

Abteilung für Sportorthopädie der
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff)

**Effekt von Bone Morphogenetic Protein 2 auf die
Knorpel- /Knochenregeneration am Kaninchenmodell -
Histologische und Immunhistologische Ergebnisse**

Daniel Hensler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff**
- 2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel**

Die Dissertation wurde am 19.02.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

**Meinen Eltern.
In Liebe und Dankbarkeit.**

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	8
1.1	Grundlagen	9
1.1.1	Hyaliner Knorpel	9
1.1.1.1	Physiologie	9
1.1.1.2	Struktureller Aufbau	9
1.1.1.3	Chondrozyten	10
1.1.1.4	Extrazelluläre Matrix	11
1.1.2	Klassifikation von chondralen Läsionen	12
1.1.3	Klassifikation von osteochondralen Läsionen	15
1.1.4	Intrinsische Regenerationsfähigkeit von Knorpel	15
1.1.5	Übersicht über aktuelle Therapiemöglichkeiten	16
1.1.5.1	Arthroskopische Lavage, Shaving und Debridement	16
1.1.5.2	Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen	17
1.1.5.3	Periost- / Perichondriumtransplantation	19
1.1.5.4	Osteochondrale Autografts (Mosaikplastik/ OATS/ Mega-OATS)	20
1.1.5.5	Osteochondrale Allografts	22
1.1.5.6	Autologe Chondrozytentransplantation (ACT / MACT)	23
1.1.6	Tissue Engineering	24
1.1.7	Geneherapie	27
1.1.7.1	Nicht-viraler Gentransfer	27
1.1.7.2	Viraler Gentransfer	28
1.1.8	Bone Morphogenetic Protein	29
1.1.8.1	Die Wirkung des BMP-2	30
1.1.8.2	Der BMP-2 Rezeptor und Signalkaskade	31
1.2	Ziel der vorliegenden Arbeit	33
2	Material und Methodik	34
2.1	Material	34

2.2	Methodik.....	36
2.2.1	Versuchsaufbau	36
2.2.2	Tiere und Tierhaltung	36
2.2.3	Anästhesie und postoperative Versorgung	37
2.2.4	Versuchsablauf	38
2.2.4.1	Operationstechnik zur Knorpelzellbiopsie	38
2.2.4.2	Fibrinkleber/Fibrin Clots	39
2.2.4.3	Operationstechnik zur Implantation	39
2.2.4.4	Tiertötung	41
2.2.4.5	Präparation der Femurkondylen	41
2.2.5	Entkalkung und Einbettung	41
2.2.6	Anfertigung von Schnittpräparaten.....	42
2.2.7	Histologische Färbung	42
2.2.7.1	HE Färbetechnik.....	43
2.2.7.2	Alcian-Blau- Färbetechnik	44
2.2.8	Erstellung und Färbung der MMA- Präparate/ -Schnitte	44
2.2.9	Immunhistologische Färbung.....	46
2.2.10	Auswertung der Präparate	49
2.2.10.1	Histologie/MMA	49
2.2.10.2	Immunhistologie	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Ergebnisse der 4- Wochen-Tiere	52
3.1.1	Makroskopische Beurteilung bei Explantation	53
3.1.2	Histologische Ergebnisse.....	54
3.1.2.1	Oberfläche.....	55
3.1.2.2	Extrazelluläre Matrix.....	55
3.1.2.3	Zellverteilung	56
3.1.2.4	Lebensfähigkeit der Chondrozyten.....	56
3.1.2.5	Subchondraler Knochen.....	56
3.1.2.6	Knorpelmineralisation.....	56

3.2	Ergebnisse der 12- Wochen-Tiere	57
3.2.1	Makroskopische Beurteilung nach Explantation	58
3.2.2	Histologische Ergebnisse.....	61
3.2.2.1	Oberfläche.....	61
3.2.2.2	Extrazelluläre Matrix.....	62
3.2.2.3	Zellverteilung	62
3.2.2.4	Lebensfähigkeit der Chondrozyten.....	62
3.2.2.5	Subchondraler Knochen.....	63
3.2.2.6	Knorpelmineralisation.....	63
3.3	Vergleich 4- Wochen-Tiere vs. 12-Wochen-Tiere	66
3.4	Alcian-Blau-Färbung / Proteoglykane	68
3.5	Immunhistologische Ergebnisse	70
4	Diskussion	74
4.1	Methodik- Diskussion	74
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	77
4.3	BMP-2	78
4.4	Schlussfolgerung, Risiken und Ausblick	79
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	83
7	Abbildungsverzeichnis.....	96
8	Danksagung.....	97
9	Lebenslauf	98
10	Veröffentlichungen	100

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AB	Alcian-Blau
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C ₂ H ₄ O ₂	Essigsäure
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
Col 1 / 2	Kollagen I / II
dest.	destilliert
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraacetat
EKG	Elektrokardiographie
et al.	et altera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGF	Fibroblast Growth Factor
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GAG	Glykosaminoglykane
HE	Hämatoxylin-Eosin
hBMP	humans BMP/ Plasmid-BMP
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICRS	International Cartilage Repair Society
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IM	Insertionelle Mutagenese
i.v.	Intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LTR	Long Terminal Repeats

MACT	Matrix-assoziierte Chondrozytentransplantation
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
m^2	Quadratmeter
min	Minute
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
mmol, μ mol	Millimol, Mikromol
mRNA/mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
OATS	Osteochondrales Autologes Transfer System
OP	Operation
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
pDNA	Plasmiddesoxyribonukleinsäure
PEI	Polyethylenimin
PGA	Polyglycolic Acid
pH	pH-Wert, Pondus Hydrogenii
PLLA	Poly-L-Lactid
rhBMP	Rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
s.c.	subcutan
s	Sekunde
SEM	mean standard error
SIN	self-inactivating
SIP	Smad Interacting Protein
Smurf	Smad ubiquitin regulatory factors
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
\emptyset	Durchmesser
%	Prozent

1 Einleitung

Eine sehr häufige Verletzung im Bereich der Orthopädie sowie der Unfallchirurgie ist die Läsion des Gelenkknorpels (chondrale Läsionen) sowie die osteochondrale Läsion.

In einer arthroskopischen Nachuntersuchung von 31516 Fällen nach Knie Trauma konnte bei 19827 Fällen (entspricht 62,9%) Läsionen des Gelenkknorpels festgestellt werden. In der Mehrzahl zeigten sich Grad III- Läsionen an der Patella sowie Grad IV- Läsionen an der medialen Femurkondyle [33]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie, in der 25124 Kniearthroskopien analysiert wurden. Hierbei zeigten sich chondrale Läsionen bei 60% der Fälle. Hauptlokalisation war ebenfalls die Patellarrückfläche (36%) wie auch die mediale Femurkondyle (34%) [187]. In einer prospektiven Studie wurde bei 1000 durchgeführten Kniearthroskopien in 19% der Fälle ein Knorpelschaden nachgewiesen, wovon bei 61% der Patienten der Schaden auf ein vorhergehendes Trauma zurückgeführt werden konnte. Die durchschnittliche Größe der Defekte wurde mit über 2cm^2 angegeben [61].

Die Therapie dieser chondralen und osteochondralen Gelenkflächenschäden stellt noch immer ein ungelöstes Problem in der Medizin dar.

Schon kleine Knorpelschäden, welche als präarthrotische Deformität zu bezeichnen sind, können sich ausdehnen und sich im Verlauf zu einer manifesten Arthrose der betroffenen Gelenke entwickeln [56, 88, 107]. Dies stellt nicht nur ein therapeutisches, sondern auch aufgrund der demographischen Entwicklung, der fortschreitenden Überalterung in den Industrienationen und der damit zunehmenden Prävalenz altersbedingter Arthrosen, ein sozioökonomisches Problem dar [117, 184, 188].

1.1 Grundlagen

1.1.1 Hyaliner Knorpel

1.1.1.1 Physiologie

Der Gelenknorpel der „echten“ Gelenke, der Diarthrosen, besteht aus dem glasartigen (griechisch: hyalos) hyalinen Knorpel, der zusammen mit der Synovia, der Gelenkflüssigkeit, eine weitestgehend reibungsarme Beweglichkeit der Gelenkpartner ermöglicht. Weiter vermindert und dämpft er die mechanische Last auf den subchondralen Knochen [139].

Der hyaline Knorpel entwickelt sich aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe. Im Laufe der Entwicklung wird der Gelenknorpel noch durch Blutgefäße versorgt, während der adulte Knorpel sich als avaskuläres, alymphatisches und nicht innerviertes Gewebe darstellt [21, 151].

1.1.1.2 Struktureller Aufbau

Obwohl makroskopisch von einheitlichem Aufbau, besitzt der Gelenknorpel bei mikroskopischer Betrachtung eine zonale Gliederung, in der sich schichttypische Unterschiede in Dichte, Form, Ausrichtung und metabolischer Aktivität der Chondrozyten zeigen. Im Bereich der Gelenkfläche bis zum subchondralen Knochen können vier hochorganisierte Zonen beziehungsweise Schichten unterschieden werden [23, 24] (siehe Abbildung 1):

1. Die oberflächliche Schicht (*Tangentialschicht*), bestehend aus parallel zur Oberfläche verlaufenden kollagenen Fibrillen, stellt die zell dichteste Zone dar und beträgt 10-20% des Gesamtvolumens. Die Kollagene sind tangential angeordnet und sorgen für die größte Fasersteifigkeit und eine gleichmäßige Gewichtsverteilung. Am Übergang zur Gelenkkapsel geht sie in die Membrana synovialis über.
2. Die *Übergangszone* macht ca. 40-45% des Gesamtvolumens aus [140]. Sie beinhaltet sphärische Chondrozyten, die in kleinen, isogenen Gruppen angeordnet sind und mehr Proteoglykan produzieren [122].

3. In der *Radiärzone* sind abgerundete Knorpelzellen vorhanden, welche in Säulen angeordnet sind und senkrecht zur Knorpeloberfläche stehen [140].
4. Die sogenannte *Mineralisierungszone* des Knorpels ist von der Radiärzone durch die *tidemark* getrennt. [110]

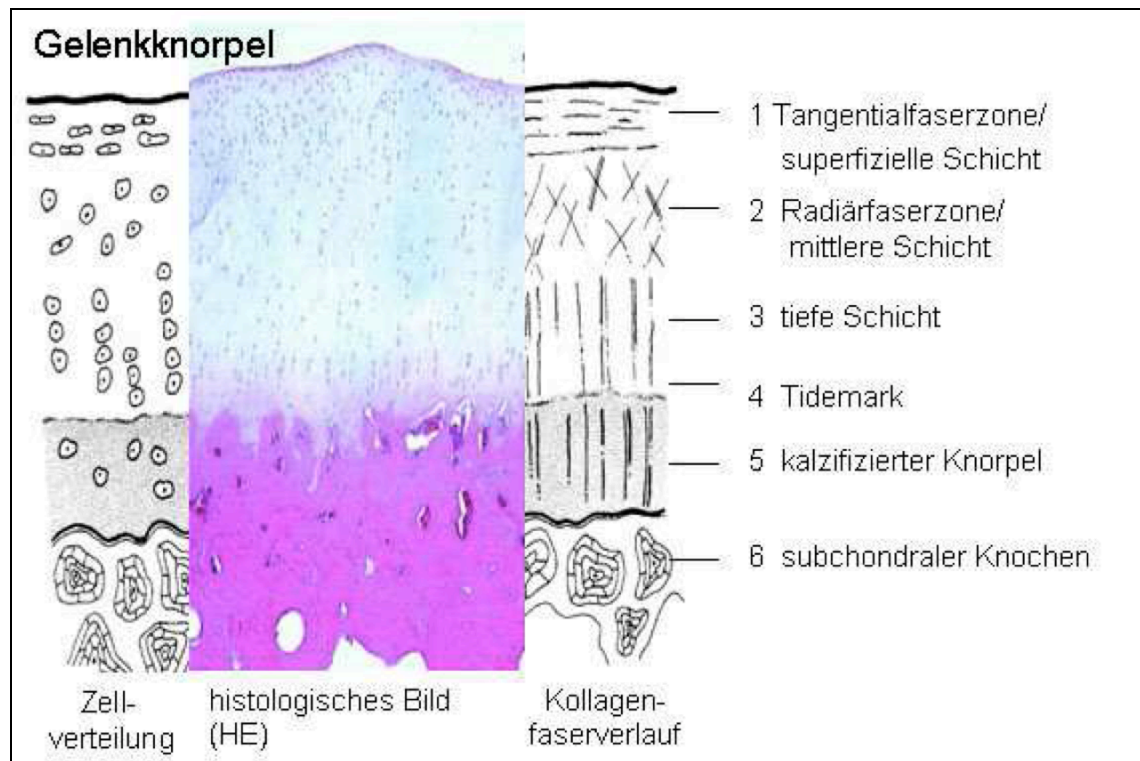


Abbildung 1: Morphologie des Gelenkknorpels (modifiziert nach [110])

1.1.1.3 Chondrozyten

Der Chondrozyt stellt die zelluläre Komponente des hyalinen Knorpels dar und ist in die Extrazelluläre Matrix eingebettet. Die Chondrozyten machen ungefähr 1-10% des gesamten Knorpelvolumens aus. Sie werden durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und teilweise aus den Gefäßen des subchondralen Knochens versorgt. Die Diffusion wird mechanisch unterstützt durch den Wechsel von Kompression und Entlastung. Dadurch findet ein steter Austausch der Inhaltsstoffe der Synovialflüssigkeit im Knorpelgewebe statt.

Trotz ihres geringen Volumenanteils sind die Knorpelzellen entscheidend für die Erhaltung und Funktion der Extrazellulären Matrix. Sie sind sowohl für die Synthese als auch für den Abbau der Kollagene und Proteoglykane zuständig. Gleichzeitig hat die Matrix mit ihren Komponenten wiederum direkten Einfluss auf die Zellfunktion und metabolische Aktivität. Es konnten in die extrazelluläre Matrix hineinragende Zilien der Chondrozyten durch Buckwalter et al. nachgewiesen werden, die als Sensoren für Veränderungen der Zellumgebung dienen [26]. Veränderungen des chemischen Milieus wie auch mechanische Veränderungen können die synthetische Funktion der Chondrozyten stören sowie die Zellen direkt schädigen [79, 91].

1.1.1.4 Extrazelluläre Matrix

Die Interzellulärsubstanz des hyalinen Knorpels erscheint unter dem Mikroskop im ungefärbten frischen Schnittpräparat vielfach optisch homogen, wenn man von der stärkeren Lichtbrechung der Wandung der Knorpelhöhlen absieht. Polarisationsmikroskopische Untersuchungen zeigten das Prinzip der Doppelbrechung, welches charakteristisch für die kollagenen Fasern ist. Ferner konnte man mit Hilfe der Silberimprägnation das Vorhandensein der Fibrillen in der EZM des hyalinen Knorpels nachweisen.

Den überragenden Anteil am Gesamtvolumen der EZM besitzt Wasser (70-80%). Einen Anteil von 20-30% haben die organischen und anorganischen Bestandteile wie Proteoglykane und Kollagene [22, 25, 191]. Der Anteil an Kollagen II am Gesamtkollagen im gesunden hyalinen Knorpel beträgt 90 -95%, wohingegen die Kollagene 1, 5, 6, 9, 10 und 11 nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Die oben beschriebene arkadenförmige Ausrichtung der Kollagenfasern bedingt eine große Zugfestigkeit und Widerstandsfähigkeit des Gelenkknorpels gegenüber Scherkräften. Je dedifferenzierter die Chondrozyten sind, desto höher wird der Anteil an Kollagen 1 und 10. Aufgrund dessen können diese Kollagensubtypen als Marker für den Dedifferenzierungszustand herangezogen werden [11].

Die ebenfalls von Chondrozyten produzierten Proteoglykane sind ein weiterer wesentlicher Bestandteil der EZM. Sie bestehen aus einem Proteinkern und einer oder mehrerer angehängter, sulfatierter Polysaccharideinheiten. Diese

Glykosaminoglykanen stellen im Knorpel Chondroitinsulfat, *Dermatansulfat*, *Keratansulfat* und *Heparansulfat* dar [55, 124]. Sie sind eng mit den Kollagenfibrillen verbunden und machen 35-40% des Trockengewichts des Gelenkknorpels aus. Durch die hohe Wasserbindungsfähigkeit sorgen sie für die Druckelastizität des Knorpels [4]. Mit über 100 Chondroitin- und Keratansulfatketten stellt das Aggrecan nicht nur das am häufigsten vertretene, sondern auch das größte Proteoglykan dar [149].

1.1.2 Klassifikation von chondralen Läsionen

Die Einteilungen von Knorpelschäden und der Arthrose orientieren sich an den arthroskopischen Befunden dieser Defekte.

Basierend auf diesen Befunden wurde von Bauer und Jackson, Erstveröffentlichung im Jahre 1988, eine heutzutage gebräuchliche Einteilung vorgenommen. Es lassen sich durch diese deskriptive Einteilung traumatische von degenerativen Knorpelläsionen unterscheiden und die Morphologie der Defekte beschreiben[6].

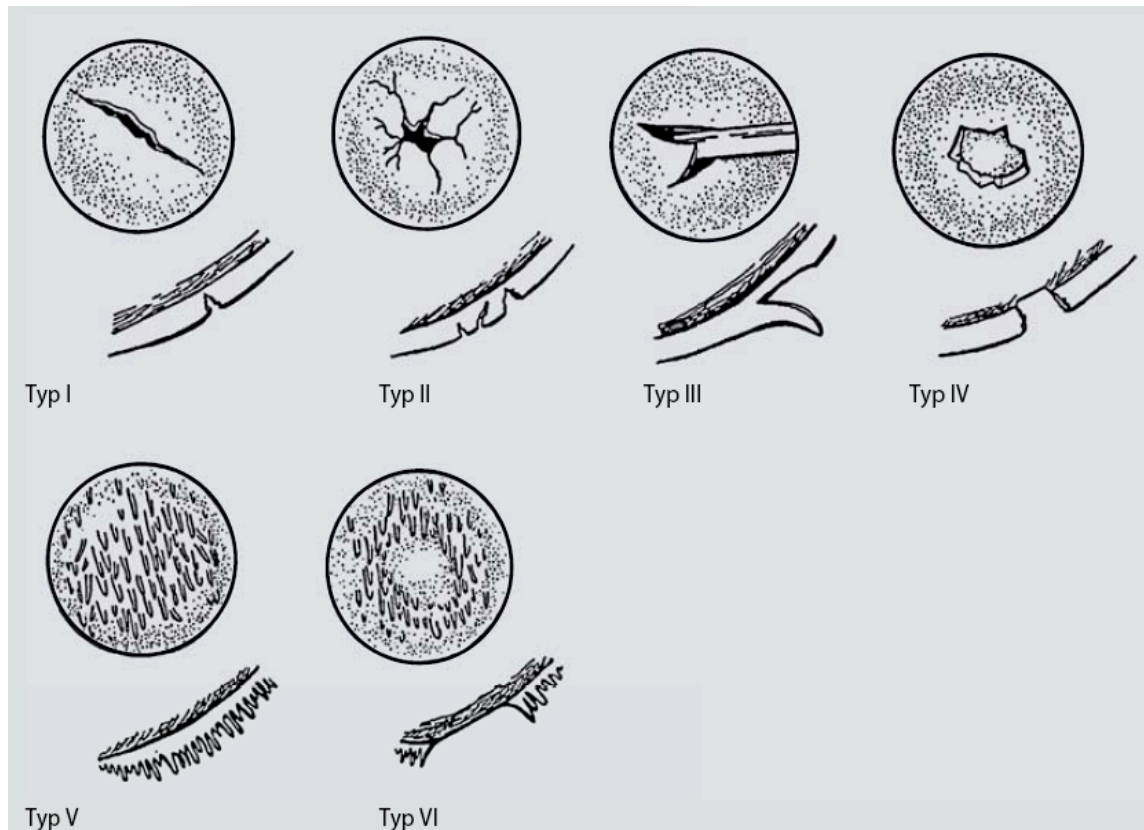


Abbildung 2: Klassifikation von Knorpelschäden (modifiziert nach [182])

Typ I "Linear-crack-Typ":	isolierte lineare Knorpelfraktur, ggfs. bis zum subchondralen Knochen reichend	traumatisch
Typ II "Stellatuntyp":	mehrere divergierende Frakturlinien, oft mit Ausbruch eines zentralen <i>flakes</i>	traumatisch
Typ III "Flaptyp":	Ausriss einer Knorpellamelle, noch mit dem umgebenen Knorpel verbunden	traumatisch
Typ IV "Kratertyp"	vom subchondralen Knochen abgelöstes Knorpelstück	traumatisch
Typ V "Fibrillationstyp"	faserförmige Aufrauung der Knorpeloberfläche ohne Ablösung größerer Knorpelstücke	degenerativ
Typ VI "Degenerativer Typ"	der Knorpel ist erweicht, einzelne Knorpelstücke sind abgelöst, der subchondrale Knochen wird erreicht	degenerativ

Ein geeignetes Mittel zur Einschätzung der therapeutischen Konsequenzen stellt die ICRS-Klassifikation von Knorpelschäden dar (siehe Abbildung 3).










Outerbridge	ICRS Grad	ICRS Beschreibung	
	0	keine erkennbaren Defekte	
I	1 a	intakte Oberfläche, fibrillationen und/oder leichte Erweichung	
	1 b	zusätzl. oberflächliche Risse/ Fissuren	
II	2	Läsionstiefe <50% der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)	
III	3 a	>50% Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierten Schicht (schwer abnormer Knorpel)	
	3 b	>50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierten Schicht	
	3 c	>50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte	
	3 d	>50% Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung	
IV	4 a/ b	vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte	

Abbildung 3: ICRS-Klassifikation osteochondraler Schäden (modifiziert nach [182])

1.1.3 Klassifikation von osteochondralen Läsionen

Eine erste Diagnose einer OCL kann durch die Anfertigung konventioneller Röntgenbilder gestellt werden, wobei man schon erste Aussagen über Ausdehnung und Tiefe der ossären Läsion treffen kann [100]. Eine exakte Beurteilung des Knorpelschadens kann durch eine Arthroskopie sowie eine Tasthakenprüfung des Dissekats erfolgen. Zur weiteren Therapiefindung ist die Aussage über die Vitalität des Fragments sehr hilfreich. Unter Zuhilfenahme der MRT-Diagnostik kann eine allgemeine Einteilung der osteochondralen Läsionen getroffen werden (siehe Abbildung 4) [15, 71, 112, 181].

Stadium	Röntgen	MRT	Arthroskopie	Befund
I A	Eventuell verminderte Knochendichte	Bone bruise, geringere Signalintensität T1, Ödem T2, kein Grenzsaum	Intakter Knorpel	Knochenkontusion
I B	Unauffällig	Eventuell Verdickung des Gelenkknorpels	Knorpel weich/uneben	Knorpelerweichung
II A	Verminderte Knochendichte	Niedrige Signalintensität T1/T2, Signalanstieg nach i.v.-Gd., niedrige Signalintensität T1, Grenzsaum, Knorpelalteration	Knorpel demarkiert, aber intakt	Demarkation ohne Sklerose, Knorpel intakt
II B	Verminderte Knochendichte, Abgrenzung durch Sklerose	Idem, kein Signalanstieg nach i.v.-Gd.	Knorpel demarkiert, aber intakt	Demarkation mit Sklerose, großer Herd, Knorpel intakt
III A	Partiell gelöstes Fragment	Niedrige Signalintensität T1/T2, Signalanstieg nach i.v.-Gd. im Herd, hohe Signalintensität T2, Grenzsaum, Knorpeldefekt	Herd partiell gelöst, Knorpel intakt	Partielle Ablösung, vitales Fragment, Knorpel intakt, ohne Sklerose
III B	Partiell gelöstes Fragment, Sklerosezone	Idem, aber kein Signalanstieg n. i.v.-Gd.	Herd partiell gelöst, Knorpel nicht intakt	Partielle Ablösung, avitales Fragment oder malazischer Knorpel, deutliche Sklerose
IV A	Komplett gelöstes Fragment mit/ohne Dislokation	Hohe subchondrale Signalintensität, Grenzsaum, Knorpeldefekt, Signalanstieg im Herd nach i.v.-Gd.	Freies Dissekat	Vitales freies Fragment, keine Sklerose
IV B	Komplett gelöstes Fragment mit/ohne Dislokation	Idem, kein Signalanstieg im Herd nach i.v.-Gd.	Freies Dissekat	Avitales freies Fragment, deutliche Sklerose
V A	Zystische verminderte Knochendichte, keine Sklerose	Hohe Signalintensität T2 (Anfangsphase)	Knorpel intakt oder Knorpelmalazie	Zyste ohne Sklerose
V B	Idem, Sklerosezone	Idem, Grenzsaum, niedrige Signalintensität T1/T2	Idem	Zyste mit Sklerose

Abbildung 4: Einteilung der OCL nach Imhoff [71]

1.1.4 Intrinsische Regenerationsfähigkeit von Knorpel

Gelenkknorpel hat eine geringe intrinsische Fähigkeit zur Heilung von Defekten. Ursächlich hierfür sind zwei Hauptprobleme, die in der Therapie von Knorpelschäden adressiert werden müssen. Zum Einen sollte das Gewebe, welches den

Defektbereich ausfüllt, die gleichen mechanischen Eigenschaften besitzen wie der ursprüngliche Gelenkknorpel. Zum Anderen muss eine gute Integration zwischen dem Reparaturgewebe und dem umliegenden Defektrand erfolgen. Selbst kleinste Defekte können im Verlauf der Zeit als Folge der Belastungen zu einer manifesten Arthrose führen.

Durch bisherige Therapieansätze konnte keine *Restitutio ad integrum* erreicht werden. Stattdessen entsteht im Bereich des Defektes ein Ersatzgewebe, welches die Funktion des hyalinen Knorpels nicht erbringen kann. Dieses Regenerationsgewebe degeneriert im Vergleich zum ursprünglichen Gewebe schneller, ist mechanisch minderwertig und besitzt nicht die Eigenschaften des hyalinen Knorpels [130]. Nur bei sehr kleinen Defekten sind die unmittelbar benachbarten Chondrozyten in der Lage, durch Synthese von Matrixproteinen, v.a. von Proteoglykanen, eine vollständige Regeneration zu erreichen. In der Reparation des größeren Knorpeldefektes spielt der subchondrale Knochen eine wichtige Rolle [22].

1.1.5 Übersicht über aktuelle Therapiemöglichkeiten

Verschiedenste Techniken finden Anwendung in der Therapie entstandener Knorpeldefekte, wobei es vier verschiedenen Grundansätze gibt [130]:

- „Wiederherstellung“ im Sinne einer Heilung bzw. Regeneration der Gelenkoberfläche, der Knorpelmatrix und des subchondralen Knochens
- „Ersatz“ des Knorpelschadens mittels *Allograft* oder Prothese
- Entlastung des Defektbereichs, welche durch eine Osteotomie erreicht werden kann (z.B. valgisierende/varisierende tibiale Umstellungsosteotomie).
- Resektion des Schadens bzw. des Defektbereichs.

1.1.5.1 Arthroskopische Lavage, Shaving und Debridement

Die *Lavage* (Spülung) des Gelenks während der Arthroskopie scheint oftmals eine Schmerzlinderung zu erbringen obgleich dessen Ursache bisher nicht völlig geklärt ist. Zu vermuten ist, dass hierbei Detritus sowie Entzündungsmediatoren aus dem

Gelenk gespült werden. In 45% der Fälle berichteten Patienten von einer Beschwerdeverbesserung für bis zu 3,5 Jahren [99].

Debridement, früher oftmals offen durchgeführt, bezeichnet die Entfernung von instabilen und freien Knorpelfragmenten aus dem Gelenk. Neben der Knorpelchirurgie können hierbei Meniskusrisse behandelt, Osteophyten abgetragen und Teilsynovektomien durchgeführt werden. In Kombination mit einer Gelenkspülung ist das schmerzfreie Intervall verlängert [29].

Diese drei Techniken werden sehr oft auch kombiniert verwendet und zeigen in den frühen Stadien einer Arthrose häufig eine erfolgreiche Schmerzreduktion, bei höhergradiger Arthrose sowie Knochen-Knochen-Kontakt konnten keine befriedenden Ergebnisse erreicht werden [77, 159],

Keine dieser Techniken induziert eine Reparatur der chondralen Defekte oder ein vermindertes Fortschreiten des degenerativen Prozesses [84, 121], sie sind also rein symptomatische Therapieverfahren.

1.1.5.2 Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen

Viele arthroskopische Prozeduren, welche die Regeneration des Gelenkknorpels fördern, machen sich die intrinsische Heilfähigkeit, ausgelöst durch Eröffnen des subchondralen Knochens [160], zu Nutze. Die Mesenchymalen Stammzellen aus Blut oder Knochenmark sind undifferenzierte Zellen, welche sich unter dem Einfluss von biologischen und mechanischen Faktoren u.a. in Knochen- und Knorpelgewebe umwandeln können.

Hierbei gibt es verschiedene Techniken:

- Abrasionsarthroplastik

Bei der Abrasionsarthroplastik wird im Gegensatz zur Pridiebohrung nicht die alleinige Perforation der subchondralen Lamelle durchgeführt, sondern eine Abtragung der oberflächlichen Lamelle mit Eröffnung des Markraumes [2, 34, 161]. Dies führt jedoch zu einer irreparablen Strukturveränderung des Gelenks. Zu einer Besserung der Symptomatik kann es jedoch in Fällen diffus fortgeschrittener sowie korrespondierender Knorpelschädigung kommen. Experimentell konnte die Minderwertigkeit der Abrasionsarthroplastik gezeigt

werden, bei isolierten Knorpeldefekten stellt diese Technik keine suffiziente Therapieoption dar und ist daher als Palliativtherapie zum Zeitgewinn vor Implantation eines prothetischen Ersatzes zu sehen [2, 84, 116].

- Pridie- Bohrung

Hierbei wird, z.T. nach Debridement des Gelenkknorpels, durch Bohren in den subchondralen Knochen eine frische Blutung erreicht, wodurch die Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt ermöglicht wird [9, 75].

Tippet et al. [174] konnte in einen positiven Effekt nachweisen, wobei in einen durchschnittlichen Follow-Up von 62 Monaten 70,8 % der Patienten ein exzellentes, 15,5 % ein mittleres und 6,9% ein schlechtes Ergebnis angaben. In dieser Studie wurde jedoch an den Patienten zusätzlich eine Umstellungsosteotomie durchgeführt, so dass nicht sicher eruiert werden kann, welches Ergebnis das Bohren alleine erbracht hätte.

Bei osteochondralen Läsionen mit noch intaktem Knorpelüberzug besteht die Indikation zur retrograden Anbohrung (*Beck'sche* Bohrung). Eine Röntgendiagnostik ist präoperativ durchzuführen. Lässt sich die osteochondrale Läsion röntgenologisch nachweisen, sind die intraoperative Defektlokalisierung und das sichere Treffen des Defektes in retrograder Bohrtechnik unter Bildwandlerkontrolle erleichtert.

- Mikrofrakturierung

Der Knorpel wird zunächst im gesamten Defektbereich abgetragen und ein scharfer Wundrand erzeugt. Dann wird der subchondrale Knochen mit Knochenahnen in einem Abstand von 2-3 cm perforiert. Die Tiefe der Perforation sollte optimaler Weise ca. 4 mm betragen. Die Indikation wird in kompletten Knorpeldefekten in der Belastungszone der Femurkondylen sowie der Trochlea gesehen, eine Kontraindikation besteht bei Patienten über 60 Jahre. Der postoperative Bewegungsumfang ist frei gegeben, die Belastung sollte für die ersten 6-8 Wochen auf ca. 10 kg je nach Defektgröße beschränkt sein [46, 163, 167, 195]. Es konnte gezeigt werden, dass in einem *Follow-Up*

von 7 Jahren bis zu 80% der Patienten eine Schmerzbesserung erfahren [166].

Die Grundüberlegung ist bei jeder dieser Techniken gleich. Durch die Perforation erfolgt der Einstrom mesenchymaler Stammzellen und Chondroprogenitorzellen, es entsteht zunächst ein *Blut-Clot* im Defektbereich. Neben der temporären Bildung eines *Fibrin-Clots* und eines Granulationsgewebes kommt es letztendlich zur Ausbildung eines fibrösen Knorpelersatzgewebes, welches biomechanisch wie auch funktionell minderwertig ist. In der Klinik zeigt sich über einen limitierten Zeitraum eine Besserung der Funktion und der Beschwerdesymptomatik, Langzeitergebnisse fallen jedoch schlecht aus. Die Ergebnisse variieren stark, was in engem Zusammenhang mit dem Alter und dem Aktivitätslevel der Patienten sowie der Größe des Defektes steht [69, 80, 166].

1.1.5.3 Periost- / Perichondriumtransplantation

Schon 1985 berichtete Niedermann et al. über erfolgreiche Ergebnisse nach Transplantation eines Periostlappens bei Patienten mit *Osteochondrosis dissecans*. Das Periost wurde von der medialen Tibiafacette genommen und mit Fibrinkleber auf dem freigelegten Knochen refixiert. In den ein Jahr postoperativ durchgeführten Arthroskopien ließen sich die Defektgrenzen nur schwer abgrenzen [89, 129]. In Experimenten mit Hasenkniegelenken wurden mit Periostlappen osteochondrale Läsionen zur Ausheilung gebracht. Hierbei zeigte sich in den aufgefüllten Defektbereichen hyaliner Knorpel mit bis zu 90% Kollagen 2 sowie normalem Wassergehalt, Proteoglykanen und Chondroitin [132-134].

Im Zeitraum zwischen 1986 und 1992 wurden 88 Patienten mit Knorpeldefekten mittels Perichondriumtransplantation aus dem Rippenbereich, fixiert mit Fibrinkleber, behandelt. Postoperativ war eine passive Bewegung wie auch Teilbelastung erlaubt. Das durchschnittliche *Follow-Up* dieser Langzeitstudie von Bouwmeester et al. betrug 52 Monate. Ein gutes Ergebnis zeigte sich bei 38% der Patienten, bei 8% war dieses mäßig und sogar bei 55% schlecht. Die schlechten Resultate wurde von den

Autoren auf die Verkalkung der Transplantate sowie deren überschießendes Wachstum zurückgeführt [16].

Homminga et al. behandelte 25 Patienten, die 30 Knorpeldefekte aufwiesen mit Perichondriumtransplantaten aus dem Rippenbereich. Durchschnittlich zeigte sich eine Verbesserung der Kniebewertungsskalen, in 14 Fällen kam es nach zwei Jahren zu keiner Verschlechterung dieser Scores. In wiederholten Arthroskopien konnte in 28 Fällen die Auffüllung der Defekte mit Gelenkknorpelähnlichem Gewebe festgestellt werden [66].

1.1.5.4 Osteochondrale Autografts (Mosaikplastik/ OATS/ Mega-OATS)

Wagner stellte 1964 erstmals die Technik der autologen osteochondralen Transplantation vor [183]. Im Verlauf wurde diese Technik erneut von verschiedensten Arbeitsgruppen, u.a. Imhoff et al., aufgegriffen und z.T. für verschiedene Gelenke wie Ellbogen, Kniegelenk, oberes Sprunggelenk und Schulter modifiziert [3, 54, 73, 114, 153, 156, 176].

Bei dieser Technik werden aus einer wenig belasteten Donorregion Knochen-Knorpel-Zylinder in die entsprechenden Defektbereiche transplantiert. In einer biomechanischen Studie konnte in Bereichen der Trochlea geringe Druckbelastung nachgewiesen werden [48]. Deshalb und aufgrund des leichten Zugangs im Sinne einer Miniarthrotomie bietet sich v.a. die anterolaterale aber auch die anteromediale Trochlea und die Notch als Donorregion an.

Ziel ist es, eine kongruente Oberfläche in der Defektregion wiederherzustellen, weshalb unterschiedliche Konzepte entwickelt wurden. Vorteil der Mosaikplastik ist es, mit vielen, kleinen Zylinder die Oberfläche besser modellieren zu können, so dass die Oberfläche von Spender- und Therapiestelle nicht zwingend übereinstimmen muss. Die Ernährung der zentralen Zylinder ist neben der mangelnden Fusion der einzelnen Zylinder das Hauptproblem bei Verwendung der Mosaiktechnik.

Weniger Zylinder werden in der OATS-Technik verwendet, welche offen wie auch arthroskopisch durchgeführt werden kann [32]. Bei diesem Verfahren werden wenige Zylinder verwendet, die ggf. überlappend in den ausgestanzten Defekt in *Press-fit*-

Technik eingepasst werden. Diese macht eine zusätzliche Verankerung nicht notwendig. Das bedeutet, dass die Spenderzylinder im Vergleich zu den Defektzonenzylindern einen diskret größeren Durchmesser haben. Eine gute Indikation stellen Osteochondrosis dissecans und subchondrale Nekrosen mit einer maximalen Tiefe von 10 mm sowie fokale 4.-gradige Knorpelschäden nach ICRS mit einer Größe von bis zu 2 x 2,5 cm dar. Die einzelnen Zylinder haben einen Durchmesser von 5 bis 15 Millimeter und schon bei deren Entnahme ist auf die Krümmungsfläche von Donorregion und Defektzone zu achten, um das Hauptproblem, die Inkongruenz der Knorpeloberflächen dieser beiden Regionen, möglichst zu umgehen. Weiter wird der Erfolg des OATS-Verfahrens durch die Passform der Zylinder entscheidend beeinflusst. Bei einer zu geringen Tiefe des Zylinders im Vergleich zur Tiefe des ausgestanzten Defektes kann es zu einem verminderten Aufbau des subchondralen Knochens kommen. Bei kleinen Spalten kann Synovialflüssigkeit eindringen und erneut zu zystischen Veränderungen in der subchondralen Zone führen. Darüberhinaus besteht bei Zylinderlängen von weniger als acht Millimeter die Gefahr der Nekrose der Transplantate. Eine vollständige Einheilung des Transplantatknorpels in den ortsständigen Knorpel ist nicht möglich. Histologisch bleibt ein Rand deutlich abgrenzbar [36].

Weitere Nachteile der OATS-Technik sind die nur begrenzte Verfügbarkeit von Donorzylindern, die ausbleibende chondrale Zylindereinheilung mit der Umgebung sowie die Morbidität an der Entnahmestelle [41, 53]. Diese sogenannte *Donor-site-morbidity* wird in der Literatur mit bis zu 5% angegeben [43, 94].

Wie schon oben genannt erscheinen osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von mehr als 20 mm für die OATS-Technik oder die Mosaikplastik nicht geeignet. Neben der begrenzten Verfügbarkeit ist bei dieser Defektgröße eine stabile pressfit-Verankerung nicht mehr gewährleistet. Der modifizierte posteriore Kondylentransfer, auch Mega-OATS genannt, wurde erstmals von Imhoff 1990 verwendet um große Defekte in der Belastungszone vorwiegend jüngerer Patienten zu decken [1, 72].

Die Indikation zur Verwendung der Mega-OATS-Technik besteht bei ausgedehnten Knorpeldefekten (>20mm) in der Belastungszone der medialen und lateralen Femurkondylen.

Nach Arthrotomie wird der Defektbereich so präpariert, dass sich keine nekrotischen Knochen- oder Knorpelanteile in der Defektzone befinden. Der subchondrale, zum Teil sklerotische Knochen wird, ähnlich der Abrasionsarthroplastik entfernt. Hierbei ist darauf zu achten, dass eine ausreichend stabile dorsale Kante im transplantierenden Bereich vorhanden ist. Anschließend wird mit einem scharfen Meißel der posteriore Femurkondylus entlang der Femurlängsachse osteotomiert. Ein der Defektgröße entsprechendes Transplantat wird nun präpariert. Bei instabiler Fixierung besteht die Möglichkeit, mittels Kleinfragmentschrauben das Transplantat zu stabilisieren. Der Vorteil einer *Press-fit-Technik* ist, dass ein zweiter Eingriff zur Entfernung der Schrauben entfällt. Die unterschiedliche Krümmung der posterioren Kondyle in Vergleich mit dem weiter anterior liegenden Kondylenanteil wird durch Drehung des Transplantats um 90° ausgeglichen

Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten über eine Schmerzabnahme berichteten sowie sich ihre Lebensqualität deutlich verbesserten. Die Einheilung der Transplantate erfolgte meist problemlos [72].

1.1.5.5 Osteochondrale Allografts

Osteochondrale Allografts können als Zylinder, simultan der autologen Technik, passgenau dem Defekt entsprechend aus dem meist tiefgefrorenen Spendergewebe gewonnen werden. In ersten Versuchen konnte Malinin et al. bei tiefgefrorenen Allografts im Affenexperiment nach fünf Jahren degenerative Veränderungen am Knorpel feststellen, wobei die Transplantate vollständig knöchern eingehilt waren [106]. In einem zweiten Experiment konnte dieselbe Arbeitsgruppe nachweisen, dass der Verlust von vitalen Chondrozyten mit der Länge des Tiefgefrierens einhergeht. Laut dieser Studie ist eine Gefrierlagerung von Knorpel, die länger als 20 Tage dauert, nicht zu empfehlen [105]. In experimentellen Studien an Hunden konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort des Empfängers gegenüber tiefgefrorenen Allografts geringer ausfiel als bei frischen Allotransplantaten [169]. Histokompatibilität ist zumindest für große osteochondrale Allografts ein positiver Faktor im Hinblick auf das Langzeitergebnis [45].

1.1.5.6 Autologe Chondrozytentransplantation (ACT / MACT)

Bereits 1968 führten verschiedene Arbeitsgruppen Versuche durch, die Therapie von Gelenkknorpelschäden mittels Transplantation von *ex vivo* kultivierten Chondrozyten durchzuführen. In Tierversuchen wurden allogene Chondrozyten sowohl mit wie auch ohne Trägersysteme in vorher gesetzte Defekte transplantiert. Es konnte gezeigt werden, dass vitale, in einen Knorpeldefekt transplantierte Chondrozyten zur Proliferation und Bildung der Extrazellulären Matrix befähigt sind [10, 31].

In Fällen mit großen Knorpeldefekten konnte sich, basierend den Arbeiten von Brittberg et al., die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) als Verfahren mit guten klinischen und histologischen Ergebnissen durchsetzen [17, 138].

Die Indikation zur ACT besteht bei Knorpelschäden Grad III mit einer Größe ab 3 cm² im Bereich der Femurkondylen, der Trochlea, der Patella sowie des Talus. Grundvoraussetzungen für die Durchführung einer ACT sind ein intakter Umgebungsknorpel, ein intakter Meniskus, eine suffiziente Bandführung sowie der freie Bewegungsumfang des betroffenen Gelenkes. Als Kontraindikation gelten das Vorliegen einer manifesten Arthrose sowie Knorpeldefekte an der korrespondierenden Gelenkfläche [17].

Zunächst wird eine erste Arthroskopie durchgeführt, wobei ein 2-4 mm großes Knorpelstück aus der Trochlea entnommen wird. Die Chondrozyten werden anschließend enzymatisch isoliert und in einem speziellen Verfahren in einer Monolayer Zellkultur angezüchtet [165, 168]. In der zweiten Operation wird nach einer Arthrotomie der Knorpeldefekt bis zum Wundrand debridiert. Die Suspension mit den proliferierten Zellen wurde zunächst unter einen Periostlappen, der meist aus dem proximalen medialen Tibiaplateau entnommen und direkt auf die Defektzone genäht wurde, injiziert. In neueren Verfahren werden mittlerweile Matrizen mit denen die Chondrozyten assoziiert sind, benutzt [5].

Die bisherigen Ergebnisse erscheinen vielversprechend. So konnte Micheli et al. in einer Untersuchung mit einem *Follow-Up* von drei Jahren bei über 90% der Patienten eine deutliche Verbesserung der Kniebeschwerden feststellen. [118]. In einer zweiten Studie mit Langzeitresultaten von bis zu 9 Jahren konnte eine Erfolgsrate von mehr als 80% angegeben werden. Dabei erhielt man mit einer Rate von über 92% im

Bereich der Femurkondylen die besten Resultate, die schlechtesten Ergebnisse wurden bei Defekten im Bereich der Patella beschrieben [138].

Schwachstellen dieser Technik treten jedoch in der Umsetzung auf: Nach Biopsie unterlaufen die gewonnenen Chondrozyten während ihrer Kultur *in vitro* unter zweidimensionalen Bedingungen einen fibroblastären Dedifferenzierungsprozess. Ab einer bestimmten Passagezahl nimmt die Fähigkeit der kultivierten Zellen zur chondrozytären Redifferenzierung ab. Die folgende Transplantation in einem dedifferenzierten Zustand gilt somit als größter Nachteil der ACT. Des Weiteren kann eine gleichmäßige Verteilung oder Primärstabilität der Zellen im Defekt nicht garantiert werden. Periost- und Grafthypertrophie, Delamination sowie Transplantatversagen sind häufig beschriebene Komplikationen nach ACT [192].

Um eine sichere und stabile Verteilung differenzierter Zellen im Defekt zu erreichen, wurde die autologe Chondrozytentransplantation durch die Assoziation mit einem Zellträgermaterial, basierend auf den Prinzipien des *Tissue Engineering* [51], verbessert. *In vitro* Versuche zeigten, dass nach zweidimensionaler Kultivierung dedifferenzierte Chondrozyten durch Kultur unter dreidimensionalen Bedingungen ihre chondrozytären Phänotypus wiedererlangen konnten [11].

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Chondrozyten bei der Matrix-assoziierten Chondrozytenimplantation nach einer kurzen proliferativen Phase unter zweidimensionalen Bedingungen auf ein dreidimensionales Trägermaterial gebracht. Das Gerüst dient als Stütze wie auch als Transportorgan für die zu transplantierenden Chondrozyten und ermöglicht ortsständigen Zellen nach der Implantation und Fixierung mittels Fibrinkleber das Einwandern [109].

In den bisherigen Studien konnten sehr gute Ergebnisse durch die Therapie mittels MACT aufgezeigt werden [8, 37, 127, 146]. Weiter zeigten sich im Vergleich zur ACT nach einem Jahr postoperativ signifikant bessere Ergebnisse [5].

1.1.6 Tissue Engineering

Unter Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren ist das *Tissue Engineering*, ggfs. in Verbindung mit der o.g. Matrix-assoziierte Chondrozyten-Transplantation, eine vielversprechende Methode zur Therapie von Knorpelschäden [68, 113, 115, 180]. Das *Tissue Engineering* basiert auf der *ex-vivo* Herstellung biologischer

Ersatzgewebe unter Kontrolle der physikalisch-chemischen sowie mechanischen Parameter in der Zellkultur [27].

Ende 1987 wurde der Begriff des *Tissue Engineerings* erstmals auf einem Treffen der US-amerikanischen *National Science Foundation* in Washington dokumentiert [128]. Als „Interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien der Ingenieurs- und Biowissenschaften anwendet zur Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien, die die Funktion eines Gewebes oder eines ganzen Organes wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern“ definierte Langer et al. 6 Jahre später diesen Begriff [93].

Mittels *Tissue Engineering* ist es möglich, Zellen, respektive Gewebe, im Labor zu entwickeln, zu manipulieren und zu züchten. Zellen können schon seit längerer Zeit *ex vivo* gezüchtet werden. Mit dieser neuen Technik kommt jetzt die Möglichkeit hinzu, mittels Trägermaterialien (*scaffolds*) Zellen dreidimensional zu expandieren und somit Gewebekomplexe herzustellen, die die Physiologie und Funktion des menschlichen Gewebes kopieren sollen. Dieser Forschungsbereich stellt ein großes interdisziplinäres Gebiet dar, in dem sowohl die Zellbiologie, die Biomaterialforschung und die chirurgische Medizin eng zusammenarbeiten müssen.

Vacanti et al. berichtet über den Ersatz eines traumatisch abgerissenen Daumens mittels per *Tissue Engineering* gezüchteten Knochens. Zunächst wurden nach Biopsie Periostzellen für neun Wochen *in-vitro* gezüchtet und anschließend, aufgebracht auf porösem Hydroxylapatit, replantiert. 10 Monate postoperativ konnte histologisch Lamellenknochen nachgewiesen werden [178].

Neben der plastischen Chirurgie, in der kommerziell hergestellte Haut bereits zur Behandlung von Patienten mit z. B. diabetischen Ulzera verfügbar ist, findet das *Tissue Engineering* weitere potentielle Einsatzgebiete in der Therapie von Tumoren, Herzinfarkt, neurologischen und gastroenterologischen Erkrankungen [59, 171, 189]. Moderne Methoden zur Kultivierung von Zellen / Gewebe ermöglichen durch den Erhalt phänotypischer Charakteristiken von Chondrozyten die *in vitro* Herstellung von vitalem Knorpelgewebe [27]. Als zelluläre Komponente haben sich neben autologen Chondrozyten multipotente Stammzellen etabliert.

Es gibt eine Vielzahl von Techniken, die kultivierten Chondrozyten in den Defekt zu bringen; die Arbeitsgruppe um Brittberg deckte die Defekte, indem die Chondrozytensuspension unter einen Periostlappen injiziert wurde [17], dagegen

finden aktuell vermehrt dreidimensionale *Scaffolds*, auf denen die Zellen kultiviert wurden, Verwendung [11, 130, 150]. Die näher untersuchten und z.T. schon verwendeten Trägermaterialien können aus *Agarose-Gele* [11], *Polyglactin*, *PLLA* [150, 162], *Hyaluronsäure* [19], Fibrin [58], Kollagen-Gele [184] und Kollagen[47, 126] bestehen.

Kollagenimplantate besitzen den Vorteil, dass das Kollagen von zellulären Enzymen erkannt wird, durch Um- und Abbau Platz für einwachsendes Gewebe frei wird und dass die Implantate selber die Kollagenproduktion der Chondrozyten anregen. Desweiteren konnte schon früh von Kimura et al. gezeigt werden, dass Chondrozyten, die für 6 Wochen in Kollagen-Gel eingebettet waren, ihren Phänotyp sowie die Produktion von GAG und Proteoglykanen beibehielten [86].

Ito et al. transplantierte kultivierte Chondrozyten, besiedelt auf einer Kollagen/PLLA-Matrix, in osteochondrale Defekte des Humeruskopfes von Kaninchen. Histologisch konnte nach vier und nach 12 Wochen Ersatzgewebe mit erhöhtem Kollagen II-Gehalt nachgewiesen werden [76].

Eine Vielzahl von verschiedenen Verfahren wurde bereits untersucht, jedoch konnte bisher keine *Restitutio ad integrum* erzielt werden. Auch bei der bereits am Menschen angewendeten *MACT* blieb bisher trotz guter klinischer Resultate der Nachweis der Bildung von genuinem Knorpel und somit von guten Langzeitergebnissen aus [5, 8].

Ergänzend zum *Tissue Engineering* erscheint die Kombination mit Wachstumsfaktoren sinnvoll [85]. Die Rationale dieser Verbindung besteht im Transfer von mit einem therapeutischen Gen manipulierten Zellen in den Bereich eines Gewebedefektes.

Jakob et al. untersuchten die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf Chondrozyten in einer dreidimensionalen Matrix und wiesen eine Steigerung von Kollagen II sowie von Aggrecan im Verhältnis zu Kollagen I und Versican nach [78]. Blunk et al. konnten den positiven Effekt von vier Wachstumsfaktoren (IGF, IL-4, PDGF und TGF-beta1) auf mittels Tissue Engineering hergestellten Knorpel nachweisen. Dabei lag der Fokus auf der Fähigkeit, die Wachstumsrate des Konstrukts sowie den Anteil an GAG und Kollagen, den Hauptkomponenten der Extrazellulären Matrix, zu steigern. Die Chondrozyten wurden auf eine *Polyglycic*

Acid-Matrix besiedelt und zeigten nach 4 Wochen eine Steigerung des Gewichts um das 1,5-2,9-fache, ebenso kam es zu einer Steigerung der EZM um bis zum 5-fachen [14].

1.1.7 Genterapie

Genterapie ist das gezielte Einbringen von funktionsfähigem, genetischem Material in Körperzellen mit therapeutischer Zielsetzung. Diese Zielsetzung kann, wie z. B. bei monogenetischen Erkrankungen, eine Substitutionstherapie darstellen, oder darin liegen, der Zelle eine zusätzliche Funktion zu vermitteln.

Schon vor mehr als 30 Jahren postulierte Tatum die Nutzung von Viren als Überträgerstoffe für Gene [172]. Erstmals konnte Hammer et al. 1984 die genterapeutische Heilung in Mäusen, bei denen ein defizientes Wachstumshormon ersetzt wurde, nachweisen [52]. Seit Anfang der 90er Jahre werden Phase 1-Genterapie-Studien auch am Menschen durchgeführt.

Grundsätzlich muss zwischen zwei verschiedenen Verfahren unterschieden werden: *Ex-vivo*- und *in-vivo*-Gentransfer. Beim *ex-vivo*-Gentransfer werden die Zellen aus dem Körper entnommen und *in vitro* mit einem Genvektor genetisch verändert. Diese Zellen werden anschließend wieder implantiert. Beim *in-vivo*-Gentransfer wird der Genvektor direkt in den Zielorganismus, bzw. das Zielgewebe eingebracht [13].

Bei beiden Methoden ist die Überwindung der Zell- und der Kernmembran essentiell. Behilflich dabei sind Trägersubstanzen, sogenannte *Vektoren*, die die DNA beinhalten. Zur Einschleusung stehen grundsätzlich nicht-virale und virale Vektoren zur Verfügung.

1.1.7.1 Nicht-viraler Gentransfer

Das Einbringen von Fremd-DNA mittels *non-viraler* Methode bezeichnet man als *Transfektion*. Sie stellt eine einfache und sichere Technik des Gentransfers dar und nimmt aufgrund z.T. unüberwindbarer Probleme beim viralen Gentransfer an Bedeutung zu. Die nicht-viralen Vektoren besitzen eine geringe Immunogenität,

Toxizität und onkogene Potenz und können in großem Umfang hergestellt werden [101].

Die Limitation der nicht-viralen Gentransfermethoden liegt in der geringen *Transfereffizienz* sowie in der vergleichsweise schwachen Transgenexpression.

Mit dem einfachsten non-virale Verfahren, der Verwendung nackter DNA, konnte zwar eine kurze Expression von Transgenen erreicht werden, insgesamt ist diese Transfektionsform jedoch zu ineffizient [135]. Die Technik der Mikroinjektion, bei der DNA-Moleküle direkt an den Zellkern injiziert werden, ist deutlich effizienter, jedoch muss für jede Zelle eine Injektion erfolgen, weswegen diese Methode nicht für große Zellzahlen geeignet ist.

Mit Hilfe zusätzlicher physikalischer Maßnahmen kann der Gentransfer und die Genexpression effektiver gemacht werden. Die *Gene-Gun*-Methode, bei der an Goldpartikel gekoppelte DNA in Zellen bzw. Gewebe geschossen wird und die *Elektroporation*, bei der mittels elektronischem Impuls die Zellmembran kurzzeitig geöffnet wird, zählen zu diesen modifizierten Methoden[90].

Bei der *Lipofektion* hingegen wird die negativ geladene DNA an positive geladene Lipide gebunden. Durch die positive Ladung können die DNA- Moleküle besser über die Zellmembran ins Zellinnere transloziert werden[104].

1.1.7.2 Viraler Gentransfer

Im Gegensatz zum nicht-viralen Gentransfer wird der virale Gentransfer als *Infektion* oder als *Transduktion* bezeichnet. Die viralen Vektoren bestehen aus menschen- bzw. tierpathogenen Viren, meist auf der Basis von Adenoviren, Lentiviren, Herpes-Simplex-Viren, Vaccina-Viren und, wie in unseren Versuchen, Retroviren. Die Effizienz dieser Gentransfertechnik ist höher im Vergleich zu nicht-viralen Techniken, es besteht jedoch ein höheres pathogenes Potential. Aus diesem Grund muss verhindert werden, dass Viren sich in den Zellen vermehren und selber Zellen infizieren können. Dies wird durch *Deletion* der viralen Gene für Replikation und Infektion erreicht, so dass die Vektoren im optimalsten Fall nur noch die für die Therapie notwendige genetische Information sowie für die Transduktion notwendige Gensequenz besitzen.

1.1.8 Bone Morphogenetic Protein

Urist et al. beobachtete schon in den 60er Jahren, dass Extrakte aus demineralisiertem Knochen eine Knochenneubildung im Muskelgewebe von Mäusen verursachte [177, 179]. Im Verlauf wurden diese aktiven Komponenten als Proteine identifiziert und *Bone Morphogenetic Proteins (BMP)* genannt. 1988 konnte für BMP-1, -2 und -3 die komplementäre DNA isoliert [186, 193] und kurze Zeit später als Induktor der enchondralen Ossifikation am Knochen identifiziert werden [141]. BMP-2 und BMP-3 werden aufgrund ihrer Struktur zu der *Transforming-Growth-Factor-Beta (TGF- β)* Superfamilie gezählt [63]. Zu dieser „Superfamilie“ gehören neben den BMPs weitere Wachstumsfaktoren wie *Inhibine, Aktivine, Nodal, Glial Derived Neurotrophic Factor, Growth/Differentiation Factors (GDF)* und die *Müllerian-inhibiting Substanz* [142]. *TGF- β* beeinflusst nicht nur den Differenzierungsprozess von Knorpelgewebe sondern auch von Knochengewebe, Nervengewebe, Endothelium und von Zellen des hämatopoetischen Systems, mitunter schon auf der Stufe der mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark [123]. Die Wirkungen von *TGF- β* werden durch Bindung an spezifische, membranständige Rezeptoren vermittelt. Mehrere Bindungsproteine und einige Bestandteile der EZM modulieren die Wirkung von *TGF- β* in hochkomplexer Form. In mehreren Geweben stimuliert *TGF- β* die Synthese von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix und verhindert deren Abbau durch die Regulation der Synthese und Funktion kataboler Enzyme [144].

Proteine der *TGF- β* Familie werden als große Vorläuferproteine synthetisiert welche aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und einer *carboxy terminal region* bestehen (siehe Abbildung 5). Verantwortlich für die Sekretion des Proteins ist das Signalpeptid, die Proteinfaltung wird durch die Prodomäne bestimmt. Die *carboxy terminal region* stellt das aktive Protein dar. Über *Disulfidbrücken* bilden BMP miteinander Homo- oder Heterodimere. Die *carboxy terminal region*, die das aktive Protein darstellt, wird intrazellulär proteolytisch abgespalten [87].

Bis heute konnten ca. 20 Mitglieder der *BMP*-Familie ausgemacht werden [30].



Abbildung 5: Schematische Darstellung des hBMP-2 Vorläuferpeptids mit Angaben der Sequenzlängen

Das reife Protein besteht aus der relativ kurzen *carboxy terminal region* (Länge: 114 aa), diese bildet als Dimer das aktive Molekül. Die proteolytische Spaltung von der Prodomäne findet an der Sequenz RXXR statt. aa: Aminosäuren (Abbildung aus: [62])

1.1.8.1 Die Wirkung des BMP-2

Die Länge des Peptides beträgt 114 Aminosäuren.

Aus verschiedenen experimentellen Arbeiten geht hervor, dass BMP-2 sowohl das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen Zellen als auch die Proliferation und Syntheseleistung von Chondrozyten stimuliert [30, 38, 143, 152]. Die biologischen Eigenschaften von BMP-2 beziehen sich insbesondere auf die Knochen- und Knorpelbildung, sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch im Erwachsenenalter. Rosen et al. und Lyons et al. zeigten, dass die Expression neben anderen Organen vor allem in dem sich entwickelnden Skelettgewebe stattfand [102, 147]. Die Ausschaltung dieses Gens mit konsekutivem Fehlen von BMP-2, -4 und -7 führt zu frühem embryonalen Fruchttod wie auch zu Malformationen an Amnion und Chorion sowie Störungen der Herzentwicklung [155, 198]. Im Erwachsenenalter steht die Knorpel- und Knochenbildung im Vordergrund [179, 193].

In der Orthopädie kam *rekombinantes BMP-2* schon in verschiedenen präklinischen Studien zum Einsatz [62]. In Versuchen konnte Betz et al. zeigen, dass BMP-2 eine fördernde Wirkung auf die Heilung bei Knochendefekten kritischer Größe besitzt [13]. Schon Sellers et al. zeigten den positiven Effekt von rekombinantem BMP-2 auf die Heilung osteochondraler Knorpeldefekte am Kaninchen [157, 158]. In diesem Modell wurden Kollagenschwämme, die mit 5 mg rekombinantem hBMP-2 beschichtet waren, in bis in den Knochen hineinreichende Defekte implantiert. Im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren zeigte die Arbeitsgruppe dass Defekte der

behandelten Tiere auch nach über einem Jahr ein besseres histologisches Erscheinungsbild und eine gesteigerte Bildung von Kollagen Typ II aufwiesen (Hinweis auf die Bildung hyalinen Knorpels). Kriterien hierfür waren Integration an den Defekträndern, Morphologie der Zellen sowie des Defektes innen und an der Oberfläche sowie Neubildung der Tidemark. Die Dicke des neu gebildeten Knorpels betrug dabei allerdings nur 70 % des unverletzten Knorpels. Diese Ergebnisse konnten von einer weiteren Arbeitsgruppe um Frenkel bestätigt werden [44].

Enomoto-Iwamoto et al. wiesen nach, dass *in vitro* die Glykosaminoglykan-Produktion von Chondrozyten durch Zugabe von BMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden konnte [39].

1.1.8.2 Der BMP-2 Rezeptor und Signalkaskade

Für die Wachstumsfaktoren der *TGF- β* Superfamilie stehen drei verschiedenen Rezeptortypen zur Verfügung. Die biologische Wirkung der aktiven Form der BMPs (Dimer aus zwei *carboxy terminal regions*) wird lokal über die Bindung an zelluläre Serin/Threonin Rezeptoren (*BMPR-1* und *BMPR-2*) vermittelt. [57, 82, 98]. Beide Rezeptortypen besitzen intrazellulär Serin/Threonin Kinase Domänen, die für den Signalweg zuständig sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass Chondrozyten, deren Typ-2 Rezeptoren keine Serin/Threonin Kinase Domäne hatten, ihre Fähigkeit verlieren, Kollagen-Typ II und Aggrecan zu produzieren [39]. Die Typ-1 und Typ-2 Rezeptoren werden weiter in jeweils drei Subtypen eingeteilt. Nach Bindung an den oberflächlichen Rezeptor bildet sich ein heterotetramerer Rezeptorkomplex aus zwei Paaren BMPR 1 und 2 [155].

Durch die extrazellulären BMP-Antagonisten *Noggin*, *Chordin*, *Gremlin*, *Dan* und *Cerberus* werden die biologischen Effekte reguliert [20].

Smads sind die Hauptüberträger der Signalkaskade von Serin-/Threonin-Rezeptoren. Der Name *Smad* leitet sich von *MAD*, einem *Drosophila*-Protein (mothers against decapentaplegic) und von *SMA* (smaller worms), einem Gen aus *Caenorhabditis*, ab.

Nach Bindung von BMP erfolgt die Phosphorylierung der Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads) durch den Typ-1 Rezeptor [30]. Verschiedene R-Smads wie

Smad 1, Smad 5, Smad 8 und Smad 9 sind in der Signalkaskade beteiligt. Nach Aktivierung erfolgt Bildung eines heterotrimeren Komplexes von 2 Smads mit einem Co-Smads (Smad 4) wodurch es zur Translokation des Komplexes in den Nukleus kommt und die Zielgene exprimiert werden. Reguliert werden die BMP-Effekte durch die o.g. BMP-Antagonisten sowie durch Smad 6 und *Smad ubiquitin regulatory factors* (*Smurfs*). *Smurfs* induzieren die Markierung und den Abbau von Smads [12].

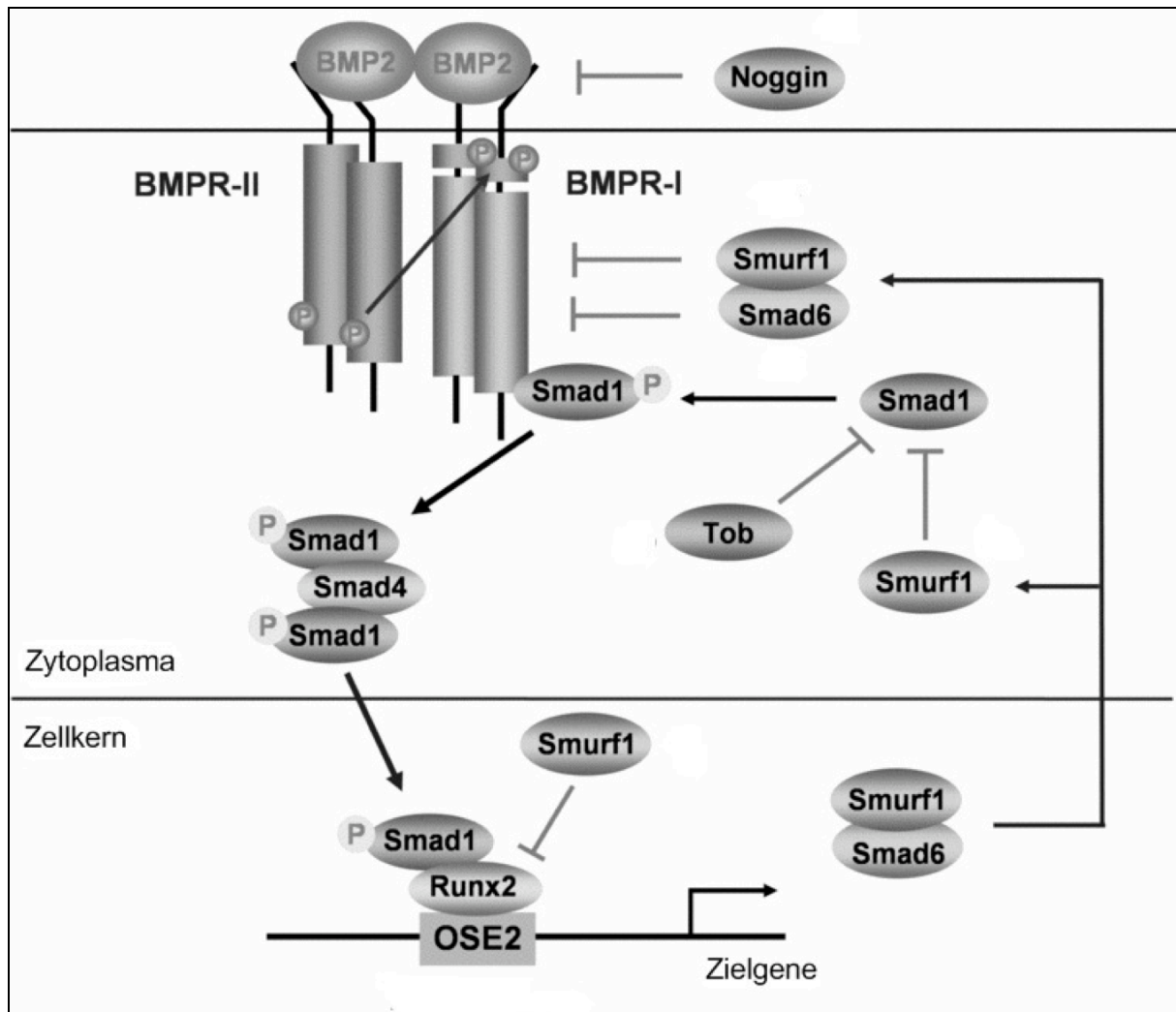


Abbildung 6: BMP-Signalkaskade (Darstellung modifiziert nach [30])

Die Wirkung von *BMP2* wird durch Typ 1 und 2 Rezeptoren und die nachfolgenden Signalmoleküle *Smad* 1, 5 und 8 vermittelt. Nach Komplexbildung mit *Smad4* erfolgt die Translokation in den *Nukleus*, in dem die Zielgene exprimiert werden. Die *BMP2*-Effekte werden u.a. durch die Proteine *Noggin*, *Smurf* und *Smad6* reguliert

1.2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Mit dieser Arbeit soll ein weiterer Ansatz zur Therapie osteochondraler Defekte vorgestellt werden.

In der Studie sollen osteochondrale Defekte am Kniegelenk des Kaninchens mit einem Knorpelersatz, behandelt auf der Basis des *Tissue Engineerings*, aus einer Fibrinmatrix und autologen, gentechnisch veränderten Chondrozyten, die als therapeutisches Gen den Wachstumsfaktor *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) überexprimieren, behandelt werden. Hierzu werden zwei verschiedene Vektorsysteme verwendet, ein nicht-viraler und ein retroviraler Vektor. Als Vergleich wird eine Kontrollgruppe benutzt, deren Defekte mit dem Fibrinkleber und unbehandelten, autologen Chondrozyten aufgefüllt werden.

Ziel der Studie ist es, osteochondrale Defekte mit den von uns verwendeten zwei Systemen zu behandeln und möglichst zu heilen. Hierbei sollen folgende einzelne Ziele untersucht und überprüft werden.

1. Analyse der Struktur und Beschaffenheit des Defektgewebes im Vergleich zu gesundem Knorpel-Knochen-Gewebe mittels histologischer Untersuchungen, Auswertung über ein Bewertungssystem (Histology Endpoint Committee, ICRS). Immunhistologische Auswertung (Kollagen I, Kollagen II, ; Aggrecan; Aggrecan Link) zur Beurteilung der molekularen Charakteristik des Gewebes sowie der EZM.
2. Makroskopische Beurteilung der Integration des Defektgewebes in das umliegende gesunde Gewebe sowie Beschaffenheit des gesamten Gelenkes.

Wir hypothesieren, dass die Behandlung von osteochondralen Defekten des Gelenkknorpels durch die Implantation von mit BMP-2-transduzierten Chondrozyten in einen osteochondralen Defekt zu einer verbesserten Defektheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Eine weitere Hypothese ist, dass die Gruppe mit den rv-BMP-2 behandelten Zellen bessere Ergebnisse als die hBMP-2-Gruppe aufweist.

2 Material und Methodik

2.1 Material

Alcian-Blau	Carl Roth KG, Karlsruhe
Benzoylperoxid	Merk AG, Darmstadt
Borgal	Veterania AG, Zürich, Schweiz
Diamant-Bandsäge	Exakt, Norderstedt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco´s PBS	Biochrom AG, Berlin
Einmal-Kunststoff-Pipetten	Costar Corning Inc., New York, USA
Eukitt	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	TPP, Schweiz
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Digitalkamera Aria	Contax, Reading, UK
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Hydrochlorid	Carl Roth KG, Karlsruhe
Kernechtrot-Aluminium-Sulfat	Chroma Inc., Münster
Kollagenase	A Roche, Mannheim
Kryoröhrchen	Carl Roth KG, Karlsruhe
Kühlschrank	Siemens
Lichtmikroskop (digital)	Axiovert Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Wilovert S Hund, Wetzlar
MMA	Merk AG, Darmstadt, Deutschland
Nassschleifmaschine	Exakt, Norderstedt
New Zealand White Rabbits	Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld
Nonyl-phenyl-polyethylenglykolacetat	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pentobarbital	Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

Reichert-Jung Ultramicrotom	Reichert-Jung GmbH, Heidelberg
Rothiclear	Roth GmbH, Karlsruhe
Sägemikrotom Leitz SP 1600,	Leitz, Nussloch
Schleifpapier	Hermes GmbH, Hamburg
Software Axiovision 4.2	Contax, Reading, UK
TOSSUCOL-Kit	Baxter AG, Wien
Tris 7-9R	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Carl Roth KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Vectastain ABC 'Elite' Kit	Vector Labs, Burlingame, USA

2.2 Methodik

2.2.1 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden randomisiert auf die folgenden Gruppen aufgeteilt:

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Rv- bmp-2	Gruppe 3 Plasmid-/h- bmp-2
4 Wochen Tiere	8	8	8
12 Wochen Tiere	8	8	8

In einer ersten Operation wird die Knorpelbiopsie aus der Trochlea des linken Kniegelenks durchgeführt. In den darauffolgenden 10 Tagen erfolgte die Transfektion/Transduktion der Chondrozyten in Gruppe 2 und 3. In einer zweiten Operation wird in der Trochlea des rechten Kniegelenks zwei osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von 3,6 mm und einer Tiefe von 3 mm gesetzt.

Im Verlauf erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit nach 4 respektive 12 Wochen die Tötung der Tiere.

Es standen 12 Reservetiere für den gesamten Zeitraum zur Verfügung.

2.2.2 Tiere und Tierhaltung

Die für die Versuche verwendeten Knorpelzellen stammen aus weiblichen Kaninchen der Rasse *New Zealand White*, bezogen von der Firma Charles River. Die Kaninchen wurden gemäß FELASA-Richtlinien in speziellen Tierhaltungsräumen (Hell/Dunkel-Lichtprogramm mit Dämmerlichtphasen) unter konventionellen Hygienebedingungen in Einzelkäfigen mit Sitzschalen aus Kunststoff und gelochtem Boden (Grundfläche 0,43 m²) gehalten. Damit die Tiere die operierte Gliedmaße in den ersten zwei Wochen nach dem zweiten Eingriff nicht zu stark belasten, erfolgte die Unterbringung in Einzelkäfigen aus V2A-Stahl (Grundfläche 0,36 m²), ebenfalls mit gelochtem Boden. Die Käfige wurden zweimal in der Woche gereinigt und die Kotbleche ausgetauscht. Zusätzlich wurden einmal in der Woche die Käfige komplett gereinigt und autoklaviert. Als Futter erhielten die Tiere pelletiertes Alleinfuttermittel

(ad libitum), Heu, getrocknetes Brot und Möhren. Es herrschten angemessene Schlaf-Bedingungen sowie freier Zugang zu Trinkwasser und Nahrung.

Nach Lieferung der Kaninchen wurden diese gewogen und einer tierärztlichen, allgemeinen Untersuchung unterzogen, um den aktuellen Gesundheitszustand zu erfassen und eventuelle Verletzungen durch den Transport auszuschließen. Die Quarantänezeit betrug sieben Tage. Im Verlauf wurde der Gesundheitszustand durch tierärztliche Untersuchungen, Kontrolle des Körpergewichtes und Kontrolle des Blutbildes weiter überwacht.

Die Nutzung der Tiere für die beschriebenen Versuche wurde der Regierung von Oberbayern innerhalb eines genehmigungspflichtigen Tierversuchsvorhabens angezeigt.

2.2.3 Anästhesie und postoperative Versorgung

Unmittelbar präoperativ wurde eine kurze Untersuchung zur Erfassung des allgemeinen Wohlbefindens des Versuchstiers durchgeführt. Es wurde über die median verlaufende Arterie des Ohres Blut abgenommen. Anschließend erfolgte der intravenöse Zugang über eine mit einem Finger gestaute Ohrvene.

Die Narkoseeinleitung wurde mit 1 % Propofol in einer Dosierung von 10 mg/kg intravenös (i.v.) durchgeführt.

Um die Intubation zu ermöglichen, wurde bei Bedarf eine Nachdosierung mit Propofol bis zur guten Relaxation von Zungen- und Kaumuskelatur vorgenommen.

Die anschließende Intubation mit einem Spiral- Endotrachealtubus erfolgte blind unter akustischer Kontrolle in Brust-Bauchlage. Nach Ausschluss einer Fehlintubation wurde der Tubus mit einem Stoffband am Kopf des Tieres fixiert. Um die Austrocknung der Augen zu vermeiden wurde eine pflegende Dexapanthenol-haltige Augensalbe verwendet. Die Narkoseerhaltung erfolgte mit 2 % Propofol in einer Dosierung von 1,5 mg/kg/min i.v. nach Bedarf über einen Perfuser. Als Antibiose benutzten wir Borgal 24%, 0,5ml pro Tier, verdünnt mit NaCl auf 2ml i.v. Während der gesamten Anästhesie atmeten die Tiere spontan, lediglich bei Aussetzen der Atmung wurde manuell über den Atembeutel beatmet. Vor dem manipulativen Eingriff bekamen die Tiere bei Bedarf eine zusätzliche intravenöse Injektion von 5-10µg/kg Fentanyl. Zur Stabilisierung des Kreislaufs erhielten die

Kaninchen während der Operation mittels eines Perfusors 10ml/kg KGW/h Ringer-Laktat-Lösung. Im Rahmen der Narkoseüberwachung wurden die Parameter Atmung, Herzfrequenz und Pupillenweite regelmäßig erfasst und protokolliert. Die Ermittlung der Herzfrequenz erfolgte über ein EKG-Gerät. Um einen Abfall der Körpertemperatur zu vermeiden, wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert, die zusätzlich als Unterlage für die Kaninchen diente.

Die Extubation erfolgte nach einer 5-10minütigen Aufwachphase nach Beendigung der Operation. Postoperativ wurden die Tiere mit Carprofen (4mg/kg KG s.c. alle 24h für drei Tage) und Buprenorphin (0,03mg/kg KG s.c. alle 12h für min. zwei Tage) analgesiert. Desweiteren erfolgte antibiotische Abdeckung mit Borgal 24% (0,5ml/Tier s.c. verdünnt mit NaCl auf 2ml, alle 24h) für min. drei Tage.

Eine Analgesie ist notwendig, weil es sich bei den Eingriffen um Arthrotomien handelte und Schmerzen nach Abklingen der Narkose zu erwarten waren. Geplant war ebenfalls, bei Auftreten im weiteren Verlauf des Versuches einer mittleren bis hochgradigen Lahmheit, bis zur Abklärung der Ursache und möglichen Behebung dieser, die Tiere mit ausreichender Analgesie zu versorgen.

2.2.4 Versuchsablauf

2.2.4.1 Operationstechnik zur Knorpelzellbiopsie

Am Tag -14 erfolgt der erste Eingriff, bei dem die Knorpelbiopsie aus dem linken Kniegelenk des sich in Rückenlage befindlichen Kaninchens durchgeführt wurde. Das Knie wurde über eine anteromediale Arthrotomie (Länge ca. 1cm) eröffnet, so dass die Patella nach lateral luxiert werden konnte und die Trochlea femoris frei zu liegen kam. Anschließend wurde mit dem Skalpell aus der lateralen Trochlea hyaliner Knorpel steril entnommen, so dass 3 Knorpelflakes mit der Größe von je ca. 3x3 mm, was einer Zellzahl von ca. 100.000 entspricht, gewonnen werden konnten. Diese Proben wurden direkt in ein Medium (D-MEM, 10 % FCS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 100 µg/ml) gegeben und ca. zehn Minuten nach der Operation weiterbehandelt. Die Gelenkkapsel wurde schichtweise mit resorbierbaren Einzelknopfnähten und die Haut mit einer Donati-Rückstichnaht

verschlossen. Zusätzlich wurde die verschlossene Wunde mit einem Sprühverband versiegelt.

2.2.4.2 Fibrinkleber/Fibrin Clots

Das TISSUCOL-Kit besteht aus einer Lösung aus lipophiler humaner Plasmafraktion mit Fibrinogen, Fibronectin, Faktor XIII und Plasminogen in einem Verhältnis von 35–55 mg/1–4.5 mg/5–25 Einheiten/0.01–0.04 mg.

In der Kontrollgruppe wurden die unbehandelten Chondrozyten mit dem Fibrinkleber implantiert. Die Chondrozyten für die Retrovirale Gruppe wurden *ex vivo* transduziert und ebenfalls mit dem Fibrinkleber in den Defekt gegeben.

Die Transfektion der Chondrozyten für die Plasmidgruppe erfolgte *in situ* nach Schillinger et al. [154]. Hierbei wird zunächst ein Komplex aus pDNA und PEI hergestellt (COPROG) und anschließend mit dem Fibrinkleber gefrieretrocknet. Nach der Rehydratation, erfolgte das Einspritzen dieses Gemisches in den Defekt zusammen mit den Chondrozyten und Thrombin. Dies führt zu einer adäquaten Transfektion der Knorpelzellen [154].

2.2.4.3 Operationstechnik zur Implantation

Nach 2 Wochen, am Tag 0, erfolgte der zweite Eingriff (Dauer ca. 20 Minuten) am kontralateralen Kniegelenk unter Vollnarkose. Auch hier wurde eine anteromediale Arthrotomie unter sterilen Bedingungen durchgeführt, so dass die Patella nach lateral luxiert werden konnte und die *Trochlea patellaris* ebenfalls frei zur Darstellung kam. Blutungen im Operationsgebiet wurden mittels Elektrokauter gestillt. Nach Spülen des eröffneten Kniegelenks mit steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung wurden in die *Trochlea patellaris* zwei 3 mm tiefe, korrespondierende Defekte mit einem Bohrer (\emptyset 3,6 mm) unter Benutzung einer Bohrhülse gesetzt, der Markraum des Femurs blieb dabei verschlossen (siehe Abbildung 7). Der so entstandene Defekt wurde mit der entsprechenden Menge an Fibrin-Chondrozyten-(Vektor)-Gemisch, je nach Gruppe, gefüllt (siehe Abbildung 8). Nachdem der Fibrinkleber sich verfestigt hatte, erfolgte

der Verschluss des Gelenks analog dem Verschluss im ersten Eingriff. Auch hier erfolgte keine postoperative Immobilisation durch den Verband.

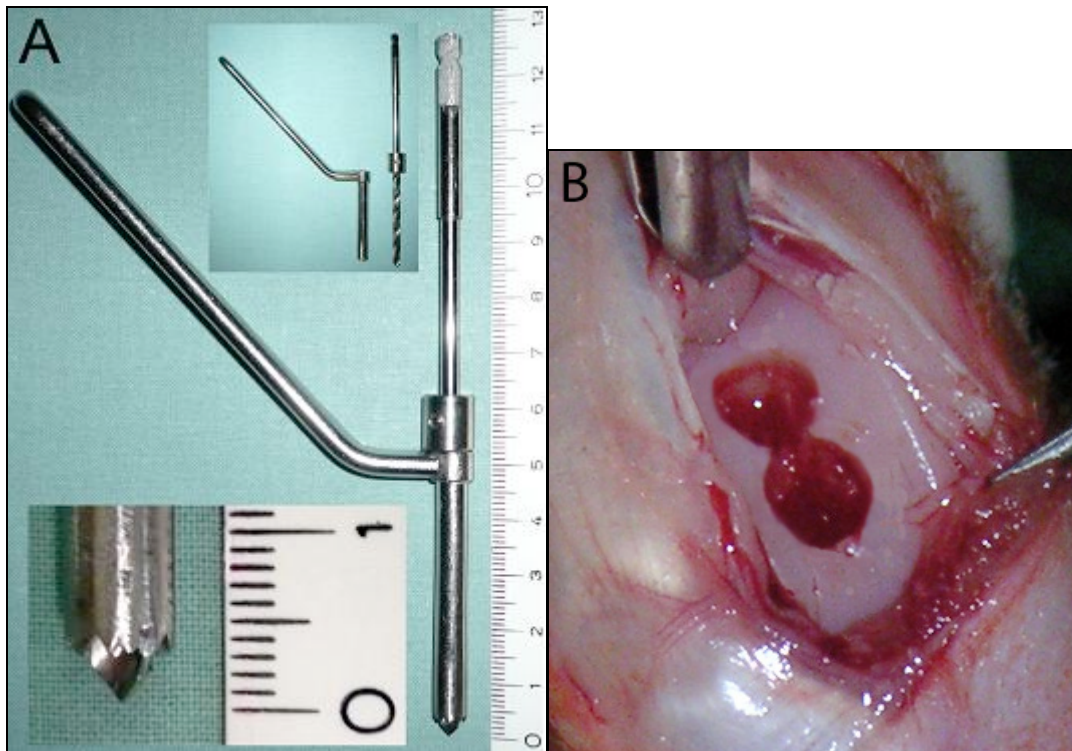


Abbildung 7: Präparation eines standardisierten osteochondralen Defekts



Abbildung 8: Intraoperativer Situs nach Auffüllung des Defektes

2.2.4.4 Tiertötung

Am Tag 28 bzw. 84 erfolgte die Euthanasie der 4- bzw. 12- Wochen Tiere. Nach initialer Blutabnahme zu Bestimmung des Gehalts an BMP-2 im Blutserum wurden die Tiere gewogen, anschließend mit 1 % Propofol i.v. narkotisiert und mit einer Überdosis Pentobarbital (90 mg/kg) i.v. euthanasiert.

2.2.4.5 Präparation der Femurkondylen

Das Kniegelenk wurde äußerlich und nach Eröffnung makroskopisch untersucht. Anschließend erfolgte die Präparation des distalen Femurs sowie die Entfernung sämtlicher Muskeln, Bänder, Gefäße und Nerven von Tibia und Fibula. Der distale Femur wurde abgesetzt und die beiden Defekte parallel der Bohrrichtung voneinander getrennt, so dass in beiden gleichgroßen Teilen die Defekte erkennbar waren. Anschließend wurden die Knochenscheiben präparatorisch weitgehend von Weichteilen befreit und ein Teil wurde randomisiert (proximaler oder distaler Defekt) in 6 %igem Formaldehyd bis zur histologischen Aufbereitung mindestens 48 Stunden bei +8 °C gelagert. Der andere Teil wurde zur Bestimmung von BMP-2, AP und Durchführung einer RT-PCR (ausgewertet durch eine weitere Arbeitsgruppe) verwendet.

2.2.5 Entkalkung und Einbettung

Für die weitere histologische Aufarbeitung, insbesondere für das Schneiden mit dem Mikrotom, war eine Entkalkung der Knochenblöcke notwendig. Die Entkalkung der Gewebstücke durch Bildung von wasserlöslichen Komplexen mit Calcium erfolgte in 20%-iger EDTA-Lösung. Die EDTA-Lösung wurde regelmäßig vor dem Wechsel des Mediums nach folgender Zusammensetzung neu angesetzt:

Herstellung von 1000ml EDTA-Entkalkungslösung:

- 100 g Titrisplex III R (Merk No. 8418)
- 33 g Tris 7-9 R (Sigma No. T 1378)
- 1000ml Aqua dest.

Die Entkalkungslösung wurde in Abständen von 72 Stunden gewechselt.

Die Proben wurden in einem 250ml Eppendorf- Reaktionsgefäß in steriler Gaze aufgehängt und auf einem automatischen Wackeltisch gestellt. Die Entkalkung erfolgte bei Raumtemperatur für 4 Wochen.

Anschließend erfolgte die Einbettung der Femurkondylen in Paraffin.

2.2.6 Anfertigung von Schnittpräparaten

Die Anfertigung von 7 µm dicken Schnitten wurde mit einem Mikrotom angefertigt. Nach der Streckung im 42 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und für 2 Stunden bei 37 °C getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.7 Histologische Färbung

Die zu färbenden Schnitte mussten zunächst entparaffiniert werden. Dies erfolgte analog Tabelle 1.

1.	Entparaffinieren in Xylol: Rothiclear 1 Rothiclear 2 Rothiclear 3 Rothiclear 4 Rothiclear 5	7 min 7 min 5 min 5 min 5 min
2.	Absteigende Alkoholreihe: 100% 100% 100% 90% 80% 70%	10 min 5 min 5 min 3-5 min 3-5 min 3-5 min
3.	Aqua dest.	3 min

Tabelle 1: Entparaffinieren der Schnitte

2.2.7.1 HE Färbetechnik

Anschließend wurde nach Tabelle 2 die HE-Färbung der einzelnen Schnitte durchgeführt.

1.	Hämalaun nach Mayer	15 min
2.	Leitungswasser (aufgrund des ph-Wertes)	30 min
3.	Eosin	5 min
4.	Aqua dest.	Kurz
5.	Alkoholreihe aufsteigend: 70% 80% 90% 100% 100%	Kurz Kurz Kurz Kurz 10 min
6.	5 Behälter mit Xylol	Jeweils 5 min
7.	Eindecken mit Eukitt	

Tabelle 2: HE-Färbung

2.2.7.2 Alcian-Blau- Färbetechnik

Auch hierbei erfolgt der erste Schritt, die Entparaffinierung der Schnittpräparate nach Tabelle 1.

Anschließend wurden die Schnitte, den Schritten in Tabelle 3 folgend, gefärbt.

1.	3%-ige C ₂ H ₄ O ₂	3 min
2.	Alcian-Blau 8GX (1%) in 3%-iger C ₂ H ₄ O ₂ ph-Wert soll 2,5 betragen	30 min
3.	Abspülen in 3%-iger C ₂ H ₄ O ₂	
4.	Aqua dest.	Kurz
5.	Gegenfärbung mit Kernechtrot	3-5 min
6.	Aqua dest	Kurz
7.	Alkoholreihe aufsteigend: 70% 80% 90% 100% 100%	Kurz Kurz Kurz Kurz 10 min
8.	5 Behälter mit Xylol	Jeweils 5 min
9.	Eindecken mit Eukitt	

Tabelle 3: Alcian-Blau-Färbung mit Gegenfärbung mittels Kernechtrot

2.2.8 Erstellung und Färbung der MMA- Präparate/ -Schnitte

Die Erstellung und die Färbung der MMA-Präparate/ -Schnitte erfolgte modifiziert nach einer Anleitung von Romeis et al. [145].

Nachdem die distalen Femuranteile mit Defekt entnommen worden sind, erfolgte zunächst die Fixierung der Präparate in Formalin 6% für 48 Stunden in einem Kühlschrank bei +4°C. Nach 2 Tagen erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70%-igem Ethanol für 48 Stunden. Die Alkohollösung wurde dann nach je 24 Stunden gewechselt und durch jeweils durch eine höher-prozentige Lösung ersetzt. Nach abschließenden 48 Stunden in 100%-

igem Ethanol wurden die Knochenpräparate in Aceton (100%) eingebracht. Das Aceton wurde nach 48 h gewechselt, weitere 48 h später durch MMA ersetzt. Das MMA wurde nach einer Woche erneuert. Die Schritte in MMA wurden im Vakuum durchgeführt (30 min), um eine gute Durchdringung der Präparate mit MMA zu erreichen und die Verwendung eines Ultrahartmikrotoms zu ermöglichen. Abschließend erfolgte die Einbettung im Einbettgemisch (Methylmethacrylat (100 ml), Nonyl-phenyl-polyethylenglykolacetat (18 ml) und Benzoylperoxid (3 mg)), welches nach einer Woche gewechselt wurde. Vor Gebrauch erfolgte die Trocknung des Benzoylperoxid für vier Stunden bei +60° C. Die Gefäße mit den Präparaten wurden durch Vakuumverschluss abgedichtet und konnten bei einer konstant geregelten Umgebungstemperatur von +22° C im Wasserbad polymerisieren. Der Einbettvorgang dauerte somit insgesamt einen Monat.

Die Aushärtung der Schnitte (Polymerisierung) erfolgte bei 37° C in einem Brutschrank.

Anschließend wurden die ausgehärteten Präparate mit einer Diamant-Bandsäge getrimmt und in das Sägemikrotom eingepasst. Mit der Innenlochsäge wurden dann abwechselnd 1 µm bzw. 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Der Substanzverlust zwischen zwei Schnitten betrug aufgrund der Sägeblattstärke 3 µm.

Die gewonnenen Schnitte wurden mit Hilfe der Toluidin-Blau-Färbung angefärbt. Neben Toluidin war dem basischen Färbegemisch Pyronin beigegeben. Die Schnitte wurden zunächst in demineralisiertes Wasser gegeben. Nach erfolgter Streckung der Schnitte durch die Erwärmung wurden die Präparate drei min. in Toluidin-Blau gefärbt. Danach wurden diese in demineralisiertem Wasser zwei bis drei Mal gespült. Die zusätzlich durchgeführte Berlin-Blau-Färbung der einzelnen Schnittpräparate erfolgte nach Tabelle 4.

1.	Verringerung der Präparatdicke von 1µm auf 0,25µm: zunächst mit Nassschleifmaschine, dann Schleifpapier grobkörnig (1000er Körnung, Ø 270mm), abschließend Schleifpapier feinkörnig (4000er Körnung, Ø 270mm)	
2.	Einlegen in 2-Methoxyethyl-acetat	12 h
3.	2%ige wässrige Kaliumferrocyanid-Lösung (Merck) und 2%ige HCL 1:1 mischen, anschließend in Brutschrank (+60° C) färben	60min
4.	Aqua dest.	Kurz
5.	Gegenfärbung mit Kernechtrot	3-5 min
6.	Aqua dest	Kurz
7.	Alkoholreihe aufsteigend: 70% 80% 90% 100% 100%	Kurz Kurz Kurz Kurz 10 min
8.	2 Behälter mit Xylol	Jeweils 5 min
9.	Eindecken mit Eukitt	

Tabelle 4: MMA-Färbung (Berliner-Blau-Färbung, modifiziert nach [145])

2.2.9 Immunhistologische Färbung

Zu detaillierten immunohistochemischen Analyse des Ersatzgewebes wurde die Paraffinschnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen I (Col1), Kollagen II (Col2) Aggrecan und Aggrecan-Link-Protein gefärbt. Die Immunhistologische Färbung erfolgte gemäß unten stehender Tabelle 5 und Tabelle 6.

Nach dem Entparaffinieren der Schnitte mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte die Behandlung mit 1%-Wasserstoffperoxid (in Methanol) um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu unterbrechen. Die anschließende Enzymvorbehandlung für das jeweilige Antigen ist notwendig und differiert je nach Antigen. Um die, das Ergebnis verfälschenden, unspezifischen Bindungen der primären Antikörper zu verhindern, erfolgte ein Zwischenschritt, bei dem Pferdeserum zum Blockieren verwendet wurde.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Enzyme	
Aggrecan	12/21/1-C-6	1:5	Ch AC*	DSHB
Link Protein	9/30/8A4	1:5	Ch AC*	DSHB
Kollagen I	Col1	1:1500	Hyal/Protease	Sigma
Kollagen II	CIICI	1:6	Hyal/Pronase	DSHB

Tabelle 5: Antikörper, Enzymvorbehandlung und Bezugsquelle

1.	Entparaffinieren in Xylol	20 min
2.	Absteigende Alkoholreihe: 100%, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%	jeweils 2 min
3.	Methanol mit H ₂ O ₂ (1%)	25 min
4.	Umfahren der Schnitte mit dem DakoPen	
5.	PBS-Lösung	10 min
6.	<u>Enzymbehandlung bei 37°C</u>	
	Col 1,8A4, 1C6: Hyaluronidase 3U/ml	75 min
	Protease24 0,02mg/ml	45 min
	CIICI Hyaluronidase 30/ml	75 min
	Pronase 2mg/ml	45 min
7.	Spülen in PBS	15 min
8.	Blocken mit Pferdeserum 1:20	60 min
9.	Primär-Antikörper	30 min
10.	PBS	15 min
11.	Sekundär- Antikörper	30 min
12.	PBS	15 min
13.	ABC-Komplex	30 min
14.	PBS	15 min
15.	DAB	4 min
16.	Kurz spülen mit H ₂ O	
17.	Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer, und anschließendes kurzes Spülen mit H ₂ O	
18.	Aufsteigende Alkoholreihe: 70%, 80%, 90%, 100%, 100%	Je 5 min
19.	Xylol 1	5 min
20.	Xylol 2	5 min

Tabelle 6: Arbeitsschritte für immunhistologische Färbung

2.2.10 Auswertung der Präparate

Die angefertigten Präparate wurden mit einem Durchlichtmikroskop betrachtet und beurteilt. Die Auswertung der Präparate erfolgte geblindet von zwei unabhängigen Begutachtern. Es war weder die behandelte Seite noch die Gruppenzugehörigkeit der Tiere bekannt.

2.2.10.1 Histologie/MMA

Die histologische Auswertung der HE-gefärbten Präparate erfolgte nach der *ICRS Visual Histological Assessment Scale*. Dieser Score wurde erstmals 2003 von der ICRS veröffentlicht.

Hierbei werden folgende Kriterien untersucht und entsprechend Punkte vergeben:

- Oberfläche
- Matrix
- Zellverteilung
- Zellebensfähigkeit
- Subchondraler Knochen
- Knorpelmineralisation

Jeder Defekt erhält so eine Punktzahl zwischen null und 18, wobei die Maximalzahl gleichbedeutend mit histologisch gesunden, hyalinen Knorpel ist. Die Schnitte wurden von zwei unabhängigen Untersuchern zwei bis dreimal bewertet. Die Ergebnisse wurden verglichen und bei deutlichen Abweichungen wurden die Präparate erneut begutachtet. Die Füllung der Defekte war dabei so kodiert, dass die tatsächliche Therapieform erst bei der endgültigen Auswertung bekannt wurde. Während der Begutachtung war den Untersuchern nicht bekannt, welcher Defekt zu welcher Gruppe zugehörig war.

Zusätzlich wurden folgende Befunde ohne Punkteverteilung erhoben und festgehalten:

- Vorhandensein von hypertrophierten Chondrozyten
- Erkennen der Defektgrenze

Eigenschaften	Punkte
I. Oberfläche	
Gleichmäßig/Kontinuierlich	3
Unregelmäßig/Unterbrochen	0
II. Matrix	
Hyalin	3
Mix	2
Fibrocartilaginär	1
Fibröses Gewebe	0
III. Zellverteilung	
Säulenartig	3
Mix	2
Cluster	1
Unorganisiert	0
IV. Zellüberleben	
Lebensfähig	3
Partiell lebensfähig	1
<10% lebensfähig	0
V. Subchondraler Knochen	
Normal	3
Gesteigerter Umbau	2
Knochennekrose/Granulationsgewebe	1
Abgelöst/Fraktur/Kallus	0
VI. Knochenmineralisation	
Normal	3
Abnormal	0
Vorliegen von hypertrophen Chondrozyten	
VII. Grenze	
Kontinuierlich	
Diskontinuierlich	
Defektgrenze erkennbar	

Tabelle 7: ICRS-Score (modifiziert nach [103])

2.2.10.2 Immunhistologie

Die Bewertung der Defekte nach Färbungen für Kollagen I, Kollagen II, Link-Protein und Aggrecan erfolgte, wie auch die Bewertung der Alcian-Blau-Präparate nach einem eigenen Punkteschema mit einem Maximum von 1 und einem Minimum von 0 Punkten. Bewertet wurde das Färbeverhalten des Defektes im Vergleich zum umliegenden gesunden Knorpel.

Auch hier, ähnlich zur Auswertung der histologischen Präparate, wurden die Schnitte von mindestens zwei unabhängigen Untersuchern zwei bis dreimal bewertet. Die Ergebnisse wurden ebenfalls verglichen und bei deutlichen Abweichungen wurden die Präparate erneut begutachtet. Die Füllung der Defekte war dabei so kodiert, dass die tatsächliche Therapieform erst bei der endgültigen Auswertung bekannt wurde. Während der Begutachtung war den Untersuchern nicht bekannt, welcher Defekt zu welcher Gruppe zugehörig war.

Die Punkteverteilung ergab sich wie folgt für Kollagen I, Kollagen II, Link-Protein, Aggrecan:

Färbeintensität im Verhältnis zum umliegenden, gesunden Knorpel:

- Stärker 1 Punkt
- Gering bis gleich 0,5 Punkte
- Keine Färbung 0 Punkte

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der 4- Wochen-Tiere

Der Versuch wurde mit insgesamt 26 gleichaltrigen, ausgewachsenen, New Zealand White Rabbits durchgeführt. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein durchschnittliches Gewicht von 3566 g (\pm 371g). Zum Zeitpunkt der Knorpelbiopsie aus dem rechten Kniegelenk wogen sie durchschnittlich 3725 g (\pm 415g), zur Implantation 10 Tage später waren sie mit 3675g (\pm 378g) etwas leichter. Die Tötung der Tiere erfolgte 4 Wochen später, wobei diese im Durchschnitt 3847g (\pm 390g) wogen.

Ein Kaninchen der Kontrollgruppe verstarb beim Intubationsversuch vor der Knorpelentnahme. Bei einem weiteren Tier dieser Gruppe imponierte nach der Implantation am 10.8.04 eine Umfangsvermehrung des linken Knies, bei der Revision, welche wir 10 Tage nach Implantation durchführten, zeigte sich ein eitriger Abszess, welcher von der Subkutis über Fisteln durch die Faszie bis in das Kniegelenk reichte. Am 29.08.04 erschien die Haut erneut offen, so dass am 30.08.04 eine zweite Revision erfolgte. Bei der Opferung am 6.9.04 zeigte sich noch immer ein eitriger Gelenkerguss.

Das objektive Wohlbefinden eines Tieres der Gruppe 1 verschlechterte sich nach der Implantation so sehr, so dass wir 2 Tage nach Implantation entschlossen, eine Euthanasie des Tieres durchzuführen.

So konnten 24 Tiere in die Auswertung aufgenommen werden

	Gruppe 1: Kontrolle	Gruppe 2: Rv-bmp-2	Gruppe 3: Plasmid
Tierzahl	8	8	8

Tabelle 8: Verteilung der 4 Wochen-Tiere

3.1.1 Makroskopische Beurteilung bei Explantation

Die Kniegelenke sowie die Narben der Kontrollgruppe erschienen mit einer Ausnahme, bei der wir eine Bursitis praepatellaris feststellten, reizlos und unauffällig. Die Defekte waren ebenfalls aufgefüllt, jedoch imponierte das Ersatzgewebe glasig-durchsichtig (siehe Abbildung 9B). Bei einem Tier wies der Defekt einen Riss im Randbereich auf. Bei allen Tieren der Gruppe, deren Chondrozyten mit retroviralem BMP-2 behandelt wurden, waren nach Gelenkeröffnung Osteophytenbildung, wenn auch zum Teil nur sehr diskret ausgeprägt, nachweisbar. Bei 2 Tieren dieser Gruppe imponierten heterotrope Ossifikationen im Bereich des parapatellären Zugangsweges. Ein Tier entwickelte im Verlauf der 4 Wochen eine hypertrophe, teils wulstige Narbe am linken Kniegelenk, bei dem auch die Kapsel stellenweise verknöchert erschien. Bei allen Tieren der Gruppe 2 zeigte sich nach 4 Wochen Standzeit, dass die aufgefüllten Defekte auf Niveau des umliegenden Gelenkknorpels lagen. Die Oberfläche erschien größtenteils glatt und glänzend, der Defekt selber erschien etwas heller und durchsichtiger im Vergleich zum umliegenden Knorpel (siehe Abbildung 9A). Die Defekte imponierten auf Druck mit einer Pinzette weicher als der umliegende, intakte Knorpel.

Zwei Kaninchen der Plasmid-Gruppe wiesen zum Zeitpunkt der Tötung einen mit 2 bzw. 3 ml relativ großen, weißlich trüben und fadenziehenden Gelenkserguss auf. Mit einer Ausnahme, bei der der Knorpel in der Mitte des Defektes eingebrochen erschien, waren die restlichen Defekte allesamt auf Knorpelniveau sowie makroskopisch ähnlich denen der Gruppe 2.

Die explorative Eröffnung der rechten Kniegelenke zeigte bei allen Tieren diskrete Aufrauungen im Bereich der Entnahmestelle der Knorpelflakes. Höhergradige Knorpelschäden waren makroskopisch nicht nachweisbar.

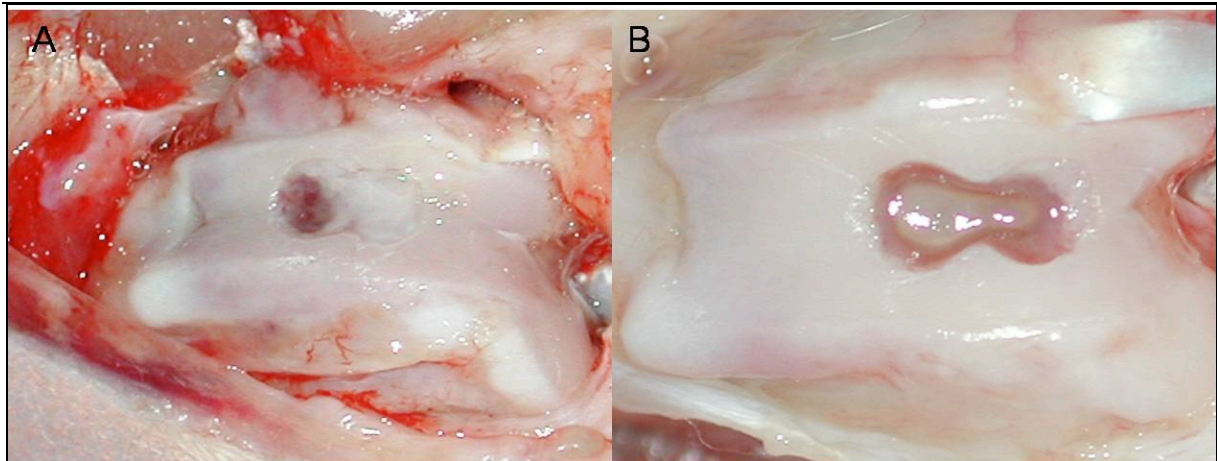


Abbildung 9: Repräsentative Bilder von aufgefüllten Defekte der Retroviren Gruppe (A) und der Kontrollgruppe (B)

3.1.2 Histologische Ergebnisse

Die erreichte durchschnittliche Gesamtpunktzahl von Gruppe 2 betrug 10,8 (\pm 1.3 SEM), was ein signifikant besseres Ergebnis im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Plasmid-Gruppe darstellt. Die Kontrollgruppe erreichte mit 8,4 Punkten (\pm 0.9 SEM) ein unwesentlich besseres Ergebnis im Vergleich zur Plasmid-Gruppe, welche durchschnittlich auf 7 Punkte (\pm 3,1 SEM) kam (siehe Tabelle 9).

In keiner Gruppe entsprach die Knorpelqualität des Defektes der des nativen, hyalinen Gelenkknorpels.

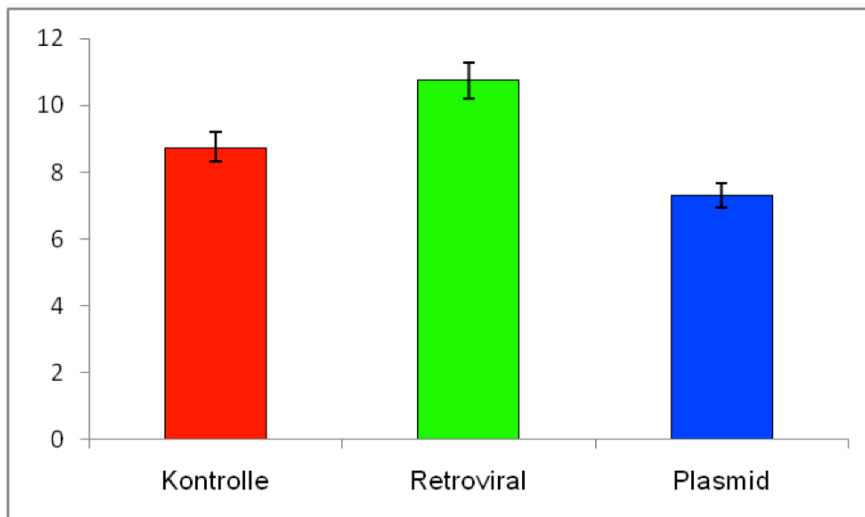


Tabelle 9: Verteilung der ICRS-Durchschnittspunktzahl, 4- Wochen-Tiere

3.1.2.1 Oberfläche

Die maximal erreichbare Punktzahl beträgt 3, wobei die Oberfläche in ihrer Gesamtheit durchgängig und glatt sein musste. In Gruppe 2 zeigten die Präparate von 3 Tieren eine glatte und erhaltene Oberfläche, bei den restlichen Tieren der Gruppe war die Oberfläche aufgeraut und nicht durchgängig, so dass sie eine Durchschnittspunktzahl von 1,875 erreicht. Bei Gruppe 1 und Gruppe 3 zeigten jeweils 2 Tiere eine glatte durchgängige Oberfläche, 3 Tiere erschienen unter dem Mikroskop aufgeraut und diskontinuierlich.

3.1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Bei der Auswertung der extrazellulären Matrix erreichte ein Tier der rv-BMP-2-Gruppe die maximale Punktzahl von 3 nach ICRS. Bei den restlichen Präparaten der Gruppe konnte eine Mischung aus hyalinem Knorpel und Faserknorpel festgestellt werden, so dass die durchschnittliche Punktezahl von 2,2 erreicht wurde (siehe Abbildung 13A). In Gruppe 1 wie auch in Gruppe 3 fand sich jeweils nur ein Präparat, welches die histologische Struktur von fibrocartilaginärem Gewebe aufwies, bei den restlichen Tieren war in allen Schnitten fibröses Gewebe vorhanden.

3.1.2.3 Zellverteilung

Bei der Beurteilung der Anordnung der Zellen konnten wir lediglich bei 2 Präparaten der Gruppe 2 eine geordnete Verteilung der Chondrozyten erkennen. Ein Schnittpräparat wies eine Mischung von säulenförmiger Anordnung und in Haufen liegenden Chondrozyten auf. Ansammlungen von über 10 Chondrozyten in einer isogenen Gruppe sind physiologisch und Zeichen eines stattgehabten Teilungsprozesses. Das andere hervorzuhebende Präparat ließ wenige, jedoch in Haufen liegende Zellen erkennen.

3.1.2.4 Lebensfähigkeit der Chondrozyten

Die Lebensfähigkeit der Chondrozyten ist essentiell für die Funktionalität des Knorpels. Hierbei zeigten alle Präparate der Kontrollgruppe sowie der Plasmid-Gruppe in der Mehrzahl lebensfähige Chondrozyten.

3.1.2.5 Subchondraler Knochen

Der subchondrale Knochen legt die Geometrie des Gelenks sowie seine Beladung mit Chondrozyten fest. Eine normale subchondrale Struktur konnte in keinem Präparat gefunden werden. In der retroviralen Gruppe wiesen die Schnitte von 3 Tieren einen gesteigerten Umbau der subchondralen Zone auf, so dass sich die Gruppe 3 mit 1,4 Punkten von den anderen Gruppen abhob. In der Kontrollgruppe zeigten 2 Präparate einen gesteigerten Umbau, ein Tier Granulationsgewebe. Kallusbildung in der subchondralen Zone trat bei den restlichen 2 Defekten dieser Gruppe auf. Die Plasmid-Gruppe zeigte vorwiegend Kallusbildung.

3.1.2.6 Knorpelmineralisation

Mit Ausnahme von 3 Präparaten wiesen alle Defekte eine normale, homogene Matrix ohne Verkalkungen und kristallinen Einlagerungen auf. Ein Tier der Kontrollgruppe sowie 2 Schnitte der Plasmid-Gruppe zeigten Verkalkungen innerhalb des Defektes.

Bei jeweils zwei Schnittpräparaten der Retroviralen Gruppe sowie der Plasmidgruppe und einem Präparat der Kontrollgruppe konnte hypertrophierte Chondrozyten innerhalb des Defekts erkannt werden.

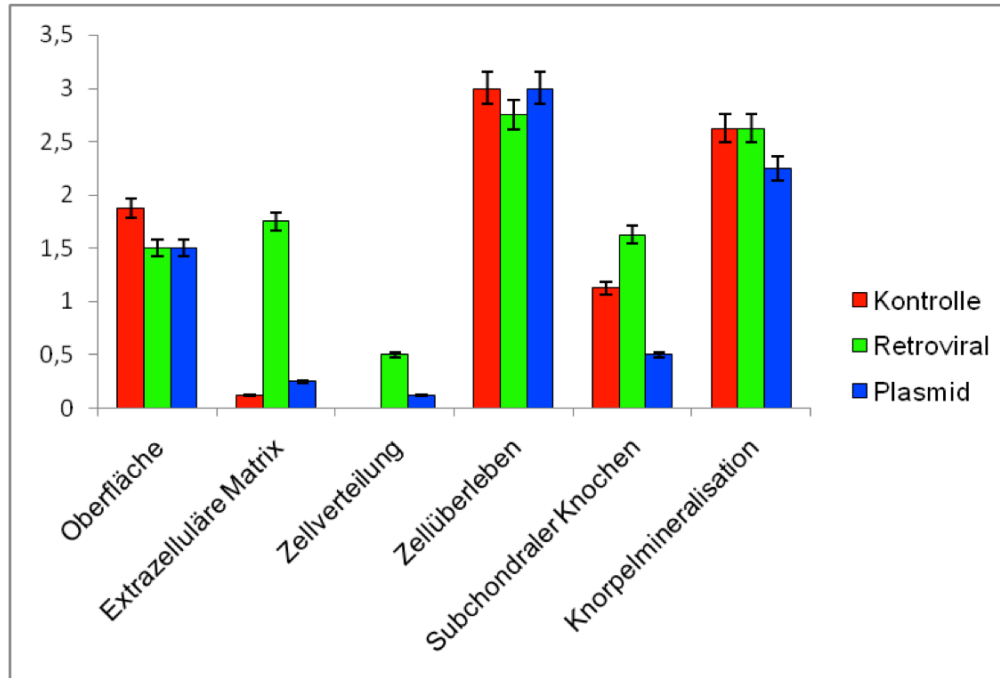


Tabelle 10: Verteilung der Gruppen in Bezug auf die Untergruppen des ICRS-Score (4-Wochen-Tiere)

3.2 Ergebnisse der 12- Wochen-Tiere

Die zweite Versuchsreihe wurde mit 25 gleichaltrigen, ausgewachsenen Kaninchen der Gattung *New Zealand White Rabbit* durchgeführt. Nach Erhalt der Tiere wogen diese im Durchschnitt 3834g (\pm 378g). Zum Zeitpunkt der Knorpelbiopsie, welche 5 Tage später stattfand, lag das Durchschnittsgewicht bei 3826g (\pm 360g), welches 10 Tage später am Tage der Implantation 3837g (\pm 382g) betrug. Zeitpunkt der Tötung der Tiere nach 12 Wochen wogen die Kaninchen im Durchschnitt 4444g (\pm 417g).

Bei 3 Kaninchen kam es postoperativ zur Bildung von Hämatomen, welche jeweils ohne Komplikationen ausheilten. Ein Tier entwickelte nach Implantation eine leichte Wundheilungsstörung mit Dehiszenz der Wundränder. Nach mehrmaligem Spülen sowie Reinigen heilte die Wunde ohne weitere Probleme ab.

Ansonsten zeigte sich bei allen anderen Tieren bei den Wundkontrollen an beiden Kniegelenken ein komplikationsloser Heilungsverlauf. Ein Tier verstarb nach der Implantation. Es konnten somit 24 Tiere nach unten stehender Verteilung in die Auswertung aufgenommen werden (siehe Tabelle 11).

	Gruppe 1: Kontrolle	Gruppe 2: Rv-bmp-2	Gruppe 3: Plasmid
Tierzahl	8	8	8

Tabelle 11: Verteilung der 12- Wochen- Tiere

3.2.1 Makroskopische Beurteilung nach Explantation

Die Narben waren bei allen 24 Tieren reizlos, zum Zeitpunkt der Gelenkentnahme konnten keine Entzündungszeichen festgestellt werden.

Bei fünf Tieren der Kontrollgruppe zeigten sich arthrotische Veränderungen medialseitig an der Trochlea, bei drei Präparaten waren zusätzlich osteophytäre Anbauten an der lateralen Trochlea und an der Patella zu sehen. Die Produktion von Synovialflüssigkeit, welche sich farblos und fadenziehend darstellte, war bei zwei Tieren erhöht, bei den anderen Kaninchen der Kontrollgruppe konnten keine Auffälligkeiten erkannt werden. Die Defekte waren gut abgrenzbar (siehe Abbildung 10), der Defekt eines Präparats war nur mäßig durchbaut. Die Oberfläche der Defekte war glatt und glänzend, der Defekt selbst stellte sich im Vergleich zu dem ihn umgebenden hyalinen Knorpel heller und durchsichtiger dar und gab auf Druck leicht nach. Eine Stufenbildung war bei keinem Präparat makroskopisch nachweisbar.

Bei einem Tier der Retroviralen Gruppe zeigten sich Verknöcherungen im Bereich der Narbe. Alle Tiere der Gruppe 1 wiesen nach der Arthrotomie osteophytäre Anbauten an der medialen und lateralen Trochlea sowie an der Patella auf. Bei zwei Tieren stellte sich die Patellasehne verknöchert dar. Die Synovialflüssigkeit war bei allen Tieren der Retroviralen Gruppe fadenziehend, bei vier Tieren vermehrt und farblos, bei einem Tier imponierte die Flüssigkeit bernsteinfarben. Die Kapsel eines Tieres wirkte fibrös verändert. Nach Gelenkeröffnung stellten sich die aufgefüllten Defekte in der Trochlea noch sichtbar dar (siehe Abbildung 11). Die Oberflächen der

Defekte erschienen glatt und glänzend. Ulzerationen waren nicht nachweisbar. Die Defekte zeigten sich diskret heller im Vergleich zum umliegenden Knorpelgewebe, waren jedoch mit einer Ausnahme gut durchbaut und gaben auf Druck im Vergleich zu der 4-Wochen-Gruppe weniger nach.

In der Plasmid-Gruppe zeigten sich bei allen Tieren osteophytäre Anbauten im Sinne arthrotischer Veränderungen an der Trochlea medialisseitig. Bei zwei Tieren imponierten diese Veränderungen auch am lateralen Rand der Trochlea, bei zwei weiteren Tieren auch an der Patella. Die Synovialflüssigkeit war bei drei Tieren leicht vermehrt. Nach Gelenkeröffnung stellten sich die aufgefüllten, gut erkennbaren Defekte glatt und glänzend dar, wobei drei Gelenke eine Stufenbildung beim Übergang vom gesunden, hyalinen Knorpel zum Defekt aufwiesen. Ein Defekt zeigte keine Durchbauung. Eine Rissbildung war makroskopisch nicht zu erkennen. Bei allen Tieren wirkten die Defekte bei Druck mit der Pinzette diskret weicher als bei der Gruppe 2.

Die explorative Eröffnung des rechten Kniegelenks zeigte bei allen 12-Wochen-Tieren eine diskrete Aufrauung der Knorpeloberfläche im Sinne von 1.-bzw 2.-gradigen Knorpelschäden im Bereich der Entnahmestellen.

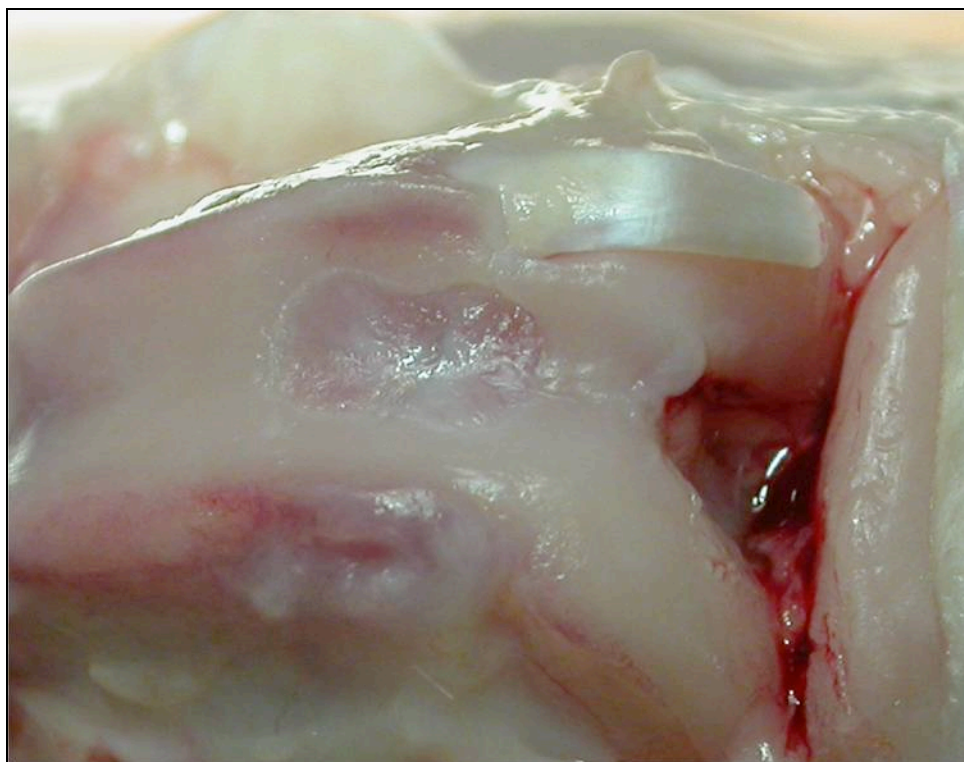


Abbildung 10: Defektbereich (Kontrollgruppe) nach 12 Wochen



Abbildung 11: Defektbereich (rv-BMP-2) nach 12 Wochen

3.2.2 Histologische Ergebnisse

Gruppe 2 erreichte mit durchschnittlich 13,57 Punkten ($\pm 1,39$ SEM) das beste Ergebnis im Vergleich zu der Kontrollgruppen (9,83 Punkte $\pm 3,18$ SEM), und der Plasmid- Gruppe (8,71 Punkte $\pm 2,14$ SEM).

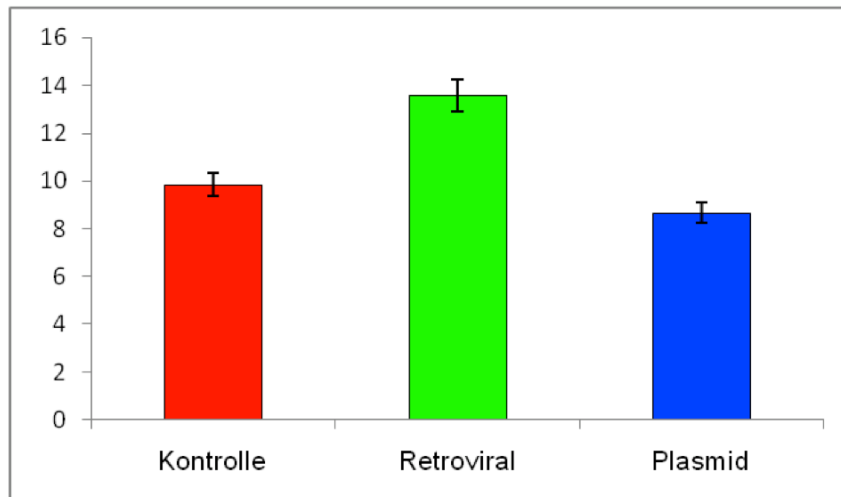


Tabelle 12: Verteilung der ICRS-Durchschnittspunktzahl, 12-Wochen-Tiere

3.2.2.1 Oberfläche

In der Kontrollgruppe wiesen 2 Präparate glatte und durchgängige Defektoberflächen auf, wobei sich in dieser Gruppe bei den restlichen Defekten eine Rissbildung zeigte. Die Beschaffenheit der Oberfläche war auch histologisch bei Präparaten der Retroviralen Gruppe mit einer Ausnahme glatt und durchgängig. Lediglich ein Schnittpräparat der Plasmid- Gruppe zeigte eine durchgängige Oberfläche, bei den restlichen Präparaten waren Aufrauungen oder Kontinuitätsunterbrechungen erkennbar, so dass man von einer geringen Widerstandsfähigkeit des Ersatzgewebes ausgehen kann.

3.2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Ein Schnittpräparat der Retroviralen Gruppe wies bei Auswertung der Extrazellulären Matrix sowohl hyaline Anteile wie auch Faserknorpelanteile auf. Bei zwei weiteren Tieren zeigte sich hauptsächlich Faserknorpel als Regenerationsgewebe der Defekte, der vierte Defekt aus dieser Gruppe war mit fibrösem Gewebe ausgefüllt.

In der Kontrollgruppe zeigte sich bei allen Schnitten Faserknorpel als vorherrschendes Regenerationsgewebe.

In der Plasmid- Gruppe konnten zwei Präparate aufgrund der gemischten Matrix aus Hyalinen Knorpel und Faserknorpel mit zwei Punkten bewertet werden, zwei weitere Tiere wiesen rein fibröses Gewebe innerhalb des Defektes auf.

3.2.2.3 Zellverteilung

Bei einem Tier aus der Retroviralen Gruppe und zwei Tieren aus Gruppe 1 waren die Chondrozyten zum Einen säulenförmig aufgereiht, zum Anderen zeigten sich jedoch auch in Clustern liegende Zellen, so dass alle drei Präparate den Punktwert 2 erhielten. Bei den restlichen Schnitten imponierten die Chondrozyten in Clustern liegend oder auch unorganisiert innerhalb des Defektes.

3.2.2.4 Lebensfähigkeit der Chondrozyten

Bei allen Schnittpräparaten zeigten sich nahe ausschließlich lebensfähige Chondrozyten, erkennbar an deren eigener perizellulärer Matrix, dem sogenannten Knorpelhof sowie den homogenen EZM mit Zeichen eines hohen Anteils an Proteoglykanen.

3.2.2.5 Subchondraler Knochen

In der Kontrollgruppe konnten vier Präparate einen gesteigerten Umbau des subchondralen Knochens aufweisen, bei einem Präparat war lediglich etwas Kallusbildung zu erkennen.

Bei allen Präparaten der Retroviralen Gruppe zeigte sich ein gesteigerter Umbau in der subchondralen Zone, normaler Subchondraler Knochen war jedoch noch in keinem Schnitt zu sehen.

In der Plasmid- Gruppe imponierten bei drei Tieren im Bereich des subchondralen Knochens allein stehende Knochenstücke sowie stellenweise Kallusbildung. Bei den restlichen fünf Präparaten stellte sich die subchondrale Zone ähnlich den Schnitten der Gruppe 1 dar.

3.2.2.6 Knorpelmineralisation

Die histologischen Schnitten der Retroviralen wie auch Kontrollgruppe zeigten eine regelrechte Knorpelmineralisation. Ein Präparat der Plasmid-Gruppe zeigte einen kalzifizierten Bereich innerhalb des Defektes. Hypertrophierte Zellen konnten bei keinem Tier nachgewiesen werden.

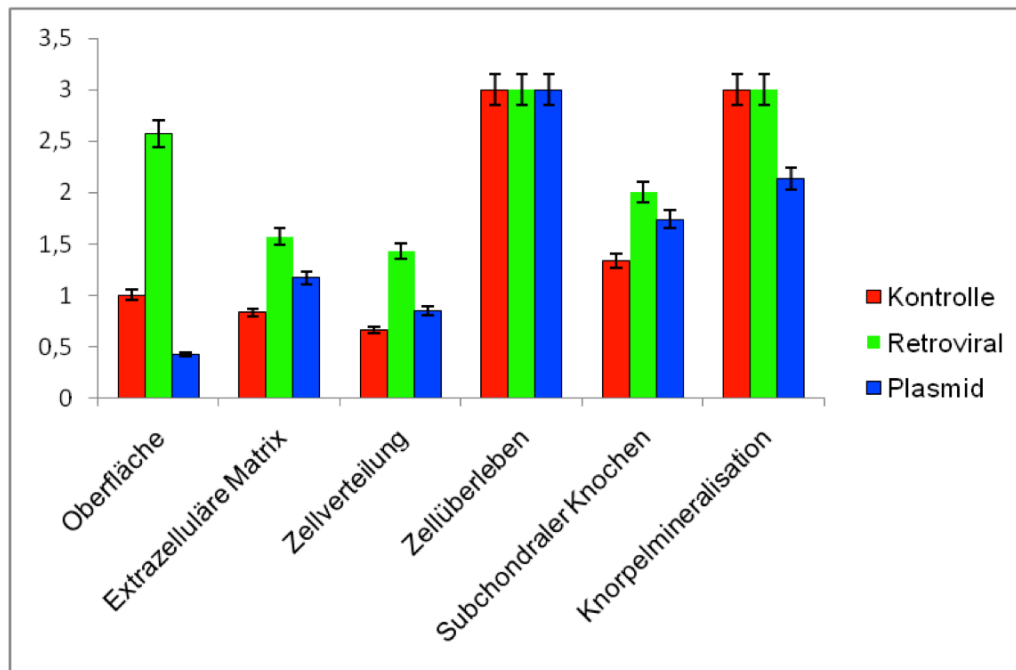


Tabelle 13: Verteilung der Gruppen in Bezug auf die Untergruppen des ICRS-Scores (12-Wochen-Gruppe)

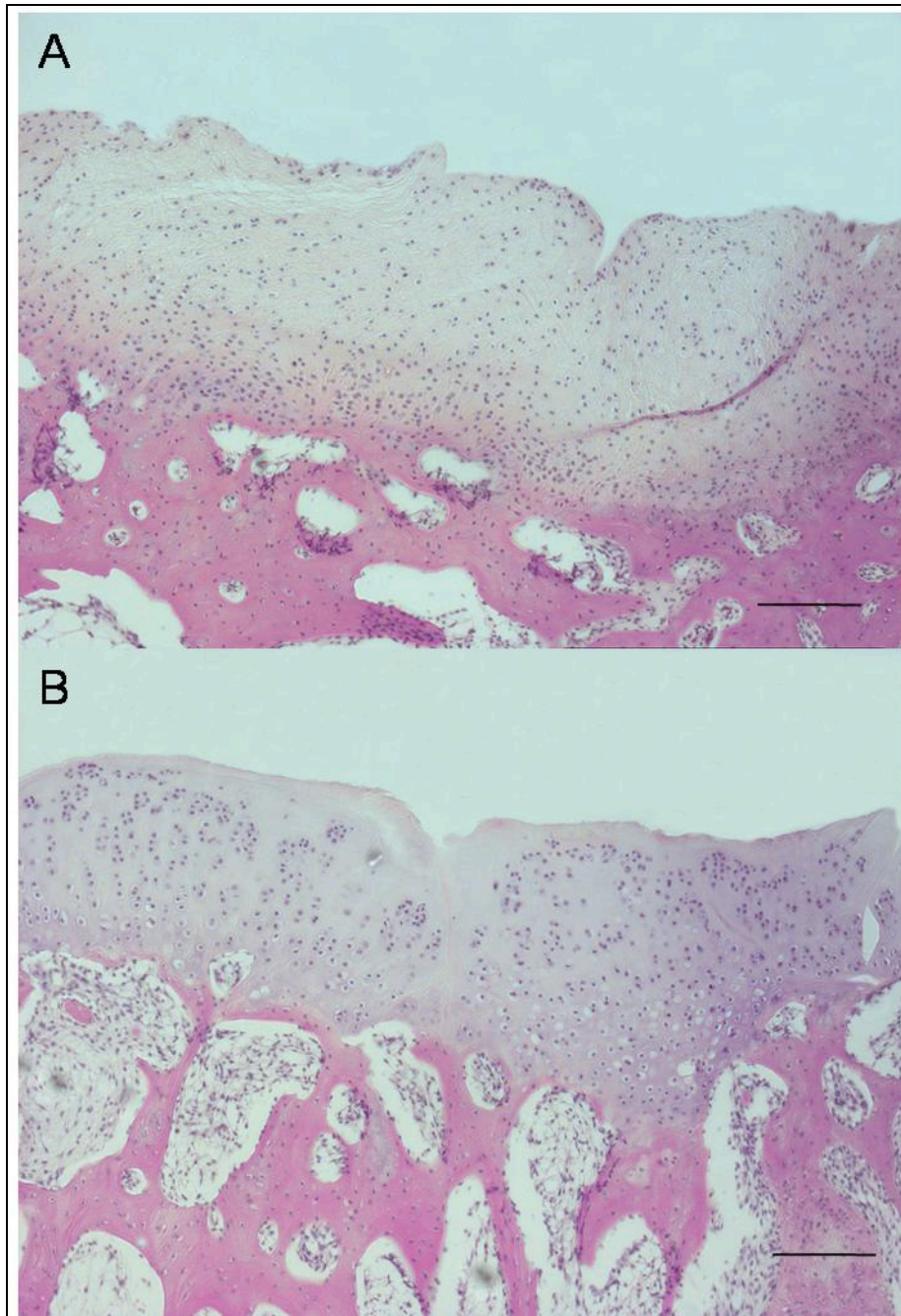


Abbildung 12: Repräsentative histologische Schnitte nach 12 Wochen (HE-Färbung, Balkenlänge 125 μm)

A) In der Kontrollgruppe zeigt sich im Defektbereich eine Mischung aus fibrösem und fibrocartilaginären Gewebe. Eine säulenförmige Anordnung wie sie es für intakten Hyalinen Knorpel typisch ist, kann nicht nachgewiesen werden. Lediglich einzelne Chondrozytenanhäufungen sind erkennbar.

B) Im Gegensatz dazu zeigen sich in der Retroviralen Gruppe mehr typische Anzeichen für Hyalinen Knorpel wie eine vermehrte säulenförmige Anordnung der Chondrozyten sowie reichlich EZM.

3.3 Vergleich 4- Wochen-Tiere vs. 12-Wochen-Tiere

Bei allen Tieren waren makroskopisch und histologisch die Defektgrenzen zu erkennen.

Insgesamt kam es im Verlauf zu einer Verbesserung der durchschnittlichen Punktwerte nach ICRS-Score in allen drei Gruppen. Der noch deutliche Vorteile der Retroviralen Gruppen im Vergleich v.a. zu der Kontrollgruppe war jedoch geringer.

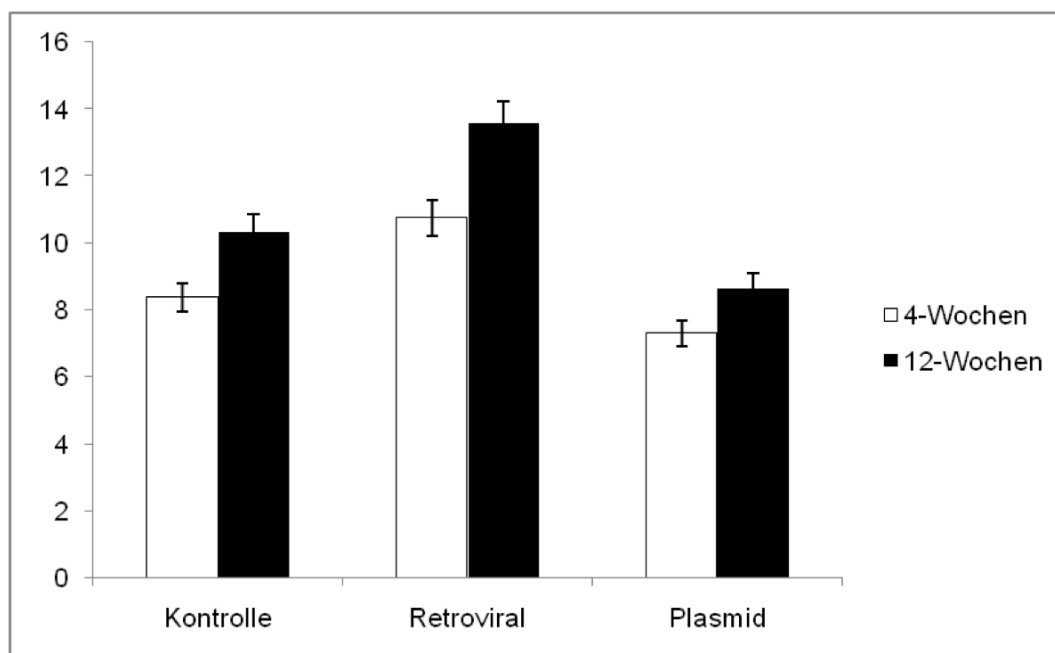


Tabelle 14: Vergleich der ICRS-Gesamtwerte aller 3 Gruppen

Im Vergleich der Kontrollgruppen kam es zu einer Verbesserung von 8,4 Punkten auf 10,8 Punkte ($p > 0,05$). Eine Ursache dieser Veränderung ist die homogenere Struktur der extrazellulären Matrix, wobei der Anteil des faserigen Gewebes deutlich zurück ging.

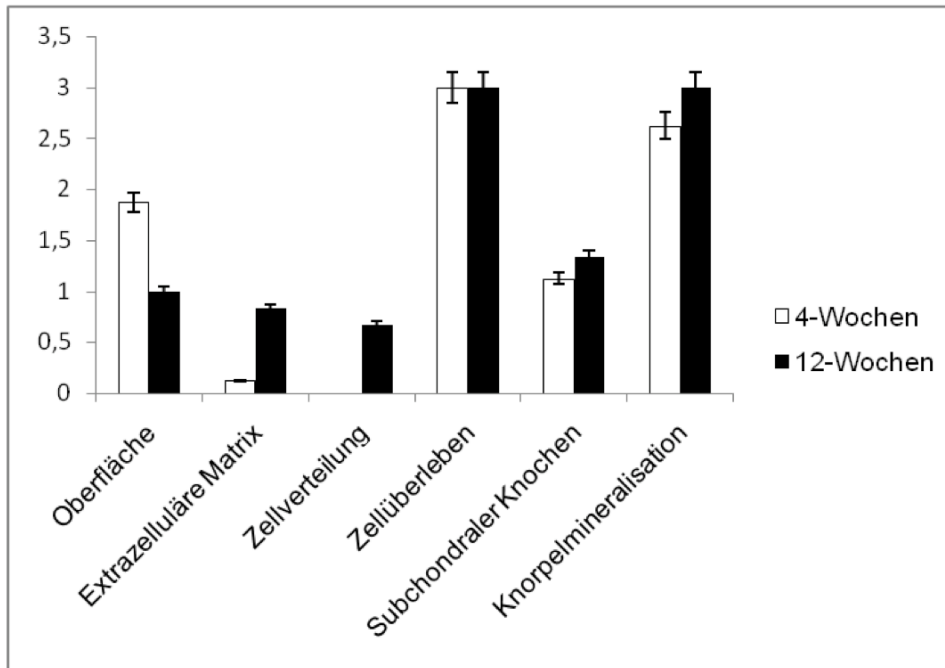


Tabelle 15: Vergleich der Kontrollgruppen nach 4 Wochen und nach 12 Wochen Standzeit

Die Retrovirale Gruppe zeigte eine Verbesserung der Punktzahl von 9,8 auf 13,6 Punkte ($p < 0,05$). Dabei wies vor allem die Oberflächenbeschaffenheit eine deutliche Verbesserung auf.

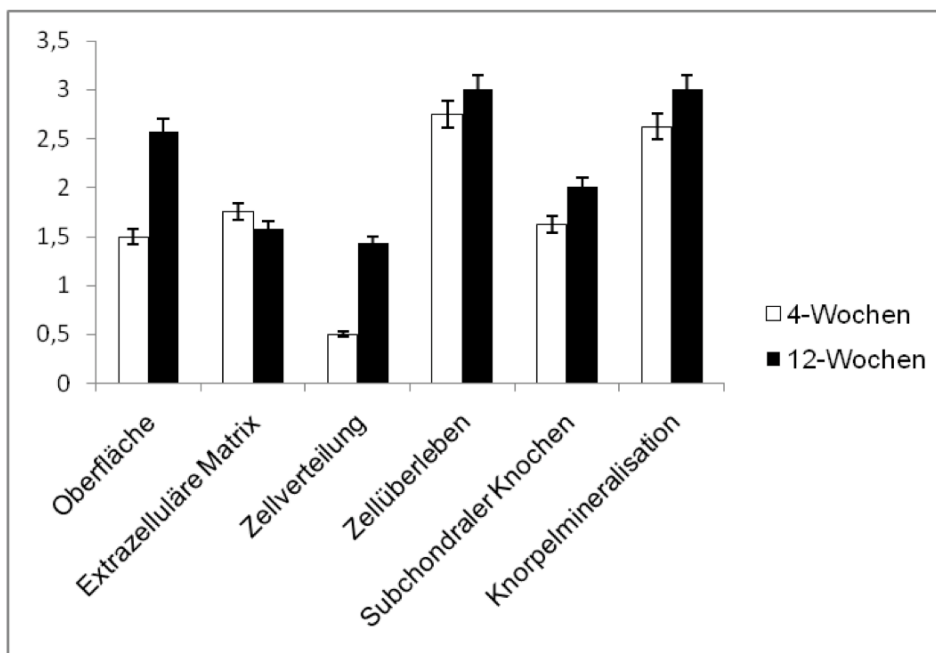


Tabelle 16: Vergleich der Retroviralen Gruppen nach 4 Wochen und nach 12 Wochen

Bei der Plasmid- Gruppe kam im Verlauf der nach 12 Wochen zu einer Verschlechterung der Defektoberfläche, es zeigte sich jedoch eine deutlich bessere Chondrozytenverteilung und der EZM innerhalb des Defektes. Insgesamt erreichte die Plasmid-Gruppe eine Verbesserung von 7,4 Punkten auf 8,7 Punkte ($p > 0,05$).

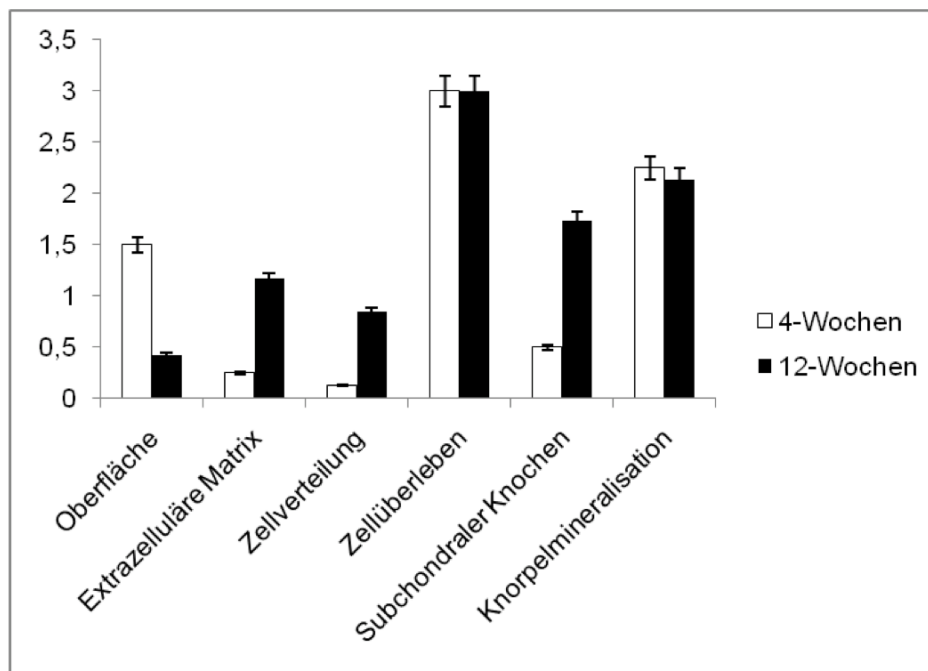


Tabelle 17: Vergleich der Plasmid- Gruppen nach 4 Wochen und nach 12 Wochen Strandzeit

3.4 Alcian-Blau-Färbung / Proteoglykane

Ähnlich zu den oben beschriebenen Ergebnissen zeigt sich, dass, im Vergleich zu Gruppe 1 und 3, in Gruppe 2 nach 4 Wochen die Färbung auf Alcian-Blau intensiver darstellt, was auf eine vermehrte Bildung von Proteoglykanen hinweist (siehe Abbildung 13). Auch nach 12 Wochen zeigt sich in der Retroviralen Gruppe weiterhin eine intensivere Färbung auf Alcian-Blau (siehe *Proteoglykan* Tabelle 18 und Tabelle 19).

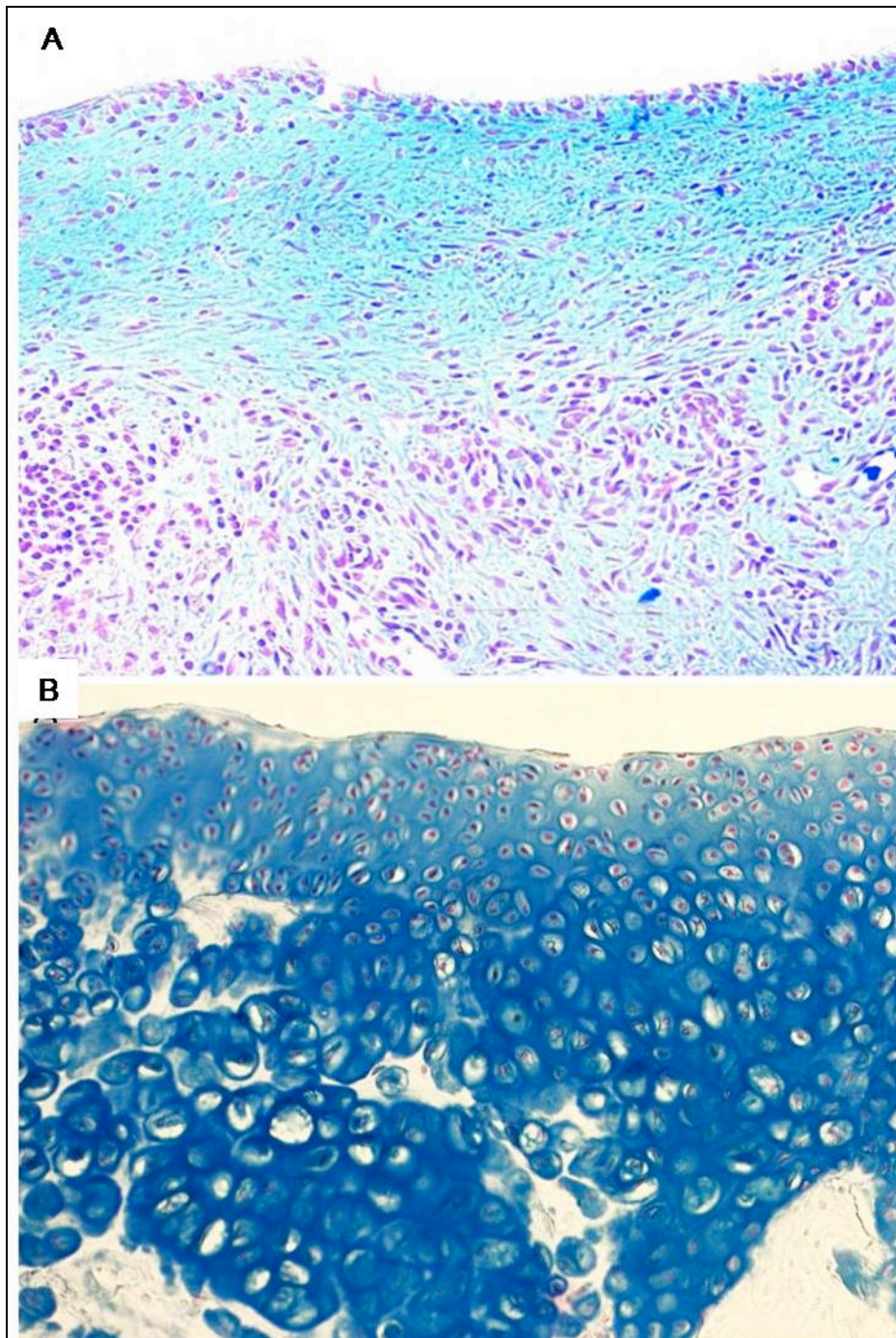


Abbildung 13: Alcian-Blau-Färbung der Kontrollgruppe (A) und rv-BMP-2-Gruppe (B) nach 4 Wochen. 20-fache Vergrößerung

(A) Gruppe 1: Das Reparaturgewebe der Kontrollgruppe ist unorganisiert. Es zeigt sich fibröses Gewebe mit nur leichter Färbung für Proteoglykane.

(B) Gruppe 2: Das Ersatzgewebe zeigt ansatzweise das für hyaline Knorpel typische Erscheinungsbild. Auffällig ist die intensivere Färbung der EZM, was auf eine erhöhte Proteoglykanproduktion hinweist. Eine kolumnenartige Anordnung besteht nicht.

3.5 Immunhistologische Ergebnisse

In der immunhistologischen Färbung wurde mittels primärer Antikörper gegen Kollagen I, Kollagen II, Link-Protein und Aggrecan gefärbt. Dabei zeigt sich nach 4 Wochen durch die Transduktion von BMP-2 bei den Tieren der retroviralen Gruppe eine vermehrte Bildung von Kollagen-2, Aggrecan und Link-Protein innerhalb des Defektes als Nachweis vermehrter Chondrozytenaktivität sowie eine verminderte Färbeintensität auf Kollagen I. Im Vergleich dazu zeigen sowohl die Kontrollgruppe wie auch die Plasmid-Gruppe keine bis sehr geringe Färbeintensität auf Kollagen II, wohingegen die Färbung auf Kollagen I intensiver war, was ein typisches Färbeverhalten für Fasergewebe bzw. fibrocartilaginäres Gewebe (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

Nach 12 Wochen war der Unterschied zwischen der Retroviralen Gruppe und den beiden anderen Gruppe im Bezug auf das Färbeverhalten auf Kollagen-2 weniger intensiv.

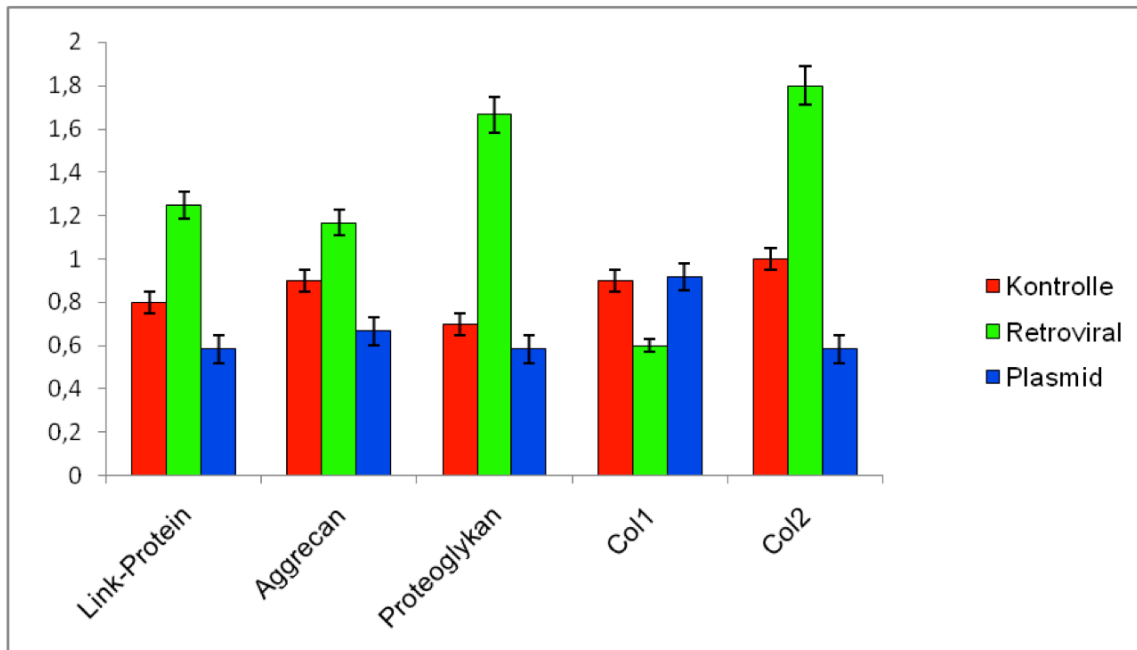


Tabelle 18: Immunhistologische Ergebnisse (4-Wochen-Tiere)

Proteine wie Link-Protein, Aggrecan und v.a. Kollagen II als sogenannte „Knorpelmarker“ werden vermehrt in Gruppe 1 synthetisiert.

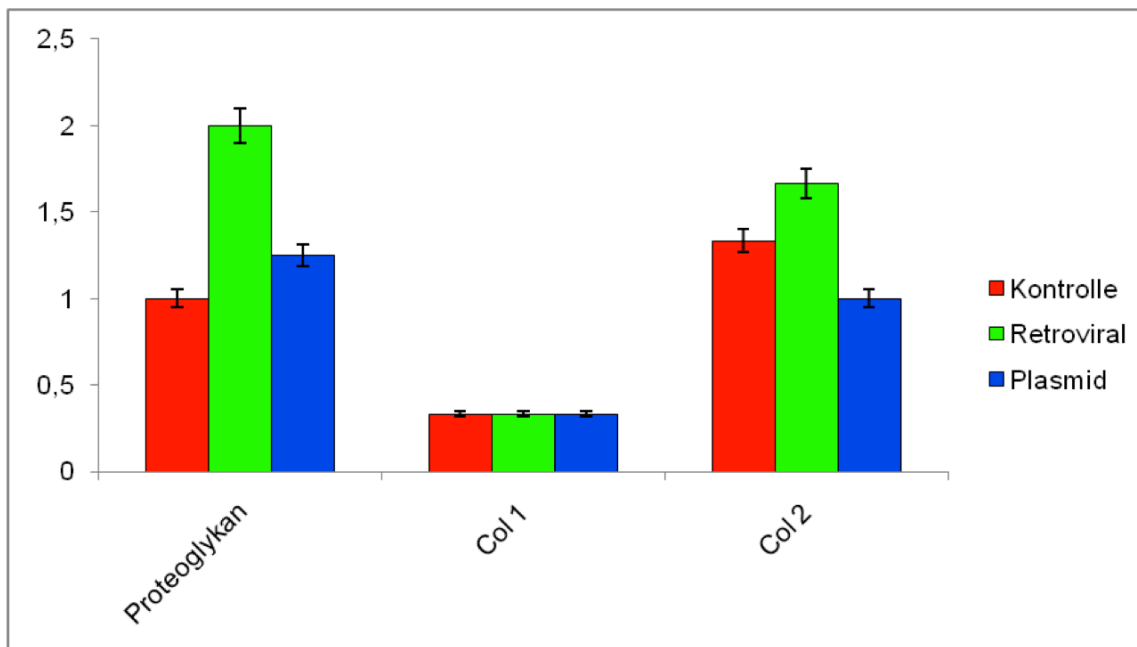
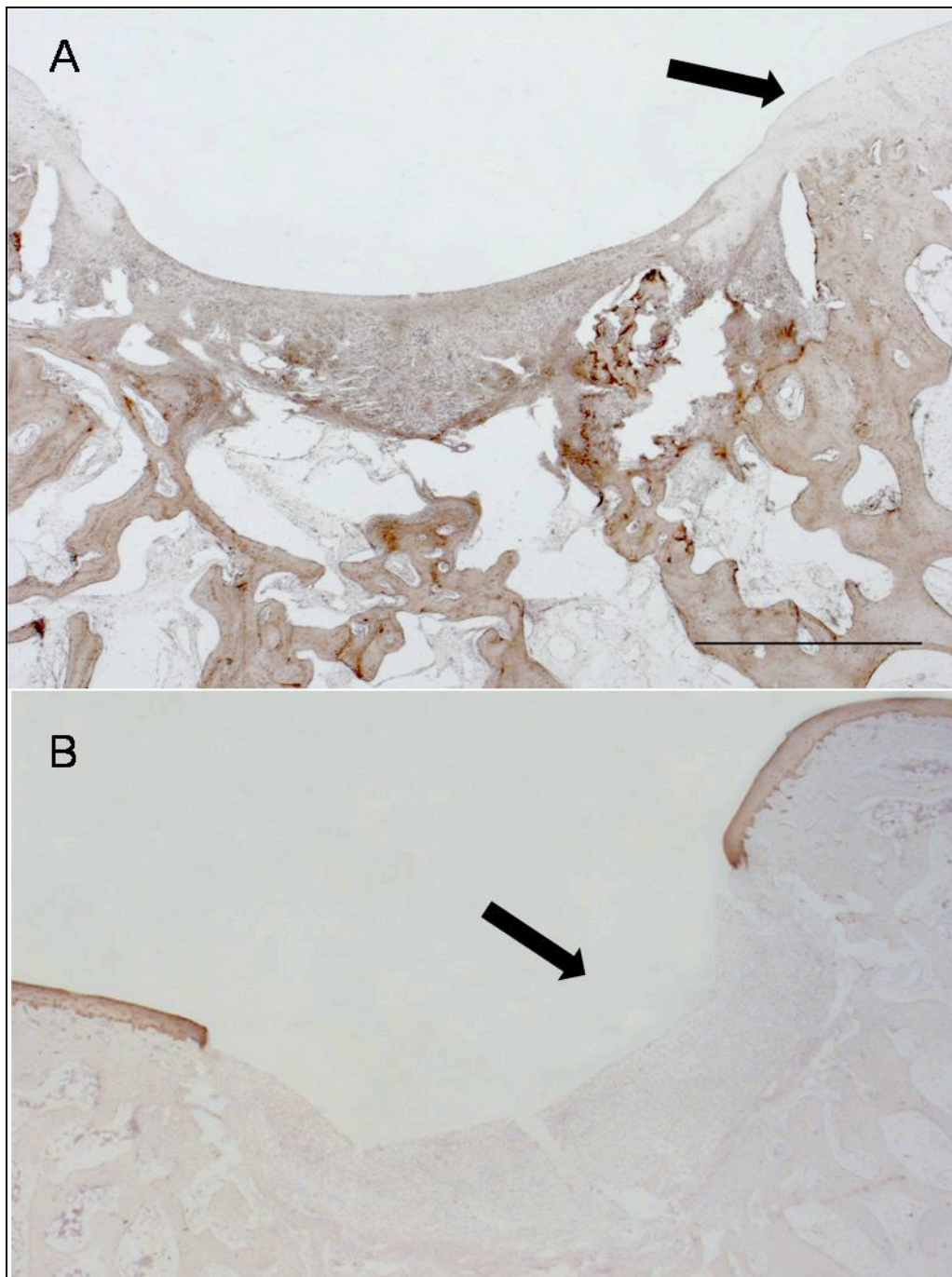


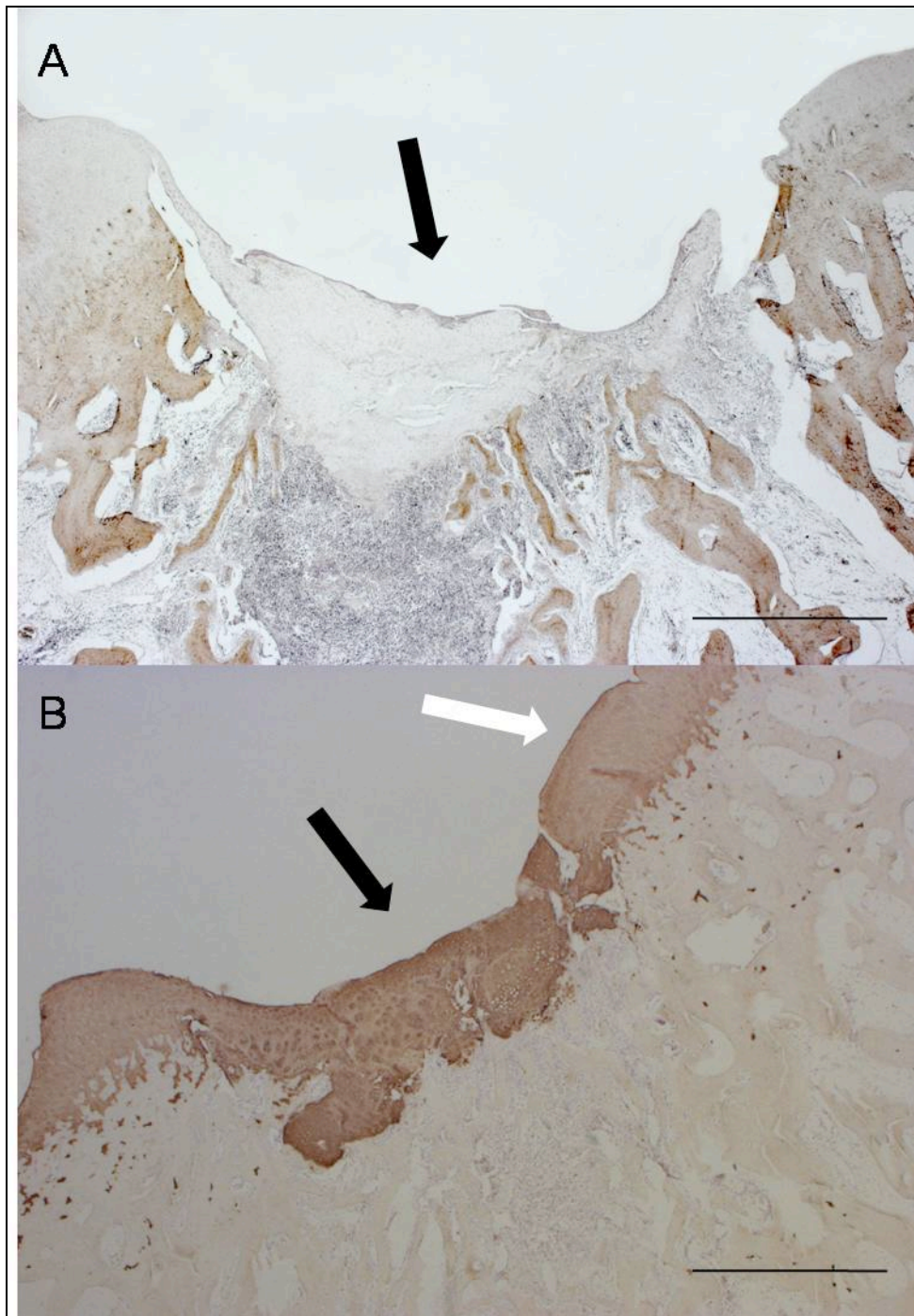
Tabelle 19: Immunhistologische Ergebnisse (12-Wochen-Tiere)



**Abbildung 14: Immunhistologische Färbung der Kontrollgruppe nach 4 Wochen
(Balkenlänge 500 μm)**

A) Immunohistochemische Färbung auf Kollagen I zeigt eine Färbung des Reparaturgewebes im Defektbereich. Zu beachten ist dass originaler Hyaliner Knorpel keine Färbung auf Kollagen I zeigt (schwarzer Pfeil).

B) Die immunhistologische Färbung auf Kollagen II zeigt im Defektbereich der Kontrollgruppe eine sehr schwache Färbung (schwarzer Pfeil).



**Abbildung 15: Immunhistologische Färbung der Retroviralen Gruppe nach 4 Wochen
(Balkenlänge 500 μm)**

A) Im Bezug auf die immunohistochemische Färbung des Defektbereichs auf Kollagen I (schwarzer Pfeil) ist kein wesentlicher Unterschied zu dem umliegenden hyalinen Knorpel zu erkennen.

B) Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutliche Färbung des Defektbereichs für Kollagen II (schwarzer Pfeil) welcher vergleichbar zum umliegenden gesunden Hyalinen Knorpel ist (weißer Pfeil).

4 Diskussion

Partielle Schäden des hyalinen Knorpels am Knie- und Sprunggelenk sind häufige Verletzungen, welche ursächlich für die Arthroseentstehung in den betroffenen Gelenken sein können [74, 88, 97, 111, 136, 164, 182].

Eine optimale Behandlung mit *Restitutio ad integrum* von Knorpelschäden ist aufgrund des geringen Heilungspotentials und der Komplexität des hyalinen Knorpelgewebes bis heute nicht möglich. Wichtige Gründe für das niedrige Heilungspotential dieses Gewebes sind die fehlende Gefäßversorgung, die niedrige Zellproliferationsrate, die komplexe Matrix, die eine Migration der Chondrozyten erschwert, und ein Mangel an Stammzellen.

4.1 Methodik- Diskussion

Zur besseren Vergleichbar- und Auswertbarkeit verwendeten wir Kaninchen als Versuchstiere. Die Knorpelflächen sowie der Knochen- und Sehnenapparat des Kniegelenks bei Kaninchen besitzt eine große Ähnlichkeit zum Kniegelenk des Menschen.

Das Kniegelenk setzt sich aus zwei Anteilen, dem patello-femorale und dem femoro-tibiale Gelenk, zusammen. Ähnlich wie beim Menschen ist das distale, artikulierende Ende der Tibia in Form eines Plateaus angelegt. Zwischen beiden Gelenkpartnern sind ein medialer und ein lateraler Meniskus vorhanden sowie zwei Kreuzbänder, die beim Kaninchen als kraniales und kaudales Kreuzband bezeichnet werden. Die Patella liegt der konkav geformten Trochlea auf und ist über ein kräftiges Ligamentum patellae mit der Tuberositas tibiae nach kaudal verbunden. Der Ansatz sowie der Verlauf des *Musculus extensor digitorum communis* sind als anatomische Besonderheit des Kaninchenknies zu erwähnen. Er entspringt dem distalen Femur und zieht sehnig ventral über den lateralen Kondylus Richtung Zehen [185]. Der *Musculus extensor digitorum longus* beim Menschen ist der vergleichbare Muskel, welcher jedoch seinen Ursprung nicht am Femur, sondern an der ventralen Seite der Tibia und der *Membrana interossea* hat [50].

Die Heilung von osteochondralen Defekten ist ein komplexes Geschehen, das von vielen Faktoren abhängig ist. Daher ist es notwendig, die Forschung von Therapien osteochondraler Defekte an intakten Gesamtorganismen durchzuführen. Es sind verschiedene Gewebestrukturen, hauptsächlich hyaliner Knorpel und subchondraler Knochen, in den Heilungsprozess involviert. Diese Gewebestrukturen und deren Regenerierung sind auf physiologische Verhältnisse in einem Gelenk angewiesen. Im Rahmen der Voruntersuchungen zur Entwicklung und Erprobung unserer Behandlungsmethode wurden die existierenden Methoden in der Zellkultur schon ausgeschöpft. Zur Heilung von Knochendefekten *in vivo* wurden verschiedene Tiere, unter anderem Kaninchen, Mäuse, Ratten, Schweine, Hunde und Affen verwendet, wobei Kaninchen und Ratten die am häufigsten untersuchten Tiere darstellen und man daher etablierte Versuchsschemata vorfindet [65].

Es gibt noch weitere Gründe weshalb Kaninchen als Tiermodell verwendet wurden. Ein wesentlicher Grund ist die Größe des Kniegelenks. Man kann ohne Setzen von großen Defekten relativ viele Chondrozyten (drei Knorpelchips mit einer Größe von 9mm^2 entsprechen ca. 100.000 Chondrozyten) entnehmen. Auch ist es möglich, Defekte von 10mm^2 zu setzen. Nawata et al. wählte Ratten als Tiermodell und setzte Defekte mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Tiefe von 2 mm [125]. Eine annähernd normale Biomechanik, welche ein wesentlicher Bestandteil der Knorpelphysiologie darstellt, ist dabei nichtmehr zu erwarten, da die Trochlea der Ratte nicht wesentlich größer ist als der gesetzte Defekt. Trotz Vorteile in Haltung und Kosten, ist die Ratte für unsere Implantationsexperimente ungeeignet, da sie über kein ausreichend großes Kniegelenk verfügt, um die von uns geplanten Defekte setzen zu können. Zusätzlich verlaufen Heilung und Regeneration des Knochendefektes bei der Ratte meist schneller als beim Menschen [64], wohingegen Kaninchen ein recht ähnliches Gelenk- und Knochenwachstum zeigen [65].

Desweiteren hat sich das *New Zealand White Rabbit* als Tiermodell in der Erforschung von Kniegelenkserkrankungen bereits in anderen Studien etabliert [18, 67, 70, 81, 95, 119, 131, 134, 157, 158]. Aufgrund der relativ niedrigen Kosten für Unterbringung und Futter bieten sich Studien an diesen Tieren an.

Die nach Arthrotomie und Luxation der Patella am besten zugängliche Stelle des Kniegelenkes ist die Trochlea femoris, welche sich als Lokalisation der Defekte in

mehreren Studien bewährt hat [18, 120]. Somit war es uns möglich, die Defekte bei jedem Kaninchen standardisiert zu setzen.

Für die histologische Auswertung der gefärbten Schnittpräparate gibt es viele Möglichkeiten. So wertete Sellers et al. in einer Kaninchenstudie nach eigenen Kriterien wie Defektfüllung, Integration des Ersatzgewebes in den umliegenden Knorpel, Färbeverhalten der Tidemark, Zellmorphologie, Morphologie des Gewebes, Oberflächenbeschaffenheit, und Ersatz des subchondralen Knochens aus. Je nach erreichter Prozentzahl (im Vergleich zum Originalgewebe) wurden Punkte vergeben [158].

Der wohl am meisten verwendete Score zur Beurteilung des Knorpels ist der Mankin-Score [108]. Basierend auf der Bewertung definierter Parameter (z.B. Proteoglykangehalt) mit normalem Knorpelgewebe vergleichend, werden hierbei die Oberflächenintegrität, das Färbeverhalten innerhalb des Defektes, die Zellverteilung sowie die Tidemark beurteilt. Eine Aussage über die Formation des subchondralen Knochens sowie mögliche Verknöcherungen innerhalb des Defekts bleibt aus. Folglich kann mit dem Mankin-Score in erster Linie Defekte beurteilt werden, bei denen die Mineralisationszone intakt geblieben ist. Daher eignet sich die Klassifikation in erster Linie zur histologischen Beurteilung von Osteoarthrosen eines Gelenkes. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Score sehr untersucherabhängig ist und die Reproduzierbarkeit auch bei gutem Verständnis des Untersuchers eher gering ist [136].

Die ICRS veröffentlichte 2003 eine Klassifikation für osteochondrale und chondrale Defekte, in der durch einfache Parameter eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden soll [103]. Diese *reparatur-spezifische* Einteilung beinhaltet neben den o.g. Eigenschaften auch die Regeneration des subchondralen Knochens sowie mögliche Verknöcherungen innerhalb des Defekts. Da unsere gesetzten Defekte ebenfalls die Mineralisationszone verletzen, verwendeten wir die ICRS-Klassifikation zur Auswertung der MMA- sowie der Paraffinschnitte.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die histologische Färbung lässt Aussagen über das Vorhandensein von Chondrozyten sowie deren Verteilung und z.T. auch Differenzierung zu. Wir konnten zeigen, dass Chondrozyten nach Transduktion mit rv-BMP-2 in Vergleich zu den anderen Gruppen schon nach 4 Wochen eine gesteigerte Aktivität und im Vergleich eine bessere Differenzierung vorwiesen, was sich vor allem in der gesteigerten Matrixsynthese sowie höheren Proliferationszahl widerspiegelt.

In dieser Arbeit konnte eindeutig die Effektivität von der *ex-vivo* Transduktion von Chondrozyten mit retroviralem BMP-2 nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich dieser Effekt im Vergleich zu den anderen Gruppen am deutlichsten nach 4 Wochen.

Mittels immunhistochemischer Markierungen sollten Fragen bezüglich der Zellfunktion, der Differenzierung sowie der Zellvitalität beantwortet werden. Bei positiven Markierungen ist davon auszugehen, dass die Zellen bis zur Fixierung vital und in der Lage waren, zellarttypische Proteine zu produzieren. Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass die Zellen schon beim Besiedelungsvorgang abgestorben waren und die Matrixprodukte trotzdem nachweisbar sind. Allerdings spricht das paarweise Auftreten von Chondrozyten gegen einen vorzeitigen Zelltod, sodass folglich die Zellteilung auch innerhalb des Defektes stattgefunden haben muss.

In allen Kniegelenken konnten degenerative Veränderungen v.a. nach 12 Wochen in allen drei Gruppen makroskopisch festgestellt werden. Als Zugang wurde die mediale parapatelläre Arthrotomie gewählt. Das Narbengewebe im Bereich des Zugangs zeigte sich verdickt und kann Ursache der degenerativen Veränderungen sein [42]. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass ein Übertritt von BMP-2 aus dem Reparaturgewebe in die Synovia zu vermehrter Osteophytenbildung führte. Da zu wenig Synovialflüssigkeit vorhanden war, konnte diese Hypothese nicht bewiesen werden. Andererseits kam es zu keinen erhöhten systemischen BMP-2 Konzentrationen (Serum) in den BMP-2 Tieren.

4.3 BMP-2

In mehreren Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Rattenmodellen eine Verbesserung der Defektheilung durch *ex-vivo* mit BMP-2 transduzierte Chondrozyten erreicht werden konnte [49] und BMP-2 die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten beeinflusst [28, 137, 175]. Weiter zeigte sich ein hemmender Effekt auf die Dedifferenzierung der Chondrozyten. Diese würden in Monolayerkulturen rasch einen fibroblastenartigen Phänotypus mit entsprechender intrinsischer Aktivität annehmen [60, 170]. Die Synthese der EZM, vor allem die Bildung von Kollagen II und Aggrecan, kann unter BMP-2-Einfluss aufrechterhalten und eine gesteigerte Kollagen-I-Produktion verhindert werden [152].

Mehrere Studien belegen, dass es sogar zu einer gesteigerten Produktion bestimmter Komponenten der EZM kommt. In den Studien wurde dies anhand der Bestimmung von Proteoglykan und Kollagen II nachgewiesen [83, 96].

Das Link-Protein stellt eine stabilisierende Komponente der Interaktion zwischen Aggrecan und Hyaluronsäure dar.

Sellers et al. berichtet von einer verbesserten Defektheilung 12 Monate postoperativ, nachdem der Defekt mit einem, mit rhBMP-2 behandelten, Kollagenschwamm gedeckt wurde. Die histologischen Verbesserungen zeigten sich in der Defektintegrität, Zellmorphologie, Defektmorphologie und konsolidierter *Tidemark* [158]. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangen wir in unserer Studie. Sowohl nach 4 Wochen wie auch nach 12 Wochen konnte eine verbesserte Defektheilung im Vergleich zu den anderen Gruppen nachgewiesen werden, auch wenn der Unterschied zwischen den Gruppen nach 12 Wochen konstant zu bleiben schien.

Mit Ausnahme von zwei Studien [190, 194] weist die Literatur dem BMP-2 eine, die Proliferationsrate steigernde Wirkung zu [35, 40]. In keiner Studie wurde jedoch der Effekt von BMP-2 über mehr als sieben Tage untersucht. In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass über mindestens 12 Wochen der Effekt des retroviral transduzierten BMP-2 aufrechterhalten bleibt. Nach 12 Wochen zeigen sich typische Charakteristika von hyalinem Knorpel, wie kolumnenartige Verteilung der Zellen, hyaline Matrix und eine glatte Oberfläche, was auf eine langfristige Wirkung des retroviralen BMP-2s hindeutet. Die rvBMP-2-Zellen erschienen abgerundet und

konnten ihren Phänotyp erhalten während die Kontroll- und rhBMP-2-Zellen eine fibroblastenartige Morphologie mit länglicher Zellform und zahlreichen Zellfortsätzen zeigten.

4.4 Schlussfolgerung, Risiken und Ausblick

In *in-vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass rh-BMP-2 innerhalb einer Woche ein Expressionsmaximum erreicht [173]. Es ist jedoch davon auszugehen, dass in einem biologischen System die Expression von BMP verschiedenen Einflüssen unterliegt. Dies bedeutet, dass *in vitro* nicht vorhandene Regelmechanismen *in vivo* eine berücksichtigenswerte Rolle spielen. Wie schon oben beschrieben unterliegen die Wirkungen von Wachstumsfaktoren und somit auch die Expression von Genen einem komplexen Regelkreis. Es ist naheliegend, dass durch Wirkung von BMP-2 Antagonisten wie z.B. *Chordin* die Genantwort *in vivo* inhibiert und reguliert wird.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Wachstumsfaktor BMP-2 nur bei konstanter Expression im osteochondralen Defekt einen Einfluss auf die Regeneration von hyalinem Knorpel hat. Die Transduktion mittels Plasmiden und die damit verbundene kurzzeitige, temporäre Expression hat hingegen keinen wesentlichen Effekt und das Ergebnis ist mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Daher müssen im gentherapeutischen Tissue-Engineering der osteochondralen Läsion stabile Transduktionssysteme gefordert werden. Das benutzte retrovirale System ist ein solches.

Aufgrund der Gefahr einer insertionellen Mutagenese bei Integration des retroviralen Vektors in das Wirtsgenom, sowie durch die Dauerexpression des therapeutischen Gens, müssen Sicherheitsaspekte berücksichtigt werden [196].

Die Arbeitsgruppen um Langenfeld und Rothhammer wiesen nach, dass unter Verwendung viraler Wachstumsfaktoren in Form von Transgenen das Karzinomrisiko beträchtlich erhöht wird [92, 148]. Trotz hoher Effizienz unter Verwendung viraler Vektoren ist diese Methode aufgrund des hohen Risikos einer malignen Entartung aktuell nicht am Menschen anwendbar. Auch besteht das Problem der zu lange anhaltenden, stabilen Expression von Fremdgenen und somit auch der Genprodukte.

Zur Deckung osteochondraler bzw. chondraler Defekte wäre vermutlich die Expression dieser „therapeutischen Gene“ für wenige Wochen ausreichend.

Durch Auftreten von schwerwiegenden Komplikationen in klinischen Studien mit retroviralen Vektoren sind diese vorerst eingestellt worden [51]. Die Verringerung der Gefahr einer insertionellen Mutagenese ist folglich ein wesentlicher Punkt in der aktuellen Forschung. So ist es denkbar, dass Vektoren produziert werden, die ausschließlich an festgelegten Integrationsloci angreifen. Auch ist es vorstellbar, dass in Zukunft durch Veränderungen des viralen Genoms, wie Splitten oder Entfernen von Gensequenzen, die Gefahren der viralen Transfektion verringert werden. Die Verfügbarkeit solcher Vektoren und Modifikationen ist aktuell jedoch noch nicht absehbar [196].

Weiter ist man bei der Regulation der Dauerauspression der „therapeutischen Gene“. So soll in naher Zukunft das sogenannte *tet*-System die Genexpression steuern, was in ersten Versuchen möglich war. Im *tet-on* System ist die Genexpression an die Anwesenheit von Tetrazyklin gebunden. Im Gegensatz dazu bezeichnet das *tet-off* System die Abhängigkeit von der Abwesenheit der pharmakologischen Substanz [196].

Eine weitere Regulationsmöglichkeit ist die Verwendung von schon verfügbaren SIN-Vektoren [7]. Die SIN-Vektoren besitzen eine Deletion in der 3'-LTR, was zu einem Funktionsverlust der 5'-LTR führt und somit eine Expression von Transgenen durch interne Promotoren (z.B. gewebsspezifisch) ermöglicht wird [197].

5 Zusammenfassung

Fragestellung:

Heutige Therapien bei chondralen Defekten zeigen noch immer keine befriedigenden Ergebnisse. Tissue-Engineering (TE) in Verbindung mit gentherapeutischen Methoden ist eine Alternative. Diese Studie zeigt die histologischen und immunhistologischen Ergebnisse nach retroviraler BMP-2-Transduktion im osteochondralen Defekt des Kaninchens im Vergleich zu einer Kontroll- und einer Plasmid-BMP-2 Gruppe.

Methoden:

Primäre Chondrozyten von NZW-Kaninchen wurden isoliert und mit BMP-2 retroviral (rv-BMP-2) ex vivo transduziert. *In vivo* wurden diese Zellen mittels Fibrin-Clot in artifizielle osteochondrale Defekte der Trochlea implantiert (n=16). Als Vergleichsgruppe dienten nicht infizierte (n=16) und *in situ* mit BMP-2-Plasmid transfizierte Chondrozyten (CROPOG) (n=16), die ebenfalls implantiert wurden. 4 und 12 Wochen postoperativ wurden die Kondylen entnommen und histologisch und immunhistologisch analysiert.

Ergebnisse:

Nach 4 Wochen zeigte sich histologisch in der Kontrollgruppe ein ICRS-Wert von 8,4, in der BMP-2-Plasmid Gruppe von 7,4 und in der rv-BMP2 Gruppe von 10,8. Die Immunhistologie war in der Kontroll- und Plasmid-BMP2 Gruppe positiv für Kollagen1 und negativ für Kollagen2. In der rv-BMP2 Gruppe war die Immunhistologie positiv für Kollagen I und II. Nach 12 Wochen zeigte die Kontroll- und Plasmidgruppe in der Histologie Faserknorpel-artiges Gewebe. Es kam daher zu einem leichten Anstieg der ICRS-Werte in beiden Gruppen. In der rv-BMP-2-Gruppe zeigten sich hingegen typische Charakteristika von hyalinem Knorpel, wie kolumnenartige Verteilung der Zellen, hyaline Matrix und eine glatte Oberfläche. In der Immunhistologie war Kollagen I nur gering nachweisbar und Kollagen II stark exprimiert.

Schlussfolgerung:

Der Wachstumsfaktor BMP-2 hat nur bei konstanter Expression im osteochondralen Defekt einen positiven Einfluss auf die Regeneration von hyalinem Knorpel, wobei es nicht zu einer Entstehung von nativem, hyalinem Knorpel kommt. Die Transduktion mittels Plasmiden und damit die kurzzeitig temporäre Expression zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Effekt. Daher müssen im gentherapeutischen Tissue-Engineering der osteochondralen Läsion stabile Transduktionssysteme gefordert werden. Das benutzte retrovirale System ist ein solches. Durch die Dauerexpression des therapeutischen Gens und eine mögliche insertionelle Mutagenese des retroviralen Vektors müssen jedoch Sicherheitsaspekte berücksichtigt werden. Daher sollen in Zukunft das tet-on System und sogenannte SIN-Vektoren zum Einsatz kommen, die die Genexpression steuern und die Gefahr einer Insertionelle Mutagenese verringern können.

6 Literaturverzeichnis

1. Agneskirchner, J. D., Brucker, P., Burkart, A., Imhoff, A. B. Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, (2002) 10, 160-8.
2. Akizuki, S., Yasukawa, Y., Takizawa, T. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy*, (1997) 13, 9-17.
3. Ansah, P., Vogt, S., Ueblacker, P., Martinek, V., Woertler, K., Imhoff, A. B. Osteochondral transplantation to treat osteochondral lesions in the elbow. *J Bone Joint Surg Am*, (2007) 89, 2188-94.
4. Athanasiou, K. A., Rosenwasser, M. P., Buckwalter, J. A., Malinin, T. I., Mow, V. C. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res*, (1991) 9, 330-40.
5. Bartlett, W., Skinner, J. A., Gooding, C. R., Carrington, R. W., Flanagan, A. M., Briggs, T. W., Bentley, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br*, (2005) 87, 640-5.
6. Bauer, M., Jackson, R. W. Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy*, (1988) 4, 97-102.
7. Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., Fehse, B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*, (2006) 17, 253-63.
8. Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B., Russlies, M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee*, (2006) 13, 194-202.
9. Beiser, I. H., Kanat, I. O. Subchondral bone drilling: a treatment for cartilage defects. *J Foot Surg*, (1990) 29, 595-601.
10. Bentley, G., Greer, R. B., 3rd Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature*, (1971) 230, 385-8.
11. Benya, P. D., Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, (1982) 30, 215-24.
12. Bessa, P. C., Casal, M., Reis, R. L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*, (2008) 2, 1-13.
13. Betz, O. B., Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Evans, C. H. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, (2006) 88, 355-65.
14. Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J., Courter, D. L., Hollander, A. P., Nahir, A. M., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L. E. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*, (2002) 8, 73-84.

15. Bohndorf, K. Osteochondritis (osteochondrosis) dissecans: a review and new MRI classification. *Eur Radiol*, (1998) 8, 103-12.
16. Bouwmeester, S. J., Beckers, J. M., Kuijer, R., van der Linden, A. J., Bulstra, S. K. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop*, (1997) 21, 313-7.
17. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, (1994) 331, 889-95.
18. Brittberg, M., Nilsson, A., Lindahl, A., Ohlsson, C., Peterson, L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res*, (1996), 270-83.
19. Brun, P., Abatangelo, G., Radice, M., Zacchi, V., Guidolin, D., Daga Gordini, D., Cortivo, R. Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res*, (1999) 46, 337-46.
20. Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, (1998) 280, 1455-7.
21. Bruns, J., Kampen, J., Kahrs, J., Plitz, W. [Autologous meniscus replacement with rib perichondrium. Experimental results]. *Orthopade*, (2000) 29, 145-50.
22. Buckwalter, J. A. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, (2002), 21-37.
23. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, (1998) 47, 487-504.
24. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, (1998) 47, 477-86.
25. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev*, (1988) 1, 87-112.
26. Buckwalter, J. A., Woo, S. L., Goldberg, V. M., Hadley, E. C., Booth, F., Oegema, T. R., Eyre, D. R. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am*, (1993) 75, 1533-48.
27. Bujia, J., Sittinger, M., Hammer, C., Burmester, G. [Culture of human cartilage tissue using a perfusion chamber]. *Laryngorhinootologie*, (1994) 73, 577-80.
28. Carlberg, A. L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R. S., Hall, D. J. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation*, (2001) 67, 128-38.
29. Chang, R. W., Falconer, J., Stulberg, S. D., Arnold, W. J., Manheim, L. M., Dyer, A. R. A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*, (1993) 36, 289-96.
30. Chen, D., Zhao, M., Harris, S. E., Mi, Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci*, (2004) 9, 349-58.
31. Chesterman, P. J., Smith, A. U. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*, (1968) 50, 184-97.
32. Chow, J. C., Hantes, M. E., Houle, J. B., Zalavras, C. G. Arthroscopic autogenous osteochondral transplantation for treating knee cartilage defects: a 2- to 5-year follow-up study. *Arthroscopy*, (2004) 20, 681-90.

33. Curl, W. W., Krome, J., Gordon, E. S., Rushing, J., Smith, B. P., Poehling, G. G. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, (1997) 13, 456-60.
34. Dandy, D. J. Abrasion chondroplasty. *Arthroscopy*, (1986) 2, 51-3.
35. De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V., Baron, J. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*, (2001) 142, 430-6.
36. Desjardins, M. R., Hurtig, M. B., Palmer, N. C. Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet Surg*, (1991) 20, 434-45.
37. Dorotka, R., Bindreiter, U., Macfelda, K., Windberger, U., Nehrer, S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*, (2005) 13, 655-64.
38. Duprez, D. M., Coltey, M., Amthor, H., Brickell, P. M., Tickle, C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol*, (1996) 174, 448-52.
39. Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno, T., Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S., Kurisu, K. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol*, (1998) 140, 409-18.
40. Erickson, D. M., Harris, S. E., Dean, D. D., Harris, M. A., Wozney, J. M., Boyan, B. D., Schwartz, Z. Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop Res*, (1997) 15, 371-80.
41. Evans, P. J., Miniaci, A., Hurtig, M. B. Manual punch versus power harvesting of osteochondral grafts. *Arthroscopy*, (2004) 20, 306-10.
42. Fahlgren, A., Chubinskaya, S., Messner, K., Aspenberg, P. A capsular incision leads to a fast osteoarthritic response, but also elevated levels of activated osteogenic protein-1 in rabbit knee joint cartilage. *Scand J Med Sci Sports*, (2006) 16, 456-62.
43. Feczko, P., Hangody, L., Varga, J., Bartha, L., Dioszegi, Z., Bodo, G., Kendik, Z., Modis, L. Experimental results of donor site filling for autologous osteochondral mosaicplasty. *Arthroscopy*, (2003) 19, 755-61.
44. Frenkel, S. R., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Chin, G. S., Steinbrech, D. S., Brent, B., Gittes, G. K., Longaker, M. T. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg*, (2000) 105, 980-90.
45. Friedlaender, G. E., Strong, D. M., Tomford, W. W., Mankin, H. J. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am*, (1999) 30, 583-8.
46. Frisbie, D. D., Oxford, J. T., Southwood, L., Trotter, G. W., Rodkey, W. G., Steadman, J. R., Goodnight, J. L., McIlwraith, C. W. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop Relat Res*, (2003), 215-27.
47. Fuss, M., Ehlers, E. M., Russlies, M., Rohwedel, J., Behrens, P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded

- onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat*, (2000) 182, 303-10.
48. Garretson, R. B., 3rd, Katolik, L. I., Verma, N., Beck, P. R., Bach, B. R., Cole, B. J. Contact pressure at osteochondral donor sites in the patellofemoral joint. *Am J Sports Med*, (2004) 32, 967-74.
 49. Gelse, K., von der Mark, K., Aigner, T., Park, J., Schneider, H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum*, (2003) 48, 430-41.
 50. Grover, D., Chen, A., Hazelwood, S. Biomechanics of the rabbit knee and ankle: Muscle, ligament, and joint contact force predictions. *Journal of Biomechanics*, (2007) 40, 2816–2821.
 51. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, (2003) 302, 415-9.
 52. Hammer, R. E., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature*, (1984) 311, 65-7.
 53. Hangody, L., Fules, P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, (2003) 85-A Suppl 2, 25-32.
 54. Hangody, L., Kish, G., Karpati, Z., Szerb, I., Eberhardt, R. Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique--a preliminary report. *Foot Ankle Int*, (1997) 18, 628-34.
 55. Hardingham, T. E., Fosang, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*, (1992) 6, 861-70.
 56. Hayes, D. W., Jr., Brower, R. L., John, K. J. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg*, (2001) 18, 35-53.
 57. Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, (1997) 390, 465-71.
 58. Hendrickson, D. A., Nixon, A. J., Grande, D. A., Todhunter, R. J., Minor, R. M., Erb, H., Lust, G. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res*, (1994) 12, 485-97.
 59. Herve, P. [Therapeutic applications and promises of cellular and tissue engineering. What strategic choice for the Etablissement Francais du Sang?]. *Transfus Clin Biol*, (2007) 14, 3-9.
 60. Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D. M., Asada, A., Suzuki, F. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res*, (1991) 6, 1373-85.

61. Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R., Brittberg, M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, (2002) 18, 730-4.
62. Hoffmann, A., Weich, H. A., Gross, G., Hillmann, G. Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, (2001) 57, 294-308.
63. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, (1996) 6, 432-8.
64. Hollinger, J. O., Kleinschmidt, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*, (1990) 1, 60-8.
65. Holy, C. *In vivo models for bone tissue tissueengineering constructs*. 2000. Toronto.
66. Homminga, G. N., Bulstra, S. K., Bouwmeester, P. S., van der Linden, A. J. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, (1990) 72, 1003-7.
67. Homminga, G. N., van der Linden, T. J., Terwindt-Rouwenhorst, E. A., Drukker, J. Repair of articular defects by perichondrial grafts. Experiments in the rabbit. *Acta Orthop Scand*, (1989) 60, 326-9.
68. Huard, J., Li, Y., Peng, H., Fu, F. H. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med*, (2003) 5, 93-108.
69. Hunt, S. A., Jazrawi, L. M., Sherman, O. H. Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg*, (2002) 10, 356-63.
70. Hunziker, E. B., Rosenberg, L. C. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*, (1996) 78, 721-33.
71. Imhoff, A. B. Arthroskopie – qualifizierte Stadieneinteilung der osteochondralen Läsion (OCL) am Knie. *Arthroskopie*, (2003) 16, 23-28.
72. Imhoff, A. B., Burkart, A., Ottl, G. M. [Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation]. *Orthopade*, (1999) 28, 45-51.
73. Imhoff, A. B., Oettl, G. M. Arthroscopic and Open Techniques for Transplantation of Osteochondral Autografts and Allografts in Various Joints. *Surg Technol Int*, (2000) VIII, 249-252.
74. Imhoff, A. B., Ottl, G. M., Burkart, A., Traub, S. [Autologous osteochondral transplantation on various joints]. *Orthopade*, (1999) 28, 33-44.
75. Insall, J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (1974), 61-7.
76. Ito, Y., Ochi, M., Adachi, N., Sugawara, K., Yanada, S., Ikada, Y., Ronakorn, P. Repair of osteochondral defect with tissue-engineered chondral plug in a rabbit model. *Arthroscopy*, (2005) 21, 1155-63.
77. Jackson, R. W., Dieterichs, C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy*, (2003) 19, 13-20.
78. Jakob, M., Demarteau, O., Schafer, D., Hintermann, B., Dick, W., Heberer, M., Martin, I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem*, (2001) 81, 368-77.
79. Jennings, L., Wu, L., King, K. B., Hammerle, H., Cs-Szabo, G., Mollenhauer, J. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connect Tissue Res*, (2001) 42, 71-86.

80. Johnson, L. L. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res*, (2001), S306-17.
81. Katayama, R., Wakitani, S., Tsumaki, N., Morita, Y., Matsushita, I., Gejo, R., Kimura, T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)*, (2004) 43, 980-5.
82. Kawabata, M., Imamura, T., Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, (1998) 9, 49-61.
83. Kim, D. J., Moon, S. H., Kim, H., Kwon, U. H., Park, M. S., Han, K. J., Hahn, S. B., Lee, H. M. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine*, (2003) 28, 2679-84.
84. Kim, H. K., Moran, M. E., Salter, R. B. 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 Am*, (1991) 73, 1301-15.
85. Kim, H. T., Zaffagnini, S., Mizuno, S., Abelow, S., Safran, M. R. A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop Sports Phys Ther*, (2006) 36, 765-73.
86. Kimura, T., Yasui, N., Ohsawa, S., Ono, K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res*, (1984), 231-9.
87. Kingsley, D. M. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet*, (1994) 10, 16-21.
88. Kleemann, R. U., Krocker, D., Cedraro, A., Tuischer, J., Duda, G. N. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis Cartilage*, (2005) 13, 958-63.
89. Korkala, O. L. Periosteal primary resurfacing of joint surface defects of the patella due to injury. *Injury*, (1988) 19, 216-8.
90. Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, M., Fukui, H. Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther*, (2000) 7, 1132-6.
91. Kurz, B., Jin, M., Patwari, P., Cheng, D. M., Lark, M. W., Grodzinsky, A. J. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res*, (2001) 19, 1140-6.
92. Langenfeld, E. M., Langenfeld, J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res*, (2004) 2, 141-9.
93. Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science*, (1993) 260, 920-6.
94. LaPrade, R. F., Botker, J. C. Donor-site morbidity after osteochondral autograft transfer procedures. *Arthroscopy*, (2004) 20, e69-73.
95. Lee, J. H., Prakash, K. V., Pengatteeeri, Y. H., Park, S. E., Koh, H. S., Han, C. W. Chondrocyte apoptosis in the regenerated articular cartilage after allogenic chondrocyte transplantation in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Br*, (2007) 89, 977-83.
96. Li, J., Kim, K. S., Park, J. S., Elmer, W. A., Hutton, W. C., Yoon, S. T. BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan. *J Orthop Sci*, (2003) 8, 829-35.

97. Lindahl, A., Brittberg, M., Peterson, L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp*, (2003) 249, 175-86; discussion 186-9, 234-8, 239-41.
98. Liu, F., Ventura, F., Doody, J., Massague, J. Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, (1995) 15, 3479-86.
99. Livesley, P. J., Doherty, M., Needoff, M., Moulton, A. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *J Bone Joint Surg Br*, (1991) 73, 922-6.
100. Loredó, R., Sanders, T. G. Imaging of osteochondral injuries. *Clin Sports Med*, (2001) 20, 249-78.
101. Lundstrom, K., Boulikas, T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat*, (2003) 2, 471-86.
102. Lyons, K. M., Pelton, R. W., Hogan, B. L. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development*, (1990) 109, 833-44.
103. Mainil-Varlet, P., Aigner, T., Brittberg, M., Bullough, P., Hollander, A., Hunziker, E., Kandel, R., Nehrer, S., Pritzker, K., Roberts, S., Stauffer, E. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am*, (2003) 85-A Suppl 2, 45-57.
104. Maitani, Y., Igarashi, S., Sato, M., Hattori, Y. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *Int J Pharm*, (2007) 342, 33-9.
105. Malinin, T., Temple, H. T., Buck, B. E. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. *J Bone Joint Surg Am*, (2006) 88, 762-70.
106. Malinin, T. I., Mnaymneh, W., Lo, H. K., Hinkle, D. K. Cryopreservation of articular cartilage. Ultrastructural observations and long-term results of experimental distal femoral transplantation. *Clin Orthop Relat Res*, (1994), 18-32.
107. Mankin, H. J. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, (1982) 64, 460-6.
108. Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L., Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*, (1971) 53, 523-37.
109. Marlovits, S., Striessnig, G., Kutscha-Lissberg, F., Resinger, C., Aldrian, S. M., Vecsei, V., Trattinig, S. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, (2005) 13, 451-7.
110. Martinek, V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, (2003) 54, 166-170.
111. Martinek, V., Fu, F. H., Lee, C. W., Huard, J. Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering. *Clin Sports Med*, (2001) 20, 403-16, viii.
112. Martinek, V., Ottl, G., Imhoff, A. B. [Chondral and osteochondral lesions of the upper ankle joint. Clinical aspects, diagnosis and therapy]. *Unfallchirurg*, (1998) 101, 468-75.

113. Martinek, V., Ueblacker, P., Imhoff, A. B. Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*, (2003) 85, 782-8.
114. Matsusue, Y., Yamamuro, T., Hama, H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*, (1993) 9, 318-21.
115. Meenen, N. N., Ueblacker, P., Pörtner, R., Göpfert, C., Nagel-Heyer, S., Petersen, J. P., A., P. Knorpel aus dem Labor - eine Sackgasse? *Arthroscopie*, (2005) 18, 245-252.
116. Menche, D. S., Frenkel, S. R., Blair, B., Watnik, N. F., Toolan, B. C., Yaghoubian, R. S., Pitman, M. I. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy*, (1996) 12, 280-6.
117. Messner, K., Gillquist, J. Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand*, (1996) 67, 523-9.
118. Micheli, L. J., Browne, J. E., Erggelet, C., Fu, F., Mandelbaum, B., Moseley, J. B., Zurakowski, D. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med*, (2001) 11, 223-8.
119. Mierisch, C. M., Wilson, H. A., Turner, M. A., Milbrandt, T. A., Berthoux, L., Hammarskjold, M. L., Rekosh, D., Balian, G., Diduch, D. R. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am*, (2003) 85-A, 1757-67.
120. Mitchell, N., Shepard, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am*, (1976) 58, 230-3.
121. Mitchell, N., Shepard, N. Effect of patellar shaving in the rabbit. *J Orthop Res*, (1987) 5, 388-92.
122. Mollenhauer, J. K., KE. *Articular Cartilage*. 1997. New York: Dee R.
123. Moses, H. L., Serra, R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev*, (1996) 6, 581-6.
124. Muir, H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays*, (1995) 17, 1039-48.
125. Nawata, M., Wakitani, S., Nakaya, H., Tanigami, A., Seki, T., Nakamura, Y., Saito, N., Sano, K., Hidaka, E., Takaoka, K. Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. *Arthritis Rheum*, (2005) 52, 155-63.
126. Nehrer, S., Breinan, H. A., Ramappa, A., Hsu, H. P., Minas, T., Shortkroff, S., Sledge, C. B., Yannas, I. V., Spector, M. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*, (1998) 19, 2313-28.
127. Nehrer, S., Domayer, S., Dorotka, R., Schatz, K., Bindreiter, U., Kotz, R. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol*, (2006) 57, 3-8.
128. Nerem, R. M. Tissue engineering: the hope, the hype, and the future. *Tissue Eng*, (2006) 12, 1143-50.
129. Niedermann, B., Boe, S., Lauritzen, J., Rubak, J. M. Glued periosteal grafts in the knee. *Acta Orthop Scand*, (1985) 56, 457-60.

130. O'Driscoll, S. W. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, (1998) 80, 1795-812.
131. O'Driscoll, S. W., Fitzsimmons, J. S., Commisso, C. N. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res*, (1997) 15, 682-7.
132. O'Driscoll, S. W., Keeley, F. W., Salter, R. B. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, (1986) 68, 1017-35.
133. O'Driscoll, S. W., Keeley, F. W., Salter, R. B. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am*, (1988) 70, 595-606.
134. O'Driscoll, S. W., Salter, R. B. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res*, (1986), 131-40.
135. Ogris, M. Non-viral cancer gene therapy--what is best? *Drug Discov Today*, (2003) 8, 63.
136. Ostergaard, K., Andersen, C. B., Petersen, J., Bendtzen, K., Salter, D. M. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis*, (1999) 58, 208-13.
137. Park, Y., Sugimoto, M., Watrin, A., Chiquet, M., Hunziker, E. B. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage*, (2005) 13, 527-36.
138. 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 Relat Res*, (2000), 212-34.
139. Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., Lavery, S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, (2001), S26-33.
140. Poole, A. R., Rizkalla, G., Ionescu, M., Reiner, A., Brooks, E., Rorabeck, C., Bourne, R., Bogoch, E. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl*, (1993) 39, 3-13.
141. Reddi, A. H. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*, (1992) 4, 850-5.
142. Reddi, A. H. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis*, (2003) 62 Suppl 2, ii73-8.
143. Riley, E. H., Lane, J. M., Urist, M. R., Lyons, K. M., Lieberman, J. R. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, (1996), 39-46.
144. Roberts, A. B., McCune, B. K., Sporn, M. B. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*, (1992) 41, 557-9.
145. Romeis. *Die mikroradiographische Technik*. 1995.

146. Ronga, M., Grassi, F. A., Bulgheroni, P. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy*, (2004) 20, 79-84.
147. Rosen, V., Wozney, J. M., Wang, E. A., Cordes, P., Celeste, A., McQuaid, D., Kurtzberg, L. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res*, (1989) 20, 313-9.
148. Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M., Bosserhoff, A. K. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res*, (2005) 65, 448-56.
149. Roughley, P. J., Lee, E. R. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech*, (1994) 28, 385-97.
150. Rudert, M., Hirschmann, F., Wirth, C. J. [Growth behavior of chondrocytes on various biomaterials]. *Orthopade*, (1999) 28, 68-75.
151. Rudert, M., Tillmann, B. Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods. *Ann Anat*, (1993) 175, 237-42.
152. Sailor, L. Z., Hewick, R. M., Morris, E. A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res*, (1996) 14, 937-45.
153. Scheibel, M., Bartl, C., Magosch, P., Lichtenberg, S., Habermeyer, P. Osteochondral autologous transplantation for the treatment of full-thickness articular cartilage defects of the shoulder. *J Bone Joint Surg Br*, (2004) 86, 991-7.
154. Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A., Plank, C. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res*, (2008) 25, 2946-62.
155. Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R., Hollinger, J. O. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*, (1999) 17, 269-78.
156. Schottle, P. B., Oetli, G. M., Agneskirchner, J. D., Imhoff, A. B. [Operative therapy of osteochondral lesions of the talus with autologous cartilage-bone transplantation]. *Orthopade*, (2001) 30, 53-8.
157. Sellers, R. S., Peluso, D., Morris, E. A. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, (1997) 79, 1452-63.
158. Sellers, R. S., Zhang, R., Glasson, S. S., Kim, H. D., Peluso, D., D'Augusta, D. A., Beckwith, K., Morris, E. A. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am*, (2000) 82, 151-60.
159. Shannon, F. J., Devitt, A. T., Poynton, A. R., Fitzpatrick, P., Walsh, M. G. Short-term benefit of arthroscopic washout in degenerative arthritis of the knee. *Int Orthop*, (2001) 25, 242-5.
160. Shapiro, F., Koide, S., Glimcher, M. J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, (1993) 75, 532-53.
161. Singh, S., Lee, C. C., Tay, B. K. Results of arthroscopic abrasion arthroplasty in osteoarthritis of the knee joint. *Singapore Med J*, (1991) 32, 34-7.

162. Sittinger, M., Bujia, J., Minuth, W. W., Hammer, C., Burmester, G. R. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials*, (1994) 15, 451-6.
163. Sledge, S. L. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med*, (2001) 20, 365-77.
164. Smith, G. D., Richardson, J. B., Brittberg, M., Erggelet, C., Verdonk, R., Knutsen, G., Ashton, B. A., Ashton, I. K., Harrison, P. E. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. *J Bone Joint Surg Am*, (2003) 85-A, 2487-8; author reply 2488.
165. Sokoloff, L. Repair mechanisms of articular cartilage. *J Am Podiatry Assoc*, (1982) 72, 228-32.
166. Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J., Rodkey, W. G. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, (2003) 19, 477-84.
167. Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade*, (1999) 28, 26-32.
168. Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Lahm, A., Guhlke-Steinwachs, U. [Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation]. *Unfallchirurg*, (1999) 102, 855-60.
169. Stevenson, S., Dannucci, G. A., Sharkey, N. A., Pool, R. R. The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, (1989) 71, 1297-307.
170. Stewart, M. C., Saunders, K. M., Burton-Wurster, N., Macleod, J. N. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res*, (2000) 15, 166-74.
171. Stoltz, J. F., Bensoussan, D., Decot, V., Ciree, A., Netter, P., Gillet, P. Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview. *Biomed Mater Eng*, (2006) 16, S3-S18.
172. Tatum, E. L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*, (1966) 10, 19-32.
173. Tim Yoon, S., Su Kim, K., Li, J., Soo Park, J., Akamaru, T., Elmer, W. A., Hutton, W. C. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro. *Spine*, (2003) 28, 1773-80.
174. Tippet, J. *Articular cartilage drilling and osteotomy in osteoarthritis of the knee*. 1991. New York: Raven Press.
175. Toh, W. S., Yang, Z., Liu, H., Heng, B. C., Lee, E. H., Cao, T. Effects of culture conditions and bone morphogenetic protein 2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, (2007) 25, 950-60.
176. Ueblacker, P., Burkart, A., Imhoff, A. B. Retrograde cartilage transplantation on the proximal and distal tibia. *Arthroscopy*, (2004) 20, 73-8.
177. Urist, M. R. A bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. *Clin Orthop Relat Res*, (1973), 210-20.

178. Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., Shufflebarger, J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*, (2001) 344, 1511-4.
179. Van de Putte, K. A., Urist, M. R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*, (1965) 43, 257-70.
180. van den Berg, W. B., van der Kraan, P. M., Scharstuhl, A., van Beuningen, H. M. Growth factors and cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, (2001), S244-50.
181. Verhagen, R. A., Maas, M., Dijkgraaf, M. G., Tol, J. L., Krips, R., van Dijk, C. N. Prospective study on diagnostic strategies in osteochondral lesions of the talus. Is MRI superior to helical CT? *J Bone Joint Surg Br*, (2005) 87, 41-6.
182. Vogt, S., Braun, S., Imhoff, A. B. [Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation]. *Z Rheumatol*, (2007) 66, 493-503; quiz 504.
183. Wagner, H. [Surgical Treatment of Osteochondritis Dissecans, a Cause of Arthritis Deformans of the Knee.]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, (1964) 50, 335-52.
184. Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, (1994) 76, 579-92.
185. Wallace, C. D., Amiel, D. Vascular assessment of the periarticular ligaments of the rabbit knee. *J Orthop Res*, (1991) 9, 787-91.
186. Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S., Wozney, J. M. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1988) 85, 9484-8.
187. Widuchowski, W., Widuchowski, J., Trzaska, T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*, (2007) 14, 177-82.
188. Wolfe, F., Lane, N. E., Buckland-Wright, C. Radiographic methods in knee osteoarthritis: a further comparison of semiflexed (MTP), schuss-tunnel, and weight-bearing anteroposterior views for joint space narrowing and osteophytes. *J Rheumatol*, (2002) 29, 2597-601.
189. Wollert, K. C., Drexler, H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*, (2005) 96, 151-63.
190. Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F., Weiss, R. H. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, (2003) 284, E972-9.
191. Woo, S. L., Buckwalter, J. A. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res*, (1988) 6, 907-31.
192. Wood, J. J., Malek, M. A., Frassica, F. J., Polder, J. A., Mohan, A. K., Bloom, E. T., Braun, M. M., Cote, T. R. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am*, (2006) 88, 503-7.
193. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, (1988) 242, 1528-34.
194. Xu, C. P., Ji, W. M., van den Brink, G. R., Peppelenbosch, M. P. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol*, (2006) 12, 7621-5.

195. Yen, Y. M., Cascio, B., O'Brien, L., Stalzer, S., Millett, P. J., Steadman, J. R. Treatment of osteoarthritis of the knee with microfracture and rehabilitation. *Med Sci Sports Exerc*, (2008) 40, 200-5.
196. Yi, Y., Hahm, S. H., Lee, K. H. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr Gene Ther*, (2005) 5, 25-35.
197. Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., Gilboa, E. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1986) 83, 3194-8.
198. Zhang, H., Bradley, A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*, (1996) 122, 2977-86.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie des Gelenkknorpels (modifiziert nach [110]).....	10
Abbildung 2: Klassifikation von Knorpelschäden (modifiziert nach [182])	13
Abbildung 3: ICRS-Klassifikation osteochondraler Schäden (modifiziert nach [182])	14
Abbildung 4: Einteilung der OCL nach Imhoff [71].....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung des hBMP-2 Vorläuferpeptids mit Angaben der Sequenzlängen	30
Abbildung 6: BMP-Signalkaskade (Darstellung modifiziert nach [30]).....	32
Abbildung 7: Präparation eines standardisierten osteochondralen Defekts	40
Abbildung 8: Intraoperativer Situs nach Auffüllung des Defektes.....	40
Abbildung 9: Repräsentative Bilder von aufgefüllten Defekte der Retroviralen Gruppe (A) und der Kontrollgruppe (B)	54
Abbildung 10: Defektbereich (Kontrollgruppe) nach 12 Wochen.....	60
Abbildung 11: Defektbereich (rv-BMP-2) nach 12 Wochen	60
Abbildung 12: Repräsentative histologische Schnitte nach 12 Wochen (HE-Färbung)	65
Abbildung 13: Alcian-Blau-Färbung der Kontrollgruppe (A) und rv-BMP-2-Gruppe (B) nach 4 Wochen. 20-fache Vergrößerung	69
Abbildung 14: Immunhistologische Färbung der Kontrollgruppe nach 4 Wochen)....	72
Abbildung 15: Immunhistologische Färbung der Retroviralen Gruppe nach 4 Wochen	73

8 Danksagung

Folgenden hilfreichen Händen und Köpfen möchte ich im Zusammenhang mit der Fertigstellung dieser Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen:

Meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. A. B. Imhoff für die Überlassung des Themas, Anregungen und die Forschungsmöglichkeiten in dem Labor für Sportorthopädie sowie die freundliche Betreuung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Bernd Gänsbacher für die Überlassung der Räumlichkeiten für die Laborarbeiten im Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung.

Ganz besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. med. habil. Stephan Vogt für seine ununterbrochene Hilfestellung und Beratung bei den durchgeführten Experimenten.

Herrn Dr. Thomas Tischer für die stete Bereitschaft bei Problemstellungen sowie ununterbrochene Hilfestellung während den histologischen Experimenten.

Frau Gabriele Wexel für ihre stete und ununterbrochene und unverzichtbare Hilfestellung während der gesamten Zeit der Tierexperimente.

Und ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich in jeglichen Belangen stets unterstützten.

9 Lebenslauf

Daniel Hensler

Geboren am 31.12.1979 in Göttingen

Schulbildung

09/1986 – 07/1999 Grundschule und Gymnasium
(Finsterwalder Gymnasium Rosenheim)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

- 04/2001 – 04/2003 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität München
- 04/2003 – 06/2007 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
- 06/2007 Erlangung der Approbation als Arzt

Famulaturen, Praktika, Praktisches Jahr

- 02/2001 – 03/2001 Pflegepraktikum, Abteilung für Orthopädie, Klinikum Rosenheim
- 05/2004 – 01/2006 Studententätigkeit, Abteilung für Neurologie, Klinikum Bogenhausen, München
- 09/2005 – 02/2007 Studententätigkeit, Abteilung für Sportmedizin, Klinikum Rechts der Isar, München

Famulaturen:

- 08/2003 – 09/2003 Famulatur, Abteilung für Unfallchirurgie,
St. Marienkrankenhaus, Berlin
- 10/2004 Famulatur, Orthopädische Praxisklinik Dr. Köster,
Bad Aibling
- 02/2005 – 03/2005 Famulatur, Department of Anaesthetics,
Royal Prince Alfred Hospital, Sydney
- 08/2005 – 09/2005 Famulatur, Abteilung für Sportmedizin,
Klinikum Rechts der Isar, München

Praktisches Jahr

- 02/2006 – 06/2006 Innere Medizin, Spitalzentrum Oberwallis, Schweiz
- 06/2006 – 10/2006 Orthopädie, Abteilung für Sportorthopädie, Klinikum
Rechts der Isar, München
- 10/2006 – 01/2007 Chirurgie, Spital Zollikerberg, Zollikon, Schweiz

Beruflicher Werdegang

- Seit 07/2007 Assistenzarzt der Abteilung für Sportorthopädie,
Klinikum Rechts der Isar,
Technische Universität München

10 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in „Biomaterials“ und in „Pharmaceutical Research“ unter den folgenden Titeln veröffentlicht:

Biomaterials:

“The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodeling and repair of osteochondral defects”

Stephan Vogt ^a, Gabriele Wexel ^{a,b,1}, Thomas Tischer ^{a,1}, Ulrike Schillinger ^b, Peter Ueblacker ^{a,c}, Bettina Wagner ^b, Daniel Hensler ^a, Jonas Wilisch ^a, Christopher Geis ^a, Daniela Wübbenhorst ^b, Joachim Aigner ^b, Michael Gerg ^b, Achim Krüger ^b, Gian M. Salzmann ^a, Vladimir Martinek ^a, Martina Anton ^b, Christian Plank ^b, Andreas B. Imhoff ^a, Bernd Gänsbacher ^b

^a Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München

^b Abteilung für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München

^c Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg

¹ Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen

Pharmaceutical Research:

“A Fibrin Glue Composition as Carrier for Nucleic Acid Vectors“

Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, Vogt S, Ueblacker P, Tischer T, Hensler D, Wilisch J, Aigner J, Walch A, Stemberger A, Plank C.

Pharm Res. 2008 Dec;25(12):2946-62. Epub 2008 Sep 10.