

1. Einleitung

1.1 Biologie des Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein hochspezialisiertes und von seinem ultrastrukturellen Aufbau einzigartiges Gewebe, das die glatte und belastungsaufnehmende Oberfläche der artikulierenden Knochen in echten Gelenken überzieht. Zusammen mit unmittelbar den Gelenkbinnenraum begrenzenden Strukturen, der Synovialmembran und –flüssigkeit, sowie weiteren das Gelenk umgebenden Strukturen, der Gelenkkapsel und dem subchondralen Knochen, bildet der Gelenkknorpel eine funktionelle Einheit. Die auf diese funktionelle Einheit einwirkende Muskulatur und der Kapselbandapparat dienen nicht nur einer stabilen Gelenkführung und der mechanischen Protektion, sondern ermöglichen bei Bewegung und Belastung eine gleichmäßige Kraftübertragung und eine suffiziente Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen. Aufgrund seines ultrastrukturellen Aufbaus und seiner makromolekularen Komposition besitzt Gelenkknorpel stoßdämpfend-elastische Eigenschaften, ermöglicht somit eine optimale Kraftübertragung auf den subchondralen Knochen und gewährleistet zusammen mit der Synovialflüssigkeit ein nahezu friktionsloses Gleiten der artikulierenden Gelenkoberflächen bei Bewegung (Buckwalter, 2002).

Adulter hyaliner Gelenkknorpel ist eine anervale, alymphatische und avaskuläre Matrix, die von einer kleinen größtenteils postmitotischen in ihr verteilten Zellpopulation, den Chondrozyten, synthetisiert wird. Die Chondrozyten selbst stellen damit das aktive Element dar und sind für die lebenslange Homöostase des Gelenkknorpels verantwortlich (Muir, 1995). Während juveniler Gelenkknorpel noch zum Teil über Blutgefäße aus dem subchondralen Knochen versorgt wird, ist der ausgereifte Gelenkknorpel, nach Ausbildung der Verkalkungszone, von diesen abgeschnitten, so dass seine Ernährung ausschließlich durch Diffusion vom Gelenkspalt erfolgt (Metz, 2001).

Biochemisch besteht Gelenkknorpel aus Chondrozyten (1 - 10%) und Extrazellulärmatrix (EZM, 90%), welche sich auf supramolekularer Ebene in einen kollagenen und einen nicht kollagenen Anteil aufspalten lässt. Die EZM

besteht zum größten Teil aus Wasser, das in großer Menge durch hydrophile Proteoglykane gebunden wird (Tab. 1).

Der kollagene Anteil der EZM wird hauptsächlich aus einem Netzwerk von Kollagen II aber auch anderen Kollagenen, wie V, VI, IX und XI, gebildet (Bruckner et al., 1994; Burgeson und Nimni, 1992). Diese Kollagene bilden neben dem gebundenen Wasser den Hauptbestandteil der EZM, wobei Kollagen II mit über 90% das dominierende und knorpelspezifische Kollagen darstellt. Andere Kollagen-Typen, wie X, I und III, werden im Gelenkknorpel in der Regel nur bei pathologischen Prozessen in nennenswerten Mengen synthetisiert (Gebhard et al., 2003).

Bestandteile	Anteil in %
• Chondrozyten	1 - 10
• Wasser	70 - 80
• Kollagen	12 - 14
- Typ II	10 - 12
- Typ IX	ca. 1
- Typ XI	ca. 1
• Proteoglykane	7 - 9
• Mineralsubstanzen	< 4
• Matrixproteine	< 1

Tab. 1: Zusammensetzung des Gelenkknorpels (nach Metz, 2001).

Die nicht kollagene Komponente der EZM besteht größtenteils aus hochgradig sulfatierten Proteoglykanen, die im Verbund mit Hyaluronsäure und Link Protein große polyanionische, hydrophile Aggregate bilden. Proteoglykane bestehen zu 95% aus Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure und Keratansulfat, wobei das größte und am häufigsten vertretene Proteoglykan des Gelenkknorpels, mit mehr als 100 Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten, als Aggrekan bezeichnet wird (Carney und Muir, 1988).

Diese spezifische Zusammensetzung der EZM spiegelt sich in den mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels wieder, wobei das Kollagennetzwerk maßgeblich zur Dehnbarkeit beiträgt und so die viskoelastische Expansion der wasserbindenden Aggrekan-Komplexe verhindert, was dem Gelenkknorpel eine hohe Kompressionssteifigkeit verleiht (Maroudas, 1976; Athanasion et al., 1991). Unter Kompression zeigt sich der Knorpel verformbar, erlangt seine Elastizität aber umgehend wieder wenn freies Wasser

durch hydrophile Aggrecan-Aggregate in der EZM gebunden werden (Carney und Muir, 1988). Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels enthält noch eine große Anzahl anderer Komponenten, die zur Kohärenz der EZM und Regulation der Zellfunktion beitragen. Nicht aggregierende Proteoglykane, wie Decorin und Fibromodulin, sind vermutlich für die Fibrillogenese der Kollagene, Kollagen-Kollagen/-Proteoglykan Interaktionen und das Binden von Wachstumsfaktoren entscheidend. Andere Matrixproteine die in der EZM gefunden werden, einschließlich Fibronectin, cartilage matrix protein und cartilage oligomeric protein (COMP), sind an der Regulation der Genexpression und der Ausbildung eines chondrogenen Phänotyps in der Knorpelentstehung beteiligt (Roughley und Lee, 1994; Dourado et al., 1996).

Histomorphologisch und von seiner biochemischen Zusammensetzung lässt sich der Gelenkknorpel von der Gelenkoberfläche bis auf den subchondralen Knochen in 4 Zonen unterteilen (Abb. 1).

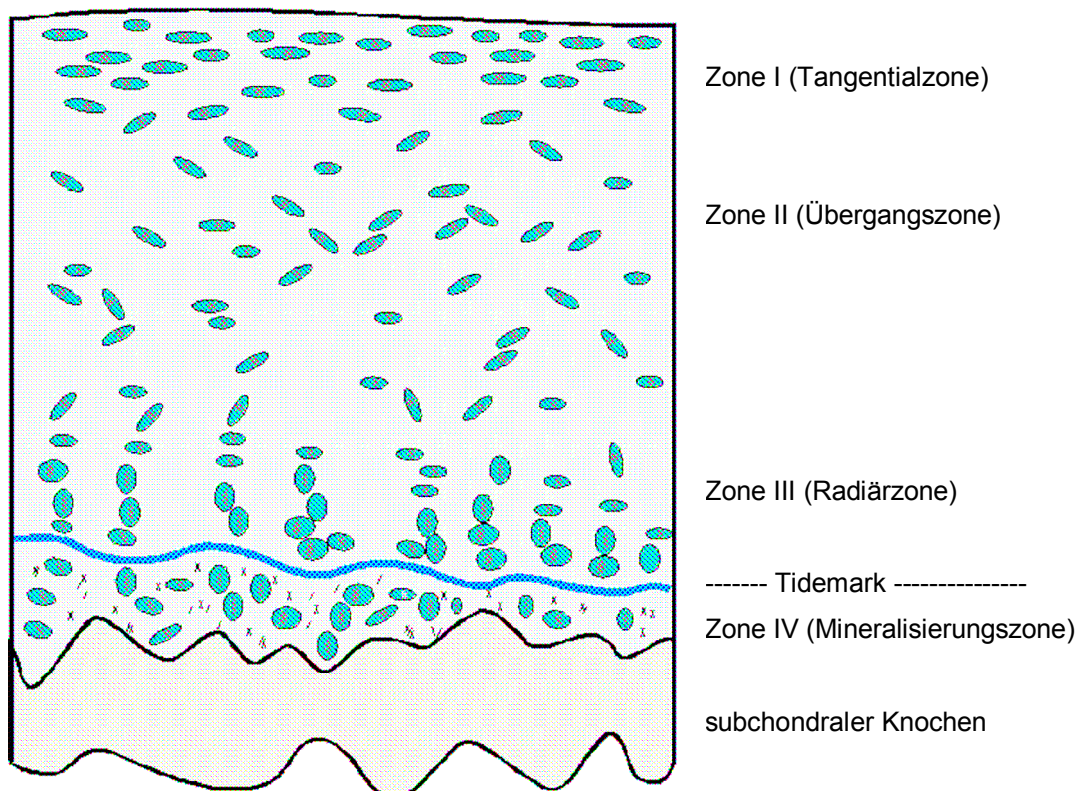


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zonen des hyalinen Gelenkknorpels (nach Rudert und Wirth, 1997).

In der relativ schmalen oberflächlichen Tangentialzone (I) sind die Chondrozyten flach und parallel zur Oberfläche angeordnet und folgen damit in etwa der trajektoriiellen Ausrichtung der Kollagenfasern. Der Zellgehalt ist beim Erwachsenen niedrig, ebenfalls der Proteoglykangehalt wobei der Anteil an Kollagenfibrillen hoch ist. Die Knorpeloberfläche wird von einer sehr dünnen azellulären Schicht aus Kollagenfibrillen (Lamina splendens) zum Gelenkraum abgeschlossen.

In der Übergangzone (II) finden sich eher rundliche Chondrozyten ohne spezielle Ausrichtung im sich überschneidenden Kollagenfasengerüst. Der Proteoglykangehalt ist höher als in den oberflächlichen Anteilen.

Die Radiärzone (III) ist die breiteste hyaline Knorpelschicht. Hier sind die Zellen säulenartig und parallel zu den radiär zur Gelenkfläche stehenden Kollagenfasern angeordnet. Es findet sich ein hoher Proteoglykangehalt. Vor dem Übergang zur Mineralisierungszone (IV) befindet sich die „Tidemark“, die einen Übergang zu der kalzifizierenden Zone des Gelenkknorpels markiert.

In der Mineralisierungszone (IV) finden sich in die EZM eingelagerte Kalziumkristalle und blasig aufgetriebene Chondrozytenester mit Hinweisen auf apoptotische Vorgänge im Sinne degenerativer Prozesse (Aigner et al. 2001). Diese Zone stellt den Übergang zwischen visko-elastischem Gelenkknorpel und steifem subchondralen Knochen dar. Die Chondrozyten in der Übergangs- und Radiärzone zeigen die höchste metabolische Aktivität und tragen somit zu großen Teilen zur Gelenkknorpelhomöostase bei (Aydelotte und Kuettner, 1988; Aydelotte et al., 1988).

1.2 Gelenkknorpeldefekte und Gelenkknorpelheilung

Die normale schmerzfreie Bewegung eines Gelenkes hängt von den speziellen Gewebeeigenschaften des Gelenkknorpels ab, der die kraftübertragenden Oberflächen von Synovialgelenken bedeckt (Buckwalter und Mankin, 1997). Verletzung oder Degeneration dieses einzigartigen Gewebes führen zu Mobilitätseinschränkung, rezidivierendem Belastungsschmerz und in schweren Fällen zum Funktionsverlust des Kniegelenkes (Buckwalter et al., 2000). Die

pathophysiologischen Mechanismen, Prävalenz und auslösenden Faktoren für Gelenkknorpelschäden sind bis heute bei weitem nicht vollständig bekannt (Buckwalter 1992 und 1995; Buckwalter and Mankin, 1997). Anfänglich oftmals fehlende Symptomatik von chondralen oder osteochondralen Verletzungen und limitierte Diagnoseverfahren für deren frühzeitige Erkennung machen es nahezu unmöglich eine akkurate Beziehung von Inzidenz und der Entwicklung konsekutiv fortschreitender Degeneration herzustellen (Buckwalter und Lane, 1997). Studien bei denen nach Trauma eine Kniearthroskopie zum Zwecke der Knorpeldefektdokumentation durchgeführt wurde deuten daraufhin das Knorpelschädigungen in Frühstadien oftmals makroskopisch nicht erkennbar sind (Noyes et al., 1980; Noyes und Stabler, 1989).

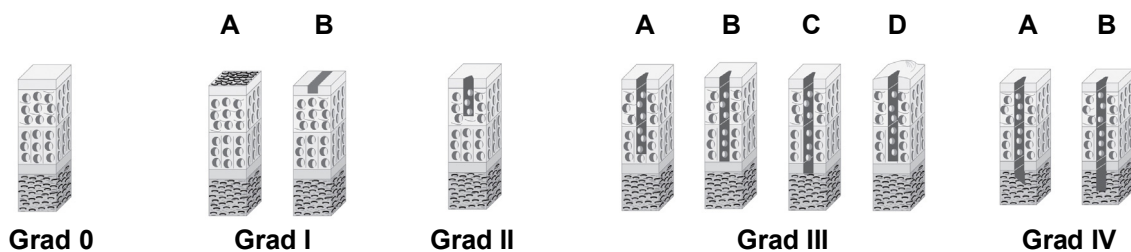
Um die Mechanismen die zu einer Knorpelschädigung führen zu verstehen benötigt man das Verständnis wie die Kraftübertragung und die Art der Krafteinwirkung den Knorpel beanspruchen. Langsam und schnell einwirkende Kräfte unterscheiden sich fundamental in ihren Effekten auf die Gelenkoberfläche. Die EZM des Gelenkknorpels besteht hauptsächlich aus Wasser und einem makromolekularen Netzwerk, das vorwiegend aus Kollagen II und großen aggregierten Proteoglykanen geformt wird. Kollagene verleihen dem Gelenkknorpel seine Form und Dehnbarkeit, die Interaktionen von Proteoglykanen mit Wassermolekülen garantieren die elasto-kompressiven Eigenschaften und vermutlich die Langlebigkeit des Gewebes. Krafteinwirkung auf die Gelenkoberfläche verursacht Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb der EZM des Gelenkknorpels, was die Belastung dämpft, auf die gesamte Gelenkoberfläche verteilt und so an den subchondralen Knochen weiterleitet (Mow und Rosenwasser, 1988). Wenn dieser Prozess langsam abläuft kann es zu Flüssigkeitsverschiebungen kommen, der Knorpel verformt sich entsprechend und verringert die Scherkräfte auf das makromolekulare Netzwerk. Bei schneller Krafteinwirkung, Stoß-/Torsionsbelastung ist dies nicht der Fall und ein größerer Teil der Kraft wird aufgrund fehlender Flüssigkeitsbewegungen innerhalb der EZM auf das makromolekulare Netzwerk übertragen. Übersteigt die Belastung die cohesiven Kräfte des Netzwerkes zerreißt dieses und es kommt in der Folge zu einem Verlust an Proteoglykanen

und ggf. einer Zellschädigung/-untergang (Donohue et al., 1983; Loening et al., 2000; Thompson et al., 1991; Zang et al., 1999). Benachbarte Chondrozyten sind bis zu einem gewissen Grad in der Lage Veränderungen in der Zusammensetzung der EZM zu erkennen, durch gesteigerte Synthese diese auszugleichen und den Schaden zu begrenzen (Martin und Buckwalter, 2000). Übersteigt das Ausmaß der Schädigung die intrinsische Reparaturkapazität der ortständigen Zellen resultiert ein Verlust an Proteoglykanen und Kollagen II. Die konsekutive Kompromittierung der mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels führt nun zu einer veränderten Biomechanik in diesem Areal und weitere Schädigungen mit makroskopischen Fibrillationen/Rissen können bei erneuten Traumen die Folge sein und zu ausgeprägten degenerativen Veränderungen führen. Diese oberflächlichen Knorpelverletzungen können jedoch, abhängig von ihrer Größe, unverändert bestehen und müssen nicht zwangsläufig zu degenerativen Gelenkveränderungen führen (Mankin, 1982; Hayes et al., 2001).

Gelenkknorpelverletzungen unterteilt man in chondrale und osteochondrale Verletzungen, letztere durchbrechen die subchondrale Platte. Als Klassifizierung des Defektausmaßes hat sich die Einteilung der International Cartilage Repair Society (ICRS; Abb. 2) durchgesetzt, die sich maßgeblich an der Einteilung von Outerbridge (1961) orientiert.

Osteochondrale Verletzungen, welche die Tidemark durchbrechen, werden im Gegensatz zu den rein chondralen Verletzungen durch Eröffnung der Knochenmarkräume mit Granulationsgewebe, dem sog. „fibrin-clot“, ausgefüllt. Innerhalb von 2 bis 7 Tagen kommt es zu einer Einwanderung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, welche sich im Anschluss zeitweise in knorpel- bzw. knochenbildende Zellen umwandeln können. Dadurch wird der Defekt innerhalb von 6 bis 8 Wochen mit einem gelenkknorpelähnlichem Reparaturgewebe aufgefüllt. Im weiteren Verlauf kommt es allerdings zur Bildung von knorpelfremden Kollagenen, wie Kollagen I, III und X, so dass nur ein minderwertiger, faseriger Regeneratknorpel mit deutlich schlechteren mechanischen Eigenschaften resultiert (Shapiro et al.,

1993), und eine langfristige Belastungsstabilität nicht gegeben ist (Jackson et al., 2001).



Defektgrad	Defektausmaß
0	Normaler gesunder Knorpel
I	Erweichung der intakten Oberfläche (A) oder oberflächliche Fibrillationen/Risse (B).
II	Läsionen erreichen bis zu < 50% der Knorpeltiefe.
III	Dieser Grad beinhaltet Knorpeldefekte, die > 50% der Knorpeltiefe (A), die kalzifizierte Schicht (B) und den subchondralen Knochen, erreichen, aber nicht durch diesen hindurch reichen (C, D).
IV	Läsionen durchbrechen die subchondrale Lamelle (A) und/oder reichen bis in den subchondralen Knochen (B).

Abb. 2: Einteilung der Knorpeldefekte nach der International Cartilage Repair Society (www.cartilage.org).

1.3 Strategien der Gelenkknorpelrekonstruktion

Bereits bevor Hunter 1743 feststellte, das „from Hippocrates to the present age, ulcerated cartilage is a troublesome thing and once destroyed, is not repaired“, wurden unzählige Versuche unternommen, die Pathophysiologie von Gelenkknorpeldefekten zu und seiner Defektheilung zu analysieren und damit die Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung zu verbessern (Hunter, 1743).

Heute richtet sich die Therapie von Gelenkknorpeldefekten unter anderem nach dem Grad, der Größe und der Lokalisation des Defektes (Behrens et al., 2004). Neben den, sicherlich nicht im Vordergrund stehenden, konservativen Behandlungsversuchen, wie der lokalen Behandlung mit Zytokinen (Hickey et

al., 2003) oder Hyaluronsäure-Derivaten (Williams et al., 2003), gibt es heute eine Vielzahl verschiedener operativer Therapiemöglichkeiten.

Lavage (Gelenkspülung), Knorpelglättung und Debridement stellen Therapieverfahren dar, die hauptsächlich auf die Entfernung pro-inflammatorisch wirkender Substanzen und erkrankten Knorpelgewebes zielen. Es konnte jedoch in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass diese Verfahren in keinsten Weise zu einer reaktiven bzw. reparativen Antwort des verbleibenden Knorpels führen. Vielmehr kommt es durch die mechanische Manipulation zu einer fortschreitenden Degeneration mit Zelluntergang besonders im Bereich der Defektränder und einem damit verbundenem substantiellen Verlust an Gelenkknorpelmatrix (Kim et al., 1991; Tew et al., 2000; Mitchell und Shepard, 1987; Hunziker und Quinn, 2002). Dementsprechend ist die wissenschaftliche Datenlage bezüglich klinischer Ergebnisse extrem variabel und reicht von guten (bei > 65% der Patienten mit Beschwerdeverbesserung) postoperativen Resultaten (Sprague, 1981; Linschoten und Johnson, 1997) bis zu extrem schlechten (< 25% Beschwerdeverbesserung) postoperativen Ergebnissen (McGinley et al., 1999; Kruger et al., 2000).

Abrasionsarthroplastik (Magnuson, 1941; Rockett und Wageck, 1997), Pridie-Drilling (Pridie, 1959) und Mikrofrakturierung (Steadman et al., 1997 und 1999) beinhalten alle ein sorgfältiges Debridement mit Entfernung des degenerativ veränderten Knorpels. Des Weiteren kommt es durch diese Techniken zu einer Eröffnung der subchondralen Lamelle und der oberflächlichen Anteile des darunter liegenden Knochens. Die Techniken unterscheiden sich nur in der Art der Eröffnung des subchondralen Knochens, während es bei der Abrasionsarthroplastik zu einer großflächigen Abtragung kommt, wird bei der Pridie-Bohrung der subchondrale Knochen aufgebohrt, dieses geschieht bei der Mikrofrakturierung mit einer Ahle, was zu einem Erhalt der biomechanischen Eigenschaften der subchondralen Lamelle beitragen soll (Steadman et al., 1999). Durch Eröffnung des Knochenmarkraumes kommt es bei allen 3 Techniken zu einer Einblutung und damit Einwanderung von zellulären Bestandteilen des Knochenmarks in den Defekt, dort bildet sich anschließend

ein Blutkoagel, der sog. „fibrin-clot“, der ein Gemisch unterschiedlicher Vorläuferzellen, Wachstumsfaktoren und anderer bioaktiver Substanzen enthält. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieser „fibrin-clot“ organisiert und ein knorpelartiges Ersatzgewebe bildet, welches Komponenten hyalinen, aber auch fibrösen Knorpels enthält (Furukawa et al., 1980). Allerdings ist die Ausbildung des faserigen Regeneratknorpels sehr variabel und zeigt deutlich schlechtere mechanische Eigenschaften als nativer Gelenkknorpel (Shapiro et al., 1993; Mitchell und Shepard, 1987). Es konnten mit diesen Techniken jedoch kurzfristig deutlich bessere postoperative Ergebnisse erzielt werden als durch alleiniges Debridement (Schmidt und Hasse, 1989). Langzeitstudien zeigen allerdings oftmals nur teilweise zufrieden stellende Ergebnisse (Kim et al., 1991; Johnson, 1986).

Die Ergebnisse der knochenmarkstimulierenden Verfahren werden sehr kontrovers diskutiert, führen jedoch, besonders im Falle der Mikrofrakturierung, bei kleinen Defekten und einem ausgewählten Patientengut zu guten Langzeitergebnissen (Steadman et al., 2003; Sledge, 2001).

Andere Strategien gehen mit einer autologen Gewebe- oder Zelltransplantation einher. Die autologe osteochondrale Transplantation wurde erstmals von Wagner im Jahre 1972 beschrieben (Wagner, 1972). Hierbei werden Knorpel-Knochen-Zylinder unterschiedlicher Größe aus gering belasteten Knorpelzonen des Kniegelenkes entnommen um Defekte in den Belastungszonen aufzufüllen. Das Verfahren wurde von Hangody zum Osteochondralen Autologen Transfer System (OATS) oder auch Mosaikplastik weiterentwickelt (Hangody und Karpati, 1994). Bei dieser Technik gibt es, neben der limitierten Verfügbarkeit der Zylinder, das Problem der unterschiedlichen Knorpeldicke und Inkongruenz der Oberfläche an der Entnahme- und Implantationsstelle, sowie eine relativ häufig auftretende „donor-site morbidity“ (postoperative Probleme an der Entnahmestelle).

Die Möglichkeit der in vitro Kultivierung und Vermehrung von Chondrozyten nach enzymatischer Herauslösung aus dem nativen Knorpel ist bereits seit Anfang der sechziger Jahre bekannt (Manning und Bonner, 1967).

Versuche zur Behandlung von Knorpeldefekten mit in vitro expandierten und anschließend implantierten autologen Chondrozyten wurden erstmals von Peterson am Kaninchen durchgeführt (Peterson et al., 1984). Durch Weiterentwicklungen dieser Methode konnte durch die gleiche Arbeitsgruppe 1994 erstmals die klinische Anwendung der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) zur Behandlung traumatischer Knorpeldefekte beim Menschen beschrieben werden (Brittberg et al., 1994) und stellt somit das erste zellbasierte Verfahren zur Gelenkknorpelrekonstruktion dar.

Bei dieser, heute als „klassisches Verfahren“ bezeichneten Technik, wird dem Patienten arthroskopisch eine etwa 2 x 2 mm große Knorpelbiopsie aus nicht belastungstragenden Anteilen des Kniegelenkes entnommen. Aus dem Knorpelgewebe werden im Labor die Chondrozyten durch enzymatischen Verdau der umgebenden Knorpelmatrix isoliert, anschließend in einem speziellen Nährmedium amplifiziert und in einem zweiten offenen Eingriff nach ca. 3 bis 5 Wochen als Zellsuspension unter einen über den Knorpeldefekt genähten Periostlappen injiziert. Der Periostlappen wird von ventralen Anteilen des Tibiakopfes gehoben, mit resorbierbarem Nahtmaterial über den Defekt genäht und vor Injektion der Zellsuspension mit Fibrinkleber abgedichtet. In einer Verlaufsstudie über zehn Jahre zeigten sich in bis zu 90% der Fälle gute bis sehr gute postoperative Ergebnisse (Peterson et al., 2000). Allerdings gibt es auch bei dieser Methode Nachteile die zu beachten sind. Die Methode ist aufgrund der Notwendigkeit des Periostlappens zeitaufwendig, technisch anspruchsvoll und nur zur Anwendung bei femuralen, trochleären oder retropatellaren Defekten bis zu einer Größe von max. 10 cm² geeignet. Während der in vitro Expandierung in einer Monolayer-Kultur kommt es in Abhängigkeit der Dauer und des Alters des Patienten zu einer progredienten Dedifferenzierung der Chondrozyten und damit zum Verlust der knorpelspezifischen Eigenschaften (Schnabel et al., 2002). Die am häufigsten auftretende postoperative Komplikation ist eine Hypertrophie des Periostlappens, die zu schmerzhafter Bewegungseinschränkung führen kann und Folgeeingriffe bedingt (Peterson et al., 2000).

Diese Problematik führte zu entscheidenden Weiterentwicklungen, so dass heute matrixbasierte Verfahren die aktuelle Generation der ACT bilden. Dabei werden die isolierten Chondrozyten nicht wie bei der klassischen Methode in einer Monolayer-Kultur expandiert sondern direkt auf bzw. in das Biomaterial gegeben. Die Kultivierung der Chondrozyten in einer dreidimensionalen Trägersubstanz verringert die Dedifferenzierung der Zellen. Zusätzlich garantiert der Zellträger nach Implantation den Verbleib der Zellen im Defekt und macht die Verwendung eines Periostlappen, sowie die damit verbundenen Nahtfixierung, überflüssig (Marlovits et al., 2004). Von entscheidender Bedeutung bei dieser sog. Matrix-gekoppelten ACT ist die Wahl des Trägermaterials. Verschiedene Trägersubstanzen wie z.B. Kollagen-I/III-Membranen, Hyaluronsäure-Vliese oder Kollagengele sind derzeit in klinischer Anwendung. Die Anforderungen die an ein Biomaterial im Allgemeinen und Speziellen bei der Verwendung zur matrixbasierten ACT gestellt werden müssen sind ausführlich von Hunziker (1999 und 2002) beschrieben worden (Tab. 2)

<u>Zellträger Eigenschaften</u>	<u>Biologische Basis</u>
Porosität	Zellmigration
Karrierefunktion	Speicherfunktion und kontrollierte Freisetzung von Signalsubstanzen/-moleküle
Adhäsion	Zellarretierung
Biodegradibilität	physiologisches „remodeling“
Volumenstabilität	Kontakt zu nativem Gewebe, Integration
Biokompatibilität	Vermeidung von körpereigenen Abwehrreaktionen
Bonding	Integration und Cohesion des Scaffolds
interne Kohäsionskraft	Strukturelle Integrität
Elastizität	Physiologische dynamische Deformation
strukturelle Anisotropie	physiologische Entwicklung des Regenerats

Tab. 2: Anforderungen der Eigenschaften von Biomaterialien zur Gewährleistung optimaler Bedingungen der Knorpelregeneration bei der Anwendung im Tissue Engineering (nach Hunziker, 1999).

1.4 Mesenchymale Stammzellen

Stammzellpopulationen lassen sich in zahlreichen adulten Geweben finden und normalerweise reflektiert ihr Differenzierungspotenzial die Spezialisierung der residualen Zellpopulation. Diese Stammzellpopulationen spiegeln ein Reservoir von Reparaturzellen wieder, die in der Folge von Verletzungen, Krankheit oder Alterung mobilisiert werden und migrieren können um in Kooperation mit ortsständigen Zellen und lokalen Wachstumsfaktor-Stimuli die Gewebeschädigung zu beheben. Adulte Stammzellen besitzen die einzigartige Eigenschaft über lange Zeit identische Kopien ihrer selbst erstellen zu können, die Tochterzellen wie auch die Stammzelle selbst können unter bestimmten Umständen in eine Effektorzelle differenzieren (Loeffler und Potten, 1997).

Da diese Effektorzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben und sich nicht selbst erneuern können, findet die Zellerneuerung aus diesem Pool von permanent vorhandenen Stammzellen statt, aus denen zunächst Vorläuferzellen und später die differenzierten Effektorzellen hervorgehen.

Bei humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) handelt es sich um Zellen, die in unterschiedliche mesenchymale Gewebe, wie z.B. Knochen (Jaiswal et al., 1997), Knorpel (Johnstone et al., 1998), Sehnen, Bänder, Muskeln (Wakitani et al., 1995), sowie Fett und Haut differenzieren können (Pittenger et al., 1999) (Abb. 3).

Mesenchymale Stammzellpopulationen konnten mit verschiedenen Techniken aus unterschiedlichsten mesenchymalen Geweben isoliert werden, wie z.B. Knochenmark (Pittenger et al., 1999), Periost (Nakahara et al., 1990), trabekulären Knochen (Nöth et al., 2002a), Fettgewebe (Zuk et al., 2001), Muskelgewebe (Jankowski et al., 2002), Haut und der Synovialmembran (De Bari et al., 2001). Für alle diese Zelltypen wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, sich selbst zu replizieren und in unterschiedliche Gewebe mesenchymalen Ursprungs differenzieren können. Neuere Daten zeigen allerdings das sich mesenchymale Stammzellen unter speziellen Bedingungen auch in nicht mesenchymale Zelltypen, wie neuroektodermale oder endodermale, differenzieren lassen und damit vermutlich eine pluripotentes Verhalten mit

hoher Plastizität aufweisen (Jiang et al., 2002; Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000). Humanes Knochenmark stellt die am besten erforschte mesenchymale Stammzellquelle dar und ist bezüglich einer klinischen Nutzung die wohl praktikabelste Quelle (Baksh et al., 2004).

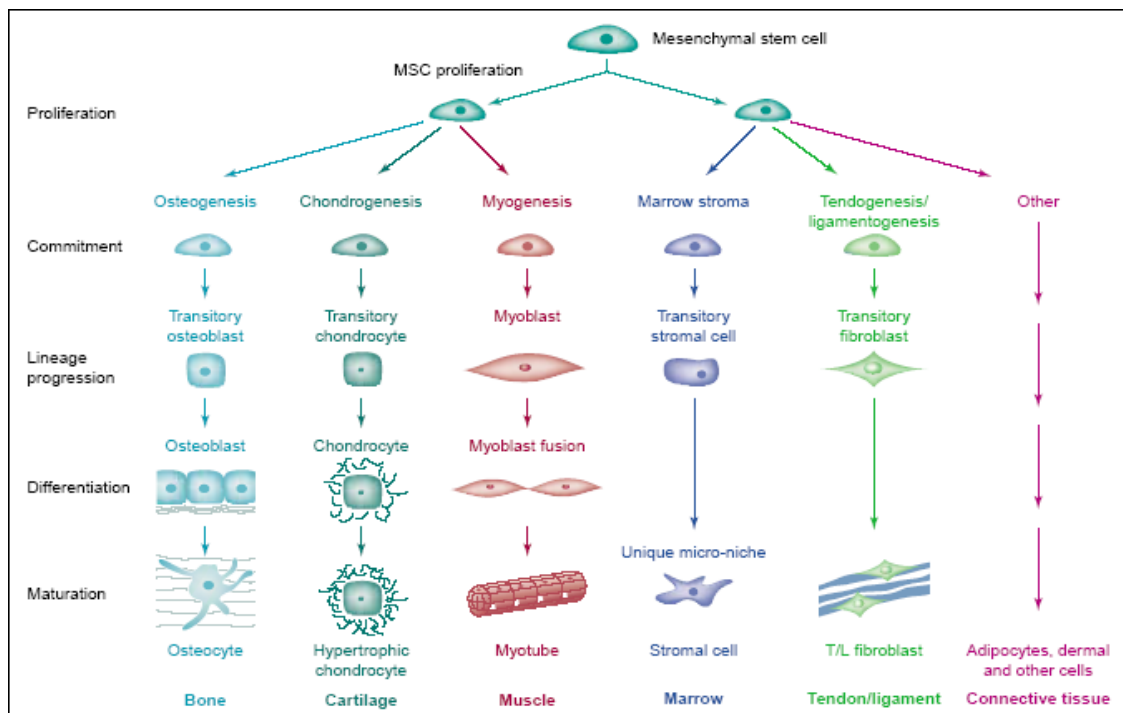


Abb. 3: Differenzierungswege der mesenchymalen Stammzelle bis zur differenzierten Effektorzelle. Auftragung von links nach rechts mit abnehmender wissenschaftlicher Datenlage der einzelnen Differenzierungswege (aus Caplan et al., 2001).

1.5 Chondrogene Differenzierung

Als chondrogene Differenzierung wird die zeittabhängige Änderung der morphologischen, molekularbiologischen/-chemischen und synthetischen Zelleigenschaften mesenchymaler Stammzellen von einem undifferenzierten in einen differenzierten chondrozytenähnlichen Zelltyp verstanden.

Während der embryonalen Gelenkknorpelentwicklung durchlaufen multipotente MSZ einen komplexen Prozess der Zelldifferenzierung, in dem über Chondroprogenitorzellen letztendlich Chondrozyten entstehen. Dieser

Entwicklungsschritt erfordert eine orchestrale Abstimmung verschiedenster Zell-Zell/-Matrix Interaktionen, Stimulation durch Wachstumsfaktoren und mechanische Einflüsse (Shum et al., 2003; Tuan, 2004). In vitro benötigen MSZ ebenfalls einige dieser Bedingungen und Faktoren um einen definierten chondrogenen Differenzierungsprozess zu durchlaufen.

Bei der Kultivierung von primären Chondrozyten in einer zweidimensionalen Monolayer-Kultur kommt es zu einer zeitabhängigen Dedifferenzierung der Zellen in einen fibroblastenartigen Zelltyp und dem Verlust der Fähigkeit Kollagen II und Aggrekan, also knorpelspezifische Matrix, zu synthetisieren (van der Mark et al., 1977). Diese Dedifferenzierung kann durch Kultivierung der Chondrozyten in einem Pellet-Zellkultursystem verhindert werden (Holtzer et al., 1960; Manning und Bonner, 1967). Man nimmt an, dass dieses dreidimensionale Kultivierungssystem die Ausbildung von Zell-Zellkontakten und Interaktionen mit der sich bildenden EZM erlaubt und so einige der notwendigen Bedingungen für den Erhalt eines stabilen Phänotyps gewährleistet, wie sie auch in der Embryogenese vorhanden sind (Fell, 1925).

Für die chondrogene Differenzierung humaner MSZ sind gerade die Prinzipien einer dreidimensionalen Kultur unabdingbar und wurden von Johnstone et al. als so genannte „high-density“ Pellet Zellkulturen verwendet (Johnstone et al., 1998). Hierbei wird die Anzahl der Interzellularkontakte gefördert und die zur chondrogenen Differenzierung notwendige kritische Zelldichte erreicht.

Für eine definierte Chondrogenese in vitro ist allerdings nicht nur das dreidimensionale Zellkultursystem ausschlaggebend, es werden auch noch andere Faktoren benötigt um eine gezielte Zelldifferenzierung zu erreichen. So wird ein chemisch definiertes, serumfreies Medium mit bestimmten bioaktiven Zusätzen benötigt, die bei der Induktion und Progression der Chondrogenese eine entscheidende Rolle spielen. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen das Wachstumsfaktoren, besonders Mitglieder der TGF- β Superfamilie, eine entscheidende Rolle spielen. Im Speziellen für TGF- β 1 (Barry et al., 2001), TGF- β 2, TGF- β 3 (Mackay et al., 1998), sowie für BMP-2 und BMP-6 (Sekiya et al., 2002) konnte der Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von MSZ gezeigt werden. Weitere chondrogen wirkende Faktoren die einzeln oder in

Kombination essentielle Bedeutung für die Differenzierung haben sind Dexamethason, Insulin, Ascorbat-2-Phosphat und ITS plus (Johnstone et al., 1998).

Neben einem chemisch definierten, serumfreien Medium und der dreidimensionalen Zellkonfiguration gibt es andere externe Stimulatoren einer chondrogenen Differenzierung. So konnte in einer Pelletzellkultur mit MSZ gezeigt werden, dass es durch die Einwirkung von intermittierendem hydrostatischen Druck allein, oder in Kombination mit erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck zu einer gesteigerten Expression chondrogener Markergene und folglich zur Deposition knorpelspezifischer EZM kommt (Domm et al., 2000). Ebenfalls konnten Angele et al. (2003) unter zyklisch hydrostatischem Druck im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Markergenexpression feststellen, so dass man eine mechano-biologische Komponente der Chondrogenese vermuten muss.

Als Indikatoren zur Identifizierung, Beurteilung und Quantifizierung einer chondrogenen Zelldifferenzierung können sowohl molekularbiologische als auch immun-/histologische Verfahren dienen. Immun-/histochemisch kann normalerweise nach durchlaufener Chondrogenese eine proteoglykan- und kollagenreiche EZM nachgewiesen werden, insbesondere der Nachweis von gelenkknorpelspezifischem Kollagen II sowie weiterer chondrozytenspezifischer Kollagene ist entscheidend (Srinivas et al., 1993; Bruckner und van der Rest, 1994). Der Nachweis einer Kombination verschiedener Kollagentypen, wie Kollagen II, IX und XI, ist spezifisch für hyalinen Gelenkknorpel. Nach Induktion der chondrogenen Differenzierung kommt es in den Pellets zu einer zeitlich definierten Expression entsprechender Markergene die mittels RT-PCR nachgewiesen werden können (Barry et al., 2001). Der Autor definiert drei separate Stadien der chondrogenen Differenzierung über einen Zeitraum von 21 Tagen, wobei es in der frühen Phase (1. bis 6. Tag) zu einer Expression von Sox-9, Fibromodulin und COMP kommt. Dieser folgt eine kurze Zwischenphase (6. bis 8. Tag) in der sich eine Expression von Chondroadherin, Versican Core Protein und den Leucin-reichen Proteoglykanen Decorin und Biglykan zeigt. In der späten Phase (8. bis 21. Tag) konnten weitere

knorpelspezifische Marker, wie Kollagen II und Aggrekan, nachgewiesen werden, die für eine adulte extrazelluläre Knorpelmatrix typisch sind. Allerdings kam es im Verlauf ebenfalls zum Auftreten von Kollagen X. Der Nachweis dieses Markers ist assoziiert mit hypertrophem Knorpel, der die terminale Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumsfuge anzeigt und ebenfalls in der kalzifizierenden Zone von adultem Gelenkknorpel nachweisbar ist.

1.6 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein bereits Ende der achtziger Jahre erarbeitetes und von Langer und Vacanti (1993) detailliert beschriebenes interdisziplinäres Forschungskonzept, das die Prinzipien und Methoden der Ingenieurwissenschaften, Molekular-/Zellbiologischen Fächer und der interventionellen Medizin zusammenführt um Strategien und Möglichkeiten zu erforschen in vitro oder in vivo Geweberegenerate herzustellen, um mit diesen durch Trauma oder Erkrankung geschädigtes körpereigenes Gewebe zu ersetzen und so eine adäquate Funktionalität dieser Struktur wieder herzustellen, zu erhalten oder zu verbessern.

Bereits zu Anfang der achtziger Jahre wurden zellbesiedelte Kollagenmembranen von zwei Forschergruppen als Hauttransplantate vorgestellt (Bell et al., 1981; Burke et al., 1981). Im Verlauf konnten durch Weiterentwicklungen und Neuentdeckungen im Bereich der Materialwissenschaften, der Zellbiologie und der Medizin immer neuere Konzepte zur Geweberekonstruktion erarbeitet werden. Heutzutage hat sich das Tissue Engineering zu einer weitgehend selbstständigen Disziplin entwickelt, die sich mit der Rekonstruktion nahezu aller Gewebe des menschlichen Körpers befasst (Fuchs et al., 2001).

Schädigungen des muskuloskelettalen Systems durch Trauma, degenerative Veränderungen oder andere Erkrankungen führen in unserer Gesellschaft häufig zu einer schwerwiegenden Einschränkung der Lebensqualität und Erwerbsfähigkeit und damit folglich zu einer immensen Belastung des

Gesundheitswesens und der sozialen Sicherungssysteme. Da es für viele diese Erkrankungen bisher keine Therapiemöglichkeiten gibt, die zu einer Restitutio ad integrum führen, bietet das Tissue Engineering ein großes therapeutisches Potential für den Ersatz oder die Regeneration von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskelettalen Systems (Marler et al., 1998; Laurencin et al., 1999; Huard et al., 2003).

In den Arbeiten vergangener Jahren kristallisierte sich eine Trias von Faktoren heraus die nahezu jedes Tissue Engineering Verfahren charakterisiert und beeinflusst. Dieses Prinzip basiert, je nach dem zu rekonstruierendem Gewebetyp, auf dem Einsatz unterschiedlicher

1. **Trägermaterialien** (Scaffolds),
2. **Zellen**, die das zu regenerierende Gewebe ersetzen sollen und
3. **Gewebespezifischer Wachstumsfaktoren** oder anderer (z. B. mechanischer) Stimuli (Langer und Vacanti, 1993; Vacanti und Langer, 1999).

Die heute im klinischen oder experimentellen Einsatz befindlichen Scaffolds lassen sich in organische und synthetische Materialien einteilen. Wobei organisch basierte Materialien, wie Kollagen, Fibrin oder Alginat den Vorteil einer optimalen Biokompatibilität und Biodegradibilität bieten. Synthetische Scaffolds wie z. B. Polyglykolsäure, Polymilchsäure oder Polycaprolacton sind hingegen formstabiler, bieten eine hohe Primärstabilität und sind in der Ausbildung ihrer Mikro- bzw. Makrostruktur besser steuerbar (Vacanti et al., 1999). Als grundlegendes Prinzip muss die Porosität allerdings durch jedes Zellträgermaterial gewährleistet sein um die nutritive Versorgung, die Migration der Zellen und eine komplette Besiedelung des Scaffold zu ermöglichen. (Laurencin und Langer, 1999).

Die Verwendung primärer gewebespezifischer autologer Zellen hat sich bereits in der Klinik bewährt, wie z. B. bei der matrixbasierten ACT und bei dem Einsatz von mit Keratinozyten besiedelter Kollagenmembranen zur Hautdefektdeckung.

Die Verwendung von autologen MSZ stellt einen neuen Erfolg versprechenden Ansatz im Bereich der Geweberekonstruktion dar. Mesenchymale Stammzellen konnten aus einer Vielzahl von Geweben isoliert und kultiviert werden (Tuan et al., 2003). Als multipotente Vorläuferzellen besitzen sie die Eigenschaft unter adäquaten Bedingungen in eine Vielzahl von Geweben mesenchymalen Ursprungs, wie Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen, Muskel und Fett zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Zusätzlich deuten neuere Untersuchungen am Tiermodell darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen bei allogener Transplantation keine Abstoßungsreaktion auslösen und immunsuppressive Eigenschaften besitzen (Caplan et al., 2001; Djouad et al. 2003).

Die gewebespezifische Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, sowie die charakteristische Synthetisierung extrazellulärer Matrix sind für die Herstellung eines entsprechenden funktionellen Geweberegenerates unabdingbar. Um die entsprechenden molekularbiologischen Prozesse und Signalkaskaden einzuleiten sind je nach Gewebeart unterschiedliche Wachstumsfaktoren, Zellinteraktionen und physikalischen Stimuli wie Dehnung, Druck oder Änderung des O₂-Partialdrucks notwendig (Bosch et al., 2002; Lobo et al., 2003).

Die Ausprägung und Voraussetzungen der benötigten Komponenten richten sich nach den Charakteristika des zu rekonstruierenden Gewebes und können frei miteinander kombiniert werden um ein den Anforderungen entsprechendes Regenerat zu erhalten.

1.7 Kollagen Typ I und Hydrogel

Der Begriff „Kollagen“ wird für eine Gruppe von Proteinen verwendet die eine triplehelikale Struktur aus drei Polypeptidketten aufweisen. Alle Mitglieder der Kollagen-Familie formen diese supramolekulare Struktur in der EZM aus, sind aber in der Zusammensetzung ihrer Polypeptidketten, Form, Funktion und Superstruktur sehr unterschiedlich veranlagt. Bis zum heutigen Tage ist es

gelungen 26 unterschiedliche Kollagene zu charakterisieren (Kühn, 1986; Mayne und Brewton, 1993; van der Rest und Garrone, 1991; Myllyharju und Kivirikko, 2001).

Zusammen mit Kollagen II, III, V und XI gehört Kollagen I zu den fibrillären Kollagenen, die sich durch die Fähigkeit auszeichnen hochorganisierte supramolekulare Aggregate mit definierter Superstruktur zu bilden. Dabei kommt es zur Polymerisierung einzelner triplehelikaler Monomere mit einer typischen Periodizität und fibrillären Anordnung. Kollagen I ist das am häufigsten vorkommende und am besten erforschte Kollagen. Es macht mehr als 90% der organischen Masse von Knochen aus und ist das Hauptstrukturkollagen von Bändern, Sehnen, Haut, Cornea und zahlreichen Bindegeweben. Die Kollagen-Triplehelix (ca. 300 nm lang und 1,5 nm breit) ist eine aus zwei identischen $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2(I)$ -Kette bestehende heterotrimere Struktur (Abb. 4) (Hulmes und Miller, 1981). Elektronenmikroskopisch sind diese Fibrillen durch ein periodisches Bandenmuster (D-Bande) mit einem Abstand von 70 nm charakterisiert (Abb. 5).

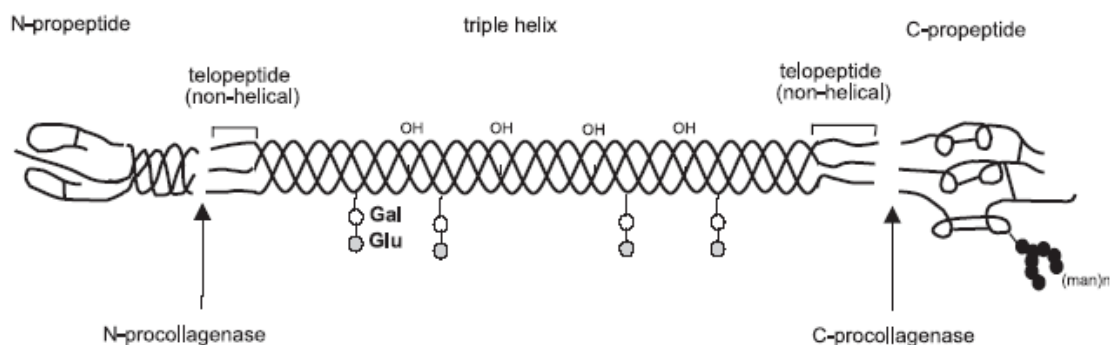


Abb. 4: Molekularstruktur fibrillärer Kollagene, triplehelikaler Aufbau der drei Polypeptidketten und nicht-helikale N- und C-Telopeptide (aus Gelse et al., 2003).

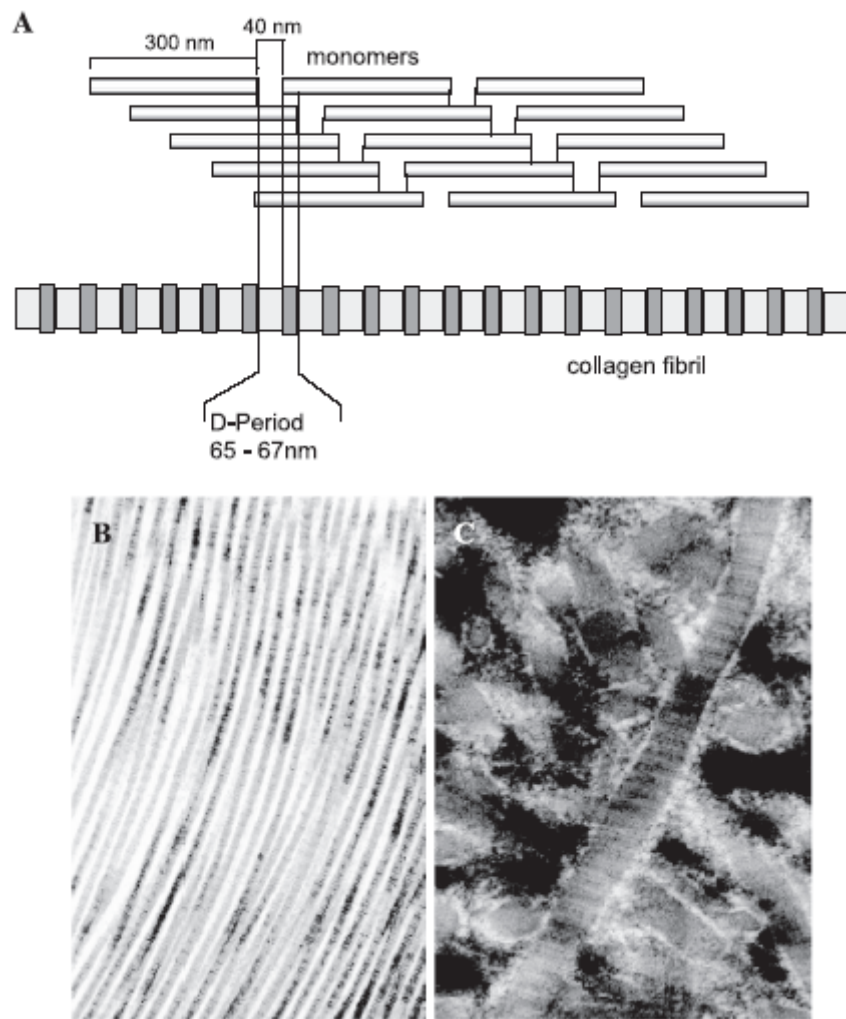


Abb. 5: Schematische Darstellung der supramolekularen Anordnung einzelner Kollagen Triplehelices in dem typischen 40 nm Versatzmuster (A), das bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der fibrillären Kollagene das charakteristische Bandenmuster (B und C) zur Darstellung kommen lässt. Native Kollagen Typ I- (B) und II- Fibrillen (C) wie sie längsorientiert in Sehngewebe (B) und eher netzwerkartig in Gelenkknorpel vorliegen (aus Gelse et al., 2003).

Eine weitere Eigenschaft von Kollagen I ist seine gute Löslichkeit in schwachen Säuren, wobei es durch den sauren pH-Wert zu einer Dissoziation der Fibrillen in einzelne Monomere kommt. Wobei je nach Molarität der Säure und Temperatur der Lösung eine mehr oder weniger visköse Suspension vorliegt. Wird nun diese Suspension durch Zugabe von Puffersubstanzen auf einen physiologischen pH-Wert gebracht und die Lösung auf Körpertemperatur erwärmt kommt es zu einer Polymerisierung der einzelnen Kollagen I Monomere und es bilden sich kollagene Fibrillen mit einem Durchmesser von

400 nm bis mehreren Mikrometern aus. Das in der Lösung vorhandene Wasser wird durch die gebildeten Kollagen I Strukturen gebunden und so resultiert eine gelartige Struktur (Kadler et al., 1996; Koshnoodi et al., 2006).

Dieses als „self assembly“ beschriebene Phänomen ist das Grundprinzip sämtlicher kommerziell erhältlicher Kollagenhydrogele.

1.8 Cartilage Regeneration System (CaReS®)

CaReS® (Arthro Kinetics pcl, Esslingen; www.arthro-kinetics.com) stellt ein im klinischen Einsatz befindliches matrixbasiertes Verfahren der ACT dar, wobei hier ein Kollagen I Hydrogel als Zellträger fungiert. Dieses System befindet sich, zur Therapie fokaler Knorpeldefekte des Knie- und oberen Sprunggelenkes, seit 4 Jahren in unserer Klinik im Einsatz.

In einem ersten Eingriff wird dem Patienten arthroskopisch ein ca. 2 x 2 mm großes Knorpelbiopsat aus einer nicht belastungsaufnehmenden Zone des Kniegelenkes entnommen. Dieses wird dann in einem GMP-geprüften Zelllabor der Firma enzymatisch verdaut und die so isolierten Chondrozyten unmittelbar in dem Kollagen I Hydrogel verkapselt. Anschließend erfolgt die Kultivierung des Konstruktes in einem speziellen Nährmedium unter Zusatz von 10% patienteneigenem Serum für 10 bis 12 Tage. Danach schließt sich ein zweiter operativer Eingriff an, bei dem über eine Arthrotomie das betroffene Kniegelenk eröffnet wird und nach ausgiebigem Debridement das dem Knorpeldefekt angepasste Chondrozyten-Hydrogelkonstrukt mit Fibrinkleber in dem Defekt befestigt wird (Abb. 6)

Europaweit wurden bereits im Rahmen einer Multicenter-Studie über 1000 Patienten mit diesem Verfahren behandelt. Erste 3 bis 4 Jahres Ergebnisse zeigten ein gutes bis sehr gutes postoperatives Resultat in über 75% der Fälle und damit im Vergleich zu der klassischen ACT (Brittberg et al., 1994) ähnlich gute klinische Erfolge (Schneider und Andereya, 2003; Andereya et al., 2006). Dieses zur 3. Generation der ACT gehörende Verfahren zeichnet sich im Vergleich zu der „klassischen“ ACT durch zahlreiche Vorteile aus:

- Kürzere Operationsdauer
- Wegfall des Periostlappens und damit verbundener Probleme
- Deckung größerer Knorpeldefekte
- Möglichkeit der Deckung tibialer und trochleärer Defekte
- Keine Dedifferenzierung der Chondrozyten in Monolayer-Kultur
- Kleinerer operativer Zugang
- Arretierung der transplantierten Zellen im Defekt durch den Zellträger.

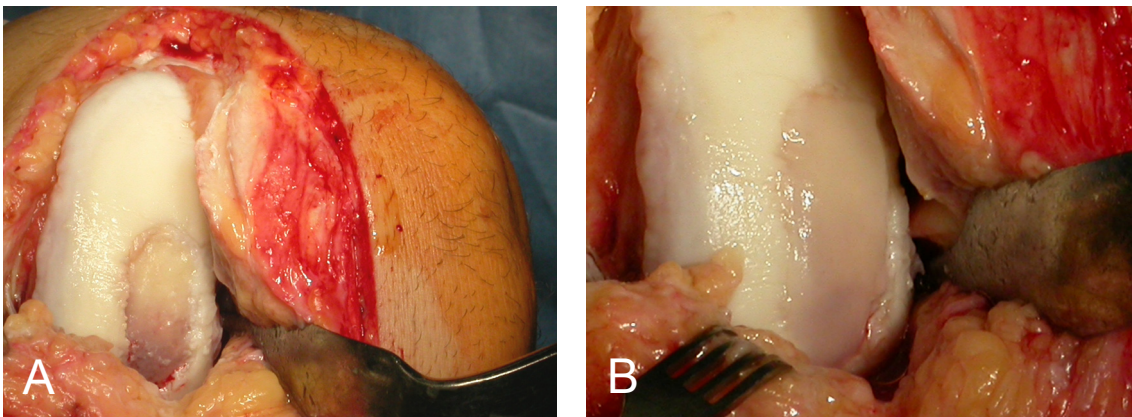


Abb. 6: Knorpeldefekt (3 x 2 cm, ICRS-Grad IV) an der medialen Femurkondyle eines 24-jährigen Patienten nach Debridement (A) und nach Einbringen des chondrozytenbeladenen Kollagen I Hydrogels (CaReS®) in den Defekt (B).

1.9 Fragstellung

Traumatisch oder degenerativ bedingte Defekte des adulten hyalinen Gelenkknorpels weisen eine limitierte intrinsische Heilungskapazität auf. Nicht therapierte Knorpeldefekte stellen nach heutigen Erkenntnissen eine präarthrotische Deformität dar. Wissenschaftliche Arbeiten konnten zeigen, dass diese langfristig zu einer fortschreitenden degenerativen Veränderung führen und letztendlich in einer Zerstörung des Gelenkes, als funktioneller Einheit, enden können. Daher kommt der operativen Therapie fokaler Knorpelschäden zur Prävention weitreichender Gelenkdestruktion heute eine immense Bedeutung zu. Trotz dieser Tatsache und intensiver Forschung sind die derzeit zur Verfügung stehenden etablierten Verfahren zur

Knorpelrekonstruktion trotz intensiver Forschungsbemühungen und klinischer Studien zur Erprobung neuer Strategien in ihren Langzeitresultaten unbefriedigend.

Die Isolierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus verschiedenen Ursprungsgeweben wurde Ende der 90er-Jahre beschrieben. Die Therapie mit diesen Zellen eröffnet neue Perspektiven für die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Erste viel versprechende tierexperimentelle Ansätze wurden in den letzten Jahren veröffentlicht. Zusätzlich erweiterten intensive Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Materialwissenschaften neue Anwendungsmöglichkeiten im Bereich matrixbasierter Behandlungsstrategien zur Gelenkknorpelrekonstruktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in einem Kollagen I Hydrogel unter dem Einfluss von BMP-2 und TGF- β 1 untersucht um das Potential dieser multipotenten Vorläuferzellen für den Einsatz im Kontext der matrixgekoppelten autologen Zelltransplantation zur Gelenkknorpelrekonstruktion zu erforschen. Hierzu wurden $2,5 \times 10^5$ MSZ in 1 ml Kollagen Hydrogel verkapselt und anschließend wurden diese Konstrukte über 3 Wochen unter Zugabe von BMP-2 oder TGF- β 1 kultiviert. Als Kontrollgruppe dienten ohne Wachstumsfaktor kultivierte Konstrukte. An unterschiedlichen Zeitpunkten wurde der Grad der chondrogenen Zelldifferenzierung anhand der Expression chondrogener Markergene mittels RT-PCR evaluiert. Nach 3 Wochen Kultivierung wurden Konstrukte aller 3 Gruppen immun-/histochemisch analysiert um die Akkumulation knorpelspezifischer Extrazellulärmatrix in dem Kollagen I Hydrogel nachzuweisen.

Die Vorteile von MSZ, anstelle der zur Zeit verwendeten Chondrozyten, liegen in der einfachen Gewinnung aus einer ambulant durchgeführten Knochenmarkaspiration, dem Wegfall der arthroskopischen Knorpelbiopsie und der damit verbundenen „donor-site morbidity“, sowie der Verfügbarkeit weitaus höherer Zellzahlen durch Amplifizierung der Zellen in Monolayer-Kulturen und damit die Möglichkeit der Rekonstruktion größerer Defekte mit einer

ausreichenden Zellzahl/Volumeneinheit. Daher würde die matrixbasierte autologe Stammzelltransplantation (AST) unter Verwendung humaner MSZ eine neue Generation der autologen zellbasierten Knorpelrekonstruktionsverfahren begründen, dieses kann gegebenenfalls zu einer weiteren Verbesserung der operativen Knorpelregenerationsverfahren beitragen. Unsere Untersuchungen sollten daher zeigen ob und unter welchen Kulturbedingungen humane mesenchymale Stammzellen in einem erfolgreich im klinischen Einsatz befindlichen Kollagen I Hydrogel chondrogen differenzieren können und sich damit prinzipiell für den Einsatz in der matrixgekoppelten Gelenkknorpelrekonstruktion eignen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark

Die Gewinnung der MSZ erfolgte aus dem Hüftkopf von 3 Patienten (58 Jahre männlich, 61 und 64 Jahre weiblich), die sich aufgrund einer Osteoarthrose einer Hüftprothesenimplantation unterzogen. Die Methode der Zellgewinnung/-kultivierung wurde in modifizierter Form von Haynesworth et al. (1992) übernommen (Nöth et al., 2002b). Die Genehmigung durch die Ethikkommission der Julius-Maximilians Universität Würzburg lag vor.

Mittels eines scharfen Löffels wurden von der distalen Schenkelhalsosteotomiefläche trabekuläre Knochenfragmente samt Knochenmark (10 - 15 ml) gewonnen und in ein 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml DMEM/F12-Medium (PAA, Linz) überführt. Die Röhrchen wurden 30 sek gevortext um Knochenmarkszellen von Knochenfragmenten zu trennen und anschließend für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-/Knochenfragmentpellet in 10 ml DMEM/F12-Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FBS, GIBCO BRL, Darmstadt), 50 IU Penicillin/ml, 50 mg Streptomycin/ml (beide PAA, Linz) und 50 mg/ml L-ascorbat-2-phosphat (Sigma, Steinheim) resuspendiert.

Nach erneuter Durchmischung der Suspension wurden die gelösten Knochenmarkszellen durch eine aufgesetzte 20-Gauge Nadel in eine 10 cm³, Spritze aufgenommen. Die zwischen den Knochenfragmenten verbliebenen Knochenmarkszellen wurden durch mehrfache Wiederholung der oben beschriebenen Prozedur extrahiert, bis die Knochenfragmente gelblich-weiß erschienen. Die so gewonnenen Zellen wurden zentrifugiert (300 x g, 5 min), in einer definierten Menge Medium resuspendiert, mit Hilfe eines Hämozytometers gezählt und anschließend in einer Dichte von 6 x 10⁷, pro 150 cm² Zellkulturflasche (TPP, Tresadingen, Schweiz) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nicht adhärente Zellen wurden nach zwei Tagen durch Aspiration mit einer Pasteur Pipette entfernt und die adhärenen Zellen

wurden zweifach mit PBS (phosphate buffer saline) gewaschen. Das komplette Stammzellmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Nachdem die Zellen nach ca. 10 - 14 Tagen eine Konfluenz von 70 - 80% erreicht hatten, wurden sie mit 0,25% Trypsin abgelöst, gezählt und zur Herstellung der MSZ-Kollagen Konstrukte verwendet.

2.2 Herstellung der MSZ-Kollagen Konstrukte

Zur Herstellung des Kollagen I Hydrogels (Arthro Kinetics pcl, Esslingen) wurde eine Kollagenlösung und eine Gel-Neutralisationslösung verwendet.

Das Kollagen wurde aus Rattenschwänzen von gesundheitsüberwachten Tieren präpariert und in 0,1%iger Essigsäure gelöst. Nach Abtrennung der ungelösten nicht kollagenen Bestandteile wurde in der Kollagen-Lösung eine Endkonzentration von 6 mg/ml eingestellt, mit einem Kollagen Anteil von $\geq 98\%$.

Der zweite Bestandteil des Gels ist die Gel-Neutralisationslösung, welche aus HEPES-gepuffertem doppelt konzentriertem Medium mit Zusatz von 20% Serum besteht.

Die Herstellung des Gels erfolgte auf Eis. Es wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 0,5 ml Gel-Neutralisationslösung resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Kollagen Lösung unter vorsichtigem Mischen und Vermeidung von Lufteinschlüssen. Das Gelieren in 50 ml Zentrifugenröhrchen erfolgt für 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die so hergestellten Zell-Hydrogel Konstrukte entweder in serumhaltigen (10% FCS) Stammzellmedium (Kontrollgruppe) oder in einem chemisch definierten, serumfreien chondrogenen Differenzierungsmedium

- mit Zugabe von BMP-2 (100 ng/ml)
- mit Zugabe von TGF- β 1 (10 ng/ml)

kultiviert (37°C, 5% CO²). Der komplette Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Für histochemische und immunhistochemische Analysen wurden Konstrukte nach 21 Tagen in Paraformaldehyd (4%) bis zur weiteren Verarbeitung fixiert. Zur RT-PCR Analyse wurden Konstrukte an den Tagen 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 verwendet.

2.3 RT-PCR

2.3.1 Aufbereitung der MSZ-Kollagen I Konstrukte

An den entsprechenden Analysezeitpunkten (0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 Tage) wurde zunächst das Kultivierungsmedium abgesaugt und anschließend 3 Konstrukte je Patient, Gruppe und Zeitpunkt 2mal mit PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde das Konstrukt in eine konischen Glasküvette überführt und nach Zugabe von 3 ml GTC-Puffer (500 µg Mercaptoethanol + 0,7 g Sarkosyl + 2,5 ml Natriumacetat (pH-Wert 4.3) ad 100 ml aqua dest.) mechanisch mit einer sterilen Schere für 5 min zerkleinert. Die so gewonnene Suspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 5 ml Phenol, 0,5 ml Natriumacetat-Trihydrat und 1,4 ml Trichlormethan-Chloroform für 20 min mit 13,000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die oberste wässrige, RNA-haltige Phase wurde nun abpipetiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die RNA mit 5 ml Isopropanol bei -20°C über 1h ausgefällt. Es erfolgte die erneute Zentrifugation mit 13,000 x g für 20 min bei 4°C, der Überstand wurde verworfen und das gebildete Pellet 2-3 min an der Luft angetrocknet. Die pelletierte RNA wurde in 500 µl RLT-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) mit 5 µl β-Mercaptoethanol gelöst, danach in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.2 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Die weitere RNA-Prozessierung wurde streng nach dem Protokoll für die Isolierung von RNA aus Tiergewebe der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit, Hilden) durchgeführt. Zu der in 500 µl RLT-Puffer gelösten RNA wurden 500 µl 70%-iger Ethanol pipettiert, durchmischt und für 3 min bei 14,000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Im Folgenden wurden 600 µl Ethanol (70%) hinzugefügt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren durchmischt. Jeweils 700 µl der Suspension wurden auf eine „RNeasy mini spin column“ gegeben und für 15 sek bei 9,000 x g zentrifugiert. Dann wurden 700 µl RW1-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und für 15 sek bei 9,000 x g zentrifugiert, das Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurde die Membran zweimal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) in der Zentrifuge gewaschen, zunächst bei 9,000 x g für 15 sek, anschließend bei 10,000 x g für 2 min. Zum Trocknen der Membran wurde die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt und bei 10,000 x g für 1 min zentrifugiert. Zum Herauslösen der RNA wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und 30 µl RNase freies Wasser (RNeasy Kit, Qiagen) auf die Membran der Säule pipettiert und bei 10,000 U/min für 1 min zentrifugiert.

Der RNA-Gehalt der Suspension wurde mittels Biophotometer bestimmt. Die gewonnene RNA wurde anschließend in gleichen Gewichtsanteilen zur cDNA-Synthese verwendet.

2.3.3 cDNA-Synthese und Amplifikation mittels RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurden zunächst jeweils gleiche Gewichtsanteile (1 µg RNA) der verschiedenen RNA-Proben aliquotiert (max. Volumen 13 µl), diese gegebenenfalls anschließend auf ein Volumen von 13 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl Oligo dtPrimer hinzupipettiert und in

einem 1,5 ml Eppendorf-Cup für 10 min in einen Heizblock bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde danach für 5 min auf Eis gestoppt.

Im direkten Anschluss erfolgte die Zugabe von jeweils 4 µl M-MLV RT 5 x Puffer, 1 µl dNTP-Mix und 1 µl rT (reverse Transkriptase) und die Inkubation für 60 min bei 42°C im Heizblock. Die reverse Transkriptase wurde zum Abschluss der Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 10 min denaturiert. Danach wurden jeweils 30 µl HPLC-H₂O hinzu gegeben und ein Endvolumen von 50 µl cDNA-Suspension erreicht.

Die im Folgenden durchgeführte RT-PCR wurden mit einem Volumen von 30 µl angesetzt. Die Reaktionskomponenten, die Reaktionsbedingungen und verwendete Primersequenzen für die Reaktionen sind unten aufgeführt. Alle Reaktionskomponenten wurden auf Eis pipettiert.

Standardreaktionskomponenten für die Amplifikation mittels RT-PCR:

- 22,5 µl HPLC-H₂O
- 1 µl cDNA
- 1 µl dNTP-Mix
- 3 µl 10 x PCR-Puffer
- 0,5 µl Taq-Polymerase
- 1 µl Primermix forward -Primer (125 pmol/µl in HPLC-H₂O)
- 1 µl Primermix reverse-Primer (125 pmol/µl in HPLC-H₂O)

Reaktionsbedingungen:

1. 94°C → 3 min (initiale Denaturierung der DNA)

2. 94°C → 1 min (Denaturierung)

3. Annealing Temp. → 1 min (Annealing) Zyklus

4. 72°C → 1 min (Elongation)

5. 72°C → 5 min

RT-PCR: chondrogene Primer-Sequenzen und Produktgrößen

Gen	RT-PCR Primer-Sequenz (5'-3')	Produkt-Größe (bp)	Position (bp)	Annealing Temp.
EF-1alpha	Sense: AGGTGATTATCCTGAACCATCC Antisense: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC	234	1090-1324	54°C
Koll II	Sense: GAACATCACCTACCACTGCAAG Antisense: GCAGAGTCCTAGAGTGACTGAG	387	4318-4705	58°C
Koll X	Sense: CCCTTTTGTGCTAGTATCC Antisense: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC	467	112-579	54°C
Koll XI	Sense: ACTTCTGACTGCCTCTGCTC Antisense: GCTTTTGCCATGTGATTCTGCC	494	5301-5795	57°C
Aggrekan	Sense: GCCTTGAGCAGTTCACCTTC Antisense: CTCTTCTACGGGGACAGCAG	391	1814-2205	54°C
Chondroadherin	Sense: ACCTGGACCACAACAAGGTC Antisense: CACCTTCTCCAGGTTGGTGT	388	535-923	51°C
Fibromodulin	Sense: CTTACCCCTATGGGGTGGAT Antisense: AAGTAGCTATCGGGGACGGT	636	175-811	54°C
COMP	Sense: CAGGACGACTTTGATGCAGA Antisense: AAGCTGGAGCTGCCTGGTA	313	1538-1851	54°C
Sox-9	Sense: ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG Antisense: TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	263	548-811	51°C

Tab. 3: Verwendete Primersequenzen, PCR Produktgrößen und „Annealing“ Temperatur für die von uns verwendeten Primer zur Evaluierung der chondrogenen Markergenexpression in den MSZ-Kollagen Konstrukten.

Jeweilig verwendete Zyklenanzahl:

EF-1a	22 x
Koll II	33 x
Koll X	26 x
Koll XI	31 x
Aggrekan	32 x
Chondroadherin	29 x
Fibromodulin	26 x
COMP	24 x
Sox-9	35 x

2.4 Gel-Elektrophorese

Die Proben wurden aus 15 µl RNA Lösung und jeweils 1,5 µl Ladungs-Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß hergestellt. Für die Gel-Elektrophorese wurde ein 1,5% Agarose-Gel verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose-DNA/RNA-Gel-

Pulver in einem Erlenmeyerkolben zusammen mit 100 ml TBE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt. Danach wurden 7,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Gele in eine entsprechende Gelelektrophoresekammer gegossen. Durch den eingesetzten Kamm entstanden 10 Taschen, wovon 9 mit jeweils 10 µl des PCR-Produktes gefüllt wurden und eine Tasche mit einem 100bp Marker. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei 140 V durchgeführt. Die Gele wurden unter UV-Licht in einem Digital Imager und der Software Bio 1D/Capt MW (Version 99.03s) analysiert und digitale Bilder zur weiteren Auswertung gesichert.

2.5 Semiquantitative Densitometrie

Zur semiquantitativen Bestimmung der Genexpression wurde die kumulative Pixelhelligkeit der Elektrophoresebande des entsprechenden Gens jeder Kulturbedingung, Zeitpunktes und Patienten in Verhältnis zur Pixelhelligkeit der korrespondierenden PCR-Bande des „housekeeping“ Gens EF-1alpha gesetzt und graphisch dargestellt. Hierzu wurde die Bio 1D/Capt MW Software (LTF Wasserburg) verwendet und die Mittelwerte der Expression (in x-facher Expression zu EF-1alpha) aus 3 Banden (eine pro Patient) berechnet. Alle Daten wurden als Mittelwert mit dazugehöriger \pm Standardabweichung berechnet und einer Varianzanalyse unterzogen, hierbei dienten die ohne Wachstumsfaktor kultivierten Konstrukte als Kontrollgruppe. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Mann-Whitney Tests geprüft, wobei eine Wahrscheinlichkeit $< 0,05$ als statistisch signifikantes Ereignis angesehen wurde.

2.6 Apoptose und Zellvitalitäts-Assay

Um die Vitalität bzw. Apoptose der Zellen im Kollagenhydrogel nach 21 Tagen Kultivierung nachzuweisen wurde der „Apoptose Detection Kit Annexin V-Cy3“ verwendet und streng nach Herstellerprotokoll verfahren.

Bei diesem Assay bindet Annexin V-Cy3 an Phosphatidylserin, welches sich an der äußeren Schicht von Doppellipidmembranen von nekrotischen Zellen befindet. Um gleichzeitig vitale Zellen darzustellen wurde eine Gegenfärbung mit 6-CFDA-SE (5-(6) Carboxyfluorescein Diacetat, succinimidyl Ester) durchgeführt. Dieser nichtpolare Farbstoff, der durch die Zellmembran in das Zytoplasma eindringt, wird in vitalen Zellen durch zelleigene Esterasen aktiviert und fluoresziert anschließend grün. In nekrotischen Zellen ist die entsprechende Esteraseaktivität nicht vorhanden und es kommt nicht zu einer Fluoreszenz (Martin et al., 1995).

Es wurden Konstrukte aller 3 Gruppen an Tag 21 zunächst 3 mal mit PBS gewaschen, der Färbung unterzogen und anschließend, wie bei den im Folgenden beschriebenen histologischen Protokollen, prozessiert. Daraufhin wurden die gefärbten histologischen Schnitte (Dicke 4 µm) unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert und digital erfasst.

2.7 Histologie

2.7.1 Anfertigen der histologischen Schnitte

Zur Anfertigung histologischer Schnitte wurden 3 Konstrukte je Gruppe und Patient nach 21 Tagen Kultivierung 3 mal mit PBS gewaschen, in 4% Paraformaldehyd über Nacht fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (25, 50, 75, 95 und 100% für je 1 Stunde) und Amylacetat dehydratisiert und anschließend in Paraffin bei 56°C eingebettet. Die Aushärtung erfolgte über 48h bei Raumtemperatur.

An einem Schlittenmikrotom wurden aus den entsprechenden Paraffinblöcken anschließend 4 µm dicke Schnitte durch das Zentrum des Konstruktes gefertigt,

die auf einem Objektträger über Nacht trockneten. Im Anschluss erfolgte vor allen Färbungen die Entparaffinisierung (2x Xylol für 5 min) und die Dehydratisierung (absteigende Alkoholreihe: 100, 95, 75, 50, 25% Ethanol und aqua dest. für je 1 min). Alle im Folgenden aufgeführten (immun-)histologischen Verfahrens-Protokolle sind von diesem Punkt aus detailliert beschrieben.

2.7.2 Histochemische Färbungen

Hämatoxylin/Eosin Färbung

1.	Hämatoxylin	10 min
2.	Spülen in aqua dest.	2 x 3 min
3.	0,25% HCl / 50% Ethanol	10 sek
4.	Spülen in aqua dest.	3 min
5.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
6.	1%ige Eosinlösung	20 sek
7.	Aqua dest.	2 x 3 min
8.	70% Ethanol	10 sek
9.	Dehydratisierung in 95% Ethanol	10 sek
10.	100% Isopropanol	2 x 1 min
11.	Xylol	2 x 5 min
12.	Eindecken mit organischem Eindeckmittel	

Alcian Blau Färbung

1.	3%ige Essigsäure in aqua dest.	5 min
2.	1% Alcian Blau 8GX (pH 1,0)	60 min
3.	Saurer Ethanol (368,5 ml 95%iger Ethanol, 131,5ml aqua dest., 5 ml HCl)	2x3 min
4.	Spülen in aqua dest.	2 x 3 min
5.	Gegenfärbung mit Kernechtrot	2 min
6.	Aqua dest.	2 x 3 min
7.	70% Ethanol	10 sek

- | | | |
|-----|---|-----------|
| 8. | Dehydratisierung in 95% Ethanol | 10 sek |
| 9. | 100% Isopropanol | 2 x 1 min |
| 10. | Xylol | 2 x 5 min |
| 11. | Eindecken mit organischem Eindeckmittel | |

2.6.3 Immunhistochemische Färbungen

Kollagen II und X Antikörper-Färbung

Kollagen II: Spezifität: $\alpha 1(\text{II})$ - und $\alpha 3(\text{XI})$ -Ketten mit identischer Primärstruktur für Human, Maus, Huhn, Salamander

Klon: 6B3 (Chemicon, Bestell-Nr. MAB8887)

Isotyp: Maus IgG₁, monoklonal

Einsatzkonz.: 670 ng/ml

Detektion der Bindung des primären Antikörpers (Immunzytochemische Färbung):

Waschpuffer: 0,05M TBS pH 7,6

Stammlösung: 10xTBS (0,5M), pH 7,6; für 1L:
 60,6 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 87,66 g NaCl
 in 900 ml aqua bidest. lösen und pH einstellen, ad 1000ml mit aqua bidest., autoklavieren.

Arbeitslösung: 1xTBS: 1:10-Verdünnung 10xTBS mit H₂O bidest.

Blockierungslsg.: 2% BSA, 5% normal horse serum in 1xTBS
 1g BSA+2,5 ml horse serum in 47,5 ml 1xTBS

AK-Verdünnungslösung = Blockierungslösung

Kollagen X: Spezifität: natives und denaturiertes Kollagen X
Human, Schwein, Hirsch
Klon: COL-10 (Bestell-Nr. 234196, Calbiochem)
Isotyp: Maus IgM, monoklonal, Ascites
Einsatzkonz.: 500 ng/ml

Detektion der Bindung des primären Antikörpers (Immunzytochemische Färbung):

Waschpuffer: 0,05 M TBS pH 7,6

Stammlösungen: 0,5 M Tris, pH 7,6 0,9% NaCl
30,29 g Tris-HCl 9 g NaCl
ad 500 ml dest. H₂O ad 1000 ml H₂O

- pH Einstellung, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern

Arbeitslösung (0,05 M Tris): 100 ml Tris + 900 ml NaCl + 1 ml Tween 20

Blockierungslösung: 2% BSA, 2,5% normal horse serum in TBS
2 g BSA in 97,5 ml TBS + 2,5 ml horse serum

AK-Verdünnungslösung = Blockierungslösung

1. Waschpuffer für 15 min
2. Verdau mit 1 mg/ml Pepsin in 1 M Tris HCl, pH 2,0 für 15 min bei RT
(Anti-Kollagen II Färbung)
2. Verdau mit 0,25% Trypsin bei 37°C
(Anti-Kollagen X Färbung)
3. 3x Waschen mit Waschpuffer
4. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 100 µl Blockierungslösung
Inkubation für 20 min bei RT
5. Überschichten der Zellen mit 100 µl primären Antikörper in
entsprechender Verdünnung (1:300 Koll II, bzw. 1:400 Koll X)
6. Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer 4°C

Negativkontrolle: Maus-Serum, Proteinkonzentration wurde mit Blockierungslösung auf die gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers eingestellt.

Detektionssystem:

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse:

Link: Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)

Biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline, in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid.

Label: Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)

Substrat-Chromogen: Fast Red-Chromogen

Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3

Substrat-Puffer: AP Substrate Buffer

1. 3x Waschen mit Waschpuffer
2. Überschichten der Schnitte mit 3 Tropfen Link und Inkubation für 15 min in einer feuchten Kammer bei RT
3. 3x Waschen mit Waschpuffer
4. Überschichten der Schnitte mit 3 Tropfen Label und Inkubation für 15 min in einer feuchten Kammer bei RT
5. 3x Waschen mit Waschpuffer
6. Chromogen Fast Red ansetzen:
Substrat-Arbeitslösung (CHROM): 750 µl AP Substrate Buffer + 30 µl Chromogen Red 1, 30 µl Chromogen Red 2, 30 µl Chromogen Red 3.
Zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase 1 Tropfen Levamisole für je 10 ml AP Substrate Buffer zugeben. Vor Zugabe der Chromogen Red Komponenten zugeben und mischen.

7. Zugabe des Chromogen Fast Red und Inkubation für 2-5 min, Rotfärbung beobachten
8. 3x Waschen mit aqua dest.
9. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 9 min
10. 3x Waschen mit H₂O dest.
11. Bläuen in Leitungswasser für 10 min
12. Eindecken mit wässrigem Eindeckmittel

2.8 Verwendete Lösungen und Ansätze

TBE-Puffer (Tris-Borate-EDTA)

108 g Trisbase, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (8382S012251, Merck, Darmstadt)
55 g Borsäure (K29935665204, Merck, Darmstadt)
40 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) (03700, Fluka, Deisenhofen)
1 Liter destilliertes Wasser

Tris-Puffer

6,057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (8382S012251, Merck, Darmstadt)
8,010 g NaCl (Natriumchlorid) (K30322804208, Merck, Darmstadt)
1 Liter destilliertes Wasser (pH- 7,4 einstellen)

Stammzellmedium

500 ml DMEM/ F-12 (A190,500-SA, Appli Chem, Darmstadt)
50 ml FBS (10270-106, Konz.: 10%, GIBCO BRL, Darmstadt)
5 ml Penicillin/Streptomycin (50 IU Penicillin/ml, 50 µg Streptomycin/ml) (P11-010, PAA, Linz)
550 µl L-Ascorbat-2-Phosphat (A-8960, Konz.: 50 µg/ml, Sigma, Steinheim)

Chondrogenes Differenzierungsmedium

50 ml DMEM/ F-12 (E15-813, PAA, Linz)

5 µl Dexamethason (D-4902, Konz.: 10 nM, Sigma, Steinheim)

50 µl L-Ascorbat-2-Phosphat (A-8960, Konz.: 50 µg/ml, Sigma, Steinheim)

50 µl Pyruvat (S-8636, Konz.: 100 µg/ml, Sigma, Steinheim)

50 µl Prolin (816019, Konz.: 40 µg/ml, Merck, Darmstadt)

0,5 ml IST+1 (I-2521, Sigma, Steinheim)

0,5 ml Penicillin/Streptomycin (50 IU Penicillin/ml, 50 µg Streptomycin/ml) (P11-010, PAA, Lenz)

TGF-β1, 10 ng/ml (C-63505, Promocell, Heidelberg)

BMP-2, 100ng/ml (Prof. W. Seebald, Institut für Physikalische Chemie II, Julius-Maximilians Universität Würzburg)

Färbelösung für Alzian Blau Färbung

Alzian Blau

0,1 g Alzian Blau (A3157, Sigma, Steinheim) in 97 ml destilliertem Wasser lösen und 3 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) zufügen

Kernechtrot

0,1 g Kernechtrot (Merck, Darmstadt) in 100 ml 5% Aluminiumsulfatlösung (Merck, Darmstadt) heiß lösen und nach Erkalten filtrieren

Färbelösung für H/E Färbung

Hämalaun-Farbstoff nach Mayer

1 g Hämatoxylin (4302, Merck, Darmstadt) in 1000 ml destilliertem Wasser lösen

0,2 g NaJO₃ (S4007, Sigma, Steinheim)

50 g reines Kalium (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat) (A4396,1000, Appli Chem, Darmstadt) nach Umrühren blauviolette Farbe

50 g Chloralhydrat (2425, Merck, Darmstadt)

1g Zitronensäure (1.00244.1000, Merck, Darmstadt), nach Umrühren rotviolette Farbe

Eosin

0,1g Eosin (15935, Merck, Darmstadt) in 100 ml destilliertem Wasser lösen

DNA Ladungs-Puffer (10x)

3 ml Glycerol (30%), (Sigma, Steinheim)
2 ml EDTA (0,1 M, pH- 8,0) (PAA, Linz)
1 ml SDS (Konz.: 0,1 %) (Merck, Darmstadt)
5 mg Bromphenolblau (Konz.: 0,25%), (Merck, Darmstadt)
5 mg Xylene Cyanol (Konz.: 0,25 %, Merck, Darmstadt)
4 ml destilliertes Wasser

Primärer Antikörper

Kollagen II (Spezies: mouse), (Verdünnung 1:50) (Bestell-Nr. MAB8887,
Chemicon, Hofheim)
Kollagen X (Spezies: rabbit), (Verdünnung 1:100) (Bestell-Nr. 234196,
Calbiochem, Darmstadt)

Antikörper Detektions Kit

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse:

Link: Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)

Label: Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)

- Agarose (GTQ) (6352.4, Roth, Karlsruhe)
- Bovines Serum Albumin (BSA 0,5 %) (RPN412, Amersham, Freiburg)
- DAB (Diaminobenzidine Peroxidase) Tabletten (D-4168, Sigma, Steinheim)
- dNTP-Mix (PCR Nucleotide Mix 10mM) (C1145, Promega, Mannheim)
- Entellan (1.07961.0100, Merck, Darmstadt)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (1.00983.1000, Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Konz.: 10mg/ml) (15585-011, GIBCO BRL, Darmstadt)
- Formalin (A0823,2500, Appli Chem, Darmstadt)

- Glycerol Gelatine (GG-1, Sigma, Steinheim)
- Glycergel (DAKO, Glostrup, Denmark)
- Hämatoxylin-Lösung (4302, Merck, Darmstadt)
- Marker (100 bp DNA-Leiter) (Peqlab, Erlangen)
- Mercaptoethanol (1.15433, Merck, Darmstadt)
- oligo(dT)15 Primer (Konz.: 500 µg/ml) (C110A, Promega, Mannheim)
- Paraffin (Sigma, Steinheim)
- PBS (Phosphat Buffer Saline) Dulbecco 99,55 g/l Aqua bidest, (L182-50, Biochrom, Berlin)
- PCR-Puffer (10x Konzentrat) (225285, Amersham, Freiburg)
- PCR-Puffer (M-MLV RT 5 x Buffer) (M531A, Promega, Mannheim)
- Pepsin (S3002, 2g/250ml 0,2M HCL, DAKO, Glostrup, Denmark)
- reverse Transkriptase (M 368C, M-MLV RT RNase H(-)Point Mutant, Promega, Mannheim)
- Taq DNA Polymerase (Cloned for PCR, 5 U/µl) (224472, Amersham, Freiburg)
- Tissue Tek (4583, Sakura, Zoeterwoude, Holland)
- Trypanblau (Konz.: 0,4 %) (T-8151, Sigma, Steinheim)
- Trypsin/EDTA (0,5g Trypsin/l, 0,2g EDTA/l) (L11-004, PAA, Linz)
- Trypsin (Immunhistochemie, S2012, 250µg/ml, DAKO, Glostrup, Denmark)
- Xylol (1.08685.2500, Merck, Darmstadt)

2.9 Verwendete Geräte und Materialien

- Abzug (1500, Waldner, Wangen)
- AP-Färbekit (DAKO, Glostrup, Denmark)
- Bio Chem-Vacuum Center, BCV 21 (Vacuubrand, Wertheim)
- Biophotometer (6131) (Eppendorf, Hamburg)
- Brutschrank (Heraeus, Hanau, 37 °C, 95% O₂, 5% CO₂)
- Deckgläser (Hartenstein, Würzburg)
- Densitometer (LTF-Labortechnik, Wasserburg)
- Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz)

Färbeküvetten aus Glas (Schott, Mainz)
Feuchte Kammer: Metallkiste mit Deckel, ausgelegt mit nassen Tüchern
Gefrierschrank (Bosch, Albstadt)
Gel-Elektrophoresekammer-MIDI (Roth, Karlsruhe)
Glasküvetten (5 ml, v-vails) (Wheaton, USA)
Heizblock (Promega, Mannheim)
Inkubator für Zell- und Gewebekulturen BB6060 (Heraeus, Hanau)
Lichtmikroskop (Axiovert 25) (Zeiss, Jena)
Mikrowelle (600 W, Panasonic)
Multicycler PTC 200 (Biozym, Hessisch Oldendorf)
Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Objektträger (Objektträger Super Frost, Menzel, Braunschweig)
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) (Hartenstein, Würzburg)
PCR-Cycler (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Multi Cycler, Biozym, Hessisch Oldendorf)
Pipettierhilfe (Accujet, Braun, Melsungen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg)
Schlittenmikrotom (Leitz, Oberkochen)
Sicherheitswerkbank Klasse II (HS 15, Heraeus, Hanau)
Tischzentrifuge (Heraeus, Hanau, Biofuge pico)
Vortex Genie 2 (G560, Scientific Industries, Karlsruhe)
Wasserbad (37°C) (GFL, Burgwedel)
Zellkulturflaschen (150cm², 90151, TPP, Tresadingen, Schweiz)
Zentrifuge (biofuge pico, Heraeus, Hanau)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50ml, Sarstedt, Nürnberg)

3. Ergebnisse

3.1 Stammzellkultur

Nach dem Ausplattieren der von trabekulären Knochenfragmenten gereinigten Knochenmarksuspension wurde das Zellkulturmedium nach 3 Tagen gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt waren lichtmikroskopisch bereits einige anhaftende Zellen und colony-forming units zu erkennen. Nach etwa 10 bis 14 Tagen erreichten die Zellen eine ca. 80% Konfluenz. Der Zellrasen wurde anschließend mit 0,25% Trypsin abgelöst und die Zellen im Verhältnis eins zu drei ausplattiert. Nach erneuter Expansion der Zellen bis zu einer 70 bis 80% Konfluenz wurden die Zellen der Passage 1 abgelöst und zur Herstellung der MSZ-Hydrogel Konstrukte verwendet. Die lichtmikroskopische Kontrolle vor Verwendung der Zellen zeigte bei allen 3 Patienten eine homogene fibroblastenartige Zellpopulation mit zahlreichen mitotischen Aktivitäten in P0 und P1, wie bereits von Nöth et al. (2002b) beschrieben.

3.2 MSZ-Kollagen Hydrogele

Nach Hinzufügen von 3 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums zu den hergestellten MSZ-Hydrogel Konstrukten wurden diese durch leichtes Schütteln von den Wänden des 15 ml Zentrifugenröhrchens abgelöst und hatten die konische Form des Bodens angenommen. Die Konstrukte aller drei Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt transparent und hatten eine homogene, gelartige Struktur.

Während der dreiwöchigen Kultivierung kam es bei allen Konstrukten zu einer mediumabhängigen Kontraktion und dadurch zu einem kugelförmigen Aussehen.

In der mit Stammzellmedium kultivierten Gruppe kam es zu einer Kontraktion von 30 bis 40% im Vergleich zu der Ausgangsgröße an Tag 0. In den unter Zusatz von chondrogenen Wachstumsfaktoren kultivierten Hydrogelen war die

zu beobachtende Kontraktion deutlich stärker ausgeprägt, wobei die stärkste Kontraktion unter Zugabe von TGF- β 1 mit 50 bis 75% auftrat, mit BMP-2 betrug diese nur 40 bis 50%.

Optisch nahm die Transparenz der MSZ-Hydrogelkonstrukte während der Kultivierung deutlich ab, wobei die in Differenzierungsmedium kultivierten Konstrukte, besonders unter Zugabe von TGF- β 1, nach 21 Tagen eher opak-weißlich erschienen und ebenfalls eine höhere Festigkeit aufwiesen.

3.3 Apoptose und Zellvitalität

Die an Tag 21 durchgeführte Doppel-Fluoreszenzfärbung mit Annexin V-Cy3 und 6-CFDA erlaubte eine Unterscheidung von vitalen (grün), apoptotischen (gelb) und nekrotischen Zellen (rot).

Nach 3 Wochen konnten vorwiegend lebende, grün fluoreszierende Zellen sowohl in der Kontrollgruppe mit Stammzellmedium (Abb. 7A) als auch in den mit chondrogenen Wachstumsfaktoren BMP-2 (Abb. 7B) und TGF- β 1 (Abb. 7C) kultivierten Hydrogelen nachgewiesen werden.

Die Doppelfärbung der Zellen mit grünem und rotem Fluoreszenzfarbstoff ergab eine Gelbfluoreszenz, die apoptotische Zellen anzeigt. Der Gesamtanteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen war in der Kontrollgruppe, im Vergleich zu den mit BMP-2 bzw. TGF- β 1 kultivierten Hydrogelen, höher (Abb. 7). Interessanterweise zeigten sich einzelne der rundlich chondrogen differenzierten Zellen in der TGF- β 1 und BMP-2 behandelten Gruppe nach 3 Wochen apoptotisch (rechter oberer Bildrand in Abb. 7 B und C).

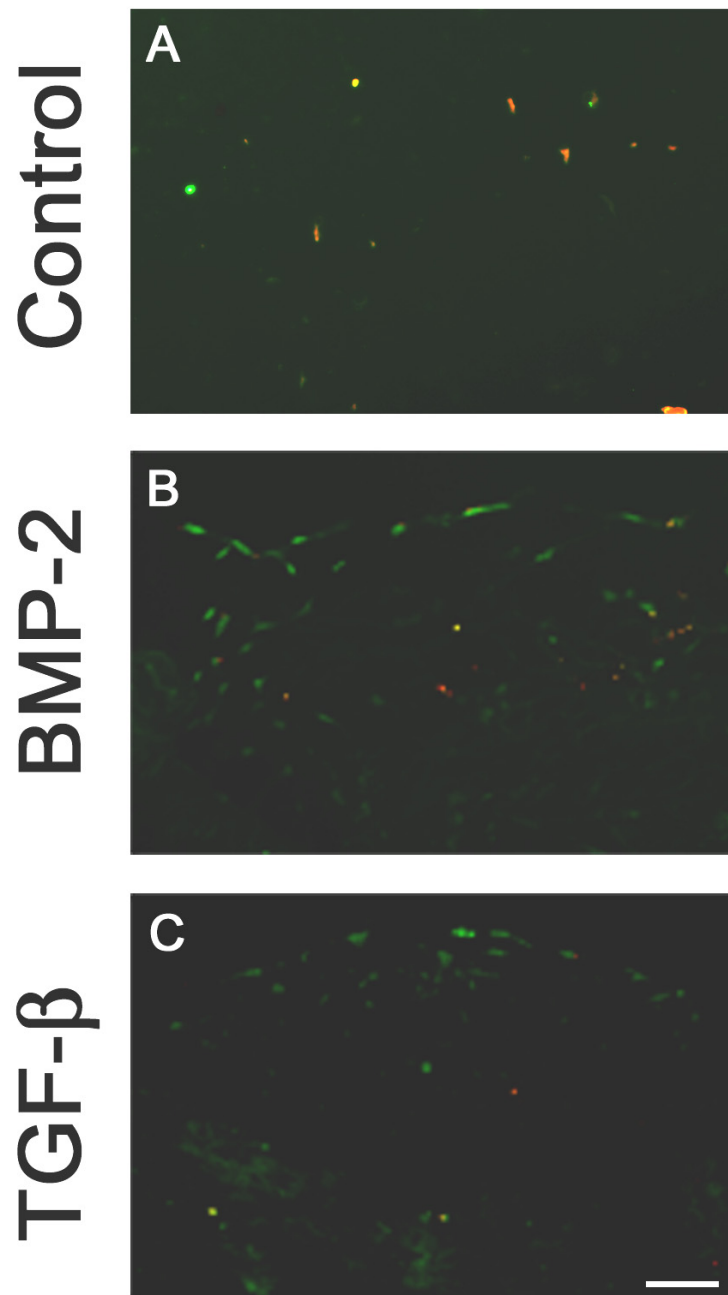


Abb. 7.: Fluoreszenz-Mikroskopie der MSZ-Hydrogel Konstrukten nach 3 Wochen Zellkultur. Die MSZ-Hydrogele wurden in Stammzellmedium mit 10% FCS (A) oder in einem serumfreien Differenzierungsmedium mit 100 ng/ml BMP-2 (B) bzw. 10 ng/ml TGF- β 1 (C) kultiviert. Die Doppelfärbung mit 6-CFDA und Annexin V-Cy3 erlaubt eine Aussage über die Vitalität der Zellen, wobei vitale Zellen durch Anfärbung mit 6-CFDA (grün) und nekrotische Zellen durch Anfärbung mit Annexin V-Cy3 (rot) gekennzeichnet sind. Apoptotische Zellen weisen durch eine Doppelanfärbung mit beiden Farbstoffen eine gelbe Fluoreszenz auf. Maßstab 20 μ m.

3.4 Genexpressionmuster der RT-PCR Analyse

An acht verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21) wurde RNA von je drei Konstrukten pro Gruppe, Patient und Zeitpunkt isoliert. An Tag 0 wurde RNA aus MSZ der Passage 1 aller 3 Patienten vor Herstellung der MSZ-Hydrogele gewonnen. Im Folgenden sind die repräsentativen, zeitabhängigen Genexpressionsmuster der mit Stammzellmedium (Abb. 8A), sowie der mit chondrogenem Differenzierungsmedium, unter Zusatz von BMP-2 (Abb. 8B) bzw. TGF- β 1 (Abb. 8C) kultivierten Konstrukte, dargestellt. Dabei ist in der obersten Reihe jeweils das „housekeeping gen“ EF-1alpha und des weiteren die Expression der, von Barry et al. (2001) beschriebenen, frühen (COMP, Sox-9 und Fibromodulin), intermediären (Chondroadherin und Koll XI) und späten (Koll II und Aggrekan) Markergene abgebildet. Zusätzlich ist die Expression von Koll X dargestellt, welches als hypertrophes Markergen angesehen wird.

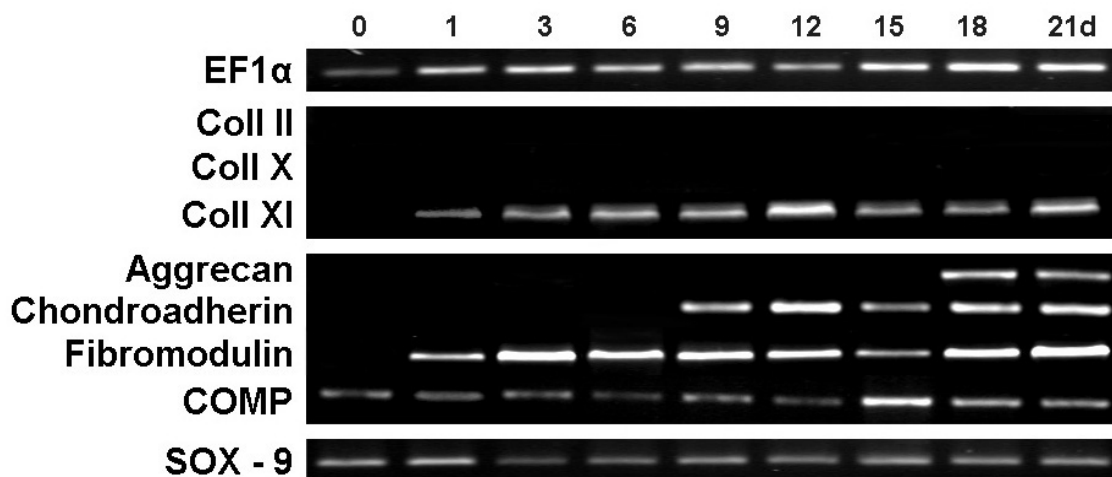
Bei allen drei Gruppen war zu jedem Analysezeitpunkt eine Expression von Sox-9 und COMP nachweisbar. In der Kontrollgruppe (Abb. 8A) sowie unter BMP-2 (Abb. 8B) war diese über den gesamten Zeitraum konstant, wohingegen es unter TGF- β 1 in der RT-PCR zu einer stetigen Zunahme der Bandenintensität kam (Abb. 8C). Eine Fibromodulinexpression konnte unter dem Einfluß von TGF- β 1 bereits an Tag 1 nachgewiesen werden, welche hingegen bei den übrigen Gruppen erst an Tag 3 zu sehen war. Diese zeitliche Verzögerung konnte auch bei der Expression von Chondroadherin gesehen werden. Hier kam es unter TGF- β 1 (Abb. 8C) nach 6 Tagen zu einer Expression, die Kontrollgruppe und die BMP-2 Gruppe zeigten sich erst nach 9 Tagen positiv.

Im Bezug auf die Expression von Markergenen die eine fortgeschrittene chondrogene Differenzierung anzeigen, Koll II und Aggrekan, kam es zu deutlichen Unterschieden zwischen den Gruppen. In der Kontrollgruppe (Abb. 8A) konnte keine Koll II Expression nachgewiesen werden, es kam hier erst ab Tag 18 zu einer Aggrekanexpression. Im Gegensatz dazu konnte im Differenzierungsmedium unter Zusatz chondrogener Wachstumsfaktoren

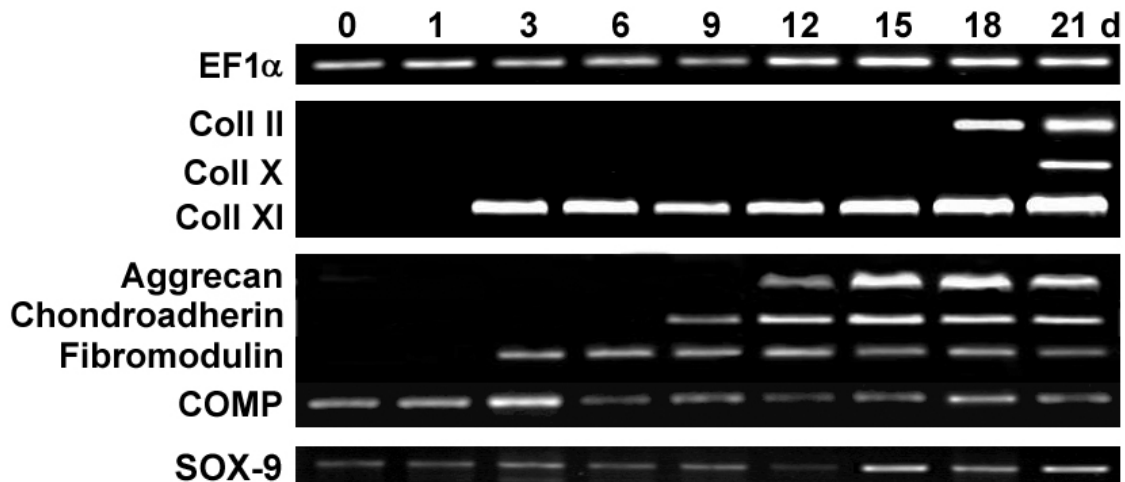
jeweils die Expression vom Koll II und Aggrekan nachgewiesen werden. In der BMP-2 Gruppe (Abb. 8B) kam es ab Tag 12 bzw. Tag 18 zu einer Aggrekan bzw. Koll II Expression, unter TGF- β 1 (Abb. 8C) trat diese bereits ab Tag 9 bzw. 12 auf.

Eine Koll X Genexpression konnte in der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden, bei Verwendung eines chondrogenen Differenzierungsmediums kam es unter BMP-2 an Tag 21 zu einer Expression, in der TGF- β 1 behandelten Gruppe konnte, das den Übergang in die Hypertrophie anzeigende Markergen, bereits ab Tag 18 nachgewiesen werden.

A: Kontrollgruppe (serumhaltiges Stammzellmedium).



B: Chondrogenes Differenzierungsmedium + 100 ng/ml BMP-2.



C: Chondrogenes Differenzierungsmedium + 10 ng/ml TGF- β 1.

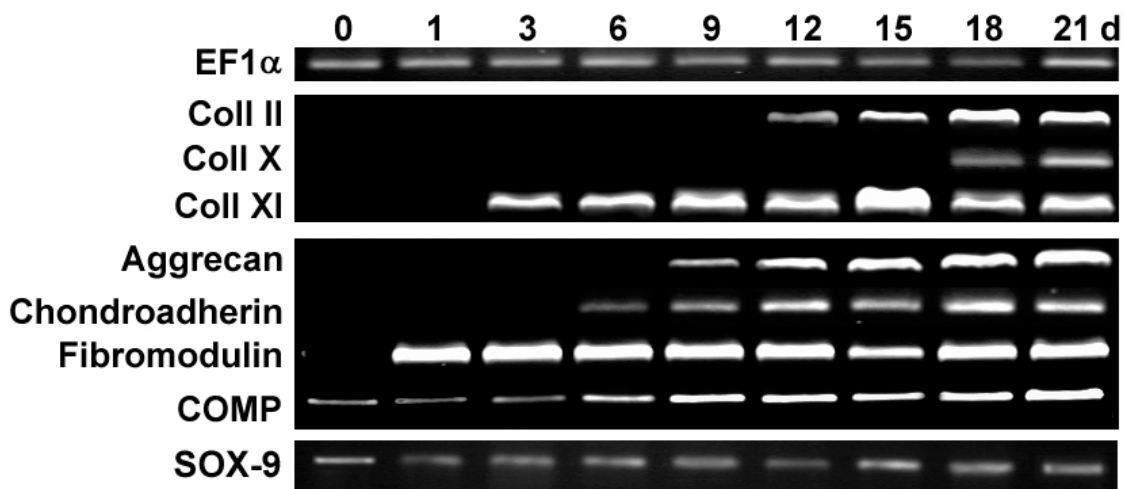


Abb. 8: Expression chondrogener Markergene mittels RT-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung von MSZ-Kollagen Konstrukten über 3 Wochen. Die Konstrukte wurden in serumhaltigem Stammzellmedium (A) und chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 (B) oder 10 ng/ml TGF- β 1 (C) kultiviert. Die RNA wurden an den angegebenen Zeitpunkten aus den MSZ-Hydrogel Konstrukten isoliert und die chondrogene Markergenexpression für die angegebenen Gene analysiert. EF-1alpha diente als „housekeeping gen“. Dargestellt ist die repräsentative Genexpression des 58-jährigen männlichen Patienten.

3.5 Semiquantitative Densitometrie

Für eine semiquantitative Analyse der Genexpression wurden die kumulativen Pixelhelligkeiten der entsprechenden RT-PCR Produkte für Koll II, X und Aggrecan densitometrisch bestimmt. Dabei wurden die erfassten Werte aller Patienten für das jeweilige Gen, den Zeitpunkt und die Kultivierungsbedingung gemittelt und in Relation zu dem entsprechenden Wert für die Expression des „housekeeping“ Gens EF-1alpha gesetzt und als x-facher Wert dessen ausgedrückt (Abb. 9).

Wie bereits die RT-PCR Analyse zeigte war bei Kultivierung der MSZ-Kollagenegel Konstrukte im serumhaltigen Stammzellmedium keine Expression von Koll II oder X nachweisbar. In der BMP-2 Gruppe kam es an Tag 21 zu einer Koll X-Expression (0,65-fach; Abb. 9A), in der TGF- β 1 Gruppe an Tag 18 und 21 (0,66 und 0,86-fach; Abb. 9C). Die Koll II Expression lag in der BMP-2 Gruppe an den Tagen 18 und 21 bei 0,86- bzw. 1,08-fachen Werten (Abb. 9B). In der TGF- β 1 Gruppe stieg hingegen die Koll II Expression von Tag 12 bis 21

kontinuierlich (0,59-; 0,76-; 1,25-; bzw. 8,28-fach; Abb. 9B). Aggrekan konnte in allen drei Gruppen detektiert werden, in der Kontrollgruppe an Tag 18 und 21 (0,64- bzw. 0,54-fach; Abb. 9A), in der BMP-2 Gruppe von Tag 12 an (0,60-; 1,03-; 1,16-; bzw. 0,94-fach; Abb. 9A) und in der TGF- β 1 Gruppe von Tag 9 an (0,44-; 0,82-; 1,07-; 1,33-; bzw. 1,59-fach; Abb. 9A).

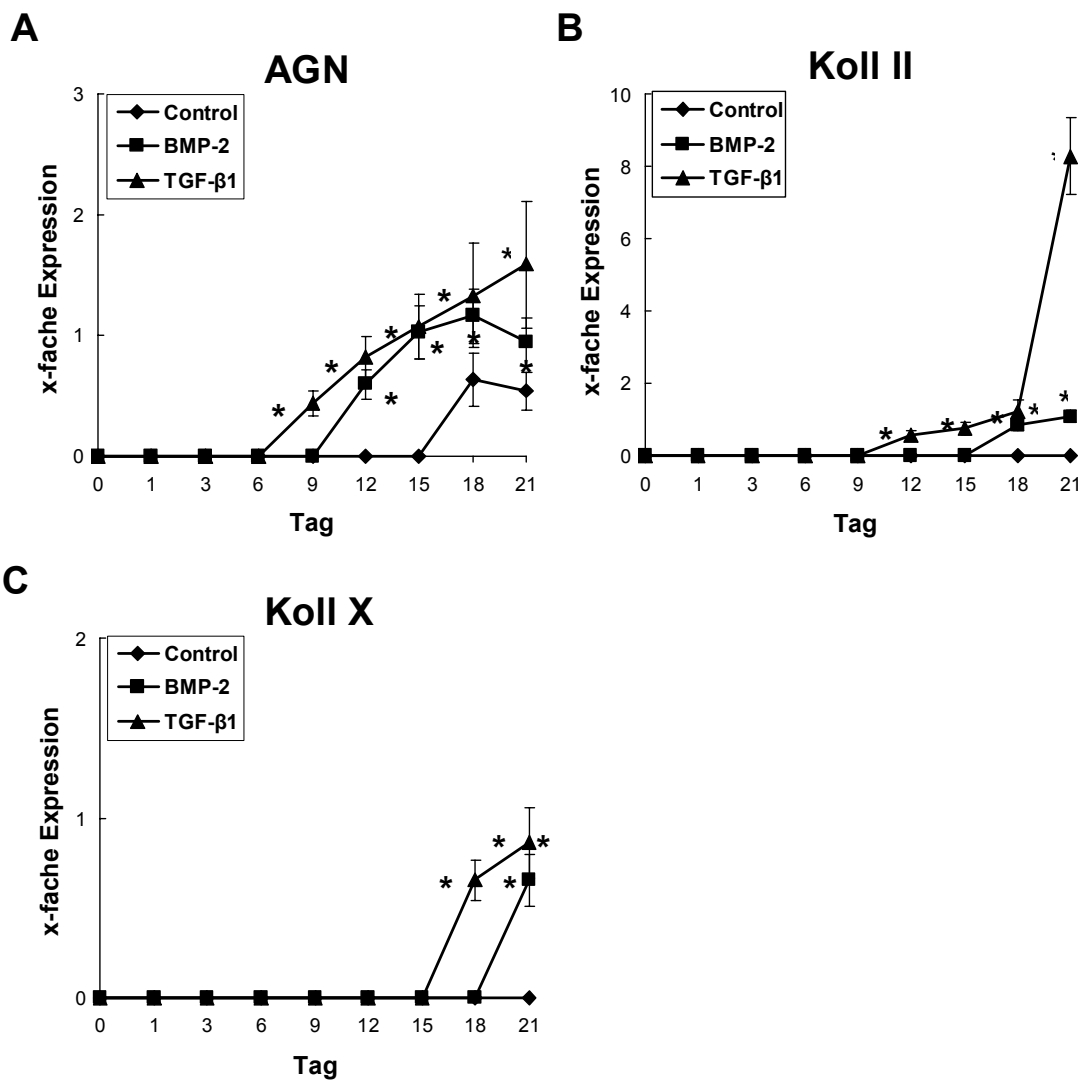


Abb. 9: Densitometrie von PCR-Produkten der MSZ-Hydrogel Konstrukte. Gezeigt ist der x-fache Wert der Expression von Aggrekan (A), Koll II (B) und Koll X (C) in Relation zu dem „housekeeping“ Gen EF-1alpha. Die MSZ-Hydrogel Konstrukte wurden in serumhaltigem Stammzellmedium oder chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 oder 10 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Densitometrie von drei Patienten. Die statistische Signifikanz wurde zur Kontrollgruppe (Stammzellmedium) geprüft und $p < 0,05$ (*) als statistisch signifikant angesehen.

3.6 Histochemische- und Immunhistochemische Färbungen

3.6.1 Hämatoxylin/Eosin und Alzian Blau Färbung

Die im Folgenden dargestellten histologischen Abbildungen zeigen die jeweilige Färbung der MSZ-Kollagengel Konstrukte zum Vergleich der Unterschiede in den 3 Gruppen, wobei von rechts nach links je vier unterschiedliche Vergrößerungen aufgetragen sind.

Nach 3 Wochen Kultivierung zeigte sich in der H/E Färbung (Abb. 10) in allen 3 Gruppen eine homogene Zellverteilung. In den Übersichtsbildern der Kontrollgruppe (Abb. 10A), der BMP-2 Gruppe (Abb. 10E) und der TGF- β 1 Gruppe (Abb. 10I) lässt sich der Grad der Kontraktion gut erkennen. Die im Differenzierungsmedium mit Zusatz von TGF- β 1 kultivierten Konstrukte wiesen die stärkste Kontraktion auf (Abb. 10I). In keinem der histologischen Schnitte konnten nekrotische Zellareale gefunden werden, auch nicht im Zentrum der Konstrukte.

In einigen Bereichen des Konstruktrandes der TGF- β 1 Gruppe (Abb. 10I) ist eine 2 bis 3 lagige Zellschicht von fibroblastenartigen Zellen zu erkennen, diese war in den übrigen Gruppen nicht zu sehen. Interessanterweise konnten in den Konstrukten der Kontrollgruppe einige, von der Morphologie her, chondrozytenähnliche Zellen mit umgebenden Lakunen gesehen werden (Abb. 10D). In den mit chondrogenen Differenzierungsmedium kultivierten Gruppen nahmen fast alle Zellen an Tag 21 eine chondrozytenähnliche Morphologie an, wobei die unter Zusatz von BMP-2 kultivierten Konstrukte Zellen mit deutlich größere Lakunen aufwiesen (Abb. 10G und H), als in den Konstrukten die unter Zusatz von TGF- β 1 (Abb. 10K und L) kultiviert wurden.

Die nach 3 Wochen durchgeführte Alzian Blau Färbung zum Nachweis knorpelspezifischer Proteoglykane war für die in serumhaltigen Stammzellmedium kultivierten Konstrukte negativ (Abb. 11A - D), wobei es zu einer geringfügigen bläulichen Anfärbung des MSZ-Kollagengels kam, welche wahrscheinlich aufgrund unspezifischer Interaktionen von Kollagen Hydrogelen mit dem Farbstoff bedingt ist. Konstrukte die unter Zusatz von TGF- β 1 kultiviert

wurden zeigten nach 21 Tagen eine intensive dunkelblaue Anfärbung der extrazellulären Matrix (Abb. 11I-L), was darauf schließen lässt, dass die differenzierten chondrozytenähnlichen Zellen von einer, an polyanionischen, sulfatierten Proteoglykanen reichen EZM umgeben sind. Die mit BMP-2 kultivierten Konstrukte zeigten ebenfalls eine positive Färbung, wobei diese im Vergleich zu der TGF- β 1 behandelten Gruppe wesentlich schwächer ausfiel (Abb. 11E – H).

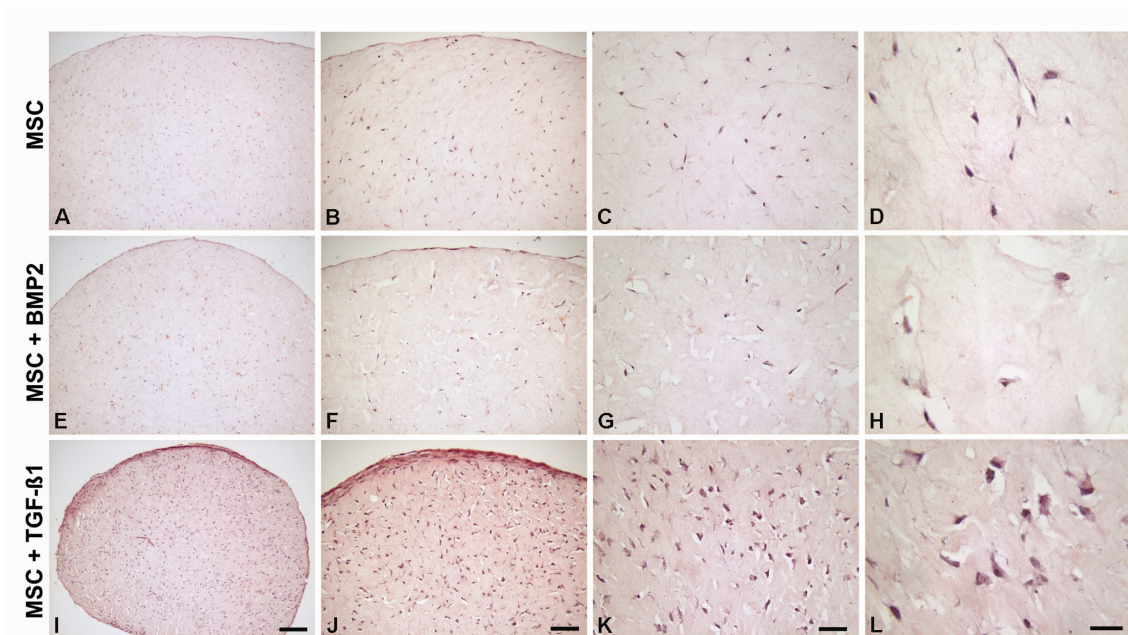


Abb. 10: H/E Färbung der MSZ-Kollagen gel Konstrukte nach dreiwöchiger Kultivierung. Die Konstrukte wurden in serumhaltigem Stammzellmedium (A – D) oder chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 (E – H) oder 10 ng/ml TGF- β 1 (I – L) kultiviert. Bemerkenswerterweise zeigten sich in der Kontrollgruppe vereinzelt Zellen die eine chondrozytenähnliche Morphologie aufwiesen (D). In den Übersichtsbildern ist die mediumabhängige Kontraktion gut zu erkennen, die stärkste Kontraktion fand sich bei Zugabe von TGF- β 1 (I). Maßstab von links nach rechts: 200, 100, 50 und 25 μ m.

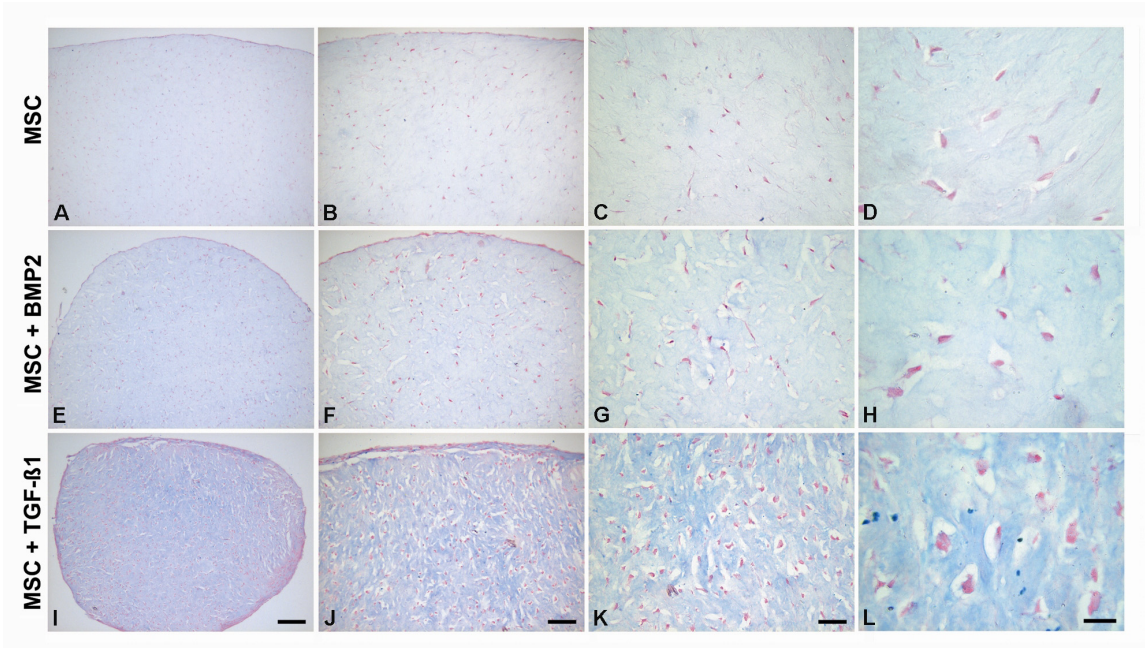


Abb. 11: Alzian Blau Färbung der MSZ-Kollagenegel Konstrukte nach dreiwöchiger Kultivierung. Die Konstrukte wurden in serumhaltigem Stammzellmedium (A – D) oder chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 (E – H) oder 10 ng/ml TGF- β 1 (I – L) kultiviert. Die Akkumulation einer proteoglykanreichen EZM konnte besonders in den mit TGF- β 1 kultivierten Konstrukten nachgewiesen werden (I – L). Auch unter dem Einfluss von BMP-2 wurden knorpelspezifische Proteoglykane gebildet, wenn auch in deutlich geringerem Maße (E – H). Maßstab von links nach rechts: 200, 100, 50 und 25 μ m.

3.6.2 Anti-Kollagen II und X Immunhistochemie

Nach Kultivierung der MSZ-Kollagenhydrogel Konstrukte in serumhaltigen Stammzellmedium für 3 Wochen zeigte sich sowohl die immunhistologische Färbung für Kollagen II (Abb. 12A – D) als auch für X (Abb. 13A – D) negativ.

In den mit TGF- β 1 (Abb. 12I - L) und BMP-2 (Abb. 12E – H) behandelten Gruppen war eine positive Anfärbung von Kollagen II in den histologischen Schnitten nachweisbar. Wie bereits von MSZ-Pelletkulturen bekannt war die extrazelluläre Verteilung von Kollagen II nicht völlig homogen (8,9), sondern zeigte eine fokale Akkumulation. Wobei es in der BMP-2 Gruppe nur vereinzelt zu einer perizellulären Anfärbung (Abb. 12G – H) kam und eine deutlich stärkere, homogenere Verteilung bei den mit TGF- β 1 behandelten Konstrukten auftrat (Abb. 12K – L).

Die Anti-Kollagen X Immunhistochemie (Abb. 13) war positiv in den histologischen Präparaten der mit TGF- β 1 behandelten Konstrukte, es zeigte sich hier ebenfalls eine etwas inhomogene perizelluläre Anfärbung (Abb. 13I – L). Eine noch schwächere Anfärbung mit nur sehr vereinzelt für Kollagen X positiven Arealen zeigte sich in den Konstrukten der BMP-2 Gruppe (Abb. 13E – H).

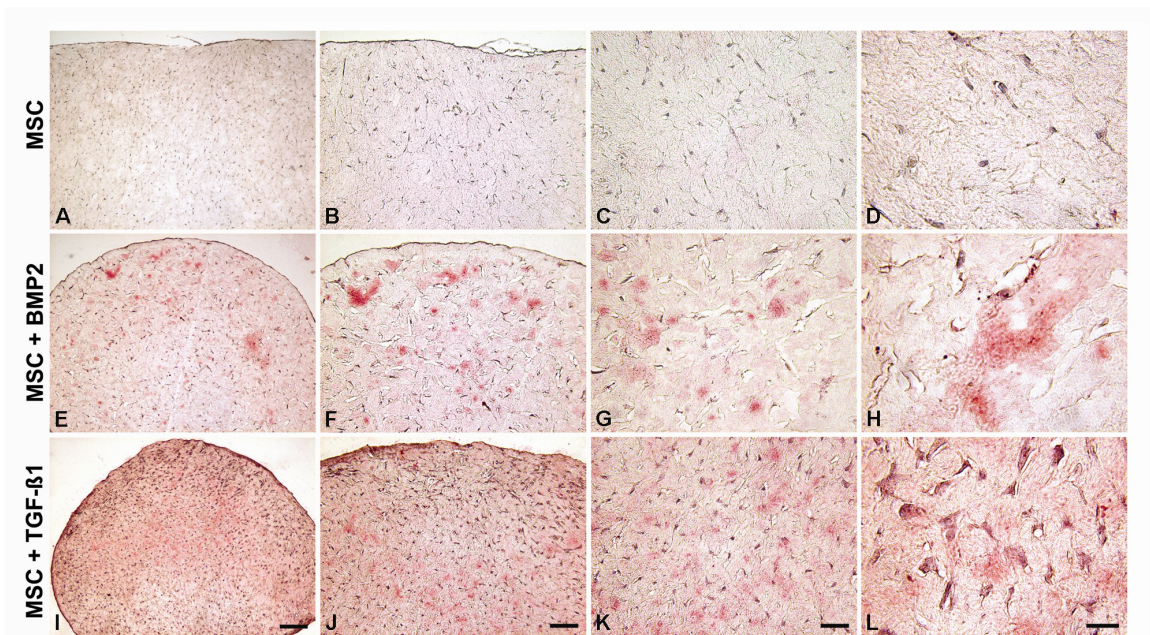


Abb. 12: Immunhistochemische Anfärbung für Kollagen II. Eine positive Anfärbung ist durch die fleckig-rote Anfärbung der EZM angezeigt und deutet auf die extrazelluläre Deposition von Kollagen II besonders in den mit TGF- β 1 behandelten MSZ-Hydrogel Konstrukten hin (I – L). Allerdings zeigen auch die mit BMP-2 behandelten Konstrukte einzelne positive Areale (E – H). Die Konstrukte der Kontrollgruppe zeigen keine extrazelluläre Ansammlung von Kollagen II (A – D). Maßstab von links nach rechts (I – L): 200, 100, 50 und 25 μ m.

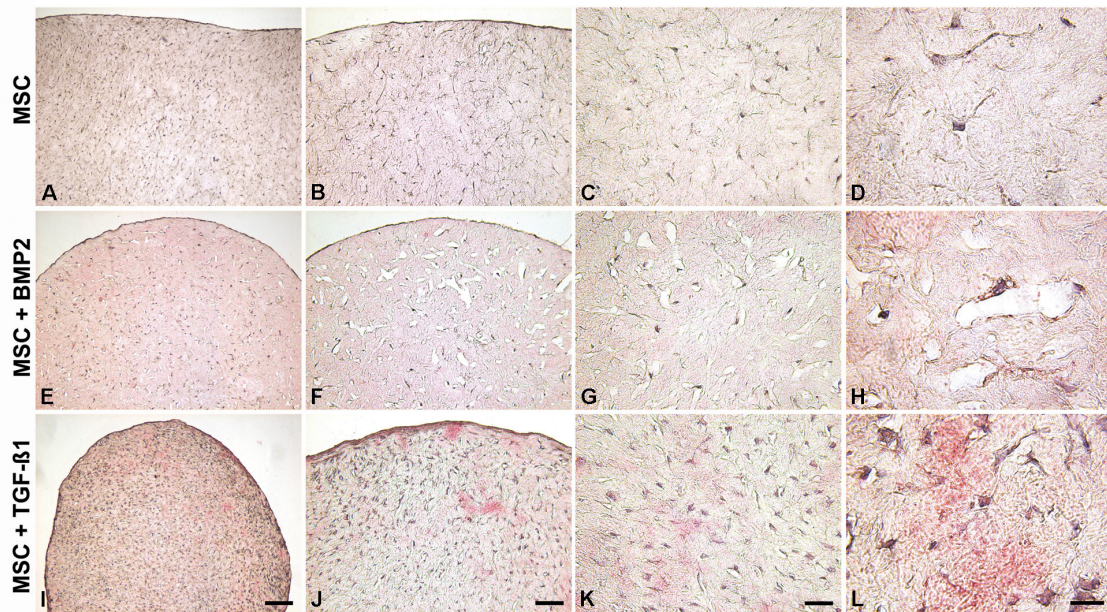


Abb. 13: Immunohistochemische Anfärbung für Kollagen II nach 3 Wochen Kultivierung. Die extrazelluläre Deposition von Kollagen X ist durch die fleckig-rötliche Färbung angezeigt und verdeutlicht das Kollagen X in den mit TGF-β1 behandelten Konstrukten (I – L) sehr schwach, aber auch in Konstrukten der BMP-2 Gruppe vorhanden ist (E – H). Die in serumhaltigem Stammzellmedium kultivierten Konstrukte wiesen kein Kollagen X auf (A – D). Maßstab von links nach rechts (I – L): 200, 100, 50, 25 μm.

4. Diskussion

4.1 Methodische Überlegungen

Die Anwendung matrixbasierter Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation bietet zahlreiche Vorteile im Vergleich zu der „klassischen“ Methode nach Brittberg und Peterson (1994).

Unter den zahlreichen Zellträger-Materialien im klinischen Einsatz zur matrixbasierten ACT gewährleisten besonders Kollagen Hydrogele eine homogene Zellverteilung und sichern den Verbleib der Zellen im Gelenkknorpeldefekt, dieses wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Erste klinische Ergebnisse der Transplantation autologer Knochenmark-Stromazellen zur Deckung 3-4° retropatellarer Knorpeldefekte wurden von Wakitani et al. (2004) publiziert. In dieser Studie wurde 2 Patienten ein Kollagen Hydrogel-MSZ Konstrukt implantiert und anschließend mit einem Periostlappen gedeckt. Ein Jahres Follow-up Untersuchungen zeigten die Füllung des Defektes mit bindegewebig durchsetztem Knorpel und nach einem Beobachtungszeitraum von 4 bzw. 5 Jahren war das klinische Ergebnis signifikant besser als im Vergleich mit denen einer „klassischen“ ACT.

In diesem Zusammenhang könnte eine ex vivo Prädifferenzierung der MSZ in der Trägermatrix mit spezifisch chondrogenen Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung sein um die Bildung von bindegewebigen Knorpel zu verringern bzw. zu vermeiden, da gezeigt wurde das dieser minderwertige mechanische Eigenschaften im Vergleich zu hyalinem Knorpel aufweist.

Aus den genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kollagen Hydrogel, welches sich erfolgreich im klinischen Einsatz für die matrixgekoppelte ACT befindet verwendet um die chondrogene Differenzierung MSZ unter dem Einfluss von BMP-2 und TGF- β 1 zu untersuchen.

4.2 Zellvermittelte Kontraktion, Vitalität und Proliferation

Einer der limitierenden Faktoren zur Verwendung von mit Wachstumsfaktor chondrogen stimulierten MSZ-beladenen Hydrogelen zur Gelenkknorpelrekonstruktion ist die zellvermittelte Kontraktion des Konstruktes. Diese Hydrogelkontraktion führt zu einer signifikanten Erhöhung der effektiven Zellzahl/Volumeneinheit und sollte bereits in der Entwicklungsphase jedes Tissue Engineering Knorpelersatzgewebes berücksichtigt werden. Dabei ist zu beachten, dass nicht terminal differenzierte Zellpopulationen ein wesentlich höheres zellvermitteltes Kontraktionspotential aufweisen als differenzierte Zellpopulationen (Steinberg et al., 1980).

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die Zellproliferation in der verwendeten Matrix entscheidend. Weitere Faktoren die eine Hydrogelkontraktion beeinflussen können sind absolute Zellzahl, Kollagen-/Serumkonzentration, Anzahl und Länge der einzelnen Kollagenfibrillen und zusätzlich der zur chondrogenen Differenzierung verwendete Wachstumsfaktor (Schmitt et al., 2003; Yokoyama et al., 2005; Lewus und Naumann, 2005).

In der vorliegenden Studie betrug die Kontraktion der Hydrogele ca. 30 bis 40% in der Kontrollgruppe (10% FCS), 40 bis 50% in der mit BMP-2 stimulierten Gruppe und bis zu 75% in der TGF- β 1 behandelten Gruppe. Es wurden $2,5 \times 10^5$ MSZ/ml in einem 0,3%igen Kollagengel verwendet, welches, im Vergleich zur Chondrozytenanzahl in der klinischen Situation der matrixbasierten ACT mit der CaReS[®]-Technologie, einer geringfügig höheren Zellzahl pro Volumeneinheit entspricht. Andere Publikationen zeigten eine deutlich geringere Kontraktion von Kollagen Hydrogelen bei Verwendung von sogar höheren Zellzahlen pro Volumeneinheit bei allerdings 10-fach höherer Kollagenkonzentration von 3% (Yokoyama et al., 2005). Bei Kultivierung der MSZ-Hydrogele unter Zusatz von fötalem Kälberserum wurde von anderen Arbeitsgruppen bei Verwendung von 10% FCS in Abhängigkeit von der Kollagenfibrillegroße und verwendeter Zellzahl eine mehr als 50%-ige Kontraktion beobachtet (Lewus und Naumann, 2005). Aufgrund dieser Tatsache muss in Betracht gezogen werden, das durch Hinzufügen von kurzen

Kollagenfibrillen eine deutlich reduzierte zellvermittelte Kontraktion, bei unveränderter Permeabilität des Konstruktes und Vitalität der Zellen, erreicht werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden das durch Cross-linking zwischen Kollagenfibrillen und durch Thiol funktionalisierte Hyaluronsäurederivate eine Verbesserung der strukturellen Integrität der Kollagen Hydrogele erzielt werden kann, was zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der kontraktile Potenz von Fibroblasten führte (Mehra et al., 2006). Diese Erkenntnis könnte zu einer Stabilisierung der von uns verwendeten Hydrogele beitragen und so die in unseren Versuchen beobachtete MSZ-vermittelte Kontraktion verringern bzw. vermeiden.

Kobayashi et al. (2006) konnten in ihrer Studie zeigen das SMAD3 eine Schlüsselrolle in der TGF- β 1 vermittelten Kontraktion von Fibroblasten spielt und das α -SMA, welches ein durch die SMAD3-Signalkaskade upstream reguliertes Gen ist, essentiell zur Kontraktion beiträgt. Ob nun die Aktivierung ähnlich strukturierter Signalkaskaden, wie etwa SMAD1/-5, in der von uns beobachteten BMP-2 vermittelten Hydrogelkontraktion von Bedeutung ist und weshalb eine geringer ausgeprägte Kontraktion im Vergleich zu der TGF- β 1 stimulierten Gruppe auftritt bedarf weiterer Untersuchungen.

Die histochemischen Analysen nach 21 Tagen zeigten eine sehr homogene Zellverteilung im Hydrogel in allen 3 Gruppen, wobei unter dem Einfluss von TGF- β 1 eine wesentlich höhere relative Zelldichte im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtet wurde. Die Kernfrage bezüglich der Zelldichte ist ob die Ursache hierfür in einer gesteigerten Zellproliferation unter TGF- β 1 oder der höheren zellvermittelten Kontraktion des Hydrogels liegt. Vorläufige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die höchste Proliferationsraten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der TGF- β 1 behandelten Gruppe zwischen Tag 6 und Tag 9 zu beobachten sind, wobei im Vergleich die Proliferation in der Kontrollgruppe um das 2-fache höher war. Im Anschluss an Tag 9 kam es in beiden Gruppen allerdings zu keiner weiteren Zellzahlvermehrung.

Wir konnten ebenfalls in beiden Gruppen an Tag 21 keine nennenswerte Anzahl an apoptotischen oder nekrotischen Zellen im Kollagen Typ I Hydrogel

mittels Annexin V-Cy3 Assay nachweisen. Diese Resultate zusammen genommen lassen vermuten, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe, unter Einfluss von TGF- β 1 eine schnelle chondrogene Differenzierung der MSZ im Kollagen Hydrogel zu Kosten der Proliferationskapazität auftritt und das die höhere relative Zelldichte hauptsächlich aufgrund der Wachstumsfaktor bedingten Differenzierung der MSZ mit konsekutiver Produktion von Extrazellulärmatrix und Kontraktion des Konstruktes einher geht.

4.3 Chondrogene Differenzierung von MSZ

In einer Studie von Yoneno et al. (2005) wurde die chondrogene Differenzierung von humanen MSZ in einem 0,3%-igen Kollagen Gel unter dem Einfluss von 10 ng/ml TGF- β 3 beschrieben. Es konnten zellmorphologisch zumeist chondrozytenähnliche Zellen nachgewiesen werden. Histochemische Analysen zeigten eine positive Toluidin-Blau Färbung und es kam extrazellulär zu einer Akkumulation von knorpelspezifischen GAGs. Des Weiteren konnte bei Verwendung von 5×10^6 MSZ/ml eine zeitabhängige Genexpression von Kollagen II und X mit maximaler Intensität an Tag 15 nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte diese Arbeitsgruppe bei Verwendung von 5×10^5 Zellen/ml keine signifikante Akkumulation von GAGs oder Genexpression von Kollagen II oder X an Tag 20 nachweisen. Unsere Studie zeigt im Gegensatz dazu, dass eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ MSZ/ml ausreichend ist um eine homogene Zellverteilung im Hydrogel und eine chondrogene Differenzierung der Zellen, unter Zusatz von 10ng TGF- β 1/ml und Verwendung einer Kollagenkonzentration von 0,3%, zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang ist auf die Tatsache hinzuweisen, das Yoneno et al. in ihrer Studie MSZ nach 4- bis 6-facher Passagierung verwendeten, unsere Arbeitsgruppe hingegen durch den direkten Zugriff auf Patientenmaterial routinemäßig MSZ in Passage 1 verwendet. Dies ist von entscheidender Bedeutung da man durch Arbeiten von Muraglia et al. (2000) weiß, dass die Differenzierungs- und Proliferationskapazität von MSZ stark von der Anzahl der Zellpassagen

abhängig ist. Ein anderer Grund für die Unterschiede der Untersuchungen könnte eine höhere chondrogene Potenz des von uns verwendeten Kollagen I Hydrogels, im Sinne einer unterschiedlichen biologischen ultrastrukturellen Komposition und chondroinduktiven Kapazität, sein. Zusätzlich ist es möglich das unser verwendetes Kollagen I Hydrogel ein anderes Kontraktionsverhalten aufgrund unterschiedlicher ultrastrukturellen Aspekte aufweist und so die von uns beobachtete starke Kontraktion eine bessere Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und konsekutiv eine N-cadherin vermittelte Signalkaskade erlaubt, welches für die chondrogene Differenzierung besonders bei niedrigen Zelldichten von essentieller Bedeutung ist (Woodward und Tuan, 1999).

Vergleichende Studien von Barry et al. (2001) zeigten eine höhere chondrogene Induktion von TGF- β 3 im Vergleich zu TGF- β 1 in einem Pellet-Kultursystem. In Bezug auf unsere Arbeit und den Ergebnissen von Yoneno et al. lässt sich vermuten das verschiedene Zellkultursysteme (Pellet vs. Kollagen I Hydrogel) unterschiedliche Sensitivität gegenüber chondrogenen Wachstumsfaktoren aufweisen und das TGF- β 1 in dem von uns verwendete Hydrogel eine stärkere chondrogene Induktion verursacht.

In einer weiteren kürzlich erschienenen Arbeit von Yokoyama et al. (2005) wurden aus der Synovia isolierte Stammzellen in einem 3%-igen Kollagen Typ I Hydrogel (Atelocollagen, Tokyo, Japan) verkapselt, allerdings wurden hier weitaus höhere als von uns beschriebene Zellkonzentrationen verwendet (5×10^7 und 1×10^8 Zellen/ml). Zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung wurde dem Zellkulturmedium und/oder dem Hydrogel vor der Zellverkapselung ein Wachstumsfaktor-Mix aus 500 ng/ml BMP-2, 10 ng/ml TGF- β 3 und 100 nM Dexamethason zugesetzt, wobei die stärkste chondrogene Differenzierung der MSZ bei Zusatz der Zytokine zu beidem, Hydrogel und Zellkulturmedium, beobachtet wurden.

Der Zusatz von chondrogenen Wachstumsfaktoren direkt in das Kollagen Konstrukt stellt eine interessante Strategie dar, die in der Zukunft positiven Einfluss auf das Knorpel Tissue Engineering haben könnte. Bemerkenswerterweise kam es in den so behandelten Hydrogelen nur zu einer Kontraktion von ca. 30% nach Tag 1 und in der Folgezeit konnte bis zum Tag

21 keine weitere Kontraktion festgestellt werden. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in der Verwendung eines 3%-igen Kollagengehaltes, also 10-fach höher als von uns verwendet. Nach 3 Wochen Kultivierung der Konstrukte konnten immun-/histochemisch ebenfalls Proteoglykane und Kollagen II, nicht allerdings Kollagen X, in der EZM nachgewiesen werden. Allerdings wurde in dieser Studie leider keine RT-PCR für Kollagen X durchgeführt.

Diese publizierten Daten führen zur der Annahme, dass der Zusatz von BMP-2 eventuell die Genexpression von Kollagen X inhibiert und die MSZ somit keine terminale Differenzierung durchlaufen und in einem nicht hypertrophen Stadium arretiert werden. Wobei die hier verwendeten pluripotenten Vorläuferzellen der Synovia entstammen und nicht eindeutig geklärt ist ob diese Zellen eine identische chondrogene Potenz besitzen wie aus dem Knochenmark isolierte MSZ. Die stärkste Expression chondrogener Markergene wurde von den Autoren bei der Verwendung von 1×10^8 MSZ/ml beschrieben, allerdings ist unserer Ansicht nach eine Zellkontraktion von 1×10^6 MSZ/ml ausreichend um ein physiologisches Verhältnis zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix herzustellen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellkonzentration von 2.5×10^5 MSZ/ml Hydrogel hat hauptsächlich 2 Gründe, erstens reflektiert diese Konzentration die physiologische Zellkonzentration in humanem Gelenkknorpel und zweitens besteht bei Verwendung höherer Zellkonzentrationen die Gefahr einer unkontrollierten Kontraktion der Matrix mit kritischer Abnahme der interfibrillären Porengröße und damit Beeinträchtigung der nutritiven Versorgung im Inneren des Konstruktes mit darauf folgender Apoptose der Zellen.

Das temporäre Genexpressionsmuster humaner mesenchymaler Stammzellen während der TGF- β 3 induzierten Chondrogenese in einem Pellet-Zellkultursystem wurde ausführlich von Barry et al. beschrieben und führte zu einer signifikanten Deposition von knorpelspezifischer EZM. Hauptstrukturkomponenten der EZM von Gelenkknorpel sind Kollagen II, als spezifischer Marker für hyalinen Knorpel, und Aggrekan, welches nach Bindung von Link Protein und Hyaluron komplexe Aggregate formt, die das Grundgerüst

der Glycosaminoglykane bilden. Kollagen X hingegen gilt als Marker für hypertrophen Knorpel in der kalzifizierenden Zone des Gelenkknorpels sowie der Wachstumsfuge des sich entwickelnden Skelettsystems und damit als Zeichen einer terminalen Differenzierung von Chondrozyten, die in der Apoptose endet. In letzter Zeit lässt aber eine gewisse Anzahl von Publikationen darauf schließen das Kollagen X in limitierten Mengen auch in normalem Gelenkknorpel vorhanden ist bzw. exprimiert wird (Barry et al. 2001). Nach 21 Tagen zeigten sich in unserer Studie bei den mit TGF- β 1 kultivierten Konstrukten in der histochemischen Analyse chondrozytenähnliche Zellen mit typischen perizellulären Lacunae in einer proteoglykanreichen EZM. Immunohistochemische Färbungen zeigten ebenfalls die extrazelluläre Akkumulation von vornehmlich Kollagen II und deutlich geringer Kollagen X. Mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR konnte eine zeitabhängige ansteigende Genexpression von Kollagen II, Aggrekan und Kollagen X, wie sie bereits für Pelletkultursysteme unter dem Einfluss von TGF- β 1 beschrieben wurde, nachgewiesen werden (Barry et al., 2001).

Im Gegensatz dazu fand sich in der BMP-2 behandelten Gruppe histochemisch ein eher länglicher als runder Zelltyp. Im Vergleich zu TGF- β 1 zeigte sich der Nachweis von Glykosaminoglykanen in der EZM nach Alzian Blau Färbung deutlich schwächer, immunhistochemisch war Kollagen II nur lokal nachweisbar und Kollagen X war hier im Vergleich zu den Negativkontrollen so gut wie nicht nachweisbar. Der Grund für die, immun-/histochemisch nachgewiesene, eindeutig schwächere Akkumulation von knorpelspezifischer EZM resultiert vermutlich aus der im Vergleich zu TGF- β 1 später einsetzenden chondrogenen Differenzierung der MSZ im Hydrogel. Ein um ca. 3 bis 6 Tage verzögerter typischer Differenzierungszyklus mit verglichen zu TGF- β 1 verspäteter Genexpression von Kollagen II, AGN und Kollagen X konnte aber auch in der BMP-2 behandelten Gruppe nachgewiesen werden. Dabei ist zu erwähnen, dass an Tag 10 sämtliche histologischen Verfahren und RT-PCR hinsichtlich der Expression knorpelspezifischer Marker in der BMP-2 behandelten Gruppe negativ ausfielen. Trotz alledem kommt es auch in dieser Gruppe zwischen Tag 10 und 21 zu zunehmenden chondrogenen Differenzierung. Um allerdings die

Frage zu beantworten ob und in welchen Zeitrahmen es unter BMP-2 Zugabe zu einer mit TGF- β 1 vergleichbaren Differenzierung der Zellen kommt oder ob hier bedeutsame Unterschiede der zugrunde liegenden Prozesse bestehen, kann nur nach Analyse von Langzeit-Experimenten über mindestens 6 Wochen beantwortet werden. Diese Langzeitversuche könnten auch zeigen ob es nach erfolgter chondrogener Differenzierung der Zellen zu einer terminalen Differenzierung und anschließender Apoptose nach Tag 21 kommt und ob die in der Kontrollgruppe unter Zusatz des serumhaltigen Stammzellmediums gefundene positive Aggrekan Genexpression an Tag 18 und 21 ein erstes Anzeichen beginnender chondrogener Differenzierung, zumindest einzelner Zellen, darstellt.

4.4 Zukunftsperspektiven

Intensive Forschungsbemühungen zur Entwicklung neuer Strategien der Gelenkknorpelrekonstruktion in den letzten Dekaden trugen zu einem besseren Verständnis der Gelenkknorpelphysiologie und -regeneration bei. Eine spezielle Bedeutung fällt hierbei verschiedenen Wachstumsfaktoren zu, die als Reaktion auf endogene oder exogene Reize ausgeschüttet werden und gewebe-/zellspezifische Mechanismen anstoßen. Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass TGF- β , BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) und IGF-I (Insulin Like Growth Factor), zu einer Steigerung der Kollagen II und Proteoglykansynthese von Chondrozyten in verschiedenen Zellkultursystemen führen (Posever et al., 1995; Trippel, 1995; Sah et al., 1996). Ebenfalls wurde dies für Mitglieder der BMP-Familie (Bone Morphogenetic Protein) nachgewiesen (Sato und Urist, 1984). Weitgehend ungeklärt bleiben jedoch die Wechselwirkungen einzelner Wachstumsfaktoren untereinander, sowie ihre Wirkung und Potenz in vivo.

Eine weitere Herausforderung bleibt bislang die therapeutische in vivo Applikation von Wachstumsfaktoren mit einer gleich bleibenden biologisch wirksamen Konzentration im Zielgewebe (Gerich et al., 1997) bzw. die

Synthese von Wachstumsfaktoren durch ortsständige Zellen oder durch Zellen, die in den Knorpeldefekt implantiert werden. Hier bietet die Technologie des Gentransfers neue Möglichkeiten um ein für einen bestimmten Wachstumsfaktor kodierendes Gen in die Zielzelle einzuschleusen und nach Implantation eine temporäre Überexpression zu erreichen (Nikol und Höfling, 1996; Palmer et al., 2005).

Die Wahl des Trägermaterials, in dem MSZ implantiert werden können, spielt eine entscheidende Rolle bei den matrixbasierten Verfahren der Gelenkknorpelrekonstruktion. Das Transplantat sollte gemäß den von Hunziker (1999) postulierten Anforderungen eine ausreichende Porosität besitzen um eine Migration von Chondrozyten aus dem umgebenden nativen Knorpel zu ermöglichen, dies würde auch zu einer verbesserten Integration des Konstruktes in die Gelenkfläche mit sich bringen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass durch Eröffnung der subchondralen Lamelle und dem konsekutiven Einwachsen von Vorläuferzellen in ein darüber befindliches zellfreies Transplantat, bei kleineren Gelenkknorpeldefekten evtl. die Möglichkeit einer zellfreien einzeitigen Therapie mit Stimulation der mesenchymalen Stammzellen durch Mikrofrakturierung in Verbindung mit einem Implantat besteht (Behrens, 2005). Hier wäre ein Implantat wünschenswert das chemotaktische Eigenschaften besonders für Chondroprogenitorzellen aufweist und zusätzlich die chondrogene Differenzierung nach Migration in das Biomaterial bedingt. Ebenfalls ist die biochemische Komposition in Einheit mit den vorliegenden ultrastrukturellen Charakteristika von hoher Bedeutung, so konnten Li et al. zeigen, dass durch „electrospinning“ hergestellte Nanofibers eine signifikante Auswirkung auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen haben (Li et al. 2005 und 2006)

Die ex vivo Prädifferenzierung eines mit MSZ beladenen Implantates stellt eine weitere Möglichkeit zur Sicherung einer kontrolliert ablaufenden Chondrogenese dar. Neben optimierten Kultivierungsbedingungen mit chondrogenen Wachstumsfaktoren, spielt sicherlich auch die eingesetzte Zellzahl/-dichte eine entscheidende Rolle. Wobei hier zu klären sein wird, ob

und in welchem Ausmaß chondrogen differenzierte Stammzellen nach Implantation phänotypisch stabil und vital bleiben, oder im Mikroenvironment des Kniegelenkes dedifferenzieren bzw. eine terminale Differenzierung durchlaufen und in die Apoptose übergehen.

Arbeiten der vergangenen Jahre auf dem Gebiet der Mechanobiologie konnten einen positiven Einfluss unterschiedlicher physikalischer Stimuli, wie Kompression oder zyklisch hydrostatischer Druck, auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen zeigen (Carter et al., 1998; Mouw et al., 2006; Angele et al., 2003).

Diese Überlegungen zeigen die Komplexität des Tissue Engineering im Bereich der Gelenkknorpelrekonstruktion. Wobei hier die Trias von Zellträger, Zellen und Wachstumsfaktoren bzw. induktiven Stimuli eine grundlegende Bedeutung zukommt. Die Aufgabe in den nächsten Jahren wird sein, viel versprechende experimentelle Ansätze zur Therapie fokaler Gelenkknorpeldefekte, wie den in unserer Arbeit beschriebenen, zu detektieren, Schwachstellen der derzeitigen klinischen Verfahren offen zu legen und unter Nutzung der uns zur Verfügung stehenden Kerntechnologien aus den Materialwissenschaften, der Zellbiologie und der Medizin eine weitere Verbesserung der Gelenkknorpelregeneration einzuleiten.

5. Zusammenfassung

Das Feld der operativen Therapie traumatischer und degenerativer Gelenkknorpeldefekte erwies sich in den vergangenen Dekaden als äußerst komplex und stellt bis heute eine große klinische Herausforderung für jeden Chirurgen dar. Die derzeit angewandten operativen Behandlungsmaßnahmen zeigen vor allem aufgrund der limitierten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels oftmals unbefriedigende Langzeitergebnisse mit fortschreitender Degeneration der Gelenkfläche und letztendlich Zerstörung der funktionellen Einheit des Kniegelenkes. Dies und der damit verbundene sozioökonomische Einfluss auf die Gesellschaft war und ist ständiger Motor und Ausgangspunkt für das unermüdliche Bemühen neue biologische Behandlungskonzepte und Technologien für die Therapie von Gelenkknorpeldefekten zu entwickeln.

Bis Anfang der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts standen nur operative Möglichkeiten, wie Lavage/Debridement, Abrasionsarthroplastik, Pridie-Drilling und der osteochondrale Transfer/Mosaikplastik, zur Verfügung die nur kurzfristig zu einer Symptomreduzierung führten, mit der Ausbildung eines mechanisch minderwertigen Ersatzgewebes einhergingen oder andere operationstechnische Nachteile aufwiesen, so dass langfristig hier nur von einer Gelenkknorpelreparatur nicht aber –regeneration auszugehen war. Daher stellte das 1994 von Brittberg und Peterson publizierte Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation einen Meilenstein in der operativen Therapie der Gelenkknorpeldefekte dar, zugleich war es das erste Verfahren mit dem Anspruch einer zellbasierten Gelenkknorpelregeneration im Sinne des Tissue Engineering.

Heute kommen in der Klinik immer mehr matrixbasierte Verfahren der ACT zum Einsatz und die Verwendung von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark als Zellquelle ist Gegenstand zahlreicher viel versprechender Ansätze für eine matrixbasierte autologe Stammzelltransplantation (AST) für die operative Regeneration von Gelenkknorpeldefekten.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der chondrogenen Differenzierung von humanen MSZ in einem Kollagen I Hydrogel unter dem Einfluss verschiedener chondrogener Wachstumsfaktoren. Hierzu wurden multipotente Zellen aus humanem Knochenmark isoliert, amplifiziert und mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in dem Hydrogel verkapselt. Diese Konstrukte wurde für 3 Wochen entweder in einem chemisch definierten, serumfreien Medium unter Zusatz von BMP-2 (100ng/ml) bzw. TGF- β 1 (10ng/ml) oder in herkömmlichen Stammzellmedium unter Zusatz von 10% FCS kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der chondrogenen Differenzierung wurden RT-PCR-Analysen des Konstruktes durchgeführt, um die unterschiedliche Expression der chondrogenen Markergene darzustellen. Zusätzlich wurden nach 3 Wochen immun-/histochemische Verfahren eingesetzt um die Akkumulation knorpelspezifischer Extrazellulärmoleküle nachzuweisen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass in einem Kollagen Typ I Hydrogel verkapselte MSZ aus humanem Knochenmark, in einem serumfreien, chemisch definierten Medium unter Zusatz von TGF- β 1 in 3 Wochen einen definierten chondrogenen Differenzierungszyklus unterlaufen. Nach 3 Wochen konnte mittels RT-PCR die Expression knorpelspezifischer Markergene und immun-/histochemisch die Akkumulation von entsprechender EZM nachgewiesen werden. Unter Einfluss von BMP-2 kam es ebenfalls zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung der Zellen, in der RT-PCR zeigte sich die Expression der entsprechenden Markergene, allerdings im Vergleich zu TGF- β 1 um 3-6 Tage verzögert, so dass eine knorpeltypische EZM in den histologischen Analysen deutlich schwächer nachweisbar war. Ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors konnten in einem serumhaltigen Stammzellmedium lediglich frühe Markergene der chondrogenen Differenzierung mittels RT-PCR nach 3 Wochen nachgewiesen werden und histologisch zeigte sich kein Anhalt für die Produktion knorpelspezifischer EZM.

Die von uns gezeigten Daten sind bezüglich des Einsatzes humaner MSZ in dem bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Trägermaterial äußerst viel versprechend und könnten zu einer weiteren Verbesserung der

zellbasierten matrixgekoppelten Verfahren zur Gelenkknorpelregeneration beitragen.

Allerdings sind im Vorfeld weitere Studien bezüglich der zellvermittelten Kontraktion der verwendeten Hydrogele nötig. Anzustreben wäre eine Vermeidung bzw. Minimierung der Kontraktion bei Einsatz von multipotenten Zellen. Hierzu gibt es bereits viel versprechende experimentelle Studien die durch chemische Cross-linking Verfahren oder den Einsatz höherer Kollagenkonzentrationen eine deutliche Reduzierung der Kontraktion beschreiben.

Da die Anwendung von Wachstumsfaktoren, im speziellen TGF- β 1, ex-/in vivo derzeit für keine der operativen Strategien zur Gelenkknorpelregeneration zugelassen und eine mögliche Zulassung ungewiss ist, gilt es zunächst zu untersuchen ob die natürliche physiologische Situation nach Implantation in das Kniegelenk ausreicht um mit den hier vorhandenen, sekretierten Zytokinen und mechanischen Stimuli entsprechende Signalkaskaden aktivieren zu können, die zu einer chondrogenen Differenzierung der transplantierten Zellen führen. Zu dieser Fragestellung wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ein in vivo Mini-Pig Modell etabliert, in dem gezielt die oben angeführten Fragestellungen untersucht werden können.

Es bleibt allerdings weiterhin abzuwarten ob in der nahen Zukunft mesenchymale Stammzellen in den matrixbasierten Verfahren zur Gelenkknorpelrekonstruktion Einzug halten. Weitere intensive Forschung bezüglich einer optimierten chondrogenen Differenzierung der Stammzellen und der Sicherstellung eines stabilen Phänotyps nach erfolgter Differenzierung sind notwendig, zusätzlich kann die Entwicklung neuer biomimetischer Trägermaterialien zu einer weiteren Verbesserung operativer Strategien der Gelenkknorpelregeneration beitragen.

6. Literaturverzeichnis

Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum* (2001) Jun;44(6):1304-12.

Andereya S, Maus U, Gavenis K, Muller-Rath R, Miltner O, Mumme T, Schneider U. First clinical experiences with a novel 3D-collagen gel (CaReS) for the treatment of focal cartilage defects in the knee. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* (2006) May-Jun;144(3):272-80.

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* (2003) 21:451-457.

Athanasion KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow van C. Interspecies comparison of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* (1991) 9:330-340.

Aydelotte MB, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* (1988) 18:205-222.

Aydelotte MB, Greenhill R, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan Metabolism. *Connect Tissue Res* (1988) 18:223-234.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* (2004) Jul-Sep;8(3):301-16. Review.

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* (2001) 268:189-200.

Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaismaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Nöth U, Perka C, Richter W, Schäfer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K. Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Geweberegeneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop* (2004) 142:529-539.

Bell E, Ehrlich P, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent of full thickness. *Science* (1981) 221:1052-1054.

Bosch U, Krettek C. Tissue Engineering von Sehnen- und Ligamentgewebe. *Unfallchirurg* (2002) 105:88-94.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Perterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine* (1994) 331:889-895.

Bruckner P, van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microscop Res Tech* (1994) 28:378-84.

Buckwalter JA. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse and abuse: Experimental studies. *J Rheumatol* (1995) 22(Suppl 43):13–15.

Buckwalter JA. Mechanical Injuries of Articular Cartilage. In Finerman G (ed). *Biology and Biomechanics of the Traumatized Synovial Joint*. Park Ridge, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons (1992) 83–96.

Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med.* (1997) Nov-Dec;25(6):873-81. Review.

Buckwalter JA. Articular Cartilage Injuries. *Clin Orthop Related Res* (2002) 402:21-37.

Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* (1997) 79A:600–611.

Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage II: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* (1997) 79A:612–632.

Buckwalter JA, Martin JA, Mankin HJ: Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* (2000) 49:481–489.

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* (1992) 282:250-272.

Burke JF, Yannas IV, Quimby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* (1981) 194:413-448.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21th century. *Trends Mol Med* (2001) 7:259-264.

Carney SL, Muir H. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev* (1988) 68:858-910.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* (2001) 44:1928-1942.

Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell favors tumor growth in allogenic animals. *Blood*. (2003) Nov 15;102(10):3837-44.

Donohue JM, Buss D, Oegema TR, Thompson RC: The effects of indirect blunt trauma on adult canine articular cartilage. *J Bone Joint Surg* (1983) 65A:948–956.

Domm C, Fay J, Schunke M, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopäde* (2000) 29:91-99.

Dourado GS, Adams ME, Matyas JR, Huang D. Expression of biglycan, decorin and fibromodulin in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* (1996) Sep;4(3):187-96.

Fell HB. *J. Morphol. Physiol* (1925) 40:417–459.

Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: A 21th century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* (2001) 72 :577-591.

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg* (1980) 62A:79–89.

Gebhard PM, Gehrsitz A, Bau B, Soder S, Eger W, Aigner T. Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general

shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res* (2003) 21:96-101.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2003) 55:1531–1546.

Gerich TG, Lobenhoffer HP, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Virusvermittelter Gentransfer in die Patellarsehne. Eine experimentelle Studie am Kaninchen. *Unfallchirurg* (1997) 100:354-362.

Hangody L, Karpati Z. A new surgical treatment of localized cartilaginous defects of the knee. *Hungarian J Orthop Trauma* (1994) 37:237.

Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg* (2001) 18:35-53.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* (1992) 13(1):81-8.

Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* (2003) 32:70-76.

Holtzer H, Abbott J, Lash J, and Holtzer S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1960) 46, 1533–1542.

Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med* (2003) 5:93-108.

Hulmes DJ, Miller A, Molecular packing in collagen, *Nature* 293 (1981) 234–239.

Hunter W. On the structure and disease of articulating cartilage. *Philos Trans R Soc Lond* (1743) 42b:514-521.

Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage – Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Related Res* (1999) 367:135-S46.

Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* (2002) 10:423-463.

Hunziker EB, Quinn TM. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J Bone Joint Surg Am.* (2003) 85-A Suppl 2:85-92.

Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg (Am)* (2001) 83:53-64.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* (1997) 64:295-312.

Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy* (2002) 9:642-647.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez 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* (2002) Jul 4;418(6893):41-9.

Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty. Historical and pathologic perspective present status. *Arthroscopy* (1986) 2:54-69.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Re* (1998) 238:265-272.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J.* (1996) May 15;316 (Pt 1):1-11. Review.

Kim HKW, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion—an experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg* (1991) 73A:1301–15.

Khoshnoodi J, Cartailier JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem.* (2006) Dec 15;281(50):38117-21.

Kobayashi T, Liu X, Wen FQ, Kohyama T, Shen L, Wang XQ, Hashimoto M, Mao L, Togo S, Kawasaki S and others. Smad3 mediates TGF-beta1-induced collagen gel contraction by human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 339(1):290-5.

Kruger T, Wohlrab D, Reichel H, Hein W. The effect of arthroscopic joint debridement in advanced arthrosis of the knee joint. *Zentralbl Chir* (2000) 125:490–3.

Kühn K, The collagen family-variations in the molecular and supermolecular structure. *Rheumatology* (1986) 10:29–69.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* (1993) 260:920-926.

Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA Jr.. Tissue engineering: Orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* (1999) 1:19-46.

Lewus KE, Nauman EA. In vitro characterization of a bone marrow stem cell-seeded collagen gel composite for soft tissue grafts: effects of fiber number and serum concentration. *Tissue Eng* (2005) 11(7-8):1015-22.

Li WJ, Jiang YJ, Tuan RS. Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size. *Tissue Eng.* (2006) Jul;12(7):1775-85.

Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* (2005) Sep;26(25):5158-66.

Linschoten N, Johnson C. Arthroscopic debridement of knee joint arthritis: effect of advancing articular degeneration. *J South Orthop Assoc* (1997) 6:25–36.

Loboa EG, Wren TA, Beaupre GS, Carter DR. Mechanobiology of soft skeletal tissue differentiation—a computational approach of a fiber-reinforced poroelastic model based on homogeneous and isotropic simplification. *Biomech Model Mechanobiol.* 2003 Nov;2(2):83-96.

Loeffler M, Potten CS. Stem cells and cellular pedigrees – a conceptual introduction. *Stem cells*, C.S. Potten. London, Academic press (1997) 1-27.

Loening AM, James IE, Levenston ME: Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* (2000) 381:205–212.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* (1998) 4:415-428.

Magnuson PB. Joint debridement surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynecol Obstet* (1941) 73:1-9.

Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg (Am)* (1982) 64:460-466.

Manning W, Bonner W. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum* (1967) 10:235-239.

Marler JJ, Upton J, Langer R, Vacanti JP. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 33:165-182.

Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vecsei V. Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results. *Radiologe* (2004) Aug;44(8):763-72. Review.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* (2000) 113 (Pt 7):1161-6.

Maroudas A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and osteoarthritic cartilage. *Nature* (1976) 260:808-809.

Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* (2000) 37:129-140.

Martin SJ., Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* (1995) 182:1545-1556.

Mayne R, Brewton RG, New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1993) 5:883–890.

McGinley B, Cushner F, Scott W. Debridement arthroscopy. 10-year followup. *Clin Orthop* (1999) 367:190–4.

Mehra TD GK, Shu XZ , GD Prestwich, Clark RAF. Molecular Stenting with a Crosslinked Hyaluronan Derivative Inhibits Collagen Gel Contraction. *J Invest Dermatol* (2006) advance online publication, 1 June 2006.

Metz J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels, In: Erggelet C, Steinwachs M (Ed), *Gelenkknorpeldefekte*, Steinkopff Verlag Darmstadt (2001), Seite 3-14.

Mitchell N, Shepard N. Effect of patellar shaving in the rabbit. *J Orthop Res* (1987) 5:388–92.

Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *BioEssays* (1995) 17:1039-1048.

Mow VC, Rosenwasser MP: Articular Cartilage: Biomechanics. In Woo SL, Buckwalter JA (eds). *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissue*. Park Ridge, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons (1988) 427–463.

Myllyharju J, Kivirikko KI, Collagens and collagen-related diseases, *Ann. Med.* 33 (2001) 7 – 21.

Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, Caplan AI. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from periosteum. *Bone* (1990) 11:181-188.

Nikol S, Höfling B. Aktueller Stand der Getherapie. *Dt Ärztebl* (1996) 93, Heft 41, S.2620-2628.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* (2002a) 20:1060-1069.

Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* (2002b) 8:131-144.

Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL: Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. *J Bone Joint Surg* (1980)62A:687–695.

Noyes FR, Stabler CL: A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* (1989) 17:505–513.

Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg (Br)* (1961) 43:752-757.

Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani C. Gene-Induced Chondrogenesis of Primary Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Molecular Therapie* (2005) 12:219-228.

Peterson L, Menche D, Grande D. Chondrozyte transplantation – an experimental model in the rabbit. *Trans Orthop Res Soc* (1984) 9:218.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* (2000) 374:212-234.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1999) 284:143-147.

Posever J, Phillips FM, Pottenger LA. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta 1, insulin-like growth factor-1, and insulin on human osteoarthritic articular cartilage explants. *J Orthop Res* (1995) 13:832-837.

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

Rockett P, Wageck J. The reparative response with abrasion arthroplasty. ISAKOS 1997 Biennial Congress, Buenos Aires, 11-16 May.

Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* (1994) Aug 1;28(5):385-97. Review.

Rudert M, Wirth CJ. Die Knorpelzelltransplantation. Experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. *Orthopäde* (1997) 26:741-747.

Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ. Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res* (1996) 14:44-52.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* (2000) Aug;164(2):247-56.

Sato K, Urist MR. Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop* (1984) v 183:180-187.

Schmidt H, Hasse E. Arthroscopic surgical treatment of circumscribed cartilage damage with spongiolization or Pridie drilling. *Beitr Orthop Traumatol* (1989) 36:35–7.

Schmitt B, Ringe J, Haupl 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* (2003) 71(9-10):567-77.

Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartil* (2002) 10:62-70.

Schneider U, Andereya S. First results of a prospective randomized clinical trial on traditional chondrocyte transplantation vs CaReS-Technology. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* (2003) Sep-Oct;141(5):496-7.

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* (2002) 99:4397-4402.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* (1993) 75A: 532–53.

Shum L, Coleman CM, Hatakeyama Y, Tuan RS. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* (2003) May;69(2):102-22.

Sledge S. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med* (2001) 20:365–77.

Sprague N. Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease. *Clin Orthop* (1981) 160:118–23.

Srinivas GR, Barrach HJ, Chichester CO. Quantitative immunoassays for type II collagen and its cyanogen bromide peptides. *J Immunol Methods* (1993) 159:53-62.

Steadman J, Rodkey W, Briggs K, Rodrigo J. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* (1999) 28:26–32.

Steadman JR, Rodkey WG, Singelton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operat Tech Orthop* (1997) 7:300-304.

Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19:477-484, 2003.

Steinberg BM, Smith K, Colozzo M, Pollack R. Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. *J Cell Biol* (1980) 87(1):304-8.

Tew S, Kwan APL, Hann A, Thomson B, Archer CW. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum* (2000) 43:215–25.

Thompson RC, Oegema TR, Lewis JL, Wallace L: Osteoarthritic changes after acute transarticular load: An animal model. *J Bone Joint Surg* (1991) 73A:990–1001.

Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* (1995) 43:129-132.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* (2004) Oct;(427 Suppl):S105-17.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cell and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* (2003) 5(1):32-45. Review.

Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* (1999) 354 (Suppl 1):132-134.

von der Mark K. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone, *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, Academic Press, Orlando, (1999) pp. 3– 29.

van der Mark K, Gauss V, Mark H von der, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* (1977) 267:531-532.

van der Rest M, Garrone R, Collagen family of proteins. *FASEB* (1991) J. 5:2814– 2823.

Wagner H. Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. *Z Orthopädie* (1972) 110:708-715.

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* (2004) 13(5):595-600.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrowmesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* (1995) 18:1417-1426.

Williams JM, Rayan V, Sumner DR, Thonar EJ. The use of intra-articular Na-hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits. *J Orthop Res* (2003) 21:305-311.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* (2000) Aug 15;61(4):364-70.

Woodward WA, Tuan RS. N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine. *Dev Genet* (1999) 24(1-2):178-87.

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* (2005) 322(2):289-98.

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

threedimensional collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res A* (2005) 75(3):733-41.

Zang H, Vrahas MS, Baratta RV, Rosler DM: Damage to rabbit femoral articular cartilage following direct impacts of uniform stresses: An in vitro study. *Clin Biomech* (1999) 14:543–548.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng* (2001) 7:211-228.