

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
König-Ludwig-Haus  
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Pilotstudie zum Vergleich der Knorpelrekonstruktion durch  
Autologe Chondrozytentransplantation und Autologe  
Stammzelltransplantation in Kollagen I Hydrogelen am  
Göttinger Mini-Pig**

**Inaugural – Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Theresa Krätzig  
aus Göttingen

Würzburg, April 2016



Referent: Prof. Dr. Ulrich Nöth

Koreferent: Prof. Dr. Jürgen Groll

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. September 2016

Die Promovendin ist Ärztin

**Meinen Eltern gewidmet**

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-Associated Virus
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
APAAP	Alkali-Phosphatase-Anti-Alkali-Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CaReS®	Cartilage Regeneration System
CDMP1	Cartilage-Derived Morphogenetic Protein 1
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col I bis X	Kollagen Typ I bis X
CS4	Chondroitin-4-Sulfat
CS6	Chondroitin-6-Sulfat
d	Tage
DMEM/HAM'S F12	Dulbecco's Modified Egel Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Automated Cell Sorting
FBS	Foetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Good Manufacturing Practice
HCl	Hydrochlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRPO-Konjugat	Horseradish Peroxidase Konjugat
HSV	Herpes Simplex Virus
IGF	Insulin Like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
i. m.	intramuskulär
LIUS	Low-Intensity Ultrasound
M	Mol

MACT	Matrixgekoppelte Autologe Chondrozyten Transplantation
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
OATS	Osteochondrales Autologes Transfer System
PBS	Phosphate Buffered Saline
SD	Standardabweichung
SZ	Stammzellen
TGF	Transforming Growth Factor
Vol%	Volumenprozent
x g	vielfaches der Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Gelenkknorpel – Anatomie und Physiologie	1
1.2 Möglichkeiten der Gelenkknorpeltherapie	2
1.3 Matrixgekoppelte ACT (MACT) und Trägermaterialien	6
1.4 Cartilage Repair System (CaReS®)	8
1.5 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)	9
1.6 Chondrogene Differenzierung der MSZ in Hydrogelen	12
1.7 Fragestellung	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	14
2.2 Versuchstiere und operatives Vorgehen	15
2.3 Operation I: Stammzellgewinnung und Knorpelbiopsie	15
2.4 Zellpräparation und Kultivierung	16
2.5 Herstellung der Kollagenhydrogele	17
2.6 Einbringen der Zellen in die Hydrogele und Proliferation	18
2.6.1 Chondrozyten	18
2.6.2 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)	18
2.7 Operation II: Therapie der Knorpeldefekte	19
2.8 Makroskopie	20
2.9 Aufbereitung der Präparate	20
2.10 Histologie und Immunhistochemie	21
2.11 Chemikalien und Geräte	24
2.11.1 Chemikalien	24
2.11.2 Antikörper	25
2.11.3 Materialien und Geräte	25
2.11.4 OP-Material	27
2.11.5 Medikamente	28

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Zellanalyse	28
3.1.1	Chondrozyten in Hydrogelen	28
3.1.2	Mesenchymale Stammzellen (MSZ)	29
3.1.2.1	MSZ in Kultur	29
3.1.2.2	MSZ in Hydrogelen	30
3.2	Makroskopisches Erscheinungsbild	31
3.3	Histologische Analyse	33
3.3.1	Chondrozyten	33
3.3.2	MSZ	34
3.3.3	Kontrolle	36
3.3.4	Histologische Auswertung – Score	37
3.4	Immunhistochemische Analyse	39
3.4.1	Chondrozyten	39
3.4.2	MSZ	39
3.4.3	Kontrolle	40
3.4.4	Immunhistochemische Auswertung – Score	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Versuchsaufbau	43
4.2	Kollagenhydrogele als Trägermatrix	46
4.3	Ergebnisse	49
4.4	Perspektiven	52
4.4.1	Vordifferenzierung der MSZ in Kultur und/oder Hydrogel	52
4.4.2	Geneherapie	54
4.4.3	Markierung der Zellen	56
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Gelenkknorpel – Anatomie und Physiologie

Hyaliner Gelenkknorpel ist stark beanspruchtes avaskuläres Gewebe, das komplexen Druck- und Scherkräften bei verschiedenen Bewegungsabläufen standhalten muss. In Abhängigkeit von den individuellen Belastungen ist der Knorpel in der Lage, seine mechanischen Eigenschaften innerhalb eines Gelenks an die jeweiligen Verhältnisse anzupassen, so dass die biochemische Zusammensetzung des Knorpels und die Morphologie der Chondrozyten variiert [Russlies et al., 2002; Poole et al., 2001].

Knorpelgewebe besteht zu ca. 1% des Gesamtvolumens aus Chondrozyten. Achtzig Prozent des Nassgewichts des Gewebes macht die flüssige Phase (Wasser, Gase, Metabolite, Kationen) aus, die in ständigem Austausch mit der umgebenden Synovialflüssigkeit steht, um die Versorgung des Knorpels sowie einen reibungslosen, schmerzfreien Bewegungsablauf sicherzustellen. Die extrazelluläre Matrix besteht bei hyalinem Knorpel aus Kollagen (90 – 95% Typ II Kollagen, geringe Anteile Typ VI, IX, X, XI; Typ X Kollagen nur nahe der subchondralen Lamelle in der Kalzifikationszone), Proteoglykanen und nichtkollagenen Proteinen (Glykoproteine, Fibronektin, Tenascin) [Temenoff et al., 2000].

Die im Knorpelgewebe befindlichen Chondrozyten verfügen über eine sehr geringe Teilungsrate. Vor allem nach dem Schluß der Wachstumsfugen besteht kein Zugang zu gewebespezifischen regenerativen Zellpopulationen mehr [Gaissmaier et al., 2003]. Oberflächliche Defekte sind somit nicht in der Lage sich selbst zu heilen. Lediglich solche, die den subchondralen Knochen penetrieren, werden durch das Einwandern von Zellen aus dem Knochenmark durch neu gebildetes Ersatzgewebe gedeckt. Dieser Faserknorpel ist jedoch biomechanisch dem hyalinen Knorpel nicht gleichwertig und nur minderbelastbar. Weiterhin ist er durch fortschreitende Degeneration gekennzeichnet, die zu vorzeitiger Arthrose führen kann [Caplan et al., 1997; Buckwalter, 1998].

## 1.2 Möglichkeiten der Gelenkknorpeltherapie

Gelenkschmerzen gehören zu den Hauptursachen der Invalidität im mittleren und höheren Alter [Buckwalter et Mankin, 1998], aber auch bei jüngeren Patienten sind lokalisierte vollschichtige Knorpeldefekte, v. a. im Kniegelenk, häufig die Ursache von Gelenkbeschwerden [Aroen et al., 2004]. Durch primäre Arthrose, Osteonekrosen (Osteochondrosis dissecans), Traumata, wiederholte Gelenküberlastung oder Achsfehlstellungen können Knorpeldefekte entstehen, die die oben genannten komplexen mechanischen Eigenschaften des Knorpels schädigen und mit einem erheblichen Verlust an Lebensqualität einhergehen. Das Risiko der Entstehung einer vorzeitigen Arthrose wird durch Knorpelläsionen bei jungen Menschen verdreifacht, bei Erwachsenen mehr als verfünffacht [Gelber et al., 2000].

In den letzten Jahren wurden neue Therapieverfahren entwickelt, die begrenzten Heilungsressourcen des Knorpels zu unterstützen bzw. das fehlende Knorpelgewebe zu ersetzen.

Oft ist die Implantation einer Endoprothese oder eine Osteotomie zur Änderung der Belastungsverhältnisse innerhalb des Gelenks erforderlich. Vor allem bei jüngeren Menschen sollten diese Therapiemöglichkeiten jedoch als ultima ratio gelten und erst nach anderen frustranen Behandlungsversuchen Anwendung finden.

Zur Basisbehandlung bei allen arthroskopischen Knorpel Eingriffen gehört nach wie vor die Gelenklavage mit Débridement, welche jedoch lediglich eine Symptomreduktion bewirkt, die den weiteren Degenerationsprozess nicht aufzuhalten vermag [Hubbard et al., 1996].

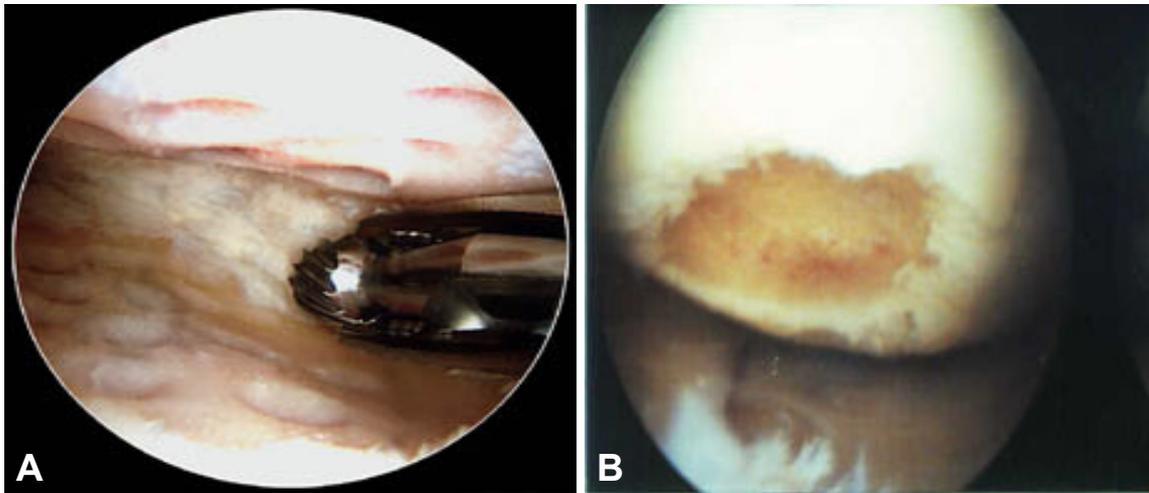
Um lokale Knorpeldefekte zu therapieren wurden verschiedene Ansätze entwickelt bei denen man zwischen Reparatur und Rekonstruktion unterscheiden muss. Methoden, die den natürlichen Reparatursprozess anregen sollen, sind z. B. die Pridie-Bohrung, die Abrasionsarthroplastik (Abb. 1) oder die Mikrofrakturierung (Abb. 2). Hier handelt es sich um offene oder arthroskopische Operationstechniken, bei denen zunächst ein Débridement des Defekts durchgeführt und anschließend mit unterschiedlichen Methoden die subchondrale Knochenlamelle perforiert wird, damit mesenchymale

Vorläuferzellen aus dem darunter liegenden Knochenmark einwandern, den Defekt füllen und Faserknorpel bilden können [Pridie, 1959; Bert et al., 1989; Steadman et al., 1997]. Dieses fibrocartilaginäre Narbengewebe besteht jedoch zu einem hohen Anteil aus Kollagen Typ I und neigt zu Verknöcherung. Die langfristige Qualität und Belastbarkeit ist nicht sichergestellt [Hunziker, 2002].

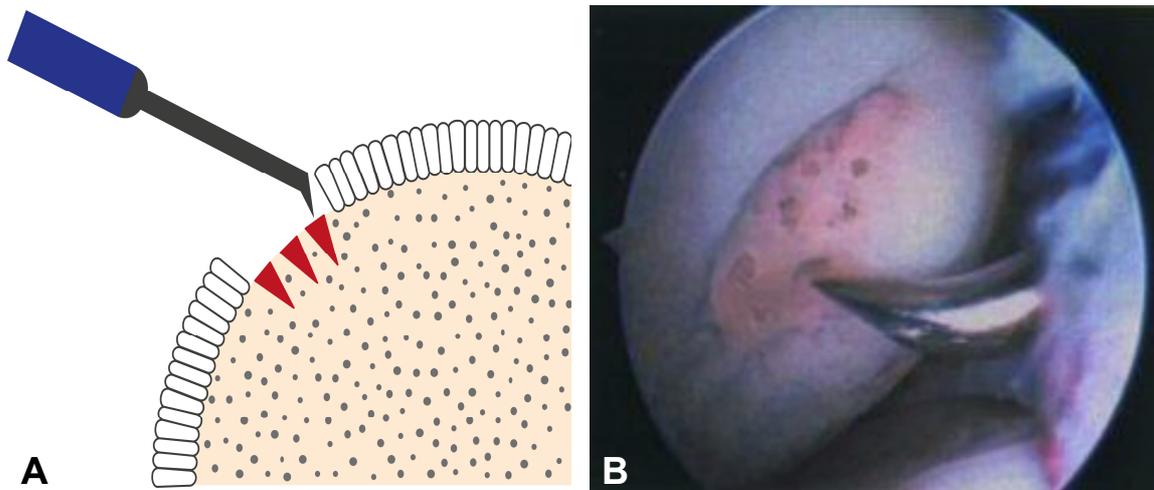
Für den rekonstruktiven Knorpelersatz kam vorerst nur die Transplantation körpereigener chondraler bzw. osteochondraler Zylinder (OATS-Technik; Mosaikplastik, Abb. 3) zum Einsatz [Hangody et al., 1997; Bobic et al., 1999]. Im Jahr 1989 wurde erstmals die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) beschrieben [Grande et al., 1989], die 1994 erste klinische Ergebnisse lieferte [Brittberg et al., 1994]. Bei dieser Technik wird eine Knorpelbiopsie am gesunden, weniger beanspruchten Bereich des Kniegelenks vorgenommen, die Chondrozyten werden isoliert und nach Kultivierung unter einen aufgenähten Periostlappen in den Defekt injiziert (Abb. 4). Hierbei entsteht ein Gewebe, das dem hyalinen Gelenkknorpel biomechanisch und histologisch am ähnlichsten ist [Peterson et al., 2000; Briggs et al., 2003]. Die ACT wurde in den letzten Jahren weiter modifiziert (Ersatz des Periostlappens durch resorbierbares Biomaterial; matrixgekoppelte ACT, siehe 1.3) und befindet sich heute erfolgreich in der klinischen Anwendung, wobei auch großflächige und tiefe Defekte adäquat behandelt werden können [Peterson et al., 2000 und 2002].

Trotz der viel versprechenden Ansätze gibt es jedoch Nachteile bei den oben genannten Therapiemöglichkeiten. Es steht nur eine begrenzte Menge an gesundem körpereigenem Knorpel zur Verfügung und das Proliferationspotential der Chondrozyten nimmt mit steigendem Alter kontinuierlich ab. Zusätzlich dedifferenzieren die Chondrozyten unter *in vitro* Zellkulturbedingungen in einen fibroblastären Phänotyp [Dozin et al., 2002]. Die Größe der zu behandelnden Defekte ist limitiert und die sogenannte „donor-site-morbidity“ [LaPrade et al., 2004] muss bedacht werden. Bei der klassischen ACT kann es durch den verwendeten Periostlappen zu weiteren Komplikationen, wie der Periosthypertrophie, Kalzifikation, Delamination des Transplantats sowie intraartikulären Adhäsionen [Peterson et al., 2000; Minas et al., 1999; Erggelet et al., 2000] kommen. Die gleichmäßige Verteilung der Chondrozyten und der

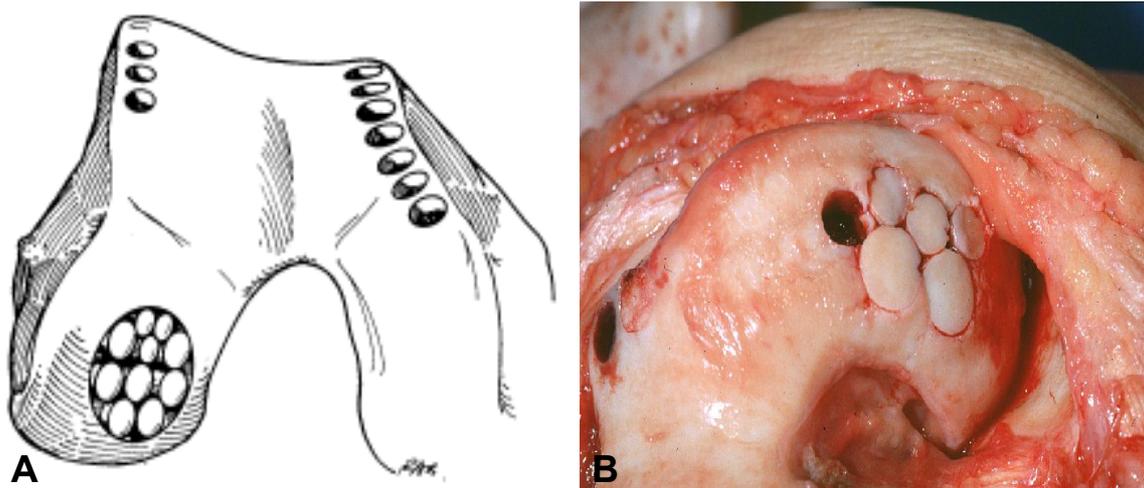
definitive Verbleib der Zellen im Defekt kann ebenfalls nicht garantiert werden [Sohn et al., 2002].



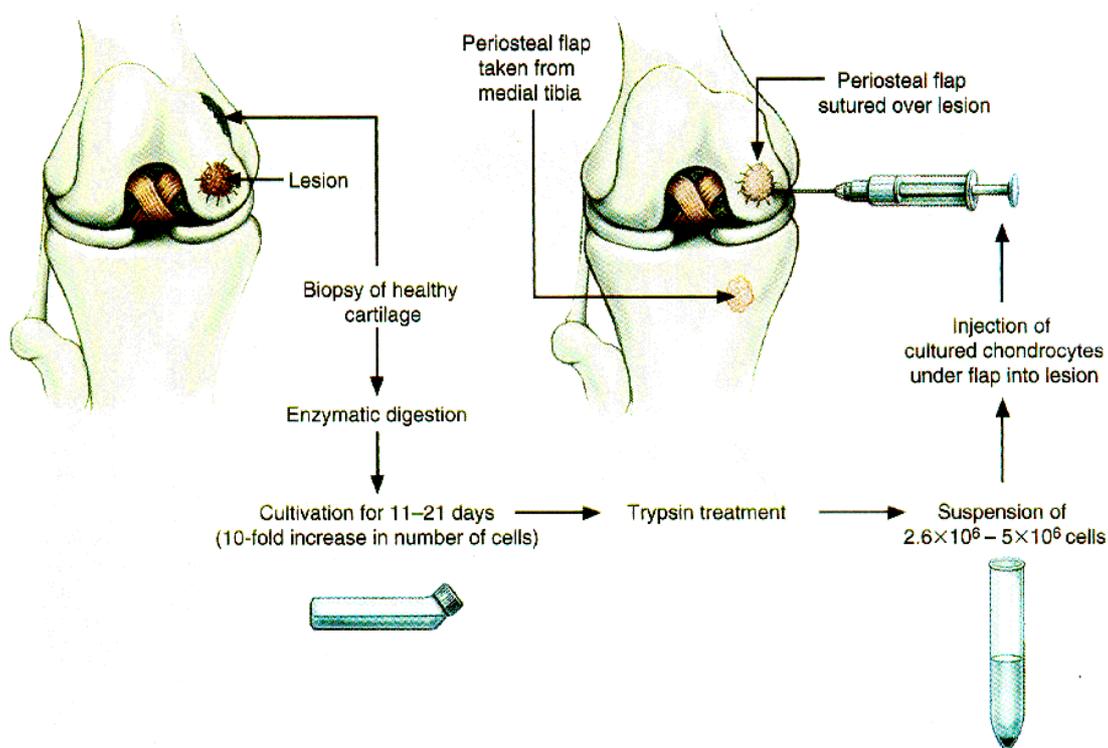
**Abb. 1:** Abrasionsarthroplastik. Arthroskopiebilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. P. Bachmann, Woergl, 2008. A: Anfräsen des freiliegenden Knochens im Bereich des Knorpeldefekts mit dem Shaver. B: Defekt nach dem Anfräsen mit Mikroeinblutungen aus dem subchondralen Knochen.



**Abb. 2:** Mikrofrakturierung. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. P. Bachmann, Woergl, 2008. A: Schematische Darstellung multipler Perforationen des subchondralen Knochens mit gebogener Ahle. B: Arthroskopisches Bild.



**Abb. 3:** Mosaikplastik. Mit Genehmigung aus Mandelbaum et al., 1998.  
 A: Schema eines Transfers multipler Knorpel-Knochenzylinder aus einem wenig belasteten Gebiet des Kniegelenks (Trochlearand) in einen Knorpeldefekt der Hauptbelastungszone.  
 B: Intraoperatives Bild.



**Abb. 4:** Erste Generation der ACT. Knorpelbiopsie mit Gewinnung von Chondrozyten, Kultivierung und Proliferation mit anschließender Injektion der Knorpelzellen in den Knorpeldefekt und Deckung durch einen Periostlappen. (\*Reproduced with permission from (Brittberg et al., 1994), Copyright Massachusetts Medical Society)

### **1.3 Matrixgekoppelte ACT (MACT) und Trägermaterialien**

Die in 1.2 genannten Nachteile der klassischen ACT nach Brittberg sollen bei der MACT durch die Verwendung geeigneter Biomaterialien umgangen werden. Die Entnahme und Aufnahme des Periostlappens entfällt, das Risiko der Transplantathypertrophie sinkt, die OP-Zeit wird verkürzt und der operative Zugang kann kleiner ausfallen [Schewe und Weise, 2005]. Ideale Trägermaterialien sollten gewisse Grundvoraussetzungen erfüllen. Zu den wichtigsten Eigenschaften gehören Biokompatibilität, mechanische Belastbarkeit und eine Oberfläche, die Zelladhäsion und Zellwachstum ermöglicht. Der kontrollierte Materialabbau muss mit der Gewebeneubildung korrelieren, dabei dürfen aber keine toxischen oder proinflammatorischen Substanzen entstehen. Die Matrix muss eine homogene Verteilung der Zellen erlauben und sollte reproduzierbar in dreidimensionalen Strukturen herstellbar sein. Weiterhin sollte sie in jeglicher Form und Größe an den Defekt angepasst werden können und eine ausreichende Form- und Primärstabilität besitzen [Kuo und Tuan, 2003; Marlovits, 2005].

Lange lieferten die Entwicklungen auf diesem Gebiet keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Zu den getesteten synthetischen Matrices zählen Polyglykolpolymere [Vacanti et al., 1994; Sitterling et al., 1994], Polylaktid [Chu et al., 1995], Carbon- [Brittberg et al., 1994], Dacron- und Teflon-Mikronetzwerkstrukturen [Messner et al., 1993 und 1994]. Diese Materialien lassen sich zwar in jeglicher Form und Stärke herstellen, die Resorption im Gelenk ist jedoch nicht vorhersehbar und nicht selten kommt es zur Bildung unphysiologischer Stoffwechselmetabolite sowie zu Fremdkörperreaktionen [Schneider et al., 2005]. Hyaluronsäurekonstrukte [Aigner et al., 1998], Kollagenmembranen [Nehrer et al., 1997] und Fibrin [Hendrickson et al., 1994] sind Vertreter natürlicher Trägermaterialien. Vor allem die Kollagenmembranen in Verbindung mit autologen oder allogenen Chondrozyten führten in zahlreichen tierexperimentellen Studien zu guten Ergebnissen in der Knorpelheilung [Frenkel et al., 1997; Nehrer et al., 1998]. Kollagen bildet die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix im Knorpel, reguliert das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung und besitzt die erforderliche

physikalische Festigkeit [Yoneno et al., 2005; Chaipinyo et al., 2004]. In den dreidimensionalen Netzwerkstrukturen der Membranen ist jedoch keine homogene Verteilung der Knorpelzellen möglich, was sich negativ auf das gebildete Reparaturgewebe auswirken kann. Nur in primär flüssigen Trägermaterialien kann eine homogene Zellverteilung erzielt werden. Fibrin und Kollagengele sind hierbei die einzigen Matrices, die auch klinisch eingesetzt werden können [Erggelet et al., 2003; Schneider et al., 1999]. Fibrin allein ist allerdings nicht ausreichend stabil. Hydrogele lassen zwar ebenfalls eine adäquate Primärstabilität vermissen, besitzen jedoch eine hohe Anpassungsfähigkeit und ermöglichen so eine gute Modellierung des Transplantats in jede Defektform und -größe [CaReS®-Technologie, Arthro Kinetics]. Sie besitzen die Fähigkeit große Mengen Wasser zu speichern und sind so besonders für sehr flüssigkeitshaltige Gewebe wie Knorpel als Trägermaterial bei Zelltransplantationen gut geeignet [Kisiday et al., 2002]. Durch die Kultivierung der Zellen in einem primär dreidimensionalen System kann die Dedifferenzierung der Chondrozyten deutlich reduziert werden [Caron et al., 2012].

Wakitani und Mitarbeiter belegten diese Vorteile bereits 1989 anhand eines Kaninchenmodells, in dem Knorpeldefekte mit allogenen Chondrozyten in einem Kollagengel therapiert wurden. Die histologische Auswertung zeigte eindeutig die Dominanz von Kollagen II im neugebildeten Knorpelgewebe (hyaliner Gelenkknorpel). Die Zellen behielten ihr chondrozytäres Differenzierungsstadium bei, waren vital und in der Lage, in dieser geeigneten Umgebung die benötigten Makromoleküle für die extrazelluläre Matrixbildung zu synthetisieren. In der radiologischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Gels eine sichere Fixierung der Chondrozyten im Defekt erlaubte und eine homogene Verteilung der Zellen gewährleistet war [Wakitani et al., 1989].

Zum Zeitpunkt unserer Versuchsreihe gab es in Deutschland sechs Firmen, die die MACT anboten: Arthro Kinetics, Esslingen/Manchester (CaReS®); Biotissue AG, Freiburg (Bioseed®-C); Fidia Advanced Polymers, Italien (Hyalograft® C); Orthogen AG, Düsseldorf (Arthromatrix®); Tetec AG, Reutlingen (Novocart® 3D);

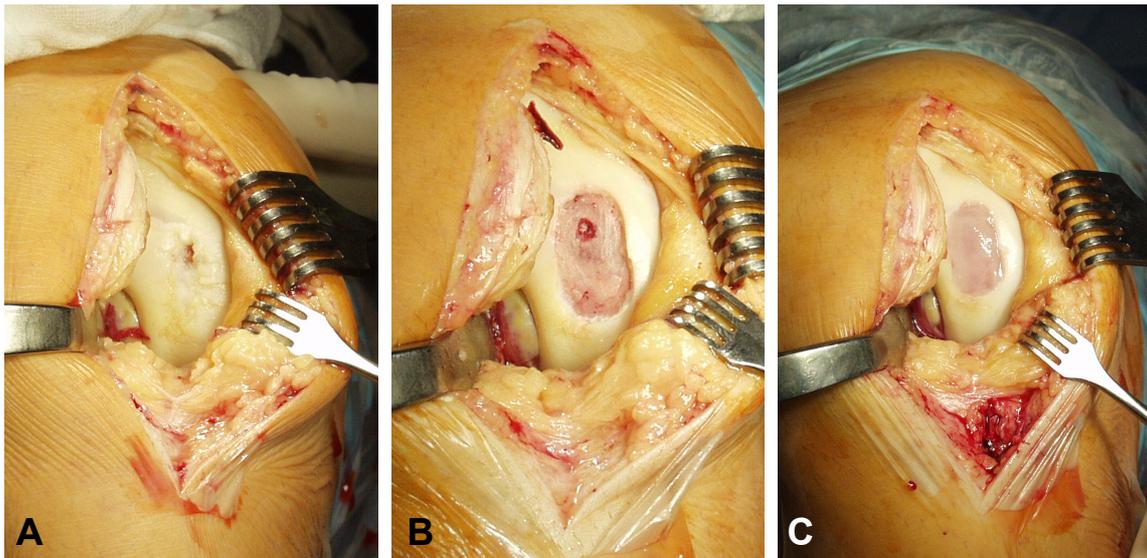
sowie Verigen AG/Genzyme, Leverkusen (MACI®). Bis auf eine Ausnahme werden die Zellen in autologem Serum kultiviert. Die Materialien sind sowohl natürlicher als auch synthetischer Herkunft und auch Materialkombinationen werden verwendet. Die Kultivierungsart und –dauer variiert erheblich. Leider gibt es bis heute keine vergleichenden klinischen Studien zu den einzelnen Materialien [Schneider et al., 2005].

#### **1.4 Cartilage Repair System (CaReS®; Arthro Kinetics plc, Esslingen/Manchester)**

Das “Cartilage Repair System” ist eine matrixgekoppelte Modifikation der Autologen Chondrozytentransplantation, die sich seit 2002 in klinischer Anwendung befindet. Hierbei werden dem Patienten in einer ersten Operation zwei Knorpelbiopsate entnommen und die Chondrozyten werden in einem GMP-konformen Labor aus dem Biopsat isoliert und unmittelbar in ein Kollagen I Hydrogel (siehe 1.4) eingebracht. Über zwölf bis sechzehn Tage erfolgt die Kultivierung der Zellen im Hydrogel. Am Transplantationstag wird der Knorpeldefekt zunächst entsprechend seiner Größe ausgestanzt, débridiert und die Gelmatrix in „press-fit-Technik“ eingepasst und mit Fibrinkleber fixiert (Abb. 5). Die Eröffnung des subchondralen Markraums sollte vermieden werden, um die Bildung minderwertigen Faserknorpels, wie er bei den älteren oben erwähnten Techniken entsteht, zu vermeiden.

Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber der klassischen ACT bestehen in der verminderten Dedifferenzierung der Chondrozyten durch das sofortige Einbringen in eine dreidimensionale Matrix, der kontrollierten Zellverteilung sowie der besseren Zellfixierung (keine Zell-„Verluste“) im Defekt. Durch die formstabile Kollagenmatrix ergibt sich eine einfachere Handhabung bei der Implantation und der Patient kann früher mobilisiert werden.

Eine aktuelle Multicenterstudie gibt eine Übersicht über die erfolgreiche Behandlung von Knorpeldefekten mit der CaReS®-Technologie [Schneider et al., 2011].



**Abb. 5:** Rekonstruktion eines Knorpeldefekts mit der CaReS®-Technologie. Bildmaterial U. Nöth, orthopädische Universitätsklinik Würzburg.  
 A: Knorpeldefekt Grad IV nach Outerbridge bei einem 24-jährigem Patienten. B: Defekt nach operativem Débridement bis zur Knorpel-Knochen-Grenze. Eine Knochenzyste wurde mit autologer Spongiosa gefüllt. C: Rekonstruktion des Defekts mit dem Chondrozyten beladenen Kollagenhydrogel.

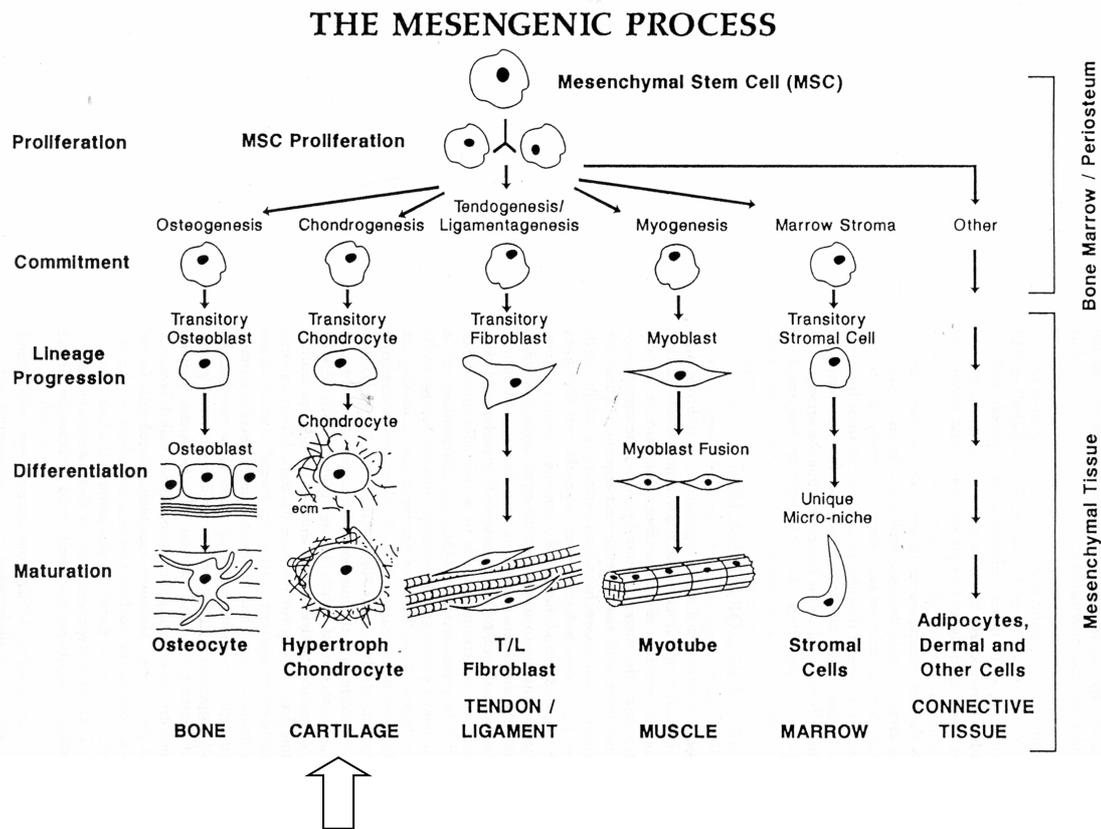
### 1.5 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

Als entscheidende Verbesserung auf dem Gebiet der Behandlung von Knorpeldefekten gilt momentan die oben beschriebene MACT. Bei dieser Methode müssen jedoch sowohl bei der klassischen wie auch bei der matrixgekoppelten ACT immer zwei invasive Eingriffe vorgenommen werden, um primär autologe Zellen zu gewinnen. Unter Verwendung von autologen MSZ aus dem Knochenmark kann die erste Arthroskopie sowie die donor-site-morbidity umgangen werden. Es steht eine wesentlich größere Anzahl an Zellen zur Verfügung als bei Verwendung ausgereifter Chondrozyten. Zudem besitzen Stammzellen ein hohes Proliferationspotential und können daher in Kultur über lange Zeiträume expandiert werden, ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren [Caplan et al., 1991, 1997]. Beim Menschen lassen sich große Mengen dieser Zellen relativ leicht durch eine Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm isolieren [Haynesworth et al., 1992; Pittenger et al., 1999]. Studien am Tiermodell deuten außerdem darauf hin, dass weder autologe noch allogene Stammzellen bei lokaler Implantation sowie systemischer Applikation immunogen wirksam sind und somit keine Abstoßungsreaktion beim Empfänger auslösen [Caplan et al., 2001; Arinzeh et al., 2003; Grinnemo et al., 2004].

Es gibt verschiedene Stammzelltypen, die in Abhängigkeit ihres Ursprunggewebes als totipotent (zygote SZ), pluripotent (embryonale SZ) und multipotent (neurale, mesenchymale oder hämatopoetische SZ) bezeichnet werden [Gage et al., 2000].

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, deren Verwendung ethisch sehr umstritten ist, sind adulte Stammzellen weniger kanzerogen, was sie für die vorliegenden Studien zusätzlich attraktiv macht [Raghunath et al., 2005].

Für diese Arbeit besonders relevant sind die MSZ, die zu den verschiedensten Geweben mesenchymalen Ursprungs, wie Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen, Fett und Muskel, ausdifferenzieren können [Ringe et al., 2002; Pittenger et al., 1999] (Abb. 6). Allerdings findet dieser Prozess nicht spontan statt. Auf der undifferenzierten Stammzelle wurde eine große Anzahl Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktorrezeptoren sowie Oberflächenantigene nachgewiesen. Weitere Untersuchungen führten zu der Schlussfolgerung, dass spezifische biologische Stimuli notwendig sind, um MSZ in die jeweilige Differenzierungsrichtung zu leiten [Johnstone et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Barry et al., 2001; Jiang et al., 2002]. Für die Bildung von Knorpelgewebe spielt der Oberflächenmarker CD105 eine wichtige Rolle, der als Rezeptor für Faktoren aus der transforming growth factor- $\beta$ - (TGF- $\beta$ -)Familie fungiert, welche die chondrogene Differenzierung induzieren können [Johnstone et al., 1998]. Zu diesen Faktoren gehören neben den einzelnen TGF- $\beta$ -Subtypen  $\beta$ 1 -  $\beta$ 3 die bone morphogenic proteins (BMP), Insulin-like-growth-factor (IGF) und fibroblast growth factor-2 (FGF-2) [Barry et al., 2001; Grande et al., 2003; Stevens et al., 2004]. *In vivo* Versuche haben gezeigt, dass auch mechanische Stimuli bei der Bewegung des betroffenen Gelenks sowie die Synovialflüssigkeit mit den in ihr enthaltenen zahlreichen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle beim Differenzierungsprozess spielen [Tagil und Aspenberg, 1999]. Eine Übersichtsarbeit über das Differenzierungspotential und Einflussfaktoren auf die osteogene und chondrogene Differenzierung von MSZ liefern Lavrentieva und Mitarbeiter [Lavrentieva et al., 2013].



**Abb. 6:** Der mesenchymale Differenzierungsprozess. Eine MSZ hat das Potential sich zu verschiedenen Zellen mesenchymalen Gewebes auszudifferenzieren und somit Knochen, Knorpel, Bänder und Sehnen, Muskel, Mark- und Bindegewebe zu bilden. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.com aus Caplan et al., 1994.

Zurzeit liegen verschiedene Vergleichsstudien an Tiermodellen zur Anwendung von Stammzellen bei der Knorpelrekonstruktion vor. Goldberg und Caplan konstatierten 1994, dass die Implantation von MSZ in Knorpeldefekte bei Kaninchen ein besseres Resultat bezüglich der Bildung von hyalinem Gewebe lieferte als die Implantation von Chondrozyten [Goldberg et Caplan, 1994]. In einer Vergleichsstudie von Hui und Mitarbeitern an fortgeschrittenen Osteochondrosis dissecans Defekten bei Kaninchen wiesen die autologe Chondrozytentransplantation und die Transplantation autologer MSZ jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Qualität des neugebildeten Knorpels auf [Hui et al., 2004].

Erste klinische Ergebnisse bezüglich der erfolgreichen Therapie tiefschichtiger patellarer Knorpeldefekte beim Menschen mit autologen MSZ wurden 2005 berichtet [Yoneno et al., 2005]. 2015 erschien eine Fallserie von Patienten, bei

denen Knorpeldefekte der Femurkondyle mit einer Suspension aus synovialen MSZ behandelt wurden und nach drei Jahren follow-up gute Ergebnisse lieferten [Sekiya et al., 2015].

### **1.6 Chondrogene Differenzierung der MSZ im Hydrogel**

Kollagen I Hydrogele werden seit einigen Jahren erfolgreich bei der matrixgekoppelten ACT eingesetzt. Nachdem auch Stammzellen positive Ergebnisse bei der Therapie von Knorpeldefekten zeigten, wird verstärkt an deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten in verschiedenen Kultursystemen geforscht, um bestmögliche Bedingungen für deren Kultivierung und Einsatz schaffen zu können.

Das chondrogene *in vitro* Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen wurde bisher vor allem in zweidimensionalen Kultursystemen und in high-density Pelletkulturen untersucht [Lunstrum et al., 1999; Barry et al., 2001]. Neuere Studien befassen sich mit den optimalen Bedingungen für die Expansion von Stammzellen in dreidimensionalen Systemen. Kollagen basierte Biomaterialien eignen sich hier besonders, da die Stammzellen im Anfangsstadium der Chondrogenese verstärkt Kollagen I exprimieren und Kollagen einen wichtigen Faktor für die Aufrechterhaltung der interzellulären Homöostase der MSZ darstellt [Wakitani et al., 2002; Yoneno et al., 2005].

Das Vorhandensein bestimmter Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie die räumliche Organisation und Zelldichte in Kultur hat einen großen Einfluss auf die Stammzellen. Ohne die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ) zum Kulturmedium behalten die homogenen Zellpopulationen einen fibroblastären Phänotyp bei [Pittenger et al., 1999; Barry et al., 2001]. Außerdem sind Zell-Zell-Interaktionen, ähnlich den Bedingungen wie sie bei der embryonalen Knorpelentwicklung auftreten, für ein gutes Proliferationsergebnis unerlässlich, weshalb eher eine höhere Stammzellendichte in der Kultur angestrebt werden sollte [Yanai et al., 2005]. Bei zu hohen Zellzahlen kontrahiert das Gel z. T. jedoch stark und kann nicht mehr ausreichend bearbeitet werden [Vickers et al., 2010]. In verschiedenen

Versuchen bewährte sich eine Dichte von  $5 \times 10^7$  bis  $10^8$  Zellen/ml Gel [Yokoyama et al., 2005; Koga et al., 2008].

Die besten Ergebnisse bei der Kultivierung und chondrogenen Differenzierung von Stammzellen in Kollagen I Gelen lieferten bisher Studien unter Zugabe von BMP-2, TGF- $\beta$  und Dexamethason sowohl initial zum Medium als auch zum Hydrogel [Schmitt et al., 2003; Toh et al., 2005; Yokoyama et al., 2005]. Die Kultivierungsdauer sollte zwischen zwei und drei Wochen betragen. Unter den genannten Bedingungen konnte histologisch und immunhistochemisch die Bildung von Proteoglykanen, Kollagen II sowie Chondroitin-4- und Chondroitin-6-sulfat nachgewiesen werden, welche spezifische Komponenten des hyalinen Gelenkknorpels darstellen [Toh et al., 2005; Yokoyama et al., 2005].

### **1.7 Fragestellung**

Die Methode der MACT zur Therapie von Gelenkknorpeldefekten befindet sich heutzutage schon erfolgreich in der klinischen Anwendung. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde außerdem das chondrogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen gezeigt [Goldberg et Caplan, 1994; Barry et al., 2001; Yokoyama et al., 2005; Yoneno et al., 2005].

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Großtiermodells zum Vergleich mesenchymaler Stammzellen mit Chondrozyten im Rahmen der matrix-basierten Therapie von Gelenkknorpeldefekten in einer Langzeitstudie.

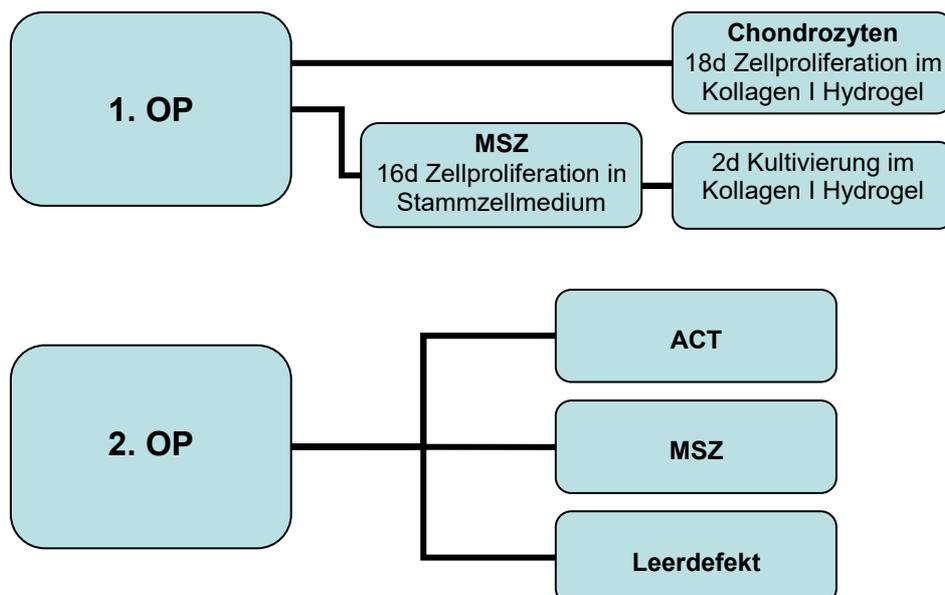
Standardisierte Knorpeldefekte im Kniegelenk bei Göttinger-Minipigs sollten mit der CaReS<sup>®</sup>-Methode behandelt werden. Die Implantation von Chondrozyten im Kollagen I Hydrogel und MSZ im Kollagen I Hydrogel sollte durchgeführt und die Ergebnisse bezüglich der Knorpelbildung nach einem definierten Zeitraum von einem Jahr makroskopisch sowie histologisch und immunhistochemisch verglichen werden. Die Knorpelzellen wurden wie bekannt in den Gelen kultiviert. Die Stammzellen sollten vor dem Einbringen in das Gel in Stammzellmedium expandiert, aber nicht vordifferenziert werden. Weder das Kultivierungsmedium noch das Hydrogel sollten spezifische Wachstumsfaktoren enthalten. Es sollte festgestellt werden, ob das Potential des vitalen Knorpelgewebes sowie die mechanische Komponente bei Bewegung

ausreichen, um die chondrogene Differenzierung der Stammzellen zu induzieren. Die Arbeit wurde als Pilotstudie angelegt. Die Ergebnisse sollten eine Grundlage für weitere Versuchsreihen bezüglich des Ersatzes von Chondrozyten bei der matrixgekoppelten ACT durch mesenchymale Stammzellen *in vivo* am Großtiermodell legen. Geplant sind Studien über verschiedene Zeiträume mit einer chondrogenen Vordifferenzierung der Stammzellen im Hydrogel sowie einer Retrovirus-Markierung der Zellen, um deren Verbleib im Defekt zu kontrollieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Vier Tiere wurden in einem prospektiven Vergleich an beiden Kniegelenken operiert. Eine erste Operation diente der Entnahme mesenchymaler Stammzellen aus dem Beckenkamm sowie der standardisierten Defektsetzung (7mm Durchmesser) an der medialen Femurotrochlea, die zugleich die Gewinnung des Knorpelbiopsats darstellte. 19 Tage später erfolgte in einer zweiten Operation das Débridement des Defektes und die Therapie mit den drei unterschiedlichen Methoden (Abb. 7).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

## **2.2 Versuchstiere und operatives Vorgehen**

[Eine entsprechende Genehmigung von der Behörde für diesen Tierversuch liegt vor. AKZ: 621 – 2531.01 – 19/02.]

Vier adulte weibliche Göttinger Minipigs, mit einem durchschnittlichen Alter von 14 Monaten (13 – 16 Monate) und einem Gewicht von durchschnittlich 35 kg (33 – 36 kg) wurden in Isofluran-Inhalationsnarkose (initial 4 Vol%, Erhaltungsdosis 1,5 – 2,5 Vol%) operiert.

Die Prämedikation erfolgte mit 1 – 2 mg/kg Körpergewicht Azaperon i. m. (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss) und Novaminsulfon 10 – 30 mg i. m. (Novalgin®, ratiopharm, Ulm).

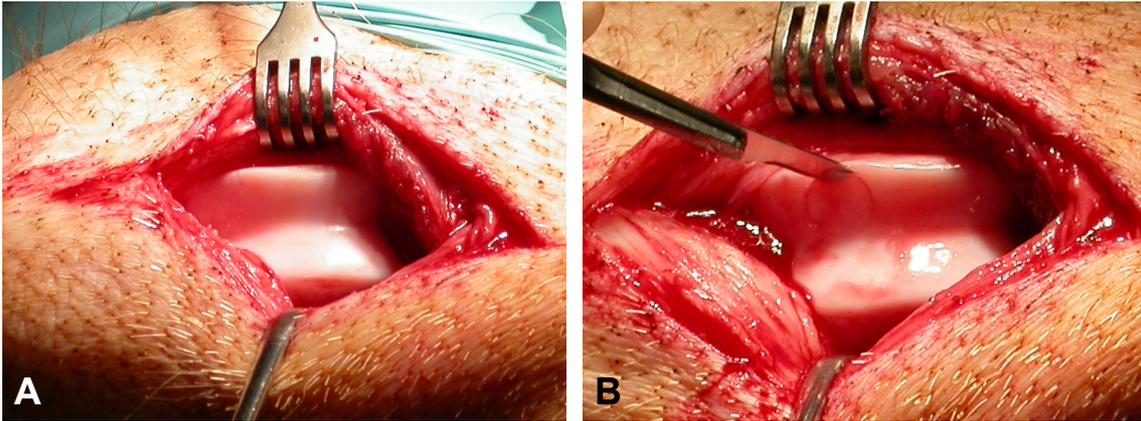
Zur Infektprophylaxe wurde präoperativ Cefazolin 1 g i. m. (Basocef®, DeltaSelect, Dreieich) verabreicht.

## **2.3 Operation I: Stammzellgewinnung und Knorpelbiopsie**

Unter sterilen Bedingungen erfolgte zunächst über einen ca. 6 cm langen Hautschnitt über dem Beckenkamm die Knochenmarkaspiration mittels Yamshidi-Nadel zur Stammzellgewinnung (durchschnittlich 10 ml Aspirat auf 5 ml Heparin-Natrium).

Anschließend wurde ventralseitig eine Miniarthrotomie des entsprechenden Kniegelenks durchgeführt und das Patellagleitlager freigelegt (Abb. 8). Nach Darstellung der Gelenkflächen wurde im Bereich der medialen Trochlea mit einer Hohlstanze ein 7 mm großer, ca. 1 mm dicker Knorpelzylinder ausgestochen und mit dem Skalpell abpräpariert (Abb. 9). Die subchondrale Knochenlamelle wurde respektiert; vereinzelt auftretende leichte Blutungen wurden mit Adrenalin bzw. Fibrinkleber (Tissucol, Baxter, Heidelberg) gestillt.

Das gewonnene Knorpelbiopsat wurde zum Transport in ein steriles, mit Kulturmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 500 µl L-Ascorbat-2-Phosphat [Konzentration 50 µg/ml]) gefülltes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.



**Abb. 8:** Operation I.

A: Mediale Arthrotomie am Kniegelenk des Göttinger Minipig. B: Defektsetzung an der medialen Trochlea des Kniegelenks. Abpräparation des vorgestanzten Knorpelzylinders bis auf den subchondralen Knochen.

## 2.4 Zellpräparation und Kultivierung

Die Knorpelbiopsate wurden innerhalb von 24 Stunden gekühlt (4 – 8°C) an die Firma Arthro Kinetics in Esslingen versandt.

Dort wurden die Biopsate zunächst mechanisch zerkleinert und die Knorpelstücke in je eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Zugabe von 9 ml Medium (DMEM/HAM'S F12 ohne Serumzusatz) + 1 ml Kollagenase (5 mg/ml, NB 4 Standard Grade, Serva, Heidelberg) überführt. Über Nacht (20 h ± 4 h) erfolgte der Verdau im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach dessen Beendigung wurden die noch unverdauten Stückchen in der Zellkulturflasche sedimentiert und der Überstand mit den Zellen in ein Zentrifugenröhrchen abpipettiert, wobei beide Ansätze vereinigt wurden. Nach Auffüllen mit Kultivierungsmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FCS + 1% Gentamicin) auf 40 ml erfolgte die Zentrifugation für zehn Minuten bei 480 x g. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Zur Zellzählung und Vitalitätsprüfung wurden 50 µl der Suspension mit 50 µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung gemischt (Endkonzentration 0,2%), dieses Gemisch wurde zwei bis fünf Minuten inkubiert und dann 10 µl dieser Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden jeweils vier Zählungen (je vier Großquadranten in beiden Kammern) unter einem Phasenkontrast-Mikroskop mit dem 10x-Objektiv durchgeführt (= 100fache Vergrößerung). Im Anschluß wurde die Zellsuspension erneut auf 40 ml mit

Kultivierungsmedium aufgefüllt, zehn Minuten bei 480 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet resuspendiert und dieser Vorgang nochmals wiederholt. Es erfolgte nun das Einbringen der Chondrozyten in das Kollagengel (Vorgehen siehe 2.6.1).

Das Knochenmarkspirat wurde bei Ankunft im Labor in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit bekanntem Kultivierungsmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 500 µl L-Ascorbat-2-Phosphat [Konzentration 50 µg/ml]) auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde für fünf Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 10 ml Medium resuspendiert und die Lösung gleichmäßig in zwei bis vier (je nach gewonnener Aspiratmenge) 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Alle Flaschen wurden auf 20 ml Inhalt mit Kulturmedium aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt und die adhärenen Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Flaschen wurden wieder mit 20 ml Kultivierungsmedium versehen und dieses alle drei bis vier Tage gewechselt. Nach 16 Tagen Proliferation wurden die Flaschen mit Medium aufgefüllt und an Arthro Kinetics versandt, wo die Zellen ebenfalls in die Kollagenhydrogele eingebracht wurden.

## **2.5 Herstellung der Kollagen I Hydrogele (Arthro-Kinetics plc, Esslingen/Manchester)**

Für die Herstellung des Kollagenhydrogels wurden zwei Lösungen verwendet und 1:1 miteinander vermischt:

1. Kollagen I Lösung (Konzentration =  $6 \pm 0,5$  mg/ml, Reinheit  $\geq 98\%$ ):

Nach Isolation des Kollagens aus Rattenschwanzsehnen wurden die Kollagenfasern in 0,1%iger Essigsäure gelöst. Nach Abtrennung von Fremdproteinen wurde diese hochvisköse Flüssigkeit mit einem pH-Wert von 4,0 bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Vor dem Einsatz wurde die aufgetaute Lösung abzentrifugiert, um vorhandene Luftblasen zu entfernen und danach auf Eis gelagert.

## 2. Gelneutralisationslösung:

Die Lösung bestand aus HEPES-gepuffertem, doppelt konzentriertem DMEM und 20% FCS. In diesem Medium mit starker Pufferkapazität können einerseits Zellen aufgenommen werden, andererseits wird damit der saure pH-Wert der Kollagenlösung abgepuffert. Die Neutralisationslösung wurde ebenfalls bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

## 2.6 Einbringen der Zellen in die Hydrogele und weitere Proliferation

### 2.6.1 Chondrozyten

Bei der Verkapselung der Knorpelzellen betrug die eingesetzte Zellzahl pro ml Gel in Anlehnung an den klinischen Einsatz  $8 \times 10^2$  -  $2,3 \times 10^4$ , wobei immer die maximale Zellzahl angestrebt wurde.

Die Zellen wurden in 11,5 ml der Gelneutralisationslösung aufgenommen (entspricht einer Zellzahl von  $2,3 \times 10^4$  Zellen/ml Gel) und diese mit demselben Volumen (11,5 ml) Kollagenlösung blasenfrei gemischt. Es wurden für jedes Versuchstier je 2 Gele à 2,0 ml, 2 Gele à 2,4 ml, 2 Gele à 2,8 ml sowie 2 Gele à 3,2 ml Volumen in 6 well-Zellkulturplatten hergestellt. Nach 20 Minuten Gelierzeit im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) erfolgte die Zugabe von je 3 ml Kultivierungsmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FCS + 1% Gentamicin), welches in den folgenden 15 Tagen alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde.

### 2.6.2 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

16 Tage nach Herstellung der Chondrozyten-Gele wurden die Zellkulturflaschen mit den Stammzellen zu der Firma Arthro-Kinetics versandt. Dort wurden die Zellen wie folgt für das Einbringen in die Kollagenhydrogele vorbereitet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmalig mit 10 ml PBS-/EDTA gewaschen und nach Zugabe von weiteren 10 ml PBS-/EDTA zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml 0,25%iger Trypsin-Lösung folgte eine weitere Inkubationszeit von drei Minuten; die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 15 ml Kultivierungsmedium gestoppt. Die Ansätze wurden bei 480 x g zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, alle Pellets zusammen

in insgesamt 2 ml Medium aufgenommen und 50 µl für die Zellzählung und Vitalitätsprüfung entnommen (siehe 2.4).

Eines der Chondrozyten-Gele wurde mit dem Skalpell zerkleinert, je 1 ml PBS sowie 1 ml Kollagenase (5 mg/ml) zugefügt und bis zu zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C verdaut. Nachdem sich das Gel vollständig aufgelöst hatte (makroskopische Kontrolle), wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zehn Minuten bei 480 x g zentrifugiert und das Pellet anschließend in 2 ml Medium aufgenommen. Nach Zellzählung und Vitalitätsprüfung (siehe 2.4) wurden Stammzell-Gele mit einer analog der in den Chondrozyten-Gelen ermittelten Zellzahl angefertigt (siehe 2.6.1). Die Volumina der Lösungen (Gelneutralisationslösung und Kollagen I) wurden anhand der benötigten Zellzahl gewählt.

Je Versuchstier wurden drei 2,4 ml-Gele in 6 well-Platten und ein 2,8 ml-Gel in 6 well-Platte hergestellt. Alle Gele wurden mit je 3 ml Medium überschichtet und im Brutschrank gelagert. Am zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Der Rückversand der Zell-Gel-Konstrukte in unser Labor erfolgte 18 Tage nach der ersten Operation in einem sterilen Transportbehälter.

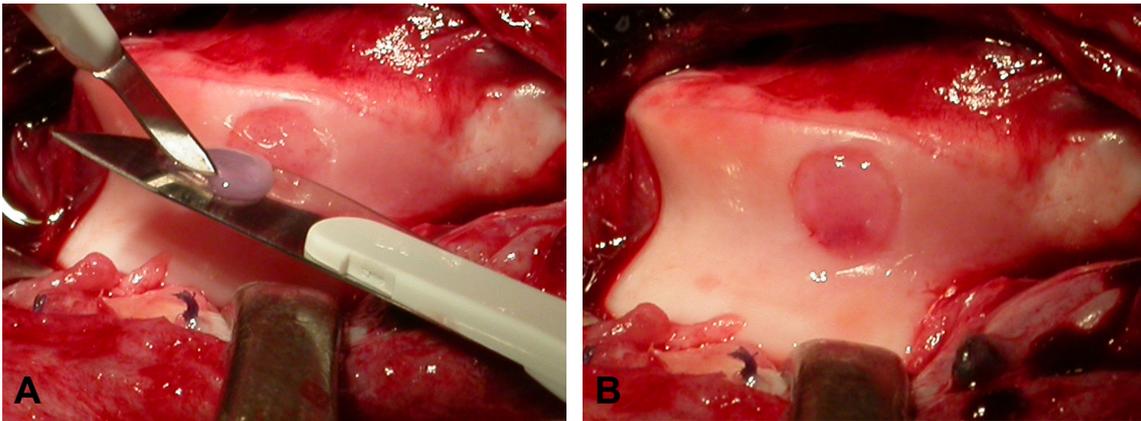
## **2.7 Operation II: Therapie der Knorpeldefekte**

19 Tage nach der ersten Operation wurden die Tiere wiederholt operiert. Die Prämedikation, Narkose und der Zugang zu den Kniegelenken erfolgte analog der ersten Operation.

Die Kontrolltiere wurden keiner zweiten Operation unterzogen (Leerdefekt). Bei allen anderen Versuchstieren wurde nach erfolgtem Débridement des chondralen Defektes, um das gebildete Regeneratgewebe zu entfernen, je ein Knie mit der matrixgekoppelten ACT, das andere mit dem Stammzell-Gel therapiert. Nach Benetzung des Defektgrundes mit Fibrinkleber wurde in Press-fit-Technik ein 7 mm großer Gel-Zylinder in den Defekt eingefügt (Abb. 10A und B). Das Transplantat wurde mit einer anatomischen Pinzette plan angedrückt und anschließend oberflächlich noch einmal mit Fibrinkleber versiegelt. Das

Kniegelenk wurde durchbewegt und die Passfestigkeit des Transplantats überprüft. Die Implantationstechnik war für beide Methoden identisch.

Bei starker Vernarbung der Gelenkumgebung wurde zusätzlich ein laterales Release vorgenommen, um einen uneingeschränkten Bewegungsspielraum des Knies sicherzustellen.



**Abb. 9:** Operation II.

A: Einpassen des Kollagengelimplantats in den Defekt in press-fit-Technik. B: Gel im Knorpeldefekt, mit Fibrinkleber fixiert.

## 2.8 Makroskopie

Nach einem Jahr wurden die Tiere durch Bolzenschuß getötet. Aus den Hinterläufen wurde umgehend ein ca. 2 x 2 x 2 cm großer Knochen-Knorpelwürfel mit dem Defekt aus der Femurtrochlea der Kniegelenke herauspräpariert. Die Defektstelle wurde fotografiert, die Integration des Implantates in das umgebende Knorpelgewebe und eventuelle Begleitreaktionen makroskopisch beurteilt.

## 2.9 Aufbereitung der Präparate

Die Gelenkpräparate wurden in 4%igem Paraformaldehyd (pH=7,4) fixiert. Danach erfolgte die Entkalkung über vier Wochen in 20%iger EDTA-Lösung (pH=7,4) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Fixierungsmittel mit Leitungswasser ausgewaschen und eine Entwässerung der Präparate mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt: Je drei Sekunden

in 70%igem Ethanol, 95%igem Ethanol, zweimal fünf Minuten in 100%igem Isopropanol und abschliessend zweimal fünf Minuten in Xylol bzw. Rotihistol. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden von dem unabhängigen Gutachter Dr. Achim Battmann aus der Pathologie Bad Homburg durchgeführt. Nach der Entwässerung erfolgte die Einbettung der Gewebe in heißes Paraffin, das in Blöckchen eingegossen wurde. Nach dem Erkalten wurden 8 µm dicke Schnitte angefertigt.

## **2.10 Histologie und Immunhistochemie**

Die Schnitte wurden zunächst mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für die Übersichtsfärbungen sowie mit Alzianblau gefärbt, um die sulfatierten Proteoglykane in der extrazellulären Matrix darzustellen.

Für die HE-Färbung wurden die Objektträger neun Minuten in Hämatoxylinlösung gegeben und anschließend in destilliertem Wasser gespült, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Nach der Differenzierung für drei Sekunden in 0,25% HCl/50% Ethanol wurde abermals mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Präparate zehn Minuten in Leitungswasser gebläut, ein bis zwei Minuten in 1%iger Eosinlösung gefärbt und mit Aqua dest. ausgewaschen.

Bei der Alzianblau-Färbung wurden die Objektträger zunächst drei Minuten in 3%iger Essigsäure eingelegt, dann 30 Minuten in 1%igem Alzianblau 8GX (pH=1,0) gefärbt und mit destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte eine fünfminütige Gegenfärbung mit Kernechtrot und wiederum Spülen mit Aqua dest.

Als Abschluß wurden die Objektträger beider Färbungen für drei Sekunden in 70%igem Ethanol differenziert und drei Sekunden in 95%igem Ethanol sowie zweimal fünf Minuten in 100%igem Isopropanol entwässert. Mit organischem Eindeckmittel wurden die Präparate ohne Einschluß von Luftblasen eingedeckt.

Für die immunhistochemischen Analysen für Typ I, Typ II und Typ X Kollagen (Col I, II, X) sowie Chondroitin-4- und -6-sulfat (CS4, CS6) wurden die Zellen aller Präparate 15 Minuten mit Waschpuffer rehydriert.

Für Kollagen I und II wurden die Präparate mit Pepsin (8 g/l in 1,0 N HCl; Col II) über vier Minuten, für Kollagen X mit Trypsin und für CS4 und CS6 mit Chondroitinase ABC (5 U/ml in destilliertem Wasser) für zehn Minuten bei Raumtemperatur vorverdaut. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 0,5 M Trispuffer (pH=7,6) sowie eine Behandlung mit einer 1%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Nach nochmaligem Abspülen mit 0,5 M Trispuffer wurde jeder Schnitt über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper (siehe Tabelle 1) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde erneut gründlich mit Trislösung gespült und die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 2) inkubiert. Nach nochmaliger Spülung mit Trislösung wurden alle Präparate über 30 Minuten mit den Tertiärantikörpern (siehe Tabelle 3) inkubiert.

Nach mehreren abschließenden Waschungen (Trispuffer) konnte die Antikörperbindung mittels der Alkali-Phosphatase-Anti-Alkali-Phosphatase (APAAP)-Methode sichtbar gemacht werden. Gestoppt wurde die Reaktion durch Eintauchen der Schnitte in Wasser. Die Gegenfärbung aller Zellen erfolgte durch fünfminütige Inkubation in Mayers Hämalaun-Lösung. Nach zehn Minuten in Wasser wurden die Proben mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt.

Als Negativkontrolle fertigten wir Präparate an, die lediglich mit dem zweiten und dritten Antikörper beladen waren.

Die Transplantate wurden abschließend verblindet mit einem modifizierten O'Driscoll-Score, nach Caplan und mit einem Immunhistochemie-Score beurteilt.

**Tabelle 1:** Verwendete Primärantikörper mit Isotypen, Spezifitäten und Einsatzkonzentrationen.

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Einsatzkonzentration</b>
Kollagen Typ I anti-human (µg/ml)	Kaninchen, polyklonal	Humanes Kollagen Typ I	1:40 µg/ml
Kollagen Typ I anti-Maus (µg/ml)	Kaninchen, polyklonal	Maus-Kollagen Typ I	1:50 µg/ml
Kollagen Typ II (200 µg/ml)	Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal	α1(II)- und α3(XI)- Ketten mit identischer Primär- struktur	1:100 ng/ml
Kollagen Typ X (mg/ml)	Kaninchen IgG, polyklonal	natives und denaturiertes Kollagen Typ X	1:50 µg/ml
Chondroitin-4- sulfat	Maus IgG <sub>1kappa</sub> , monoklonal	denaturiertes Chondroitin-4-sulfat	1:100
Chondroitin-6- sulfat	Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal	denaturiertes Chondroitin-6-sulfat	1:100

**Tabelle 2:** Verwendete Sekundärantikörper mit den zugehörigen Primärantikörpern.

<b>Antikörper</b>	<b>Detektion folgender Primärantikörper</b>	<b>Einsatzkonzentration</b>
Kaninchen-anti-Maus-IgG	Col II, CS4, CS6	µg/ml
Maus-anti-Kaninchen-IgG	Col I, Col X	µg/ml

**Tabelle 3:** Verwendete Tertiärantikörper mit den zugehörigen Primärantikörpern.

<b>Antikörper</b>	<b>Detektion folgender Primärantikörper</b>	<b>Einsatzkonzentration</b>
Ziege-anti-Kaninchen-IgG (HRPO Konjugat)	Col II, CS4, CS6	µg/ml
Schaf-anti-Maus-IgG	Col I, Col X	µg/ml

## 2.11 Chemikalien und Geräte

### 2.11.1 Chemikalien

Alzianblau 8GX, AppliChem, Darmstadt; A2124  
Antibiotic Antimycotic Solution (100x), Sigma-Aldrich, Steinheim; A5955  
Aqua bidest., Biochrom, Berlin; L182-50  
Citronensäure, Merck, Darmstadt; 100244  
DMEM/Ham's F-12 (1x), PAA Laboratories, Linz; E15-813  
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat), AppliChem, Darmstadt; A3553  
DABCO, Roth, Karlsruhe; 0718.2  
Eosin, AppliChem, Darmstadt; A2353  
Essigsäure 100%, Merck, Darmstadt; 100063  
Ethanol 96% vergällt, Roth, Karlsruhe; T171.4  
Ethanol 70% vergällt, Roth, Karlsruhe; T913.2  
Foetal Bovine Serum, PAA Laboratories, Linz; A15-043  
Gelneutralisationslösung, Arthro-Kinetics plc, Esslingen/Manchester  
Gentamicin, GIBCO Invitrogen, Karlsruhe; 15750060  
HEPES Puffer, PAA Laboratories, Linz; S11-001  
Isopropanol (100%), AppliChem, Darmstadt; A0892  
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung, Roth, Karlsruhe; N069.1  
Kollagenase, NB4, Serva, Heidelberg; 17454  
Kollagen I, Arthro-Kinetics plc, Esslingen/Manchester  
L-Ascorbat-2-phosphat (50 µg/ml), Sigma-Aldrich, Steinheim; A8960  
Mayer's Hämatoxylin-Lösung, AppliChem, Darmstadt; A4840  
NaCl, Merck, Darmstadt; 106404  
Natronlauge (1M), Roth, Karlsruhe; K021.1  
Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt; 104005  
PBS DULBECCO pH7, Biochrom, Berlin, Best.-Nr. L 182-50  
Penicillin/Streptomycin (100x), PAA Laboratories, Linz; P11-010  
Picrinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim; 36011  
Roti-Histol, Roth, Karlsruhe; 6640.4  
Salzsäure (1M), Roth, Karlsruhe; K025.1

TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, Darmstadt; 108382

Trypanblau-Lösung, Sigma-Aldrich, Steinheim; T8154

Trypsin 2,5%, GIBCO Invitrogen, Karlsruhe; 15090-046

Trypsin/EDTA (1x), PAA Laboratories, Linz; L15-004

Wasser HPLC gradient grade, Roth, Karlsruhe; A511.2

### **2.11.2 Antikörper**

Col I: Mouse anti-collagen type I polyclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA; AB765

Col I anti-human: Rabbit anti-human collagen type I polyclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA; AB745

Col II: Mouse anti-collagen type II monoclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA; MAB8887

Col X: Rabbit anti-collagen type X polyclonal antibody, Calbiochem, San Diego, USA; 234196

CS4: Mouse anti-chondroitin-4-sulfat monoclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA; MAB2030

CS6: Mouse anti-chondroitin-6-sulfat monoclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA; MAB2035

Goat anti rabbit IgG (H+L), Caltag Laboratories, Burlingame, USA; L42007

Rabbit anti mouse IgG, Dako, Als, Dänemark; P0161

Rabbit anti goat immunglobulins, Dako, Als, Dänemark; P0449

### **2.11.3 Materialien und Geräte**

Abzug 1500, Waldner, Wangen

Accu-jet, Brand, Wertheim

Aufbewahrungsbox für Zentrifugenröhrchen, Hartenstein, Würzburg; B20

Bechergläser 500 und 1000 ml, Hartenstein, Würzburg

Biofuge pico, Heraeus, Hanau

Dampfsterilisator Varioklav VI 400EP, H+P, Oberschleißheim

Deckgläser 24x50 mm, Hartenstein, Würzburg

Deckgläser für Neubauer-Zählkammer, Hartenstein, Würzburg  
Doppelspatel, Hartenstein, Würzburg; DS14  
Einmalpipetten (steril) 2, 5, 10 und 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht  
Einmalspritzen Ecoject 2 ml, Dispomed, Gelnhausen  
Heizgerät BBD 2, Grant Boekel, Feasterville, USA  
Kühlgefrierkombination economy, Bosch, Stuttgart  
Labofuge 400R, Heraeus, Hanau  
Magnetrührer mit Heizung M32, Hartenstein, Würzburg  
Magnetrührstäbchen (12 x 4,5mm), Hartenstein, Würzburg; MR12  
Mikroskop Axioskop, Zeiss, Jena  
Mikroskop Axiovert 25, Zeiss, Jena  
Neubauer-Zählkammer, Hartenstein, Würzburg; ZK06  
Pasteurpipetten, Hartenstein, Würzburg; PP07  
Ph-meter inoLab pH, WtW, Weilheim  
Pipettenhütchen, Hartenstein, Würzburg; SYGK  
Pipettenspitzen Plastibrand, 0,1 -1000 µl, Laug&Scheller, Kürnach  
Reaktionsgefäße 1,5 ml safety cap, Sarstedt, Nümbrecht  
Schottflaschen 500 und 1000 ml mit Deckel, Laug&Scheller, Kürnach  
Sicherheitswerkbank HERA safe Klasse 1, Heraeus, Hanau  
Objektträger mit Mattfeld, Hartenstein, Würzburg; OTMM  
Maxima Minima Thermometer, Hartenstein, Würzburg; TMM  
Messpipetten 5 ml, Hartenstein, Würzburg; PM5  
Messpipetten 10 ml, Hartenstein, Würzburg; PM10  
Trockenschrank T12, Kendro, Langenselbold  
Vortex-Genie 2 G560, Roth, Karlsruhe  
Waage Kern 770, Kern, Balingen  
Waage Scaltec, Scaltec, Göttingen  
Wägeschalen 10ml, Hartenstein, Würzburg; WAE2  
Wärmeschrank BB 5060, Heraeus, Hanau  
Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> mit Filter, Biochrom, Berlin; P90760  
Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> ohne Filter, Biochrom, Berlin; P90750  
Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup> mit Filter, Biochrom, Berlin; P90260

Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup> ohne Filter, Biochrom, Berlin; P90250  
Zellkulturplatten 6-well, Biochrom, Berlin; P92060  
Zentrifugenröhrchen 50 ml, Biochrom, Berlin; P91050

#### **2.11.4 OP-Material**

Abdecktuch klein, Lohmann, Neuwied  
Abstreichklemmen, Aesculap, Tuttlingen  
Abstreich-Tupfer, Lohmann, Neuwied  
Adhaesive Drape, Lohmann, Neuwied  
Beatmungsмасke, Groppler, Deggendorf  
Desinfektionslösung (Kodan), Braun, Melsungen  
Doppel-Lochtuch, Lohmann, Neuwied  
Fadenschere, Aesculap, Tuttlingen  
Fibrinkleber (0,5 – 1 ml), Tissucol®, Baxter, Unterschleißheim  
Haken scharf, Aesculap, Tuttlingen  
Handschuhe, Ansel, München  
Hohlstanze 7 mm, Aesculap, Tuttlingen  
Hohmann-Haken, Aesculap, Tuttlingen  
Injektionsnadeln, Braun, Melsungen  
Knochenadel groß, Aesculap, Tuttlingen  
Langenbeck-Haken, Aesculap, Tuttlingen  
Metallnierenschale klein und groß, Aesculap, Tuttlingen  
Mundschutz, Lohmann, Neuwied  
Nadelhalter, Aesculap, Tuttlingen  
Nahtmaterial 0- und 1-0er Vicryl, Ethicon, Norderstedt  
Narkosegerät, Groppler, Deggendorf  
OP-Haube, Lohmann, Neuwied  
OP-Kittel, Lohmann, Neuwied  
OP-Tischbezug, Lohmann, Neuwied  
Pinzette anatomisch, Aesculap, Tuttlingen  
Pinzette chirurgisch, Aesculap, Tuttlingen  
Präparierschere, Aesculap, Tuttlingen

Schlitttuch einfach, Lohmann, Neuwied  
Skalpelle 11, 15 und 22er, Braun, Melsungen  
Spritzen 10 und 20 ml, Braun, Melsungen  
Spritzenverschlusskappe, Braun, Melsungen  
Stockinette klein, Lohmann, Neuwied  
Yamshidi-Nadel (Einmalartikel), Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding

### **2.11.5 Medikamente**

Azaperon (Stresnil®), Janssen-Cilag, Neuss  
Cefazolin-Natrium (Basocef®), DeltaSelect, Dreieich  
Heparin-Natrium (25000 IE/5ml), ratiopharm, Ulm  
Isofluran 100%, Baxter, Bielefeld  
Novaminsulfon (Novalgin®), ratiopharm, Ulm

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Zellanalyse**

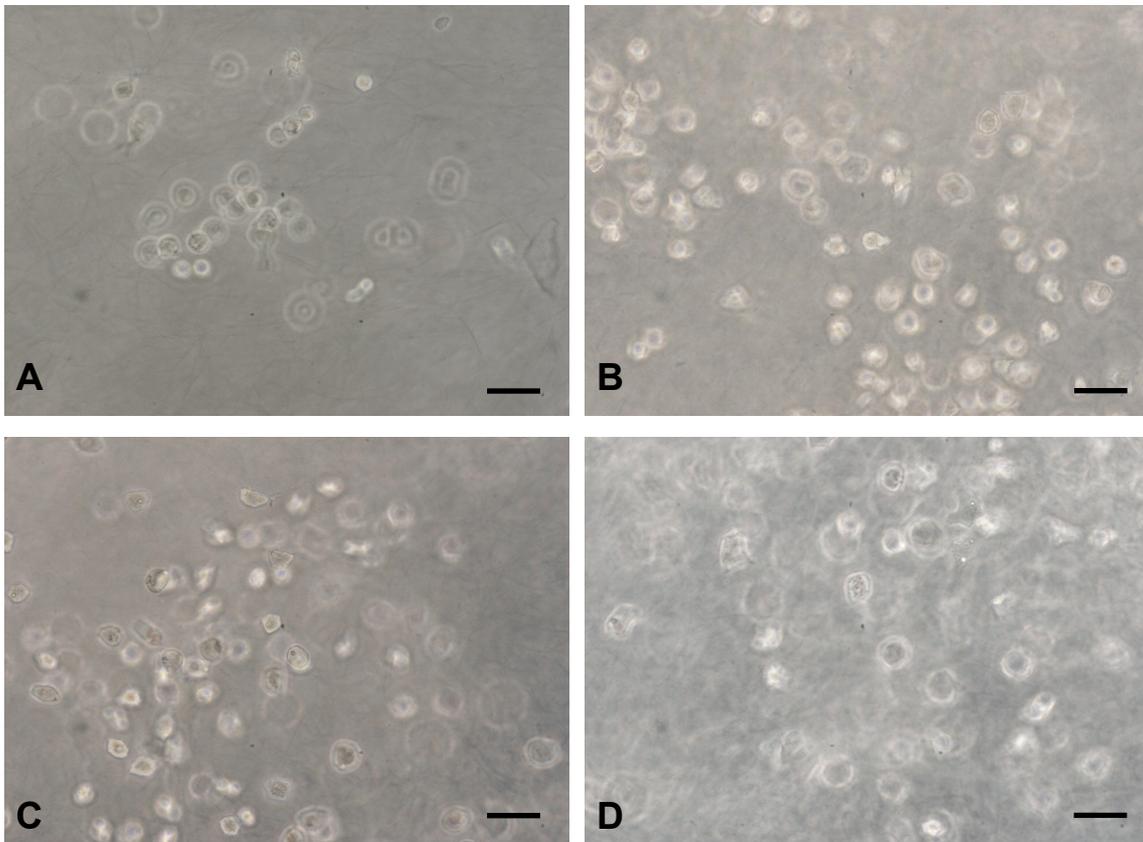
#### **3.1.1 Chondrozyten in Hydrogelen**

Für die Knorpelbiopsate wurde nach Durchführung des Kollagenaseverdaus bei der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau ein Wert von  $100\% \pm 0$  ( $n = 2$ ) ermittelt. Die Chondrozyten wurden mit einer Zellzahl von  $2,25 \times 10^4/\text{ml Gel} \pm 0$  ( $n = 2$ ) in die Kollagen Typ I Hydrogele eingebracht.

Während der 16 Tage dauernden Kultivierung in der dreidimensionalen Matrix behielten die Zellen ihren chondrozytären Phänotyp bei. Am dritten Tag lagen die runden Knorpelzellen vereinzelt bzw. in Gruppen im Gel. Ab dem sechsten Tag war eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu sehen (Abb. 11 A - D).

Am 16. Tag wurde erneut eine Zellzählung und Vitalitätsprüfung der Chondrozyten-Gele durchgeführt, um dieselbe Anzahl Stammzellen ins Gel einbringen zu können. Die ermittelte Chondrozytenzahl ergab zum jeweiligen Zeitpunkt  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml Gel  $\pm 2,24$  ( $n = 2$ ). Die Vitalität der Chondrozyten

lag bei  $96,2\% \pm 3,45$  ( $n = 2$ ). Die Proliferationsrate der Zellen betrug damit  $0,33 \pm 0,07$  ( $n = 2$ ).



**Abb. 11:** Chondrozyten in Kollagen I Hydrogel. 200fache Vergrößerung. A: 3. Tag. B: 6. Tag. C: 9. Tag. D: 13. Tag. Balken zeigt  $50\mu\text{m}$  an.

### 3.1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

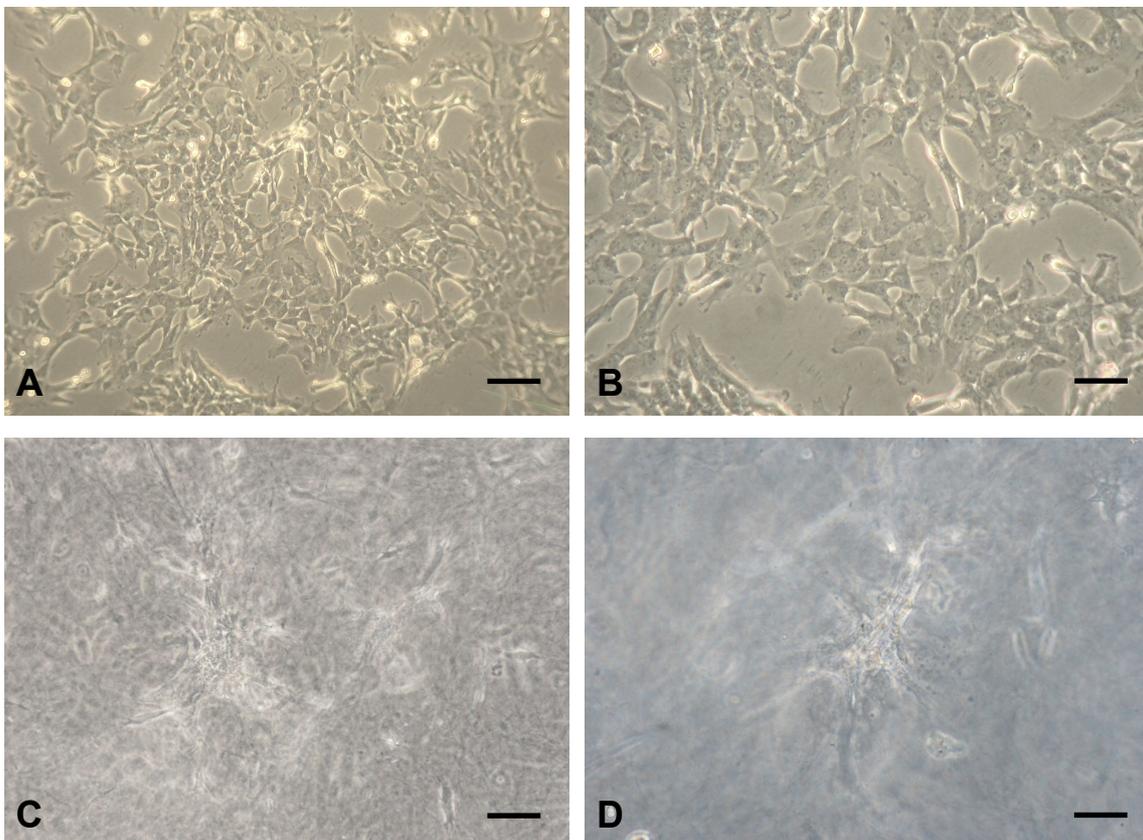
#### 3.1.2.1 MSZ in Kultur

Die mesenchymalen Stammzellen adherierten zunächst vereinzelt in den Kulturflaschen und formten individuelle Kolonien. In der ersten Woche war kaum eine Zellproliferation zu sehen. Ab dem 12. bis 14. Tag konnte ein deutlicher Anstieg der Zellzahl beobachtet werden. Die Stammzellnester erreichten nach 16 Tagen eine 70 – 80%ige Konfluenz. Die Zellen zeigten über die gesamte Kultivierungsdauer den für mesenchymale Stammzellen typischen fibroblastären Phänotyp (Abb. 12A - B).

### 3.1.2.2 MSZ in Hydrogelen

Nach 16 Tagen wurden die Stammzellen von den Zellkulturflaschen abgelöst und mit einer Zellzahl von  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml Gel  $\pm 1,2$  ( $n = 2$ ) verkapselt, entsprechend der zu diesem Zeitpunkt in den Chondrozyten-Gelen befindlichen Zellzahl. Die Trypanblaufärbung ergab eine Vitalität der Zellen von  $90,5\% \pm 0,1$  ( $n = 2$ ).

Im Gel blieben die Stammzellen spindelförmig und bildeten Kolonien aus fibroblastären Zellen. Am dritten Tag der Kultivierung im Gel konnte mikroskopisch keine Zunahme der Zellzahl, jedoch interindividuelle Unterschiede in der Zelldichte beobachtet werden (Abb. 12C – D).



**Abb. 12:** MSZ.

A: 16. Tag in Kulturmedium, 100fache Vergrößerung. B: 16. Tag in Kulturmedium, 200fache Vergrößerung. C: 2. Tag in Kollagen I Hydrogel, 100fache Vergrößerung. D: 2. Tag in Kollagen I Hydrogel, 200fache Vergrößerung. Balken zeigt  $50\mu\text{m}$  (A+C) und  $100\mu\text{m}$  (B+D) an.

### **3.2 Makroskopisches Erscheinungsbild**

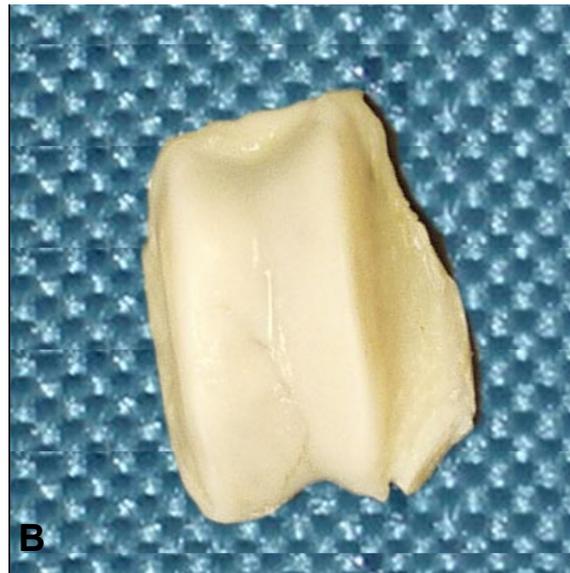
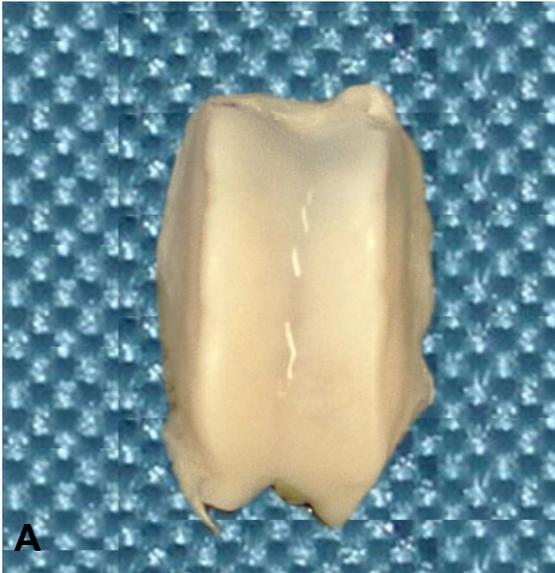
Bei der makroskopischen Beurteilung der sechs Knorpeldefekte nach einem Jahr zeigten sich bei den Präparaten deutliche Unterschiede.

Einer der Kontrolldefekte stellte sich gut gefüllt dar, die Oberfläche war homogen glatt und ohne Höhenunterschiede. Es waren kaum Grenzen zum umgebenden Gelenkknorpel sichtbar (Abb. 13A). Bei dem anderen Knie ohne Transplantat war der Defekt nicht gänzlich gedeckt, die Defektgrenzen waren noch zu erkennen und die Oberflächenstruktur des Regeneratgewebes war sehr inhomogen. Der sichtbare Riss durch die Gelenkfläche entstand bei der Präparation (Abb. 13B).

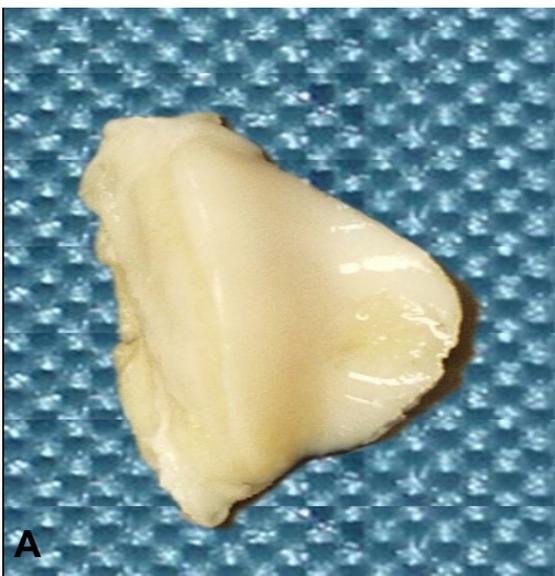
Die Defekte der MACT-Gruppe waren vollständig durch die Chondrozytentransplantate ausgefüllt und es fand eine gute Integration in das umliegende Knorpelgewebe statt. Die Oberfläche imponierte leicht inhomogen, es waren kaum Höhenunterschiede zu erkennen (Abb. 14A). In Abb. 14B wirkte das Transplantat minimal verrutscht, die scheinbare Spaltbildung war allerdings nur eine leicht rötliche Verfärbung der darunterliegenden subchondralen Knochenlamelle. Die Oberfläche stellte sich etwas inhomogen dar, lag aber im Niveau des umgebenden Knorpelgewebes.

Eines der Stammzellimplantate füllte den Defekt vollständig aus und das Transplantat war gut integriert. Die Oberfläche zeigte nur an einigen Stellen minimale Auffaserungen (Abb. 15B). Bei dem anderen Tier dieser Gruppe war das Transplantat verrutscht, so dass sich die eine Hälfte des Defekts ohne validierbaren Regeneratknorpel darstellte. Der distale Anteil des Implantates im Defekt war an den Grenzen gut in den originären Knorpel integriert, lag auf derselben Höhe und zeigte eine homogene Oberflächenstruktur (Abb. 15A).

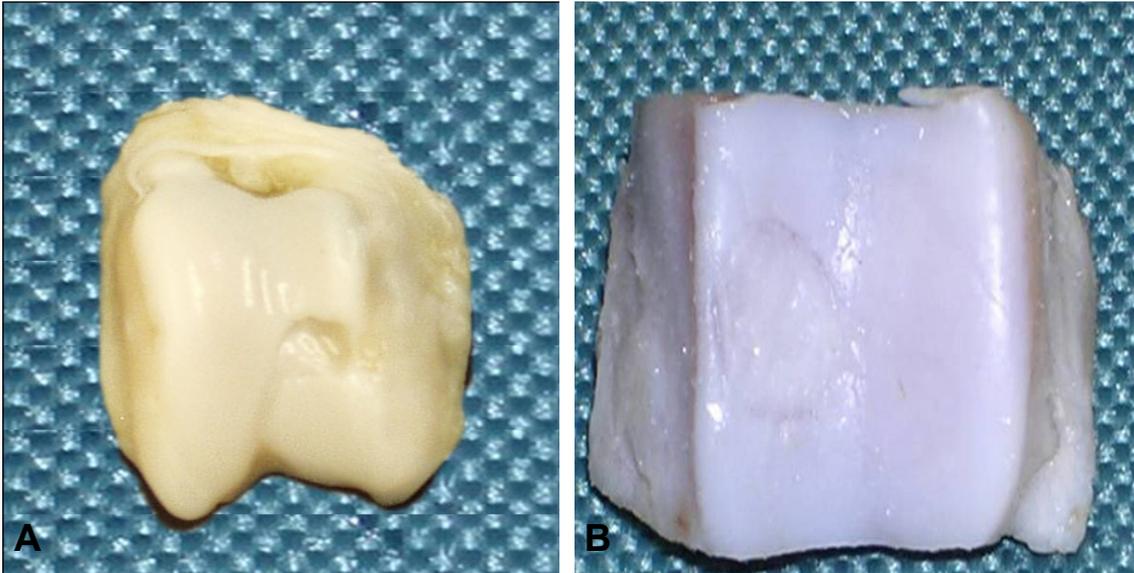
Bei allen Tieren war die Reparationszone nach einem Jahr noch von dem umgebenden Knorpel abgrenzbar. In keinem der Gelenke ließen sich Zeichen einer Synovialitis, freie Gelenkkörper, multifokale Knorpelläsionen oder arthrotische Veränderungen nachweisen.



**Abb. 13A und B:** Explantierte Femurtrochlea der Kontrollgruppe.



**Abb. 14A und B:** Explantierte Femurtrochlea der MACT-Versuchsgruppe.



**Abb. 15A und B:** Explantierte Femurtrochlea der AST-Versuchsgruppe.

### **3.3 Histologische Analyse**

Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin und Alzianblau gefärbt. Zur Auswertung und Dokumentation wurden die HE-Färbungen herangezogen.

Die verblindete Bewertung nach dem O'Driscoll- und Caplan-Score wurde von PD Dr. med. Achim Battmann (Institut für Pathologie Bad Homburg) durchgeführt (Tab. 4 und 5).

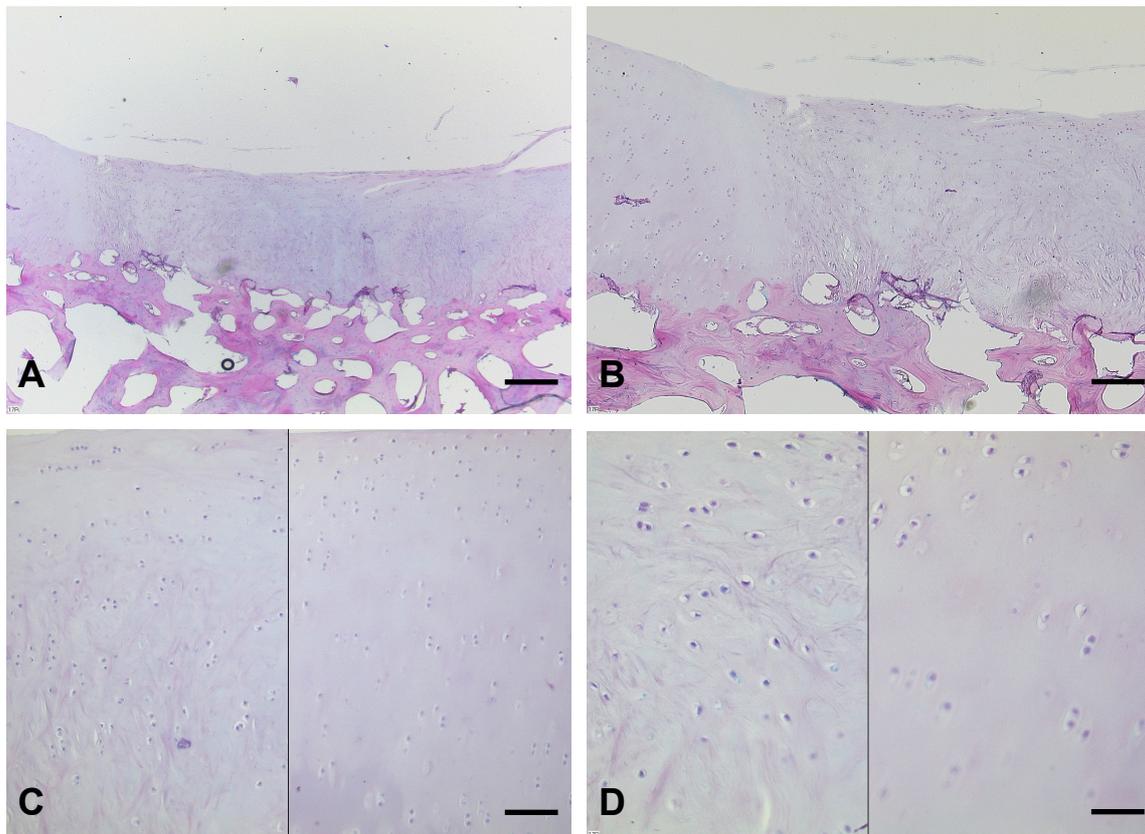
#### **3.3.1 Chondrozyten**

Die Transplantate der mit der MACT behandelten Tiere füllten die Defekte vollständig aus oder waren leicht hypertroph. Die Basisintegration der Präparate war durchgehend gut und der subchondrale Knochen einwandfrei von dem darüber liegenden Knorpelgewebe abgrenzbar. Die laterale Integration in das normale Knorpelgewebe war zufriedenstellend, in der Grenzzone des minimal verrutschten Präparates waren an dieser Stelle keine Chondrozyten vorhanden. Die Oberflächenstruktur wies kaum Unregelmäßigkeiten und lediglich leichte Anzeichen einer Auffaserung auf.

Die strukturelle Beschaffenheit des Transplantatknorpels variierte von fehlender Zellorganisation bis hin zu kompletter Desintegration. Es war zwar bei keinem der Transplantate eine saubere kolumnare Anordnung der Chondrozyten zu erkennen, jedoch konnte eine dreizonale Gliederung des Regeneratknorpels

dargestellt werden. Apikal eine zwei- bis dreilagige Zellschicht, darunter gleichmäßig verteilte, aber ungeordnete Knorpelzellen in einer homogen angefärbten Matrix und basal Knorpelzellinseln in einem deutlich faserigen extrazellulären Netzwerk (Abb. 16). Das zellreiche Knorpelgewebe zeigte lediglich bei einem der Tiere eine Clusterbildung.

Keines der Präparate zeigte Granulozyten oder andere Entzündungszellen als Hinweis auf eine Inflammation oder Unverträglichkeitsreaktion.



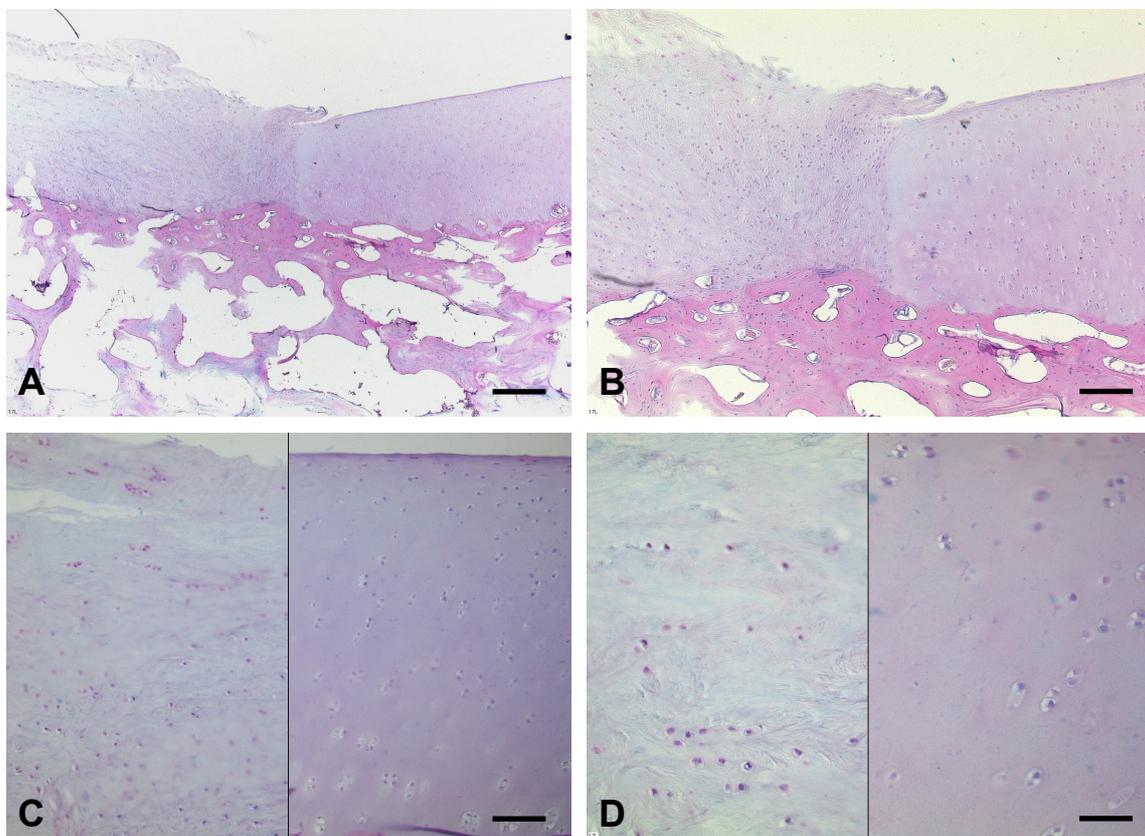
**Abb. 16:** Histologie (Hämatoxylin-Eosin) – MACT; A und B links nativer Knorpel, rechts Transplantat, C und D links Transplantat, rechts nativer Knorpel. **A:** 25fache Vergrößerung. **B:** 50fache Vergrößerung. **C:** 100fache Vergrößerung. **D:** 200fache Vergrößerung. Balken zeigt 400µm (A), 200µm (B), 100µm (C) und 50µm an.

### 3.3.2 MSZ

Ein Transplantat war zur Hälfte verrutscht, so dass hier nur der gefüllte Teil beurteilt wurde. Die Stammzell-Hydrogeltransplantate deckten die Defekte in dieser Versuchsgruppe, ohne dass eine Höhenminderung oder Hypertrophie zu verzeichnen war. Die Regenerate waren bei intakter Knorpel-Knochen-Grenze fest mit dem subchondralen Knochen verwachsen. Auf einer oder auch beiden

Seiten konnte im Randbereich zum gesunden Knorpel eine gute Integration beobachtet werden. Insgesamt war die Defektgrenze auf der gesamten Höhe noch abgrenzbar, die Übergänge zum nativen Knorpel gestalteten sich jedoch fließend. Die Oberfläche erschien normal glatt, ein Präparat zeigte moderate Auffaserungen und Unregelmäßigkeiten (Abb. 17).

Die in der Anzahl nicht vom normalen Knorpelgewebe abweichenden Zellen zeigten deutlich die Ausbildung eines chondrozytären Phänotyps sowie den Zusammenschluss zu Chondronen. Eine Organisation im Sinne einer säulenförmigen Zellordnung war nicht zu erkennen. Die Präparate wiesen keine Anzeichen einer Entzündung auf.

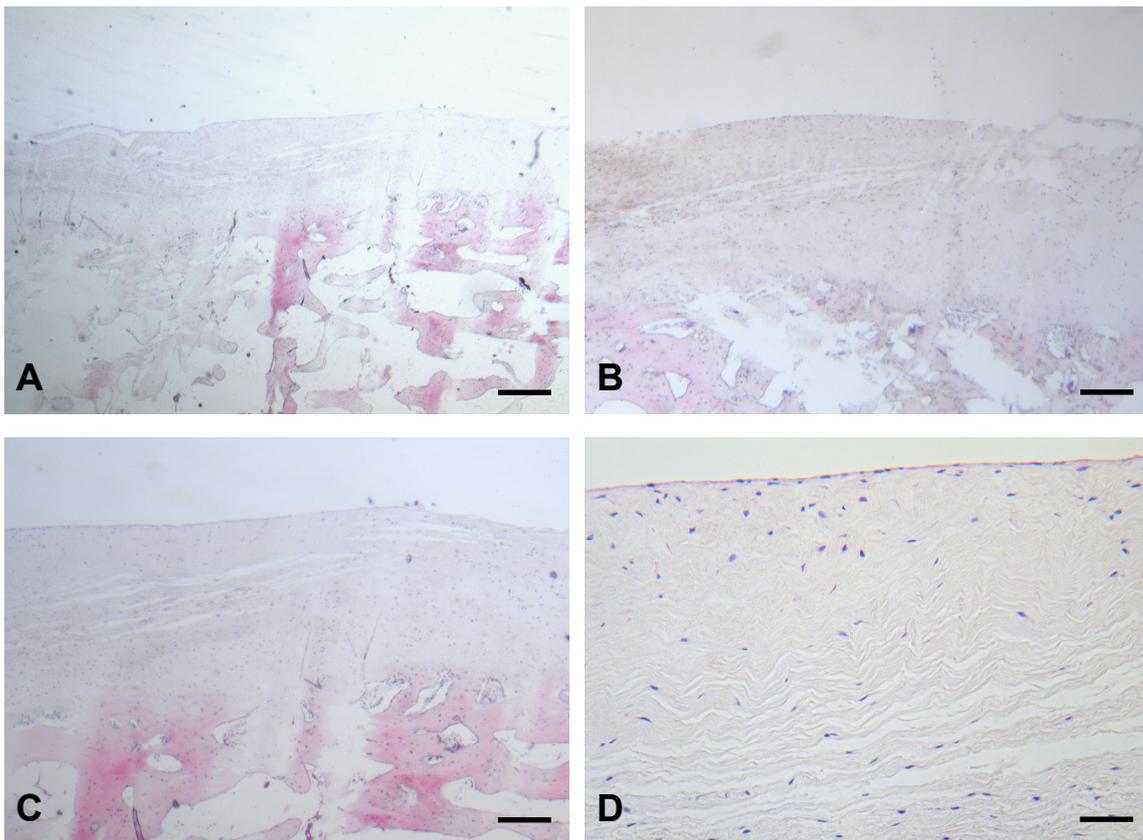


**Abb. 17:** Histologie (Hämatoxylin-Eosin) – AST; je links Transplantat, rechts nativer Knorpel. **A:** 25fache Vergrößerung. **B:** 50fache Vergrößerung. **C:** 100fache Vergrößerung. **D:** 200fache Vergrößerung. Balken zeigt 400µm (A), 200µm (B), 100µm (C) und 50µm an.

### 3.3.3 Kontrolle

Bei den Tieren ohne Transplantat waren die Defekte gefüllt, jedoch leicht hypertroph oder erreichten nicht ganz das Niveau des gesunden Gelenkknorpels. Der Übergang zum subchondralen Knochen war gut bis mäßig, die Knorpel-Knochengrenze gut darstellbar. Der Randbereich zum gesunden Knorpel war zum Teil unzureichend ausgebildet, zum Teil konnte aber eine befriedigende laterale Integration in den umgebenden Knorpel gezeigt werden. Oberflächlich waren geringe Unregelmäßigkeiten und Auffaserungen des Gewebes zu erkennen.

Die Zellularität war mit der normalen Knorpels vergleichbar und es konnten einige wenige Clusterbildungen der Chondrozyten beobachtet werden. Im Übersichtsbild war der gesamte Regeneratknorpel kaum strukturiert (Abb. 18). Auch in der Kontrollgruppe zeigten sich keine Entzündungsreaktionen.



**Abb. 18:** Histologie (Hämatoxylin-Eosin) – Kontrolle; je links Transplantat, rechts nativer Knorpel. **A:** 25fache Vergrößerung. **B:** 50fache Vergrößerung. **C:** 100fache Vergrößerung. **D:** 200fache Vergrößerung. Balken zeigt 400µm (A), 200µm (B), 100µm (C) und 50µm an.

### 3.3.4 Histologische Auswertung – Score

**Tabelle 4:** Modifizierter O’Driscoll-Score.

Strukturintegrität: 0 = schwere Desintegration, 1 = Zysten/Risse, 2 = keine Organisation, 3 = beginnende kolumnare Organisation, 4 = normal; Zellcluster: 0 = 25-100% der Zellen, 1 = < 25% der Zellen, 2 = keine; Zellularität: 0 = keine, 1 = < 25%, 2 = 25-75%, 3 = > 75-100%; Defektfüllung: 0 = < 25%, 1 = 26-50%, 2 = 51-75%, 3 = 76-90% oder 111-125%, 4 = 91-110%; Höhe (im Vergleich zum umgebenden Knorpel): 0 = 0%, 1 = 1-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%; Oberfläche: 0 = tiefe Irregularitäten/Risse, 1 = moderate Auffaserung/Irregularität, 2 = wenig Auffaserung/Irregularität, 3 = normal; Basisintegration: 0 = < 50%, 1 = 50-70%, 2 = 70-90%, 3 = 91-100%; Laterale Integration: 0 = keine, 1 = einseitig oder beidseitig unvollständig, 2 = beidseitig.

		O’Driscoll-Score				Zusatzbewertung O’Driscoll				Σ
		0 – 4	0 – 2	0 – 3	0 – 4	0 – 4	0 – 3	0 – 3	0 – 2	
Gruppe	Dauer	Strukturintegrität	Zellcluster	Zellularität	Defektfüllung	Höhe	Oberfläche	Basisintegration	Laterale Integration	
ACT	1 Jahr	1	2	1	3	4	1	3	1	<b>16</b>
ACT	1 Jahr	2	0	2	4	3	2	3	1	<b>17</b>
MSZ	1 Jahr	2	2	2	4	4	3	2	1	<b>20</b>
MSZ	1 Jahr	2	2	2	4	4	1	3	2	<b>20</b>
Kontrolle	1 Jahr	1	1	2	3	3	1	3	2	<b>16</b>
Kontrolle	1 Jahr	1	2	1	3	2	1	1	0	<b>11</b>

**Tabelle 5:** Modifizierter Caplan-Score.

Morphologische Oberfläche: 0 = tiefe Risse bis zu 100% der Defektdicke, 1 = Fissuren bis zu 50% der Defektdicke, 2 = tiefe Rillen bis max. 25% der Defektdicke, 3 = oberflächliche Rillen/Unebenheiten, 4 = eben/intakt; Subchondraler Knochen: 0 = keine Basisintegration, 1 = wenig Kontakt, 2 = mäßige Integration, 3 = intakt/direkter Übergang zum Implantat; Inflammation: 0 = schwere, 1 = mäßige, 2 = kaum, 3 = keine Entzündungsreaktion; Defektfüllung: 0 = < 25%, 1 = > 25%/Hypertrophie, 2 = 100% Defektfüllung; Übergang: 0 = tiefe Unebenheit im Übergangsbereich, 1 = Fissuren am Übergang, 2 = direkter Übergang zum Nachbarknorpel.

Caplan Score							
		0 – 4	0 – 3	0 – 3	0 – 2	0 – 2	Σ
Gruppe	Dauer	Morphologische Oberfläche	Subchondraler Knochen	Inflammation	Defektfüllung	Übergang	
ACT	1 Jahr	3	3	3	1	1	<b>11</b>
ACT	1 Jahr	4	3	3	2	1	<b>13</b>
MSZ	1 Jahr	4	3	3	2	1	<b>13</b>
MSZ	1 Jahr	3	3	3	2	2	<b>13</b>
Kontrolle	1 Jahr	4	3	3	2	2	<b>14</b>
Kontrolle	1 Jahr	3	2	3	2	0	<b>10</b>

### **3.4 Immunhistochemische Analysen**

Auch hier erfolgte die verblindete Bewertung nach dem Immunhistochemie-Score durch PD Dr. med. Achim Battmann (Institut für Pathologie Main Taunus, Frankfurt) (Tab. 6).

#### **3.4.1 Chondrozyten**

In sämtlichen Präparaten, die mit der MACT behandelt wurden, war Kollagen Typ I nachweisbar. Die Knorpelmatrix und –oberfläche waren anfärbbar, bei der Verwendung der Anti-Maus-Primärantikörper in geringem Maße auch die Zellen. Allerdings zeigte auch der umgebende Knorpel eine Farbaufnahme. Bei einem Tier war eine sehr gute Kollagen Typ II Expression in der Matrix zu erkennen. Die Knorpeloberfläche zeigte bei keinem der Präparate eine Kollagen II Farbaufnahme bzw. war nur schwach anfärbbar. Alle Chondrozytentransplantate, aber auch der umgebende hyaline Knorpel, wiesen eine geringe homogene Kollagen Typ X Expression sowohl in der Matrix als auch an der Oberfläche auf (Abb. 19A, D, G).

Die Glykosaminoglykanketten (CS4 und CS6) waren bei allen Tieren in sämtlichen Schichten des Knorpelgewebes gut ausgebildet (Abb. 19J, M).

In der Abbildung überragen die obersten Schichten des Regenerats den nativen Knorpel. Der Knorpelhof der Chondrozyten war nur bei wenigen Zellen abzugrenzen. In den unteren Schichten schien das Gewebe leicht aufgelockert, das Perichondrium war gut ausgebildet (Abb. 19A, D, G, J, M).

#### **3.4.2 MSZ**

Bei den Stammzelltransplantaten waren alle Schichten, z. T. auch die Zellen, des Regeneratgewebes sowie der umgebende native Knorpel mit Kollagen Typ I anfärbbar. Es hatte eine gute Kollagen Typ II Bildung stattgefunden, die bei einem der Tiere bis an die Oberfläche heranreichte. In den tieferen Schichten schien das Gewebe jedoch aufgelockert. Ein Perichondrium war kaum vorhanden. Bei den meisten Knorpelzellen war der umgebende Hof deutlich sichtbar. Eine Expression von Kollagen Typ X Fasern war sowohl im neugebildeten Gewebe als auch im nativen Knorpel darstellbar. Die

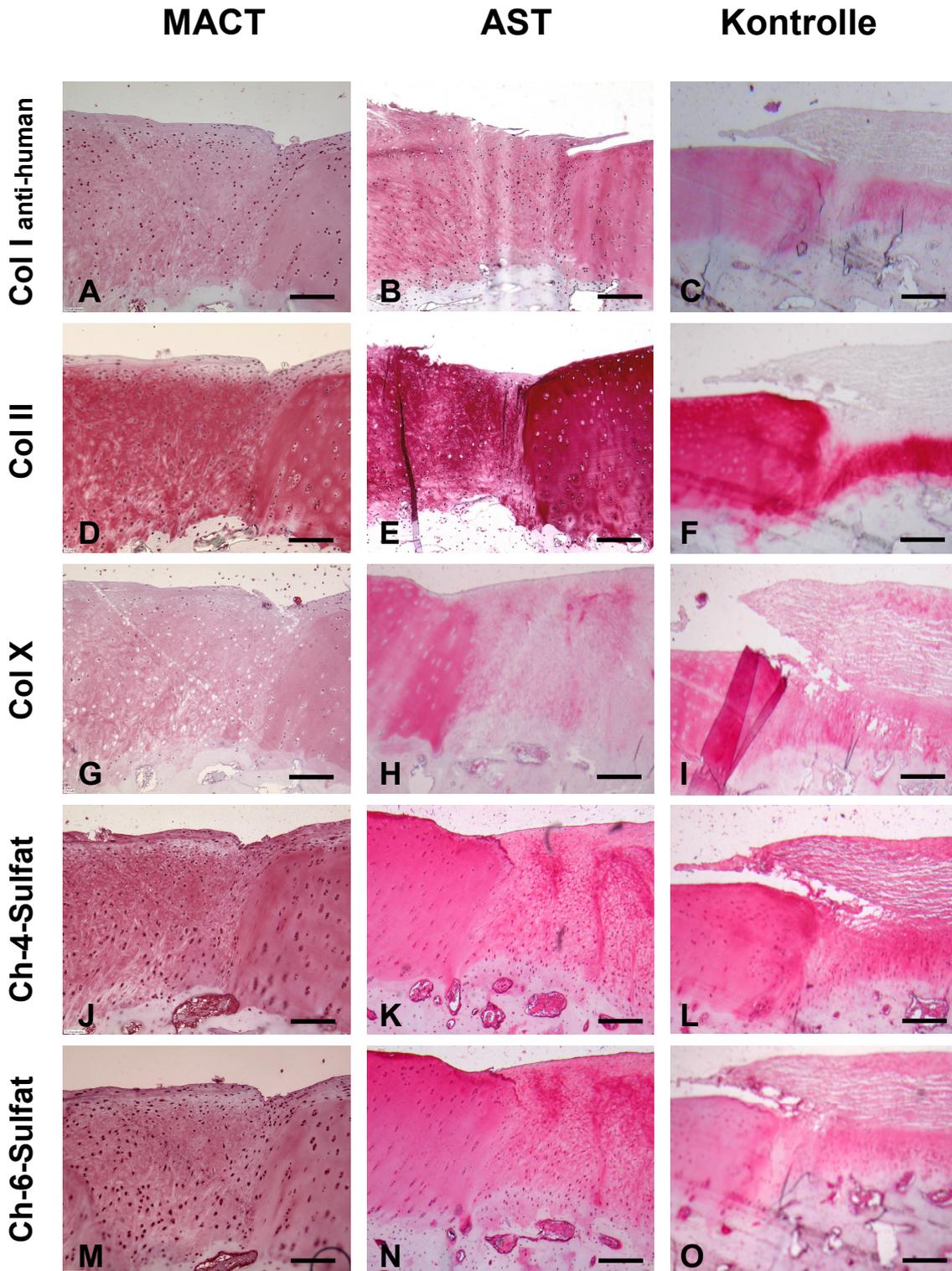
Anfärbarkeit war allerdings eher punktuell als homogen ausgeprägt (Abb. 19B, E, H).

Chondroitin-4- und -6-sulfat waren bei sämtlichen Präparaten in allen Schichten anfärbbar (Abb. 19K, N).

### **3.4.3 Kontrolle**

In der Kontrollgruppe ohne Transplantat war nur eine geringe Anfärbarkeit der Präparate auf Kollagen Typ I anti-human und anti-Maus möglich. Es konnte bei keinem der Tiere eine Kollagen Typ II Expression gezeigt werden. Die Bildung von Kollagen Typ X war in dieser Gruppe am stärksten ausgeprägt (Abb. 19C, F, I).

Chondroitin-4-sulfat konnte bei einem der Kontrolltiere in größerer Menge nachgewiesen werden, bei dem anderen war kaum eine Färbung zu erkennen. Chondroitin-6-sulfat war bei beiden Präparaten nur geringfügig darstellbar (Abb. 19L, O).



**Abb. 19:** Immunhistochemie; MACT (A, D, G, J, M) und AST (B, E, H, K, N) 100fache Vergrößerung, Balken zeigt 100µm an; Kontrolle (C, F, I, L, O) 75fache Vergrößerung, Balken zeigt 150µm an. **A, B, D, E, G, J, M:** links Transplantat, rechts nativer Knorpel. **C, F, H, I, K, L, N, O:** links nativer Knorpel, rechts Transplantat.

### 3.4.4 Immunhistochemische Auswertung – Score

**Tabelle 6:** Auswertung Immunhistochemie-Score.

Färbeintensität der Defektfüllung: 0 = keine, 1 = schwache, 2 = mäßige, 3 = starke Reaktion.

<b>Col I Maus</b>		<b>Färbung 0-3</b>		
<b>Transplantat</b>	<b>Versuchsdauer</b>	<b>Matrix</b>	<b>Zellen</b>	<b>Oberfläche</b>
MACT	1 Jahr	2	1	2
MACT	1 Jahr	2	1	2
MSZ	1 Jahr	2	1	2
MSZ	1 Jahr	2	1	1
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1

<b>Col I Human</b>		<b>Färbung 0-3</b>		
<b>Transplantat</b>	<b>Versuchsdauer</b>	<b>Matrix</b>	<b>Zellen</b>	<b>Oberfläche</b>
MACT	1 Jahr	1	0	1
MACT	1 Jahr	2	0	1
MSZ	1 Jahr	1	0	0
MSZ	1 Jahr	2	0	2
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1
Kontrolle	1 Jahr	0	0	1

<b>Col II</b>		<b>Färbung 0-3</b>		
<b>Transplantat</b>	<b>Versuchsdauer</b>	<b>Matrix</b>	<b>Zellen</b>	<b>Oberfläche</b>
MACT	1 Jahr	0	2	0
MACT	1 Jahr	3	2	1
MSZ	1 Jahr	2	2	0
MSZ	1 Jahr	3	0	2
Kontrolle	1 Jahr	0	1	0
Kontrolle	1 Jahr	0	1	0

<b>Col X</b>		<b>Färbung 0-3</b>		
<b>Transplantat</b>	<b>Versuchsdauer</b>	<b>Matrix</b>	<b>Zellen</b>	<b>Oberfläche</b>
MACT	1 Jahr	2	1	2
MACT	1 Jahr	1	0	1
MSZ	1 Jahr	2	0	1
MSZ	1 Jahr	1	0	1
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1
Kontrolle	1 Jahr	2	2	3

CS4		Färbung 0-3		
Transplantat	Versuchsdauer	Matrix	Zellen	Oberfläche
MACT	1 Jahr	2	3	2
MACT	1 Jahr	2	3	2
MSZ	1 Jahr	3	3	2
MSZ	1 Jahr	3	2	3
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1
Kontrolle	1 Jahr	3	3	3

CS6		Färbung 0-3		
Transplantat	Versuchsdauer	Matrix	Zellen	Oberfläche
MACT	1 Jahr	3	1	3
MACT	1 Jahr	2	3	1
MSZ	1 Jahr	3	3	2
MSZ	1 Jahr	2	2	1
Kontrolle	1 Jahr	1	1	1
Kontrolle	1 Jahr	1	1	2

## 4. Diskussion

### 4.1 Versuchsaufbau

Die Reparation geschädigten Knorpelgewebes ist nach wie vor eine klinische Herausforderung. Es sind bisher zwar vielversprechende Techniken sowohl in Tierversuchen als auch an Patienten angewandt worden, jedoch konnte für keine dieser Methoden eine konstante Bildung hyalinen Knorpels gezeigt und somit auf lange Sicht eine vollständige und optimale Heilung erzielt werden.

Die MACT zeigt viele Vorteile gegenüber der klassischen Methode nach Brittberg und Mitarbeitern [Zeifang et al., 2010; Schewe et Weise, 2005; Brittberg et al., 1994]. In 2- bis 5-Jahres follow-up Studien ist bei ähnlichem oder besserem klinischen Outcome die ACT bzw. MACT gegenüber der konventionellen Mikrofrakturierung in Bezug auf die histologischen Reparaturergebnisse überlegen [Knutsen et al., 2007; Basad et al., 2010; Saris et al., 2009]. Auch die Verwendung autologer MSZ anstelle der Chondrozyten

bei Knorpeldefekten der humanen Patella lieferte bereits erste positive Ergebnisse [Yoneno et al., 2005].

Viele tierexperimentelle Studien wurden an Kleintieren durchgeführt, die aber durch ihre physiologischen und anatomischen Unterschiede zum menschlichen Gelenk keine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse ermöglichen [Reinholz et al., 2004]. Insbesondere durch ihre geringe Größe und ihr Gewicht bestehen keine vergleichbaren Stabilitäts- und Belastungsbedingungen innerhalb der Gelenke. Adäquate Großtiermodelle bieten authentischere Bedingungen bezüglich der Gewichtsverhältnisse und somit auch der Heilungsprozesse bei Knorpeldefekten. Minipigs wurden schon in zahlreichen Studien eingesetzt [Wang et al., 2000; Mainil-Varlet et al., 2001; Hunziker, 2001] und wiesen elektronenoptisch die größte mikroanatomische Ähnlichkeit mit humanem artikulärem Knorpel gegenüber anderen Tierspezies auf [Kaab et al., 1998].

Bei der Wahl der Stammzellen stehen embryonale, fetale und adulte Stammzellen zur Verfügung. In einer Übersichtsarbeit von Lodi et al. wird diskutiert, dass embryonale und fetale Stammzellen ein deutlich größeres Expansions- und Differenzierungspotential haben als adulte Stammzellen und außerdem lange Zeit kultiviert und konserviert werden können, ohne diese Eigenschaften zu verlieren oder zu verändern. Allerdings darf neben der ethischen Diskussion auch ein erhöhtes Gefahrenpotential durch möglichen Kontrollverlust der Zellproliferation und somit einer Tumorbildung nicht außer Acht gelassen werden [Lodi et al., 2011]. Bei der Verwendung allogener Stammzellen könnte eine Immunreaktion oder Abstoßung der transplantierten Zellen hervorgerufen werden [Butnariu-Ephrat et al., 1996]. Die Wahl adulter autologer Stammzellen ermöglicht eine sicherere Anwendung und die Stammzellen können aus verschiedenen Geweben entnommen werden, so u.a. aus Synovial-, Fett- und Muskelgewebe sowie aus dem Knochenmark. MSZ sind gut geeignet mesodermale Zelllinien, zu der auch die Chondrozyten gehören, auszubilden. Es wird ein gewisses anti-apoptotisches und immunmodulatorisches Potential diskutiert [Lodi et al., 2011; Tögel et al., 2007]. Mesenchymale Stammzellen, die aus Knochenmark oder Synovialgewebe gewonnen wurden, erzielten im Vergleich und in klinischen Studien bisher

bezüglich der Knorpelbildung *in vitro* und *in vivo* die besten Ergebnisse. Synovialstammzellen haben ein größeres Proliferationspotential, sie sind allerdings nicht so leicht zu gewinnen wie Knochenmarksstammzellen [Jakobsen et al., 2010; Afizah et al., 2007, Koga et al., 2008, Nimura et al., 2008]. Aktuell sind letztere also die praktikabelste Ressource für eine Stammzellgewinnung. In der Zukunft könnte als suffiziente Quelle von MSZ eventuell sogar peripheres Blut genutzt werden. Diese Technik wäre noch weniger invasiv, atraumatischer und kostengünstiger [Chong et al., 2011].

In einer Studie von Ringe und Mitarbeitern wurden humane mit Schweine-Stammzellen in Monolayer- und high-density-Pelletkultur verglichen. Bei beiden Zelltypen konnte ein vergleichbares Proliferationsverhalten in Kultur, die Ausbildung eines stabilen fibroblastären Phänotyps sowie die Induktion der Chondrogenese unter Zugabe von TGF- $\beta$ 1 demonstriert werden [Ringe et al., 2002].

In vielen Studien wurde der positive Einfluß diverser mechanischer Stimuli auf das chondrogene Differenzierungspotential von MSZ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben [Angele et al., 2003; Wakitani et al., 1994; Huang et al., 2004]. Arbeiten zur Frakturheilung zeigten, dass insbesondere Beuge- und Scherkräfte am Ort des Defekts die Stammzellen zur Chondrogenese anregten [Sundelacruz et al., 2009]. Cui und Mitarbeiter untersuchten die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen bei Kaninchen. Nach Manipulation mit LIUS (low-intensity ultrasound) war hier eine signifikante Steigerung der Glykosaminoglykanproduktion sowie der Kollagen II Expression erkennbar [Cui et al., 2006].

In unserer Studie sollte das CaRe-System von Arthro Kinetics (Esslingen, Deutschland) als matrixgekoppelte ACT mit der Implantation von MSZ (AST) in Göttinger Minipigs verglichen werden. Als Kontrolle dienten Knorpeldefekte ohne jegliches Implantat.

Die MSZ wurden lediglich in Kulturmedium vorexpanziert, um zu untersuchen, ob die intraartikuläre biomechanische Stimulation sowie die *in situ* vorhandenen Signalmoleküle zur Induktion der Chondrogenese ausreichen.

Aufgrund der geringen Fallzahl konnten für unsere Versuchsreihe abschließend keine statistisch signifikanten Aussagen getroffen werden, weshalb in der folgenden Diskussion ausschließlich Tendenzen beschrieben werden. Weitere Studien zu diesem Thema mit größeren Fallzahlen und unterschiedlichen Versuchszeiträumen sind erstrebenswert.

#### **4.2 Kollagenhydrogele als Trägermatrix**

Verschiedene Matrices wurden bisher *in vitro* und *in vivo* tierexperimentell als Trägersubstanz für Chondrozyten und MSZ entwickelt und getestet. Neben der Bereitstellung eines mechanischen Substrates, können Scaffolds dynamisch und synergistisch mit den Zellen, bioaktiven Molekülen und mechanischen Signalen interagieren und so den Regenerationsprozess direkt beeinflussen und mitorganisieren [Lu et al., 2001]. Es sollten also folgende biologische Anforderungen an die Trägersubstanz gestellt werden. Das Material soll die Zellproliferation und Differenzierung unterstützen sowie für eine Implantation *in vivo* geeignet sein. Die Geometrie und Porosität müssen ein dreidimensionales Wachstum der Zellen ermöglichen und die Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie unterstützen. Außerdem muss die Matrix mechanischen Belastungen stand halten sowie die Interaktion mit bestimmten Signalmolekülen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, ermöglichen [Sundelacruz et al., 2009].

Um großflächige Defekte zu decken, sind dreidimensionale, vorgeformte Trägersubstanzen zu bevorzugen. Als ein natürlicher Vertreter dieser Gruppe ist Kollagen I das am meisten untersuchte Polymer bezüglich der artikulären Knorpelregeneration [Wakitani et al., 1989; Grande et al., 1997; Nehrer et al., 1998].

Kollagen I bietet als natürliche Komponente des Knorpelgewebes ideale Voraussetzungen für den Einsatz als Trägersubstanz in dieser Studie. Es ist biokompatibel, biodegradierbar, ausreichend belastungsstabil und löst nach Implantation allenfalls eine geringe Immunantwort aus. Badylak und Mitarbeiter sehen natürlich vorkommende extrazelluläre Matrix als den Goldstandard für die Herstellung von Trägermaterialien zur Geweberekonstruktion an [Badylak et al., 1999].

In einer Studie von Wakitani und Mitarbeitern wurden standardisierte Knorpeldefekte bei Kaninchen mit Chondrozyten in einer gelierten Kollagen-DMEM-Lösung gefüllt. Als Kontrollen dienten Defekte mit dem Gel allein sowie ohne jegliches Implantat. Nach 24 Wochen zeigten die Chondrozyten-Gel-Transplantate in achtzig Prozent neu gebildetes Knorpelgewebe, das makroskopisch sowohl bezüglich der Integration als auch der Oberflächenbeschaffenheit kaum noch vom umgebenden Knorpel zu unterscheiden war. Es bestand hauptsächlich aus Kollagen Typ II, einer homogenen Matrix, gut differenzierten Knorpelzellen und wies eine adäquate Proteoglykanbildung auf. Im Gegensatz dazu waren bei den Kontrollen zwar gefüllte Defekte, jedoch unregelmäßige Oberflächen, klar erkennbare Grenzonen und in erster Linie Kollagen Typ I zu erkennen [Wakitani et al., 1989].

Einige Jahre später wurden von einer Versuchsgruppe um Nehrer autologe Chondrozyten unter anderem in einer Kollagen I sowie einer Kollagen II Matrix in vollschichtige Knorpeldefekte der Femurtrochlea bei Hunden implantiert. Im Vergleich zu der Behandlung der Defekte mit der konventionellen ACT mit Vernähung eines Faszienlappens schnitten die beiden Kollagenmatrizes bezüglich der Gewebeneubildung und Defektfüllung deutlich besser ab. Die Oberflächenbeschaffenheit sowie die laterale und basale Integration des Regeneratgewebes war sehr gut, allerdings bestand es zu zwei Drittel aus Faserknorpel, nur ca. zwei Prozent konnten als hyalines Knorpelgewebe identifiziert werden [Nehrer et al., 1998]. Wakitani und Mitarbeiter implantierten 1998 allogene Chondrozyten in einem Kollagen I Gel in Defekte der medialen Femurkondyle sowie der patellaren Gelenkfläche in Kaninchen. Das nach zwölf Wochen untersuchte Regenerationsgewebe glich histologisch und biomechanisch dem normalen hyalinen Gelenkknorpel. Hier fehlten lediglich die zonale Gliederung und die Integration in das umgebende Empfängergewebe [Wakitani et al., 1998].

Dass Kollagen I Gel auch für MSZ eine geeignete Trägermatrix darstellt, zeigten unter anderem Yokoyama und Mitarbeiter, in dem sie die Chondrogenese der Stammzellen im Gel mit der in Medium jeweils mit und

ohne Wachstumsfaktoren verglichen. Mit der Zugabe von BMP-2, TGF- $\beta$ 3 und Dexamethason wurde im Gel dieselbe Ausbildung von Chondrozyten und eine gute Kollagen II und Proteoglykanexpression beobachtet wie im Medium [Yokoyama et al., 2005]. In einem anderen *in vitro*-Versuch konnte ebenfalls die chondrogene Differenzierungsfähigkeit von MSZ in Kollagengel unter Zugabe von Dexamethason und TGF- $\beta$ 3 gezeigt werden. Nach zwanzig Tagen waren runde Knorpelzellen ohne Anzeichen von Hypertrophie in einer gleichmäßigen extrazellulären Matrix mit adäquater Kollagen II Expression zu erkennen [Yoneno et al., 2005]. Qi et al. zeigten 2011, dass mesenchymale Stammzellen eingebettet in eine Kollagen-Matrix auch ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren oder Gentransfer nach Implantation in Kniegelenke von Kaninchen nach zwölf Wochen gute Ergebnisse bezüglich der Integration in das umliegende Knorpelgewebe und der Bildung hyalinen Knorpelgewebes lieferten [Qi et al., 2012].

Im Gegensatz zu der Knorpelherstellung in Pelletkulturen, wo der Durchmesser der Konstrukte auf 3 mm limitiert war [Sekiya et al., 2002], konnten in Kollagen-Gelen Durchmesser von bis zu 7 mm erreicht werden, die so auch eine Deckung großflächigerer Knorpelläsionen ermöglichten [Yokoyama et al., 2005]. Zum Zeitpunkt der Tierversuche war das von uns verwendete CaReS<sup>®</sup>-Hydrogel laut Herstellerinformation für Knorpeldefekte bis zu 6 cm<sup>2</sup> zugelassen [www.arthro-kinetics.com].

In unserem Versuch wurde ein Kollagen Typ I, isoliert aus Rattenschwänzen, der Firma Arthro Kinetics (Esslingen, Deutschland) verwendet, welches sich seit 2002 in klinischer Anwendung zur MACT befindet [Schneider und Gavensis, 2003].

In einer Vergleichsstudie wurden humane Chondrozyten in drei verschiedenen Kollagen I Gelen über einen Zeitraum von drei Monaten subkutan in Mäuse implantiert. Alle Gele zeigten abhängig von der Zellzahl einen gewissen Gewichtsverlust, wobei jedoch eines völlig seinen intrinsischen Zusammenhalt verlor und von der Studie ausgeschlossen wurde. Sowohl das CaReS<sup>®</sup>-Hydrogel (Arthro Kinetics, Deutschland) als auch das Atelokollagengel (Koken, Japan) wiesen eine gute mechanische Stabilität auf und waren leicht zu

bearbeiten. In beiden Gelen war die Bildung einer EZM sowie eine perizelluläre Kollagen Typ II Expression zu verzeichnen, Charakteristika hyalinen Knorpels. In Bezug auf den Stoffabbau zeigte das Arthro Kinetics-Gel ein geringfügig besseres Ergebnis [Schneider und Gavensis, 2003]. In einer anderen Vergleichsstudie von sechs verschiedenen Matrixsystemen zur Kultivierung von humanen Chondrozyten schnitten das Atelokollagengel sowie das CaReS®-Gel von Arthro Kinetics bezüglich der homogenen Zellverteilung in der Matrix sowie der Kollagen Typ II Bildung am besten ab [Gavenis et al., 2006].

Eine Weiterentwicklung in Richtung xeno-freie Matrix wurde durch Muhonen und Mitarbeiter publiziert, die rekombinantes humanes Kollagen II Hydrogel zur Kultivierung und Prädifferenzierung von MSZ mit dem in Pelletkulturen verglichen. Allerdings war die Chondrogenese in der humanen Hydrogelmatrix verzögert [Muhonen et al., 2015].

### **4.3 Ergebnisse**

Makroskopisch war bei einem Tier das Implantat disloziert (Abb. 15A). Dies könnte auf die sofortige postoperative volle Belastung und uneingeschränkte Beweglichkeit der Kniegelenke zurückgeführt werden und so auf die Notwendigkeit einer besseren Fixierung der Transplantate in den Defekten hinweisen. Da die anderen Implantate allerdings eine gute Defektfüllung bei gleicher postoperativer Belastung zeigten, ist hier von einer Ausnahme auszugehen.

Die makroskopischen Ergebnisse zeigen, dass bis auf das o.g. Tier, in allen Defekten die Fixierung und Primärstabilität der Gelkonstrukte ausreichte, um bei einer sofortigen Belastung eine ausreichende Integration der Implantate in den Defekten zu gewährleisten. Die Oberfläche war z. T. etwas aufgefasert und hypertroph. Es wäre daher zu überlegen, ob eine zumindest kurzzeitige postoperative Ruhigstellung der Gelenke sinnvoll wäre, um den Verbleib der Transplantate im Defekt sicherzustellen und möglicherweise eine homogenere Oberflächenstruktur zu erhalten. In mehreren Studien wurde der positive Effekt kontinuierlicher passiver Bewegung auf die Knorpelheilung beschrieben [O'Driscoll, 1984; O'Driscoll et Salter, 1984; Salter, 1989; Moran et al., 1992].

Komplette Immobilisation hingegen solle sogar die Knorpeldicke reduzieren, eine Erweichung des Gewebes hervorrufen und die Proteoglykansynthese verändern [Vanwanseele et al., 2002]. In einer Studie von Salter und Mitarbeitern an Kaninchen wurde gezeigt, dass sich in den mit einer „Pridie“-Bohrung behandelten Knorpeldefekten bei voller postoperativer Bewegung oder Immobilisation in einer Gipsschiene in zehn Prozent weniger Fällen hyalines Knorpelgewebe bildete als bei passiver Bewegung [Salter et al., 1980]. Eine bessere Primärstabilität der Kollagengele könnte auch durch eine dynamische Kompression oder hydrostatischen Druck vor der Implantation *in vitro* erzielt werden. Positive Effekte konnten in verschiedenen Studien für die Kompressionsbehandlung der Gele nach einer Wachstumsfaktor-induzierten Vordifferenzierung gezeigt werden, wobei es zu einer veränderten extrazellulären Matrix-Produktion kam [Kisiday et al., 2009; Huang et al., 2010]. Eine sofortige kontinuierliche Belastung setzte die Stabilität der Konstrukte eher herab [Huang et al., 2010; Thorpe et al., 2008].

Die makroskopisch sichtbare Spaltbildung zum angrenzenden nativen Knorpel auf den Abbildungen 14B und 15B besteht nur scheinbar. Hier wurde die subchondrale Knochenlamelle beim Débridement während der zweiten Operation leicht verletzt, so dass diese rot durchscheint. Auch in dieser Grenzzone befand sich Regenerationsgewebe. Es stellt sich natürlich die Frage, ob insbesondere bei dem mit MACT versorgten Transplantat (Abb. 14B), trotz Blutstillung mit Adrenalin und Fibrinkleber, Vorläuferzellen aus dem subchondralen Knochen eingewandert sind und an der Reparatur des Defekts beteiligt waren.

Die histologischen Ergebnisse wurden verblindet nach dem modifizierten O'Driscoll-Score beurteilt, der kürzlich in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Reliabilität mit einem anderen, oft verwandten Score nach Pineda verglichen wurde [O'Driscoll et al., 1986, 1988, 2001; Pineda et al., 1992; Moojen et al., 2002]. Beide Systeme lassen eine verlässliche semi-quantitative Beurteilbarkeit des Knorpelgewebes zu und weisen eine gute Korrelation zu den histologischen Ergebnissen auf [Reinholz et al., 2004].

In fast allen Kategorien des O'Driscoll-Scores schnitten die beiden Stammzelltransplantate etwas besser ab als die Vergleichsgruppen, nur in der Basisintegrität war die MACT überlegen. Die Kontrollgruppe ohne Transplantat erreichte außer in der lateralen Integrität und der Zellbeurteilung die schlechtesten Ergebnisse. Die Ergebnisse waren aber auch innerhalb der Gruppen z. T. sehr divergent. Ein MACT-Defekt zeigte eine sehr gute Clusterbildung, der andere fast gar keine. Die laterale Einbindung des Regeneratknorpels der Kontrolltiere war einmal nahezu vollständig vorhanden, einmal fehlte sie gänzlich. Clusterbildung und Zellularität waren in der Gruppe B (AST) zufriedenstellend. Im Caplan-Score waren kaum Unterschiede zwischen den Gruppen zu verzeichnen.

Nach dem auf ein Jahr angesetzten Versuchszeitraum war bei beiden MSZ-Transplantaten eine sehr gute chondrozytäre Ausdifferenzierung der Zellen mit abgrenzbarem Knorpelhof sichtbar und es war ein Zusammenschluss zu Chondronen zu erkennen. Diesbezüglich war die Gruppe B überlegen. Perichondrium war in der MACT-Gruppe besser abgrenzbar und es war eine dreizonale Gliederung des Ersatzknorpels erkennbar. Eine arkadenförmige Kollagen-Anordnung war in keiner Gruppe darstellbar. Diese ist aber für die ausreichende Stabilität des Knorpels unverzichtbar [Korhonen und Herzog, 2008; Wilson et al., 2007]. Die MSZ-Transplantate zeigten den höchsten Gehalt an Kollagen II, die Dichte war allerdings nicht ganz so homogen wie im nativen Knorpel. In Bezug auf den Kollagen I Gehalt und weitere Bestandteile der EZM waren MACT und AST in den histologischen Ergebnissen vergleichbar. Die Kontrollgruppe schnitt deutlich schlechter ab, Kollagen II war gar nicht darstellbar, geringe Mengen Kollagen I, welches in minderwertigem Faserknorpel überwiegt, und wenig Glykosaminoglykane. In der Kontrollgruppe war der Kollagen X Gehalt am höchsten, ein Marker für Chondrozytenhypertrophie und Ossifikation. Insgesamt waren die Transplantat-Gruppen, MACT und AST, bezüglich der histologischen und immunhistochemischen Beurteilungen mindestens vergleichbar, die AST in Tendenzen sogar etwas besser. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Yan und Mitarbeitern, die in einer Vergleichsstudie von AST und MACT im

Tierversuch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im histologischen Score, aber eine bessere Zellordnung, Integration in den umgebenden Knorpel und den subchondralen Knochen bei der Stammzellgruppe feststellen konnten [Yan et al., 2007]. Die Kontrollgruppe mit Leerdefekt lieferte die schlechtesten Ergebnisse, eine Spontanheilung ist also bei einem 7 mm-Knorpeldefekt auch mit Faserknorpel nicht mehr möglich.

In unserem Versuch betrug die Zelldichte für die Chondrozyten und die MSZ im Gel  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml zum Zeitpunkt der Implantation in die Knorpeldefekte. Die Zelldichte der Stammzellen wurde analog zu der Chondrozytendichte zu dem entsprechenden Zeitpunkt gewählt. Diese Zellzahl war möglicherweise zu gering, um optimalere Ergebnisse zu erzielen. Andere Studien haben gezeigt, dass die Menge des neu gebildeten Knorpels mit der Zelldichte der MSZ im Gel korreliert. Konstrukte mit  $5 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  Zellen/ml erzielten bessere histologische Ergebnisse und waren reicher an Proteoglykanen als Konstrukte mit einer niedrigeren Zelldichte [Yokoyama et al., 2005]. Auch bei Ochi und Wakitani und jeweiligen Mitarbeitern lagen Chondrozyten- und MSZ-Zellzahlen bei  $1 - 6,5 \times 10^6$  Zellen/ml Gel [Ochi et al., 2001; Wakitani et al., 2002].

#### **4.4 Perspektiven**

##### **4.4.1 Vordifferenzierung der MSZ in Kultur und/oder Hydrogel**

Unser Versuch hat gezeigt, dass die Umgebung im Kniegelenk der Minipigs sowie die mechanische Stimulation durch frühzeitige Bewegung und Belastung des Transplantats ausreichen, um eine chondrogene Differenzierung der MSZ zu induzieren. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich wurde, waren die zelluläre Beschaffenheit und auch die Produktion der extrazellulären Matrix der Stammzellregenerate durchaus mit denjenigen aus der ACT vergleichbar.

Um jedoch bestmögliche Resultate zu erzielen, sollte an eine Vordifferenzierung der MSZ gedacht werden. Der Einfluss von diversen Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , BMP, IGF, FGF) auf die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und die Synthese einer knorpelspezifischen EZM wurde bisher vielfach in Zellkulturen und diversen

natürlichen sowie synthetischen Trägermatrizes untersucht [Johnstone et al., 1998; Ma et al., 2003; Gelse et al., 2003; Nawata et al., 2005; Perrier et al., 2011; Kim et al., 2012; Fisher et al., 2016]. Die besten Ergebnisse bezüglich der Kollagen Typ II und Proteoglykanexpression lieferten hier die Zugaben von Vertretern der TGF- $\beta$ - und BMP-Familie. Insbesondere die Kombination der Faktoren TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 sowie BMP-2 und TGF- $\beta$ 3 zeigten synergistische Effekte [Toh et al., 2005; Schmitt et al., 2004; Shen et al., 2009]. Bei der Frage, ob die Zugabe der Wachstumsfaktoren nur initial, intermittierend oder kontinuierlich während der Kultivierung der Zellen erfolgen soll und welche Dosierung am effektivsten ist, variieren die bisherigen Versuchsergebnisse [Kock et al., 2011; Huang et al., 2009; Mehlhorn et al., 2006].

In den letzten Jahren wurden die Wachstumsfaktoren nicht mehr nur dem Medium zugefügt, sondern auch Versuche mit der Zugabe zur Trägermatrix durchgeführt. Die Studiengruppe um Nöth beschäftigte sich 2007 mit der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 in Kollagen Typ I Hydrogelen auf die Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen [Nöth et al., 2007]. Eines der Hauptprobleme der Vor- bzw. weiteren Ausdifferenzierung der MSZ im Gel stellt die Gelschrumpfung dar, die unter anderem abhängig ist von der Zellzahl, der Konzentration des Gels und des Serums sowie der Art des Wachstumsfaktors [Lewus et al., 2005; Schmitt et al., 2003; Yokoyama et al., 2005]. Keiner der oben genannten Wachstumsfaktoren bzw. Faktor-Kombinationen konnte allerdings bisher die Synthese von Kollagen Typ I und Kollagen Typ X reduzieren oder gar verhindern [Barry et al., 2001; Ichinose et al., 2005]. Andere veröffentlichte Daten geben aber vielversprechende Ansätze zur Unterdrückung von Kollagen I und Kollagen X Expression im chondrogenen Differenzierungszyklus, unter anderem durch die Kokultivierung der MSZ mit Chondrozyten [Rampersad et al., 2011; Bian et al., 2011].

Die Studiengruppe um Huang verglich die Kombination einer chondrogenen Vordifferenzierung mit TGF- $\beta$ 3 und konstantem dynamischen Druck in Bezug auf die mechanische Stabilität und die Bildung extrazellulärer Matrix bei Stammzell-Hydrogelen. Mit TGF- $\beta$ 3 vordifferenzierte Gele zeigten bessere Ergebnisse in der mechanischen Belastbarkeit und dem

Glykosaminoglykangehalt [Huang et al., 2010]. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Mouw und Mitarbeiter nach Vordifferenzierung mit TGF- $\beta$ 1 und anschließender dynamischer Kompression im Hinblick auf Kollagen II und Aggrecan Bildung [Mouw et al., 2007]. Zscharnack und Mitarbeiter führten eine *in vivo* Studie an Schafen durch, die zeigte, dass mit TGF- $\beta$ 3 vordifferenzierte MSZ in einem Kollagen I Hydrogel signifikant bessere Ergebnisse bezüglich den histologischen Scores nach sechs Monaten zeigte als die Gruppe mit undifferenzierten MSZ [Zscharnack et al., 2010].

2011 führte die Arbeitsgruppe um Marquass eine unserem Studienprotokoll sehr ähnliche Versuchsreihe an Knorpeldefekten der Femurkondyle von Schafen durch. Es wurden Kollagen I Hydrogele mit Chondrozyten, undifferenzierten MSZ und mit TGF- $\beta$ 3 vordifferenzierten MSZ implantiert. Obwohl die Gelkonstrukte mit den vordifferenzierten MSZ initial eine Schrumpfung zeigten, waren die histologischen und radiologischen Ergebnisse nach einem Jahr besser als in den Vergleichsgruppen [Marquass et al., 2011].

#### **4.4.2 Gentherapie**

Die chondrogene Vordifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Kultur oder in der Gelmatrix wurde bereits vielfach untersucht. Sie stellt momentan die praktikabelste Möglichkeit der Vordifferenzierung dar. Erstrebenswert ist aber eine dauerhafte Versorgung der Stammzellen mit Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen *in vivo*. Die systemische Anwendung oder die direkte Applikation in den Defekt bzw. in das Gelenk erfordert jedoch hohe Dosen oder wiederholte vielfache Injektionen. Diese Methoden sind teuer und bergen unvorhersehbares Komplikationpotential, z.B. Osteophytenbildung, Ossifikation und ähnliches [Allen et al., 1990; van Beuningen et al., 1998; Lee et al., 2007]. In der Folge sind verschiedene Strategien evaluiert worden, um eine längerfristige kontrollierte Abgabe von Signalmolekülen zu gewährleisten. Zufriedenstellende Ergebnisse konnten allerdings nicht präsentiert werden. Eine Übersicht gibt hier die Arbeit von Nandi und Mitarbeitern [Nandi et al., 2010].

Gentherapie stellt eine Alternative bezüglich der konstanten Bereitstellung von Wachstumsfaktoren an der Defektstelle dar [Steinert et al., 2008; Gelse et al.,

2006]. An einen Vektor gebunden werden die Gene der entsprechenden Wachstumsfaktoren in die Stammzellen eingeschleust, die dann für unterschiedliche Zeiträume in der Lage sind, diese selbst zu exprimieren. Der Gentransfer in die Zielzellen kann viral oder nicht viral erfolgen. Nicht-virale Vektoren konnten keine ausreichend hohen Spiegel der Genexpression erzielen und auch die Expressionsdauer war nicht ausreichend [Evans et al., 2006b]. Die führenden viralen Vektoren in klinischen Versuchsreihen sind Adenoviren, Retroviren, Lentiviren, AAV (adeno-associated virus) und HSV (herpes simplex virus) [Evans et al., 2006a; Davis, 2002; Kay et al., 2001]. Adenoviren bewirken eine eher passagere, Retro- und Lentiviren eine länger andauernde Bildung der Faktoren im Defekt [Nixon et al., 2007; Cucchiaroni et al., 2005; Partridge et al., 2004]. Bei der Verwendung von Retro- und Lentiviren besteht allerdings so auch die Gefahr einer Mutation, das Adenovirus ruft Immunreaktionen hervor und das HSV ist zytotoxisch. So bleibt das AAV, das bereits erfolgreich in Tiermodellen bezüglich der Arthritisbehandlung sowie in klinischen Studien eingesetzt wurde [Evans et al., 2006b].

Die Effizienz und Sicherheit der Gentherapie in Tierstudien ist für die Anwendung an lokalen Knorpeldefekten in mehreren Studien bereits belegt worden [Evans et al., 2006a]. Die Studiengruppe um Katayama erzielte 2004 positive Ergebnisse eines vektorinduzierten Gentransfers im Tiermodell. Mit CDMP1 (cartilage-derived morphogenetic protein 1), einem Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie, transfektierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark wurden in Knorpeldefekte bei Kaninchen implantiert. Die CDMP1-Gruppe erzielte signifikant bessere histologische Ergebnisse als die Kontrollgruppe mit dem GFP-Gen (green fluorescent protein) [Katayama et al., 2004].

Für die klinische Anwendung, insbesondere bei Knorpeldefekten, die keine vital bedrohliche Erkrankung darstellen, ist die Gentherapie aktuell nicht sicher genug [Evans et al., 2006a+b]. Ausführliche Studien müssen folgen, bevor eine Freigabe erwartet werden kann. Eine Übersichtsarbeit hierzu liefern Madry und Mitarbeiter [Madry et al., 2011].

Eine weitere Diskussion bezieht sich auf die Identifikation und Isolation von MSZ mit hohem chondrogenem Potential mittels FACS-Analyse (fluorescence automated cell sorting). Bei dieser Technik werden spezielle Oberflächenmarker von Subpopulationen erkannt. Hierdurch könnte möglicherweise die Ausbildung eines fibroblastären Phänotyps während der chondrogenen Differenzierung reduziert oder gar vermieden werden [Arai et al., 2002; Fickert et al., 2003].

#### **4.4.3 Markierung der Zellen**

Lange Zeit konnte nach der Implantation von Chondrozyten oder Stammzellen in einen Knorpeldefekt nur das Regeneratgewebe an sich beurteilt werden. Inwieweit allerdings ein Verbleib der transplantierten Zellen im Defekt gesichert war und ob die zuvor isolierten Zellen maßgeblich an der Bildung des Ersatzknorpels beteiligt waren, konnte nicht sicher geklärt werden. Die implantierten Zellen sollten demnach markiert werden. Hierzu stehen verschiedene fluoreszierende Farbstoffe zur Verfügung.

GFP (green fluorescent protein) ist heutzutage wohl der Standardzell- bzw. -proteinmarker [Chalfie et al., 1994]. Es ist nicht zelltoxisch, kann allerdings bei sehr hoher Expression Peroxid bilden, welches die betreffenden Zellen unter Stress setzen und schädigen könnte. Das membrangebundene DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) besitzt eine geringe Zelltoxizität und soll kaum die Zellvitalität oder das Differenzierungspotential beeinflussen [Crawford et al., 1991; Ponticciello et al., 2000], die Fluoreszenz bleibt nach einer Studie von Koga und Mitarbeitern mindestens 24 Wochen erhalten [Koga et al., 2007]. Auch die Gelbeschaffenheit oder das histologische Ergebnis werden nicht verändert und verfälscht, es fand kein Farbaustritt aus den Zellen in die extrazelluläre Matrix statt [Koga et al., 2008]. Bei Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs PKH26 reduzierte die Zellproliferation die Fluoreszenz schrittweise und die Vitalität der Zellen war nach dem Markierungsvorgang von initial 95% auf 70-80% reduziert, was auf die vielfachen Waschprozeduren zurückgeführt wird. Die vitalen gelabelten Zellen hatten dann keine reduzierte Überlebenszeit und

der Farbstoff war mindestens für zehn Wochen nach *in vivo*-Transplantation nachweisbar [Krause et al., 2001; Chen et al., 2005; Huang et al., 2011]. Nach den Angaben der Hersteller beträgt die Halbwertszeit sogar bis zu 100 Tage.

## 5. Zusammenfassung

Traumatische und/oder degenerative, umschriebene Knorpeldefekte sind aufgrund der schlechten intrinsischen Regenerationseigenschaften des Knorpelgewebes immer noch eine chirurgische Herausforderung. Therapiemöglichkeiten mittels Knorpelrekonstruktion durch autologes Knorpelgewebe hat den Nachteil der „donor-site-morbidity“ und auch die mit guten klinischen und bildmorphologischen Ergebnissen bereits in der Klinik angewandte matrixgekoppelte autologe Chondrozytentransplantation kommt nicht ohne eine zusätzliche Operation und Entnahme von Knorpelgewebe aus.

Autologe mesenchymale Stammzellen sind einfach mittels Beckenkammpunktion zu gewinnen und stellen aufgrund ihres Proliferations- und chondrogenen Differenzierungsvermögens eine vielversprechende Alternative dar. Die Tissue Engineering Division des orthopädischen König-Ludwig-Hauses in Würzburg befasst sich nun seit mehreren Jahren in verschiedenen Versuchsreihen unter anderem mit dieser Alternative der Knorpelrekonstruktion. Vor allem die Optimierung der Nutzung von Stammzellen, die Vordifferenzierungsmöglichkeiten *in vitro* und das Verhalten in verschiedenen Trägermatrizes wird erforscht.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Pilotstudie zur Anwendung von Stammzellen analog zu der in klinischer Anwendung befindlichen MACT *in vivo* in Göttinger Minipigs vor. Wir haben zeigen können, wenn auch nur mit einer geringen Fallzahl und fehlenden signifikanten Aussagen, dass Stammzellen eine vielversprechende Alternative zu Chondrozyten in der Versorgung von Gelenkknorpeldefekten darstellen. Eine Verarbeitung in Kollagen I Hydrogelen ist in gleicher Weise wie mit den Chondrozyten möglich und auch die mechanische Stabilität differiert nicht. Die histologischen und immunhistochemischen Auswertungen haben in den Stammzelltransplantaten

gleich gute, in einigen Aspekten sogar gering bessere Ergebnisse erzielt als die bewährten Chondrozytentransplantate.

In der Nachbehandlung schien die sofortige volle Belastung der frisch operierten Kniegelenke bei den Minipigs möglicherweise problematisch in Bezug auf die Fixierung und den Verbleib der Gel-Transplantate im Defekt. In der Klinik ist eine zeitweise Teilbelastung und anfangs lediglich passive Bewegung des Gelenks natürlich problemlos möglich. In der Zukunft werden durch Vordifferenzierung und Markierung der Stammzellen sowie durch Vorauswahl von Zellen mit einem hohen chondrogenen Differenzierungspotential die Ergebnisse von ähnlichen Versuchsreihen sicher noch optimiert werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

**Afizah H**, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW, Lee EH. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng* 13:659-666, 2007.

**Aigner J**, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 42:172-181, 1998.

**Allen JB**, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 171:231-247, 1990.

**Angele P**, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21:451-7, 2003.

**Arai F**, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* 195:1549-1563, 2002.

**Arinze TL**, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85:1927-1935, 2003.

**Aroen A**, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 32:211-215, 2004.

**Badylak S**, Arnoczky S, Plouhar P, Haut R, Mendenhall V, Clarke R, Horvath C. Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin Orthop Relat Res* 367:333-43, 1999.

**Baksh D**, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8:301-316, 2004.

**Barry F**, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268:189 - 200, 2001.

**Basad E**, Ishaque B, Bachmann G, Stürz H, Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:519-527, 2010.

**Bert J**, Maschka K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: A five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy* 5:25-32, 1989.

**Bobic V**. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopäde* 28:19-25, 1999.

**Briggs TW**, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 85:1077-83, 2003.

**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* 331:889-895, 1994.

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

**Buckwalter JA**, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41:1331-42, 1998.

**Butnariu-Ephrat M**, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop Relat Res* 330:234-243, 1996.

**Caplan AI**. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-50, 1991.

**Caplan AI**. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 3:429-35, 1994.

**Caplan AI**, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 342:254-69, 1997.

**Caplan AI**, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21<sup>st</sup> century. *Trends Mol Med* 7:259-264, 2001.

**Caron MM**, Emans PJ, Coolen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJ. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1170-1178, 2012.

**Chaipinyo K**, Oakes BW, Van Damme MP. The use of debrided human articular cartilage for autologous chondrocyte implantation: maintenance of

chondrocyte differentiation and proliferation in type I collagen gels. *J Orthop Res* 22:446-455, 2004.

**Chalfie M**, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 11;263:802-805, 1994.

**Chen J**, Wang C, Lü S, Wu J, Guo X, Duan C, Dong L, Song Y, Zhang J, Jing D, Wu L, Ding J, Li D. In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319:429-438, 2005.

**Chong PP**, Selvaratnam L, Kamarul T. Characterization of undifferentiated human bone marrow and blood derived mesenchymal stem cells and their potential for chondrogenic differentiation. *BMC Proceedings* 5:85, 2011.

**Chu CR**, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D. Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res* 29:1147-1154, 1995.

**Cucchiari M**, Madry H. Gene therapy for cartilage defects. *L Gene Med* 7:1495-1509, 2005.

**Cui JH**, Park K, Park SR, Min BH. Effects of low-intensity ultrasound on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in polyglycolic acid: an in vivo study. *Tissue Eng* 12:75-82, 2006.

**Davis ME**. Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol* 13:128–131, 2002.

**Dozin B**, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol* 21:449-459, 2002.

**Erggelet C**, Steinwachs MR, Reichelt A. The operative treatment of full thickness cartilage defects in the knee joint with autologous chondrocyte transplantation. *Saudi Med J* 21:715-21, 2000.

**Erggelet C**, Browne JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Mosely JB. [Autologous chondrocyte transplantation for treatment of cartilage defects of the knee joint. Clinical results]. *Zentralbl Chir* 125:516-22, 2000.

**Erggelet C**, Sittinger M, Lahm A. The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy* 19:108-110, 2003.

**Evans CH**, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene therapy for arthritis: what next? *Arthritis Rheum* 54:1714-1729, 2006a.

**Evans CH**, Ghivizzani SC, Robbins PD. Will arthritis gene therapy become a clinical reality? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:344-345, 2006b.

**Fickert S**, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage* 11:790-800, 2003.

**Fisher MB**, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Söegaard N, Kim M, Pfeifer C, Saxena V, Dodge GR, Burdick JA, Schaer TP, Steinberg DR, Mauck RL. Effects of mesenchymal stem cell and growth factor delivery on cartilage repair in a mini-pig model. *Cartilage* 7:174-84, 2016.

**Frenkel SR**, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 79:831-36, 1997.

**Gage FH**. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438, 2000.

**Gaissmaier C**, Fritz J. Ursachen und Epidemiologie von Knorpelschäden des Kniegelenks. *Arthritis und Rheuma* 25:293-298, 2005.

**Gavenis K**, Schmidt-Rohlfing B, Mueller-Rath R, Andereya S, Schneider U. In vitro comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42:159-167, 2006.

**Gelber AC**, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med* 133:321-328, 2000.

**Gelse K**, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 48:430-441, 2003.

**Gelse K**, Schneider H. Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 58:259-284, 2006.

**Goldberg VM**, Caplan AI. Biological resurfacing: an alternative to total joint arthroplasty. *Orthopedics* 17:818-21, 1994.

**Grande DA**, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7:208-18, 1989.

**Grande DA**, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 34:211-20, 1997.

**Grande DA**, Mason J, Light E, Dines D. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85:111-6, 2003.

**Grinnemo KH**, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127:1293-1300, 2004.

**Hangody L**, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Eberhardt R. Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique – a preliminary report. *Foot Ankle Int* 18:628-634, 1997.

**Haynesworth SE**, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88, 1992.

**Hendrickson DA**, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 12:485-497, 1994.

**Huang AH**, Stein A, Tuan RS, Mauck RL. Transient exposure to transforming growth factor beta 3 improves the mechanical properties of mesenchymal stem cell-laden cartilage constructs in a density-dependent manner. *Tissue Eng Part* 15:3461-3472, 2009.

**Huang AH**, Farrell MJ, Kim M, Mauck RL. Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19:72-85, 2010.

**Huang CY**, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22:313-23, 2004.

**Huang JW**, Lin SS, Chen LH, Liu SJ, Niu CC, Yuan LJ, Wu CC, Chen WJ. The use of fluorescence-labeled mesenchymal stem cells in poly(lactide-co-

glycolide)/hydroxyapatite/collagen hybrid graft as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. *J Trauma* 70:1495-502, 2011.

**Hubbard MJ.** Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle: A five year study. *J Bone Joint Surg Br* 78:217-19, 1996.

**Hui JH,** Chen F, Thambyah A, Lee EH. Treatment of chondral lesions in advanced osteochondritis dissecans: A comparative study of the efficacy of chondrocytes, mesenchymal stem cells, periosteal graft, and mosaicplasty (osteochondral autograft) in animal models. *J Pediatr Orthop* 24:427-33, 2004.

**Hunziker EB.** Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9:22-32, 2001.

**Hunziker EB.** Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-63, 2002.

**Ichinose S,** Yamagata K, Sekiya I, Muneta T, Tagami M. Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:561-570, 2005.

**Jakobsen RB,** Shahdadfar A, Reinholt FP, Brinchmann JE. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:1407-1416, 2010.

**Jiang Y,** Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzales XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49, 2002.

**Johnstone B**, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-72, 1998.

**Kaab MJ**, Gwynn IA, Notzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat* 193:23-34, 1998.

**Katayama R**, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology* 43:980-985, 2004.

**Kay MA**, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33–40, 2001.

**Kim M**, Erickson IE, Choudhury M, Pleshko N, Mauck RL. Transient exposure to TGF- $\beta$ 3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels. *J Mech Behav Biomed Mater* 11:92-101, 2012.

**Kisiday J**, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9996-10001, 2002.

**Kisiday JD**, Frisbie DD, McIlwraith CW, Grodzinsky AJ. Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines. *Tissue Eng Part A*. 15:2817-24, 2009.

**Knutsen G**, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O. A randomized trial comparing

autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at 5 years. *J Bone Joint Surg Am* 89:2105-2112, 2007.

**Kock L**, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* 347:613-27, 2012.

**Koga H**, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, Mark K von der, Sekiya I. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 25:689-696, 2007.

**Koga H**, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya, I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333:207-215, 2008.

**Korhonen RK**, Herzog W. Depth-dependant analysis of the role of collagen fibrils, fixed charges and fluid in the pericellular matrix of articular cartilage on chondrocyte mechanics. *J Biomech* 41:480-485, 2008.

**Krause DS**, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 4;105:369-377, 2001.

**Kuo CK**, Tuan RS. Tissue engineering with mesenchymal stem cells. *IEEE Eng Med Biol Mag* 22:51-56, 2003.

**LaPrade RF**, Botker JC. Donor-site morbidity after osteochondral autograft transfer procedures. *Arthroscopy* 20:69-73, 2004.

**Lavrentieva A**, Hatlapatka T, Neumann A, Weyand B, Kasper C. Potential for osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 129:73-88, 2013.

**Lee SH**, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:339-359, 2007.

**Lewus KE**, Nauman EA. In vitro characterization of a bone marrowstem cell-seeded collagen gel composite for soft tissue grafts: Effects of fiber number and serum concentration. *Tissue Eng* 11:1015–1022, 2005.

**Lodi D**, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 30:9, 2011.

**Lunstrum GP**, Keene DR, Weksler NB, Cho YJ, Cornwall M, Horton WA. Chondrocyte differentiation in a rat mesenchymal cell line. *J Histochem Cytochem* 47:1-6, 1999.

**Ma HL**, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 64:273-81, 2003.

**Madry H**, Cucchiaroni M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croat Med J* 52:245-61, 2011.

**Mainil-Varlet P**, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage* 9:6-15, 2001.

**Mandelbaum BR**, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB Jr., Erggelet C, Minas T, Peterson L. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 26:853-861, 1998.

**Marlovits S**, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 57:24-31, 2005.

**Marquass B**, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G, Josten C, Bader A. Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med* 39:1401-12, 2011.

**Mehlhorn AT**, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, Südkamp NP. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng* 12:1393-403, 2006.

**Messner K**, Gillquist J. Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomater* 14:513-521, 1993.

**Messner K**. Durability of artificial implants for repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle in rabbits. *Biomater* 15: 657-664, 1994.

**Minas T**. The role of cartilage repair techniques, including chondrocyte transplantation, in focal chondral knee damage. *Instr Course Lect* 48:629-643, 1999.

**Moojen DJ**, Saris DB, Auw Yang KG, Dhert WJ, Verbout AJ. The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. *Tissue Eng* 8:627-634, 2002.

**Moran ME**, Kim HK, Salter RB. Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal

grafts subjected to continuous passive motion. *J Bone Joint Surg Br* 74:659-667, 1992.

**Mouw JK**, Connelly JT, Wilson CG, Michael KE, Levenstone ME. Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells. *Stem Cells* 25:655-663, 2007.

**Muhonen V**, Narcisi R, Nystedt J, Korhonen M, van Osch GJ, Kiviranta I. Recombinant human type II collagen hydrogel provides a xeno-free 3D micro-environment for chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*, Epub, doi: 10.1002/term.1983, 2015.

**Nandi SK**, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 132:15-30, 2010.

**Nawata M**, Wakitani S, Nakaya H, Tanigami A, Seki T, Nakamura Y, Saito N, Sano K, Hidaka E, Takaoka K. Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 52:155-163, 2005.

**Nehrer S**, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 38:95-104, 1997.

**Nehrer S**, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomater* 19:2313-2328, 1998.

**Nimura A**, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells

with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 58:501-510, 2008.

**Nixon AJ**, Goodrich LR, Scimeca MS, Witte TH, Schnabel LV, Watts AE, Robbins PD. Gene therapy in musculoskeletal repair. *Ann N Y Acad Sci* 1117:310-327, 2007.

**Nöth U**, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 83:626-35, 2007.

**Ochi M**, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 25:172-179, 2001.

**O'Driscoll SW**, Salter RB. The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 66:1248-1257, 1984.

**O'Driscoll SW**, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 68:1017-1035, 1986.

**O'Driscoll SW**, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 70:595-606, 1988.

**O'Driscoll SW**, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng.* 7:313-320, 2001.

**Partridge KA**, Oreffo RO. Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies. *Tissue Eng* 10:295-307, 2004.

**Perrier E**, Ronzière MC, Bareille R, Pinzano A, Mallein-Gerin F, Freyria AM. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 33:2091-2101, 2011.

**Peterson L**, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two-to-nine-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374:212-234, 2000.

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

**Pineda S**, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat* 143:335-340, 1992.

**Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999.

**Poole AR**, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 391:26-33, 2001.

**Pridie KH.** A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* 41:618-619, 1959.

**Qi Y, Zhao T, Xu K, Dai T, Yan W.** The restoration of full-thickness cartilage defects with mesenchymal stem cells (MSCs) loaded and cross-linked bilayer collagen scaffolds on rabbit model. *Mol Biol Rep* 39:1231-1237, 2012.

**Raghunath J, Salacinsky HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM.** Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* 16:503-509, 2005.

**Rampersad S, Ruiz JC, Petit A, Lerouge S, Antoniou J, Wertheimer MR, Mwale F.** Stem cells, nitrogen-rich plasma-polymerized culture surfaces, and type X collagen suppression. *Tissue Eng Part A* 17:2551-2560, 2011.

**Reinholz GG, Lu L, Saris DBF, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW.** Animal models for cartilage reconstruction. *Biomater* 25:1511-1521, 2004.

**Ringe J, Kaps C, Burmester GB, Sittinger M.** Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 89:338-351, 2002.

**Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittinger M.** Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 307:321-327, 2002.

**Russlies M, Behrens P, Wunsch L, Gille J, Ehlers EM.** A cell-seeded biocomposite for cartilage repair. *Ann Anat* 184:317-323, 2002.

**Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND.** The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-

thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 62:1232-51, 1980.

**Salter RB.** The biologic concept of continuous passive motion of synovial joints. The first 18 years of basic research and its clinical application. *Clin Orthop* 242:12-25, 1989.

**Saris DB,** Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, Luyten FP; TIG/ACT/01/2000&EXT Study Group. Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am J Sports Med* 37:10-19, 2009.

**Schewe B,** Weise K. Aktueller Stand biologisch rekonstruktiver Verfahren des Gelenkknorpels. *Arthritis+Rheuma* 25:312-316, 2005.

**Schmitt B,** Ringe J, Häupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation* 71:567-577, 2003.

**Schneider U,** Reusch SJ, von der Mark K. Aktueller Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation. *Z Orthop* 137:386-392, 1999.

**Schneider U,** Gavenis K. Chondrocytes and collagen gels. In: Hendrich C, Nöth U und Eulert J. *Cartilage surgery and future perspectives*. Springer Verlag, Berlin, S. 157-163, 2003.

**Schneider U.** Tissue engineering von Gelenkknorpel. *Arthritis+Rheuma* 25:317-322, 2005.

**Schneider U**, Rackwitz L, Andereya S, Siebenlist S, Fensky F, Reichert J, Lör I, Barthel T, Rudert M, Nöth U. A prospective multicenter study on the outcome of type I collagen hydrogel-based autologous chondrocyte implantation (CaReS) for the repair of articular cartilage defects in the knee. *Am J Sports Med* 39:2558-65, 2011.

**Sekiya I**, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4397-4402, 2002.

**Sekiya I**, Muneta T, Horie M, Koga H. Arthroscopic transplantation of synovial stem cells improves clinical outcomes in knees with cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res* 473:2316-26, 2015.

**Shen B**, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DD. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng A* 15:1311-1320, 2009.

**Sittinger M**, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomater* 15:451-456, 1994.

**Sohn DH**, Lottman LM, Lum LY, Kim SG, Pedowitz RA, Coutts RD, Sah RL. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res* 394:254-262, 2002.

**Song L**, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytotherapy* 6:596-601, 2004.

**Steadman JR**, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects. *Operat Tech Orthop* 7:300-304, 1997.

**Steinert AF**, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* 39:97-113, 2008.

**Stevens MM**, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad Shastri V. FGF-2 enhances TGF-beta1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 22:1114-1119, 2004.

**Sundelacruz S**, Kaplan DL. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol* 20:646-655, 2009.

**Tagil M**, Aspenberg P. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res* 17:200-204, 1999.

**Temenoff JS**, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomater* 21:431-440, 2000.

**Thorpe SD**, Buckley CT, Vinardell T, O'Brian FJ, Campbell VA, Kelly DJ. Dynamic compression can inhibit chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377:458-462, 2008.

**Toh WS**, Liu H, Heng BC, Rufaihah AJ, Ye CP, Cao T. Combined effects of TGF $\beta$ 1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors* 23:313-321, 2005.

**Tögel F**, Westenfelder C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 236:3321-3331, 2007.

**Vacanti CA**, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 22:485-488, 1994.

**van Beuningen HM**, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 6:306-317, 1998.

**Vanwanseele B**, Lucchinetti E, Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 10:408-419, 2002.

**Vickers SM**, Gotterbarm T, Spector M. Cross-linking affects cellular condensation and chondrogenesis in type II collagen-GAG scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 28:1184-92, 2010.

**Wakitani S**, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 71:74-80, 1989.

**Wakitani S**, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan A, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-92, 1994.

**Wakitani S**, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4:429-44, 1998.

**Wakitani S**, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation

for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10:199-206, 2002.

**Wakitani S**, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant.* 13:595-600, 2004.

**Wakitani S**, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med.* 1:74-9, 2007.

**Wang CJ**, Chen CY, Tsung SM, Chen WJ, Huang HY. Cartilage repair by free periosteal grafts in the knees of pigs: a histologic study. *J Formos Med Assoc* 99:324-329, 2000.

**Wilson W**, Huyghe JM, van Donkelaar CC. Depth-dependant compressive equilibrium properties of articular cartilage explained by its composition. *Biomech Model Mechanobiol* 6:43-53, 2007.

**Yan H**, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 23:178-187, 2007.

**Yanai T**, Ishii T, Chang F, Ochiai N. Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 87:721-29, 2005.

**Yokoyama A**, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 322:1-10, 2005.

**Yoneno K**, Ohno S, Tanimoto K, Honda K, Tanaka N, Doi T, Kawata T, Tanaka E, Kapila S, Tanne K. Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res A* 75:733-41, 2005.

**Zeifang F**, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med* 38:924-933, 2010.

**Zscharnack M**, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, Josten C, Bader A, Marquass B. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med* 38:1857-69, 2010.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jochen Eulert, ehemaliger Ärztlicher Direktor der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg im König-Ludwig-Haus, danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Lehrstuhl durchführen zu können.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Nöth für die Überlassung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und Durchführung der Operationen.

Ganz herzlich möchte ich außerdem Herrn Dr. med. Lars Rackwitz, Herrn Dr. med. Florian Fensky und Herrn Dr. med. Johannes Reichert für die Unterstützung bei den Operationen und die dafür geopfert Zeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Osteologiezentrums unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Franz Jakob und des Labors für klinische Forschung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze für die Hilfe bei der Einarbeitung und Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. rer. nat. Andrea Heymer und Frau Dr. rer. nat. Meike Haddad-Weber.

Außerdem danke ich der Firma Arthro Kinetics in Esslingen für die Verarbeitung der Zellen und Bereitstellung der Kollagen Typ I Hydrogele.

Herrn PD Dr. med. Achim Battmann danke ich für die Durchführung der Histologie und Immunhistochemie sowie für die verblindete Auswertung.

Ein außerordentlicher Dank gilt allerdings meinen Eltern, für die Unterstützung während meines Studiums und die Motivation bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

# Curriculum Vitae

## Theresa Krätzig

**Derzeitige Tätigkeit:** Assistenzärztin

### Schulbildung:

1987 - 1991 Wilhelm-Busch-Grundschule, Göttingen  
1991 - 1993 Lutherschule, Göttingen (Orientierungsstufe)  
1993 - 2000 Max-Planck-Gymnasium, Göttingen  
Abschluss: Abitur

### Studium der Humanmedizin:

2000 - 2002 Philipps-Universität, Marburg  
2002 - 2007 Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
Abschluss: Staatsexamen / Approbation

### Berufliche Ausbildung:

08/2007 - 07/2008 Assistenzärztin Viszeral- und Gefäßchirurgie;  
Krankenhaus Neu-Bethlehem, Göttingen

08/2008 - 05/2012 Assistenzärztin; Zentrum für Orthopädische  
Chirurgie und Spinale Neurochirurgie  
Krankenhaus Tabea, Hamburg

05/2012 - 03/2013 Assistenzärztin; Klinik für Intensivmedizin,  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Seit 03/2013 Assistenzärztin; Klinik und Poliklinik für  
Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-  
Eppendorf

Theresa Krätzig

Hamburg, Mai 2016