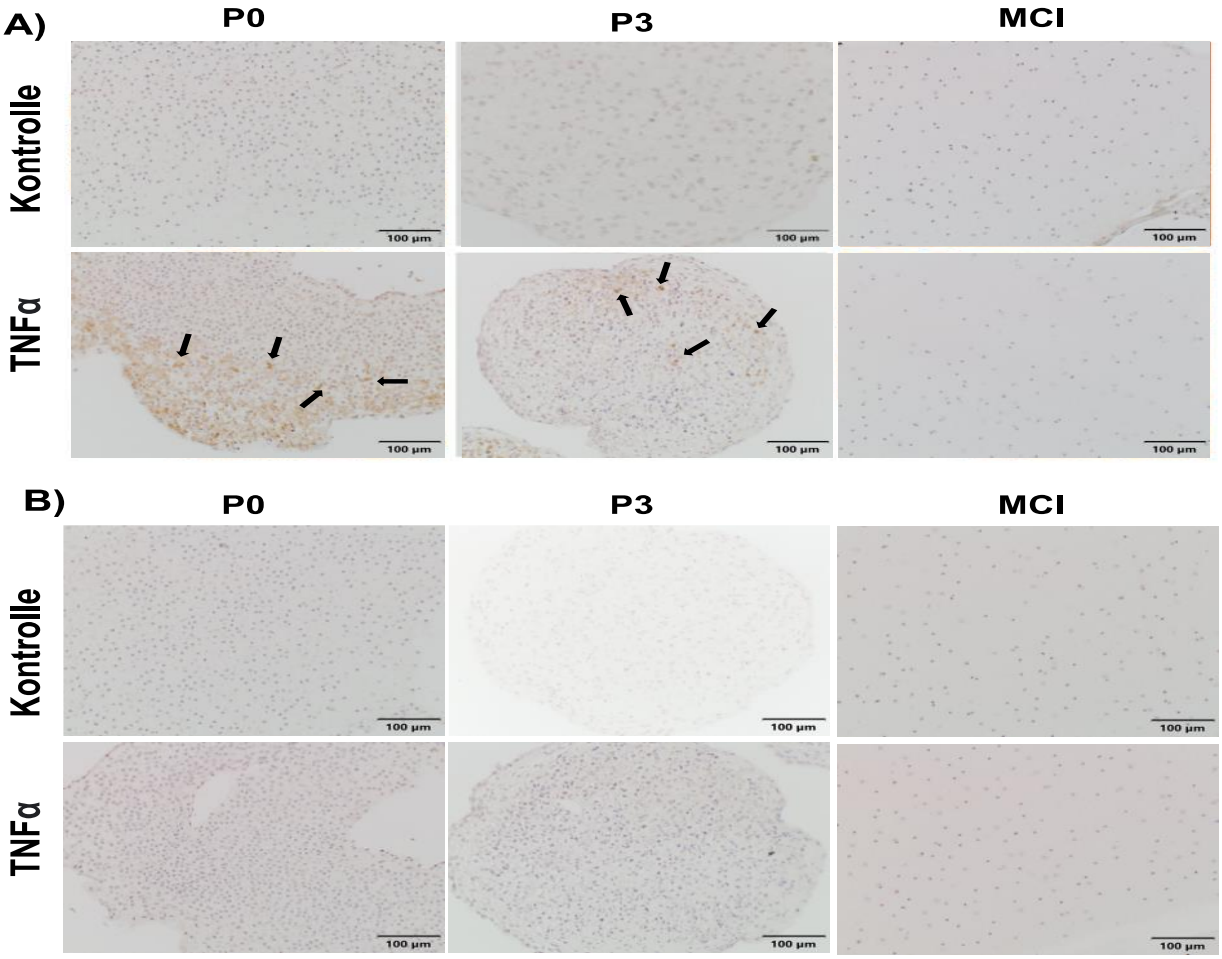

Abb. 17: Immunhistochemie für Caspase 3 (Gruppen: Kontrolle, 20 ng/ml TNFα) Maßstab: 100 µm. Die Abbildungen fokussieren auf den jeweiligen Befund, Pfeile zeigen auf apoptotische Zellkerne. TNFα: Tumor-Nekrose-Faktor alpha. P0: Spheroidkultur unpassagierter Chondrozyten (Passage 0), P3: Passage-3-Chondrozyten Spheroidkultur, MCI: Minced Cartilage Präparate

4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Einfluss von TNFα auf die Knorpelregeneration in einem Modell untersucht, das die Implantation autologer Chondrozyten sowie das Minced Cartilage Verfahren simuliert. Somit wurden diese beiden Verfahren unter proinflammatorischen Bedingungen verglichen. Darüber hinaus wurden auch unpassagierte Chondrozyten untersucht, um einen möglichen Einfluss der Passagierung nachweisen zu können.
TNFα zeigte sich hierbei dazu in der Lage, die Chondrogenese negativ zu beeinflussen. Bei passagierten Chondrozyten kam es zu einer Hochregulierung kataboler Marker, sowie einer Verminderung anaboler Marker in der Genexpressionsanalyse und einem Verlust von Kollagen 2 und Proteoglykanen. Bei unpassagierten Chondrozyten und MCI-Konstrukten fielen diese Effekte geringer aus, sodass von einer höheren Empfindlichkeit von ACT-Sphäroiden für TNFα ausgegangen werden kann, die sich durch Passagierung weiterhin verstärkt. Diese Ergebnisse zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen vier unabhängigen Spendern.

4.1 Inflammationsmodell

Die Vielschichtigkeit der Pathogenese, mit den sich häufenden Hinweisen auf die Beteiligung aller Aspekte einer Immunreaktion, in Kombination mit zahlreichen mechanischen und biochemischen Faktoren, machen die Arthrose, entgegen der früheren Auffassung, es handle sich um einen einfachen altersbedingten Abbau des Gelenkknorpels, zu einem hochkomplexen inflammatorischen Krankheitsbild. Neuere Übersichtsarbeiten bestätigen, dass Arthrose als entzündlich-metabolische Erkrankung mit Beteiligung von Knorpel, Synovium und subchondralem Knochen verstanden werden muss (Kraus et al. 2024). Es kommt zu einer Synthese von Zytokinen und matrixabbauenden Proteasen, wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) mit konsekutivem Abbau und Fragmentierung des Knorpels. Zeitgleich erfolgt eine Stimulation der Chondrozyten zur Reparation, bei der die Produktion von Proteoglykanen und Kollagenen, sowie die Synthese synovialer Deckzellen gesteigert wird. Folgen sind eine Proliferation der Synovia und subchondrale Sklerosierung. Das Verhältnis zwischen der Produktion von extrazellulären Matrix-Proteinen und der Produktion von proteolytischen Enzymen ist unausgewogen und führt im Laufe der Zeit zum programmierten Zelltod

(Apoptose) der Chondrozyten und vollständigen Verlust des Knorpelgewebes. Wenn der Knorpel zerstört ist, kann es nachfolgend zur Schädigung und Sklerosierung des freiliegenden Knochens kommen (Tong et al. 2022; Zheng et al. 2021; Graceffa et al. 2019; Akkiraju und Nohe 2015).

Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine, insbesondere IL-1β und Tumornekrosefaktor (TNF)α ist dabei aufgrund von In-vitro- und In-vivo-Studien gut belegt (Kobayashi et al. 2005; Lubberts und van den Berg 2003). Obwohl die Auswirkungen von IL-1β und TNFα auf die Biologie der Chondrozyten relativ gut untersucht sind, ist das konkrete Ausmaß, in dem diese Zytokine die Mechanobiologie der Chondrozyten bei Arthrose beeinflussen könnten, noch unbekannt. Da die Funktion des Knorpelgewebes hauptsächlich mechanischer Natur ist, wird davon ausgegangen, dass auch mechanische Belastung eine entscheidende Rolle für den Metabolismus des Knorpels spielt.
Dennoch hat sich gezeigt, dass IL-1β und TNFα für die Pathophysiologie der Arthrose die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine darstellen (Chen et al. 2015)
IL-1β und TNFα werden während der Arthrose-Progression hochreguliert (Kapoor et al. 2011) und von Chondrozyten und Synoviozyten ausgeschüttet. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Störung der Knorpelhomöostase und dem MMP-vermittelten Knorpelabbau und modulieren den Chondrozytenstoffwechsel, indem sie die MMP-Expression erhöhen und die Produktion von MMP-Inhibitoren hemmen (Liacini et al. 2003, Batarfi et al. 2025).
TNFα ist dabei nachweislich im arthrotischem Knorpel überexprimiert (Melchiorri et al. 1998; Moos et al. 1999) und konnte in arthrotisch verändertem Synovium nachgewiesen werden (Schlaak et al. 1996). Die TNF-Rezeptorexpression ist bei Arthrose ebenfalls in Knorpel und Synovium erhöht (Silvestri et al. 2006; Zheng et al. 2021). Eine Stimulation der Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 durch TNFα konnte aufgezeigt werden (Reboul et al. 1996; Liacini et al. 2003; Cai et al. 2016)
Weiterhin ist auch eine erhöhte mRNA-Expression von TNFα Converting Enzyme (TACE), welches die Umwandlung von pro-TNFα in reifes TNFα vermittelt, in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe nachweisbar (Patel et al. 1998; Haseeb und Haqqi 2013).
Bertuglia et al. wiesen bei Rennpferden nach, dass TNFα ein prädiktiver Marker für den Arthrose-Progress ist und die Zytokinkonzentration radiologisch mit dem Schweregrad der

Arthrose korreliert (Bertuglia et al. 2016). Bei bovinen Knorpelproben verursachte eine Verletzung in Kombination mit TNFα und IL-6 Exposition den stärksten GAG-Verlust (Sui et al. 2009). Auch konnte bereits eine Wirksamkeit der Antagonisierung des TNFα im Sinne einer Verminderung osteoarthritische Prozesse und Stimulation der Chondrogenese aufgezeigt werden (Verbruggen et al. 2012; Ossendorff et al. 2018).
Neuere systematische Analysen bestätigen die zentrale Rolle von TNFα in In-vitro-Entzündungsmodellen von Chondrozyten (Wang et al. 2024).
In unserer Studie verwendeten wir daher für das Inflammationsmodell eine definierte Konzentration von 1 µl/ml Medium TNFα, die die Chondrogenese negativ beeinflusste.

4.2 Vergleich der ACT und MCI im in-vitro Modell

Wang verglich 2010 in einer Arbeit die mechanisch induzierte Chondrogenese unter Simulation von verschiedenen klinischen Chondrozytentransplantationstechniken, darunter Minced Cartilage, sowie zwei verschiedenen Generationen der ACT, der matrixassoziierten ACT und der ACT mit Kollagen-Seeding. Methodisch wurden dafür entweder P0, P3 oder MC in einer 3-D Polyurethan-Matrix kultiviert. Die Erhöhung des chondrogenen Potenzials mit verstärkter GAG-Synthese war dabei in den verschiedenen konditionierten Chondrozyten abhängig von der angewandten Belastung durch Bioreaktor. Bei allen Belastungsmodi zeigten MCI-Konstrukte jedoch das höchste Potenzial zur GAG-Retention und die geringste Liberation in Medium (Wang 2010).
Eine vergleichende Studie zur ACT und der MCI-Technik im inflammatorischen Milieu gibt es bislang nicht.
Nachgewiesene Matrix-Zell Interaktionen und die Aktivierung reperativer Prozesse durch Fragmentierung ließen die Annahme zu, dass Minced Cartilage weniger sensitiv für destruierende Prozesse in inflammatorischem Milieu sein könnte, als es isolierte Chondrozyten sind. Tatsächlich zeigte sich in dieser Studie eine deutlich geringere, TNFα induzierte Einschränkung der Chondrogenese bei Minced Cartilage, als es bei isolierten Chondrozyten der Fall gewesen ist.

4.2.1 Katabole Wirkungen von TNFα: Beeinträchtigung der Matrixproduktion

Das in diesem Inflammationsmodell genutzte proinflammatorische Zytokin TNFα beeinflusst die Matrixproduktion von Chondrozyten. Neidhart et al. berichteten, dass eine einwöchige Exposition gegenüber TNFα die Zerstörung der extrazellulären Matrix in einem in vitro Entzündungsmodell bei Rindern und Menschen um 87 % erhöhte. Hierbei wurden humane, sowie bovine Chondrozyten in Schwämmen kultiviert und der Abbau von Matrix mittels radioaktiv markierten Proteoglykanen (35 S) überwacht (Neidhart et al. 2000). Passend wiesen Li et al. in einem Modell mit bovinen Knorpelexplantaten nach, dass die 8-tägige Kultivierung mit dem Zytokin zu einem deutlichen Anstieg des sGAG-Verlusts und der Aggrecanase-Aktivität im Gelenkknorpel führte (Li et al. 2013).
In unserem Experiment wurde die Matrixsynthese in P0- und P3-Sphäroiden beeinträchtigt, wobei die stärksten Auswirkungen in der Kultur der expandierten Chondrozyten zu beobachten waren. Die EZM-Synthese der MCI-Konstrukte wurde durch TNFα nicht beeinflusst, hier zeigte sich weder eine Verminderung der GAG-Einlagerung auf Proteinebene, noch histologisch eine Abnahme der Proteoglykane.
Ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist Kollagen. Die Veränderungen des Kollagengehalts bei Arthrose werden kontrovers beschrieben. Während Lorenzo et al. einen Anstieg des Kollagen-Metabolismus in menschlichem, arthrotisch verändertem Knorpel beschreiben (Lorenzo et al. 2004), berichteten bereits Lippiello et al., dass die Kollagensynthese in frühen Degenerationsstadien erhöht, in späten Stadien jedoch signifikant erniedrigt war (Lippiello et al. 1977). Neuere Übersichtsarbeiten zeigen, dass es im Krankheitsverlauf zu einem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau kommt, wobei insbesondere der Abbau von Typ-II-Kollagen im Vordergrund steht (Chen et al. 2026, Jørgensen et al. 2022). Frühdegenerative Stadien sind dabei durch kompensatorisch erhöhte Syntheseprozesse gekennzeichnet, während in späteren Stadien die Matrixproduktion deutlich abnimmt.
Greenwel et al. konnten zeigen, dass TNFα die Transkription des Gens, das für die α2-Kette des Typ-I-Kollagens [α2(I)-Kollagen] kodiert, in kultivierten Fibroblasten hemmte und somit zu einer verminderten Ablagerung von Kollagen 1 führte (Greenwel et al. 2000). Eine suppressive Wirkung des Zytokins auf die Kollagen-2 Synthese wurde von Chen et al. nachgewiesen, die in Ihrer Studie humanen isolierten Chondrozyten TNFα in einer Konzentration von 20 ng/ml zusetzten und darauffolgend eine signifikant verminderte

Expression von Kollagen 2 nachweisen konnten (Chen et al. 2019). In der vorliegenden Studie zeigte sich analog zu diesen Erkenntnissen eine verminderte Einlagerung von Kollagen Typ 1 und 2 in den histologischen Schnitten der Spheroidkulturen. Bei Minced Cartilage-Präparaten führte die Zytokin-Exposition nicht zu einer verminderten Einlagerung des Kollagens in den immunhistochemischen Präparaten.

TNFα verursachte in dieser Studie weiterhin eine Suppression des natürlichen chondrogenen Stimulus der Sphäroid-Konstrukte. Dieser negative Einfluss wurde durch die Herabregulierung der chondrogenen Differenzierungsmarker Kollagen 2, sowie Aggrecan auf Genexpressionsebene deutlich. Bei Minced Cartilage war keine solche Herabregulierung zu erheben. Li et al. zeigten analog zu den Ergebnissen unserer Studie, dass die Supplementierung von TNFα bei bovinen Chondrozyten-Kulturen zu einer verminderten Expression von Kollagen 2 führte (Li et al. 2013). Kunisch et al. stimulierten normale humane Chondrozyten in einem Monolayer für 24 Stunden mit TNFα in einer Konzentration von 10 ng/ml und beschrieben mit einer Herabregulierung des Kollagen 2 um 50 % einen ähnlichen Effekt (Kunisch et al. 2016).

Kollagen 2 ist ein typischer Differenzierungsmarker für hyalinen Knorpel und kann daher als potenzieller Marker für eine gestörte Gelenkhomöostase bei Arthrose herangezogen werden (Mardani et al. 2013; Hollander et al. 1995; Charlier et al. 2019).

Das Proteoglykan Aggrecan ist im hyalinen Knorpel insbesondere bei im Gelenk wirkenden Druckkräften essentiell. Dadurch, dass es große Mengen an Wasser bindet, verleiht es dem Knorpel gemeinsam mit Hyaluronsäure seine Stoßdämpferwirkung. Aufgrund dieser Eigenschaften gehen Veränderungen in der Aggrecan-Expression mit einem gesteigerten Degenerationsrisiko einher (Roughley et al. 2006). TNFα kann die chondrogene Genexpression von Aggrecan unterdrücken (Li et al. 2013) und über inflammatorische Signalwege, insbesondere NF-κB, die Expression von Aggrecan signifikant reduzieren und damit zur Störung der Knorpelhomöostase beitragen (Horváth et al. 2023).

In der durchgeführten Studie konnte ebenfalls ein Einfluss von TNFα im Sinne einer Herunterregulierung auf diesen Biomarker festgestellt werden, erneut blieb dieser Einfluss bei Minced Cartilage aus.

Das Proteoglykan PRG4 ist ein Gelenk-/Grenzgleitmittel (Li et al. 2007). Eine Studie von Alquraini et al. legt die Annahme nahe, dass PRG4 eine wichtige

inflammationshemmende Rolle spielt und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1-beta reduziert (Alquraini et al. 2017). In unserer Studie ließ sich PRG4 jedoch nicht durch TNFα beeinflussen.

4.2.2 Katabole Marker

Katabole Marker, sind in der Regel nach akuten Verletzungen im Knorpelgewebe erhöht. So weisen mehrere Studien eine Erhöhung von katabolen Markern wie MMPs oder Aggrecanasen nach Ruptur des vorderen Kreuzbands oder Meniskusriss nach (Higuchi et al. 2006; Liu et al. 2017). Es wird angenommen, dass proinflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Hochregulierung dieser katabolen Faktoren spielen (Malemud 2017). Vasara et al. wiesen auch noch ein Jahr nach Durchführung einer autologen Chondrozytentransplantation eine erhöhte MMP-Expression nach (Vasara et al. 2009). Eine Hochregulierung von MMP-3 durch TNFα in gesunden menschlichen Chondrozyten konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden. Kunisch et al. setzten chondrozytäre Zellen im Monolayer einer 24-stündigen Inkubation mit 10 ng/ml TNFα aus und bestimmten im Folgenden die mRNA-Expression von MMP-3, die signifikant um bis zu 56% anstieg (Kunisch et al. 2016). Dieser Effekt mit Induktion kataboler Marker scheint darüber hinaus auch irreversibel zu sein (Karsdal et al. 2008).

In neueren systematischen Analysen konnte eine TNFα-konzentrationsabhängige Hochregulation kataboler Marker wie MMP-3, sowie eine gleichzeitige Hemmung anaboler Matrixkomponenten beobachtet werden (Ossendorff et al. 2024; Wang et al. 2024).

Im Rahmen unserer Studie bestätigte sich, dass die Supplementierung von TNFα zu einer erhöhten Konzentration von MMP-3 führte. Die MMP-3-Expression wurde dabei in den P3-Sphäroiden und der MCI-Kultur erhöht, nicht jedoch in den P0-Sphäroiden. MMP-3 wird andererseits jedoch auch als Auslöser für ektope Knorpelbildung diskutiert, so wies eine Studie von Pelttari et al. eine positive Korrelation stabiler ektoper Knorpelbildung mit der relativen MMP-3-Konzentration nach (Pelttari et al. 2008).

MMP-13 ist ein weiterer wichtiger Marker für katabole Prozesse im chondrozytären Metabolismus. Es ist in arthrotischem Milieu erhöht und wird mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα assoziiert (Özler et al. 2016). TNFα induziert die Expression von MMP-13 dabei durch Proteinkinase R (PKR)-Aktivierung (Ma et al. 2018).

Von Bevill et al. konnte eine Induktion von MMP-13 durch TNFα im Gelenkknorpel von Schweinen nachgewiesen werden (Bevill et al. 2014).
In der vorliegenden Studie konnte bezüglich MMP-13 nur in der P3-Sphäroidkultur eine stimulierende Wirkung festgestellt werden.
Passend zu der TNFα induzierten Erhöhung kataboler Marker konnte in dieser Studie auch eine konsekutiv gesteigerte GAG-Liberation in das Medium bei Zytokin-Supplementierung festgestellt werden, sowohl bei P3 Sphäroiden, als auch bei MCI-Konstrukten. Bei unpassagierten Chondrozyten blieb dieser Effekt aus, ebenso wie die soeben erläuterte Hochregulierung kataboler Marker.

4.2.3 Dedifferenzierung

Kollagen 1 ist ein Marker für die Entdifferenzierung von expandierten Chondrozyten. Physiologisch besteht der Gelenkknorpel überwiegend aus Kollagen Typ 2. Kunisch et al. wiesen eine starke Stimulation der Expression von Kollagen 1 durch TNFα und IL-1β bei isolierten Chondrozyten im Monolayer nach (Kunisch et al. 2016), die sich in unserer Studie jedoch nicht replizieren ließ. Stattdessen kam es in unpassagierten Chondrozyten sogar zu einer signifikant verminderten Expression von Kollagen 1, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Zellen bereits entdifferenziert waren, oder dass sich in diesen Ergebnissen die allgemeine Hemmung der Synthese von Extrazellulärmatrix durch Zytokin-Einfluss widerspiegelte. P3-Sphäroide und Minced Cartilage zeigten hier jeweils keinen TNFα-Einfluss. Kollagen X kann als Hypertrophie-Marker im Knorpelgewebe angesehen werden. (Cecil et al. 2005; Mark et al. 1992). Auch in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe wird von einer erhöhten Expression von Kollagen X berichtet (Ren et al. 2017). Im Rahmen einer Studie von Sun et al. konnte jedoch in einem In-vitro-Inflammationsmodell mit humanem Knorpelgewebe in 3D Scaffolds keine Erhöhung der Kollagen X-Expression durch Supplementierung von TNFα nachgewiesen werden (Sun et al. 2011). Auch in unserer Studie konnten wir keinen Einfluss von TNFα auf die Expression von Kollagen X feststellen, weder bei den Sphäroiden, noch den Minced Cartilage-Präparaten.

4.2.4 Inflammation

TNFα ist als multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems an zahlreichen Entzündungsprozessen beteiligt. Es kann in diesem Rahmen die Produktion von IL-6 induzieren, einem pleiotropen Zytokin, das an akuten und chronischen Entzündungen beteiligt ist (Wilbrink et al. 1991; Lipsky 2006; Gabay 2006). Eine erhöhte Konzentration von IL-6 konnte in Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Lipsky 2006), weiterhin ist auch ein starker Anstieg der IL-6-Konzentration in der Synovialflüssigkeit nach einer Gelenkverletzung nachweisbar (Irie et al. 2003). Als proinflammatorischer Mediator ist IL-6 unter anderem durch Induktion kataboler Enzyme aktiv am Progress der Arthrose beteiligt, wobei erhöhte IL-6-Werte im Serum oder in der Synovialflüssigkeit der Arthrose-Patienten mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Wiegertjes et al. 2020). Diese Bedeutung von IL-6 im inflammatorischen Gelenkmilieu wird durch neuere klinische und experimentelle Studien gestützt, die erhöhte Spiegel von IL-6, TNFα und IL-1β konsistent in Synovialflüssigkeit und Knorpelgewebe von Arthrosepatienten nachweisen konnten (Zhang et al. 2026).

Flannery et al. wiesen nach, dass IL-6 in Verbindung mit seinem löslichen Rezeptor (sIL-6R) die katabolen Effekte von TNFα beim Abbau und Verlust von Proteoglykanen aus unreifen Rinderknorpelexplantaten verstärkt (Flannery et al. 2000). In einer Studie von Sui et al. führte eine Knorpel-Verletzung mit TNFα-Exposition zu einer Hochregulierung der IL-6-Produktion von bovinen, sowie humanen Chondrozyten. Desweiteren konnte hier eine signifikante Verringerung des vorliegenden Proteoglykan-Katabolismus bei TNFα-Exposition durch Inkubation mit dem IL-6-blockierenden Fab nachgewiesen werden (Sui et al. 2009). Wir konnten analog dazu eine vermehrte Genexpression von IL-6 unter Zytokineinfluss bei den Sphäroiden, sowie auch bei Minced Cartilage nachweisen. Die Zytokin-verstärkte Expression von IL-6 war bei Minced Cartilage jedoch signifikant geringer als bei passagierten Chondrozyten. Die Sphäroide zeigten ebenfalls eine erhöhte Konzentration von IL-6 im Medium bei TNFα-Zugabe, ein Peak der Konzentration fand sich an Tag 4 der Beobachtung und besonders stark war dieser Effekt bei den passagierten Chondrozyten.

Allerdings erhöht IL-6 auch die Expression von antikatabolen Faktoren, was auf eine protektive Rolle hindeutet. So steigerte IL-6 gemeinsam mit seinem löslichen Rezeptor die Produktion von antikatabolen TIMPs (tissue inhibitors of MMPs) in Chondrozyten

signifikant (Silacci et al. 1998). Bislang ist diese Doppelrolle von IL-6 nur unvollständig geklärt und könnte auf unterschiedliche Wirkungen des klassischen IL-6 gegenüber des Trans-Signalwegs zurückzuführen sein (Wiegertjes et al. 2020).
IL-8 ist ein inflammatorisches Chemokin, das unter pathologischen Bedingungen auftritt. Interessanterweise ist die IL-8-Expression in normalem, nicht inflammatorischem Gewebe in der Regel nur gering oder gar nicht nachweisbar (Takahashi et al. 2015).
Im Rahmen der Arthrose wird IL-8 von Chondrozyten produziert und wirkt als wichtiger Vermittler in der Pathophysiologie, (Chauffier et al. 2012; Yuan et al. 2001; Merz et al. 2003), indem es eine Reihe pathogener Prozesse wie die Freisetzung von MMP-13, die Akkumulation von Neutrophilen und die Aktivierung von Leukozyten in der Synovialis fördert (Olson und Ley 2002; Borzì et al. 2004; Matsukawa et al. 1995). Darüber hinaus wird IL-8 mit einer Induktion von Hypertrophie und Differenzierung von Chondrozyten assoziiert (Borzi et al. 2002; Olson und Ley 2002). Pierzchala et al. berichteten, dass die Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte IL-8-Werte aufwies (Pierzchala et al. 2011). In einer Studie von Takahashi et al. war die IL-8 Expression bei Patienten mit Arthrose im Vergleich zur Kontrollgruppe 37-fach erhöht (Takahashi et al. 2015). Eine signifikante Assoziation von IL-8 in der Synovialflüssigkeit mit klinischen Schweregraden konnte in einer Querschnittsstudie von Patientinnen mit symptomatischer Arthrose des Knies aufgezeigt werden (García-Manrique et al. 2021). Die Induzierbarkeit der Expression von IL-8 mRNA durch TNFα wurde durch Lotz et al. gezeigt (Lotz et al. 1992). In unserer Studie konnte eine vermehrte Genexpression von IL-8 unter Zytokin-Einfluss nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit beschränkte sich in dieser Studie allerdings auf die passagierten Chondrozyten und war nicht bei Minced Cartilage oder unpassagierten Chondrozyten zu beobachten.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines gasförmiges Molekül, das im menschlichen Körper weit verbreitet und dessen Synthese von der NO-Synthase (NOS) abhängig ist. Endogenes, von Chondrozyten produziertes Stickstoffmonoxid supprimiert die Produktion von Typ-II-Kollagen (Cao et al. 1997), sowie die allgemeine Proteoglykan-Biosynthese (Häuselmann et al. 1994). Jüngere Studien haben gezeigt, dass NO und seine Redoxderivate sowohl mit physiologischen, als auch mit pathologischen Reaktionen im Gelenk eng assoziiert sein können. Sie spielen eine wichtige Rolle als Effektormoleküle

in der Regulation von Osteoklasten, Osteoblasten und Chondrozyten. Darüber hinaus können sie auch katabole Prozesse im Knorpelgewebe und die Apoptose von Zellen induzieren (Chen et al. 2024). In Abhängigkeit von weiteren Faktoren kann das NO/NOS-System inflammationshemmend oder inflammationsfördernd bei Arthrose wirken (Jiang et al. 2023). Arthrotisch veränderter Knorpel setzt spontan NO frei, wobei die Produktion durch proinflammatorische Zytokine wie TNFα erhöht werden kann. Die TNFα-Antagonisten Infliximab und Etanercept sind wiederum imstande, die TNFα-induzierte NO-Produktion dosisabhängig zu hemmen (Vuolteenaho et al. 2002). In der vorliegenden Studie zeigten die Sphäroidkultur und Minced Cartilage eine erhöhte Freisetzung von NO in das Nährmedium bei Zugabe von TNFα. Diese war jedoch in der MCI Gruppe im Vergleich zu den Spheroidkulturen signifikant geringer.

TNFα ist weiterhin ein gut beschriebener Auslöser der Apoptose (Aizawa et al. 2001). Lopez et al. berichteten über die Apoptoseregulierung durch TNFα und IL-1β in arthrotisch veränderten Chondrozyten. Sie wiesen dabei verschiedene Caspasen nach, die Apoptosewege wie Caspase 1, 3, 7 und 8 induzieren (López-Armada et al. 2006). Guo et al. berichteten über eine Korrelation zwischen den Spiegeln von TNFα und Caspase-3 in einem Arthrosemodell bei Kaninchen (Guo et al. 2011).

In einer Übersichtsarbeit stellten Charlier et al. die Annahme auf, dass pro-apoptotische Potenzial von TNFα hänge vom Versuchsmodell ab (Charlier et al. 2016). So war TNFα beispielsweise nur in Kombination mit Actinomyces D in der Lage, Apoptose in menschlichen Chondrozyten zu induzieren (Yoshimura et al. 2006). In einem Tiermodell mit durch Trennung des vorderen Kreuzbands induzierter posttraumatischer Arthrose konnte eine vermehrte Anfärbung von aktiver Caspase 3 auf erhöhte Spiegel von TNFα zurückgeführt werden (Murata et al. 2017). Unsere Studie zeigte eine höhere Apoptoserate in den TNFα-Gruppen der Spheroidkulturen, was sich mit früheren Berichten vereinbaren lässt. In den TNFα-Gruppen der Passage 0 und Passage 3 Chondrozyten konnten im Rahmen dieser Studie anhand von Caspase 3-Färbungen ebenfalls erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. Bei den Minced Cartilage Präparaten hingegen konnten keine apoptotischen Effekte von TNFα nachgewiesen werden.

4.3 Einfluss der perizellulären Matrix auf MCI-Konstrukte

Die Matrix, die bei der Minced Cartilage Implantation gemeinsam mit den Chondrozyten transplantiert wird, könnte eine wichtige Rolle bei Förderung des Einwuchs, der Migration und der Differenzierung der Zellen spielen und sie gegenüber destruierenden Umwelteinflüssen resistenter machen. Insbesondere die perizelluläre Matrix ist ein entscheidender Regulator biochemischer und biomechanischer Signale für die Chondrozyten und Störungen der PZM sind mit eng mit arthrotischen Pathologien assoziiert (Guilak et al. 2018).

Neuere Arbeiten bestätigen diese Rolle und zeigen, dass die perizelluläre Matrix als „mechanosensitive Nische“ fungiert, die insbesondere über Integrine, TRPV4-Kanäle und primäre Zilien mechanische Reize in biochemische Signale übersetzt und so die Homöostase der Chondrozyten reguliert (Zhang et al. 2023).

Adulte Stammzellen zeigten in einem porösen Gerüst, welches aus Gelenkknorpel gewonnen wurde, eine Differenzierung in Richtung eines chondrogenen Phänotyps mit signifikanter Synthese und Akkumulation von EZM-Makromolekülen und der Entwicklung mechanischer Eigenschaften, die denen des nativen Knorpels nahekommen. Diese Ergebnisse sprechen für das hohe Potenzial einer verarbeiteten Knorpel-EZM als Matrix für Gelenkknorpel (Cheng et al. 2009). Weiterhin scheinen dezellularisierte Knorpelmatrices die Zelladhäsion und chondrogene Differenzierung durch die Erhaltung der nativen PZM-Struktur signifikant zu verbessern (Zelinka et al. 2022).

In einer Studie von Rothdiener et al. konnte gezeigt werden, dass Chondronen, also Matrix umgebene Chondrozyten, in osteoarthrotisch verändertem Gewebe den isolierten Chondrozyten hinsichtlich höherer Biosynthese und mRNA-Expression von gewebe- und phänotyprelevanten Genen überlegen waren (Rothdiener et al. 2018).

Auch Vonk et al. verglichen die Vitalität und Regenerationsfähigkeit zwischen Chondrozyten und Chondronen und stellten fest, dass Chondronen aus einem Gelenk mit zuvor chirurgisch induzierter Knorpelschädigung, eine höhere Knorpelproduktion (höherer DNA-, Proteoglykan und Kollagengehalt) und eine verminderte Kollagenaseaktivität als die aus demselben Gelenk entnommenen Chondrozyten zeigten (Vonk et al. 2014).

Sie schlugen hieraus ableitend vor, dass die Konservierung von perizellulärer Matrix zu positiven Auswirkungen auf die zellinduzierte Knorpelproduktion führt, und zwar aufgrund einer erhöhten Menge an Proteoglykanen und einer geringeren Genexpression von

MMP-13 in Chondronen im Vergleich zu isolierten Chondrozyten. Es wurde festgestellt, dass weitere Wachstumsfaktoren in der PZM gespeichert sind, die bei Bedarf aktiviert werden können. Bereits 2010 wiesen Vonk et al. nach, dass Chondronen im Allgemeinen unter In-vitro-Kulturbedingungen weniger katabole Enzyme (z. B. MMPs) exprimieren als isolierte Chondrozyten (Vonk et al. 2010). Im Kaninchen-Tiermodell förderte die Kombination von Chondronen mit Chondrozyten die Produktion von extrazellulärer Matrix und die Reparatur von defektem Knorpel (Duan et al. 2021). Hing et al. untersuchten die unterschiedliche Reaktion von Chondronen und Chondrozyten unter mechanischen Stressbedingungen. So reagierten Chondronen mit einer deutlich geringeren Volumenabweichung als isolierte Chondrozyten, wenn sie Änderungen der Osmolarität ausgesetzt wurden (Hing et al. 2002).

Es hat sich gezeigt, dass bei vorliegender Arthrose eine veränderte Inzidenz und Länge der Zilien vorliegt (Guilak et al. 2018). Dies führt zu einer Störung der durch die Zilien vermittelten Signalübertragung infolge einer Veränderung der Mechanosensibilität und der beteiligten Ionenkanäle. Es kommt zur Aktivierung von Serinproteasen, die wiederum den PZM-Abbau einleiten, was zu einem pathologischen Kontakt zwischen robusten Kollagenfibrillen mit der PZM und den eingebetteten Chondrozyten führt (Wu et al. 2007). Diesen Signalwegen ausgesetzte Chondrozyten exprimieren katabole Enzyme (z. B. MMP-13), die ihrerseits Kollagen 2 abbauen (Xu et al. 2005). Das Vorhandensein der PZM in Chondronen hat einen tiefgreifenden Einfluss auf die Genexpression der Chondrozyten. Es konnte unter anderem eine Hochregulierung des Hitzeschockproteins 70 nachgewiesen werden, die zur Robustheit und aktiven Matrixproduktion von Chondronen und Stabilisierung des physiologischen Phänotyp der Chondrozyten beitragen könnte (Zhang et al. 2006).

Neuere Studien zeigten analog, dass die PZM entzündungsmodulierende Eigenschaften besitzt und die Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie TNFα und IL-1β abschwächen kann, indem sie als Diffusionsbarriere sowie als Reservoir antiinflammatorischer Mediatoren wirkt (Chery et al. 2020).

Weiterhin scheint die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in der perizellulären Matrix für die Koordination der zellulären Aktivität für eine adäquate Wundheilung unerlässlich zu sein. Zahlreiche Proteine der PZM sind dazu in der Lage, Wachstumsfaktoren zu binden und zu modulieren und beeinflussen die Geweberegeneration so maßgeblich.

Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren mit hoher Affinität können Moleküle in der perizellulären Matrix einen Vorrat an endogenen Wachstumsfaktoren anlegen, die zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt oder oberflächengebunden präsentiert werden, um Zellen in der lokalen Mikroumgebung zu stimulieren (Macri et al. 2007).
Das Einbringen von Matrix, wie es bei der MCI stattfindet, kann also einen Schutz der Chondrozyten vor Umwelteinflüssen bedeuten und könnte mit dem im Rahmen dieser Studie festgestellten geringeren Effekt von TNFα assoziiert sein.

4.4 Mincing

Die konkrete Modalität der Fragmentierung des entnommenen Knorpels bei MCI ist Gegenstand zahlreicher Studien der letzten Jahre. Die Fragmente sollten zerkleinert werden, bis sie kleiner als 1 × 1 × 1 mm sind. Optimal scheint ein pastenartiges Aussehen zu sein (Bonasia et al. 2015; Lei et al. 2021). Levinson et al. führten eine in-vitro-Studie zum Vergleich von geräte- und händisch-partikuliertem humanem Knorpel durch und erhielten in beiden Gruppen ähnliche Ergebnisse, wobei mehr als 50 % der Zellen vital genug waren, um ein Auswachsen aus dem Gewebe zu zeigen (Levinson et al. 2019).
Die in dieser Studie vorgenommene händische Zerkleinerung des Knorpels führte zu keinem Vitalitätsverlust oder einer Dedifferenzierung innerhalb der 14-tägigen Beobachtungsphase. Die Knorpelchips behielten ihren chondrogenen Phänotyp und auch genotypisch war eine chondrozytäre Differenzierung nachzuweisen. So fiel eine Expression von Kollagen 2 und Glykosaminoglykanen auf, die auch histologisch konsolidiert werden konnte. Eine Erhöhung von mit Dedifferenzierung assoziierten Markern wie Kollagen 10 oder Kollagen 1 zeigte sich nicht.
Weiterhin zeigten sich die in den Knorpelchips enthaltenen Chondrozyten vital, eine vermehrte Apoptoserate lag anhand des Apoptosemarkers Caspase nicht vor.
Mechanisch zerkleinerter Gelenkknorpel blieb auch in einer in vitro Studie von Evuarherhe et al. nach 42 Tagen Kultur in vitro lebensfähig und war im Hinblick auf Zellmigration, Auswuchs und extrazelluläre Matrixsynthese mit Knorpel-Explantaten vergleichbar (Evuarherhe et al. 2022). Konträr dazu beobachteten Jahn et al. in einer in vitro Untersuchung von Knorpelproben von 11 Patienten, die gemäß des MCI-Protokoll zerkleinert und dann eine Woche kultiviert worden waren, nach dem Zerkleinern einen erhöhten Zelltod (Jahn et al. 2024).

Beim direkten Vergleich zwischen Knorpel, der durch Kürettage vom Rand eines Knorpeldefekts entnommen wurde und Knorpelgewebe, das durch einen arthroskopischen Shaver zerkleinert wurde gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Zellwachstum oder Proliferationskapazität.
Die metabolische Aktivität im Verhältnis zur Zellzahl war dabei bei Shaver-zerkleinertem Knorpel höher als bei Chondrozyten, die aus Knorpel isoliert wurden, der durch Kürettage gewonnen wurde (Gebhardt et al. 2023).
Im Jahr 2004 untersuchten Redman et al. die Reaktion des Gelenkknorpels auf scharfe und stumpfe Traumata. Anhand eines translationalen in-vitro-Experiments wurde gezeigt, dass bei stumpfen Wunden ein breiterer Apoptose-Bereich neben dem Verletzungsrand festzustellen war. Die Mikroautoradiographie zeigte einen geringen Einbau von radioaktivem Material und somit keine neue Matrixsynthese oder Zellproliferation an. Im Gegensatz dazu zeigten Wunden, die mit einem scharfen Skalpell zugefügt wurden, zu allen Zeitpunkten einen begrenzten Zelltod mit Radiolabel-Inkorporation in der Nähe des Läsionsrandes. Dies spricht für eine Proliferation von Knorpelzellen und eine neue Matrixsynthese am Rand der Läsion und weist auf die Relevanz eines scharfen Devices beim Mincen hin (Redman et al. 2004).
Die Fragmentierung des Gelenkknorpels induziert allgemein reparative Prozesse durch Aktivierung der Chondrozyten in Bezug auf Migration, Proliferation und Differenzierung (Levinson et al. 2019; Lu et al. 2006).
Das finale Ziel des Zerkleinerungsverfahrens ist es, vitale Knorpelfragmente mit einem optimierten biologischen Potenzial zu erzeugen, um die Neosynthese von Knorpel zu stimulieren. Der Grad der chondralen Fragmentierung ist dabei ein wichtiger Parameter für die Menge der EZM-Produktion in vitro. Wenn die Knorpelsplitter zu groß sind, ist die Oberfläche zu klein für die Chondrozyten, um aktiv zu werden (Bonasia et al. 2015).
Je kleiner die Fragmente sind, desto höher scheint das Potenzial für die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten zu sein (Ossendorff et al. 2022).
Eine Studie von Bonasia et al. kam zu dem Schluss, dass die Fragmentierung des menschlichen Knorpels die EZM-Produktion in vitro erheblich beeinflusst. Eine stärkere Fragmentierung steigerte dabei die EZM-Produktion signifikant (Bonasia et al. 2015).
Auch die Migration von Chondrozyten wird durch Fragmentierung gesteigert. Es besteht die Annahme, dass dies auf einer Überregulierung von MT1-MMP (Membran-Typ-1-

Matrixmetalloprotease) beruht, die zu einer Ansammlung von Zellen am Rand der Knorpelfragmente führt (Lei et al. 2021). Die Aktivierung des biologischen Potenzials durch den Mincing-Prozess kann in dieser Studie mit einer geringeren Sensitivität für katabole Prozesse bei Zytokinwirkung assoziierbar sein.

4.5 Einfluss von Co-Stimulantien

Fibrin ist ein hochmolekulares, nicht wasserlösliches Protein, das bei der Blutgerinnung durch die enzymatische Wirkung von Thrombin aus Fibrinogen (Gerinnungsfaktor I) gebildet wird. Bei der MCI-Technik kann Fibrin zur Fixierung der Knorpelfragmente genutzt werden, um eine dreidimensionale Umgebung für die Knorpelregeneration und eine Barriere zur Vermeidung der Zelldiffusion zu schaffen. (Massen et al. 2019; Schneider et al. 2021).

Fibrinkleber können dabei sowohl autolog, als auch allogen sein, wobei autologe Varianten aus Vollblut oder konzentrierten Blutfraktionen wie Platelet Rich Plasma (PRP; deutsch: plättchenreiches Plasma) gewonnen werden.

Bei der Herstellung des Fibrinklebers aus Eigenblut, ist eine gewisse Menge an Wachstumsfaktoren vorhanden, was für die Fixierung von Knorpelzellen vorteilhaft sein könnte (Chiari et al. 2017). Im Rahmen dieser Studie konnte in einem experimentellen Durchlauf vor Beginn des regulären Studienablaufs kein Effekt auf die partikulierten Chondrozyten durch Fibrinkleber festgestellt werden.

Uehara et al. untersuchten in einer Studie 2020 den Einfluss von Fibrinkonzentration auf die Zellmigration. Hundesehnen des Musculus flexor digitorum profundus wurden gerissen und anschließend mit einem Fibrinpflaster mit Stromazellen aus dem Knochenmark des Hundes versorgt, wobei drei verschiedene Konzentrationen:
physiologisch (5 mg/ml Fibrinogen; 25 U/ml Thrombin), niedrig adhäsiv (40 mg/ml; 250 U/ml) und hoch adhäsiv (80 mg/ml;250 U/ml) von Fibrinogen und Thrombin zum Einsatz kamen. Färbungen zeigten eine Wanderung der Stromazellen in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit geringem Klebstoffanteil, während in der Gruppe mit hohem Klebstoffanteil nach zwei Wochen keine Zellmigration zu beobachten war (Uehara et al. 2020). Eine hohe Fibrinogenkonzentration kann also Zellmigration behindern. Für die in dieser Studie genutzte Konzentration von 5 mg/ml Fibrinogen scheint diese Einschränkung nicht zu gelten.

Levinson et al. führten eine vergleichende In-vitro-Studie zu Minced Cartilage in Fibrin und Kollagenhydrogel durch. Beide Materialen führten dabei zu vergleichbaren histologischen Ergebnissen in Bezug auf Wachstum und Überleben der Chondrozyten. Eine Ablagerung der Matrix konnte durch Verwendung eines Gerüsts in dieser Studie nicht verbessert werden (Levinson et al. 2019).
Auch Hyaluronsäure wird häufig als Hydrogel verwendet, um 3D-Bedingungen für die Knorpelregeneration zu schaffen. Als Bestandteil der extrazellulären Matrix bietet es ein poröses, aber festes Gerüst (Marmotti et al. 2013a). Marmotti et al. untersuchten in einem Kaninchenmodellen die MCI im Hyaluron-Gerüstverbund mit Fibrinkleber mit PRP. Sie stellten fest, dass die Kombination von Hyaluronsäure mit PRP nach 6 Monaten das beste Reparaturgewebe ergab. Fibrinkleber verringerte hier das Knorpelregenerationspotenzial (Marmotti et al. 2012).
Auch synthetische Gerüste werden zunehmend genutzt. Lu et al. untersuchten in einem Ziegenmodell das chondrogene Potenzial von MCI in einem Polylactid-Polyglycolid-Copolymer-Gerüst. Sie konnten eine gute Auswucherung der Chondrozyten aus den implantierten Knorpelstücken nachweisen. Die histologischen Befunde nach sechs Monaten zeigten ein hyalinartiges Gewebe mit einer guten Integration im Vergleich zu einem reinen Gerüst (Lu et al. 2006).
Thrombozytenreiches Plasma (PRP) ist ein Thrombozytenkonzentrat, das durch Zentrifugation von Vollblut gewonnen wird. Seine Thrombozytenkonzentration ist höher als die von normalem Vollblut und enthält eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (Everts et al. 2021). PRP konnte in klinischen Studien zur Behandlung der symptomatischen Arthrose das Auftreten von Entzündungen reduzieren, die Angiogenese verbessern und die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten fördern (Liang et al. 2022, Gebhardt et al. 2023).

Die antiinflammatorischen Effekte von PRP sind aufgrund der Assoziation von Knorpelschäden mit inflammatorischen Prozessen sehr bedeutsam. Es wird angenommen, dass PRP die Entzündungsprozesse durch mehrere Faktoren, darunter NF-κB, NO und verschiedene chondrogene Wachstumsfaktoren, reduziert (Kennedy et al. 2018, Khyzhnyak et al. 2026).

Eine Studie von Olesen et al. ergab hingegen, dass PRP-Injektionen nach der Behandlung mit autologen Knorpelchips bei fokalen Knorpeldefekten im Knie von Schweinen keine positiven Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Knorpelreparaturgewebes hatten. Es wurde hierbei kein signifikanter Unterschied in der histologischen Zusammensetzung des Knorpels zwischen den Gruppen mit wöchentlicher PRP-Injektion über 3 Wochen und alleiniger Verwendung von Knorpelchips festgestellt (Olesen et al. 2019).

Thrombozytenreiches Fibrin (PRF) ist ein Derivat von PRP, bei dem autologe Thrombozyten in einer komplexen Fibrinmatrix vorhanden sind (Dohan Ehrenfest et al. 2009; Naik et al. 2013). PRF scheint so ein auf Fibrin basierendes Gerüst zu bieten, das eine nachhaltige Freisetzung von Wachstumsfaktoren ermöglicht und so eine anhaltende chondrogene Stimulation unterstützt (Khyzhnyak et al. 2026).

Wong et al. untersuchten die Kombination von plättchenreichem Fibrin (PRF) in verschiedenen Konzentrationen und autologen Knorpeltransplantaten für die Reparatur von Gelenkknorpel bei Schweinen.

Die in vitro-Ergebnisse zeigten, dass PRF die Lebensfähigkeit und GAG-Expression der kultivierten Chondrozyten fördert. Darüber hinaus induzierten die mit PRF konditionierten Medien eine signifikante zelluläre Migration und das Auswachsen von Chondrozyten aus unverdauten porzinen Knorpeltransplantaten (Wong et al. 2020).

In der Literatur wird über verschiedene Zusammensetzungen, Herstellungsmethoden, den Status der Thrombozytenaktivierung und die Verabreichung dieser Faktoren (in einem Gerüst oder löslich im Kulturmedium) berichtet, was die unterschiedliche Effizienz der PRP-und PRF-Verwendung erklären könnte (Olesen et al. 2019; Cugat et al. 2021; Sabarish et al. 2015).

In einer Studie von Ahrens et al. wurde die MC-Technik modifiziert, indem eine synoviale Versiegelung zugefügt wurde. Hierzu wurde eine synoviale Membran aus dem inneren der Gelenkkapsel entnommen. Diese sollte die Stabilität des Transplantates verbessern und den Knorpel zur Regeneration anregen. Die klinische Studie zeigte gute Ergebnisse in Bezug auf Schmerzen, Symptome und Aktivität der Patienten nach etwa 18 Monaten (Ahrens et al. 2024).

4.6 ACT und Passagierung

In dieser Studie wurde die ACT nach einem standardisierten Protokoll simuliert. Eine wichtige Einschränkung dieser Technik ist die Notwendigkeit, Chondrozyten über mehrere Passagen zu expandieren. Um die Einflüsse dieser Expansion objektivieren zu können, wurden neben Chondrozyten der Passage 3 ebenfalls Gruppen unpassagierter Chondrozyten bezüglich ihrer chondrogenen Kapazität mit und ohne Zugabe von TNFα untersucht. Die Erhaltung chondrogener Eigenschaften ist entscheidend, wenn Chondrozyten als Zellquelle für die Knorpelreparatur verwendet werden sollen. Isolierte native Chondrozyten, die als Monolayer kultiviert werden, durchlaufen einen Dedifferenzierungsprozess, der durch andere biochemische und morphologische Merkmale gekennzeichnet ist als bei funktionell intakten nativen Chondrozyten (Marlovits et al., 2004, Chen et al. 2024). Dieser Prozess ist vor allem durch eine verringerte Synthese von Kollagen Typ II zugunsten des nahezu ubiquitär exprimierten Kollagentyps I gekennzeichnet. Unabhängig vom Ursprung des Chondrozytengewebes ist die In-vitro-Expansion von Chondrozyten schwierig, da sie eine geringe Proliferationskapazität haben und dazu neigen, ihre Morphologie, ihren Phänotyp und ihre Funktion zu verlieren. Wenn sie kultiviert werden, wechseln sie allmählich von der Produktion von Aggrecan zur Produktion kleinerer Proteoglykan-Spezies, was letztlich zu einer Veränderung der biomechanischen Eigenschaften der EZM führt (Murphy und Polak 2004). Außerdem verlieren sie wichtige Chondrozytenmarker wie Sox-5, Sox-6 und Sox-9 und erhöhen die Expression von Hypertrophiemarkern wie ALP und Runx2. (STOKES et al. 2001)

In dieser Studie zeigten Passage 3 Chondrozyten die Expression chondrogener Marker wie Kollagen 2, GAG, PRG-4 und Aggrecan. Diese war jedoch vermindert im Vergleich zu unpassagierten Chondrozyten. Eine Dedifferenzierung zeigte sich darüber hinaus auch histologisch in den Färbungen Safranin O/Fast Green für Glykosaminoglykane, sowie in der immunhistochemischen Färbung auf Kollagen 2. Vanlauwe et al. stellten die Hypothese auf, dass Chondrozyten ihren spezifischen Phänotyp bis zur dritten Passage beibehalten (Vanlauwe et al. 2014). Darling und Athanasiou hingegen zeigten bereits bei der ersten Passage Veränderungen in der Genexpression (Kollagen Typ I und Typ II, Aggrecan und Lubricin). Auch Hong und Reddi berichteten bereits bei der ersten Passage in der Monolayerkultur vom Phänomen der Dedifferenzierung (Darling und Athanasiou

2005; Hong und Reddi 2013). Grad et al. stellten in einer bovinen Chondrozytenkultur ähnliche Entwicklungen fest. Sie berichteten von einer erhöhten Kollagenproduktion, allerdings mit einem erhöhten Anteil von Kollagen Typ 1. Weiterhin wiesen sie einen Rückgang des Kollagen-Typ-2-Gehalts von 83,1 % an Tag 2 auf 43,5 % an Tag 14 nach (Grad et al. 2003). Ein in dieser Studie nachgewiesener, konträr dazu stehender, verminderter Gehalt von Kollagen Typ 1 in Passage 3 Chondrozyten lässt bei gleichzeitig signifikantem Verlust von Kollagen 2 vermutlich auf einen grundsätzlichen Rückgang der Kollagensynthese schließen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Dedifferenzierung nicht nur phänotypische Veränderungen umfasst, sondern auch funktionelle Konsequenzen hat. So verlieren Chondrozyten nach etwa 5–6 Population Doublings die Fähigkeit zur spontanen Redifferenzierung in dreidimensionaler Umgebung. Eine Wiederherstellung des chondrogenen Phänotyps ist in diesen Fällen nur noch durch zusätzliche chondrogene Stimuli, wie beispielsweise TGF-β, möglich (Kisiday 2019).
Eine Vielzahl von Substraten wurde verwendet, um die Dedifferenzierung von Chondrozyten in Monolayerkulturen zu verhindern oder zu verlangsamen. So verbesserte beispielsweise die Expansion von Chondrozyten auf einer mit Kollagen Typ II beschichteten Schale die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung in Richtung der chondrogenen Linie mit einem höheren Gehalt an Kollagen Typ II mRNA und GAG (Barbero et al. 2006). Die Notwendigkeit des Kultivierungsprozesses, um eine ausreichende Zellzahl zur Defektfüllung zu generieren, stellt die wichtigste Einschränkung der ACT dar, die mit einer Beeinträchtigung der Qualität des regenerierten Gewebes einhergehen kann (Thompson et al. 2017).

4.7 Kultivierung und Inflammation

Die autologe Chondrozytentransplantation schlägt in bis zu 20 % der Fälle fehl, wobei eine fortgeschrittene intraartikuläre Degeneration, gepaart mit einem inflammatorischem Umfeld eng mit dem Scheitern der Implantation assoziierbar scheint (Angele et al. 2015; Pestka et al. 2012).
Dabei konnte auch die spezifische Relevanz des Zytokins TNFα nachgewiesen werden, welches eine allgemeine Herabregulierung der anabolen und eine Hochregulierung der katabolen Marker, sowie Apoptose der Chondrozyten induzierte (Ossendorff et al. 2018).

Die ACT wird in etwa 34-60 % der Fälle bei arthrotischen Knorpeldefekten eingesetzt, obwohl sie ursprünglich nicht für diesen Fall entwickelt wurde (Rothdiener et al. 2018).
Diese degenerativen Defekte dennoch einem der aufgeführten Verfahren zukommen zu lassen hat sich in den letzten Jahren als klinisch effektiv erwiesen, sodass die deutsche Arbeitsgemeinschaft für klinische Geweberegeneration die Einschränkung der Empfehlung bei Arthrose im Jahr 2022 hat fallen lassen und auch fokal degenerative Knorpelschäden als geeignet für diese operative Behandlung einstuft (Niemeyer et al. 2022).
Der Einsatz ist allerdings assoziiert mit einer höheren Wahrscheinlichkeit transplantatbezogener unerwünschter Ereignisse und einem signifikant schlechteren Outcome (Angele et al. 2015).
Die Notwendigkeit der Passagierung der bei ACT eingebrachten Chondrozyten könnte dabei mit Komplikationen bei inflammatorischem Milieu assoziiert sein. So zeigten sich die passagierten Chondrozyten in unserer Studie im Vergleich zu den unpassagierten teils signifikant sensitiver auf den Einfluss des TNFα. Eine signifikant verminderte Expression des knorpelspezifischen Kollagen 2 ließ sich bei TNFα exponierten Chondrozyten der Passage 3, jedoch nicht bei denen der Passage 0 feststellen.
Auch die immunhistochemische Aufarbeitung zeigte eine verminderte Einlagerung von Kollagen 2 nach Zytokin-Zugabe bei passagierten, nicht jedoch bei unpassagierten Chondrozyten.
Die vermehrte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP 3 und 13 durch TNFα lag ebenfalls nur bei vorheriger Expansion der Chondrozyten vor, zumindest wiesen Chondrozyten der Passage 0 keine Signifikanz der Zunahme auf.
Die IL-6 Freisetzung zeigte einen auffälligen Peak in der Gruppe der passagierten, Zytokin-exponierten Chondrozyten. Eine Steigerung der IL-6 Freisetzung durch TNFα war auch bei P0-Chondrozyten nachweisbar, bei passagierten Chondrozyten jedoch signifikant stärker ausgeprägt. Zu einer zytokininduzierten, vermehrten Expression von IL-8 kam es im Rahmen dieser Studie nur bei passagierten Chondrozyten.
Die zuvor beschriebenen Effekte der Dedifferenzierung durch Passagierung von Chondrozyten könnten diese weniger belastbar gegenüber inflammatorischen Kaskaden machen und somit zum Scheitern des knorpelregenerativen Verfahrens beitragen (Guo et al. 2023).

4.8 Klinik MCI

Partikulierte Chondrozyten kamen bereits in mehreren klinischen Studien zur Anwendung und ihre Wirksamkeit wurde mit der von autologen Chondrozyten verglichen. Beim Vergleich im Kaninchenmodell mit osteochondralem Defekt der Trochlea zeigten in Kollagen gebettete, partikulierte Chondrozyten in vitro eine höhere Anzahl von Chondrozyten und vermehrte Matrix-Ablagerung als die isolierten Chondrozyten der Vergleichsgruppe (Matsushita et al. 2019).

So wie auch in der vorliegenden Studie zeigten Chondrozyten in Studien an Tiermodellen von Lu et al. nach der mechanischen Zerkleinerung zur Vergrößerung der Gewebeoberfläche einen chondrogenen Genotyp und eine aktive Matrixsynthese. Die fragmentierten und anschließend in 3-D-Gerüste eingewachsenen Chondrozyten bildeten knorpelähnliches Gewebe, auch wenn sie in SCID-Mäuse implantiert wurden. Weiterhin führte die direkte Behandlung von Knorpeldefekten bei Ziegen mit Knorpelfragmenten auf einem resorbierbaren Gerüst nach sechs Monaten zu einem hyalinartigen Reparaturgewebe (Lu et al. 2006).

Um Qualität, Haltbarkeit und Struktur des reparierten extrazellulären Knorpelmatrixgewebes zu bewerten, führten Alcaide-Ruggiero et al. einen kontrollierten Einzelblind-Versuch an 28 Schafen durch. Diesen wurden in beiden Knien Knorpeldefekte von 8mm Durchmesser zugefügt, wobei anschließend die rechten Knie mit partikulierten Chondrozyten in Kombination mit PRP, die Linken mittels Ringeractetatlösung oder Hyaluronsäure (HA) therapiert wurden. Nach 9, oder 18 Monaten nach Operation wurden die Schafe eingeschläfert und Kollagenarten und Aggrecan des gebildeten Reparaturgewebes wurden immunhistochemisch anhand eines semiquantitatives Scoring-Systems beurteilt. Dabei zeigten sich in der Gruppe mit partikuliertem Knorpel mit gesundem Knorpel vergleichbare Kollagen- und Aggrecan-Werte, Ringerlösung- oder HA-reparierter Knorpel zeigte insbesondere in Kollagenen, die mit Hypertrophie, Abbau und Matrixreife assoziiert sind, signifikante Unterschiede zu gesundem hyalinen Knorpel (Alcaide-Ruggiero et al. 2023).

Cugat et al. stellten in einer Fallstudie zwei Patienten mit osteochondralen Knieschäden vor, die mittels einzeitigem chirurgischen Verfahrens behandelt wurden, das aus dem Einbringen einer autologen Matrix aus gesunden hyalinen Knorpelstücken und einem Mischplasma (PRGF) bestand. Beide Patienten konnten nach der Behandlung wieder auf

dem Niveau vor der Verletzung Fußball spielen und zeigten sowohl in der Magnetresonanztomographie als auch bei der Arthroskopie eine ausgezeichnete Defektfüllung (Cugat et al. 2017). Bei Überprüfung einer größeren Anzahl von Patientenfälle zur Evaluation der klinischen, funktionellen und MRT-basierten Ergebnisse der autologen Matrix aus hyalinen fragmentierte Knorpelstücken in Kombination mit einem gemischten Plasma zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung zwischen dem prä- und dem postoperativen Zeitraum auf verschiedenen Schmerz- und Funktionsskalen, sowie im MRT-gestützten MOCART Score (Cugat et al. 2020). Auch Massen et al. untersuchten eine Patientenkohorte von 27 Patienten mit chondralen oder osteochondralen Läsionen des Kniegelenks, die sich einem einstufigen Verfahren mit autologem zerkleinertem Knorpel unterzogen über etwa 24 Monate. Gemessen an Schmerzskalen, AMADEUS und MOCART-Score erreichten Patienten nach zwei Jahren ein zufriedenstellendes Ergebnis (Massen et al. 2019). Ein längerer Zeitraum nach Einbringen einer Paste aus zerkleinertem Knorpel wurde in einer Studie von Stone et al. überwacht. Der chondrale Defekt der Patienten wurde hierbei zunächst debridiert und im Anschluss durch pastenartig zerkleinerten Knorpel aus der Interkondylär-Region aufgefüllt. Wichtigste Erkenntnis der vorliegenden Studie war, dass das Pasten-Transplantat-Verfahren bei einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 16,8 Jahren Schmerzen linderte und die Funktion der Patienten verbesserte (Stone et al. 2017). Ein Kultivierungsprozess wie bei der ACT ist bei Minced Cartilage nicht von Nöten, was dieses Verfahren sowohl kostengünstiger, als auch überlegen hinsichtlich Qualität des entstehenden Regenerats machen könnte. Auch die Einschrittigkeit des Verfahrens und die relativ leichte Anwendung machen es attraktiv. Die vielversprechenden Ergebnisse der Anwendung von MCI können unter anderem auf die Fähigkeit der eingebrachten Zellen zur Einwanderung in ein Biomaterial und der EZM-Synthese zurückzuführen sein (Delman et al., 2018).

Aktuelle klinische Evidenz bestätigt diese positiven Tendenzen, weist jedoch gleichzeitig auf die begrenzte Datenlage hin. Eine systematische Übersichtsarbeit und Metaanalyse zeigte signifikante Verbesserungen der klinischen Outcomes (z. B. KOOS) nach 12 und 24 Monaten bei MCI, basierend jedoch auf einer noch geringen Patientenzahl und heterogenen Studiendesigns (Frodl et al. 2022).

Erste Vergleichsstudien deuten darauf hin, dass MCI kurzfristig vergleichbare klinische Ergebnisse wie etablierte Verfahren wie die autologe Chondrozytentransplantation erzielen kann (Runer et al. 2025).

Zwar legen diese klinischen Studien nahe, dass die Einbringung von partikuliertem Knorpel in einen Defekt eine vielversprechende, einstufige Behandlung bei chondralen Schäden sein kann. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um den Einfluss von Entzündungen auf Knorpeltransplantate verschiedener Knorpelreparaturmethoden, einschließlich der Minced Cartilage Implantation und der Autologen Chondrozyten Transplantation zu vergleichen.

Die hier vorliegende Studie könnte die Annahme einer höheren Resistenz von Minced Cartilage Implantaten gegenüber inflammatorischen Reizen im Gelenk nahelegen, ist jedoch in vivo bisher nicht belegt.

4.9 Limitationen und zukünftige Perspektiven

Die Studie untersuchte über 14 Tage den Vergleich von MCI- und ACT-Transplantaten (P3) sowie einer nicht passagierten Sphäroidkultur (P0) innerhalb eines Entzündungsmodells. Eine längere Beobachtungsdauer wurde nicht einbezogen, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf reale In-vivo-Bedingungen limitiert. Gelenke sind physiologisch einem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und biomechanischen Reizen wie Kompression, Scherkräften, hydrostatischem Druck und Volumenveränderungen ausgesetzt. Diese Bedingungen sind in klinischen Anwendungen für Minced Cartilage und autologe Chondrozyten entscheidend, lassen sich jedoch im Labor nur unvollständig nachbilden. Für diese Studie wurde dennoch ein Modell verwendet, das sich in früheren Untersuchungen als effektiv erwiesen hat und möglichst realitätsnahe Bedingungen bietet, eine mechanische Stimulation erfolgt jedoch nicht. Zur besseren Standardisierung wurde ein Rindermodell genutzt, da es konsistente Ergebnisse zwischen verschiedenen Spendern liefert. Um die in der Studie beobachteten Effekte für die klinische Anwendung zu bestätigen, sind jedoch weitere Untersuchungen am Menschen notwendig. Bei der ACT-Methode müssen Chondrozyten isoliert und expandiert werden, bevor sie mit einer definierten minimalen Zelldichte an der Verletzungsstelle implantiert werden können. Bei der MCI-Technik hingegen, ist bisher die Menge der benötigten Chondrone unklar und kaum untersucht.

Auch der Einfluss möglicher Co-Stimulantien wie Fibrin oder PRP ist bisher nicht ausreichend beschrieben und eine klare Empfehlung bezüglich ihres Einsatzes nicht vorgegeben. Um den Einfluss von Entzündungen auf verschiedene Knorpelreparaturtechniken, einschließlich der Minced Cartilage Implantation und der Autologen Chondrozyten Transplantation, besser zu verstehen, sind zusätzliche präklinische und klinische Studien erforderlich.

5. Zusammenfassung

Die Minced Cartilage Implantation (MCI) ist ein einzeitiges chirurgisches Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten, bei dem autologes Knorpelgewebe in Form kleiner Fragmente („Knorpelchips“) in den Defekt eingebracht wird, um durch enthaltene Chondrozyten und extrazelluläre Matrix die Knorpelregeneration zu fördern. Diese Studie untersucht den Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNFα auf die Chondrogenese von isolierten und kultivierten Chondrozyten im Vergleich zu Knorpelchips in einem standardisierten Entzündungsmodell. Hierzu wurden Gelenkknorpelzellen von Rindern nach der Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) Methode bis zur dritten Passage kultiviert und in eine Sphäroidkultur überführt. Parallel wurden Knorpelstücke auf weniger als 1 mm³ zerkleinert, um Knorpelchips herzustellen. TNFα wurde mit einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt, um einen entzündlichen Zustand zu simulieren. Die Studie zeigt, dass TNFα eine stärkere Beeinträchtigung der Chondrogenese bei passagierten Chondrozyten verursacht als bei nicht passagierten Zellen. Passagierte Chondrozyten weisen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber TNFα auf, was sich in einer veränderten Genexpression und erhöhter Produktion entzündlicher Marker wie IL-6 äußert. Im Vergleich dazu reagieren Knorpelchips und MCI-Konstrukte weniger empfindlich auf TNFα. Besonders auffällig ist, dass MCI, welches aus zerkleinertem Knorpel besteht, eine geringere IL-6-Freisetzung aufweist und weniger Auswirkungen auf entzündungsbedingte Marker zeigt. Die histologischen und biochemischen Analysen bestätigen, dass TNFα die Chondrogenese in passagierten Pelletkulturen stärker negativ beeinflusst als bei nicht passagierten Zellen und MCI-Konstrukten. MCI-Konstrukte zeigen eine höhere Resistenz gegenüber entzündlichen Reizen, was auf ein besseres Regenerationspotenzial in entzündlichen Gelenkumgebungen hindeutet. Zusammengefasst zeigt die Studie, dass die Minced Cartilage Implantation (MCI) bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der Arthrose potenziell vorteilhafter sein könnte als die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT). Dies könnte daraus abzuleiten sein, dass MCI weniger anfällig für die entzündlichen Einflüsse von TNFα ist. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass MCI möglicherweise eine bessere Option für die Behandlung von chondralen Defekten in entzündlichen Umgebungen darstellt, wenngleich weitere Forschung notwendig ist, um diese Ergebnisse in der klinischen Praxis zu bestätigen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Proteoglykane in der Knorpelmatrix 10

Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Chondrozytens 11

Abbildung 3: Aufbau der Knorpelzonen 12

Abbildung 4: Molekulare und zelluläre Veränderungen bei Arthrose im Synovialspalt 17

Abbildung 5: Auswahl eines knorpelregenerativen Verfahrens anhand Defektgröße 20

Abbildung 6: Verfahren der matrixunterstützten autologen Chondrozytenimplantation 23

Abbildung 7: Arthroskopische Versorgung eines retropatellaren chondralen Defekts 26

Abbildung 8: A) Kollagen-2-Expression

B) Immunhistochemie für Kollagen 2

C) Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung 37

Abbildung 9: A) GAG-Quantifizierung

B) Safranin O / Fast Green Histologie 38

Abbildung 10: TNFα-Einfluss auf die Genexpression von PRG4 und Aggrecan 39

Abbildung 11: A) Kollagen-1-Expression

B) Immunhistochemie für Kollagen 1

C) Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung 41

Abbildung 12: Kollagen X-Expression artikulärer Chondrozyten 43

Abbildung 13: TNFα-Einfluss auf die Genexpression von MMP-3 und MMP-13 44

Abbildung 14: Quantifizierung der GAG-Liberation/ DNA 46

Abbildung 15: A) Zeitliche Dynamik der IL-6 Ausschüttung

B) IL-6 Quantifizierung aus dem Nährmedium

C) IL-6 und

D) IL-8-Expression von Chondrozyten im Inflammationsmodell 47

Abbildung 16: A) NO-Quantifizierung aus dem Nährmedium

B) zeitliche Dynamik der NO-Liberation 49

Abbildung 17: Immunhistochemie für Caspase 3 50

7. Literaturverzeichnis

Acevedo L, Iselin L, Berkelaar MHM, …, Arnold MP. Comparison of Human Articular Cartilage Tissue and Chondrocytes Isolated from Peripheral versus Central Regions of Traumatic Lesions. Cartilage. 2020: 1947603520958154

Ahrens P, Hinterwimmer S, Tasser M, Fritsch L, Siebenlist S, Fürmetz J, Watrinet J. The Synovial Sealant Variant for Minced Cartilage Repair: A Technical Note and Retrospective Study. Indian J Orthop. 2024;58(8):1027–1034.

Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. J Orthop Res. 2001; 19: 785–796

Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. J Dev Biol. 2015; 3: 177–192

Albrecht FH. [Closure of joint cartilage defects using cartilage fragments and fibrin glue]. Fortschr Med. 1983; 101: 1650–1652

Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Morgaz J, …, Domínguez JM. Immunohistochemical Analysis of Knee Chondral Defect Repair after Autologous Particulated Cartilage and Platelet-Rich Plasma Treatment in Sheep. Int J Mol Sci. 2023; 24

Alquraini A, Jamal M, Zhang L, Schmidt T, Jay GD, Elsaid KA. The autocrine role of proteoglycan-4 (PRG4) in modulating osteoarthritic synoviocyte proliferation and expression of matrix degrading enzymes. Arthritis Res Ther. 2017; 19: 89

Angele P, Fritz J, Albrecht D, Koh J, Zellner J. Defect type, localization and marker gene expression determines early adverse events of matrix-associated autologous chondrocyte implantation. Injury. 2015; 46 Suppl 4: S2-9

Aurich M, Hofmann GO, Best N, Rolauffs B. Induced Redifferentiation of Human Chondrocytes from Articular Cartilage Lesion in Alginate Bead Culture After Monolayer Dedifferentiation: An Alternative Cell Source for Cell-Based Therapies? Tissue Eng Part A. 2018; 24: 275–286

Barbero A, Grogan SP, Mainil-Varlet P, Martin I. Expansion on specific substrates regulates the phenotype and differentiation capacity of human articular chondrocytes. J Cell Biochem. 2006; 98: 1140–1149

Batarfi WA, Yunus MHM, Hamid AA, Maarof M, Abdul Rani R. Breaking Down Osteoarthritis: Exploring Inflammatory and Mechanical Signaling Pathways. Life (Basel). 2025;15(8)

Bentley G, Biant LC, Carrington RWJ, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. J Bone Joint Surg Br. 2003; 85: 223–230

Bertuglia A, Pagliara E, Grego E, Ricci A, Brkljaca-Bottegaro N. Pro-inflammatory cytokines and structural biomarkers are effective to categorize osteoarthritis phenotype and progression in Standardbred racehorses over five years of racing career. BMC Vet Res. 2016; 12: 246

Bevill SL, Boyer KA, Andriacchi TP. The regional sensitivity of chondrocyte gene expression to coactive mechanical load and exogenous TNF-α stimuli. J Biomech Eng. 2014; 136: 91005

Biant LC, Bentley G. Stem cells and debrided waste: two alternative sources of cells for transplantation of cartilage. J Bone Joint Surg Br. 2007; 89: 1110–1114

Biant LC, Simons M, Gillespie T, McNicholas MJ. Cell Viability in Arthroscopic Versus Open Autologous Chondrocyte Implantation. Am J Sports Med. 2017; 45: 77–81

Bonasia DE, Marmotti A, Mattia S, Cosentino A, Spolaore S, Governale G, Castoldi F, Rossi R. The Degree of Chondral Fragmentation Affects Extracellular Matrix Production in Cartilage Autograft Implantation: An In Vitro Study. Arthroscopy. 2015; 31: 2335–2341

Bortoluzzi A, Furini F, Scirè CA. Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. Autoimmun Rev. 2018; 17: 1097–1104

Borzi RM, Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Uguccioni M, Gatti R, Orlandini G, Cattini L, Facchini A. Growth-related oncogene alpha induction of apoptosis in osteoarthritis chondrocytes. Arthritis Rheum. 2002; 46: 3201–3211

Borzì RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A. Chemokines in cartilage degradation. Clin Orthop Relat Res. 2004: S53-61

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med. 1994; 331: 889–895

Buckwalter JA. Mechanical Injuries of Articular Cartilage. Iowa Orthop J. 1992; 12: 50–57

Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. J Orthop Sports Phys Ther. 1998; 28: 192–202

Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. Clin Orthop Relat Res. 2002: 21–37

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect. 2005; 54: 465–480

Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF, Hebda PA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. Biochem J. 1997; 324 (Pt 1): 305–310

Cai LY, Kong XL, Xie Q, Xie J. The Effects of NF-kappaB Signalling on the TNF-α Induced Ratios of MMPs to TIMPs in Chondrocytes. J Sichuan Univ Med Sci Ed. 2016;47:642–648

Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R. Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. J Immunol. 2005; 175: 8296–8302

Charlier E, Deroyer C, Ciregia F, Malaise O, Neuville S, Plener Z, Malaise M, Seny D de. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). Biochem Pharmacol. 2019; 165: 49–65

Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J, Malaise MG, Seny D de. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. Int J Mol Sci. 2016; 17

Chauffier K, Laiguillon M-C, Bougault C, …, Sellam J. Induction of the chemokine IL-8/Kc by the articular cartilage: possible influence on osteoarthritis. Joint Bone Spine. 2012; 79: 604–609

Chen B, Wang L, Xie D, Wang Y. Exploration and Breakthrough in the Mode of Chondrocyte Death – A Potential New Mechanism for Osteoarthritis. Biomed Pharmacother. 2024;170:115990

Chen C, Xie J, Rajappa R, Deng L, Fredberg J, Yang L. Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2015; 47: 121–129

Chen D, Di Lu, Liu H, Xue E, Zhang Y, Shang P, Pan X. Pharmacological blockade of PCAF ameliorates osteoarthritis development via dual inhibition of TNF-α-driven inflammation and ER stress. EBioMedicine. 2019; 50: 395–407

Chen M, Jiang Z, Zou X, You X, Cai Z, Huang J. Advancements in Tissue Engineering for Articular Cartilage Regeneration. Heliyon. 2024;10:e25400

Chen T, Chen W, Xu T, Wang H, Zhang Y, Wang L, et al. Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. MedComm. 2026;7:e70727

Cheng N-C, Estes BT, Awad HA, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. Tissue Eng Part A. 2009; 15: 231–241

Chery DR, Han B, Li Q, Zhou Y, Heo SJ, Kwok B, et al. Early Changes in Cartilage Pericellular Matrix Micromechanobiology Portend the Onset of Post-Traumatic Osteoarthritis. Acta Biomater. 2020;111:267–278

Chiari C, Walzer S, Stelzeneder D, Schreiner M, Windhager R. Therapeutische Anwendung von Stammzellen in der Orthopädie. Orthopade. 2017; 46: 1077–1090

CHMP. European Medicines Agency (EMA). Spherox (Spheroids of Human Autologous Matrix-Associated Chondrocytes): EPAR Assessment Report. London: EMA; 2017.

Christensen BB, Foldager CB, Olesen ML, Hede KC, Lind M. Implantation of Autologous Cartilage Chips Improves Cartilage Repair Tissue Quality in Osteochondral Defects: A Study in Göttingen Minipigs. Am J Sports Med. 2016; 44: 1597–1604

Christensen BB, Olesen ML, Hede KTC, Bergholt NL, Foldager CB, Lind M. Particulated Cartilage for Chondral and Osteochondral Repair: A Review. Cartilage. 2020: 1947603520904757

Clark AL, Votta BJ, Kumar S, Liedtke W, Guilak F. Chondroprotective role of the osmotically sensitive ion channel transient receptor potential vanilloid 4: age- and sex-dependent progression of osteoarthritis in Trpv4-deficient mice. Arthritis Rheum. 2010; 62: 2973–2983

Cole BJ, Farr J, Winalski CS, Hosea T, Richmond J, Mandelbaum B, Deyne PG de. Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. Am J Sports Med. 2011; 39: 1170–1179

Cugat R, Alentorn-Geli E, Navarro J, …, García-Balletbó M. A novel autologous-made matrix using hyaline cartilage chips and platelet-rich growth factors for the treatment of full-thickness cartilage or osteochondral defects: Preliminary results. J Orthop Surg (Hong Kong). 2020; 28: 2309499019887547

Cugat R, Alentorn-Geli E, Steinbacher G, Álvarez-Díaz P, Cuscó X, Seijas R, Barastegui D, Navarro J, Laiz P, García-Balletbó M. Treatment of Knee Osteochondral Lesions Using a Novel Clot of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Mixed with Healthy Hyaline Cartilage Chips and Intra-Articular Injection of PRGF. Case Rep Orthop. 2017; 2017: 8284548

Cugat R, Samitier G, Vinagre G, …, Laiz P. Particulated Autologous Chondral-Platelet-Rich Plasma Matrix Implantation (PACI) for Treatment of Full-Thickness Cartilage Osteochondral Defects. Arthrosc Tech. 2021; 10: e539-e544

Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. J Orthop Res. 2005; 23: 425–432

Delman C, Wuellner J, Kreulen C, Lundeen G, Giza E. Particulated Autograft Cartilage Implantation for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus: A Novel Technique. Foot Ankle Spec. 2018; 11: 365–371

Deng Z, Jin J, Zhao J, Xu H. Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses. Stem Cells Int. 2016; 2016: 9201492

DiBartola AC, Everhart JS, Magnussen RA, Carey JL, Brophy RH, Schmitt LC, Flanigan DC. Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. Knee. 2016; 23: 344–349

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol. 2009; 27: 158–167

Domínguez Pérez JM, Fernández-Sarmiento JA, Aguilar García D, …, Cugat Bertomeu R. Cartilage regeneration using a novel autologous growth factors-based matrix for full-thickness defects in sheep. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2019; 27: 950–961

Duan W, Zhao Y, Ren X, Zhao R, Li Q, Sun Z, Song W, Yang Y, Li P, Wei X. Combination of chondrocytes and chondrons improves extracellular matrix production to promote the repairs of defective knee cartilage in rabbits. J Orthop Translat. 2021; 28: 47–54

Everts PA, van Erp A, DeSimone A, Cohen DS, Gardner RD. Platelet Rich Plasma in Orthopedic Surgical Medicine. Platelets. 2021; 32: 163–174

Evuarherhe A, Condron NB, Knapik DM, …, Cole BJ. Effect of Mechanical Mincing on Minimally Manipulated Articular Cartilage for Surgical Transplantation. Am J Sports Med. 2022; 50: 2515–2525

Eyre D. Collagen of articular cartilage. Arthritis Res. 2002; 4: 30–35

Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connect Tissue Res. 1982; 9: 247–248

Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. Matrix Biol. 2000; 19: 549–553

Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. Clin Orthop Relat Res. 2011; 469: 2706–2715

Frisbie DD, Lu Y, Kawcak CE, DiCarlo EF, Binette F, McIlwraith CW. In vivo evaluation of autologous cartilage fragment-loaded scaffolds implanted into equine articular defects and compared with autologous chondrocyte implantation. Am J Sports Med. 2009; 37 Suppl 1: 71S-80S

Frodl A, Siegel M, Fuchs A, Wagner FC, Schmal H, Izadpanah K, Yilmaz T. Minced Cartilage Is a One-Step Cartilage Repair Procedure for Small Defects in the Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Pers Med. 2022;12(11)

Fuchs J, Kuhnert R, Scheidt-Nave C. 12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland. J Health Monit. 2017;2(3):55–60.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther. 2006; 8 Suppl 2: S3

García-Manrique M, Calvet J, Orellana C, Berenguer-Llergo A, Garcia-Cirera S, Llop M, Albiñana-Giménez N, Galisteo-Lencastre C, Gratacós J. Synovial fluid but not plasma interleukin-8 is associated with clinical severity and inflammatory markers in knee osteoarthritis women with joint effusion. Sci Rep. 2021; 11: 5258

Gebhardt S, Zimmerer A, Balcarek P, Wassilew GI, Schoon J. The Influence of Arthroscopic Shaver Mincing and Platelet-Rich Plasma on Chondrocytes of Intraoperatively Harvested Human Cartilage. Am J Sports Med. 2023; 51: 2679–2687

Gentili C, Cancedda R. Cartilage and bone extracellular matrix. Curr Pharm Des. 2009; 15: 1334–1348

Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. Ann Rheum Dis. 2008; 67 Suppl 3: iii75-82

Graceffa V, Vinatier C, Guicheux J, Stoddart M, Alini M, Zeugolis DI. Chasing Chimeras - The elusive stable chondrogenic phenotype. Biomaterials. 2019; 192: 199–225

Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. Biomaterials. 2003; 24: 5163–5171

Greenwel P, Tanaka S, Penkov D, Zhang W, Olive M, Moll J, Vinson C, Di Liberto M, Ramirez F. Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. Mol Cell Biol. 2000; 20: 912–918

Guilak F, Mow VC. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. Journal of Biomechanics. 2000; 33: 1663–1673

Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu C-L, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. Matrix Biol. 2018; 71-72: 40–50

Guo H, Luo Q, Zhang J, Lin H, Xia L, He C. Comparing different physical factors on serum TNF-α levels, chondrocyte apoptosis, caspase-3 and caspase-8 expression in osteoarthritis of the knee in rabbits. Joint Bone Spine. 2011; 78: 604–610

Guo X, Xi L, Yu M, Fan Z, Wang W, Ju A, Liang Z, Zhou G, Ren W. Regeneration of articular cartilage defects: Therapeutic strategies and perspectives. J Tissue Eng. 2023; 14: 20417314231164765

Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol. 2003; 54: 469–487

Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. Clin Immunol. 2013; 146: 185–196

Häuselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. FEBS Lett. 1994; 352: 361–364

Higuchi H, Shirakura K, Kimura M, Terauchi M, Shinozaki T, Watanabe H, Takagishi K. Changes in biochemical parameters after anterior cruciate ligament injury. Int Orthop. 2006; 30: 43–47

Hinckel BB, Thomas D, Vellios EE, …, Gomoll AH. Algorithm for Treatment of Focal Cartilage Defects of the Knee: Classic and New Procedures. Cartilage. 2021: 1947603521993219

Hing WA, Sherwin AF, Poole CA. The influence of the pericellular microenvironment on the chondrocyte response to osmotic challenge. Osteoarthr Cartil. 2002; 10: 297–307

Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. J Clin Invest. 1995; 96: 2859–2869

Hong E, Reddi AH. Dedifferentiation and redifferentiation of articular chondrocytes from surface and middle zones: changes in microRNAs-221/-222, -140, and -143/145 expression. Tissue Eng Part A. 2013; 19: 1015–1022

Horváth E, Sólyom Á, Székely J, Nagy EE, Popoviciu H. Inflammatory and Metabolic Signaling Interfaces of the Hypertrophic and Senescent Chondrocyte Phenotypes Associated with Osteoarthritis. Int J Mol Sci. 2023;24(22)

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. Rheum Dis Clin North Am. 2008; 34: 623–643

Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann H-J. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. Osteoarthr Cartil. 2002; 10: 564–572

Irawan V, Sung T-C, Higuchi A, Ikoma T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. Tissue Eng Regen Med. 2018; 15: 673–697

Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. Knee. 2003; 10: 93–96

Jacobi M, Villa V, Magnussen RA, Neyret P. MACI - a new era? Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 2011; 3: 10

Jahn J, Halm-Pozniak A, Klutzny M, Noll M, Stärke C, Lohmann CH, Bertrand J. Collagen 1 gel may improve the regenerative capacity of minced adult and preosteoarthritic cartilage. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2024; 32: 821–828

Jeffery AK, Blunn GW, Archer CW, Bentley G. Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. J Bone Joint Surg Br. 1991; 73: 795–801

Jiang H, Ji P, Shang X, Zhou Y. Connection between Osteoarthritis and Nitric Oxide: From Pathophysiology to Therapeutic Target. Molecules. 2023; 28

Jørgensen AEM, Agergaard J, Schjerling P, Heinemeier KM, van Hall G, Kjaer M. The Regional Turnover of Cartilage Collagen Matrix in Late-Stage Human Knee Osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2022;30:886–895

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7: 33–42

Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. Arthritis Res Ther. 2008; 10: R63

Kennedy MI, Whitney K, Evans T, LaPrade RF. Platelet-Rich Plasma and Cartilage Repair. Curr Rev Musculoskelet Med. 2018; 11: 573–582

Khyzhnyak M, Vasilyeva I, Potapov O, Tsyndrenko O, Gafiychuk Y. Platelet-Rich Plasma and Platelet Fibrin: Standardized Preparation Protocols, Mechanisms of Activation, Storage Stability, and Regulatory Frameworks. East Ukr Med J. 2026;13:952–962

Kisiday JD. Expansion of Chondrocytes for Cartilage Tissue Engineering: A Review of Chondrocyte Dedifferentiation and Redifferentiation as a Function of Growth in Expansion Culture. Regen Med Front. 2019

Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum. 2005; 52: 128–135

Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Int J Mol Sci. 2021; 22

Kou S, Wu Y. Meta-analysis of tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism and knee osteoarthritis risk. BMC Musculoskelet Disord. 2014; 15: 373

Kraus VB, Sun S, Reed A, Soderblom EJ, Moseley MA, Zhou K, et al. An Osteoarthritis Pathophysiological Continuum Revealed by Molecular Biomarkers. Sci Adv. 2024;10:eadj6814

Kraus VB. Waiting for action on the osteoarthritis front. Curr Drug Targets. 2010; 11: 518–520

Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. Osteoarthr Cartil. 2015; 23: 1233–1241

Kunisch E, Kinne RW, Alsalameh RJ, Alsalameh S. Pro-inflammatory IL-1beta and/or TNF-alpha up-regulate matrix metalloproteases-1 and -3 mRNA in chondrocyte subpopulations potentially pathogenic in osteoarthritis: in situ hybridization studies on a single cell level. Int J Rheum Dis. 2016; 19: 557–566

Kvist AJ, Nyström A, Hultenby K, Sasaki T, Talts JF, Aspberg A. The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? Matrix Biol. 2008; 27: 22–33

Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal Biochem. 1980; 102: 344–352

Lange-Brokaar BJE de, Ioan-Facsinay A, van Osch GJVM, Zuurmond A-M, Schoones J, Toes REM, Huizinga TWJ, Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. Osteoarthr Cartil. 2012; 20: 1484–1499

Leddy HA, Christensen SE, Guilak F. Microscale diffusion properties of the cartilage pericellular matrix measured using 3D scanning microphotolysis. J Biomech Eng. 2008; 130: 61002

Lee JH, Fitzgerald JB, DiMicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. Arthritis Rheum. 2005; 52: 2386–2395

Lee W, Leddy HA, Chen Y, …, Liedtke WB. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111: E5114-22

Lei Y, Peng J, Dai Z, Liao Y, Liu Q, Li J, Jiang Y. Articular Cartilage Fragmentation Improves Chondrocyte Migration by Upregulating Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease. Cartilage. 2021: 19476035211035435

Levinson C, Cavalli E, Sindi DM, Kessel B, Zenobi-Wong M, Preiss S, Salzmann G, Neidenbach P. Chondrocytes From Device-Minced Articular Cartilage Show Potent

Outgrowth Into Fibrin and Collagen Hydrogels. Orthop J Sports Med. 2019; 7: 2325967119867618

Li Y, Frank EH, Wang Y, Chubinskaya S, Huang H-H, Grodzinsky AJ. Moderate dynamic compression inhibits pro-catabolic response of cartilage to mechanical injury, tumor necrosis factor-α and interleukin-6, but accentuates degradation above a strain threshold. Osteoarthr Cartil. 2013; 21: 1933–1941

Li Z, Yao S, Alini M, Grad S. Different response of articular chondrocyte subpopulations to surface motion. Osteoarthr Cartil. 2007; 15: 1034–1041

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res. 2003; 288: 208–217

Liang Y, Li J, Wang Y, He J, Chen L, Chu J, Wu H. Platelet Rich Plasma in the Repair of Articular Cartilage Injury: A Narrative Review. Cartilage. 2022; 13: 19476035221118419

Lippiello L, Hall D, Mankin HJ. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. J Clin Invest. 1977; 59: 593–600

Lipsky PE. Interleukin-6 and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 2006; 8 Suppl 2: S4

Liu B, Goode AP, Carter TE, …, McNulty AL. Matrix metalloproteinase activity and prostaglandin E2 are elevated in the synovial fluid of meniscus tear patients. Connect Tissue Res. 2017; 58: 305–316

Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. Adv Sci (Weinh). 2021; 8: e2004433

Lohmander S. Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. Baillieres Clin Rheumatol. 1988; 2: 37–62

López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. Osteoarthr Cartil. 2006; 14: 660–669

Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegård D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. Matrix Biol. 2004; 23: 381–391

Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. J Immunol. 1992; 148: 466–473

Lu Y, Dhanaraj S, Wang Z, Bradley DM, Bowman SM, Cole BJ, Binette F. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. J Orthop Res. 2006; 24: 1261–1270

Lubberts E, van den Berg WB. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. Adv Exp Med Biol. 2003; 520: 194–202

Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasheri A, Önnerfjord P, Bay-Jensen A. The minor collagens in articular cartilage. Protein Cell. 2017; 8: 560–572

Luyten FP, Denti M, Filardo G, Kon E, Engebretsen L. Definition and classification of early osteoarthritis of the knee. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012; 20: 401–406

Ma C-H, Wu C-H, Jou I-M, Tu Y-K, Hung C-H, Hsieh P-L, Tsai K-L. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes. Redox Biol. 2018; 14: 72–81

Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. World J Orthop. 2015; 6: 95–105

Macri L, Silverstein D, Clark RAF. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2007; 59: 1366–1381

Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P. Early osteoarthritis of the knee. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2016; 24: 1753–1762

Malemud CJ. Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017; 148: 305–325

Mardani M, Hashemibeni B, Ansar MM, Zarkesh Esfahani SH, Kazemi M, Goharian V, Esmaeili N, Esfandiary E. Comparison between Chondrogenic Markers of Differentiated Chondrocytes from Adipose Derived Stem Cells and Articular Chondrocytes In Vitro. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16: 763–773

Mark K von der, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. Arthritis Rheum. 1992; 35: 806–811

Marmotti A, Bonasia DE, Bruzzone M, Rossi R, Castoldi F, Collo G, Realmuto C, Tarella C, Peretti GM. Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-β1 and G-CSF. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2013a; 21: 1819–1833

Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, Castoldi F, Degerfeld MM von, Bignardi C, Mattia S, Maiello A, Rossi R, Peretti GM. Autologous cartilage fragments in a composite scaffold for one stage osteochondral repair in a goat model. Eur Cell Mater. 2013b; 26: 15-31; discussion 31-2

Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, Castoldi F, Rossi R, Piras L, Maiello A, Realmuto C, Peretti GM. One-step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012; 20: 2590–2601

Massen FK, Inauen CR, Harder LP, Runer A, Preiss S, Salzmann GM. One-Step Autologous Minced Cartilage Procedure for the Treatment of Knee Joint Chondral and Osteochondral Lesions: A Series of 27 Patients With 2-Year Follow-up. Orthop J Sports Med. 2019; 7: 2325967119853773

Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M. Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. J Immunol. 1995; 154: 5418–5425

Matsushita R, Nakasa T, Ishikawa M, Tsuyuguchi Y, Matsubara N, Miyaki S, Adachi N. Repair of an Osteochondral Defect With Minced Cartilage Embedded in Atelocollagen Gel: A Rabbit Model. Am J Sports Med. 2019; 47: 2216–2224

Matsushita T, Kuroda R. Osteoarthritis: Molecular Mechanisms and Treatments. In: Emans PJ, Peterson L, Hrsg. Developing Insights in Cartilage Repair. London: Springer London, 2014: 65–77

Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzì RM, Uguccioni M, Facchini A. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory

cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 1998; 41: 2165–2174

Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. J Immunol. 2003; 171: 4406–4415

Michalek AJ, Iatridis JC. A numerical study to determine pericellular matrix modulus and evaluate its effects on the micromechanical environment of chondrocytes. Journal of Biomechanics. 2007; 40: 1405–1409

Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, Court R, Biant LC, Metcalfe A, Waugh N. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess. 2017; 21: 1–294

Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. Maturitas. 2014; 78: 188–198

Moos V, Fickert S, Müller B, Weber U, Sieper J. Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. J Rheumatol. 1999; 26: 870–879

Murata K, Kanemura N, Kokubun T, Fujino T, Morishita Y, Onitsuka K, Fujiwara S, Nakajima A, Shimizu D, Takayanagi K. Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. Osteoarthr Cartil. 2017; 25: 297–308

Murphy CL, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. J Cell Physiol. 2004; 199: 451–459

Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. J Conserv Dent. 2013; 16: 284–293

Nehrer S, Neubauer M. Möglichkeiten und Grenzen der konservativen Therapie der Arthrose : Sportberatung, Trainingstherapie, Orthesen und Knorpeltherapeutika. Orthopade. 2021; 50: 346–355

Neidhart M, Gay RE, Gay S. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2000; 43: 1719–1728

Niemeyer P. Cartilage repair surgery for full-thickness defects of the knee in Germany: indications and epidemiological data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU). Archives of orthopaedic and trauma surgery. 2016: 1–7

Niemeyer P, Albrecht D, Aurich M, …, Angele P. Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk. Z Orthop Unfall. 2022

Niemeyer P, Andereya S, Angele P, …, Albrecht D. Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. Z Orthop Unfall. 2013; 151: 38–47

Olesen ML, Christensen BB, Foldager CB, Hede KC, Jørgensen NL, Lind M. No Effect of Platelet-Rich Plasma Injections as an Adjuvant to Autologous Cartilage Chips Implantation for the Treatment of Chondral Defects. Cartilage. 2019: 1947603519865318

Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 283: R7-28

Ossendorff R, Franke K, Erdle B, Uhl M, Südkamp NP, Salzmann GM. Clinical and radiographical ten years long-term outcome of microfracture vs. autologous chondrocyte implantation: a matched-pair analysis. Int Orthop. 2019; 43: 553–559

Ossendorff R, Grad S, Stoddart MJ, Alini M, Schmal H, Südkamp N, Salzmann GM. Autologous Chondrocyte Implantation in Osteoarthritic Surroundings: TNFα and Its Inhibition by Adalimumab in a Knee-Specific Bioreactor. Am J Sports Med. 2018; 46: 431–440

Ossendorff R, Walter SG, Schildberg FA, Spang J, Obudzinski S, Preiss S, Schneider S, Salzmann GM. Biologic principles of minced cartilage implantation: a narrative review. Arch Orthop Trauma Surg. 2023; 143: 3259–3269

Ossendorff R, Wang S, Kurth S, Jaenisch M, Assaf E, Strauss AC, et al. TNFα-Induced Inflammation Model: Evaluation of Concentration- and Passage-Dependent Effects on Bovine Chondrocytes. Int J Mol Sci. 2024;25(17)

Özler K, Aktaş E, Atay Ç, Yılmaz B, Arıkan M, Güngör Ş. Serum and knee synovial fluid matrix metalloproteinase-13 and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with late-stage osteoarthritis. Acta Orthop Traumatol Turc. 2016; 50: 356–361

Pablos JL, Cañete JD. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Curr Top Med Chem. 2013; 13: 705–711

Pareek A, Carey JL, Reardon PJ, Peterson L, Stuart MJ, Krych AJ. Long-Term Outcomes after Autologous Chondrocyte Implantation: A Systematic Review at Mean Follow-Up of 11.4 Years. Cartilage. 2016; 7: 298–308

Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, Amin AR. TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. J Immunol. 1998; 160: 4570–4579

Pelttari K, Lorenz H, Boeuf S, Templin MF, Bischel O, Goetzke K, Hsu H-Y, Steck E, Richter W. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. Arthritis Rheum. 2008; 58: 467–474

Pestka JM, Bode G, Salzmann G, Südkamp NP, Niemeyer P. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation for failed microfracture treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. Am J Sports Med. 2012; 40: 325–331

Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. Am J Sports Med. 2002; 30: 2–12

Pierzchala AW, Kusz DJ, Hajduk G. CXCL8 and CCL5 expression in synovial fluid and blood serum in patients with osteoarthritis of the knee. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011; 59: 151–155

Qiao Z, Xin M, Wang L, …, Dai K. Proteoglycan 4 predicts tribological properties of repaired cartilage tissue. Theranostics. 2020; 10: 2538–2552

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. J Clin Invest. 1996; 97: 2011–2019

Redman SN, Dowthwaite GP, Thomson BM, Archer CW. The cellular responses of articular cartilage to sharp and blunt trauma. Osteoarthr Cartil. 2004; 12: 106–116

Ren J, Ma J, Zhang X, Aimaiti A, Saiyiti M, Chen Y, Cao L. Diagnostic value of combined serum marker changes and quantitative MRI evaluation of cartilage volume of tibial plateau in a surgically-induced osteoarthritis dog model. J Int Med Res. 2017; 45: 2023–2035

Richter DL, Schenck RC, Wascher DC, Treme G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. Sports Health. 2016; 8: 153–160

Rothdiener M, Uynuk-Ool T, Südkamp N, Aurich M, Grodzinsky AJ, Kurz B, Rolauffs B. Human osteoarthritic chondrons outnumber patient- and joint-matched chondrocytes in hydrogel culture-Future application in autologous cell-based OA cartilage repair? J Tissue Eng Regen Med. 2018; 12: e1206-e1220

Roughley P, Martens D, Rantakokko J, Alini M, Mwale F, Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. Eur Cell Mater. 2006; 11: 1-7; discussion 7

Runer A, Leuthard L, Hoheisel L, Stadelmann VA, Preiss S, Salzmann GM, Hax J. Minced Cartilage Implantation Provides Comparable Outcomes to Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Lesions: A Matched-Pair Analysis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2025

Runer A, Ossendorff R, Öttl F, Stadelmann VA, Schneider S, Preiss S, Salzmann GM, Hax J. Autologous minced cartilage repair for chondral and osteochondral lesions of the knee joint demonstrates good postoperative outcomes and low reoperation rates at minimum five-year follow-up. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2023; 31: 4977–4987

Sabarish R, Lavu V, Rao SR. A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma (PRP) Obtained Following Preparation by Three Different Methods. J Clin Diagn Res. 2015; 9: ZC10-2

Salzmann GM, Calek A-K, Preiss S. Second-Generation Autologous Minced Cartilage Repair Technique. Arthrosc Tech. 2017; 6: e127-e131

Salzmann GM, Ossendorff R, Gilat R, Cole BJ. Autologous Minced Cartilage Implantation for Treatment of Chondral and Osteochondral Lesions in the Knee Joint: An Overview. Cartilage. 2020: 1947603520942952

Schlaak JF, Pfers I, zum Meyer Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. Clin Exp Rheumatol. 1996; 14: 155–162

Schneider S, Ossendorff R, Holz J, Salzmann GM. Arthroscopic Minced Cartilage Implantation (MCI): A Technical Note. Arthrosc Tech. 2021; 10: e97-e101

Sellam J, Berenbaum F. Arthrose et obésité. Rev Prat. 2012; 62: 621–624

Selmi TAS, Verdonk P, Chambat P, Dubrana F, Potel J-F, Barnouin L, Neyret P. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. J Bone Joint Surg Br. 2008; 90: 597–604

Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne PA. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. J Biol Chem. 1998; 273: 13625–13629

Silvestri T, Pulsatelli L, Dolzani P, Frizziero L, Facchini A, Meliconi R. In vivo expression of inflammatory cytokine receptors in the joint compartments of patients with arthritis. Rheumatol Int. 2006; 26: 360–368

Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health. 2009; 1: 461–468

Southworth TM, Naveen NB, Nwachukwu BU, Cole BJ, Frank RM. Orthobiologics for Focal Articular Cartilage Defects. Clin Sports Med. 2019; 38: 109–122

Sproul EP, Hannan RT, Brown AC. Controlling Fibrin Network Morphology, Polymerization, and Degradation Dynamics in Fibrin Gels for Promoting Tissue Repair. Methods Mol Biol. 2018; 1758: 85–99

Stoddart MJ, Grad S, Eglin D, Alini M. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. Regen Med. 2009; 4: 81–98

STOKES DG, LIU G, DHARMAVARAM R, HAWKINS D, PIERA-VELAZQUEZ S, JIMENEZ SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. Biochem J. 2001; 360: 461–470

Stone KR, Pelsis JR, Na K, Walgenbach AW, Turek TJ. Articular cartilage paste graft for severe osteochondral lesions of the knee: a 10- to 23-year follow-up study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2017; 25: 3824–3833

Styczynska-Soczka K, Amin AK, Hall AC. Cell-associated type I collagen in nondegenerate and degenerate human articular cartilage. J Cell Physiol. 2021; 236: 7672–7681

Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, …, Grodzinsky AJ. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage. Arthritis Rheum. 2009; 60: 2985–2996

Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage - inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. Biomaterials. 2011; 32: 5581–5589

Sun S, Bay-Jensen A-C, Karsdal MA, Siebuhr AS, Zheng Q, Maksymowych WP, Christiansen TG, Henriksen K. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. BMC Musculoskelet Disord. 2014; 15: 93

Takahashi A, Andrés MC de, Hashimoto K, Itoi E, Oreffo ROC. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. Osteoarthr Cartil. 2015; 23: 1946–1954

Thompson CL, Plant JC, Wann AK, Bishop CL, Novak P, Mitchison HM, Beales PL, Chapple JP, Knight MM. Chondrocyte expansion is associated with loss of primary cilia and disrupted hedgehog signalling. Eur Cell Mater. 2017; 34: 128–141

Tong L, Yu H, Huang X, Shen J, Xiao G, Chen L, Wang H, Xing L, Di Chen. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches. Bone Res. 2022; 10: 60

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther. 2008; 117: 244–279

Tseng T-H, Jiang C-C, Lan HH-C, Chen C-N, Chiang H. The five year outcome of a clinical feasibility study using a biphasic construct with minced autologous cartilage to repair osteochondral defects in the knee. Int Orthop. 2020; 44: 1745–1754

Uehara K, Zhao C, Gingery A, Thoreson AR, An K-N, Amadio PC. The effect of fibrin formulation on cell migration in an in vitro tendon repair model. J Orthop Sci. 2020

Vanden Berg-Foels WS, Scipioni L, Huynh C, Wen X. Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network. J Microsc. 2012; 246: 168–176

Vanlauwe J, Jelic M, Limbourg MJ, Luyten FP. Characterized Chondrocyte Implantation Challenges Current Paradigms for the Treatment of Symptomatic Joint Surface Lesions. In: Emans PJ, Peterson L, Hrsg. Developing Insights in Cartilage Repair. London: Springer London, 2014: 187–209

Vasara AI, Konttinen YT, Peterson L, Lindahl A, Kiviranta I. Persisting high levels of synovial fluid markers after cartilage repair: a pilot study. Clin Orthop Relat Res. 2009; 467: 267–272

Verbruggen G, Wittoek R, Vander Cruyssen B, Elewaut D. Tumour necrosis factor blockade for the treatment of erosive osteoarthritis of the interphalangeal finger joints: a double blind, randomised trial on structure modification. Ann Rheum Dis. 2012; 71: 891–898

Vincent TL. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: a focus on the pericellular matrix. Curr Opin Pharmacol. 2013; 13: 449–454

Vonk LA, Doulabi BZ, Huang C, Helder MN, Everts V, Bank RA. Preservation of the chondrocyte's pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. J Cell Biochem. 2010; 110: 260–271

Vonk LA, Roël G, Hernigou J, Kaps C, Hernigou P. Role of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroids in the Treatment of Large Chondral Defects in the Knee: A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2021; 22

Vonk LA, Windt TS de, Kragten AHM, Beekhuizen M, Mastbergen SC, Dhert WJA, Lafeber FPJG, Creemers LB, Saris DBF. Enhanced cell-induced articular cartilage regeneration by chondrons; the influence of joint damage and harvest site. Osteoarthr Cartil. 2014; 22: 1910–1917

Vuolteenaho K, Moilanen T, Hämäläinen M, Moilanen E. Effects of TNFalpha-antagonists on nitric oxide production in human cartilage. Osteoarthr Cartil. 2002; 10: 327–332

Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Oegema TR. Expression of type-X collagen in osteoarthritis. J Orthop Res. 1995; 13: 4–12

Wang N. Mechanically in vitro Induced Chondrogenesis under Simulation of Different Clinical Chondrocyte Transplantation Techniques. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg; 2010.

Wang S, Kurth S, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA, Ossendorff R. TNFα-Related Chondrocyte Inflammation Models: A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2024;25(19)

Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. Knee. 2007; 14: 177–182

Wiegertjes R, van de Loo FAJ, Blaney Davidson EN. A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis. Rheumatology (Oxford). 2020; 59: 2681–2694

Wilbrink B, Nietfeld JJ, den Otter W, van Roy JL, Bijlsma JW, Huber-Bruning O. Role of TNF alpha, in relation to IL-1 and IL-6 in the proteoglycan turnover of human articular cartilage. Br J Rheumatol. 1991; 30: 265–271

Wodzig MHH, Peters MJM, Emanuel KS, van Hugten PPW, Wijnen W, Jutten LM, Boymans TA, Loeffen DV, Emans PJ. Minced Autologous Chondral Fragments with Fibrin Glue as a Simple Promising One-Step Cartilage Repair Procedure: A Clinical and MRI Study at 12-Month Follow-Up. Cartilage. 2022; 13: 19–31

Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Mediators Inflamm. 2014; 2014: 561459

Wong C-C, Ou K-L, Lin Y-H, Lin M-F, Yang T-L, Chen C-H, Chan WP. Platelet-Rich Fibrin Facilitates One-Stage Cartilage Repair by Promoting Chondrocytes Viability, Migration, and Matrix Synthesis. Int J Mol Sci. 2020; 21

Wu J, Liu W, Bemis A, Wang E, Qiu Y, Morris EA, Flannery CR, Yang Z. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007; 56: 3675–3684

Xu L, Peng H, Wu D, Hu K, Goldring MB, Olsen BR, Li Y. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice. J Biol Chem. 2005; 280: 548–555

Xu L, Polur I, Servais JM, Hsieh S, Lee PL, Goldring MB, Li Y. Intact pericellular matrix of articular cartilage is required for unactivated discoidin domain receptor 2 in the mouse model. Am J Pathol. 2011; 179: 1338–1346

Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, Tajima K, Shimamura T, Sawai T. Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. Osteoarthr Cartil. 2006; 14: 435–441

Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2001; 44: 1056–1070

Zelinka A, Roelofs AJ, Kandel RA, de Bari C. Cellular Therapy and Tissue Engineering for Cartilage Repair. Osteoarthritis Cartilage. 2022;30:1547–1560

Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007; 45: 27–37

Zhang Y, Tawiah GK, Wu X, Zhang Y, Wang X, Wei X, et al. Primary Cilium-Mediated Mechanotransduction in Cartilage Chondrocytes. Exp Biol Med (Maywood). 2023;248:1279–1287

Zhang Y, Han Y, Sun Y, Hao L, Gao Y, Ye J, et al. Osteoarthritis: Molecular Pathogenesis and Potential Therapeutic Options. Signal Transduct Target Ther. 2026;11(1)

Zhang Z, Fan J, Becker KG, Graff RD, Lee GM, Francomano CA. Comparison of gene expression profile between human chondrons and chondrocytes: a cDNA microarray study. Osteoarthr Cartil. 2006; 14: 449–459

Zheng L, Zhang Z, Sheng P, Mobasheri A. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. Ageing Res Rev. 2021; 66: 101249

Zimmerer A, Gebhardt S, Kinkel S, Sobau C. Das Minced-Cartilage-Verfahren zur Therapie azetabulärer Knorpelschäden am Hüftgelenk. Oper Orthop Traumatol. 2023; 35: 100–109

8. Anhang

Instrumente

Mikro-Schraubröhre 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, D
Reaktionsgefäß Safe Fit 2,0 ml	Sarstedt AG & Co. KG, D
5 ml Glaspipette	Labomedic GmbH, Bonn, D
10 ml Glaspipette	Labomedic GmbH, Bonn, D
25 ml Glaspipette	Labomedic GmbH, Bonn, D
Sapphire Filter tip 10 µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
Sapphire Filter tip 20 µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
Sapphire Filter tip 1250 µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
15 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
50 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
Microplate 96 Well, PS	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
Filter tip 100 µl	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen, D
Low retention Filterspitzen 200 µl	Axon Labortechnik, Kaiserslautern, D
Autoklav	Systec GmbH & Co. KG, Linden, D
Biometra-orbital shaker	Beyer GmbH, Düsseldorf, D
2 ml Collection Tubes	Qiagen, Hilden, D
Dako Pen	Dako, Baar, CH
ELISA Platte weiß	Sarstedt AG & Co. KG, D
Eppendorf Tubes 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel, D

Mikroskop	Olympus K.K, Shiinjuku, JPN
Hitzeofen	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D
Einmal-Injektions-Kanüle	B.Braun, Melsungen, D
Flaschen 175 cm²	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Transferpipette, 30-300 µl	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, D
Compact Rührer	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Mikroskop Nikon	Nikon Corporation, Tokio, JPN
S1 Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Nano-Photometer	Implen GmbH, München, D
Einmalskalpell No. 11	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, JPN
Einmalskalpell No. 21	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, JPN
Spinnflasche	Corning, Inc., Corning, USA
3-teilige Einwegspritzen	B.Braun, Melsungen, D
10 ml Einwegsspritzen	B.Braun, Melsungen, D
Spritzenvorsatzfilter 0,20 µl	Labomedic GmbH, Bonn, D
Latex-Micro-OP-Handschuhe	Cardinal Health, Dublin, USA
Nalgene sterile Filter	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
ProFlex Thermocycler	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Vortex V-1 Plus	Biosan, Riga, LVA
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D
Mars Class 2 Sicherheitswerkbank	LaboGene, Lillerød, DNK

Inkubator	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zirkonoxid-Kugeln 1,4 mm	Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, D
Zirkonoxid-Kugeln 3,3 mm	Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, D
Reagenzien	
1-Bromo-3-Chloropropane	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
1-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
1,9-Dimethyl-Methylene Blau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
6-Aminocaproic Acid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Reverse Transcription 10X Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Acetic acid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Monoklonaler AK anti.Collagen Typ1	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Biotinylated Anti-bovine IL-6	Kingfisher Biotech, Inc., St. Paul, USA
Anti-bovine IL-6 Kingfisher	Biotech, Inc., St. Paul, USA
Bovine IL-6 Kingfisher	Biotech, Inc., St. Paul, USA
Chloramin T trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Citronensäure-Monohydrat Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Kollagenase Typ 2	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
DEPC-behandeltes-Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
4-(Dimethylamino)-benzaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DMEM, 4,5 g/L D-Glucose	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Desoxynukleosid-Triphosphat	Invitrogen, Carlsbad, USA
DPBS	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
ELISA:TMB Substrat und Stop-Solution	Kingfisher Biotech, Inc., St. Paul, USA
Entellan Mikroskopie Medium	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
FBS hitzeinaktiviert	Bio&Sell, Feucht, D
Glycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Griess Reagent System	Promega, Madison, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hepes Pufferan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
ImmPACT DAB Diluent	Vector Laboratories, Inc, Newark, USA
ImmPACT DAB Substrate, Peroxidase	Vector Laboratories, Inc, Newark, USA
L-Ascorbin-Säure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin 200 mM	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Trans-4-Hydroxy-L-Prolin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lichtgrün FS, gelblich	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, D
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Methylalkohol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
MGCL2 Lösung 25 mM	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Natronlauge 1 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Normales Pferdeserum	Vector Laboratories, Inc, Newark, USA
Penicilin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Proteinase-K-Lösung, RNA Grade	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-Caspase 3, Kaninchen Antikörper	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit	Vector Laboratories, Inc, Newark, USA
Reagent Diluent Konzentrat 2 (10x)	R & D Systems, Minneapolis, USA
RLT-Puffer	Qiagen N.V., Hilden, D
RNase-ExitusPlus	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
RNase freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden, D
RNeasy Mini Spin Säule	Qiagen N.V., Hilden, D
RPE Waschpuffer 65 ml Konzentrat	Qiagen N.V., Hilden, D
RW1 Waschpuffer 220 ml	Qiagen N.V., Hilden, D
Safranin O	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure 1mol/l- 1 N Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumacetat Trihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Stop-Lösung (IL-6 ELISA)	Kingfisher Biotech, Inc., St. Paul, USA
Streptavidin HRP	R & D Systems, Minneapolis, USA

TaqMan Genexpresisons MasterMix	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
TaqMan Reserve Transkription	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Tris-EDTA Puffer	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, USA
Polyacrylträger	Molecular Research Center, Cincinnati, USA
0,5 % Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Polysorbat 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Waschpuffer 25x Konzentrat	R & D Systems, Minneapolis, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol (Isomere), >98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Primocin: Primocin wird genutzt, um Primärzellen vor mikrobieller Kontamination zu schützen. Es ist ein Breitspektrum-Antibiotikum, das keine toxische Wirkung auf die Primärzellen hat, jedoch über die Angriffspunkte DNA-Gyrase, prokaryotische 30S- und 50S-Untereinheiten des Ribosoms sowie Ergosterol in der Zellmembran von Pilzen und Hefen tödlich für Mikroben ist.

Puffer und Lösungen

Chondrozyten-Differenzierungsmedium Minced Cartilage:

Das chondrozytäre Differenzierungsmedium bestand aus DMEM, ergänzt mit 10 % FBS, 1 M Hepes, 60 µg/ml Ascorbinsäurephosphat, 40 µg/ml L-Prolin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 %-Aminocapronsäure (EACA) und 0,2 % Primocin.

Chondrozyten-Differenzierungsmedium Pellet-Kulturen:
Das chondrozytäre Differenzierungsmedium bestand aus DMEM, ergänzt mit 10 % FBS, 1 M Hepes, 60 µg/ml Ascorbinsäurephosphat, 40 µg/ml L-Prolin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 %-Aminocapronsäure (EACA) und 1% PenStrep.
DEPC-behandeltes Wasser:
0,1 % DEPC in Milli-Q-Wasser, RNase-frei

DMEM in Subkultur:
Das DMEM-Medium für die Ernährung der Chondrozyten bestand aus 13,38 g/L DMEM mit hoher Glukose, 3,7 g/L Natriumbicarbonat, 0,11 g/L Natriumpyruvat, 20 ml/L Hepes (1 M) und 10 ml/L Penicillin/Streptomycin.

Fast Green:
Stammlösung (1 %): 1 g Fast Green, 100 ml MiliQ Wasser
Arbeitslösung (0,02 %): 2 ml Stammlösung, 97,9 ml MiliQ-Wasser, 100 µl reine Essigsäure

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung):
Waschlösung: in 200 ml MiliQ-Wasser befinden sich 0,01 M Phosphatpuffer, 0,0027 M Kaliumchlorid und 0,137 M Natriumchlorid, der pH-Wert liegt bei 7,4, bei 25°C. Dies sorgt für eine Aufrechterhaltung des physiologischen osmotischen Drucks. Zum Waschen bei der Isolierung von Chondrozyten aus den bovinen Fesselgelenken wurde 10 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Für die restlichen Waschlösungen wurde 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

TRI-Reagenz:
Das TRI-Reagenz wurde für die Methode der RNA-Isolierung genutzt und enthält Guanidinthiocyanat und Phenol.

TaqMan-Reagenzien für die reverse Transkription:
20µl RT-Reaktionsmischung bestanden aus 2,0 µl 10x TaqMan-Puffer (500 mM KCl, 100mM Tris/HCl, ph 8,3), 4,4 µl 25mM Magnesiumchlorid, 4,0µl DesoxyNTPs-Mischung (2,5 mM von jeweils 4 dNTPs), 1.0 µl 50 µM Random-Hexamer als Primer, 0,4 µl 20 U/µl

RNase-Inhibitor und 0,5 µl 50 U/µl MultiScribe Reverse Transkriptase des rekombinanten Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MuLV).

Fibrin-Thrombin-Kleber:

Zur Herstellung eines 100 IU/ml Thrombin-Stocks wurde Thrombin in 1,1 % NaCL in 2 mM $CaCl_2$ gegeben. Die Fibrinstammlösung mit einem Gerinnungsverhältnis von 82 % wurde mittels Rekonstitution von Fibrinogen in 1,1 % NaCl zu 30 mg/ml hergestellt. Zur Lösung des Fibrinogens sollte dies am besten mit warmer Kochsalzlösung beschichtet werden, da sich Fibrinogen nicht in Wasser auflöst.

Die Fibrinogen-Kochsalz-Lösung kann geschüttelt, jedoch nicht im Vortexer gemischt werden. Das Fibrinogen löst sich langsam auf und ergibt eine trübe Lösung. Zur sterilen Filtration wird ein 0,2 µm-Filter mit Überdruck mittels Spritzenvorsatz empfohlen. Die Arbeitslösung des Fibrin-Thrombin-Gemisch wird mit Konzentrationen von 5 mg/ml Fibrinogen und 0,5 IU/ml Thrombin hergestellt und dann in gleichen Volumina gemischt.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation basiert auf Arbeiten, die im Rahmen einer kooperativen wissenschaftlichen Studie entstanden sind und in der Publikation *“Comparison of Minced Cartilage Implantation with Autologous Chondrocyte Transplantation in an In Vitro Inflammation Model”* veröffentlicht wurden. Die jeweiligen Beiträge der Autor:innen wurden im Artikel offengelegt. Meine eigene wissenschaftliche Leistung als Mitautorin stelle ich nachfolgend transparent dar: Die konzeptionelle Entwicklung und methodische Grundstruktur der Studie wurden durch meine beiden Betreuer Prof. Dr. Frank Schildberg und Dr. Robert Ossendorff erarbeitet.

Ich war nicht federführend an der Initialplanung beteiligt, habe jedoch im weiteren Verlauf aktiv an der praktischen Ausgestaltung der experimentellen Abläufe mitgewirkt. Ich war maßgeblich unter Anleitung von Dr. Robert Ossendorff an der Durchführung der experimentellen Arbeiten beteiligt, die Zellkulturarbeiten, Probenverarbeitung und die Durchführung biochemischer sowie molekularbiologischer Analysen umfasste. Die Datenerhebung und -auswertung erfolgte dabei in enger Abstimmung mit den betreuenden Wissenschaftlern Prof. Dr. Schildberg und Dr. Ossendorff.

Im Rahmen der formalen Analyse habe ich an der statistischen Auswertung und Datenaufbereitung mitgewirkt. Dazu zählten die Aufbereitung von Messergebnissen, erste Auswertungen mit grafischer Darstellung sowie die Interpretation einzelner Datensätze im Vergleich. Die wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse sowie Diskussionen zu möglichen Schlussfolgerungen erfolgten gemeinsam mit den weiteren Koautorinnen. Meine Beiträge bezogen sich insbesondere auf die Bewertung experimenteller Beobachtungen und die kritische Reflexion der methodischen Umsetzung in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schildberg und Dr. Robert Ossendorff.

Erklärung zum Einsatz von KI-Tools

Bei der Erstellung dieser Dissertation wurden ChatGPT (OpenAI) und DeepL Pro unterstützend für sprachliche Überarbeitungen, Formulierungsvorschläge und Übersetzungen genutzt. Die wissenschaftliche Konzeption, Literaturrecherche, Datenauswertung, Interpretation der Ergebnisse und alle Schlussfolgerungen erfolgten eigenständig durch die Verfasserin. Die Verantwortung für sämtliche Inhalte dieser Dissertation liegt ausschließlich bei der Verfasserin.

10. Veröffentlichungen

Teile der Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Ossendorff R, Grede L, Scheidt S, Strauss AC, Burger C, Wirtz DC, Salzmann GM, Schildberg FA. *Comparison of Minced Cartilage Implantation with Autologous Chondrocyte Transplantation in an In Vitro Inflammation Model.* **Cells.** 2024 Mar 20;13(6):546. https://doi.org/10.3390/cells13060546

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Schildberg für die wohlwollende Betreuung meiner Arbeit, die konstruktive wissenschaftliche Begleitung und die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Arbeitsbereich durchführen zu dürfen.
Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Dr. Robert Ossendorff, der mich von Anfang an in meiner Arbeit bestärkt und mir sein Vertrauen entgegengebracht hat. Seine engagierte Betreuung, seine vielen hilfreichen Anregungen und seine fachliche wie menschliche Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
Ein großes Dankeschön richte ich auch an das gesamte Team des Labors der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Bonn. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den kollegialen Austausch und die praktische Unterstützung in allen Phasen der Laborarbeit bin ich sehr dankbar.
Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir stets mit Rückhalt, Geduld und Ermutigung zur Seite gestanden hat, auch in herausfordernden und stressreichen Phasen. Ohne diese Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.