

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. v. Eisenhart-Rothe)

**Qualitative Untersuchungen zur Wertigkeit des  
Knorpelgewebes des proximalen Femurs bei  
femoroacetabulärem Impingement  
für die autologe Chondrozytentransplantation**

Frauke Wilken

*Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Medizin genehmigten Dissertation.*

**Vorsitzender:** Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

**Prüfer der Dissertation:**

1. Priv.-Doz. Dr. H. W. Gollwitzer
2. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff

*Die Dissertation wurde am 11.09.2013 bei der Technischen Universität eingereicht und durch  
die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.*



**Meinen Eltern und meiner Oma Tatje**



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>ABC</b>	Avidin-Biotin-Komplex
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
<b>ACT</b>	Autologe Chondrozytentransplantation
<b>AEC</b>	3-Amino-9-ethylcabazol
<b>Agg</b>	Aggrecan
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMP</b>	bone morphogenetic protein
<b>Cbfa1</b>	Core Binding Factor subunit alpha-1
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>FAI</b>	Femoroacetabuläres Impingement
<b>FAM</b>	6-Carboxyfluorescein
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor
<b>Kol1</b>	Kollagen 1
<b>Kol2</b>	Kollagen 2
<b>Kol10</b>	Kollagen 10
<b>MACT</b>	Matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>PBS</b>	Phosphat buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PDT</b>	Population Doubling Time
<b>PEG</b>	polyethylene glycol
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PGA</b>	polyglycolic acid

<b>PLA</b>	polyactic acid
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time PCR
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>Sox9</b>	Sex determining region Y–box 9
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Gelenkknorpeldefekte .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels.....	1
1.1.2 Einteilung der Knorpeldefekte.....	3
1.1.3 Übersicht der Therapieoptionen .....	4
1.1.4 Autologe Chondrozytentransplantation.....	6
1.1.4.1 Anwendung am Hüftgelenk.....	7
<b>1.2 Femoroacetabuläres Impingement .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Ätiologie .....	8
1.2.2 Einteilung.....	9
1.2.2.1 CAM-Impingement .....	9
1.2.2.2 Pincer-Impingement.....	10
1.2.3 Therapieansätze .....	11
1.2.3.1 konservative Therapie .....	11
1.2.3.2 operative Therapie .....	11
<b>1.3 Problemstellung .....</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL &amp; METHODIK .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Geräte und Reagenzien.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Technische Geräte.....	14
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien .....	15
2.1.3 Materialien für die Zellkultur.....	17
2.1.4 Primer für die real-time-PCR .....	18
2.1.5 Software .....	19
<b>2.2 Patienten und Knorpelmaterial.....</b>	<b>19</b>
2.2.1. Studiendesign .....	19
2.2.1.1 Impingementgruppe.....	19
2.2.1.2 gesunde Kontrollgruppe .....	20
2.2.1.3 arthrotische Kontrollgruppe .....	20
2.2.2 Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation (Mankin-Score).....	20
2.2.3 Ethikerklärung .....	21
<b>2.3 Zellkulturtechniken .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Chondrozytenisolierung .....	21
2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	22
2.3.3 Kultivierungsbedingungen in der Zellkultur .....	22
2.3.3.1 Monolayerkultur .....	22
2.3.3.2 Pelletkultur .....	23

2.3.6 Kryokonservierung .....	23
<b>2.4 Proliferationsanalyse .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Population Doubling Time (PDT) .....	24
2.4.2 BrdU-Elisa .....	24
<b>2.5 Immunhistochemische Analyse .....</b>	<b>25</b>
2.5.3 Bewertungsskala .....	26
<b>2.6 qRT-PCR Nukleinsäureanalytik .....</b>	<b>27</b>
2.6.1 RNA-Isolierung aus Kulturzellen .....	27
2.6.2 Qualitätskontrolle .....	28
2.6.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	28
2.6.4 Erstellen eines Zellpools .....	29
2.6.5 Polymerasekettenreaktion .....	29
2.6.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip .....	29
2.6.5.2 Quantitative real-time-PCR .....	29
<b>2.7 Statistische Auswertung .....</b>	<b>30</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Patientengut-Analyse .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Mankin-Score .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Verhalten der Impingementzellen in Zellkultur .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Proliferationsverhalten der Impingementzellen .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Immunhistochemische Analyse der Expression chondrozytärer Differenzierungsmarker .....</b>	<b>36</b>
3.5.1 Kollagen 1 .....	38
3.5.2 Kollagen 2 .....	39
3.5.3 Aggrecan .....	40
<b>3.6 Bestimmung der Expression chondrozytenspezifischer Gene auf mRNA-Ebene .....</b>	<b>41</b>
3.6.1 Gen-Expression Monolayerkultur .....	41
3.6.1.1 Referenz-Zellpool .....	42
3.6.1.2 Kollagen 1 .....	43
3.6.1.3 Kollagen 2 .....	43
3.6.1.4 Kollagen 10 .....	44
3.6.1.5 Sox 9 .....	45
3.6.1.6 Cbfa1 .....	46
3.6.2 Genexpression Pelletkultur .....	46
3.6.2.1 Kollagen 1 .....	48
3.6.2.2 Kollagen 2 .....	49
3.6.2.3 Kollagen 10 .....	50

3.6.2.4 Sox 9 .....	51
3.6.2.5 Cbfa1 .....	52
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
4.1 Beurteilung des Patientenkollektivs.....	53
4.2 Verhalten der FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur .....	55
4.2.1 Proliferationsverhalten.....	57
4.2.2 Veränderung der Expression von Matrixbestandteilen in Zellkultur.....	57
4.3 Verhalten der FAI-Chondrozyten in Pelletkultur.....	60
4.3.1 chondrozytäres Redifferenzierungspotential – Beurteilung der Protein- und Genexpression.....	60
4.3.2 Einsatz von Wachstumsfaktoren, Kultivierungssystemen in der ACT/MACT .....	63
4.4 Beurteilung der Mankin-Score-Korrelation .....	65
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>81</b>
<b>10. LEBENS LAUF .....</b>	<b>85</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>87</b>



# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Gelenkknorpeldefekte

Knorpeldefekte stellen auf Grund der Avaskularität und somit mangelnden Regenerationsfähigkeit des Knorpels (Leunig 2006) vor allem im Alter, aber vermehrt auch schon in jungen Jahren ein großes therapeutisches Problem dar und werfen die Frage des adäquaten medizinischen Ersatzes auf. Besonders betroffen sind die lasttragenden Gelenke des menschlichen Körpers, das Knie- und das Hüftgelenk.

Das Auftreten eines Knorpeldefektes kann vielfältige Ursachen haben. Mit fortschreitendem Alter tritt die Degeneration in den Vordergrund. Aber auch junge Menschen können durch Dysplasie, Hüftkopfnekrose, Trauma oder Tumor früh unter den Folgen eines Knorpelschadens leiden (Streich 2009). Im Laufe der Zeit kann aus einem umschriebenen Knorpelschaden eine degenerative Erkrankung des gesamten Gelenkes entstehen, die Arthrose. Eine spontane Heilung wird nahezu nicht beobachtet, da es dem Knorpelgewebe im Erwachsenenalter nicht möglich ist eine effektive chondrozytäre Migration sowie Proliferation zu initiieren (Schewe 2006). Arthrosebedingt werden derzeit in Deutschland jährlich ca. 160.000 künstliche Hüftgelenke implantiert (Veit 2009).

Vor allem das femoroacetabuläre Impingement (FAI) drängt sich als häufige Arthroseursache immer mehr in den Fokus. Gemeinsam mit der Dysplasie ist es für ca. 70% der Knorpeldefekte des Hüftgelenks verantwortlich (Gollwitzer 2010). Es stellt nach heutigem Stand der Forschung eine der häufigsten Ursachen für eine mechanisch bedingte Arthrose des Hüftgelenks mit Destruktion des randnahen acetabulären Knorpels dar (Kusma 2009, Schewe 2006).

### 1.1.1 Aufbau und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels

Für die normale Gelenkfunktion ist der gesunde, hyaline Knorpel als Gleitfläche unerlässlich. Druck- und Scherkräfte, die auf ein Gelenk einwirken werden durch eine nahezu reibungsfreie Oberfläche abgefangen und ermöglichen ein friktionsloses Gleiten sowie eine optimale Übertragung der einwirkenden Kräfte auf den subchondralen Knochen (Buckwalter 2002, Poole 1993). Dies wird durch den verbundartigen Aufbau des Knorpelgewebes ermöglicht. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Hauptkomponenten des Gelenkknorpels, der Gewebeflüssigkeit sowie einem Netz aus Makromolekülen verleihen dem Gewebe seine Form und Stabilität. Auf Grund seiner Viskoelastizität ist es dem hyalinen Knorpel möglich auf

einwirkende Kräfte und Deformationen zu reagieren ohne seine ursprüngliche Konfiguration aufgeben zu müssen (Buckwalter 1992).

Durch die persistierende, starke Beanspruchung, v.a. lasttragender Gelenke, ist der adulte, hyaline Knorpel hohen Belastungsspitzen ausgesetzt. Um seine Integrität zu wahren befinden sich keine Blut- und Lymphgefäße sowie keine nervale Versorgung im Gewebe. Lediglich juveniler Gelenkknorpel kann vor Ausbildung der Verkalkungszone noch zu einem Teil über Blutgefäße aus dem subchondralen Knochen versorgt werden (Metz 2001, Torzilli 1983). Auf Grund der Avaskularität müssen die Ernährung sowie die Entfernung der Abfallprodukte im adulten Knorpel über Diffusion erfolgen (Dudhia 2005). In der Literatur wird eine Versorgung des Knorpels über Nährstoffe aus der Synovialflüssigkeit, die in den Gelenkknorpel diffundieren, postuliert (Archer 2003, Mauck 2003). Eine physiologische Belastung der Gelenke ist hierbei essentiell, da die Immobilisierung eines Gelenks die gleichmäßige Verteilung der Synovialflüssigkeit verhindert. Dies kann eine stark herabgesetzten Knorpelernährung sowie Reduktion der Knorpeldicke zur Folge haben (O'Hara 1990, Vanwanseele 2002).

Der Gelenkknorpel ist aus Chondrozyten sowie der von ihnen synthetisierten, extrazellulären Matrix aufgebaut (Kuettner 1992). Chondrozyten stellen mit 5-10% nur einen sehr geringen Anteil des Knorpelvolumens dar, sind jedoch als einzige, vorkommende Zellart für den gesamten Stoffwechsel des Knorpelgewebes verantwortlich (Archer 2003, Bruckner 1994, Hall 2003). Dieser beinhaltet die belastungsabhängige Umstrukturierung sowie die kontinuierliche Erneuerung der extrazellulären Matrix zur Gewährleistung der mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels (Muir 1995, Rudert 1998).

Die extrazelluläre Matrix des Knorpels setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, die in zwei große Gruppen, die Gewebeflüssigkeit und das Gerüst aus Makromolekülen eingeteilt werden können, das für die nötige Stabilität des Knorpelgewebes sorgt (Buckwalter 1992). Wasser bildet mit einem Anteil von 60-70% die Grundlage der Knorpelmatrix. Der Anteil der Makromoleküle setzt sich in der Trockenmasse aus Kollagenen (~60%) Proteoglykanen (~30%) sowie aus nicht-kollagen- und nicht-proteoglykan-gebundenen Proteinen (~10%) zusammen (Spahn 2006).

Der kollagene Anteil wird zu ca. 90% aus netzwerkartig angeordnetem Kollagen 2 gebildet. Eine untergeordnete Rolle spielen die Kollagene 5, 6, 9, 11, die zur weiteren Stabilisierung des Kollagennetzwerks beitragen (Buckwalter 1983, Rudert 1998). Das Vorkommen der Kollagene vom Typ 1, 3 oder 10 kann in erhöhten Konzentrationen Hinweise auf einen pathologischen Prozess wie beginnende Osteoarthrose geben (Kielty 1985, Miosge 2004). Die exakte

Zusammensetzung des Kollagennetzwerks ist jedoch stark von der jeweiligen Belastung des Gelenks abhängig.

Das aggregierende Hauptproteoglykan Aggrecan ist für den hyalinen Gelenkknorpel charakteristisch, zeichnet sich durch eine hohe Wasserbindungsfähigkeit aus und ist für die viskoelastischen Eigenschaften sowie die hohe Druckfestigkeit des Gelenkknorpels verantwortlich (Doege 1991, Ulrich-Vinther 2003). Die Bezeichnung beruht auf der Fähigkeit des Aggrecans nicht-kovalente Bindungen mit Hyaluronsäure einzugehen und somit große Proteoglycanaggregate zu bilden, die spezifisch für hyalinen Gelenkknorpel sind (Cohen 1998, Dudhia 2005, Vanwanseele 2002).

In der extrazellulären Matrix kommen neben Kollagenen und Proteoglykanen in geringer Konzentration weitere Proteine vor, die als Link-Proteine für den Kontakt zwischen Zellen und Matrix zuständig sind sowie als Enzyme den Umbau der extrazellulären Matrix steuern (Spahn 2006). Bei Umbauprozessen der extrazellulären Matrix, wie im Falle einer arthrotischen Veränderung des Knorpelgewebes kommt es zu einer messbaren Konzentrationsänderung dieser Stoffe. Nach Zellverlust, beispielsweise ausgelöst durch ein Trauma oder auch arthrotische Degeneration kann nach Abschluss der Skelettreife in adultem Knorpel keine Zellvermehrung durch Mitose mehr erfolgen (Kuettner 1992, Sato 2012). Eine Kompensation erfolgt durch die gesteigerte Stoffwechselleistung der verbleibenden Chondrozyten (Hall 2003). Insgesamt ist die Stoffwechselleistung des hyalinen Knorpels jedoch als träge zu bewerten, da bei hoher Stoffwechselaktivität der einzelnen Chondrozyten nur eine sehr geringe Zelldichte besteht (Archer 2003).

### **1.1.2 Einteilung der Knorpeldefekte**

Chondrale Defekte stellen während der Arthroskopie einen häufigen Untersuchungsbefund dar. Jedoch war lange kein Klassifizierungssystem für Knorpeldefekte vorhanden, das als Grundlage für eine einheitliche, therapeutische Richtlinie herangezogen werden konnte. Eine vergleichende Darstellung klinischer Befunde sowie postoperativer Ergebnisse war somit nicht uneingeschränkt möglich (Brittberg 2003). Ein Klassifizierungssystem für Knorpeldefekte, das sich in der Folgezeit in breiter klinischer Anwendung befand, wurde bereits 1961 von der Arbeitsgruppe um Outerbridge entwickelt (s. Tab. 1) (Outerbridge 1961). Outerbridge teilte Knorpeldefekte in vier Gruppen ein, die Klassifikation war simpel und gut klinisch anwendbar. Jedoch wurde hier in der Abstufung der Defekte, v.a. in Bezug auf die Tiefenausdehnung (vgl. Grad II/III) nur eine unzureichend genaue Abgrenzung vorgenommen.

Grad	Pathologie
I	intakte Knorpeloberfläche mit leichter Erweichung
II	Fragmentierung / Fissuren des Knorpels mit einer Läsionstiefe <50% d. Knorpeldicke
III	Fragmentierung / Fissuren des Knorpels mit einer Läsionstiefe >50% d. Knorpeldicke
IV	vollständige Knorpelläsion, Läsion reicht bis auf Knochen

**Tabelle 1: Outerbridge-Klassifikation**

Mit dem Ziel ein standardisiertes Klassifikationssystem für die Evaluation von Knorpelverletzungen und deren operativer Therapie zu entwickeln wurde im Jahre 1997 die "International Cartilage Repair Society" gegründet. Auf Grundlage der Outerbridge-Klassifikation wurde das „ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System“ veröffentlicht. Die vierstufige Einteilung wurde übernommen, jedoch erfolgte eine detaillierte Beschreibung des Defekts (Brittberg 2003).

<b>ICRS-Grad</b>	<b>Pathologie</b>
<b>0</b>	keine erkennbaren Defekte
<b>1a</b>	intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Erweichungen
<b>1b</b>	zusätzlich oberflächliche Risse/Fissuren
<b>2</b>	Läsionstiefe <50% der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)
<b>3a</b>	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht (schwer abnormaler Knorpel)
<b>3b</b>	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierenden Schicht
<b>3c</b>	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte
<b>3d</b>	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung
<b>4</b>	vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte

**Tabelle 2: ICRS-Klassifikation**

### 1.1.3 Übersicht der Therapieoptionen

Die vorrangigen Ziele bei der langfristigen Therapie von Knorpeldefekten sind die Wiederherstellung der Oberflächenkongruenz, eine weitgehend physiologische Gelenkfunktion und die schmerzlose Beweglichkeit (Imhoff 1999). Die häufigste operative Versorgung von

Defekten des hyalinen Knorpels findet am Kniegelenk statt, wird aber auch an anderen Gelenken, u.a. am Hüftgelenk durchgeführt.

Die Auffüllung des Knorpeldefekts sollte mit einem Gewebe erfolgen, das den im Gelenkknorpel auftretenden Belastungen standhalten kann. Grundsätzlich lassen sich drei Therapiemodelle unterscheiden. Im Blickpunkt stehen die Induktion der knorpeligen Regenerationsfähigkeit (Mikrofrakturierung, Pridie-Bohrung, Abrasionsplastik) sowie die autologe Transplantation von Knorpelgewebe (OATS, ACT, MACT). Weiterhin kann die symptomatisch orientierte Behandlung des Knorpeldefekts mittels Lavage bzw. Débridement erfolgen. Unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren wie u.a. Alter des Patienten, Größe und Lokalisation des Defekts werden interindividuell unterschiedliche Therapieverfahren angewandt.

Lavage bzw. Débridement dienen vorrangig der Säuberung und Entfernung loser Fragmente eines umschriebenen Knorpeldefekts. Der randständige, gesunde, hyaline Knorpel soll vor Übertragung von Scherkräften und somit einer weiteren Schädigung geschützt werden. Eine biologische Knorpelrekonstruktion kann auf diese Weise nicht erfolgen. Eine randomisierte klinische Studie zur Beurteilung des Effekts von Lavage- und Débridementbehandlung auf Knorpeldefekte konnte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Placebogruppe feststellen (Moseley 2002). Allerdings wird die Thematik auf Grund einiger wesentlicher Schwächen der zitierten randomisierten Studie weiter ambivalent diskutiert.

Die OATS-Technik zur Transplantation hyalinen Knorpelgewebes wurde erstmals 1964 von Wagner et al. angewandt (Wagner 1964). Bei dieser osteochondralen Transplantation werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus einer unbelasteten Gelenkregion entnommen und in den bestehenden Knorpeldefekt überführt. Eine Fixierung erfolgt durch das passgenaue Auffüllen des Defekts mit einem oder mehreren Zylindern. Im Verlauf setzt eine Faserknorpelbildung vor allem an den knorpeligen Kontaktflächen ein, zudem entsteht eine gewisse Inkongruenz zwischen den Zylindern (Hangody 2003). In Langzeitstudien konnte jedoch gezeigt werden, dass die OATS-Technik bei kleineren und mittleren Defekten gute Ergebnisse zeigt. Bei größeren Defekten spielt die Beschwerdesymptomatik an der Entnahmestelle eine zunehmende Rolle. Da nur eine begrenzte Anzahl an Transplantaten entnommen werden kann eignet sich diese Methode lediglich in Einzelfällen für die Behandlung von Knorpeldefekte  $>3\text{cm}^2$  (Marcacci 2007). Mikrofrakturierung (Steadman 2001), Pridie-Bohrung (Pridie 1959) sowie Abrasionsplastik (Johnson 1986) verfolgen grundsätzlich ein ähnliches Prinzip. Durch die Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle kommt es zu einer Einblutung in den Knorpeldefekt. Zusätzlich führt dies zu einer Einwanderung von Fibrozyten und mesenchymalen Stammzellen, die einen Faserknorpel mit herabgesetzter Belastbarkeit bilden (Hunziker 2002). Die Mikrofrakturierung

findet aufgrund der geringsten Invasivität sowie einfacher technischer Handhabung eine breitere, klinische Anwendung und stellt aktuell die Methode der ersten Wahl bei der Versorgung von Knorpeldefekten  $<4\text{cm}^2$  dar (Safran 2010). Die Behandlung kleinerer Defekte ( $<2,5\text{cm}^2$ ) zeigte bei 60-80% der Patienten gute bis exzellente Ergebnisse in den ersten Jahren nach der operativen Versorgung (Bekkers 2009, Steadman 2003). Die Mikrofrakturierung stellt jedoch keine kurative Behandlung dar. Es wird angenommen, dass das gebildete fibrocartilaginäre Ersatzgewebe in Langzeitstudien dem hyalinen Knorpel unterlegen ist. Knorpeldefekte  $>4\text{cm}^2$  können auf Grund der unzureichenden biomechanischen Eigenschaften des Ersatzknorpelgewebes nicht erfolgversprechend mittels Mikrofrakturierung therapiert werden (Knutsen 2007).

### **1.1.4 Autologe Chondrozytentransplantation**

Die autologe Knorpelzelltransplantation (ACT) zur Behandlung von Knorpeldefekten wurde 1994 von Brittberg et al. erstbeschrieben (Brittberg 1994). In einem ersten operativen Schritt wird arthroskopisch eine Knorpelbiopsie entnommen. Diese Zellen werden ex vivo über mehrere Wochen kultiviert, quantitativ vermehrt und anschließend in den Knorpeldefekt injiziert, abgedeckt durch einen Periostlappen. Hier beginnen die Zellen mit der Produktion einer Knorpelmatrix, die den Defekt ausfüllt und stabilisiert. Einen limitierenden Faktor stellt jedoch das häufige Auftreten der Periostlappen-Hypertrophie dar (Peterson 2000). Eine Weiterentwicklung der ACT, die dieses Problem umgeht, zeigt sich in der Verwendung der matrixassoziierten autologen Knorpelzelltransplantation (MACT). Resorbierbare Trägermaterialien stellen ein Matrixsystem für die Kultivierung der Zellen dar und erleichtern die operative Durchführung der Transplantation und die Fixierung im Defekt, da eine zusätzliche Abdeckung durch Periostlappen oder ähnliches nicht erforderlich ist (Marlovits 2004). Auf längere Sicht scheint die MACT in Bezug auf klinisches Outcome und Wiederherstellung der Sportfähigkeit der Mikrofrakturierung wie auch der ursprünglichen Form der ACT leicht überlegen. Zum jetzigen Zeitpunkt fehlen jedoch noch Langzeitstudien, die die Ergebnisse der MACT aufarbeiten und in den klinischen Kontext einordnen (Bartlett 2005, Kon 2009).

Aktuell stellen Débridement sowie Mikrofrakturierung die First-Line-Therapie für fokale Knorpeldefekte dar (Batty 2011). Der gebildete Faserknorpel kann jedoch häufig dem postoperativen Anspruch an sportliche Aktivität nicht gerecht werden. Somit stellt sich v.a. für jüngere Patienten die Frage nach der Möglichkeit einer biologischen Rekonstruktion des Defekts. Sowohl kurz- und mittelfristige Ergebnisse (McNickle 2009, Rosenberger 2008) wie auch eine Langzeitstudie (Bentley 2012) bescheinigen der autologen Chondrozytentransplantation am

Kniegelenk gute bis sehr gute postoperative Ergebnisse. Gegenüber Mosaikplastik (Bentley 2003) und Débridement (Fu 2005) zeigt die ACT ein signifikant besseres Outcome. Bei kleineren, fokalen Defekten (<2cm<sup>2</sup>) konnten bei Mikrofrakturierung und ACT nahezu gleichwertige Ergebnisse beobachtet werden (Knutsen 2007).

#### **1.1.4.1 Anwendung am Hüftgelenk**

ACT und MACT werden auf Grund der übersichtlichen Gelenkverhältnisse vorwiegend am Kniegelenk angewandt. Der therapeutische Zugang zum Hüftgelenk ist durch eine enge Gelenkführung sowie den umliegenden, starken Muskelmantel erschwert. Die Erkenntnisse der autologen Chondrozytentransplantation am Knie lassen sich jedoch auch auf Knorpelläsionen an der Hüfte übertragen. Aktuell liegen in der Literatur allerdings nur wenige Studien vor.

Ein erster Fallbericht wurde 2006 von der Gruppe um Akimau publiziert. Es wird von einem 31-jährigen Mann mit Osteonekrose des Hüftkopfes, ein Jahr nach der Versorgung einer traumatischen, dislozierten Hüftkopffraktur berichtet. Bei stark schmerzhafter Beweglichkeit des Hüftgelenks erfolgte eine erneute operative Versorgung. Neben einer Defektauffüllung mittels autologer Spongiosaplastik aus der Trochanterosteotomiestelle kam hier erstmals die ACT am Hüftgelenk zum Einsatz. Knorpel der femoralen Trochlea wurden entnommen, Chondrozyten in Kultur expandiert und unter einem Kollagen-Patch auf den Defekt aufgetragen. Neben einem guten klinischen Ergebnis zeigte eine arthroskopische Kontrolle eine 2mm dicke, neu gebildete Knorpelschicht (Akimau 2006). Limitierend ist anzumerken, dass aufgrund der fortgeschrittenen Destruktion des subchondralen Knochens ein radiologisch schlechtes Ergebnis vorlag.

Das positive klinische Ergebnis nach ACT am Hüftgelenk wird bekräftigt durch eine retrospektiv vergleichende Studie aus dem Jahre 2012 (Fontana 2012), die die Versorgung von Knorpelschäden des Hüftgelenks mittels Débridement sowie MACT verglichen hat. Eingeschlossen wurden jeweils 15 Patienten mit Knorpelschaden des Hüftgelenks (Grad III-IV n. Outerbridge). Die arthroskopische Versorgung erfolgte in der Débridement-Gruppe einzeitig, in der ACT-Gruppe war nach der Knorpelbiopsie (Pulvinar) ein zweiter Eingriff zur Implantation der Chondrozyten in einem dreidimensionalen Polymer-Scaffold notwendig. Bei präoperativ identischer Ausgangslage zeigte sich im 5-Jahres-Follow-up in der MACT-Gruppe ein signifikant besseres Outcome, objektiviert durch die Erhebung des Harris-Hip-Scores.

Der momentane Standard ist jedoch auch bei der ACT des Hüftgelenks die Verwendung von Knorpelzellen aus dem Kniegelenk, da eine Zellentnahme am Hüftgelenk noch nicht etabliert ist.

Der Knorpel des Kniegelenks wird in einer zusätzlichen Operation aus einer unbelasteten Gelenkregion, meist aus der sog. „Notch“ entnommen. Hier findet sich eine ausreichend dicke Knorpelschicht. Nach Aufbereitung der Chondrozyten werden diese in einer Folgeoperation in den Defekt am Hüftgelenk eingebracht (Schewe 2006).

## **1.2 Femoroacetabuläres Impingement**

### **1.2.1 Ätiologie**

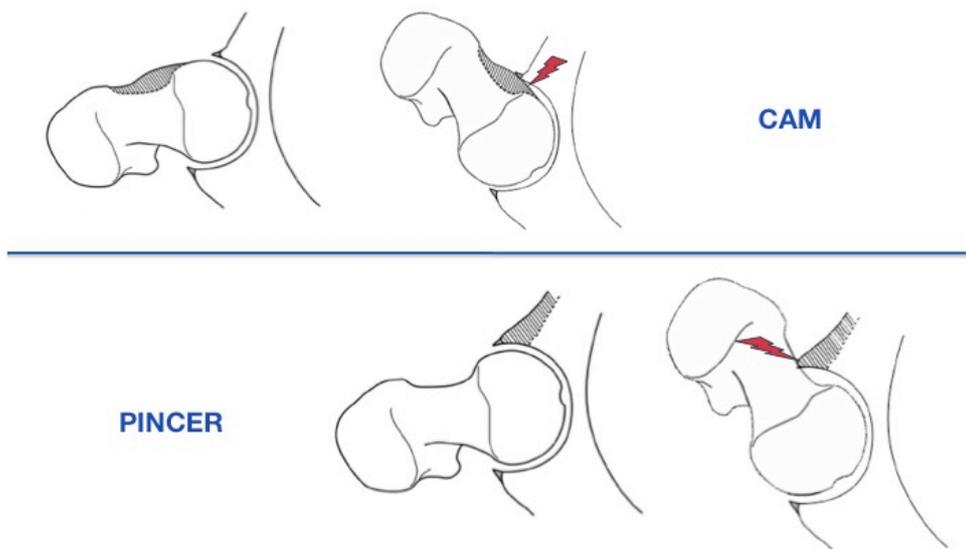
Schmerzen in der Hüfte bei Patienten aller Altersklassen werden häufig durch ein femoroacetabuläres Impingement ausgelöst. Der Mechanismus des Impingements ist eine der führenden Ursachen für die Entstehung der sekundären Arthrose (McCarthy 2001) und ist durch einen mechanischen Schädigungsprozess des Hüftgelenks bedingt. Der anatomische Aufbau dieses Gelenks stellt einen Kompromiss zwischen Flexibilität und Stabilität dar. Durch die Konzeption als Kugelgelenk besteht größtmögliche Bewegungsfreiheit, die jedoch durch den leicht querovalen Aufbau des Schenkelhalses sowie die enge Gelenkführung zu Gunsten der Stabilität eingeschränkt wird. Minimale Formabweichungen der Gelenkkörper können somit zu einer Bewegungseinschränkung sowie zu einem unphysiologischen, mechanischen Kontakt der Gelenkkörper führen (Leunig 2009).

Murray (Murray 1965), Solomon et al. (Solomon 1974, Solomon 1984, Solomon 1982) und Harris et al. (Harris 1986, Harris 1979) beschrieben schon vor mehr als 40 Jahren in ihren Arbeiten zur Ätiologie der Coxarthrose, dass auch minimale morphologische Veränderungen des Hüftgelenks, wie eine Entrundung des Hüftkopfes (sog. „tilt deformity“) in der Folge ein gehäuftes Auftreten von Arthrose bedingen. Auf diesen Arbeiten begründet sich die Hypothese, dass viele der früher als idiopathisch eingeordneten Arthrosen auf eine, meist nur gering ausgeprägte Veränderung der Hüftgelenkmorphologie zurückzuführen sind. Diese wurde im Vorfeld übersehen oder als nicht therapiebedürftig eingestuft (Ganz 2008). Arthrosen, die auf Grund von frühkindlichen Erkrankungen wie M. Perthes oder Epiphysiolysis capitis femoris entstanden sind, sowie entzündlich, traumatisch oder metabolisch bedingte Arthrosen, werden in dieser These nicht eingeschlossen.

Das Konzept des femoroacetabulären Impingements wurde jedoch erst Jahre später durch Ganz et al. propagiert und weiterentwickelt (Ganz 2003). In den folgenden Jahren konnte diese Theorie des Impingementmechanismus durch die Beobachtungen vieler Zentren weltweit gestützt werden (Beck 2005, Beck M 2004, Ganz 2008, Imam 2011).

### 1.2.2 Einteilung

Der Pathomechanismus des FAI beruht auf einer abnormalen Morphologie des Acetabulums bzw. des proximalen Femurs und führt in seiner Konsequenz bei vollem Bewegungsausmaß des Hüftgelenks zu einem Impingementphänomen. Grundsätzlich können zwei Formen des femoroacetabulären Impingements unterschieden werden (Leunig 2006).



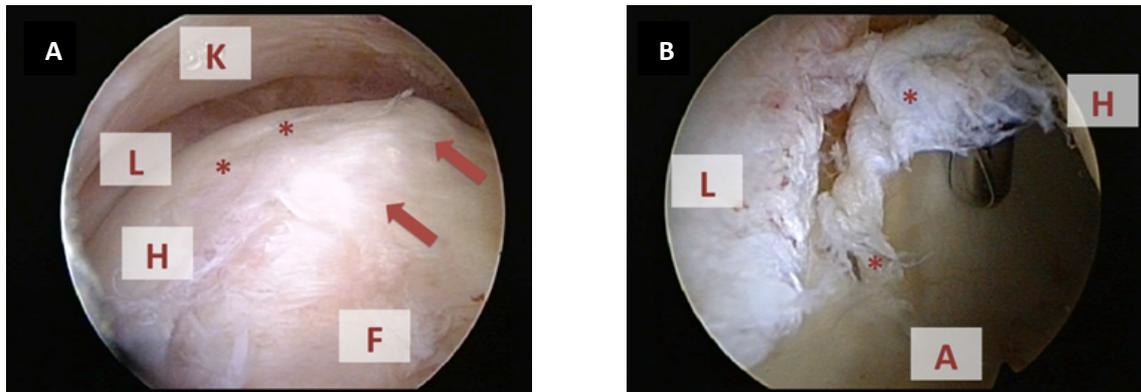
**Abbildung 1: Mechanismus des CAM-/Pincer-Impingements**

Gegenseitiges Anschlagen von Pfannenrand und Femur-Kopf-Hals-Übergang mit Quetschung des acetabulären Labrums und randständigen Knorpels, modifiziert nach Lavigne et al. (Lavigne 2004).

#### 1.2.2.1 CAM-Impingement

Das femoral induzierte CAM-oder auch Nockenwellen-Impingement wird ausgelöst durch eine morphologische Abweichung des Femurkopfes, eine asphärische, knöcherne Ausziehung, die in einer verminderten Taillierung des Kopf-Hals-Übergangs resultiert. Diese Ausziehung ist häufig im anterolateralen Bereich des Kopf-Hals-Übergangs lokalisiert (Macfarlane 2010). Bei starker Flexion und Innenrotation kommt es zum Einpressen des anormal geformten Femurkopfes in die Hüftpfanne, sowie zum Anschlagen an das anterosuperiore Acetabulum (Wagner 2003). Die hierbei auftretenden Scherkräfte trennen bei redundanter, endgradiger Bewegung den Knorpel vom subchondral gelegenen Acetabulum. Dies hat häufig einen acetabulären Knorpelschaden zur Folge. Das Labrum bleibt zu Beginn lange unbeteiligt, im weiteren Verlauf kommt es jedoch meist zur Degeneration. Eine Entzündungsreaktion, sowie ein Riss des Labrums verursachen Beschwerden und sind häufig die ersten klinischen Anzeichen. Diese Form des Impingements führt bei schleichendem Krankheitsverlauf und zu Beginn nur moderaten Schmerzen schnell zu

einer starken Knorpeldestruktion (Ito 2001). Insbesondere junge, athletische Männer im Alter von 20-30 Jahren finden sich in der betroffenen Patientengruppe (Banerjee 2011).



**Abbildung 2: CAM-Impingement intraoperativ**

(A) Knorpelhöcker bei FAI-Impingement vom CAM-Typ (Pfeile) mit femoralem Knorpelschaden (\*), (B) acetabulärer Knorpelschaden mit Delamination eines Knorpellappens (\*) und freiliegendem subchondralem Knochen; K = Hüftkapsel, L = Labrum acetabulare, H = Hüftkopf, A = acetabulärer Knorpel, F = Femurhals; aus Gollwitzer H (2013) Hüftarthroskopie: Ist der Boom gerechtfertigt? Orthopädie und Rheuma 13(2) 2-9. (Gollwitzer 2013)

### 1.2.2.2 Pincer-Impingement

Das Pincer-Impingement resultiert aus einem linearen Kontakt des Pfannenrandes mit dem Kopf-Hals-Übergang des Femurs. Ursächlich hierfür ist häufig ein weit übergreifender Pfannenrand, oder eine besonders tiefe oder fehlorientierte Pfanne (Jamali 2007). Die wiederholte Kompression bei endgradigen Flexions- und Rotationsbewegungen führt primär zu einer Degeneration des Labrums, im Verlauf kann es zu einer Ossifikation der Labrumbasis kommen (Chegini 2009). Die hohe Krafteinwirkung hat eine Ausdünnung des Labrums sowie die Bildung von Knochenappositionen am Pfannenrand zur Konsequenz. Dies führt konsekutiv zu einer zunehmenden Vertiefung der Pfanne. Eine degenerative Schädigung des Knorpels tritt zuerst im Bereich des labrumnahen Acetabulums auf. Der Knorpel des Femurkopfes bleibt lange unbeteiligt, erst bei längerem Krankheitsverlauf kommt es zu einem Abschieben des Knorpels im posteroinferioren Gelenkanteil. Ist in diesem Bereich auch der acetabuläre Knorpel betroffen spricht man von einer Contre-coup-Läsion (Beck 2005). Das Pincer-Impingement zeigt einen langsam voranschreitenden Degenerationsprozess. Die am häufigsten betroffene Patientengruppe sind Frauen im Alter von 30-40 Jahren mit einem hohen Bewegungsanspruch (Leunig 2006). Häufig treten Mischformen beider Impingement-Typen auf.

### **1.2.3 Therapieansätze**

Die Behandlung der Knorpelschäden des Hüftgelenks hat v.a. beim Krankheitsbild des femoroacetabulären Impingements auf Grund der speziellen anatomischen Verhältnisse im letzten Jahrzehnt eine starke Wandlung durchlaufen (Clohisy 2009).

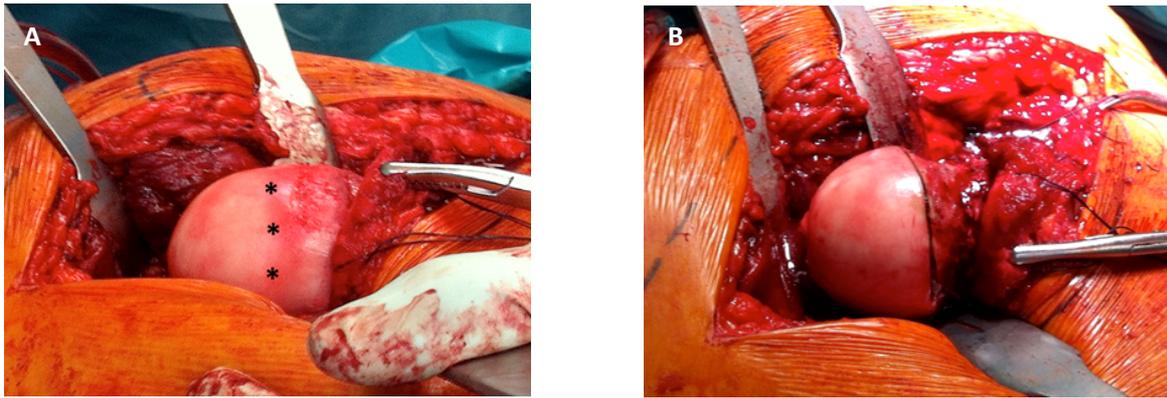
#### **1.2.3.1 konservative Therapie**

Eine konservative Versorgung des femoroacetabulären Impingements beinhaltet eine Schmerzmedikation, sowie eine schmerzabhängige Limitierung des Bewegungsumfanges bzw. Belastung des Hüftgelenks. Diese Therapieversuche sind jedoch meist frustan, da bei einem hohen Bewegungsanspruch des jungen Patientenkollektivs die Therapie nicht kausal erfolgt (Parvizi J 2007).

#### **1.2.3.2 operative Therapie**

Es stehen je nach Indikationsspektrum verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Das Ziel ist jeweils die Beseitigung der zugrunde liegenden Pathomechanismen des Hüftgelenks, um eine möglichst physiologische Hüftkonfiguration sowie schmerzfreie Bewegung zu erlangen (Wagner 2003). Dies geschieht durch eine Rekonturierung des Femurs bzw. des Acetabulums mittels Knochenfräse (Byrd 2011). Neben den beschriebenen knöchernen Veränderungen des FAI zeigt sich am Kopf-Hals-Übergang des Femurs meist eine beginnende degenerative Veränderung des Knorpels. Auf acetabulärer Seite findet sich häufig eine Labrumruptur mit Ablösung des Labrums am chondrolabralen Übergang sowie eine Delamination oder Auftreibung des anterolateralen Pfannenknorpels. (Sadri 2006, Zebala PL 2007).

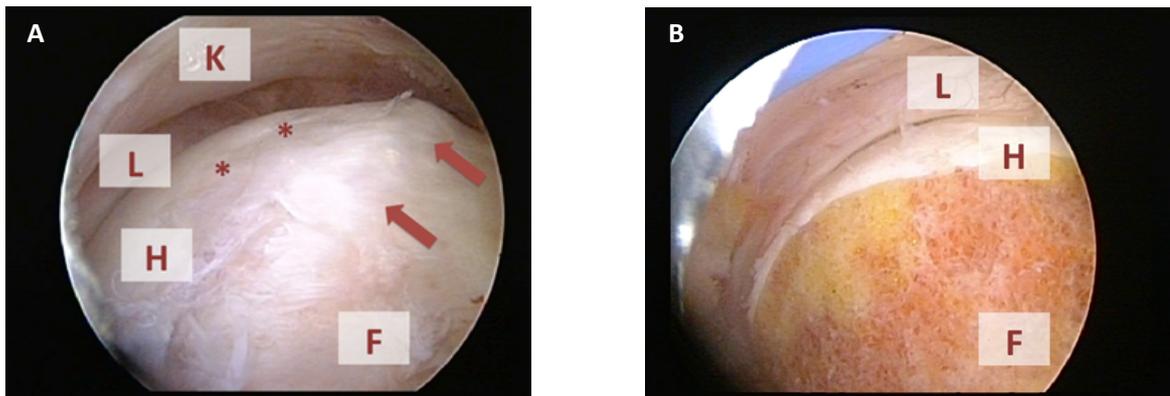
Ende der 1990er Jahre wurde die offene Operation mittels chirurgischer Hüftluxation von Ganz et al. erstbeschrieben und galt lange als Goldstandard (Ganz 2001). Viele Studien bescheinigen dieser Operationsmethode ein positives Langzeitergebnis mit 70-80 % guten bis exzellenten Ergebnissen im Nachbehandlungszeitraum (Clohisy 2009, Leunig 2009). Sie erlaubt durch die Luxation des Gelenks eine vollständige Darstellung von Hüftpfanne und proximalem Femur. Diese jedoch sehr invasive Methode ist in der Nachbehandlung mit relevanten Komplikationen wie Trochanterpseudarthrosen, heterotopen Ossifikationen, Bewegungseinschränkung und Schmerzen beschrieben (Dienst 2009, Ganz R 2001).



**Abbildung 3: Chirurgische Hüftluxation mit Darstellung der cam-Deformität am femoralen Kopf-Hals-Übergang**

(A) Offensichtlich ist die rötliche Verfärbung des Hüftknorpels, welcher durch das chronisch-rezidivierende Anschlagen eine degenerative Veränderung erfährt (\*Grenzzone zwischen normalem und gequetschtem Knorpel). (B) Zustand nach offener, operativer Schenkelhalstaillierung (Gollwitzer 2013)

Die arthroskopische Versorgung des femoroacetabulären Impingements stellt heute eine weit verbreitete Alternative zum offenen Vorgehen dar. Bereits 1931 wurde erstmalig eine Hüftarthroskopie durchgeführt (Burman 2001). Auf Grund der anatomischen Gegebenheiten des Hüftgelenks konnte sich diese Technik jedoch erst im letzten Jahrzehnt in der klinischen Praxis durchsetzen (Sampson 2006). Die Konfiguration als Kugelgelenk sowie die starke, muskuläre Führung erschweren den arthroskopischen Zugang. Durch Traktion erfolgt eine Erweiterung des Gelenkspalts, intraoperativ ist somit eine bessere Übersicht möglich. Die arthroskopische Behandlung ist im Gegensatz zum offenen Vorgehen mit weniger Folgekomplikationen (<1,5%) behaftet. Nervenirritationen im Arthroskopiegebiet (N. cutaneus femoralis lateralis., N. ischiadicus) sowie Traktionslähmungen gehören zu den möglichen Risiken, sind jedoch meist transient (Lo 2006). Sadri et al. (Sadri 2006) konnten zeigen, dass arthroskopische Behandlung und chirurgische Luxation des FAI zu vergleichbaren, klinischen Ergebnissen führen. Arthroskopisch versorgte Patienten profitieren jedoch aufgrund der geringeren Invasivität von kürzeren Rehabilitationszeiten (Bardakos 2008, Dienst 2009). Die arthroskopische Versorgung zeichnet sich durch sehr gute kurz- bis mittelfristige, klinische Ergebnisse sowie eine hohe Patientenzufriedenheit aus (Gedouin 2010, Philippon 2009). Aktuell liegen zur Bewertung von Langzeitergebnissen nur begrenzte Daten vor. In kleineren Patientenkollektiven (n=29) konnte jedoch bereits von einem guten Outcome berichtet werden (Byrd 2009).



**Abbildung 4: Rekonturierung des Schenkelhalses: intraoperative arthroskopische Aufnahme (A) vor und (B) nach Abtragung der cam-Deformität (Pfeile)**

K = Hüftkapsel, L = Labrum acetabulare, H = Hüftkopf, A = acetabulärer Knorpel, F = Femurhals; aus Gollwitzer H (2013) Hüftarthroskopie: Ist der Boom gerechtfertigt? Orthopädie und Rheuma 13(2) 2-9. (Gollwitzer 2013)

### 1.3 Problemstellung

In der Arbeit von Wagner et al. 2003 (Wagner 2003) konnte in einer histologischen Aufarbeitung gezeigt werden, dass der Knorpel im Bereich sog. CAM-Läsionen des femoroacetabulären Impingements zwar degenerative Veränderungen ähnlich der Arthrose aufweist, es sich jedoch um vitalen, hyalinen Knorpel handelt und keine Transformation zu degenerativem Faserknorpel aufgetreten ist. Die an dieser Stelle bei der operativen Therapie des femoroacetabulären Impingements vom CAM-Typ mittels Rekontourierung des Schenkelhalses entfernten - und normalerweise verworfenen - Knorpelzellen haben somit potentiell die Voraussetzung zur Expansion und Kultivierung im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Isolierung, Kultivierung und qualitative Beurteilung dieser entnommenen FAI-Chondrozyten. Entsprechend der Voruntersuchungen von Wagner et al. erfolgte als Referenzuntersuchung eine histopathologische Aufarbeitung des Knorpelgewebes. Es sollte gezeigt werden, dass diese Chondrozyten trotz ihrer präarthrotischen Veränderungen das Potential haben nach einer Kultivierungsphase als Grundlage für die (matrixassoziierte) autologe Knorpelzelltransplantation zu dienen. Dies könnte die Verwendung von Chondrozyten aus dem Kniegelenk für den Knorpelersatz bei femoroacetabulärem Impingement obsolet machen.

## 2. MATERIAL & METHODIK

### 2.1 Geräte und Reagenzien

#### 2.1.1 Technische Geräte

Biofuge fresco	Heraus (Hanau, Deutschland)
BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Cryocut 1800 Cryostat	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Hera freeze basic (-80°)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hera Safe HS12 (Laminar Flow)	Heraus (Hanau, Deutschland)
Inkubator Hera Cell	Heraus (Hanau, Deutschland)
Klimaschrank WTC	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlschrank Liebherr Premium Frost free	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)
Mikroskop Observer.Z1	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotom-Klinge S35	Feather (Osaka, Japan)
MS2 Minishaker	Ika Works Inc. (Staufen, Deutschland)
Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation (Dreieich, Deutschland)
Spectrophotometer NanoDrop 2000	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Assistant (Sondheim, Deutschland)
PCR Express	Thermo Hybaid (Ashford, England)
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Real Time PCR System StepOne plus	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Thermobecken SUB	Grant Instruments (Cambridge, England)

Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Waage Kern PEJ 220-3M	Kern (Balingen, Deutschland)
Zentrifuge Perfekt Spin	PeqLab (Erlangen, Deutschland)

## 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

### Immunhistochemie

Aceton 99,7%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
AEC + High sensitivity substrate chromogen ready to use	Dako (Hamburg, Deutschland)
Antibody Diluent with Background reducing components	Dako (Hamburg, Deutschland)
Aqua dest. Ecotainer	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Avidin-Biotin-Complex (ABC)	Vector (Burlingame, Kanada)
Brij L23 Solution	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ethanol 70%	Apotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Ethanol absolut 99,8%	Apotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol 99,9%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pepsin	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Protein Block, Serum free, Ready to use	Dako (Hamburg, Deutschland)
Saures Hämalaun nach Mayer 1l	Apotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)

Als primäre Antikörper wurden Kollagen 1, Kollagen 2 und Aggrecan verwendet. Die Negativkontrolle, zum Ausschluss einer unspezifischen Färbereaktion, erfolgte mit PBS, sowie der antikörperspezifischen Isotypkontrolle bei sonst identischem Färbeprotokoll.

### Primäre Antikörper:

Collagen Type I Polyclonal Antibody, Rabbit Verdünnung: 1:25 mit Antibody Diluent	Quartett (Berlin, Deutschland)
Collagen Type II Polyclonal Antibody, Rabbit Verdünnung: 1:25 mit Antibody Diluent	Quartett (Berlin, Deutschland)
Anti-Aggrecan Monoclonal Antibody (BC-3), Mouse / IgG1, kappa Verdünnung: 1:25 mit Antibody Diluent	Thermo Scientific (Rockford, USA)

### Sekundäre Antikörper:

Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) Verdünnung: 1:200 mit PBS	Vector (Burlingame, Kanada)
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L) Verdünnung: 1:200 mit PBS	Vector (Burlingame, Kanada)

### Isotyp-Kontrolle

Normal Rabbit IgG Verdünnung: 1:125 mit Antibody Diluent	PeptoTech Inc. (Rocky Hill, USA)
Control Mouse IgG Verdünnung: 1:125 mit Antibody Diluent	PeptoTech Inc. (Rocky Hill, USA)

### BrdU

BrdU-Kit	Roche (Mannheim, Deutschland)
----------	-------------------------------

### qRT-PCR

2-Propanol	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Chloroform (>99%)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ethanol absolut 99,8%	Apotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Quanti Tect Reverse Transcriptase Kit	Qiagen (Milden, Deutschland)
RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNase freeWater	Sigma (Steinheim, Deutschland)

TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (2x)	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
TaqMan Pre-Developed Assay Reagents Human GAPDH	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Trizol Reagent	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Collagenase A from Clostridium histolyticum	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dexamethasone	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's MEM (w 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w 4,5 g/L D-Glucose, w/o L-Glutamin, w/o Na Pyruvate)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
FBS Superior standardized	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Hepes-Buffer (1M)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
L-Ascorbic acid-2-phosphate	Sigma (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin 200mM low endotoxin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
L-Proline	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Media Supplement ITS+1	Sigma (Steinheim, Deutschland)
MEM-Vitamine (100x) w 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml 10.000ug/ml	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Sodium pyruvate	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Transforming growth factor $\beta$ 1	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> w/oMg <sup>2+</sup>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

	<b>Grundmedium</b>	<b>Medienzusätze</b>
<b>Medium I</b>	DMEM High Glucose	15% FCS 1% Glutamin 2% HEPES 1% MEM-Vitamine 1% Penicillin/Streptomycin
<b>Medium II</b>	DMEM High Glucose	Dexamethasone (100nM) 1% Glutamin 2% HEPES L-Ascorbic acid-2-phosphate (50µg/ml) L-Proline (40µg/ml) 0,01% Media Supplement ITS+1 1% Penicillin/Streptomycin Sodium pyruvate (100µg/ml) TGF-β1 (10ng/ml)
<b>Medium III</b>	DMEM High Glucose	1% Penicillin/Streptomycin 1% MEM-Vitamine 1% Glutamin 2% HEPES

**Tabelle 3: Zusammensetzung Zellkulturmedien**

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen BD Falcon (Franklin Lakes NJ, USA), B. Braun (Melsungen, Deutschland), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Deutschland), Sarsted (Newton, USA) und Sartorius stedim (Göttingen, Deutschland) erworben.

#### 2.1.4 Primer für die real-time-PCR

Alle Primer wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

<b>Primer</b>	<b>Gen</b>	<b>Gen-ID</b>	<b>Sequenz</b>
<i>Kol1</i>	COL1A1	NM_000088.3	5'-GCTGGCAGCCAGTTTGAATATAATG
<i>Kol2</i>	COL2A1	NM_033150.2	5'-TGGTCTTGGTGGAACTTTGCTGCC
<i>Kol10</i>	COL10A1	NM_000493.3	5'-ATAAAGAGTAAAGGTATAGCAGTAA
<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>	Sox9	NM_000346.3	5'-GAGCACTCGGGGCAATCCCAGGGCC
<i>runt-related transcription factor 2</i>	RUNX2	NM_001015051.3	5'-ACCAGATCACATACAGGATCATTGG

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primer**

### 2.1.5 Software

GraphPad Prism	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Excel	Microsoft (Redmond, USA)
StepOne Software v2.2.2	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Zeiss Axiovision	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)

## 2.2 Patienten und Knorpelmaterial

### 2.2.1. Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive, kontrollierte und nicht randomisierte Studie, welche monozentrisch im Zeitraum vom 04.08.2010 bis 11.09.2011 an einer Universitätsklinik durchgeführt wurde. Das verwendete Knorpelmaterial stammte von Patienten der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. v. Eisenhart-Rothe).

Anhand eines Aufnahmegesprächs sowie der präoperativ angefertigten Röntgen- bzw. MRT-Bildgebung wurden die Patienten auf das Vorliegen von Ausschlusskriterien überprüft, die im Folgenden gruppenspezifisch detailliert dargestellt werden. Patienten mit bekannten Infektionskrankheiten wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Gruppenübergreifend lag eine Einverständniserklärung der Patienten zur Teilnahme an der Studie vor. Das Mindestalter für die Teilnahme an der Studie betrug 11 Jahre, Patienten im Alter von >70 Jahren wurden nicht eingeschlossen. Bei minderjährigen Studienteilnehmern wurde zusätzlich die Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten eingeholt. Das Geschlecht spielte bei der Auswahl der Patienten keine Rolle.

#### 2.2.1.1 Impingementgruppe

Die Impingementgruppe wurde aus Patienten generiert bei denen klinisch sowie radiologisch ein femoroacetabuläres Impingement vom CAM-Typ nachgewiesen werden konnte. Als Ausschlusskriterien wurden eine manifeste Coxarthrose, eine Gelenkspaltverschmälerung <3mm sowie ein Knorpelschaden III° oder IV° n. Outerbridge (Outerbridge 1961) am femoralen Kopf-Hals-Übergang definiert. Alle Eingriffe bei Patienten mit femoroacetabulärem Impingement wurden arthroskopisch durchgeführt. Es erfolgte eine Rekonturierung des femoralen Kopf-Hals-Übergangs, hierbei erfolgte die Gewinnung des zu untersuchenden Knorpelmaterials.

### 2.2.1.2 gesunde Kontrollgruppe

In die gesunde Kontrollgruppe wurden Patienten aufgenommen, welche auf Grund einer Tumorerkrankung oder bei ausgedehnten Knochendefekten ein künstliches Hüft- bzw. Kniegelenk erhalten haben, ohne, dass die Gelenkfläche zerstört war. Radiologisch wurde präoperativ eine vorbestehende degenerative Erkrankung des Hüft- bzw. Kniegelenks ausgeschlossen. Die Knorpelproben wurden nach intraoperativer Darstellung des Tibiaplateaus bzw. des Femurkopfes aus einem makroskopisch unversehrten Teilbereich des hyalinen Knorpelüberzugs entnommen.

### 2.2.1.3 arthrotische Kontrollgruppe

Eingeschlossen in die arthrotische Kontrollgruppe wurden Patienten, denen auf Grund einer Coxarthrose mit weitgehend erhaltener Gelenkfläche (Arthrosegrad nach Tönnis 1 und 2) ein künstliches Hüftgelenk implantiert wurde. Als Ausschlusskriterium wurde eine fortgeschrittene Arthrose (Arthrosegrad nach Tönnis 3) definiert. Die Probenentnahme erfolgte in Arealen des Femurkopfes, die bei bereits vorliegenden arthrotischen Veränderungen makroskopisch möglichst wenig degenerierten, hyalinen Knorpelüberzug zeigten.

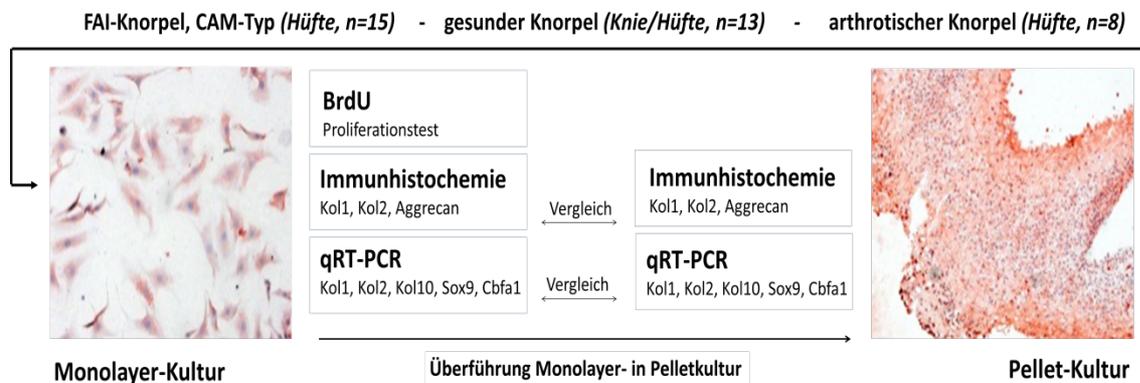


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Studienablaufs

### 2.2.2 Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation (Mankin-Score)

Unmittelbar nach der operativen Gewinnung des chondrozytären Donormaterials wurde dieses in ein steriles Gefäß überführt, mit Kulturmedium I versetzt und unverzüglich weiterverarbeitet. Die Knorpelproben wurden nach Entnahme in zwei größengleiche Anteile geteilt. Eine Teilprobe wurde in die pathologische Abteilung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Heinz Höfler) übersandt. Hier erfolgte die histologische

Beurteilung der entnommenen Probe mittels Mankin-Score (Mankin 1971). Diese histologische Einteilung wurde, zusammen mit der Beurteilung der Röntgenbilder durch einen Kliniker, als Grundlage der Gruppeneinteilung herangezogen.

Die angefertigten, histologischen Schnitte wurden nach vier Gesichtspunkten beurteilt: Struktur, Zellverteilung- und Dichte, Anfärbbarkeit durch Safranin-O sowie Intaktheit der Knorpel-Knochen-Grenze (Tide-Mark). Die bei der Beurteilung vergebenen Punktwerte wurden addiert, der Maximalwert betrug 14 Punkte. Werte  $\leq 3$  entsprechen einem gesunden, nicht arthrotisch veränderten Knorpel, Punktwerte  $>3$  entsprechen einer degenerativen Veränderung des Knorpelgewebes (Mankin 1971).

Struktur	Normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus, Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in die Übergangszone	3
	Risse bis in die Radiärzone	4
	Risse bis in die kalzifizierte Zone	5
	Komplette Desorganisation	6
Chondrozyten	Normal	0
	Diffuse Hyperzellularität	1
	Zellklone	2
	Hyperzellularität	3
Safranin-O-Färbung	Normal	0
	Leicht Reduktion	1
	Mäßige Reduktion	2
	Starke Reduktion	3
	Keine Färbung nachweisbar	4
Tidemark	Intakt	0
	Von Blutgefäßen durchzogen	1

**Tabelle 5: Mankin-Score Klassifikation**

### 2.2.3 Ethikerklärung

Eine Patienteneinverständniserklärung wurde von den jeweiligen Patienten vor der Operation eingeholt (s. Anhang). Durch die Ethikkommission wurden die Versuche mit humanem Gewebe genehmigt. Die Studie wurde nach den Kriterien der Good Clinical Practice durchgeführt.

## 2.3 Zellkulturtechniken

### 2.3.1 Chondrozytenisolierung

Alle aufgeführten Schritte zur Verarbeitung der Knorpelproben wurden unter sterilen Bedingungen unter Laminar-Air-Flow durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte bei 37°C, 95%

Luftfeuchtigkeit und einem 5% CO<sub>2</sub>-Luftgemisch in Begasungsbrutschränken. Das Nassgewicht des Knorpelmaterials wurde ermittelt, anschließend erfolgte die Überführung in eine mit Medium I versetzte Zellkulturschale. Die Probe wurde zentrifugiert (RT, 350g, 5min), mit PBS gewaschen und anschließend wiederum zentrifugiert (RT, 350g, 5min), um mögliche Rückstände zu entfernen. Die Knorpelstücke wurden in einer Kulturschale mit 10 ml PBS versetzt, mit dem Skalpell mechanisch in 1mm x 1mm große Stücke zerkleinert und in ein mit 10 ml Trypsin gefülltes Röhrchen überführt. Die durch Trypsin eingeleitete Andauung des Knorpels erfolgte auf einem Heizschüttler (37°C, 30 min). Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 10 ml Kulturmedium I zugegeben, die Probe zentrifugiert (RT, 120g, 5 min) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 10 ml Collagenase-Lösung (15mg Collagenase A gelöst in 10ml Medium I, mit 0,2 µl-Filter steril filtriert) wurde die Chondrozytenisolation auf einem Heizschüttler (37°C, 18h) gestartet. Als Zeitindikator diente der vollständige Verdau der Knorpelstücke. Nach anschließender Zentrifugation (RT, 120g, 3min) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml Medium I gelöst, in eine 25cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt und im Zellinkubator gelagert.

### **2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität**

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl bestimmt sowie durch den Trypanblau-Exklusionstest die Vitalität der Zellen überprüft werden. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, während tote Zellen ihn aufnehmen und sich blau anfärben. Es wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau versetzt. 10 µl des Zellsuspension-Trypanblau-Gemisches wurden auf eine Neubauer-Zählkammer (0,1 mm tief, 0,0025 mm<sup>2</sup>) aufgetragen. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die äußeren vier der neun Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl pro ml konnte anschließend nach folgender Formel berechnet werden.

$$ZZ = GZ : 4 \times 10^4 \times VD$$

ZZ = Zellzahl/ml

GZ = gezählte Zellen

10<sup>4</sup> = Kammerfaktor

VD = Verdünnungsfaktor

### **2.3.3 Kultivierungsbedingungen in der Zellkultur**

#### **2.3.3.1 Monolayerkultur**

Die Aussaat der Monolayerkulturen erfolgte mit einer Zelldichte von 5000/cm<sup>2</sup> in belüfteten Kulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte regelmäßig, alle drei Tage. Bei 80%-iger Konfluenz der Zellen wurden diese subkultiviert und mit der oben beschriebenen Zelldichte unter Zugabe von Medium I auf eine größere

Wachstumsfläche verteilt (s. Tab. 6). Nach vollständiger Abnahme des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 min mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) im Brutschrank inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch die Zugabe der äquivalenten Menge an Medium I. Durch Zentrifugation (RT, 350g, 10 min) erfolgte eine Pelletierung der Zellen. Dieses Pellet konnte in Medium I resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät werden. Bis zum Erreichen der Zellzahl von  $10 \times 10^6$  wurden diese Arbeitsschritte wiederholt.

Wachstumsfläche der Zellkulturflasche	Medium (ml)
25 cm <sup>2</sup>	5
75 cm <sup>2</sup>	10
175 cm <sup>2</sup>	20

**Tabelle 6: Wachstumsbedingungen in Monolayer**

Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Chondrozyten zu gleichen Anteilen für die Weiterverwendung in der immunhistochemischen Analyse sowie in der qRT-PCR Nukleinsäureanalytik aufbereitet.

### 2.3.3.2 Pelletkultur

Im Anschluss an die Kultivierung in Monolayer wurden die Zellen beim Erreichen der Zielzellzahl von 10 Millionen von den Kulturflaschen abgelöst und in eine Pelletkultur überführt. Die Chondrozyten wurden zu je 1,5 Millionen Zellen auf 15 ml-Röhrchen verteilt. Durch Zentrifugation (RT, 250g, 5 Min) erfolgte die Bildung eines Zellpellets. Das generierte Pellet wurde mit Medium II versetzt. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte modifiziert nach Johnstone et al. regelmäßig in Abständen von drei Tagen für eine Gesamtkultivierungsdauer von 21 Tagen (Johnstone 1998).

Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Pellets zu gleichen Anteilen für die Weiterverwendung in der immunhistochemischen Analyse sowie in der qRT-PCR Nukleinsäureanalytik aufbereitet.

### 2.3.6 Kryokonservierung

Nach Abschluss der Monolayerkultur wurden überzählige Chondrozyten temporär in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt. Ziel war es durch ein schonendes Einfrier- und Auftauverfahren die Proliferationsfähigkeit der Chondrozyten zu erhalten. Zum Einfrieren vorgesehene Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (RT, 350g, 10 min). Nach Abnahme des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in äquivalenter Menge Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um die Zellen langsam auf die, für die Langzeitaufbewahrung benötigte Lagerung in Stickstoff

vorzubereiten, wurden sie in einem Isopropanol-isolierten Behälter über Nacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Im Anschluss konnten sie in den Stickstofftank überführt werden. Beim Auftauen erfolgte ein rasches Erwärmen der Kryoröhrchen im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Medium I resuspendiert, zentrifugiert (RT, 350g, 10 min) und nach Abnahme des Überstands unter Zugabe von frischem Medium I in eine Zellkulturflasche überführt.

## 2.4 Proliferationsanalyse

### 2.4.1 Population Doubling Time (PDT)

Zur vergleichenden Bestimmung der Wachstumskinetik erfolgte die Auswertung der Population Doubling Time (PDT). Die PDT beschreibt die Zeit, die in Kultur befindliche Zellen zur Verdopplung ihrer Ausgangszellzahl benötigen. Erfasst wurden die Zellzahl nach Isolierung der Chondrozyten aus nativem Knorpel sowie die Zellzahl zu Abschluss der Monolayerkultivierung. Die Verdopplungszeit wurde in Tagen angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PDT} = t \times (\log 2 / \log (N - N_0))$$

$N_0$  = Ausgangszellzahl

$N$  = Zellzahl nach der Zeit  $t$

$t$  = Zeitraum zwischen den Zellzählungen

### 2.4.2 BrdU-Elisa

Für die quantitative Messung der Zellproliferation wurde ein BrdU-Elisa angewandt. Befinden sich Zellen in Proliferation wird das Thymidin-Analogon 5-Brom-2-desoxyuridin in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Hier kann es durch einen monoklonalen anti-BrdU-Antikörper aus Maus-Maus-Hybridzellen erkannt werden. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase führt zur Umsetzung des Substrats ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiatolin-6-sulfonsäure) in einen grünen Farbstoff, dessen Extinktion mittels eines Photometers gemessen werden kann. Die Extinktion ist ein Maß für die Zellproliferation der untersuchten Zellen, da sie proportional zum Substratumsatz ansteigt. Dieser hängt wiederum von der Zahl der eingegangenen BrdU-anti-BrdU-Antikörperbindungen ab (Porstmann 1992, Porstmann 1985).

Die für den Versuchsansatz verwendeten Chondrozyten wurden nach erfolgter Kryokonservierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zeitgleich aufgetaut. Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte an Tag 3 und 6. Im Anschluss wurden diese mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Medium I versetzt und auf einer Multiwell-Platte ausgesät (10.000 Zellen/well,  $n=3$ ). Die Gesamtkultivierungsdauer betrug drei

Tage. Nach 48 h Kultivierung wurde das Medium abgenommen und durch je 100 µl Medium III ersetzt, um die Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. Nach weiteren 24 h wurden alle Wells mit einer 100 µM BrdU-Lösung versetzt. Dieses sog. Labeling der Zellen wurde nach 18 h durch Abnahme des Mediums beendet und die Zellen mit je 200 µl FixDenat, 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurde die Anti-BrdU-POD-Lösung (0,15 U/ml; 100 µl/Well) zugegeben und die Zellen für 90 Minuten inkubiert. ABTS als Substrat wurde nach Waschen (3x) der Wells mit je 200 µl PBS zugegeben und die Extinktion über eine halbe Stunde, alle 5 Minuten mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 490 nm sowie gegen einen Leerwert gemessen.

## **2.5 Immunhistochemische Analyse**

Mittels Immunhistochemie erfolgte der Nachweis von charakteristischen Proteinen, die durch die Chondrozyten während der Kultivierung in Monolayer- sowie Pelletkultur exprimiert wurden.

Das Prinzip beruht auf der Visualisierung der Bindung eines primären Antikörpers, der spezifisch an das gewünschte Antigen angelagert wird. Dies geschieht durch einen gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper, der an ein Detektionssystem gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Visualisierung durch die Detektion mittels ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) erreicht. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Biotin reagierte mit einem zugegebenen Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Der Farbumschlag nach rot erfolgte durch das Enzym Meerrettichperoxidase, welches das zugegebene Chromogen 3-Amino-9-ethylcabazol (AEC) zu einem löslichen Farbstoff umsetzen kann (Guesdon 1979). Die immunhistochemische Färbung in Monolayer- und Pelletkultur erfolgte nach einem äquivalenten Protokoll. Alle Versuchsschritte wurden in einer sog. „feuchten Kammer“ durchgeführt.

Verwendet wurden aufbereitete Chondrozyten der Monolayer- sowie Pelletkultur. Die Chondrozyten der Monolayerkultur wurden nach Abschluss der Kultivierung auf vierkammerige Culture Slides (70.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) aufgetragen, 96 h im Brutschrank kultiviert und im Anschluss durch PFA (4%) fixiert, um den Erhalt der Zellstruktur zu gewährleisten. Für die immunhistochemische Analyse der Chondrozyten in Pelletkultur wurden diese in Kryomedium eingebettet. Durch Schneiden der Pellets am Cryocut konnten Gefrierschnitte in 7 µm-Dicke erzeugt werden, die auf Objektträger aufgebracht, über Nacht luftgetrocknet und anschließend

durch ein PFA(4%)-Bad fixiert (10 min) wurden. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte sowohl nach Monolayer- sowie nach Pelletkultur bei -20°C.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur gelagert und 15 min in der Pufferlösung PBS rehydriert. Eine Andauung durch Pepsin (0,1 % Pepsin in 0,5 M HCl, 40 min, 37°C) mit anschließender Spülung durch PBS ist nötig, um eine Färbung durch den Antikörper zu ermöglichen.

Ungewollte, unspezifische Färbungen können durch ionische Anlagerung von Primär- und Sekundärantikörpern an stark geladene Proteine entstehen. Verhindert wird dies durch eine 15 minütige Inkubation mit einem Protein-Block. Anschließend konnte das Antikörperreagenz in der jeweiligen Arbeitskonzentration aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Die Spülung nach jedem der folgenden Arbeitsschritte wurde mit PBS-Brij-Lösung (500 ml PBS+200 µl Brij) durchgeführt. In aufeinanderfolgenden Schritten wurden der sekundäre Antikörper (RT, 30 min), ABC-Reagenz (RT, 30 min) und final, um den Farbumschlag zu erzeugen, AEC-Reagenz (RT, 7 min) aufgetragen. Nach Zugabe des AEC-Reagenz erfolgte die Beurteilung des Farbumschlags durch ein Lichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Um die Farbreaktion zu stoppen wurde der Objektträger mit PBS gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte durch Mayer's Hämalaun (3 min). Die Fixierung der Färbung konnte durch Verschluss mittels Deckglas, gebunden durch Glycerin-Gelatine (Kaisers Glycerol) erreicht werden.

### 2.5.3 Bewertungsskala

Die Expression der Proteine wurde mittels Farbumschlag nach rot detektiert. Die Grundlage der semiquantitativen Bewertung der IHC bildete ein Bewertungssystem, das die unterschiedlichen Intensitäten des Farbumschlags abbildet. Die Bewertungsskala wurde in Anlehnung an den immunreaktiven Score, der primär zur Bewertung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen verwendet wird, erstellt (Thomas 2005).

<b>Expressionslevel</b>	<b>Bedeutung</b>
0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	mäßige Färbung
3	starke Färbung
4	sehr starke Färbung

**Tabelle 7: Bewertungsskala IHC**

Die Bewertung der Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Bei identischer Einstellung der Belichtungsoptionen wurden pro Färbung und Patient je fünf repräsentative Ausschnitte des Objektträgers bewertet. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung anhand des beschriebenen Scores. Die fünf Einzelbewertungen wurden zu einem arithmetischen Mittel zusammengefasst. Eine Auswertung der Gewebeproben fand nur statt, wenn die negative Kontrolle (Isotyp, PBS) keine Färbung aufwies.

## **2.6 qRT-PCR Nukleinsäureanalytik**

### **2.6.1 RNA-Isolierung aus Kulturzellen**

Die Trizol-Standardmethode zur Extraktion zytoplasmatischer Ribonukleinsäure (RNA) aus Kulturzellen basiert auf dem Prinzip der sauren Guinidinisothonioyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski 1987). Das Reagenz führt zur Lyse der Zellwände und -membranen, wobei die RNA intakt bleibt. Durch die Trizol-Methode kann somit Gesamt-RNA extrahiert werden. Als Ausgangsmaterial dienten Chondrozyten aus Monolayer- sowie Pelletkultur. Für die Nukleinsäureanalytik wurden die Zellen zur Extraktion der RNA in Trizol gelöst.

Die Chondrozyten der Monolayerkultur wurden für den Zeitraum von 5-7 Tagen auf einer 6-Wellplatte kultiviert bis sie konfluentes Wachstum zeigten. Nach Abnahme des Kulturmediums I erfolgte die Zugabe von Trizol-Reagent (je 1 ml/well, RT, 2 min). Die Chondrozyten der Pelletkultur wurden nach Abnahme des Kulturmediums II ebenfalls in Trizol<sup>®</sup> Reagent überführt (1 ml). Um eine Zerkleinerung der Pellets zu erreichen wurden diese über einen Zeitraum von 30 Sekunden mit einem Homogenisator behandelt. Durch den Einsatz von Ultraschallwellen konnte eine optisch homogene Zell-Trizol-Suspension hergestellt werden. Um eine Überhitzung zu verhindern wurden alle beschriebenen Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform sowie anschließender Zentrifugation (RT, 10.500g, 15 min) erfolgte die Auftrennung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase. Diese wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl 99,8% Isopropyl-Alkohol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation (RT, 10.500g, 10 min) war das RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar und wurde mit 75% Ethanol gewaschen (3x). Nach Zentrifugation bei 7500 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Sämtliche aufgeführten Arbeiten wurden mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde im

gelösten Zustand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert oder direkt zur reversen Transkription weiterverwendet.

### 2.6.2 Qualitätskontrolle

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte mittels NanoDrop (PeqLab, Erlangen, Deutschland). Für die Messung wurde  $1\ \mu\text{l}$  extrahierte, in RNase-freiem Wasser gelöste RNA auf das Gerät aufgetragen. Als Blank diente das als Lösungsmittel verwendete RNase-freie Wasser. Die Konzentration konnte durch Absorptionsmessung (Wellenlänge  $260\ \text{nm}$ ) bestimmt werden. Der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  wurde als Maß für die Reinheit der extrahierten RNA angesehen. Um eine Verunreinigung der Proben auszuschließen sollte der Quotient für reine RNA einen Wert  $>1,7$  erreichen. Zur weiteren Anwendung in der Nukleinsäureanalytik kamen nur Proben, die über dem geforderten Zielwert lagen.

### 2.6.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Amplifikation der RNA in der Polymerasekettenreaktion musste diese in cDNA (complementary DNA), einen Einzelstrang, umgeschrieben werden. Dieser als reverse Transkription bekannte Vorgang, wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Qiagen Kit durchgeführt. Zur Entfernung der genomischen DNA wurde die RNA zuerst mit gDNA Wipeout Buffer und RNase-freiem Wasser versetzt, inkubiert ( $2\ \text{min}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$ ) und anschließend auf Eis gelagert.

Ein Reaktionsansatz entspricht  $1\ \mu\text{g}$  RNA und enthielt laut Protokoll:

gDNA Wipeout Buffer, 7x	$2\ \mu\text{l}$
RNA	$6\ \mu\text{l}$
RNase freies Wasser	$6\ \mu\text{l}$
<hr/>	
Gesamtvolumen	$14\ \mu\text{l}$

Der gereinigten RNA wurde ein Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Inkubation ( $15\ \text{min}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$ ) gestartet und durch abschließendes Erhitzen ( $3\ \text{min}$ ,  $95^{\circ}\text{C}$ ) gestoppt.

Der Mastermix für einen Reaktionsansatz erhielt laut Protokoll:

Quantiscript Reverse Transcriptase	$1,1\ \mu\text{l}$
Quantiscript RT Buffer, 5x	$4,4\ \mu\text{l}$
RT Primer Mix	$1,1\ \mu\text{l}$
<hr/>	
Gesamtvolumen	$6,6\ \mu\text{l}$

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

#### 2.6.4 Erstellen eines Zellpools

Aus den cDNA-Proben der gesunden Kontrollgruppe (Mankin-Score  $\leq 3$ ) wurde ein Zellpool gebildet. Dieser setzte sich aus acht Patienten im unten angegebenen Verhältnis zusammen. Die cDNA wurde unter sterilen Bedingungen vermischt und zur Zwischenlagerung bei -80°C aufbewahrt.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Poolanteil	13 %	11,7 %	11,7 %	13 %	14,2 %	11,7 %	11,7 %	13 %

**Tabelle 8: Zellpool gesund für qRT-PCR**

#### 2.6.5 Polymerasekettenreaktion

##### 2.6.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (Saiki 1985). Die gewünschte DNA-Matrix wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt. Hierfür werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotidprimer benötigt, welche homolog zu den Enden der DNA-Matrix sind. Die Reaktion verläuft daraufhin in drei Schritten:

- *Denaturierung*: Erhitzen auf 94-96°C, Auftrennung und Denaturierung der Doppelstrang-DNA
- *Primerhybridisierung*: spezifische Anlagerung der Primer an die homologe Einzelstrang-DNA
- *Elongation*: DNA-Polymerase ergänzt durch Primeranlagerung DNA zum Doppelstrang

Die neu synthetisierten DNA-Fragmente dienen im nächsten Zyklus wiederum als Matrix für Primer. Somit ist eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments möglich. Ein vollständiger PCR-Prozess besteht aus 12-50 Zyklen.

##### 2.6.5.2 Quantitative real-time-PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) basiert auf dem Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion. Zusätzlich ermöglicht sie die Quantifizierung der in der PCR entstandenen DNA-Fragmente. Die aus Chondrozyten isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR eingesetzt.

Die Quantifizierung wird durch Hydrolyse-Sonden ermöglicht, welche an einem Ende mit einem Quencher sowie am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert waren. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wurde die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs am 5'-Ende abgebaut, Quencher und Reporter entfernten sich voneinander und es konnte ein verstärktes Fluoreszenz-Signal des Reporters gemessen werden. Die Messung fand am Ende jedes Elongations-Zyklus statt und wurde mit dem jeweiligen Amplifikationszyklus abgeglichen. Zur Quantifizierung der Expression des gesuchten Gens, wurden die Kopien im Verhältnis zu den Transkripten eines Referenzgens betrachtet. Als Referenzgene, sog. Housekeeping-Gene, wurden ubiquitär verbreitete, konstitutiv exprimierte Gene verwendet, die nicht durch die Versuchskonditionen beeinflussbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Das Enzym der Glykolyse ist in einem Zwischenschritt der Gesamtreaktion für die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) zuständig, einem unentbehrlichen Bestandteil des Stoffwechsels.

Das Mastermix-Reaktionsgemisch wurde pro Well mit 2 µl cDNA versetzt und in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach gründlicher Vermengung erfolgte die Amplifikation. Für die real-time PCR wurde das Real Time PCR System StepOne plus von Applied Biosystems verwendet. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen.

Ein Reaktionsansatz Mastermix enthielt laut Protokoll:

TaqMan Primer	1 µl
TaqMan Fast Universal Mastermix	10 µl
Nucleasefreies Wasser	7 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	18 µl

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung dieser Arbeit erfolgten mit der Software GraphPad Prism (GraphPadSoftware, Inc.; La Jolla, USA; Version 5.02).

Die angegebenen Werte der Experimente wurden als Einzelwerte in Kombination mit arithmetischem Mittel oder Median dargestellt, wobei die Streuung als Standardabweichung (standard deviation, SD) abgebildet ist. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte bei einer ausreichend großen Stichprobe ( $n \geq 4$ ) mit dem Mann-Whitney-Test für ungepaarte Stichproben. Eine Bewertung der Korrelation zweier Variablen erfolgte mittels

Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Statistische Signifikanz wurde angenommen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$  und mit den Markierungen \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientengut-Analyse

In das zu untersuchende Patientenkollektiv wurden Patienten mit der Diagnose des femoroacetabulären Impingements vom CAM-Typ aufgenommen. Zur qualitativen Einordnung der Impingement-Chondrozyten wurden ein gesundes sowie ein arthrotisches Vergleichskollektiv kreiert. Das Nassgewichts des geernteten Knorpels betrug  $139 \pm 30 \mu\text{g}$  (Range: 97 -262).

In die FAI-Gruppe konnten 15 Patienten (3 weiblich, 12 männlich) im Alter von  $30,9 \pm 9,3$  Jahren (Range: 17–46) eingeschlossen werden. Das gesunde Vergleichskollektiv bildeten 12 Patienten (6 weiblich, 6 männlich) im Alter von  $40,7 \pm 20,0$  Jahren (Range: 11-70). 9 Patienten wurde gesunder, hyaliner Knorpel des Femurkopfes, 3 Patienten gesunder, hyaliner Knorpel des Tibiaplateaus entnommen. Das arthrotische Vergleichskollektiv bildeten 8 Patienten (6 weiblich, 2 männlich) im Alter von  $53,3 \pm 9,7$  (Range: 45-74). Im Rahmen einer Hüft-TEP-Implantation wurde Knorpel des explantierten Femurkopfes entnommen. Ein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung bestand zwischen Impingementgruppe und arthrotischem Vergleichskollektiv ( $p=0,0003$ ).

Kollektiv	Patientenanzahl (n)
Femoroacetabuläres Impingement (CAM-Typ)	15
gesunder Knorpel des Hüftgelenks	9
gesunder Knorpel des Kniegelenks	3
arthrotischer Knorpel des Hüftgelenks	8

**Tabelle 9: Darstellung des Patientenkollektivs**

An Hand der Diagnose sowie der Klassifizierung durch den Mankin-Score erfolgte die Einteilung der Patienten in Untergruppen. Ein Mankin-Score  $>3$  wurde bei der Einteilung in die Vergleichskollektive als arthrotisch gewertet.

#### 3.2 Mankin-Score

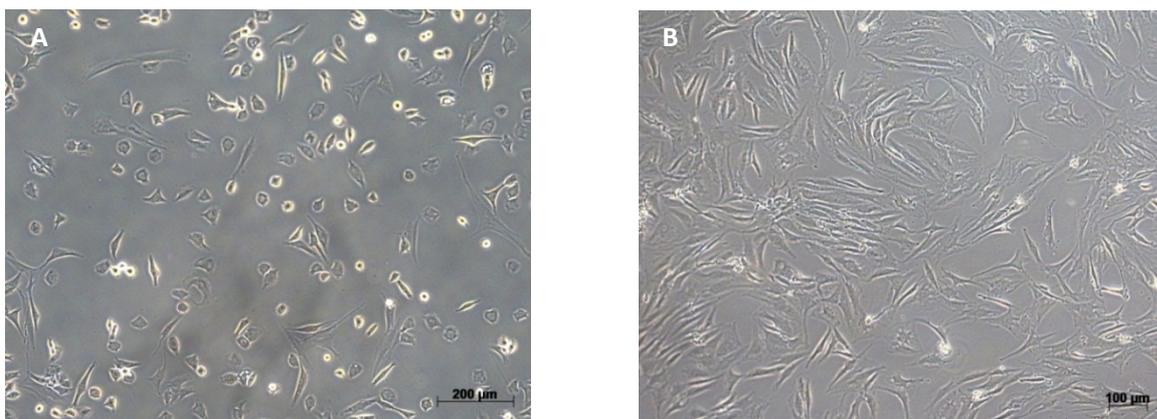
Die Patientenproben wurden zur histologischen Beurteilung in die pathologische Abteilung des Klinikums rechts der Isar München (Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler) übersandt. Der erhobene Mankin-Score wurde neben der klinisch gestellten Diagnose als zusätzlicher Faktor zur exakten



Passage  $5,7 \pm 1,4$  (Range: 4 – 9) sowie im gesunden und arthrotischen Vergleichskollektiv bis Passage  $4,8 \pm 1,7$  (Range: 2 – 7) und  $6,9 \pm 2,0$  (Range: 5 – 10) statt. Diese erfolgte bei 80%-iger Konfluenz der Zellen, in der Regel nach 5-7 Tagen.

Nach Isolierung der Chondrozyten aus dem nativen Knorpelgewebe zeigten die Zellen ein adhärentes Wachstum auf der Kulturflasche. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer setzte eine Veränderung des Phänotyps ein. Das zu Beginn rundliche Erscheinungsbild der Zellen war nach ca. 48h nur noch vereinzelt nachweisbar. Es erfolgte die Ausbildung eines fibroblastenartigen Phänotyps mit länglicher Morphologie der Zellen sowie die Generierung multipler Zellausläufer. Während der weiteren Kultivierung behielten die Zellen diesen Differenzierungszustand bei, der nach ca. 7 Tagen vollständig eingetreten war.

Im Anschluss an die Monolayerkultur wurden die Zellen in Pelletkultur überführt. Innerhalb des Kultivierungszeitraums von 21 Tagen bildete sich ein stabiles Zellpellet, dessen Morphologie einer abgeflachten Kugel entsprach. Im gesamten Versuchszeitraum traten keine Kontaminierungen mit Bakterien oder Pilzen auf.



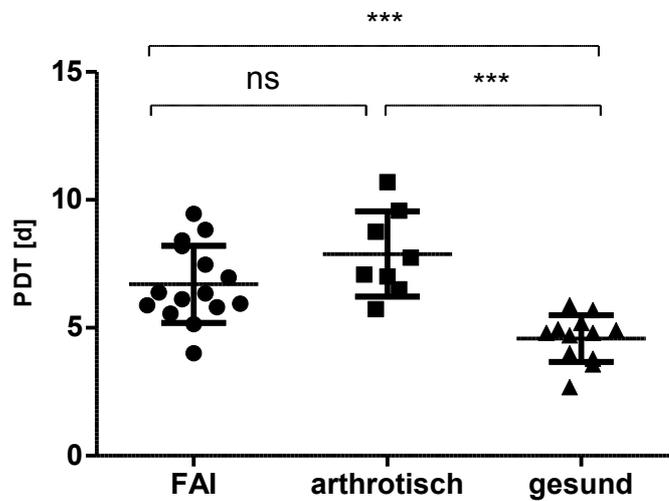
**Abbildung 7: FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur**

Isolierung von Chondrozyten aus nativem Knorpel, gewonnen bei operativer Versorgung des femoroacetabulären Impingements. Unter Zugabe von Medium I Überführung der Chondrozyten in Monolayerkultur. (A) Chondrozyten in Passage 0, 48h nach Isolierung aus nativem Knorpel. Größtenteils lag ein rundlicher Phänotyp vor, z.T. beginnende Dedifferenzierung bei Verlust der chondrozytenspezifischen Morphologie (B) Chondrozyten in Passage 4. Die Dedifferenzierung der Chondrozyten führte zu einer Entrundung der Zellen mit fibroblastischem Phänotyp.

### 3.4 Proliferationsverhalten der Impingementzellen

Zur Objektivierung der Proliferationsfähigkeit erfolgte die Bestimmung der Population Doubling Time (PDT). Nach Abschluss der Monolayerkultur zeigte sich eine vergleichbare PDT für Impingementgruppe ( $6,7 \pm 1,5d$ , Range: 4,0 – 9,5 d) und arthrotisches Vergleichskollektiv ( $7,9 \pm$

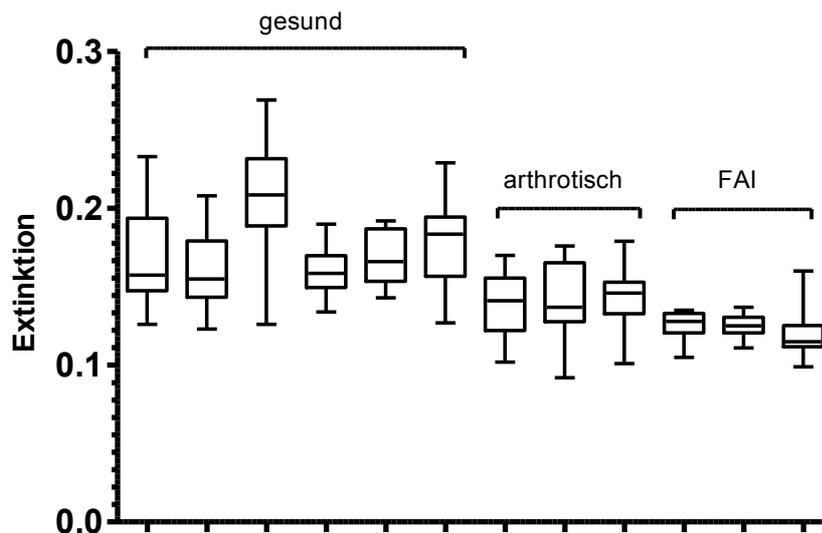
1,7d, Range: 5,7 – 10,7). Im Vergleich hierzu konnte für das gesunde Vergleichskollektiv ( $4,6 \pm 0,9$ d, Range: 2,7 – 5,9) eine signifikant verringerte PDT beobachtet werden.



**Abbildung 8: Beurteilung des Proliferationsverhaltens mittels Population Doubling Time**

Isolierung von Chondrozyten aus nativem Knorpel. Kultur in Monolayer bis Zellzahl  $10 \times 10^6$ . Anschließend Bestimmung der Population Doubling Time ausgehend von Zellzahl zu Beginn sowie Abschluss der Monolayerkultur. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von Chondrozyten der FAI-Gruppe ( $n=15$ ) sowie des gesunden ( $n=12$ ) und arthrotischen Vergleichskollektivs ( $n=8$ ).

Durch einen erhöhten Einbau des Thymidin-Analogons BrdU in die neu gebildete DNA ließen sich Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen innerhalb eines definierten Versuchszeitraums ziehen. Die Quantifizierung der Extinktion BrdU-markierter Chondrozyten nach 72h Kultivierung in Monolayer ergab lediglich eine tendenziell erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit des gesunden Vergleichskollektivs gegenüber der FAI-Gruppe sowie dem arthrotischen Vergleichskollektiv. Auf Grund der geringen Stichprobengrößen konnten keine Signifikanzen berechnet werden.



**Abbildung 4: Bestimmung des Proliferationsverhaltens mittels BrdU-Test**

Beurteilung des Proliferationsverhaltens von Patienten der FAI-Gruppe (n=3) im Vergleich zu einer gesunden (n=6) sowie arthrotischen (n=3) Kontrollgruppe 72h nach Zugabe des Thymidin-Analogons BrdU zum Kulturmedium. Dargestellt sind die Extinktionswerte einer Dreifachbestimmung als Boxplot. Die Antennen zeigen Minimal- und Maximalwerte der Messung auf.

### 3.5 Immunhistochemische Analyse der Expression chondrozytärer Differenzierungsmarker

Der Versuchsaufbau ermöglichte einen Vergleich der Proteinexpression der angewandten Kultivierungsverfahren. Der Nachweis erfolgte durch den Einsatz polyklonaler Antikörper gegen Kollagen 1 (Kol1), Kollagen 2 (Kol2) und Aggrecan (Agg). Dieser wurde jeweils über einen sekundären Antikörper an einen roten Farbstoff gekoppelt und induzierte somit eine sichtbare Farbreaktion. Der Nachweis von Kollagen 2 ist knorpelspezifisch. In gesundem, hyalinem Knorpel wird es konstant exprimiert. Aggrecan spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung der extrazellulären Matrix (EZM) sowie der Übertragung von intraartikulären Druck- und Scherkräften. In zahlreichen Studien werden Kollagen 2 und Aggrecan als Marker für eine effektive, qualitativ hochwertige *in vitro* Proliferation verwendet. Eine erhöhte Kol1- Expression kann hingegen als Zeichen einer beginnenden Dedifferenzierung gewertet werden (Martel-Pelletier 2008).

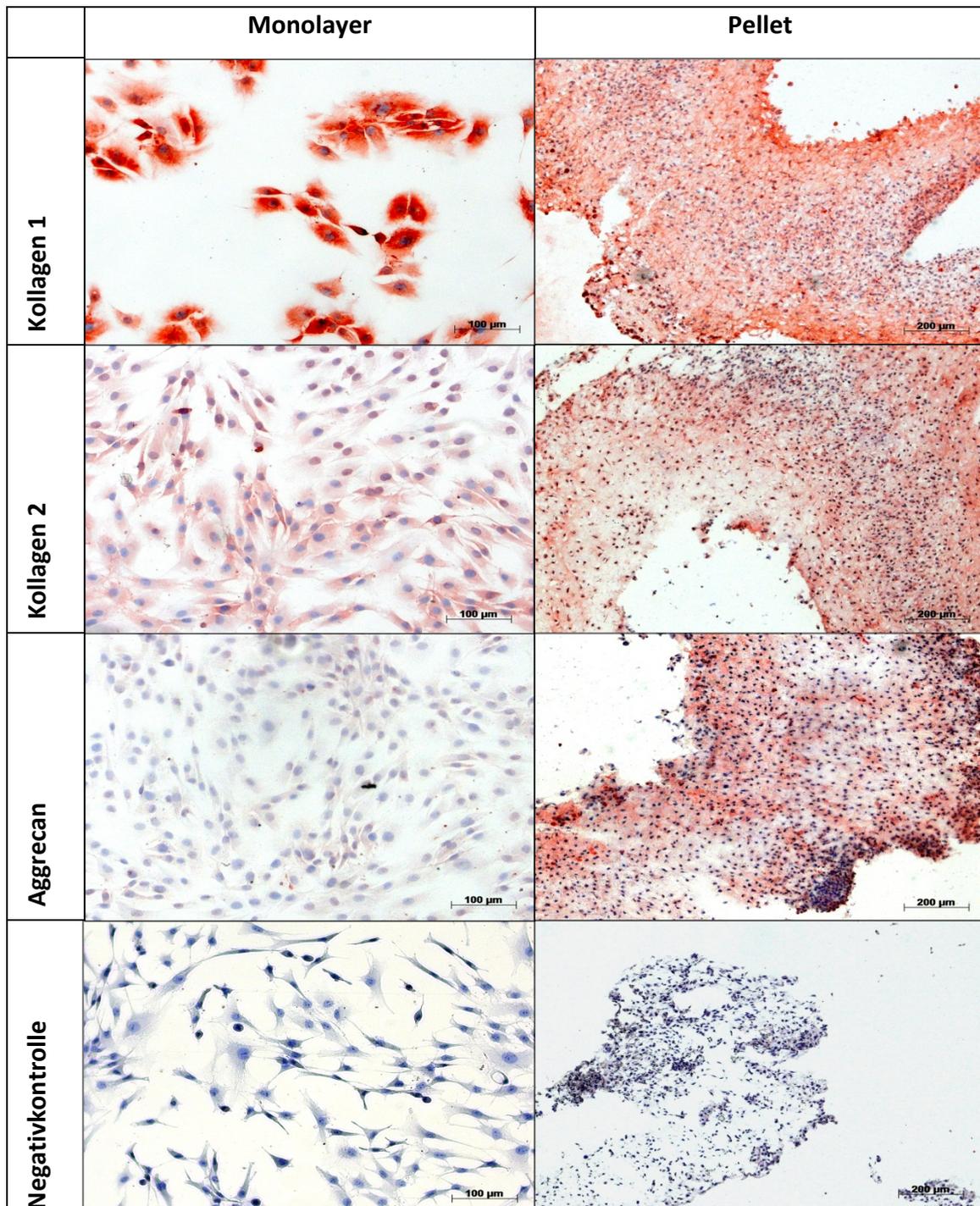
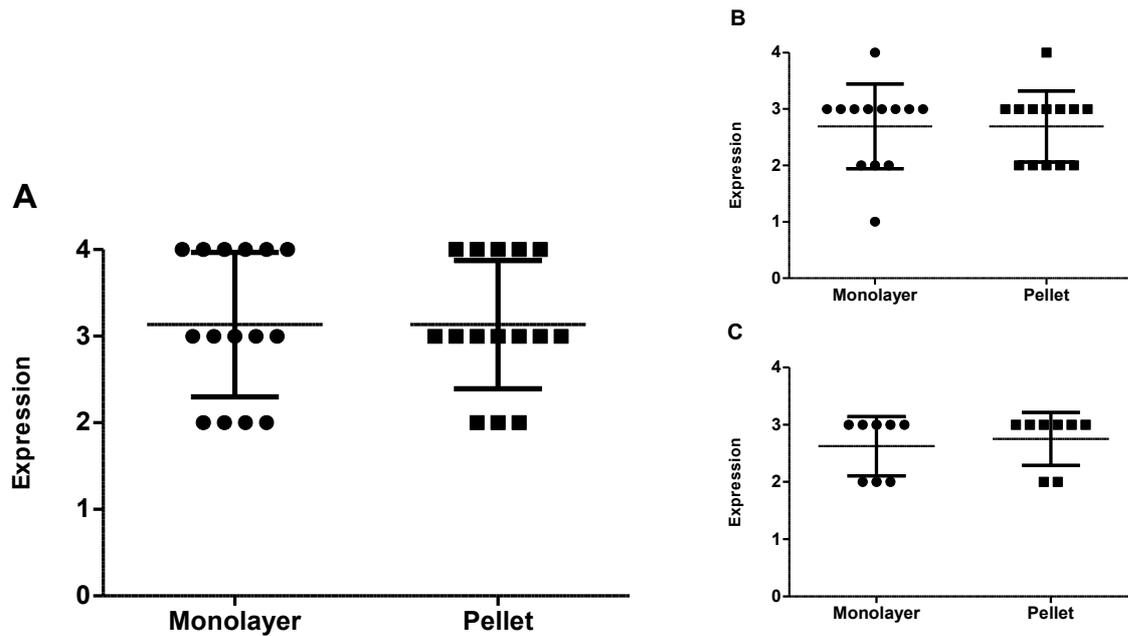


Tabelle 10: Immunhistochemie FAI

### 3.5.1 Kollagen 1

In der immunhistochemischen Färbung konnte gruppenübergreifend eine starke Kol1-Expression nach abgeschlossener Monolayerkultur detektiert werden. Weiterhin zeigte sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Expressionsunterschied nach Überführung in Pelletkultur. Zwischen Impingementgruppe, gesundem wie auch arthrotischem Kollektiv konnte ebenso kein signifikanter Unterschied bei Vergleich der Kol1-Expressionen in Monolayer- sowie Pelletkulturen festgestellt werden.



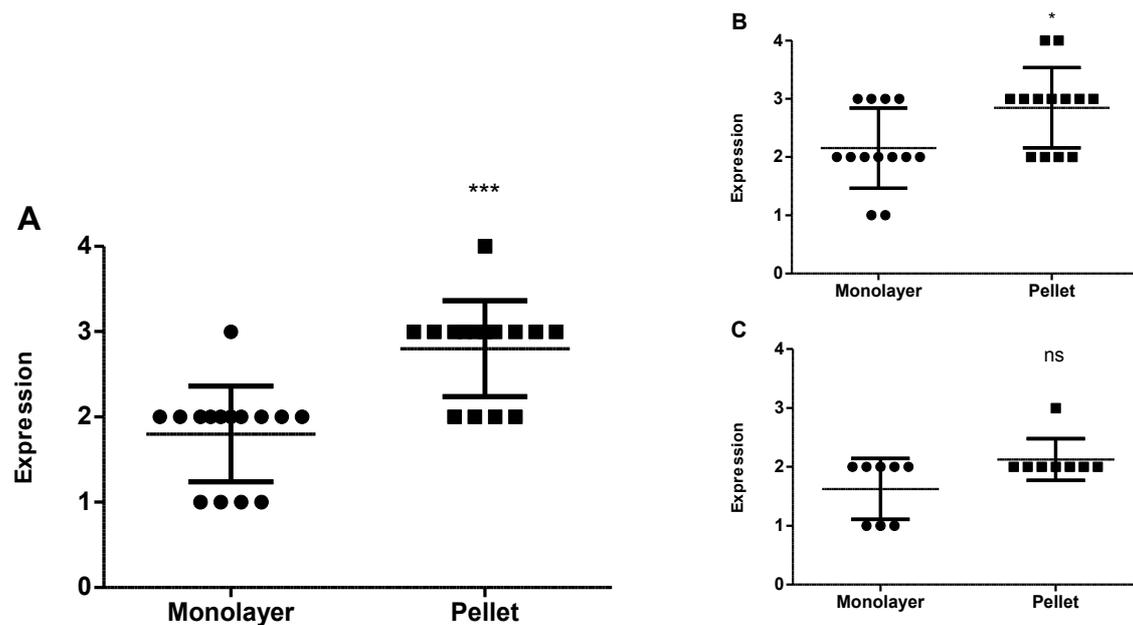
**Abbildung 9: Kol1-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur**

Isolierung von Chondrozyten aus FAI-Knorpel. Es erfolgte eine Kultur in Monolayer, anschließend Überführung der Chondrozyten in Pelletkultur unter Zugabe von Wachstumsfaktoren. Kol1-Expression wurde durch IHC nach Monolayer- sowie Pelletkultur semiquantitativ mittels visueller Farbskala ausgewertet. Abgebildet sind Einzelbestimmungen, Mittelwert  $\pm$  SD von Chondrozyten der (A) FAI-Gruppe (n=15) sowie der (B) gesunden (n=12) und (C) arthrotischen Kontrollgruppe (n=8).

### 3.5.2 Kollagen 2

Nach abgeschlossener Pelletkultur konnte sowohl in der Impingementgruppe ( $p=0,0002$ ) als auch im gesunden Vergleichskollektiv ( $p=0,0260$ ) ein signifikanter Anstieg der Kol2-Expression im Vergleich zur Monolayerkultur verzeichnet werden. Das arthrotische Vergleichskollektiv zeigte bei Betrachtung der Kol2-Expression keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Kultivierungsverfahren.

Bei Impingementgruppe ( $2,8 \pm 0,6$ , Range: 1-3) und gesundem Vergleichskollektiv ( $2,8 \pm 0,7$ , Range: 2-4) wurden nach Abschluss der Pelletkultur nahezu identische Kol2-Expressionslevel beobachtet. Im Gegensatz hierzu zeigte das arthrotische Vergleichskollektiv eine verminderte Kol2-Expression im Vergleich zur Impingementgruppe ( $p=0,0077$ ), als auch zum gesunden Vergleichskollektiv ( $p=0,0153$ ). Nach Monolayerkultur zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied. Hier herrschte eine schwache bis mäßige Kol2-Expression vor.

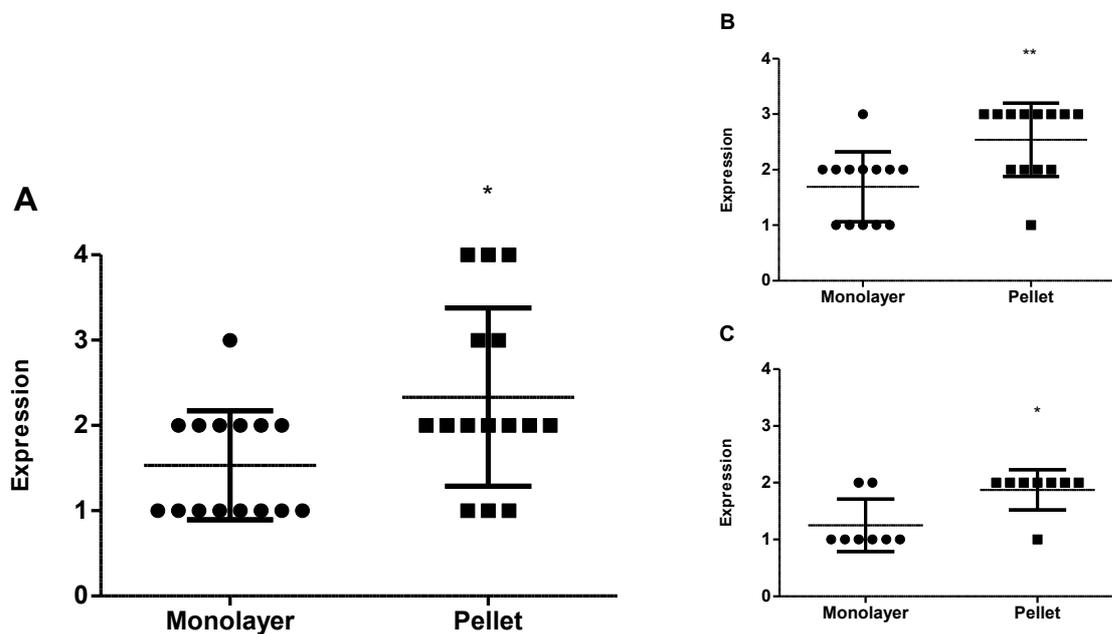


**Abbildung 10: Kol2-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur**

Isolierung von Chondrozyten aus FAI-Knorpel. Es erfolgte eine Kultur in Monolayer, anschließend Überführung der Chondrozyten in Pelletkultur unter Zugabe von Wachstumsfaktoren. Kol2-Expression wurde durch IHC nach Monolayer- sowie Pelletkultur semiquantitativ mittels visueller Farbskala ausgewertet. Abgebildet sind Einzelbestimmungen, Mittelwert  $\pm$  SD von Chondrozyten der (A) FAI-Gruppe ( $n=15$ ) sowie der (B) gesunden ( $n=12$ ) und (C) arthrotischen Kontrollgruppe ( $n=8$ ).

### 3.5.3 Aggrecan

Gruppenübergreifend konnte nach Pelletkultivierung ein signifikanter Anstieg der Aggrecan-Expression gegenüber der vorangehenden Kultur in Monolayer beobachtet werden. Den verhältnismäßig stärksten Expressionszuwachs zeigte das gesunde Vergleichskollektiv ( $p=0,0057$ ). In der Impingementgruppe war nach Pelletkultur eine breite Streuung der Aggrecan-Expression feststellbar (Range: 1-4). Ein signifikanter Expressionsunterschied war beim Vergleich der Pelletkulturen lediglich zwischen gesundem und arthrotischem Vergleichskollektiv zu beobachten ( $p=0,0189$ ). Expressionsunterschiede nach abgeschlossener Monolayerkultur bestanden nicht.



**Abbildung 11: Aggrecan-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur**

Isolierung von Chondrozyten aus FAI-Knorpel. Es erfolgte eine Kultur in Monolayer, anschließend Überführung der Chondrozyten in Pelletkultur unter Zugabe von Wachstumsfaktoren. Agg-Expression wurde durch IHC nach Monolayer- sowie Pelletkultur semiquantitativ mittels visueller Farbskala ausgewertet. Abgebildet sind Einzelbestimmungen, Mittelwert +/- SD von Chondrozyten der (A) FAI-Gruppe (n=15) sowie der (B) gesunden (n=12) und (C) arthrotischen Kontrollgruppe (n=8).

### 3.6 Bestimmung der Expression chondrozytenspezifischer Gene auf mRNA-Ebene

Nach Bestimmung der Proteinexpression von Kollagen 1, Kollagen 2 sowie Aggrecan mittels Immunhistochemie erfolgte eine weiterführende Untersuchung chondrozytenspezifischer Gene auf mRNA-Ebene. Eine vergleichende Darstellung von Monolayer- und Pelletkultur erfolgte in der qRT-PCR durch Expressionsbestimmung von Kollagen 1 (*COL1A1*), Kollagen 2 (*COL2A2*), Kollagen 10 (*COL10A1*), Sox9 sowie Cbfa1 (*RUNX2*).

Der Nachweis des Kol1- bzw. Kol2-Expressionslevels diene wiederum der Beurteilung der chondrozytären De- bzw. Redifferenzierung in ihren jeweiligen Kultursystemen. Kollagen 10 (Kol10) stellt aktuell den einzig bekannten chondrozytenspezifischen Hypertrophiemarker dar und ist vorwiegend in hypertrophem Knorpel nachweisbar (Zheng 2003). Dem Transkriptionsfaktor Sox9 (Sex determining region Y-box 9) wird eine essentielle Funktion während der Chondrozytendifferenzierung zugeschrieben (Akiyama 2008). Weiterhin wird angenommen, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Kol2-Expression steht (Zhao 1997). Cbfa1 (Core Binding Factor subunit alpha-1), auch bekannt als RunX2 (Runt-related transcription factor 2) wird als wichtiger Transkriptionsfaktor während der Osteoblastendifferenzierung angesehen. Er beeinflusst die Kol10-Expression und stellt somit einen wichtigen Faktor im Rahmen der chondrozytären Hypertrophieinduktion dar (Takeda 2001, Zheng 2003).

#### 3.6.1 Gen-Expression Monolayerkultur

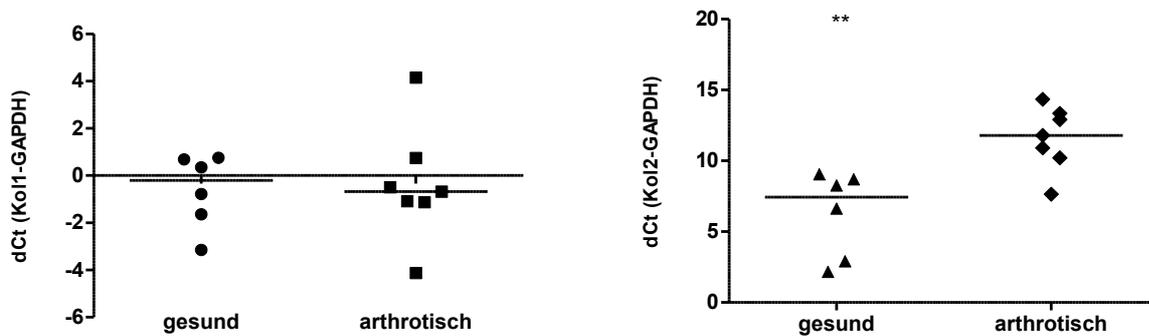
Zunächst erfolgte die Untersuchung des Genexpressionsverhaltens der FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur. Bei langen Kultivierungszeiten sowie mehrfacher Subkultivierung wird eine Dedifferenzierung isolierter Chondrozyten angenommen. Während dieses Prozesses kommt es zu einer Verminderung der Expression chondrozytärer sowie einem Anstieg osteogener Marker wie beispielsweise Kollagen 1.

Im Hinblick auf den erwarteten Dedifferenzierungsprozess wurde die Impingementgruppe im Vergleich zu einem gesunden Vergleichskollektiv untersucht. Für diese Fragestellung wurde die Expression der unter 3.6 vorgestellten Gene bestimmt.

### 3.6.1.1 Referenz-Zellpool

Als Referenzwert bei der Bestimmung der Genexpression in Monolayer diene ein Zellpool, bestehend aus Chondrozyten gesunden, hyalinen Knorpels. Die Kultivierung erfolgte äquivalent zu den Zellen der Impingementgruppe. Um ein differierendes Verhalten arthrotischer sowie gesunder Chondrozyten in Monolayerkultur zu belegen erfolgte vor Generierung des gesunden Zellpools eine vergleichende Untersuchung dieser Gruppen.

Die Menge an Kol1- bzw. Kol2-mRNA eines gesunden (n=6) sowie arthrotischen Kollektivs (n=7) nach Kultivierung in Monolayer wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei GAPDH als Housekeeping-Gen diene. Bezüglich der Kol1-Expression konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Kol2-Expression des gesunden Kollektivs war signifikant erhöht (p=0,0082).



**Abbildung 12: Gen -Expression nach Monolayerkultur**

Chondrozyten wurden aus Patientenknorpel einer gesunden (n=6) sowie einer arthrotischen (n=7) Kontrollgruppe isoliert. Die Messung der Gen-Expression der Chondrozyten nach Monolayerkultur erfolgte mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle). Abgebildet sind die Einzelmessungen (dCt) individueller Patienten sowie der Median. (A) Kol1-Expression nach Monolayerkultur (B) Kol2-Expression nach Monolayerkultur

### 3.6.1.2 Kollagen 1

Eine Signifikanz in Bezug auf die differierende Genexpression von FAI-Chondrozyten und gesundem Vergleichspool nach Monolayerkultur konnte nicht nachgewiesen werden. Es bestand jedoch eine deutliche Assoziation zwischen Kollagen 1-Expression der FAI-Chondrozyten und steigendem Mankin-Score ( $r=0,73$ ,  $p=0,0038$ ).

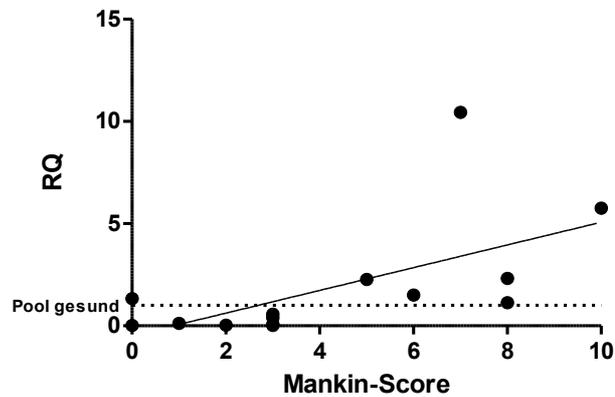
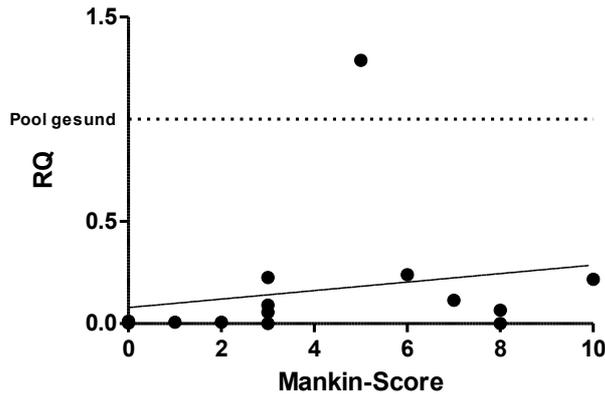


Abbildung 13: Kol1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung

Chondrozytenisolierung aus FAI-Knorpel ( $n=14$ ), Zellkultur in Monolayer. Die Kol1-Genexpression wurde durch qRT-PCR gegen einen gesunden Referenzzellpool gemessen (GAPDH als endogene Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte der Doppelbestimmung des RQ-Werts, lineare Trendlinie der RQ-Mittelwerte sowie als Referenzgerade die Werte des gesunden Kontrollpools.

### 3.6.1.3 Kollagen 2

Die FAI-Chondrozyten zeigten eine signifikant verminderte Kol2-Expression ( $p=0,296$ ). Diese betrug im Mittel 17% des Expressionsniveaus des gesunden Referenzpools ( $0,17 \pm 0,33$ , Range: 0,01 – 1,29). Eine Korrelation des Expressionslevels mit der Klassifikation nach Mankin konnte nicht beobachtet werden.

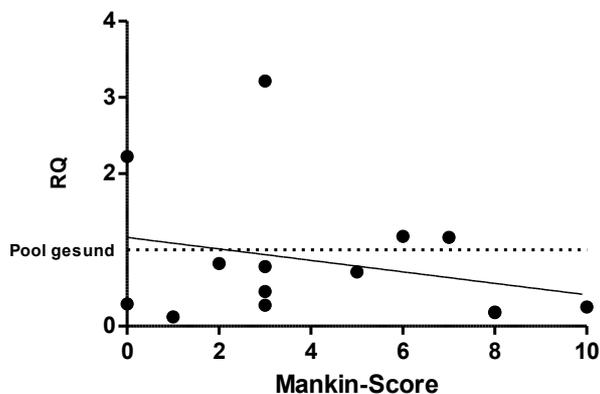


**Abbildung 14: Kol2-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung**

Chondrozytenisolierung aus FAI-Knorpel (n=14), Zellkultur in Monolayer. Die Kol2-Genexpression wurde durch qRT-PCR gegen einen gesunden Referenzzellpool gemessen (GAPDH als endogene Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte der Doppelbestimmung des RQ-Werts, lineare Trendlinie der RQ-Mittelwerte sowie als Referenzgerade die Werte des gesunden Kontrollpools.

### 3.6.1.4 Kollagen 10

Die FAI-Chondrozyten zeigten eine verminderte Kol10-Expression mit breiter Streuung der Messwerte, jedoch keine signifikante Veränderung des Expressionslevels. Eine Korrelation zwischen Genexpression und Mankin-Score-Klassifikation konnte nicht festgestellt werden.

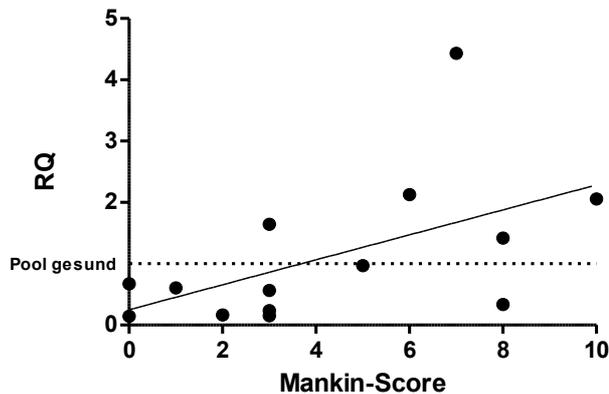


**Abbildung 15: Kol10-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung**

Chondrozytenisolierung aus FAI-Knorpel (n=14), Zellkultur in Monolayer. Die Kol10-Genexpression wurde durch qRT-PCR gegen einen gesunden Referenzzellpool gemessen (GAPDH als endogene Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte der Doppelbestimmung des RQ-Werts, lineare Trendlinie der RQ-Mittelwerte sowie als Referenzgerade die Werte des gesunden Kontrollpools.

### 3.6.1.5 Sox 9

Bei Betrachtung der FAI-Gruppe sowie des gesunden Referenzpools zeigte sich keine signifikante Veränderung des Sox9-Expressionslevels. Die Korrelationsanalyse konnte jedoch einen relevanten Zusammenhang zwischen Gen-Expression und steigendem Mankin-Score ( $r=0,58$ ,  $p=0,0316$ ) aufzeigen.

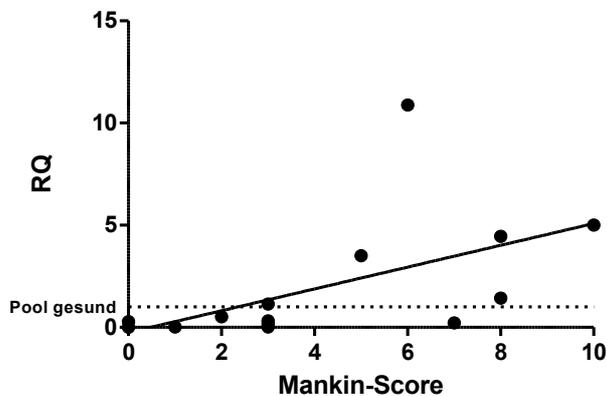


**Abbildung 16: Sox9-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung**

Chondrozytenisolierung aus FAI-Knorpel ( $n=14$ ), Zellkultur in Monolayer. Die Sox9-Genexpression wurde durch qRT-PCR gegen einen gesunden Referenzzellpool gemessen (GAPDH als endogene Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte der Doppelbestimmung des RQ-Werts, lineare Trendlinie der RQ-Mittelwerte sowie als Referenzgerade die Werte des gesunden Kontrollpools.

### 3.6.1.6 Cbfa1

Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Cbfa1-Genexpressionlevels der untersuchten Gruppen. Dagegen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression und steigendem Mankin-Score aufgezeigt werden ( $r=0,72$ ,  $p=0,0037$ ).



**Abbildung 17: Cbfa1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung**

Chondrozytenisolierung aus FAI-Knorpel ( $n=14$ ), Zellkultur in Monolayer. Die Cbfa1-Genexpression wurde durch qRT-PCR gegen einen gesunden Referenzzellpool gemessen (GAPDH als endogene Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte der Doppelbestimmung des RQ-Werts, lineare Trendlinie der RQ-Mittelwerte sowie als Referenzgerade die Werte des gesunden Kontrollpools.

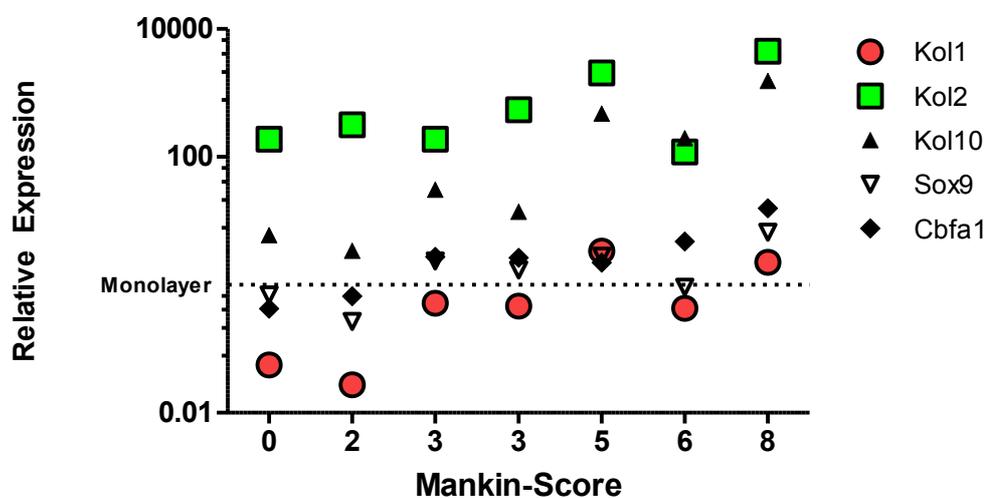
### 3.6.2 Genexpression Pelletkultur

Die bisherigen Untersuchungen zeigten auf Proteinebene ein differierendes Verhalten der FAI-Chondrozyten nach Monolayer- bzw. Pelletkultur. Nachdem die Expression chondrozytenspezifischer Marker wie Kollagen 2 und Aggrecan nach mehrwöchiger Monolayerkultivierung ein niedriges Ausgangsniveau erreicht hatten, ließ sich durch immunhistochemische Färbung eine vermehrte Expression dieser Marker nach anschließender Pelletkultur der FAI-Chondrozyten detektieren.

In einem nächsten Schritt sollte diese Beobachtungen auf mRNA-Ebene gestützt werden. Zur Untersuchung des Effekts der Pelletkultivierung von FAI-Chondrozyten auf die Genexpression ausgewählter Marker (s. Punkt 3.6) wurden diese durch qRT-PCR bestimmt. Als Referenz wurden die jeweils äquivalenten FAI-Chondrozyten nach abgeschlossener Monolayerkultivierung verwendet. Somit wurde ein Vergleich der Genexpression unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen ermöglicht. Um einen bestehenden Unterschied der Genexpression zu gesunden bzw. arthrotischen Chondrozyten aufzeigen zu können erfolgte eine vergleichende Messung der Genexpression an einem gesunden und arthrotischen Vergleichskollektiv.

Weiterhin wurde das Verhältnis der Genexpression nach Pelletkultur der differierenden Gruppen zu einem gesunden Zellpool (s. 3.6.1.1) nach Monolayerkultur untersucht.

Zusammenfassend zeigte sich in der qRT-PCR im Vergleich Pellet- zu Monolayerkultur eine signifikant erhöhte Expression von Kollagen 2 und Kollagen 10 sowie eine positive Korrelation von Genexpression und steigendem Mankin-Score für Kollagen 10 sowie Cbfa1 in FAI-Chondrozyten. Bei Auswertung der Kol1-, Sox9- sowie Cbfa1-Genexpression konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Hier kann lediglich von einer tendenziellen Zunahme (Sox9, Cbfa1) oder Abnahme (Kol1) der Genexpression gesprochen werden.

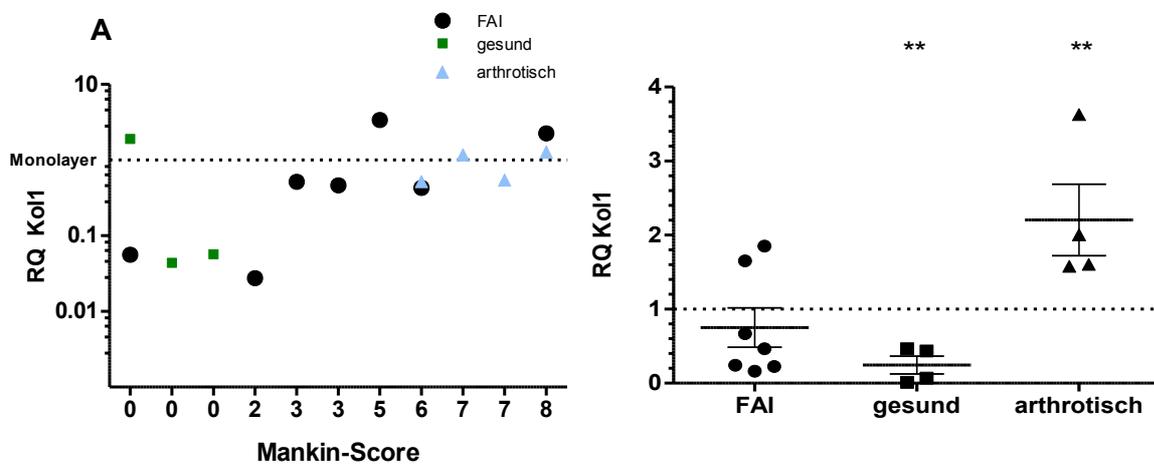


**Abbildung 18: Übersicht Genexpression FAI-Chondrozyten nach Pelletkultur**

Aus nativem Knorpel isolierte FAI-Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der Kol1-, Kol2-, Kol10-, Sox9-, Cbfa1-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI-Knorpel (n=7), normiert auf die jeweilige relative Genexpression nach Monolayer. Angezeigt sind Mittelwert des RQ-Werts sowie Referenzgerade der Genexpression nach Monolayerkultur.

### 3.6.2.1 Kollagen 1

Die FAI-Chondrozyten zeigten nach Pelletkultur kein signifikant verändertes Kol1-Expressionsmuster gegenüber der Kultur in Monolayer. Eine Korrelation der Genexpression mit der Mankin-Score-Klassifikation konnte nicht beobachtet werden. Die relative Kol1-Expression nach Pelletkultur gegenüber einem gesunden Referenzzellpool nach Monolayerkultur zeigte für das gesunde Kollektiv ( $0,25 \pm 0,15$ , Range: 0,01 – 0,45,  $p=0,0050$ ) eine signifikante Verminderung des Kol1-Expressionslevels. Im Gegensatz hierzu konnte im arthrotischen Kollektiv ein signifikant erhöhtes Expressionlevel festgestellt werden ( $2,2 \pm 0,8$ , Range: 1-6 – 3,6,  $p=0,0050$ ). Die FAI-Gruppe ( $0,75 \pm 0,6$ , Range: 0,2 – 1,6) zeigte keine signifikanten Veränderungen.

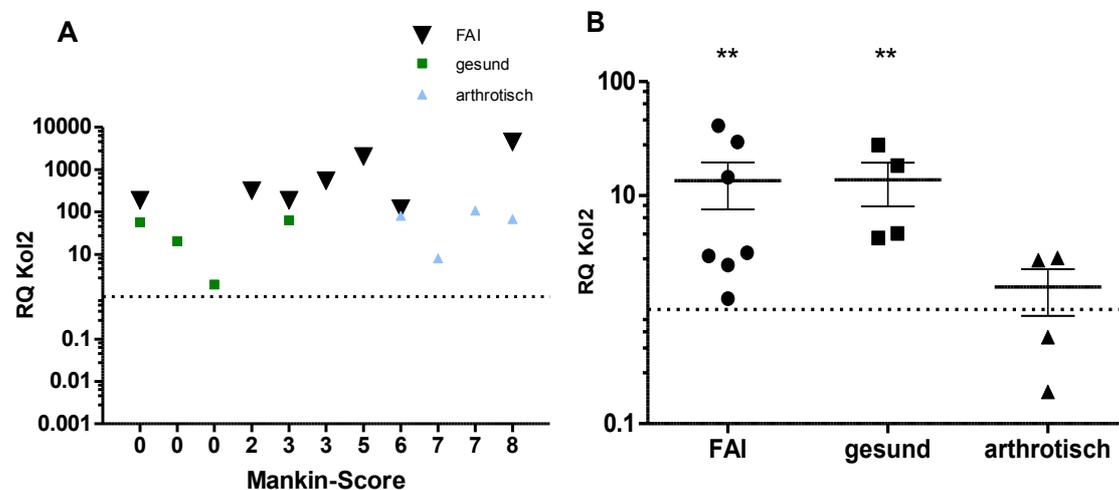


**Abbildung 19: Kol1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung**

Aus nativem Knorpel isolierte Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der Kol1-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI- ( $n=7$ ), gesunden ( $n=4$ ) und arthrotischen Knorpel ( $n=4$ ) (A) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression nach Monolayerkultur. Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, als Referenzgerade die Kol1-Expression nach Monolayerkultur (B) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression einer Kontrollgruppe (gesunder Zellpool n. Monolayerkultur). Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, Median  $\pm$  SD sowie als Referenzgerade die Kol1-Expression des gesunden Zellpools nach Monolayerkultur.

### 3.6.2.2 Kollagen 2

Im Vergleich zur Kultivierung in Monolayer zeigten die FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung eine signifikant erhöhte Kol2-Expression ( $p=0,0156$ ). Eine Korrelation zum Mankin-Score bestand nicht. Ebenso konnte für das gesunde sowie das arthrotische Vergleichskollektiv eine erhöhte Kol2-Expression nachgewiesen werden. Das Kol2-Genexpressionslevel nach Pelletkultur, normiert auf einen gesunden Referenzzellpool, zeigte ein nahezu äquivalentes Verhalten der FAI-Gruppe ( $13,5 \pm 14$ , Range: 1,3 – 40,2,  $p=0,0050$ ) und des gesunden Kollektivs ( $13,7 \pm 9,8$ , Range: 4,3 – 27,7,  $p=0,0038$ ). Bei beiden Gruppen konnte eine relativ erhöhte Kol2-Expression detektiert werden. Eine Zu- oder Abnahme der Genexpression gegenüber dem gesunden Referenzpool konnte für das arthrotische Kollektiv nicht belegt werden.

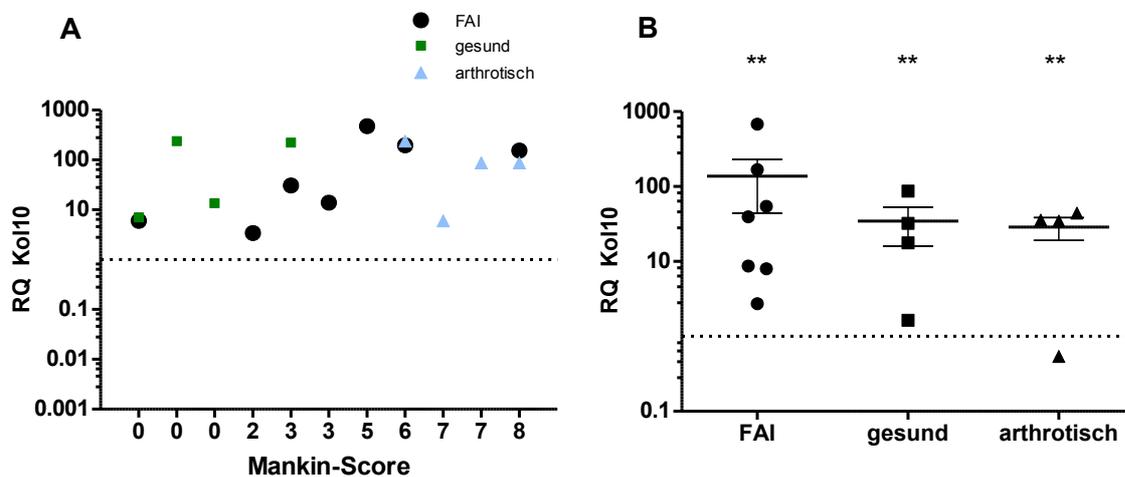


**Abbildung 20: Kol2-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung**

Aus nativem Knorpel isolierte Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der Kol2-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI- ( $n=7$ ), gesunden ( $n=4$ ) und arthrotischen Knorpel ( $n=4$ ) (A) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression nach Monolayerkultur. Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, als Referenzgerade die Kol1-Expression nach Monolayerkultur (B) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression einer Kontrollgruppe (gesunder Zellpool n. Monolayerkultur). Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, Median  $\pm$  SD sowie als Referenzgerade die Kol1-Expression des gesunden Zellpools nach Monolayerkultur.

### 3.6.2.3 Kollagen 10

Nach abgeschlossener Pelletkultivierung konnte gruppenübergreifend eine erhöhte Kol10-Expression festgestellt werden. FAI-Gruppe, gesundes sowie arthrotisches Kollektiv zeigten im direkten Vergleich keine eindeutig differierenden Ergebnisse bezüglich des Expressionsanstiegs. Die Mankin-Score-Einteilung der Impingementgruppe korreliert signifikant mit der gemessenen Kol10-Expression ( $r=0,8108$ ,  $p=0,0341$ ). Durch Normierung auf einen gesunden Referenzpool konnte in der Impingementgruppe nach Pelletkultivierung eine signifikante Steigerung der Kol10-Expression bei breiter Streuung der Messwerte detektiert werden ( $280 \pm 427$ , Range: 2,7 – 680,9,  $p=0,0006$ ). Gesundes ( $34 \pm 37$ , Range: 1,6 – 86,6) und arthrotisches Vergleichskollektiv ( $29 \pm 19$ , Range: 0,5 – 44) verhielten sich äquivalent.

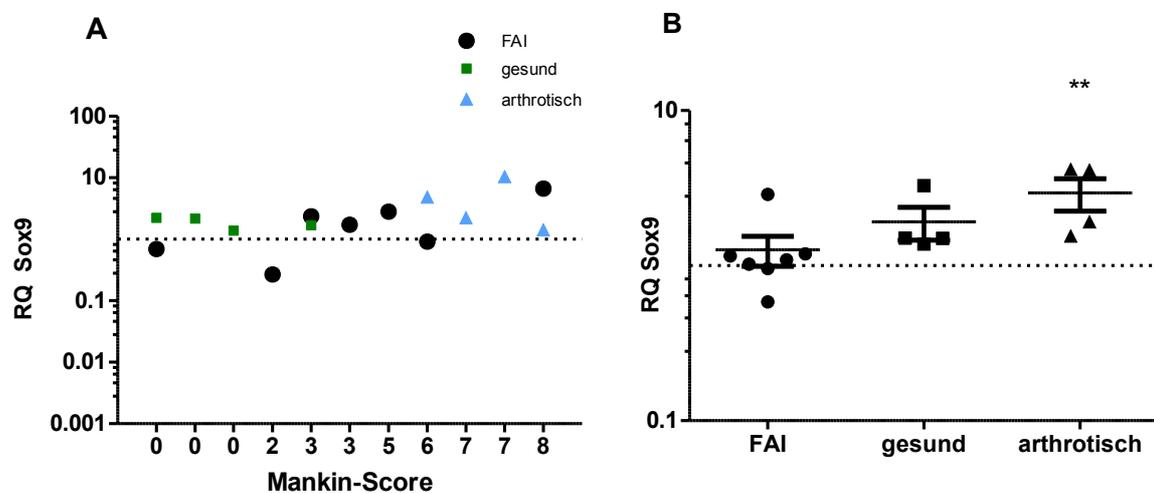


**Abbildung 21: Kol10-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung**

Aus nativem Knorpel isolierte Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der Kol10-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI- ( $n=7$ ), gesunden ( $n=4$ ) und arthrotischen Knorpel ( $n=4$ ) (A) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression nach Monolayerkultur. Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, als Referenzgerade die Kol1-Expression nach Monolayerkultur (B) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression einer Kontrollgruppe (gesunder Zellpool n. Monolayerkultur). Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, Median  $\pm$  SD sowie als Referenzgerade die Kol1-Expression des gesunden Zellpools nach Monolayerkultur.

### 3.6.2.4 Sox 9

Bei der Bestimmung der Sox9-Expression in FAI-Chondrozyten konnte nach Pelletkultur kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Genexpression nach Monolayerkultur festgestellt werden. Auch das gesunde sowie arthrotische Kollektiv zeigten ein entsprechendes Expressionsverhalten. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Normierung der Genexpression nach Pelletkultur auf einen gesunden Zellpool, auch hier konnte für FAI-Gruppe sowie gesundes Kollektiv keine signifikante Veränderung in der relativen Genexpression beobachtet werden. Eine Steigerung des Sox9-Expressionslevels konnte lediglich für das arthrotische Vergleichskollektiv detektiert werden ( $p=0,0039$ ).

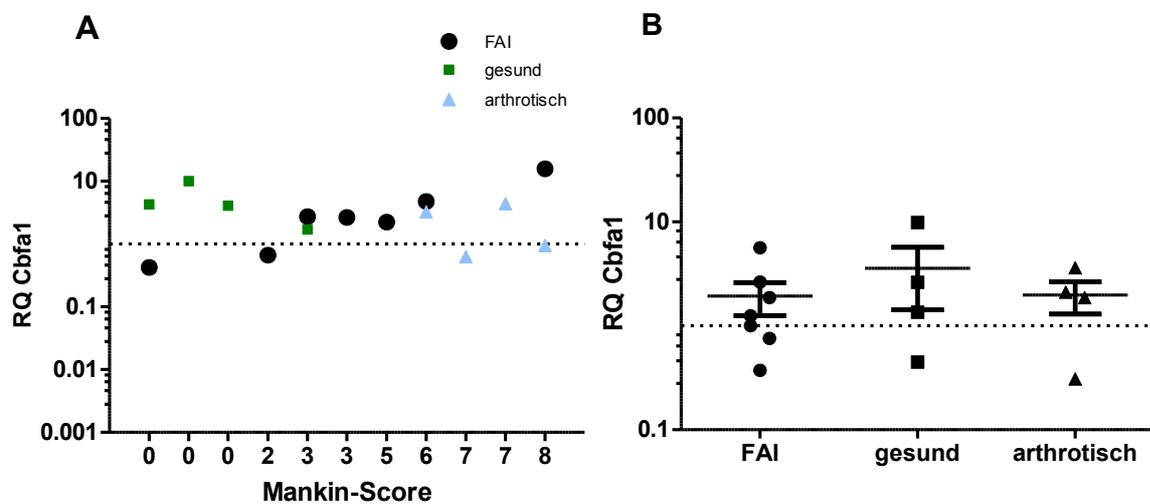


**Abbildung 22: Sox9-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung**

Aus nativem Knorpel isolierte Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der Sox9-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI- ( $n=7$ ), gesunden ( $n=4$ ) und arthrotischen Knorpel ( $n=4$ ) (A) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression nach Monolayerkultur. Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, als Referenzgerade die Kol1-Expression nach Monolayerkultur (B) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression einer Kontrollgruppe (gesunder Zellpool n. Monolayerkultur). Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, Median  $\pm$  SD sowie als Referenzgerade die Kol1-Expression des gesunden Zellpools nach Monolayerkultur.

### 3.6.2.5 *Cbfa1*

In allen untersuchten Gruppen konnte nach Pelletkultur, bei Beurteilung des jeweiligen Gesamtkollektivs, keine signifikante Veränderung des *Cbfa1*-Genexpressionslevels beobachtet werden. Die Normierung auf die Expression in Monolayerkultur sowie auf einen gesunden Referenzzellpool zeigten hier v Ergebnisse. Es bestand in der Impingementgruppe ein Zusammenhang zwischen Mankin-Score-Klassifizierung und Genexpression, diese korrelieren signifikant positiv miteinander ( $r=0,8829$ ,  $p=0,0123$ ).



**Abbildung 23: *Cbfa1*-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung**

Aus nativem Knorpel isolierte Chondrozyten wurden zunächst in Monolayer-, anschließend in Pelletkultur kultiviert. Bestimmung der *Cbfa1*-Genexpression nach Pelletkultur mittels qRT-PCR (GAPDH als endogene Kontrolle) für FAI- ( $n=7$ ), gesunden ( $n=4$ ) und arthrotischen Knorpel ( $n=4$ ) (A) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression nach Monolayerkultur. Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, als Referenzgerade die *Kol1*-Expression nach Monolayerkultur (B) Relative Genexpression nach Normierung auf die relative Genexpression einer Kontrollgruppe (gesunder Zellpool n. Monolayerkultur). Angezeigt sind Mittelwerte des RQ-Werts, Median  $\pm$  SD sowie als Referenzgerade die *Kol1*-Expression des gesunden Zellpools nach Monolayerkultur.

## **4. DISKUSSION**

Die autologe Chondrozytentransplantation steht seit ihrer klinischen Einführung im Jahre 1994 dauerhaft im Blickpunkt der Forschung, hat jedoch auch die Aufmerksamkeit der Medienlandschaft und somit vieler betroffener Patienten auf sich gezogen (Brittberg 1994). Die Möglichkeit Knorpelschäden durch körpereigenes Gewebe langfristig zu versorgen und die physiologische Gelenkfunktion zu erhalten ist ein in einer Vielzahl von Studien aufgegriffener Ansatzpunkt. Auch wenn diese Methode der operativen Versorgung ein großes Potential birgt, liegt ihr aktuell kein einheitliches Behandlungskonzept zu Grunde. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Optimierung dieses Verfahrens, hier stellt ein viel diskutiertes Problem die Entnahmestelle der transplantierten Zellen dar (Chung 2008). Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese lediglich für das Kniegelenk etabliert. Umschriebene Knorpelschäden treten jedoch vermehrt auch am Hüftgelenk auf. Das femoroacetabuläre Impingement ist eine der führenden Ursachen für die Entstehung der sekundären Arthrose im Hüftgelenk, auch umschriebene Knorpelschäden junger Patienten stellen im Krankheitsverlauf keine Seltenheit dar. Der bei der operativen Versorgung entfernte, akzessorische Knorpelhöcker, welcher meist von einer Knorpelschicht überzogen ist, kann somit als eine potentielle, neue Entnahmestelle am Hüftgelenk angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit war es die Aufgabe, den bei der operativen Versorgung des femoroacetabulären Impingements gewonnen Knorpel auf seine Eignung für einen Einsatz im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation zu untersuchen. Hierbei sollte die Wertigkeit des Knorpelgewebes gegenüber gesundem, hyalinem Knorpel bestimmt werden.

### **4.1 Beurteilung des Patientenkollektivs**

Zur Beurteilung des Knorpels, gewonnen bei der operativen Versorgung des femoroacetabulären Impingements, wurden ein gesundes sowie ein arthrotisches Vergleichskollektiv gebildet. Um ein exaktes Ergebnis bei der Einordnung des Verhaltens der Impingementchondrozyten in Kultur sowie bei der Beurteilung des chondrozytären Potentials zu erreichen, erfolgte ein äquivalenter Versuchsablauf für alle untersuchten Kollektive. Mit 80% Männeranteil herrschte im FAI-Kollektiv eine inhomogene Verteilung der Geschlechter vor. Diese deckt sich allerdings, ebenso wie die ermittelte Altersverteilung ( $29,6 \pm 9,5$  Jahre) mit den in der Literatur angegebenen Daten (Banerjee 2011, Leunig 2006). In das Patientenkollektiv des femoroacetabulären Impingements vom CAM-Typ sind insbesondere junge, athletische Männer im Alter von 20-30 Jahren

einzuordnen. Insgesamt war das FAI-Kollektiv für die untersuchte Fragestellung somit als repräsentativ zu bezeichnen.

Viele Arbeiten zur Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes wurden auf Basis tierexperimenteller Versuche durchgeführt. Hier zeigten insbesondere Chondrozyten, isoliert aus Knorpel des Jungtiers hohe Wachstumsraten, die Fähigkeit zur raschen in vitro-Vermehrung sowie ein großes chondrogenes Potential im Vergleich zu Chondrozyten älterer Donoren (Hidaka 2006, Pestka 2011). Die mit zunehmendem Alter deutlich schlechtere Anzüchtbarkeit entnommener Knorpelproben ist ein wesentliches Kriterium für die Indikationslimitierung der Knorpelzelltransplantation bei unter 40-jährigen Patienten. Trotz großer Erfolge bei jungen Donoren ist eine Verwendung infantilen Knorpels bei der Versorgung älterer Patienten im aktuellen klinischen Setting undenkbar. Um die Nähe zur klinischen Praxis zu wahren, wurde gesunder, unbelasteter Knorpel aus einem bezüglich der Altersverteilung klinisch relevanten Patientenspektrum verwendet. Dieses Kollektiv zeigte ebenso wie das arthrotische Pendant eine bezüglich des Alters inhomogene Zusammensetzung. Dieser Umstand ist zunächst irritierend, da die Patienten, gesichert durch die Erhebung des Mankin-Scores, äquivalente histologische Voraussetzungen aufwiesen. Der Zusammenhang von Patientenalter und Wertigkeit des Knorpelgewebes wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Niemeyer et al. konnten zeigen, dass Zellqualität in Kohorten >20 Jahre nicht mit steigendem Patientenalter oder erhobener Geschlechterverteilung korreliert (Niemeyer 2011). Wiederum andere Arbeiten wiesen altersabhängige Unterschiede bezüglich Proliferationsrate und chondrogener Kapazität isolierter Chondrozyten nach (Barbero 2004). In der vorliegenden Arbeit korreliert die histologische Wertigkeit des FAI-Knorpels, gesichert durch die Erhebung des Mankin-Scores, bei Beurteilung des vorliegenden Patientenguts positiv mit der Altersverteilung des Kollektivs. Somit kann die bereits diskutierte altersabhängige Qualitätsminderung der Chondrozyten in Bezug auf Impingementknorpel gestützt werden.

Insbesondere die geringen Kollektivgrößen stellen in der vorliegenden Arbeit einen limitierenden Faktor dar. Größere Kollektive sowie ein Matching der Patientengruppen könnten differierende Ausgangsbedingungen wie abweichenden Knorpelmetabolismus, veränderte Sensitivität gegenüber Mediatoren, Proliferationsfähigkeit, abweichendes Redifferenzierungspotenzial sowie die altersabhängigen Unterschiede im Vergleich zwischen den Kollektiven minimieren (Yang 2006). Gesunder Knorpel des Kniegelenks, vergleichbar mit Knorpel der aktuellen Standardentnahmestelle für die autologe Chondrozytentransplantation sowie gesunder Knorpel des Hüftgelenks wurden in einem Vergleichskollektiv vereint. Die Vermengung dieser Donoren

fürte in der Folge zu einer Relativierung der unterschiedlichen Entnahmestellen, jedoch blieb bei einheitlicher Mankin-Score-Klassifikation der grundlegende Ansatzpunkt, die Verwendung von histologisch gesundem, hyalinem Knorpel als Vergleichskollektiv erhalten. Weiterhin war bezüglich Expressionsanalyse verschiedener chondrozytärer Marker von Knie- sowie Hüftknorpel von einem simultanen Verhalten der beiden Gruppen *in vitro* auszugehen (Hoberg 2006). Das Impingementkollektiv zeigte bezüglich der Mankin-Score-Klassifizierung eine breite Streuung - neben 40% arthrotisch verändertem Knorpel konnten 60% des Kollektivs als histologisch gesunder, hyaliner Knorpel eingeordnet werden. Dies entsprach auch dem klinischen Bild, das der Impingementknorpel intraoperativ zeigte. Hier konnten sowohl unversehrter wie auch strukturell veränderter Knorpel abgegrenzt werden. Eine Verwendung des Impingementknorpels im Rahmen der ACT scheint bei Zusammenschau der Ergebnisse v.a. für junge Patienten mit umschriebenen Knorpelschäden denkbar.

#### **4.2 Verhalten der FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur**

Das Verhalten der FAI-Chondrozyten wurde zunächst in Monolayerkultur untersucht. Hier erfolgte die Expansion der Zellen. Dieses Konzept liegt auch der autologen Chondrozytentransplantation zu Grunde. Bedingt durch die geringe Zelldichte der Knorpelbiopsien sowie die Größe der zu versorgenden Knorpeldefekte muss vor Reimplantation der Chondrozyten eine deutliche Steigerung der Zellzahl erfolgen (Brittberg 1994). Die Monolayerkultur hat sich in diesem Bereich als kostengünstige sowie technisch einfach umzusetzende Vorgehensweise etabliert. Modifiziert wird dieses Verfahren in der Praxis durch differierenden Einsatz von Medien, Wachstumszusätzen, Oberflächenbeschichtungen sowie Trägermaterialien (Kock 2012). In der vorliegenden Arbeit konnten die Zellen mittels enzymatischer Reaktion erfolgreich aus dem operativ gewonnenen, nativen Knorpelgewebe gelöst und in eine zweidimensionale Kultur überführt werden. Hier zeigten sie konstant adhärentes Wachstum während einer durchschnittlichen Kultivierungsdauer von  $42,5 \pm 8,6$  Tagen. Die Monolayerkultivierung erfolgte bis zum Erreichen einer definierten Zellzahl ( $10 \times 10^6$  Zellen), vergleichbar mit der benötigten Zellzahl für die ACT. In der klinischen Anwendung werden entsprechende Zellzahlen nach einer kürzeren Kultivierungszeit ( $\sim 2-3$  Wochen) sowie häufig auch mit einer verminderten Anzahl an Subkultivierungen erreicht (Barbero 2004). Dies ist auf die bereits angeführte Verwendung unterschiedlicher Supplemente zurückzuführen. Sie induzieren eine erhöhte Proliferationsfähigkeit und steigern die chondrogene Kapazität während der Expansion. Die in der vorliegenden Arbeit benötigte, deutlich verlängerte Kultivierungszeit

ist durch den Verzicht auf jegliche, proliferationsfördernde Medienzusätze in Monolayerkultur zu erklären. Auf Zusätze wurde auf Grund der vielen uneinheitlichen, aktuell in der Literatur beschriebenen Ansätze verzichtet, um generalisierbare Ergebnisse zu erhalten. Für ein möglichst analoges Vorgehen zur Praxis der ACT, sollte jedoch in Folgeversuchen eine kürzere Expansionszeit durch die Zugabe spezifischer wachstumsfördernder Substanzen angestrebt werden.

Im klinischen Alltag wird der Gewinn an Zellquantität dennoch häufig mit einem Qualitätsverlust sowie einer einhergehenden Dedifferenzierung der Chondrozyten erkauft. Definiert ist dieser Prozess durch den Verlust des chondrozytären Phänotyps sowie eine verminderte Expression von physiologischen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Deren Bedeutung für die Stabilität sowie die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels wurden in der Einleitung bereits ausführlich erläutert. Die Verwendung irreversibel dedifferenzierter Chondrozyten in der ACT resultiert in einem funktionell minderwertigen Knorpel. Dieser ist nicht in der Lage der intraartikulären, mechanischen Beanspruchung Stand zu halten (Shakibaei 2008). Eine Umkehr dieses Vorgangs ist bis zu einem gewissen Grad, häufig beschrieben als Zeitpunkt der dritten bis fünften Subkultivierung möglich (Schulze-Tanzil 2002). Nach erfolgter Zellexpansion wird im Rahmen der ACT eine Redifferenzierung induziert, um bereits präoperativ die Bildung eines vollwertig chondrozytären Gewebes zu gewährleisten.

Morphologisch konnte vor Proliferation kein Unterschied zwischen Impingementchondrozyten und Zellen des gesunden Vergleichskollektivs festgestellt werden. Zu Beginn zeigten sich gruppenübergreifend ein rundlicher Phänotyp sowie eine Anordnung in Zellverbänden. Mit zunehmender Kultivierungsdauer verloren die Chondrozyten ihre runde Zellform und bildeten einen spindelförmigen Phänotyp mit multiplen Zellausläufern aus. Die beschriebene Dedifferenzierung der Chondrozyten beginnt häufig schon nach der ersten Subkultivierung (Darling 2005). Im klinischen Alltag besteht eine große Herausforderung in der Balance zwischen forcierter Zellexpansion und Qualitätserhalt. Dies ist von Bedeutung, da von einem Zusammenhang zwischen der Zellqualität nach Expansion und klinischem Outcome der ACT ausgegangen wird (Niemeyer 2011). Die FAI-Chondrozyten waren, ausgehend von der Beurteilung des vorliegenden Phänotyps nach erfolgter Monolayerkultur bereits in den Dedifferenzierungsprozess eingetreten. Zelladhärenz bzw. apoptotisches Verhalten war bei den FAI-Chondrozyten jedoch nicht zu beobachten. Das Verhalten in Monolayerkultur war somit äquivalent zu dem des gesunden Vergleichskollektivs zu werten und ließ bereits Rückschlüsse

auf ein analoges Verhalten sowie ein mögliches, positives Redifferenzierungspotential der Impingementzellen zu.

#### **4.2.1 Proliferationsverhalten**

Das Proliferationsverhalten der FAI-Chondrozyten wurde mittels Population Doubling Time und BrdU-Test verifiziert. Für die Impingementzellen wurde in beiden Versuchsansätzen eine gegenüber dem gesunden Vergleichskollektiv verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit, ähnlich arthrotisch veränderten Chondrozyten bestimmt. Im klinischen Alltag muss somit mit einer größeren Latenz zwischen Knorpelentnahme und –transplantation gerechnet werden. Die Population Doubling Times der FAI-Chondrozyten zeigten hierbei eine breite Streuung (4,0 – 9,0 d). Dies ließ wiederum auf einen großen Qualitätsunterschied innerhalb des Kollektivs schließen. Ähnliche Befunde konnten bereits bei Beurteilung der Mankin-Score-Klassifikation sowie der intraoperativen Darstellung des Knorpels erhoben werden. Falls die Befunde in einem größeren Vergleichskollektiv reproduzierbar sind, ist anzunehmen, dass signifikante Proliferationsunterschiede erst nach prolongierter Monolayerkultur zum Tragen kommen. Yang et. al. konnten in ihrer Studie in einer früheren Passage der Monolayerkultur keine signifikanten Differenzen zwischen gesunden und arthrotischen Chondrozyten in vitro feststellen (Yang 2006). Dieses konnte 2006 durch Acosta et al. in einer vergleichenden Proliferationsuntersuchung junger, alter sowie osteoarthrotisch veränderter Chondrozyten nach Monolayerkultur mittels BrdU bestätigt werden. Junge, infantile Chondrozyten zeigten eine signifikant erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit, im Gegensatz hierzu konnte kein Unterschied zwischen alten und bereits arthrotisch veränderten Zellen ausgemacht werden (Acosta 2006). Im Allgemeinen ist eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit und als Konsequenz eine frühere Reimplantation der Chondrozyten im Rahmen der ACT erstrebenswert. Ein möglicher Qualitätsverlust der Zellen durch prolongierte Kultivierungszeiten könnte somit verringert werden. Um eine definitive Aussage treffen zu können, sollte eine Beurteilung der Proliferation im direkten Anschluss an die Isolierung der Chondrozyten aus nativem Knorpel erfolgen.

#### **4.2.2 Veränderung der Expression von Matrixbestandteilen in Zellkultur**

Während der Expansion in Monolayer deutete bereits eine Veränderung des Phänotyps auf eine beginnende Dedifferenzierung der FAI-Chondrozyten hin. Diese Vermutung wurde durch weiterführende Untersuchungen zur Beurteilung der chondrozytären Syntheseleistung und Genexpression gestützt. Nach mehrwöchiger Kultur konnte durch immunhistochemische Färbungen in allen untersuchten Gruppen das klassische Expressionsmuster der im Prozess der Dedifferenzierung befindlichen Chondrozyten nachgewiesen werden. Die phänotypische

Veränderung der Zellen verlief somit begleitend zu einer deutlichen Abwandlung des physiologischen Kollagenexpressionsmusters. Die für Chondrozyten charakteristische Kol2- sowie Aggrecan-Synthese wurde stark unterdrückt. Damit einhergehend wurde eine deutlich erhöhte Kol1-Expression beobachtet. Eine Veränderung des Kollagenexpressionsmusters sowie eine herabgesetzte Proteoglykansynthese der EZM bekräftigen die Dedifferenzierungshypothese und sprachen für einen, zumindest temporären Verlust des chondrogenen Potentials der kultivierten Zellen. Mittels IHC konnte jedoch auf Basis der zu Grunde liegenden semiquantitativen Auswertung nur eine orientierende Aussage in Bezug auf das exakte Expressionsmuster getätigt werden. In der qRT-PCR erfolgte somit auf Grundlage der Ergebnisse der IHC eine Untersuchung der Expression cartilaginärer Marker (Kol2, Sox9). Weiterhin wurde die Regulation von Genen, die mit arthrotischem bzw. hypertrophem Knorpel assoziiert sind (Kol1, Kol10, Cbfa1) bestimmt.

Zur Generierung eines gesunden Vergleichskollektivs wurde im Vorfeld der Versuche ein signifikanter Unterschied der Kol2-Expression in gesunden und arthrotischen Zellen nachgewiesen. Somit konnte die Annahme, dass nach prolongierter Monolayerkultur eine vollständige Angleichung des chondrozytären Expressionsverhaltens erfolgt unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen widerlegt werden (Lin 2008). Es ist jedoch anzunehmen, dass die Genexpression der Zellen zumindest stark von den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird. Vorhandene Unterschiede zwischen FAI- und gesunden Chondrozyten in vivo konnten nach in vitro Kultur möglicherweise nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der in vitro Kultur haben somit v.a. einen orientierenden Stellenwert. Um die hier getätigten Annahmen zu stützen sollte eine zusätzliche Bestimmung der Genexpression in nativem Knorpel erfolgen.

Bei Analyse der Gene Kollagen 1, Kollagen 10, Sox9 sowie Cbfa1 wurde ein äquivalentes Expressionsverhalten für FAI-Chondrozyten sowie gesunden Referenzpool festgestellt. Signifikante Unterschiede konnten in Bezug auf die Expression des chondrozytenspezifischen Markers Kollagen 2 beobachtet werden. Die Expression dieses Gens war in FAI-Chondrozyten signifikant vermindert. V.a. die herabgesetzte Kol2-Expression wirft die Frage auf, ob FAI-Chondrozyten eine verminderte Resistenz gegenüber externen Einflüssen in Expansionsverfahren aufweisen. Das im Vergleich mit dem gesunden Referenzpool erhöhte Verhältnis von Kol1- zu Kol2-Expression ließen auf eine stärkere Dedifferenzierung der FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultur schließen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von Yang et al., die belegen konnten, dass arthrotisch veränderte Chondrozyten im Verlauf der

Expansion einen stärkeren Abfall der Kol2-Expression als Zellen gesunder Donoren aufweisen (Yang 2006). Zu klären galt somit, ob diese voran geschrittene Dedifferenzierung der Zellen qualitative Einbußen nach erfolgter Redifferenzierung zur Folge hatte. Der Transkriptionsfaktor Sox9 zeigte hingegen keinerlei Assoziation zur verminderten Kol2-Expression der FAI-Chondrozyten. Viele Studien konnten in vitro einen Zusammenhang zwischen Sox9- und Kol2-Expression in multipotenten Vorläuferzellen (Majumdar 2001), fetalen Maus-Chondrozyten (Murakami 2000) sowie embryonalen Zelllinien (Kolettas 2001) aufzeigen. Entgegen dieser Annahmen konnte Aigner et al. keine direkte Verbindung zwischen Kol2- und Sox9-Expression in adulten, kultivierten Chondrozyten feststellen (Aigner 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach Monolayerkultur keine Assoziation der Gene erkannt werden. Möglicherweise hat Sox9 v.a. Auswirkungen auf die zelluläre Differenzierung in vivo und fungiert in in vitro-Kulturen nicht als direkter Aktivator der Kol2-Expression.

Die mittels IHC bestimmte, äquivalente Kol1-Expression in FAI- sowie gesunden Chondrozyten konnte in der qRT-PCR bestätigt werden. Auch die Korrelation von Kol1-Expression und steigendem Mankin-Score wies wiederum auf eine Qualitätsminderung der Knorpelproben nach Kultivierung bei bereits vorangeschrittener Degeneration hin. In Einklang mit diesem Befund stand auch der Nachweis von Cbfa1 nach Monolayerkultur in beiden Gruppen. Cbfa1 spielt eine wichtige Rolle in der osteoblastären Differenzierung sowie bei der Reifung hypertropher Chondrozyten. Kol1 sowie der Transkriptionsfaktor Cbfa1 werden in gesundem, vitalem Knorpel in vivo nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Eine gesteigerte Expression dieser Marker steht dementsprechend in Einklang mit der begonnenen Dedifferenzierung der Chondrozyten.

Da eine Veränderung des chondrozytären Expressionsmusters in Monolayer spätestens um den 21. Tag erfolgt, konnte lediglich eine Aussage über das differierende Verhalten der Gruppen in Monolayerkultur, nicht über die Situation in nativem Knorpel getroffen werden (Marlovits 2004, Schnabel 2002). In einer Studie von Yang et al. zeigten gesunde und arthrotische Chondrozyten zu einem früheren Zeitpunkt in Monolayerkultur keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Kollagen-Expression (Yang 2006). Möglicherweise sind die beobachteten Unterschiede in Bezug auf Kol2- und Kol10-Expression ebenfalls der langen Kulturzeit geschuldet. In einer weiterführenden Untersuchung wäre somit die Beurteilung der Genexpression zu mehreren Zeitpunkten der Expansion wünschenswert, um eine genauere Einordnung der FAI-Chondrozyten im Vergleich zu gesunden Chondrozyten vornehmen zu können. Zur Beurteilung des chondrogenen Potentials expandierter Zellen stehen neben den in dieser Arbeit verwendeten Markern, weitere wie etwa BMP2 oder FGFR3 zur Verfügung. Eine weiterführende

Untersuchung des FAI-Knorpels in diesem Bereich sollte ebenfalls angestrebt werden (Dell'Accio 2001).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur ohne wachstumsfördernde Supplemente Zeichen einer verstärkten Dedifferenzierung aufwiesen. Gesunde Chondrozyten zeigten ein ähnliches Verhalten in Monolayerkultur, signifikante Unterschiede bestanden nur in Bezug auf die Kol2-Expression. Eine Assoziation des Mankin-Scores mit steigender Kol1- sowie Cbfa1-Expression wies darauf hin, dass stärker degenerativ veränderte Impingementzellen für eine Kultivierung und anschließende Transplantation ungünstigere Voraussetzungen mit sich bringen. Die Annahme, dass diese Art der Kultivierung zu einer Hypertrophieinduktion in FAI-Chondrozyten führt konnte nicht bestätigt werden.

### **4.3 Verhalten der FAI-Chondrozyten in Pelletkultur**

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Expansion der Chondrozyten in Monolayerkultur. Im Anschluss wurden diese in ein Pelletkultursystem überführt um eine Redifferenzierung zu induzieren. Die Kombination zweier unterschiedlicher Kulturtechniken findet ihre Anwendung auch bei der Aufbereitung humaner, autologer Chondrozyten im Rahmen der ACT (Haudenschild 2001). Im Folgenden soll das Verhalten der FAI-Chondrozyten in Pelletkultur in Bezug auf ihr chondrozytäres Redifferenzierungspotential beurteilt werden. Weiterhin erfolgt eine kritische Bewertung des Kultivierungssystems sowie der verwendeten Medienzusätze.

#### **4.3.1 chondrozytäres Redifferenzierungspotential – Beurteilung der Protein- und Genexpression**

Im Vorfeld wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Chondrozyten, isoliert aus arthrotisch verändertem Knorpel, lediglich begrenzte Fähigkeit zur Proliferation (Dozin 2002) sowie zur Bildung knorpelspezifischer Bestandteile der EZM haben (Dorotka 2005). Andere Studien bescheinigten osteoarthrotischen Chondrozyten hingegen ein hohes chondrogenes Potential sowie die Möglichkeit zur Redifferenzierung nach Verlust des chondrozytären Phänotyps (Dehne 2009). Das Gewebe, gewonnen bei der operativen Versorgung des femoroacetabulären Impingements vom CAM-Typ wurde in einer Arbeit von Wagner et. al als hyaliner Knorpel mit beginnenden arthrotischen Veränderungen klassifiziert (Wagner 2003). Auf Grund der widersprüchlichen Datenlage in Bezug auf Chondrozyten mit osteoarthrotischen Veränderungen war es das Ziel dieser Arbeit das chondrogene Potential der FAI-Zellen genauer zu untersuchen. Hier konnte nach erfolgter Redifferenzierung der Chondrozyten ein über weite Strecken

homogenes Genexpressionsmuster in FAI- sowie gesundem Vergleichskollektiv beobachten werden. Alle untersuchten Patientenproben waren nach Kultur im Pelletmodell in der Lage chondrozytenspezifisches Kollagen 2 zu exprimieren. Dies war hinweisend auf ein hohes Redifferenzierungspotenzial der FAI-Chondrozyten und zeigte somit vielversprechende Ergebnisse für den klinischen Einsatz als Transplantat im Rahmen der ACT. War nach Monolayerkultur noch ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genexpression zwischen gesundem Kollektiv und Impingementchondrozyten zu beobachten, wurde dieser durch die Pelletkultur sowie die konstante Zufuhr von Wachstumsfaktoren egalisiert, beide Gruppen zeigten eine deutliche Steigerung der Kol2-Genexpression. Im arthrotischen Vergleichskollektiv konnte hingegen nur eine geringe Veränderung des Kol2-Expressionmusters verzeichnet werden. Somit ist von einer „Arthroschwelle“ im Hinblick auf das Redifferenzierungspotenzial auszugehen.

Das Verhältnis von Kollagen 1 zu Kollagen 2 gilt nach wie vor als klassischer Marker für das chondrogene Potential der untersuchten Zellen (Marlovits 2004). Trotz signifikanter Steigerung der Kol2-Expression der FAI-Chondrozyten konnte in IHC sowie qRT-PCR ein konstant erhöhter Kol1-Spiegel nachgewiesen werden. Da für das Kol1/Kol2-Verhältnis gesunder Chondrozyten äquivalente Daten vorlagen, war die unvollständige Redifferenzierung am ehesten auf die prolongierte Kultivierung in Monolayer zurückzuführen. Die arthrotisch veränderten Zellen konnten hingegen nicht äquivalent auf die unphysiologischen Kultivierungsbedingungen reagieren. Hier konnte im Gegensatz zu FAI- und gesunden Chondrozyten sogar eine Zunahme der Kol1-Expression nach Pelletkultur beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass FAI-Chondrozyten auch nach verlängerter Kultivierungszeit in der Lage sind zu redifferenzieren. Der Grad der Redifferenzierung schien jedoch u.a. von der Länge des Dedifferenzierungsprozesses abzuhängen. Das Verhältnis von Kol1/Kol2 stellte hier zwar einen Indikator für die begonnene Redifferenzierung dar, um eine exaktere Klassifizierung der entnommenen Zellen vorzunehmen, sollten jedoch weitere Marker, die den Grad der Redifferenzierung näher bestimmen, hinzugezogen werden (Zaucke 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht dies durch die zusätzliche Bestimmung des Transkriptionsfaktors Sox9 zu spezifizieren. Wie bereits bei Analyse der Genexpression nach Monolayerkultur beobachtet, konnte jedoch wiederum keine Assoziation zwischen Kol2- sowie Sox9-Expression aufgezeigt werden. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die kultivierten Chondrozyten sowohl De- als auch Redifferenzierung durchlaufen, obwohl das Genexpressionslevel des für die Chondrogenese unerlässlichen Transkriptionsfaktors unverändert bleibt. Auch in Bezug auf FAI-Chondrozyten sowie die Vergleichskollektive konnte kein differierendes Verhalten festgestellt werden. Durch die

Bestimmung von Sox9 konnte, bezogen auf die Frage nach dem chondrogenen Potential der FAI-Chondrozyten keine zusätzliche Aussage getroffen werden. Das unterschiedliche Genexpressionsmuster kultivierter Chondrozyten in differierenden Kulturmodellen lässt annehmen, dass das Verhalten der Zellen ebenfalls stark von den gegebenen Kultivierungsbedingungen abhängt. Die biologischen Eigenschaften und folglich die Funktionalität der Chondrozyten können somit durch die Wahl des Kultivierungssystems beeinflusst werden. Im Vergleich mit Chondrozyten, isoliert aus gesundem Knorpel, wird osteoarthrotisch veränderten Zellen eine erhöhte Expression des Hypertrophie-Markers Kollagen 10 zugeschrieben. Eine Verwendung von hypertrophen Chondrozyten im Bereich des Tissue Engineering muss kritisch hinterfragt werden (von der Mark 1992). Unsere Ergebnisse zeigten eine äquivalente Kol10-Expression der Impingementchondrozyten gegenüber gesunden Chondrozyten nach Monolayerkultur. Nach Überführung der Zellen in Pelletkultur konnte sowohl in der Impingementgruppe, als auch im gesunden und arthrotischen Vergleichskollektiv ein starker Anstieg der Kol10-Expression beobachtet werden. Überdies bestanden keine Differenzen bezüglich der Expression des Hypertrophie induzierenden Transkriptionsfaktors Cbfa1 zwischen den Gruppen. Ist der Hypertrophie-Prozess angelaufen vergrößern die Chondrozyten ihr intrazelluläres Volumen, die Matrix beginnt zu kalzifizieren. Weiterhin werden hypertrophie-spezifische Matrixkomponenten wie Kollagen 10 vermehrt exprimiert. Schreitet dieser Vorgang weiter voran kommt es zu einem Einsprießen von Blutgefäßen sowie einer schrittweisen Umwandlung des Knorpelgewebes in Knochen (Kim 1999). Die Regulierung und somit vermehrte Expression der Gene Kol10 sowie Cbfa1 konnte auf die Verwendung des chondrogenen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 zurückgeführt werden. In mehreren Studien wurde eine erhöhte Kol10-Expression nach Pelletkultur mit Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 assoziiert (Johnstone 1998, Rich 2008). Unter Verwendung eines differierenden Modells zur Redifferenzierung bzw. zum Erhalt des chondrozytären Phänotyps sollte kein erhöhtes Risiko für eine hypertrophe Differenzierung der FAI-Chondrozyten bestehen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass makroskopisch unversehrter Knorpel, gewonnen bei der operativen Versorgung des femoroacetabulären Impingements vom CAM-Typ eine hinreichend hohe chondrogene Qualität in Bezug auf die Genexpression nach Pelletkultur aufweist.

#### 4.3.2 Einsatz von Wachstumsfaktoren, Kultivierungssystemen in der ACT/MACT

Nach Abschluss der mehrwöchigen Monolayerkultur konnte in der vorliegenden Arbeit eine beginnende Dedifferenzierung der FAI-Chondrozyten wie auch der Vergleichskollektive beobachtet werden. In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien zum Ansprechen hyalinen Knorpels auf den Zusatz von Wachstumsfaktoren in vivo sowie in vitro durchgeführt. Die größte Einschränkung bei Verwendung autologer Chondrozyten als Zellquelle für die Knorpelregeneration ist ihre Dedifferenzierung während Expansion. Wachstumsfaktoren stimulieren die Synthese der extrazellulären Matrix und fördern die Proliferationsfähigkeit kultivierter Chondrozyten (Coates 2010, Merrihew 2003). Ihr Einsatz in der Zellkultur kann den Dedifferenzierungsprozess verzögern, ihn jedoch nicht vollständig aufhalten (Schulze-Tanzil 2009). Um den chondrozytären Phänotyp zu stabilisieren wird in der klinischen Praxis vermehrt die additive Verwendung dreidimensionaler Kultivierungssysteme angestrebt. Diese sollen den Zellen während der Expansion möglichst physiologische Wachstumsbedingungen anbieten. Eine Redifferenzierung der FAI-Chondrozyten konnte durch das verwendete Pelletkultursystem eingeleitet werden, chondrozytenspezifisches Kollagen 2 wurde nach dreiwöchiger Kultur stark reexprimiert. In allen untersuchten Gruppen bildete sich ein elastisches, mechanisch stabiles Zellpellet aus. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits für gesunde, dedifferenzierte Chondrozyten, jedoch nicht für arthrotisch veränderte Zellen gezeigt werden (Schulze-Tanzil 2002, Zhang 2004). Das Prinzip der Pelletkultur beruht auf einer hohen Zelldichte sowie einer folglich gesteigerten Anzahl an Zell-Zell-Kontakten in einem dreidimensionalen Modell, vergleichbar mit der Situation in der embryonalen Entwicklung. In einer ersten Anwendung als Differenzierungsmodell konnte die Chondrogenese mesenchymaler Vorläuferzellen induziert werden. Die synergetische Verwendung von Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 sowie Dexamethason als Medienzusatz konnte hier eine vollständige chondrogene Differenzierung in vitro generieren (Johnstone 1998). Zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehören die drei in Bezug auf ihre chondrogene Wirkung am umfassendsten untersuchten Wachstumsfaktoren, TGF- $\beta$ 1, BMP-2 sowie BMP-7. Ihre Wirkung beruht auf einer Stimulierung der chondrozytären Syntheseaktivität sowie einer Herabsetzung der katabolen Aktivität zahlreicher Zytokine. TGF- $\beta$ 1 nimmt eine führende Rolle im Stoffwechsel des Knorpelgewebes ein, ist für Proliferation, Differenzierung, Migration sowie EZM-Homöostase verantwortlich. Der Einsatz in vitro begünstigt jedoch eine terminale Differenzierung kultivierter Chondrozyten. Bei Beurteilung der Genexpression der untersuchten FAI-Chondrozyten sowie der Vergleichskollektive konnte nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 eine deutliche Steigerung der Kol10-Expression beobachtet werden. Auf die im Anschluss an die Kultivierung in Monolayer stark erhöhte Kol1-Expression hatte der Einsatz des

Wachstumsfaktors keinen Einfluss. Eine vollständige Redifferenzierung der entdifferenzierten FAI-Chondrozyten wurde durch den Einsatz des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 in Pelletkultur somit nicht erreicht. Einen möglichen Erklärungsansatz stellt die verminderte TGF- $\beta$ 1-Rezeptordichte arthrotisch veränderter Chondrozyten dar (Blaney Davidson 2007). Auch im gesunden Vergleichskollektiv konnte jedoch keine Regulierung der Kol1-Expression beobachtet werden. Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 scheint demzufolge für den angestrebten Redifferenzierungsprozess adulter Chondrozyten im vorgestellten Kultivierungssystem nur eingeschränkt einsetzbar zu sein.

Die Anwendung des Wachstumsfaktors in vivo bringt weiterhin zahlreiche Nebenwirkungen mit sich. Intraartikulär kommt es zu einer Stimulation der synovialen Proliferation wie auch einer vermehrten Osteophytenbildung (Grimaud 2002). Ein forcierter Einsatz in der klinischen Praxis ist aktuell somit kritisch zu hinterfragen. Den aktuellen Goldstandard auf dem Gebiet der Knorpelregeneration stellt BMP-7 dar. Im Gegensatz zu TGF- $\beta$ 1 ist das Ansprechen auf BMP-7 in osteoarthrotisch veränderten Chondrozyten nicht verringert. Weiterhin konnten in der in vivo – Anwendungen keine Nebenwirkung beobachtet werden die, die bereits bestehenden Pathologien einer Osteoarthrose verschlechtern (Chubinskaya 2007). Betrachtet man die Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die in der Entwicklung sowie bei der Instandhaltung hyalinen Knorpelgewebes mitwirken, ist es nicht vorstellbar, dass der Einsatz eines einzigen Wachstumsfaktors zu einer kompletten Umkehr des Dedifferenzierungsprozesses führen kann (Goldring 2006). In einer in vivo – Studie konnte bereits eine stark synergistische Wirkung der Wachstumsfaktoren BMP-7 und IGF-1 auf gesunde sowie arthrotisch veränderte Chondrozyten nachgewiesen werden (Loeser 2003).

Wachstumsfaktoren sowie die Verwendung von verschiedenen Scaffoldmodellen zur Expansion autologer Chondrozyten stellen die Schlüsselkomponente des aktuellen Tissue Engineerings dar (Danisovic 2012). Das Ziel ist die in-vitro Generierung eines Trägersystems, das die Chondrozyten unter Erhalt ihres Phänotyps aufnimmt und expandiert. Nach Implantation in einen Gelenkknorpeldefekt bildet sich in vivo hyalines Knorpelgewebe, hierbei wird durch fortschreitende Matrixbiosynthese das Trägersystem schrittweise ersetzt. Durch Veränderung der Oberfläche, Porengröße sowie Festigkeit des Scaffolds kann eine Adaption an die klinischen Gegebenheiten erfolgen (Sittinger 1999). Zum Einsatz kommen natürliche Biomaterialien auf Grundlage von Proteinen (Kollagen, Fibrin) bzw. Polysacchariden (Alginat, Chitosan, Hyaluronsäure, Cellulose) sowie synthetische Polymere wie PLA (polyactic acid), PGA (polyglycolic acid) oder PEG (polyethylene glycol) in Form von Hydrogelen, Schwämmen,

Fasernetzen und Nanofasern (Danisovic 2012). Die Trägersysteme sollten nicht toxisch, jedoch biokompatibel und resorbierbar sein, um die Voraussetzungen für eine Anwendung in der klinischen Praxis zu erfüllen. In vitro zeigte eine große Anzahl an Trägermaterialien vielversprechende Ergebnisse, aktuell sind jedoch nur wenige für den klinischen Gebrauch zugelassen. Die in der Praxis gängigen Trägersysteme MACI® (Kollagen I/III-Membran), Hyalograft®C (Hyalurongewebe), CaReS®(Kol1-Gel) und Novocart®3D (doppelschichtiger Kol1-Schwamm, versetzt mit Chondroitin-Sulfat) wurden auf chondrozytäre Genexpression sowie ihren Differenzierungszustand vor Implantation untersucht. Den kultivierten Zellen konnte gruppenübergreifend eine im Vergleich mit nativem, hyalinen Knorpel verminderte Qualität nachgewiesen werden (Albrecht 2011), die postoperativen Ergebnisse der MACT sind jedoch im klinischen Outcome mit denen der ACT vergleichbar und stellen nach wie vor die vielversprechendste Alternative im Bereich der Knorpelregeneration dar. FAI-Chondrozyten zeigten in Pelletkultur unter Zusatz von Wachstumsfaktoren ein ähnliches Verhalten wie gesunde Chondrozyten. Weiterführende Versuche im Bereich des Tissue Engineering sind somit als erfolgversprechend anzusehen und sollen zeigen, ob die gewonnenen Ergebnisse auf die in der klinischen Praxis verwendeten Kultivierungsmethoden übertragen werden können.

#### **4.4 Beurteilung der Mankin-Score-Korrelation**

Der Mankin-Score stellt ein in der Praxis häufig angewandtes, valides, histopathologisches Klassifikationssystem zur Beurteilung von Knorpelschädigungen dar. Die Einteilung des Schweregrades erfolgt anhand der Struktur des Knorpels, der Zellverteilung und -dichte, der Anfärbbarkeit durch Safranin-O sowie der Intaktheit der Tidemark. Ein Score von 0 entspricht unversehrtem, gesundem, hyalinem Knorpel, ein Wert von 14 wird mit stark arthrotisch verändertem Gewebe gleich gesetzt (Pearson 2011, van der Sluijs 1992). Die Impingementzellen zeigten bzgl. der Mankin-Score-Klassifikation ein inhomogenes Bild. Bei breiter Streuung der erhobenen Werte konnte sowohl gesundes, hyalines wie auch arthrotisch verändertes Knorpelgewebe im untersuchten Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Die Altersverteilung des Kollektivs ließ jedoch keine Rückschlüsse auf die Qualität des Knorpelgewebes zu. Zwischen steigendem Patientenalter und fortschreitender arthrotischer Degeneration des Knorpels konnte keine Korrelation festgestellt werden. Im Falle der Verwendung des Impingementknorpels im Rahmen einer autologen Chondrozytentransplantation muss somit jeweils individuell die Qualität des Knorpels überprüft werden, ein fortgeschrittenes Patientenalter stellt hier per se kein Ausschlusskriterium dar.

In der klinischen Praxis sollten zur autologen Chondrozytentransplantation lediglich FAI-Chondrozyten ohne nachgewiesene arthrotische Degeneration herangezogen werden. Bei bereits degenerativ verändertem Knorpelgewebe muss eine Verwendung kritisch hinterfragt werden, da Proliferationsverhalten wie auch chondrogenes Potential der FAI-Zellen in diesem Stadium bereits stark reduziert erschienen. Im Gegensatz zu FAI-Chondrozyten mit einem Mankin-Score  $\leq 3$ , wurde das chondrogene Potential von FAI-Chondrozyten jenseits dieses Cut-off-Werts als signifikant erniedrigt eingestuft. In Monolayer- wie auch in Pelletkultur konnte bei Beurteilung des Expressionslevels der osteogenen Marker Kollagen 10 und Cbfa1 eine positive Korrelation mit steigenden Mankin-Score-Werten beobachtet werden. Dies weist auf ein bereits herabgesetztes chondrogenes Potential der Chondrozyten hin. Es gilt eine klinische Verwendung dieser Zellen somit sorgfältig abzuwägen. Je höher der erhobene Score, desto wahrscheinlicher sind bei den gewonnenen FAI-Chondrozyten qualitative Einbußen in Bezug auf das hergestellte Transplantat zu erwarten.

Impingementzellen, bewertet mit einem Mankin-Score unterhalb der definierten Arthroschwelle ( $\leq 3$ ) zeigten eine Genexpression, vergleichbar mit dem der gesunden Kontrollgruppe. Es kann somit von einem annähernd äquivalenten, chondrogenen Potential dieser Zellen ausgegangen werden. Bereits arthrotisch veränderte FAI-Chondrozyten sollten auf Grund des Dedifferenzierungsprozesses und der zu erwartenden ungünstigeren Transplantatbeschaffenheit im klinischen Alltag nicht zur Anwendung kommen. Gewonnener FAI-Knorpel kann unter Berücksichtigung der Mankin-Score-Klassifikation sowie geeigneter, dreidimensionaler Kultivierungsbedingungen indessen ohne einen größeren zu erwartenden Qualitätsverlust als Ausgangsmaterial für eine autologe Chondrozytentransplantation in Betracht gezogen werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das femoroacetabuläre Impingement (FAI) ist eine der häufigsten präarthrotischen Deformitäten des Hüftgelenkes. Beim sog. CAM-Typ führt eine morphologische Aberration des Übergangs vom Femurkopf zum Schenkelhals bei Innenrotation und Flexion zu einem Einklemmphanomen, sowie konsekutiv v.a. acetabulär zur Knorpelschädigung. Durch die beschränkte Regenerationsfähigkeit des Knorpels muss im Falle eines größeren Defektes die Möglichkeit der Knorpeltransplantation in Betracht gezogen werden. Der weitere therapeutische Ansatz ist eine operative Abtragung des überschüssigen femoralen Knorpel-Knochenhöckers. Dieser abgetragene Knorpel wurde qualitativ untersucht und auf ein mögliches Transplantationspotential getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Knorpelproben von 15 Patienten mit femoroacetabulärem Impingement vom CAM-Typ, die aus einem Patientenkollektiv im Alter von  $29,6 \pm 9,5$  Jahren (Range: 17-45) gewonnen wurden, untersucht. Die Proben wurden mit gesundem, hyalinem Knorpel des Hüft- und Kniegelenks, sowie mit arthrotisch verändertem Knorpel des Hüftgelenks verglichen und durch den Mankin-Score histologisch klassifiziert. Die gesammelten Knorpelproben wurden zunächst unter 2D (Monolayer)-, anschließend unter 3D-Bedingungen (Pellet) unter Zugabe von Wachstumszusätzen kultiviert. Eine vergleichende Darstellung der Kultivierungssysteme erfolgte sowohl durch immunhistochemische Färbung mit Kollagen 1, Kollagen 2, Aggrecan, als auch in der qRT-PCR mit Kollagen 1, Kollagen 2, Kollagen 10, Sox9, Cbfa1. Das Wachstumsverhalten in 2D-Kultur wurde durch einen BrdU-Proliferationstest sowie die Bestimmung der Population Doubling Time (PDT) analysiert.

Die Impingement-Gruppe zeigte eine breite Streuung in der Mankin-Score Klassifikation (Range: 0-10). BrdU-Proliferationsmessung sowie PDT ergaben für die Impingement-Gruppe ein verlangsamtes Wachstum gegenüber dem gesunden Vergleichskollektiv, ähnlich arthrotisch verändertem Knorpel. Nach abgeschlossener Monolayerkultur zeigten die Impingement-Chondrozyten in der qRT-PCR im Vergleich zu einem Pool gesunder Zellen einen starken Abfall des Kol2-Expressionslevels. In der immunhistochemischen Färbung konnte jedoch nach Pellet-Kultivierung ein signifikanter Kol2-Anstieg in Impingementgruppe und gesundem Vergleichskollektiv, sowie ein Aggrecan-Anstieg in allen untersuchten Gruppen festgestellt werden. Im Vergleich Pellet- zu Monolayer-Kultur ergab auch die Auswertung der qRT-PCR einen signifikanten Anstieg des Expressionslevels von Kollagen 2 und Kollagen 10. Die gewonnenen Knorpelproben von Patienten mit femoroacetabulärem Impingement zeigten in Bezug auf

Altersverteilung, histologische Qualität sowie chondrogenes Potential ein sehr heterogenes Bild. Histologisch ließen sich sowohl gesunder, als auch arthrotisch veränderter Knorpel abgrenzen.

Die Impingement-Chondrozyten durchlaufen in Monolayerkultur einen Dedifferenzierungsprozess. Durch Pellet-Kultivierung unter Zugabe von Wachstumszusätzen konnte jedoch die Reexpression chondrozytenspezifischer Gene induziert werden. Unter Berücksichtigung geeigneter Wachstumsbedingungen kann dieser Knorpel somit potentiell für eine Verwendung im Rahmen der autologen Knorpeltransplantation in Betracht gezogen werden. V.a. jüngere Patienten könnten bei Komorbidität von acetabulärem Knorpelschaden sowie femoroacetabulärem Impingement vom CAM-Typ von der Verwendung des akzessorischen Knorpels im Rahmen der ACT profitieren. Die Knorpelproben dieser Patienten zeigten nach Kultivierung zwar im Gegensatz zu gesundem Knorpel ein verlangsamtes Wachstum, das Redifferenzierungsverhalten und chondrogene Potential war jedoch vergleichbar mit dem der gesunden Chondrozyten. Vor einer Anwendung in der klinischen Praxis sollten weiterführende Versuche in vitro sowie in vivo durchgeführt werden. Hierbei stehen die Untersuchung eines größeren Kollektivs sowie die Anwendung praxisnaher, im Rahmen der ACT verwendeter Kultivierungsverfahren im Vordergrund.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Acosta, C. A., Izal, I., Ripalda, P., Douglas-Price, A. L., Forriol, F. Gene expression and proliferation analysis in young, aged, and osteoarthritic sheep chondrocytes effect of growth factor treatment J Orthop Res 11 (2006) 2087-2094

Aigner, T., Gebhard, P. M., Schmid, E., Bau, B., Harley, V., Poschl, E. SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes Matrix Biol 4 (2003) 363-372

Akimau, P., Bhosale, A., Harrison, P. E., Roberts, S., McCall, I. W., Richardson, J. B., Ashton, B. A. Autologous chondrocyte implantation with bone grafting for osteochondral defect due to posttraumatic osteonecrosis of the hip--a case report Acta Orthop 2 (2006) 333-336

Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9 Modern Rheumatology 3 (2008) 213-219

Albrecht, C., Tichy, B., Nurnberger, S., Hosiner, S., Zak, L., Aldrian, S., Marlovits, S. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study Osteoarthritis Cartilage 10 (2011) 1219-1227

Archer Francis-West The chondrocyte. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2003) 401-404

Banerjee, P., McLean, C. R. Femoroacetabular impingement: a review of diagnosis and management Current Reviews in Musculoskeletal Medicine 1 (2011) 23-32

Barbero, A., Grogan, S., Schafer, D., Heberer, M., Mainil-Varlet, P., Martin, I. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity Osteoarthritis Cartilage 6 (2004) 476-484

Bardakos, N. V., Vasconcelos, J. C., Villar, R. N. Early outcome of hip arthroscopy for femoroacetabular impingement: the role of femoral osteoplasty in symptomatic improvement J Bone Joint Surg Br 12 (2008) 1570-1575

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 5 (2005) 640-645

Batty, L., Dance, S., Bajaj, S., Cole, B. J. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes ANZ Journal of Surgery 1-2 (2011) 18-25

Beck, M., Kalhor, M., Leunig, M., Ganz R. Hip morphology influences the pattern of damage to the acetabular cartilage The Journal of Bone and Joint Surgery (2005) 1012-1018

Beck M., L. M., Parvizi J, Boutier V, Wyss D, Ganz R. Anterior femoroacetabular impingement: part II. Midterm results of surgical treatment. Clin Orthop Relat Res. (2004) 67-73

Bekkers, J. E., Inklaar, M., Saris, D. B. Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review Am J Sports Med (2009) 148S-155S

- Bentley, G., Biant, L. C., Vijayan, S., Macmull, S., Skinner, J. A. Carrington, R. W. Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee J Bone Joint Surg Br 4 (2012) 504-509
- Bentley, G., Biant, L. C., Carrington, R. W., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A. M., Skinner, J. A. Pringle, J. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee J Bone Joint Surg Br 2 (2003) 223-230
- Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M. van den Berg, W. B. TGF-beta and osteoarthritis Osteoarthritis Cartilage 6 (2007) 597-604
- Brittberg, M. Winalski, C. S. Evaluation of cartilage injuries and repair J Bone Joint Surg Am (2003) 58-69
- 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 14 (1994) 889-895
- Bruckner, P. van der Rest, M. Structure and function of cartilage collagens Microsc Res Tech 5 (1994) 378-384
- Buckwalter, J. Articular cartilage Instr Course Lect (1983) 349-370
- Buckwalter, J. Articular cartilage injuries. Clin Orthop Relat Res. (2002) 21-37
- Buckwalter, J. Mow, V. Cartilage repair in osteoarthritis. Journal Issue (1992) 71-107
- Burman, M. S. Arthroscopy or the direct visualization of joints: an experimental cadaver study. 1931 Clin Orthop Relat Res 390 (2001) 5-9
- Byrd, J. W. Jones, K. S. Hip arthroscopy for labral pathology: prospective analysis with 10-year follow-up Arthroscopy 4 (2009) 365-368
- Byrd, J. W. Jones, K. S. Arthroscopic management of femoroacetabular impingement: minimum 2-year follow-up Arthroscopy 10 (2011) 1379-1388
- Chegini, S., Beck, M. Ferguson, S. J. The effects of impingement and dysplasia on stress distributions in the hip joint during sitting and walking: A finite element analysis Journal of Orthopaedic Research 2 (2009) 195-201
- Chromczynski Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction Analytic Biochemistry (1987) 156-159
- Chubinskaya, S., Hurtig, M. Rueger, D. C. OP-1/BMP-7 in cartilage repair Int Orthop 6 (2007) 773-781
- Chung, C. Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue Adv Drug Deliv Rev 2 (2008) 243-262
- Clohisey, J. C., St John, L. C. Schutz, A. L. Surgical Treatment of Femoroacetabular Impingement: A Systematic Review of the Literature Clinical Orthopaedics and Related Research® 2 (2009) 555-564

- Coates, E. E., Fisher, J. P. Phenotypic variations in chondrocyte subpopulations and their response to in vitro culture and external stimuli *Ann Biomed Eng* 11 (2010) 3371-3388
- Cohen, N. P., Foster, R. J., Mow, V. C. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state *J Orthop Sports Phys Ther* 4 (1998) 203-215
- Danisovic, L., Varga, I., Zamborsky, R., Bohmer, D. The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors *Exp Biol Med (Maywood)* 1 (2012) 10-17
- Darling, E. M., Athanasiou, K. A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations *J Orthop Res* 2 (2005) 425-432
- Dehne, T., Karlsson, C., Ringe, J., Sittlinger, M., Lindahl, A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation *Arthritis Res Ther* 5 (2009) 133-146
- Dell'Accio, F., De Bari, C., Luyten, F. P. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo *Arthritis Rheum* 7 (2001) 1608-1619
- Dienst, M., Kohn, D. Arthroskopische Behandlung des femoroacetabulären Impingements *Der Orthopäde* 5 (2009) 429-443
- Doerge, K. J., Sasaki, M., Kimura, T., Yamada, Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms *J Biol Chem* 2 (1991) 894-902
- Dorotka, R., Bindreiter, U., Vavken, P., Nehrer, S. Behavior of human articular chondrocytes derived from nonarthritic and osteoarthritic cartilage in a collagen matrix *Tissue Eng* 5-6 (2005) 877-886
- Dozin, B., Malpeli, M., Camardella, L., Cancedda, R., Pietrangelo, A. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects *Matrix Biol* 5 (2002) 449-459
- Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage *Cellular and Molecular Life Sciences* 19-20 (2005) 2241-2256
- Fontana, A., Bistolfi, A., Crova, M., Rosso, F., Massazza, G. Arthroscopic Treatment of Hip Chondral Defects: Autologous Chondrocyte Transplantation Versus Simple Debridement—A Pilot Study *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 3 (2012) 322-329
- Fu, F. H., Zurakowski, D., Browne, J. E., Mandelbaum, B., Erggelet, C., Moseley, J. B., Jr., Anderson, A. F., Micheli, L. J. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up *Am J Sports Med* 11 (2005) 1658-1666
- Ganz, R., Leunig, M., Leunig-Ganz, K., Harris, W. H. The etiology of osteoarthritis of the hip: an integrated mechanical concept *Clin Orthop Relat Res* 2 (2008) 264-272
- Ganz, R., Parvizi, J., Beck, M., Leunig, M., Notzli, H., Siebenrock, K. A. Femoroacetabular impingement: a cause for osteoarthritis of the hip *Clin Orthop Relat Res* 417 (2003) 112-120

- Ganz, R., Gill, T. J., Gautier, E., Ganz, K., Krugel, N., Berlemann, U. Surgical dislocation of the adult hip a technique with full access to the femoral head and acetabulum without the risk of avascular necrosis *J Bone Joint Surg Br* 8 (2001) 1119-1124
- Gedouin, J. E., May, O., Bonin, N., Nogier, A., Boyer, T., Sadri, H., Villar, R. N., Laude, F. Assessment of arthroscopic management of femoroacetabular impingement. A prospective multicenter study *Orthop Traumatol Surg Res* 8 Suppl (2010) S59-67
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. The control of chondrogenesis *J Cell Biochem* 1 (2006) 33-44
- Gollwitzer, H. Prävention der Coxarthrose durch gelenkerhaltende Hüftchirurgie. *ATOS News* (2013) 10-13
- Gollwitzer, H. Hüftarthroskopie: Ist der Boom gerechtfertigt? *Orthopädie und Rheuma* 2 (2013) 2-9
- Gollwitzer, H. Therapie von Knorpelläsionen am Hüftgelenk *Journal Issue* (2010)
- Grimaud, E., Heymann, D., Redini, F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders *Cytokine Growth Factor Rev* 3 (2002) 241-257
- Guesdon, J. L., Ternynck, T., Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 8 (1979) 1131-1139
- Hall, A. C., Bush, P. G., Davidson, M. E., Kempson, S. A. Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box *Equine Vet J* 5 (2003) 425-428
- 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) 25-32
- Harris, W. Etiology of osteoarthritis of the hip. *Clin Orthop Relat Res.* (1986) 20-33
- Harris, W. Intra-articular acetabular labrum: a possible etiological factor in certain cases of osteoarthritis of the hip *The Journal of Bone and Joint Surgery* (1979) 510-514
- Haudenschild, D. R., McPherson, J. M., Tubo, R., Binette, F. Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation *Anat Rec* 1 (2001) 91-98
- Hidaka, C., Cheng, C., Alexandre, D., Bhargava, M., Torzilli, P. A. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes *Cell Tissue Res* 1 (2006) 127-135
- Hoberg, M., Aicher, W. K., Wulker, N., Rudert, M. [Expression analysis of different collagens and cytokines in cartilage cells derived from arthrotic hip and knee joints] *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 3 (2006) 289-295
- Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects *Osteoarthritis Cartilage* 6 (2002) 432-463
- Imam, S., Khanduja, V. Current concepts in the diagnosis and management of femoroacetabular impingement *Int Orthop* 10 (2011) 1427-1435

- Imhoff, A. B., Oetli, G. M. Arthroscopic and open techniques for transplantation of osteochondral autografts and allografts in various joints *Surg Technol Int* (1999) 249-252
- Ito, K., Minka, M. A., 2nd, Leunig, M., Werlen, S., Ganz, R. Femoroacetabular impingement and the cam-effect. A MRI-based quantitative anatomical study of the femoral head-neck offset *J Bone Joint Surg Br* 2 (2001) 171-176
- Jamali, A. A., Mladenov, K., Meyer, D. C., Martinez, A., Beck, M., Ganz, R., Leunig, M. Anteroposterior pelvic radiographs to assess acetabular retroversion: High validity of the "cross-over-sign" *Journal of Orthopaedic Research* 6 (2007) 758-765
- Johnson, L. L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status *Arthroscopy* 1 (1986) 54-69
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells *Exp Cell Res* 1 (1998) 265-272
- Kielty, C. M., Kwan, A. P., Holmes, D. F., Schor, S. L., Grant, M. E. Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes *Biochem J* 2 (1985) 545-554
- Kim, I. S., Otto, F., Zabel, B., Mundlos, S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1 *Mech Dev* 2 (1999) 159-170
- Knutsen, G., Drogset, J. O., Engebretsen, L., Grontvedt, T., Isaksen, V., Ludvigsen, T. C., Roberts, S., Solheim, E., Strand, T., Johansen, O. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years *J Bone Joint Surg Am* 10 (2007) 2105-2112
- Kock, L., van Donkelaar, C. C., Ito, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status *Cell Tissue Res* 3 (2012) 613-627
- Kolettas, E., Muir, H. I., Barrett, J. C., Hardingham, T. E. Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor *Rheumatology (Oxford)* 10 (2001) 1146-1156
- Kon, E., Gobbi, A., Filardo, G., Delcogliano, M., Zaffagnini, S., Marcacci, M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years *Am J Sports Med* 1 (2009) 33-41
- Kuettner, K. E. Biochemistry of articular cartilage in health and disease *Clin Biochem* 3 (1992) 155-163
- Kusma, M., Bachelier, F., Schneider, G., Dienst, M. Femoroacetabuläres Impingement *Der Orthopäde* 5 (2009) 402-411
- Lavigne, M., Parvizi, J., Beck, M., Siebenrock, K. A., Ganz, R., Leunig, M. Anterior femoroacetabular impingement: part I. Techniques of joint preserving surgery *Clin Orthop Relat Res* 418 (2004) 61-66
- Leunig, M., Beaulé, P. E., Ganz, R. The concept of femoroacetabular impingement: current status and future perspectives *Clin Orthop Relat Res* 3 (2009) 616-622

- Leunig, M., Beck, M., Dora, C., Ganz, R. Femoroacetabuläres Impingement als Auslöser der Koxarthrose *Der Orthopäde* 1 (2006) 77-84
- Leunig, M., Ganz, R. FAI – Konzept und Ätiopathogenese *Der Orthopäde* 5 (2009) 394-401
- Lin, Z., Fitzgerald, J. B., Xu, J., Willers, C., Wood, D., Grodzinsky, A. J., Zheng, M. H. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation *J Orthop Res* 9 (2008) 1230-1237
- Lo, Y. P., Chan, Y. S., Lien, L. C., Lee, M. S., Hsu, K. Y., Shih, C. H. Complications of hip arthroscopy: analysis of seventy three cases *Chang Gung Med J* 1 (2006) 86-92
- Loeser, R. F., Pacione, C. A., Chubinskaya, S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes *Arthritis Rheum* 8 (2003) 2188-2196
- Macfarlane, R. J., Haddad, F. S. The diagnosis and management of femoro-acetabular impingement *Annals of The Royal College of Surgeons of England* 5 (2010) 363-367
- Majumdar, M. K., Wang, E., Morris, E. A. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1 *J Cell Physiol* 3 (2001) 275-284
- Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L., Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *The Journal of Bone and Joint Surgery* (1971) 523-537
- Marcacci, M., Kon, E., Delcogliano, M., Filardo, G., Busacca, M., Zaffagnini, S. Arthroscopic autologous osteochondral grafting for cartilage defects of the knee: prospective study results at a minimum 7-year follow-up *Am J Sports Med* 12 (2007) 2014-2021
- Marlovits, S., Hombauer, M., Truppe, M., Vecsei, V., Schlegel, W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes *J Bone Joint Surg Br* 2 (2004) 286-295
- Marlovits, S., Kolonja, A., Singer, P., Zeller, P., Mandl, I., Vecsei, V. Matrixgekoppelte autologe Knorpelzelltransplantation. Biomaterialien als Trägersubstanzen/Biologische Eigenschaften *Trauma Berufskrankh* (2004) 314-323
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P., Roughley, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2 (2008) 351-384
- Mauck, H., Ateshian Modeling of neutral solute transport in a dynamically loaded porous permeable implications for articular cartilage biosynthesis and tissue engineering. *J Biomech Eng.* 125 (2003) 602-614
- McCarthy, J. C., Noble, P. C., Schuck, M. R., Wright, J., Lee, J. The Otto E. Aufranc Award: the role of labral lesions to development of early degenerative hip disease *Clin Orthop Relat Res* (2001) 25-37
- McNickle, A. G., L'Heureux, D. R., Yanke, A. B., Cole, B. J. Outcomes of autologous chondrocyte implantation in a diverse patient population *Am J Sports Med* 7 (2009) 1344-1350

- Merrihew, C., Soeder, S., Rueger, D. C., Kuettner, K. E., Chubinskaya, S. Modulation of endogenous osteogenic protein-1 (OP-1) by interleukin-1 in adult human articular cartilage *J Bone Joint Surg Am* (2003) 67-74
- Metz, J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels *Journal Issue* (2001) 3-14
- Miosge, N., Hartmann, M., Maelicke, C., Herken, R. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis *Histochem Cell Biol* 3 (2004) 229-236
- Moseley, J. B., O'Malley, K., Petersen, N. J., Menke, T. J., Brody, B. A., Kuykendall, D. H., Hollingsworth, J. C., Ashton, C. M., Wray, N. P. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee *N Engl J Med* 2 (2002) 81-88
- Muir, H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules *Bioessays* 12 (1995) 1039-1048
- Murakami, S., Lefebvre, V., de Crombrughe, B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  *J Biol Chem* 5 (2000) 3687-3692
- Murray, R. The aetiology of primary osteoarthritis of the hip. *Br J Radiol* 455 (1965) 810-824
- Niemeyer, P., Pestka, J. M., Salzmann, G. M., Sudkamp, N. P., Schmal, H. Influence of Cell Quality on Clinical Outcome After Autologous Chondrocyte Implantation *The American Journal of Sports Medicine* 3 (2011) 556-561
- O'Hara, U., Maroudas Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage *Annals of the Rheumatic Diseases* (1990) 536-539
- Outerbridge, R. E. The etiology of chondromalacia patellae *J Bone Joint Surg Br* (1961) 752-757
- Parvizi J, L. M., Ganz R. Femoroacetabular impingement. *J Am Acad Orthop Surg.* (2007) 561-570
- Pearson, R. G., Kurien, T., Shu, K. S., Scammell, B. E. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity *Osteoarthritis Cartilage* 3 (2011) 324-331
- Pestka, J. M., Schmal, H., Salzmann, G., Hecky, J., Sudkamp, N. P., Niemeyer, P. In vitro cell quality of articular chondrocytes assigned for autologous implantation in dependence of specific patient characteristics *Arch Orthop Trauma Surg* 6 (2011) 779-789
- 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* 374 (2000) 212-234
- Philippon, M. J., Briggs, K. K., Yen, Y. M., Koppersmith, D. A. Outcomes following hip arthroscopy for femoroacetabular impingement with associated chondrolabral dysfunction: minimum two-year follow-up *J Bone Joint Surg Br* 1 (2009) 16-23
- Poole, C. The Structure and Funktion of Articular Cartilage Matrices *Journal Issue* (1993) 1-35
- Porstmann, T., Kiessig, S. T. Enzyme immunoassay techniques. An overview *J Immunol Methods* 1-2 (1992) 5-21

- Porstmann, T., Ternynck, T., Avrameas, S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response *J Immunol Methods* 1 (1985) 169-179
- Pridie, K. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* (1959) 618-619
- Rich, J. T., Rosova, I., Nolte, J. A., Myckatyn, T. M., Sandell, L. J., McAlinden, A. Upregulation of Runx2 and Osterix during in vitro chondrogenesis of human adipose-derived stromal cells *Biochem Biophys Res Commun* 1 (2008) 230-235
- Rosenberger, R. E., Gomoll, A. H., Bryant, T., Minas, T. Repair of large chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation in patients 45 years or older *Am J Sports Med* 12 (2008) 2336-2344
- Rudert, M., Wirth, C. J. Cartilage regeneration and substitution *Orthopade* 5 (1998) W309-321
- Sadri, H., Menetrey, J., Kraus, E., Hoffmeyer, P. Arthroskopische Behandlung des femoroacetabulären Impingements *Arthroskopie* 1 (2006) 67-74
- Safran, M. R., Seiber, K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee *J Am Acad Orthop Surg* 5 (2010) 259-266
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia *Science* (1985) 1350-1354
- Sampson, T. G. Arthroscopic treatment of femoroacetabular impingement: a proposed technique with clinical experience *Instr Course Lect* (2006) 337-346
- Sato, M., Shin-ya, K., Lee, J. I., Ishihara, M., Nagai, T., Kaneshiro, N., Mitani, G., Tahara, H., Mochida, J. Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential *BMC Musculoskeletal Disord* (2012) 51-60
- Schewe, B., Fritz, J., Gaissmaier, C., Weise, K. Knorpelzelltransplantation *Der Unfallchirurg* 7 (2006) 577-582
- Schnabel, M. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture *Osteoarthritis and Cartilage* 1 (2002) 62-70
- Schulze-Tanzil, G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair *Ann Anat* 4 (2009) 325-338
- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H. J., Scheid, A., Shakibaei, M. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures *Cell Tissue Res* 3 (2002) 371-379
- Shakibaei, M., Csaki, C., Rahmanzadeh, M., Putz, R. [Interaction between human chondrocytes and extracellular matrix in vitro: a contribution to autologous chondrocyte transplantation] *Orthopade* 5 (2008) 440-447
- Sittinger, M., Perka, C., Schultz, O., Haupl, T., Burmester, G. R. Joint cartilage regeneration by tissue engineering *Z Rheumatol* 3 (1999) 130-135

- Solomon, L. Patterns of osteoarthritis of the hip *The Journal of Bone and Joint Surgery* (1974) 176-183
- Solomon, L. Geographical and anatomical patterns of osteoarthritis *British Journal of Rheumatology* (1984) 177-180
- Solomon, L. Osteoarthritis of the hip: the patient behind the disease *Annals of the Rheumatic Diseases* (1982) 118-125
- Spahn, G. Cartilage Lesions and Gonarthrosis. Part I: Physiology and Pathophysiology of Cartilage and Knee. *Akt Traumatol.* (2006) 1-13
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Rodrigo, J. J. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects *Clin Orthop Relat Res* 391 Suppl (2001) S362-369
- 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* 5 (2003) 477-484
- Streich, N. A., Gotterbarm, T., Barié, A., Schmitt, H. Prognostic value of chondral defects on the outcome after arthroscopic treatment of acetabular labral tears *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 10 (2009) 1257-1263
- Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducey, P., Karsenty, G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice *Genes Dev* 4 (2001) 467-481
- Thomas, L. Labor und Diagnose *Journal Issue* (2005)
- Torzilli, D., Rose, Schryuer Movement of interstitial water through loaded articular cartilage. *J Biomech.* (1983) 169-179
- Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R., O'Keefe, R. J. Articular cartilage biology *J Am Acad Orthop Surg* 6 (2003) 421-430
- van der Sluijs, J. A., Geesink, R. G., van der Linden, A. J., Bulstra, S. K., Kuyper, R., Drukker, J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis *J Orthop Res* 1 (1992) 58-61
- Vanwanseele, B., Lucchinetti, E., Stussi, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions *Osteoarthritis Cartilage* 5 (2002) 408-419
- Veit, C., Bauer, J., Döbler, K., Fischer, B. BQS-Qualitätsreport 2008 *Journal Issue* (2009)
- von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Gluckert, K., Stoss, H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy *Arthritis Rheum* 7 (1992) 806-811
- Wagner, H. Surgical Treatment of Osteochondrosis Dissecans, a Cause of Arthritis Deformans of the Knee *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* (1964) 335-352
- Wagner, S. Early osteoarthritic changes of human femoral head cartilage subsequent to femoro-acetabular impingement *Osteoarthritis and Cartilage* 7 (2003) 508-518

Yang, K. G., Saris, D. B., Geuze, R. E., van Rijen, M. H., van der Helm, Y. J., Verbout, A. J., Creemers, L. B., Dhert, W. J. Altered in vitro chondrogenic properties of chondrocytes harvested from unaffected cartilage in osteoarthritic joints *Osteoarthritis Cartilage* 6 (2006) 561-570

Zaucke, F., Dinser, R., Maurer, P., Paulsson, M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes *Biochem J Pt 1* (2001) 17-24

Zebala PL, S. P., Clohisy JC Anterior femoroacetabular impingement: A diverse disease with evolving treatment options *Iowa Orthop J* (2007) 71-81

Zhang, Z., McCaffery, J. M., Spencer, R. G., Francomano, C. A. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants *J Anat* 3 (2004) 229-237

Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis *Dev Dyn* 4 (1997) 377-386

Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., Lee, B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo *J Cell Biol* 5 (2003) 833-842

---

## 7. ABBIDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Mechanismus des CAM-/Pincer-Impingements.....	9
Abbildung 2: CAM-Impingement intraoperativ.....	10
Abbildung 3: Chirurgische Hüftluxation mit Darstellung der cam-Deformität am femoralen Kopf- Hals-Übergang.....	12
Abbildung 4: Rekonturierung des Schenkelhalses: intraoperative arthroskopische Aufnahme (A) vor und (B) nach Abtragung der cam-Deformität (Pfeile).....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Studienablaufs.....	20
Abbildung 6: Gliederung des Patientenkollektivs an Hand des Mankin-Scores.....	33
Abbildung 7: FAI-Chondrozyten in Monolayerkultur.....	34
Abbildung 8: Beurteilung des Proliferationsverhaltens mittels Population Doubling Time.....	35
Abbildung 9: Kol1-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur.....	38
Abbildung 10: Kol2-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur.....	39
Abbildung 11: Aggrecan-Expression in Chondrozyten nach Monolayer und Pelletkultur.....	40
Abbildung 12: Gen -Expression nach Monolayerkultur.....	42
Abbildung 13: Kol1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung.....	43
Abbildung 14: Kol2-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung.....	44
Abbildung 15: Kol10-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung.....	44
Abbildung 16: Sox9-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung.....	45
Abbildung 17: Cbfa1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Monolayerkultivierung.....	46
Abbildung 18: Übersicht Genexpression FAI-Chondrozyten nach Pelletkultur.....	47
Abbildung 19: Kol1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung.....	48
Abbildung 20: Kol2-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung.....	49
Abbildung 21: Kol10-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung.....	50
Abbildung 22: Sox9-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung.....	51
Abbildung 23: Cbfa1-Bestimmung in FAI-Chondrozyten nach Pelletkultivierung.....	52

## **8. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Outerbridge-Klassifikation.....	4
Tabelle 2: ICRS-Klassifikation .....	4
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primer .....	18
Tabelle 5: Mankin-Score Klassifikation .....	21
Tabelle 6: Wachstumsbedingungen in Monolayer .....	23
Tabelle 7: Bewertungsskala IHC.....	26
Tabelle 8: Zellpool gesund für qRT-PCR .....	29
Tabelle 10: Immunhistochemie FAI .....	37

## 9. ANHANG

### – Patienteninformation –

**zur Entnahme, Verarbeitung, Analyse und Aufbewahrung von Gewebeproben: Qualitative Untersuchungen zur Wertigkeit des Knorpelgewebes des proximalen Femurs bei femoroazetabulärem Impingement für die autologe Chondrozytentransplantation (ACT)**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

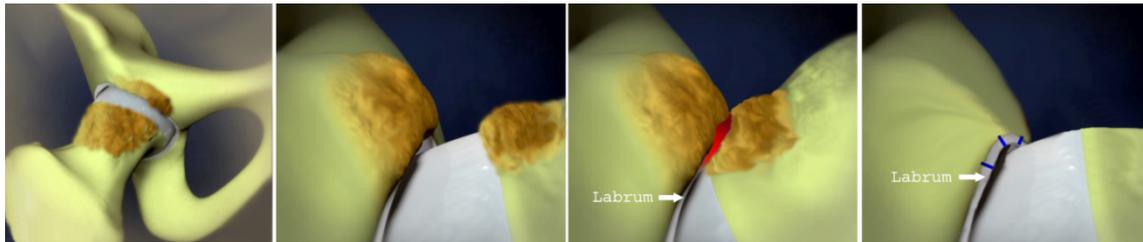
bitte lesen Sie diese Information über die geplanten Untersuchungen im Rahmen des oben genannten Vorhabens sorgfältig durch. Für weitere Fragen stehen Ihnen die Prüfarzte gerne zur Verfügung.

Wir bitten Sie, an diesem Vorhaben teilzunehmen. Sie selbst haben davon keinen unmittelbaren Nutzen, helfen aber möglicherweise mit, ein Verfahren zu entwickeln, auf dessen Grundlage anderen Patienten eine innovative therapeutische Option angeboten werden könnte.

#### Einleitung

Die Entstehung des femoroazetabulären Impingements (FAI) beruht auf Formabweichungen von Hüftpfanne bzw. körpernahe Oberschenkelknochen, meist durch knöcherne und knorpelige Anbauten. Diese überschüssigen Anbauten führen in der Konsequenz bei Bewegung des Hüftgelenks in seinem vollen Ausmaß zu einem Anschlagphänomen des Oberschenkelknochens am Becken (siehe Abbildung). Das wiederholte Anschlagen führt im Laufe der Zeit zunächst zu einem lokalisierten Knorpelschaden und ohne Behandlung später zur Arthrose des Hüftgelenkes. In der Fachsprache nennt man das Anschlagen des Oberschenkels (Femur) an der Hüftpfanne (Acetabulum) auch femoroazetabuläres Impingement (FAI).

Ziel des chirurgischen Eingriffes ist es, diese Formabweichungen und Überbauten im Rahmen einer Remodellierung des Oberschenkelhalses zu entfernen. Die so während der Operation abgetragenen Knochen- und Knorpelzellen werden normalerweise verworfen.



*Bild links: Knorpel- und Knochenanbauten an Oberschenkelknochen und Hüftpfannenrand; 2. Bild von links: Bei Beugung des Hüftgelenkes kommt es zur Annäherung der Überbauten; 2. Bild von rechts: Bei tiefer Beugung schlägt der Oberschenkel an der Hüftpfanne an; Bild rechts: Nach operativer Abtragung der Überbauten.*

Eine Möglichkeit zur Behandlung von Knorpelschäden ist die sogenannte „autologe Chondrozytentransplantation“. Chondrozytentransplantation bedeutet, dass Knorpelzellen („Chondrozyten“) übertragen werden; autolog bedeutet, dass der Spender und der Empfänger der Zellen die gleiche Person ist.

#### Wie funktioniert die autologe Chondrozytentransplantation (ACT)?

Bei der autologen Chondrozytentransplantation werden in einer ersten Operation Knorpelzellen entnommen und für die Anzucht und Vermehrung im Labor aufbewahrt. Die Entnahme der Zellen erfolgt dabei typischerweise von einer Stelle des Gelenkes, die von dem zu behandelnden Knorpelschaden entfernt liegt. Eine typische Stelle zur Entnahme von Knorpelzellen ist der Oberschenkelbereich des Kniegelenkes, denn am Hüftgelenk selbst sind noch keine Entnahmestellen etabliert. Nach Beendigung dieser ersten Operation werden die Knorpelzellen in einem zugelassenen und geprüften Labor angezchtet und nach ca. 6 Wochen in einer zweiten Operation in den zu behandelnden Knorpeldefekt eingefügt.

Für das Hüftgelenk ist die ACT bisher noch nicht etabliert und nur in Einzelfällen beschrieben. Eine der wesentlichen Limitationen ist dabei, dass für das Hüftgelenk bisher keine Entnahmestelle etabliert werden konnte, von der Knorpel entnommen werden kann, ohne das verbleibende Gelenk zu schädigen. Daher müsste also bisher eine zusätzliche Operation des gesunden Kniegelenkes zur Knorpelentnahme erfolgen.

#### Ziel der Studie

In dieser Studie soll nun untersucht werden, ob die abgetragenen und überschüssigen Knorpelzellen trotz ihrer beginnenden arthrotischen Veränderungen im Labor für einen Gewebersatz angezchtet werden können. Die Wissenschaftler erhoffen sich aus den Laborversuchen Aufschluss, ob Knorpelzellen aus den Anbauten des Oberschenkels prinzipiell für die Verwendung zur Knorpelzelltransplantation geeignet wären. Das Wachstumspotenzial der bei Patienten mit femoroazetabulärem Impingement entnommenen Knorpelzellen soll verglichen werden mit Knorpelzellen von Patienten mit gesundem Knorpel des Kniegelenkes (bisherige Entnahmestelle), gesundem Hüftknorpel und arthrotischem Hüftknorpel (Kontrollgruppen Hüftgelenk).

Sollte sich bestätigen, dass Knorpelzellen von Patienten mit FAI für eine Transplantation geeignet sind, so könnten zukünftig Patienten mit einem Knorpelschaden am Hüftgelenk von diesen Erkenntnissen profitieren. Bei einer ACT am Hüftgelenk könnte somit zukünftig auf eine zusätzliche Operation mit Knorpelentnahme am gesunden Kniegelenk verzichtet werden.

#### Ablauf der Studie

Beim operativen Eingriff wird der überschüssige Knorpel-Knochen-Höcker wie bisher vom Oberschenkelknochen abgetragen. Anstatt den Knorpelhöcker jedoch wie bisher direkt zu verwerfen wird dieser nach Beendigung des Eingriffs in einer Nährlösung für Knorpel aufbewahrt. Gleiches geschieht mit dem Knorpelgewebe der Patienten aus den Vergleichsgruppen.

Dies führt für Sie zu keiner Änderung oder Erweiterung des operativen Eingriffes. Zudem beeinträchtigt dies in keinem Fall die weitere Diagnostik oder Therapie.

Das entfernte Knorpelgewebe wird im Anschluss im Labor aufgelöst und die einzelnen Knorpelzellen werden isoliert. Über Zugabe bestimmter Nährstoffe können die Knorpelzellen im Labor zum Wachstum angeregt werden. Nachdem die Wachstumsphase abgeschlossen ist werden die Knorpelzellen analysiert. Dies geschieht durch bestimmte Färbeprozesse, über welche das Wachstumspotenzial und die biologische Potenz der gezüchteten Knorpelzellen bestimmt werden können. Die Untersuchungen sollen an Gewebe von insgesamt 15 Patienten mit FAI durchgeführt werden.

Diese Ergebnisse werden schließlich mit Knorpelzellen von Vergleichsgruppen verglichen. Zum Vergleich sollen die folgenden Gewebe untersucht werden:

- (1) Gesunder Knorpel des Kniegelenkes, welcher bei Operationen aufgrund anderer Ursachen entfernt werden muss (z.B. Patienten mit einem Tumor des körperfernen Oberschenkels, bei denen die Implantation einer speziellen Knieprothese erforderlich wird). In diese Gruppe sollen 7 Patienten aufgenommen werden.
- (2) Gesunder Knorpel des Hüftgelenkes, welcher aufgrund anderer Ursachen entfernt werden muss (z.B. Patienten mit einem Tumor des körpernahen Oberschenkels, bei denen die Implantation einer speziellen Hüftprothese erforderlich wird). In diese Gruppe sollen 7 Patienten aufgenommen werden.
- (3) Arthrotischer Hüftknorpel, welcher bei der Implantation einer Hüftprothese entfernt wird. In diese Gruppe sollen ebenfalls 7 Patienten eingeschlossen werden.

Über diesen Vergleich können Rückschlüsse auf die biologische Potenz und die Eignung der Knorpelzellen zur Knorpelzelltransplantation geschlossen werden.

**Ihre im Labor angezüchteten Zellen werden nach Abschluss der Laboruntersuchungen vernichtet! Die Zellen werden nicht zur Transplantation bei anderen Patienten verwendet!**

Die zu untersuchenden Knorpelzellen werden im Rahmen der normalen operativen Behandlung Ihrer Erkrankung entnommen! Eine zusätzliche Gewebeentnahme aufgrund der genannten Studie

erfolgt nicht. Persönlich erhalten Sie somit die gleiche operative Behandlung, unabhängig davon, ob Sie an der Studie teilnehmen oder nicht. Der einzige Unterschied besteht darin, dass bei Studienteilnahme das entfernte Gewebe bis zur Vernichtung im Labor weiter untersucht wird.

Abschließende Hinweise:

Um an dieser Studie teilzunehmen, ist Ihre Zustimmung notwendig. Stimmen Sie jedoch einer Teilnahme an dieser Studie nicht zu, wird Ihnen daraus in keiner Weise ein Nachteil entstehen. Auch zu einem späteren Zeitpunkt können Sie die Teilnahme jederzeit beenden, ohne dass Ihnen dadurch ein Nachteil entsteht.

Weitere ergänzend besprochene Punkte:

---

---

---

Vertraulichkeit der Daten und Einblicknahme in die Krankenakte

**Im Rahmen dieser Studie werden personenbezogenen Daten erhoben, gespeichert und ausgewertet. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen. Nur wenn Sie die beiliegende Datenschutzerklärung unterschreiben, können Sie an der Studie teilnehmen.**

## 10. LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

Name: Frauke Wilken  
Geburtsdatum und -Ort: 04.12.1986 in Hannover  
Familienstand: ledig, keine Kinder  
Nationalität: deutsch

### Schulabschluss

---

09/1997 – 06/2006 Abitur, Gymnasium Naila

### Studium

---

10/2006 – 05/2013 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München (klinischer Abschnitt) und Ludwig-Maximilians-Universität München (vorklinischer Abschnitt)

### praktisches Jahr

---

12/2011 – 01/2012 **Chirurgische Klinik und Poliklinik**, Rechts der Isar, München

02/2012 – 03/2012 **Abteilung für Chirurgie und Unfallchirurgie**, Concord Repatriation General Hospital Sydney, Australien

04/2012 – 07/2012 **Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie**, Klinikum rechts der Isar, München

08/2012 – 09/2012 **I. Medizinische Klinik (Kardiologie)**, Klinikum rechts der Isar, München

10/2012 – 11/2012 **III. Medizinische Klinik (Hämatonkologie)**, Klinikum rechts der Isar, München

### beruflicher Werdegang

---

seit 09/2013 Assistenzärztin an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der TU München



## 11. DANKSAGUNG

Nach intensiven Jahren - einigen Tiefs und vielen Hochs - ist die Arbeit an meiner Dissertation abgeschlossen. Es ist an der Zeit, denjenigen zu danken, die mich auf meinem Weg begleitet und in vielerlei Hinsicht zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich danken möchte ich **Herrn PD Dr. Hans Gollwitzer**, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas, die stets konstruktive Kritik an meiner Arbeit, sowie die immerwährende Unterstützung, die ich durch ihn in den letzten Jahren - auch neben der Arbeit an der Dissertation - erfahren habe.

Ich danke **Frau Jutta Tübel**, die mir immer als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen und Anregungen bereichert hat.

Weiterhin danke ich **Frau Dr. Julia Slotta-Huspenina** für die Unterstützung bei der histologischen Auswertung der Proben.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine **Mitdoktoranden**, im Speziellen an **Florian Hilz**. Ihr habt meine Zeit im Labor durch eure wissenschaftlichen Anregungen – aber auch einfach durch das gemeinsame Miteinander unglaublich bereichert.

Für die große Unterstützung, Geduld und private Entlastung bin ich meinem Freund **Max Schuler** sehr dankbar.

Und nicht zuletzt gilt ein riesen Dank **meinen Eltern**, die in jeglicher Hinsicht den Grundstein gelegt und es mir ermöglicht haben meinen Weg zu gehen.

Frauke Wilken