# Danalache Labor

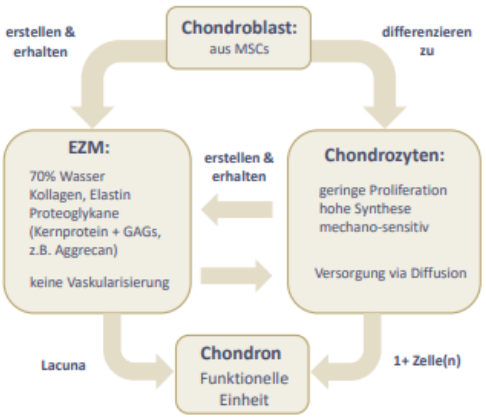
## Knorpel

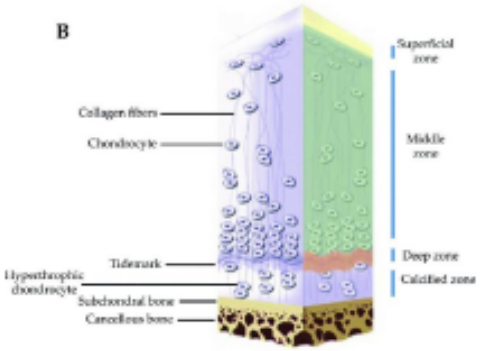
▼ Zusammenfassung

▼ Anatomie

= Flexibles Bindegewebe

- Einteilung:
  - Hyaliner Knorpel: Gelenke, Nase, Trachea häufigster Typ, Knochenvorläufer in der Entwicklung, ermöglicht Gelenkbewegung, Dämpf- und Stützstruktur
  - Elastischer Knorpel: Ohr, Epiglottis, Gefäßwand Flexibilität, Form
  - Faserknorpel: Bandscheiben, Menisken Absorbiert Schock
  - Oberflächliche Zone: Flache, Horizontale Zellen
  - Mittlere Zone: runde, vertikale Zellen, U-förmig
  - Tiefe Zone: runde Zellen, single strings
  - Tidemark: Übergangslinie zu kalzifizierter Zone
  - kalzifizierte Zone: nächster Bereich an subchondralem Knochen, Beginn der Kalzifizierung




- Heilungsfähigkeit:
  - Avasculäre Natur: Keine Blutgefäße, Nährstoffversorgung durch Diffusion beschränkt, geringe Versorgung führt zu langsamer Regeneration
  - Knorpelwachstum: Chondrozyten Reifung: ~1-2 Wochen

    Chondroblasten werden in Matrix umschlossen
  - Reifung zu erwachsenem Knorpel: Monate bis Jahre
    Geringe Zellproliferation von Chondrozyten

- starke Unterschiede: Abhängig von Alter, Hormonspiegel, Ernährung und mechanischen Stimulationen

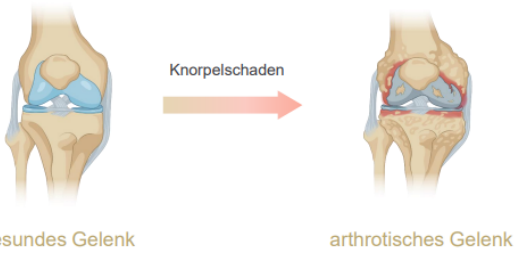
→ Schäden führen oft zu anhaltenden Schmerzen und Funktionsstörungen aufgrund unzureichender Reparatur und Bildung von Faserknorpel

| | Hyaliner Knorpel | Faserknorpel |
|---|---|---|
| **Ort** | auf meisten Gelenkoberflächen | Bandscheiben, Menisken |
| **Aufbau** | dichte Matrix aus Typ-II-Kollagenfasern; spärliche, gleichmäßig verteilte Chondrozyten | Dichte Matrix aus Kollagenfasern vom Typ I; Chondrozyten zahlreicher und in Reihen angeordnet, kein Perichondrium |
| **E-Modul** | 0.5 bis 1.5 MPa | 1.0 bis 2.0 MPa |
| **Funktion** | glatte, reibungsarme Oberfläche für Gelenkbewegungen, absorbiert Druckkräfte | Absorbiert und verteilt höhere Druckkräfte, strukturelle Unterstützung und Festigkeit |
| **Flexibilität** | Relativ flexibel, ermöglicht uneingeschränkte Gelenkbewegung | Aufgrund seiner dichten Kollagenfasern weniger flexibel als hyaliner Knorpel |

▼ Arthrose / Osteoarthritis

= chronische Gelenkerkrankung, die durch Degeneration von Knorpel und subchondralem Knochen gekennzeichnet ist

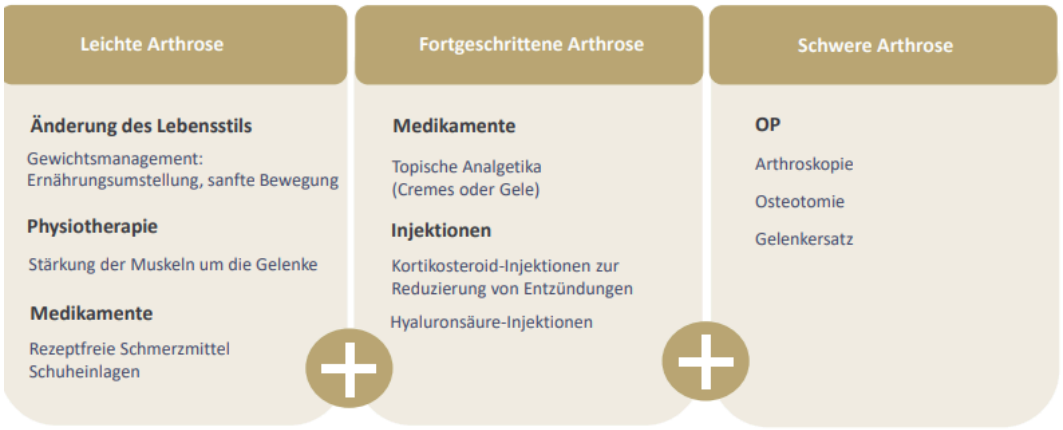
→ Schmerzen, Steifheit, beeinträchtigte Gelenkfunktionen




- Symptomverlauf: Gelenkschmerzen → Steifigkeit → Schwellungen → Bewegungseinschränkung → Krepitation → Knochensporn → Muskelschwäche → Gelenkverformungen
- Betroffene Stellen: starke Belastungen und wiederholte Nutzung: Knie, Hüfte, Hände, Wirbelsäule, Füße
- Verteilung: 500 mio weltweit, 70% älter als 55 und w/m : 60/40
- Ursachen und Riskikofaktoren:
  - soziodemografische Faktoren (Alter, weibliches Geschlecht)
  - wiederholter Stress im Sport oder bei der Arbeit
  - Genetik
  - Fettleibigkeit
  - Stoffwechselkrankheiten
  - bereits bestehende Gelenkerkrankungen

- Gelenkverletzungen

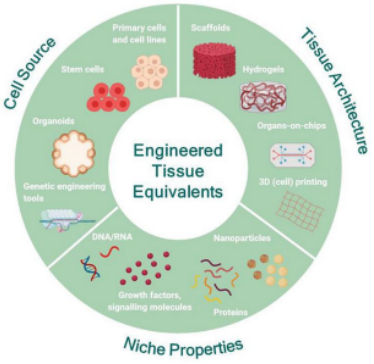
- ! Rheumatoide Arthritis: chronische Autoimmunerkrankung, bei der das Immunsystem die Gelenke angreift und Entzündungen, Schmerzen und Gelenkschäden verursacht
- Degenerationsphasen: single strings → double strings → small clusters → big clusters
- Behandlungsmöglichkeiten




  - nur 5% erreichen annähernd normale körperliche Aktivität
  - 15% der jüngeren Patienten haben nach 5 Jahren eine erneute OP
  - 17% (Hüfte) und 14% (Knie) wollen sich OP unterziehen

  ! aktuelle Behandlungen machen nur eine Linderung der Symptome

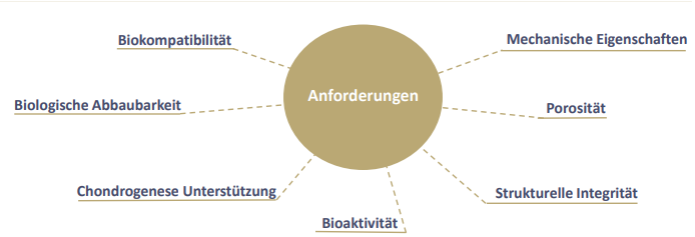
▼ Knorpel Tissue Engineering




→ Struktur, Funktion und Umgebung des natürlichen Knorpel muss nachgeahmt werden

- Zellquellen:
  - Chondrozyten: Primärzellen, die für die Knorpelreparatur verwendet werden, begrenzte Verfügbarkeit und begrenztes Expansionspotenzial, Phänotyp-Instabilität
  - Mesenchymale Stammzellen (MSC): Können in Chondrozyten differenzieren, umfassend untersucht für die Knorpelreparatur, immunprivilegiert, wodurch das Risiko einer Abstoßung verringert wird

- iPSCs: Umprogrammierte adulte Zellen, potenziell unbegrenzte Quelle, patientenspezifischer Chondrozyten, Vielversprechende Option für die Knorpelzüchtung, Sicherheit und Wirksamkeit erfordern weitere Tests
- Scaffolds: 3D Strukturen




**Natürliche Polymere**

- Kollagen, Hyaluronsäure, Chitosan, Chondroitinsulfat, Fibrin

**Vorteile:**
- Hohe Biokompatibilität
- Bioaktiv
- Fördern Adhäsion, Proliferation und Differenzierung

**Nachteile:**
- Geringe mechanische Festigkeit
- Schneller Abbau

**Synthetische Polymere**

- PEG, PCL, PLA, Polyurethan, PGA, PES

**Vorteile:**
- Einstellbare Eigenschaften
- Hohe mechanische Festigkeit

**Nachteile:**
- Kann Entzündungen verursachen
- Begrenzte Bioaktivität
- Benötigt Oberflächenmodifikation für Haftung

**Hybrid-Materialien**

- Collagen-PLA blend, PEG-Alginate

**Vorteile:**
- Kombiniert Bioaktivität mit mechanischer Festigkeit
- Regulierbare Degeneration

**Nachteile:**
- Komplexe Fertigung
- Mögliche Instabilität
- Für optimale Leistung ist Finetuning erforderlich

**Scaffold Designs**




**3D Membranen**

- **Dünne, flexible Membranen, die eine poröse 3D-Struktur für das Zellwachstum bieten**
- **Schwammartig**

**Vorteile:**
- Gute mechanische Eigenschaften
- In hohem Maße anpassbare Porosität
- Geeignet für belastbare Anwendungen

**Nachteile:**
- Begrenzte Flexibilität bei komplexen Formen
- Risiko einer ungleichmäßigen Zellverteilung

**Anwendung:**
- Geeignet für die In-vivo-Knorpelreparatur
- Gelenkknorpelgerüst

**Hydrogele**

- **Wasserbasierte Netzwerke, die den hohen Wassergehalt von Knorpel imitieren**

**Vorteil:**
- Hoher Wassergehalt unterstützt das Überleben der Chondrozyten
- Weich, flexibel, ermöglicht Nährstoffdiffusion
- Kann Zellen und Wachstumsfaktoren einkapseln

**Nachteile:**
- Begrenzte mechanische Festigkeit
- Häufig schnelle Degradationsrate

**Anwendung:**
- Geeignet für Knorpeldefekte im Frühstadium
- Zur Verabreichung von Medikamenten/Zellen

**Vliesstoffe**

- **Zufällig ausgerichtete Fasern bilden eine netzartige Struktur**

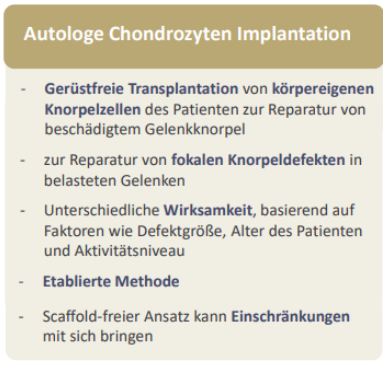
**Vorteile:**
- Große Oberfläche für die Zellhaftung
- Gute Durchlässigkeit für Nährstoffe und den Austausch von Abfallstoffen
- Unterstützt die Zellinfiltration

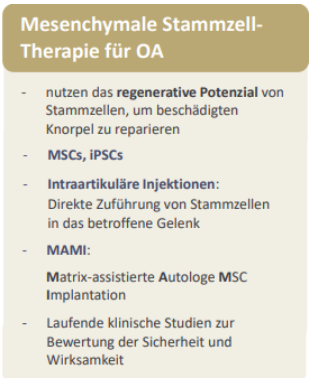
**Nachteile:**
- Mäßige mechanische Festigkeit
- Zufällige Faserausrichtung kann die Zellorientierung beeinflussen

**Anwendung:**
- Geeignet für die Abdeckung großer Defekte
- Ideal für die Gerüstentwicklung

- Signalfaktoren: Wachstumsfaktoren:
  - Förderung der Migration und Proliferation von Chondrozyten
  - Verbesserung der chondrogenen Differenzierung von Stammzellen
  - Rekrutierung endogener Stammzellen in die Läsion
    transforming growth factor beta (TGF-β),
    bone morphogenetic protein-2 (BMP-2),
    and insulin-like growth factor-1 (IGF-1)
- Sauerstoff und Nährstoffe diffundieren aus Synovialflüssigkeit, Gehalt nimmt in tieferen Zonen ab

- Mechanische Signale: Druck-, Scher,- Zugspannung, Hydrostatischer Druck




- Herausforderungen:
  - Mangelnde Blutversorgung beeinträchtigt die Nährstoffversorgung und Heilungsfähigkeit
  - Erschwerter Überlebensfähigkeit der Zellen und Implantatintegration
  - Reproduktion der komplexen zonalen Struktur des Knorpels
  - Nachahmung der speziellen tragenden und elastischen Eigenschaften von Knorpel, um dem Druck auf die Gelenke standzuhalten
  - Chondrozyten neigen dazu, sich während der In-vitro-Expansion zu dedifferenzieren
  - Verringert die Qualität des gezüchteten Gewebes und behindert die Produktion von Hyalinknorpel
  - Sicherstellung der Langlebigkeit des künstlichen Knorpels unter wiederholten mechanischen Belastungen
  - Beeinträchtigen die Heilung, behindern die Integration und führen zur Degeneration des neu gebildeten Knorpelgewebes
  - Komplexer Zulassungsprozess
  - Entwicklungskosten, Refinanzierung, Produktionssteigerung
- Perspektiven:
  - Bioprinting
  - Magnetische Hydrogele

# Osteochondrales Explantat

▼ Zusammenfassung

- Gewinnung und Einteilung:



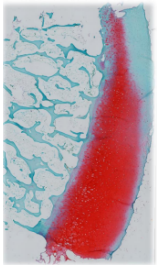

- **Varianten**
  1. kein Defekt
  2. leerer Defekt
  3. Defekt + ChondroFiller®
  4. Defekt + Fibrinkleber
  5. Defekt + ChondroFiller® + MSCs
  6. Defekt + Fibrinkleber + MSCs



- Kultur mit unterschiedlichen Medien (Knochenmedium und Knorpelmedium) für 1, 2 oder 3 Wochen
- Kultur nach entsprechender Zeitbeendet, OE halbiert
- eine Hälfte für Zellvitalitäts-Assay (MTT-Färbung): Metabolisch aktive Zellen färben sich Lila
- andere Hälfte für Biochemische Assays: Zellzahl, GAGs, Kollagen

  ! dafür Ameisensäureentkalkung, da nur entkalkter Knochen geschnitten werden kann

  - Hämatoxilin färbt Zellkerne braun
  - Safranin-O färbt GAGs rot
  - Fast Green färbt Kollagenfasern blaugrün
  - wenn Tidemark vorhanden, dann auch in blau
  - Propidiumiodid-Färbung: Fluoreszenzfärbung, die DNA rot anfärbt



! degenerierter Knorpel kann an demaskierten Kollagenfasern und Clustern erkannt werden

# Zellbiomechanik

▼ Zusammenfassung

▼ Allgemeines

- Mechanische Eigenschaften beeinflussen Funktionalität und Physiologie

→ Schlüsselrolle bei Zellteilung, Migration, Differenzierung, Signalübertragung

→ Veränderungen können auf Krankheiten hinweisen

- Hauptkomonenten
  - Zytoskelett: Zellgerüst aus Proteinen
  - Zellmembran: flexible Struktur, die die Zelle umschließt und den Stoffaustausch kontrolliert
  - Zellkern: zentrale Regulation der Genexpression

▼ Zytoskelett

- Aktin:
  - 7nm Durchmesser, Monomere (G- und F-Aktin),

        - ATP-abhängige Gestalt, 2 Monomere bilden eigentliches Filament
        - Bestandteil des Zytoskeletts, Zellwanderung, Muskelkontraktion
    - Intermediärfilamente:
        - 10nm Durchmesser, >60 bekannte IF
        - Stabilisierung, Signalübertragung, Zell-Zell-Verbindungen
    - Microtubuli
        - 25nm Durchmesser, α-Tubulin und ß-Tubulin bilden Dimer, Lagern sich zusammen
        - Transport in der Zelle, Zellteilung: Spindelapparat

▼ Zellmembran

- Doppelschicht aus amphiphilen Lipiden
- enthält Transmembranproteine

▼ Atomic Force Microscopy

- misst Topografie und mechanische Kräfte zwischen scharfer Spitze und Probenoberfläche

→ misst Ablenkung eines Cantilevers

- Hauptkomponenten:
    - Cantilever: Flexibler Hebel mit scharfer Spitze am Ende (unterschiedliche Formen)
    - Laserstrahl: Misst die Ablenkung des Cantilevers.
    - Photodetektor: Erfasst die reflektierten Laserstrahlen und wandelt sie in ein Bild um.
    - Piezoelektrischer Scanner: Bewegt die Probe unter der Spitze.
- Elastizitätsmodul:
    - E = σ/ε (Spannung durch relativen Längenunterschied bei Dehnung)

  =Verhalten bei Verformung als entstehende Spannung
    - hoher E-Modul: steif, unverformbar, niedriger E-Modul: elastisch
    - lebende Zellen haben relativ niedrigen E-Modul (0,1kPa- 10 GPa)
- Force-Distance Kurve
    - quantifiziert Anziehung und Abstoßung zwischen der Spitze und der Probe
    - Verhalten übersetzt sich in mechanische Eigenschaften
    - Force = Vertical Laser Deflection
    - Distance entspricht der Z-Piezo Position
- Hertz-Modell
    - ermöglicht Berechnung des E-Modul unter Berücksichtigung der geometrischen Form des Cantilevers

- Limitationen
  - Gute Bildqualität erforderlich, um einheitliche Messungen zu gewährleisten
  - Je nach Zellregion sehr unterschiedliches E-Modul
  - Cantilever muss erst entsprechend der Federkonstante kalibriert werden

▼ Anwendungen

- Geweberegeneration: Mechanische Stimuli sind entscheidend für das Wachstum und die Heilung von Geweben
- Künstliche Organe: Entwicklung von Biomaterialien, die die mechanischen Eigenschaften von natürlichen Geweben nachahmen
- Krebsforschung:
  - Biomechanische Eigenschaften der Krebszellen sind wegweisende Marker
  - Gibt Aufschluss über zytoskelettale Architektur
  - Biomarker für Metastasierungsverhalten
  - Krebszellen sind idR. Elastischer als ihre benigne Zelllinie
  - Potenzielle therapeutische Targets → zytoskelettale Reorganisation
- Knorpelforschung
  - Chondrozyten sind von PCM und ECM umgeben
  - E-Modul der PCM und ECM nehmen bei Arthrose ab

# Potenzielle Fragen

▼ Fragen

- Was ist keine charakteristische Eigenschaft von hyalinem Knorpel?
  - Avasculäre Natur
  - Geringe Zellproliferation
  - Hauptbestandteil: Wasser, Kollagen Typ I, Proteoglykane
  - Weist komplexe zonale Struktur auf
  - Ist Knochenvorläufer in Entwicklung
- Was trifft auf OA zu?
  - typische Symptome: Gelenkschmerzen, Krepitation, Muskelschwäche
  - Genetik, Fettleibigkeit, Alter, männliches Geschlecht erhöhen OA Risiko
  - OA ist eine chronische Immunerkrankung, bei der das Immunsystem die Gelenke angreift
  - Topische Analgetika, operative Eingriffe ermöglichen Knorpelregeneration
  - Knie-/Hüft-/ Schultergelenk sind am häufigsten von OA betroffen
- Welche Aussagen zu den Herausforderungen an Knorpel TE sind falsch?

- ist ein vollständig bewährtes Verfahren, das keine weitere Forschung benötigt
- Nachbildung der zonalen Struktur ist entscheidend für Funktionalität
- Chondrozyten können wieder de-differenzieren
- Entzündungs-/ Immunreaktionen stellen Bedrohung dar
- Einführung in klinischen Einsatz ist einfach und schnell