

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthrosetorschung

Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

**Mechanismen der frühen Chondrogenese im
Knorpeldefekt *in vivo* –
Untersuchungen des Einflusses von TGF- β 1
im translationalen Großtiermodell durch
solide Trägermaterialien und Überexpression
mittels rekombinanter adeno-assoziiierter
viraler Vektoren**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin**

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Ann-Kathrin Maria Elisabeth Asen

geboren am: 14. September 1992 in Regensburg

Für meine Eltern und Paul

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2. Einleitung	3
2.1 Thematik	3
2.2 Die osteochondrale Einheit	4
2.3 Einteilung der Knorpeldefekte	6
2.4 Klinische Relevanz von osteochondralen Defekten	7
2.5 Klinische Therapie der Knorpeldefekte	7
2.6 Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	9
2.7 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β 1)	10
2.8 Einteilung von Trägermaterialien zur Reparatur osteochondraler Defekte	11
2.9 Einteilung von Gentransfersystemen zur Reparatur osteochondraler Defekte ..	12
3. Hypothesen	13
4. Studienaufbau	14
5. Material	15
5.1 Lösungen, Puffer und Medien	15
5.2 Chemikalien	16
5.3 Biologische Materialien	16
5.3.1 Antikörper und Enzyme	16
5.3.2 Tierstämme	17
5.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
5.4.1 Großgeräte	17
5.4.2 Computersoftware	17
5.4.3 Operationsinstrumentarium und –materialien	17
5.4.4 Verbrauchsmaterialien	18
6. Methoden	19
6.1 Herstellung der Trägermaterialien	19
6.2 Herstellung der rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren	20

6.3	Großtiermodell	20
6.4	Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung	20
6.5	Evaluation des Reparaturgewebes	22
6.5.1	<i>Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	22
6.5.2	<i>Histologische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	23
6.5.3	<i>Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	29
6.5.4	<i>Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes</i>	32
6.6	Statistische Analyse der erhobenen Daten	35
7.	Ergebnisse	36
7.1	Trägermaterialien	36
7.1.1	<i>Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	36
7.1.2	<i>Histologische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	37
7.1.3	<i>Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	41
7.1.4	<i>Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes</i>	44
7.2	Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren	47
7.2.1	<i>Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	47
7.2.2	<i>Histologische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	48
7.2.3	<i>Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	50
7.2.4	<i>Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes</i>	52
7.3	Vergleich des trägermaterialbasierten mit dem gentransferbasierten Vorgehen ohne Wachstumsfaktor	55
7.3.1	<i>Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	55
7.3.2	<i>Histologische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	55
7.3.3	<i>Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	56
7.3.4	<i>Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes</i>	57
7.4	Vergleich der trägermaterialbasierten mit der gentransferbasierten Bereitstellung von TGF- β 1	59
7.4.1	<i>Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	59
7.4.2	<i>Histologische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	60
7.4.3	<i>Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes</i>	61
7.4.4	<i>Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes</i>	61
8.	Diskussion	64
8.1	Trägermaterialien	64
8.2	Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren	70

8.3 Vergleich des trägermaterialbasierten mit dem gentransferbasierten Vorgehen ohne Wachstumsfaktor	74
8.4 Vergleich der trägermaterialbasierten mit der gentransferbasierten Bereitstellung von TGF- β 1	75
8.5 Versuchsaufbau und angewandte Methoden	77
8.6 Zusammenfassung und Ausblick	78
9. Literaturverzeichnis	80
10. Publikationen	96
11. Danksagung	97
12. Lebenslauf	98

Abbildungen

Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des porcinen hyalinen Gelenkknorpels	5
Abbildung 2: Einteilung chondraler und osteochondraler Defekte	6
Abbildung 3: Übersicht verwendbarer Trägermaterialien	11
Abbildung 4: Übersicht verwendbarer Gentransfersysteme	12
Abbildung 5: Mikro-CT-Scans der Trägermaterialien in 3D-Rekonstruktion	19
Abbildung 6: Repräsentative Histologie Kondylen ohne Defekt	26
Abbildung 7: Repräsentative HE-Färbung zur Bestimmung der Histomorphometrie ..	29
Abbildung 8: Repräsentative Immunhistologie Kondylen ohne Defekt	32
Abbildung 9: Repräsentative Regionen von Interesse im Mikro-CT	34
Abbildung 10: Repräsentative makroskopische Bilder - Trägermaterialien	37
Abbildung 11: Repräsentative Histologie - Trägermaterialien	39
Abbildung 12: Repräsentative Histomorphometrie - Trägermaterialien	40
Abbildung 13: Repräsentative Typ-II-Kollagen-Immunhistologie - Trägermaterialien ..	41
Abbildung 14: Repräsentative Anti-Aggrecan-Immunhistologie - Trägermaterialien ...	42
Abbildung 15: Repräsentative TGF- β 1-Immunhistologie - Trägermaterialien	43
Abbildung 16: Repräsentative Mikro-CT-Scans - Trägermaterialien	46
Abbildung 17: Repräsentative makroskopische Bilder - rAAV	48
Abbildung 18: Repräsentative Histologie - rAAV	49
Abbildung 19: Repräsentative Histomorphometrie - rAAV	50
Abbildung 20: Repräsentative Typ-II-Kollagen-Immunhistologie - rAAV	51
Abbildung 21: Repräsentative Typ-X-Kollagen-Immunhistologie - rAAV	51
Abbildung 22: Repräsentative TGF- β 1-Immunhistologie - rAAV	52
Abbildung 23: Repräsentative Mikro-CT-Scans	54
Abbildung 24: Rolle von TGF- β 1 auf die Regulation der frühen Chondrogenese	68

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der Behandlungsarten	14
Tabelle 2: Lösungen, Puffer und Medien	15
Tabelle 3: Chemikalien	16
Tabelle 4: Antikörper und Enzyme	16
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 6: Modifiziertes Oswestry-Bewertungssystem	22
Tabelle 7: Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i>	23
Tabelle 8: Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	27
Tabelle 9: Bewertungssystem nach Fortier <i>et al.</i>	28
Tabelle 10: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität	31
Tabelle 11: Ergebnisse Oswestry-Bewertungssystem - Trägermaterialien	36
Tabelle 12: Ergebnisse Goebel-Bewertungssystem - Trägermaterialien	36
Tabelle 13: Ergebnisse Fortier-Bewertungssystem - Trägermaterialien	38
Tabelle 14: Ergebnisse Sellers-Bewertungssystem - Trägermaterialien	38
Tabelle 15: Zellularität - Trägermaterialien	40
Tabelle 16: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen - Trägermaterialien	41
Tabelle 17: Immunaktivität für Aggrecan - Trägermaterialien	42
Tabelle 18: Immunaktivität für TGF- β 1 - Trägermaterialien	43
Tabelle 19: Mikro-CT Analyse Defekt SCBP - Trägermaterialien	44
Tabelle 20: Mikro-CT Analyse angrenzende SCBP - Trägermaterialien	45
Tabelle 21: Mikro-CT Analyse Defekt SAS - Trägermaterialien	45
Tabelle 22: Mikro-CT Analyse angrenzende SAS - Trägermaterialien	46
Tabelle 23: Ergebnisse Oswestry-Bewertungssystem - rAAV	47
Tabelle 24: Ergebnisse Goebel-Bewertungssystem - rAAV	48
Tabelle 25: Ergebnisse Sellers-Bewertungssystem - rAAV	49
Tabelle 26: Zellularität - rAAV	50
Tabelle 27: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen - rAAV	50
Tabelle 28: Immunaktivität für Typ-X-Kollagen - rAAV	51
Tabelle 29: Immunaktivität für TGF- β 1 - rAAV	52
Tabelle 30: Mikro-CT Analyse Defekt SCBP - rAAV	53
Tabelle 31: Mikro-CT Analyse angrenzende SCBP - rAAV	53
Tabelle 32: Mikro-CT Analyse Defekt SAS - rAAV	54
Tabelle 33: Mikro-CT Analyse angrenzende SAS - rAAV	54
Tabelle 34: Ergebnisse Oswestry-Bewertungssystem - Kontrollen	55
Tabelle 35: Ergebnisse Goebel-Bewertungssystem - Kontrollen	55

Tabelle 36: Ergebnisse Sellers-Bewertungssystem - Kontrollen	56
Tabelle 37: Zellularität - Kontrollen	56
Tabelle 38: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen - Kontrollen	56
Tabelle 39: Immunaktivität für TGF- β 1 - Kontrollen	57
Tabelle 40: Mikro-CT Analyse Defekt SCBP - Kontrollen	57
Tabelle 41: Mikro-CT Analyse angrenzende SCBP - Kontrollen	58
Tabelle 42: Mikro-CT Analyse Defekt SAS - Kontrollen	58
Tabelle 43: Mikro-CT Analyse angrenzende SAS - Kontrollen	59
Tabelle 44: Ergebnisse Oswestry-Bewertungssystem - TGF β 1	59
Tabelle 45: Ergebnisse Goebel-Bewertungssystem - TGF β 1	60
Tabelle 46: Ergebnisse Sellers-Bewertungssystem - TGF β 1	60
Tabelle 47: Zellularität - TGF β 1	61
Tabelle 48: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen - TGF β 1	61
Tabelle 49: Immunaktivität für TGF- β 1 - TGF β 1	61
Tabelle 50: Mikro-CT Analyse Defekt SCBP - TGF β 1	62
Tabelle 51: Mikro-CT Analyse angrenzende SCBP - TGF β 1	62
Tabelle 52: Mikro-CT Analyse Defekt SAS - TGF β 1	62
Tabelle 53: Mikro-CT Analyse angrenzende SAS - TGF β 1	63

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
(r)AAV	(rekombinantes) adeno-assoziiertes Virus
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
ADSC	Stammzelle von Fettzellen ausgehend (<i>adipose derived stem cell</i>)
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
<i>aqua bidest.</i>	<i>aqua bidestillata</i> - destilliertes Wasser
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BS/BV	Knochenoberfläche/Volumen (<i>bone surface/volume</i>)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)
BV/TV	Knochenvolumenanteil (<i>bone volume fraction</i>)
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CMV-IE	Cytomegalovirus immediate-early
Ct.Th	kortikale Dicke (<i>cortical thickness</i>)
cDNS	komplementär-Desoxyribonukleinsäure
DA	Grad der Anisotropie (<i>degree of anisotropy</i>)
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i> - und andere
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)
kb	Kilobase
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hydroxyapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (<i>hepatocyte growth factor</i>)
ICRS	International Cartilage Repair Society
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
μA	Mikroampere
Mikro-CT	Mikrofokus-Computertomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)

MW	Mittelwert
NIH	Nationale Gesundheitsinstitute (<i>National Institutes of Health</i>)
NSAR	nichtsteriodale Antirheumatika
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEOT/PBT	Poly(ethylen oxid)-Terephthalat/Poly(butylen)-Terephthalat
ROI	Region von Interesse (<i>region of interest</i>)
s	Sekunde
SAS_A	angrenzende subartikuläre Spongiosa (<i>subarticular spongiosa adjacent</i>)
SAS_D	subartikuläre Spongiosa Defekt (<i>subarticular spongiosa defect</i>)
SBP_A	angrenzende subchondrale Knochenplatte (<i>subchondral bone plate adjacent</i>)
SBP_D	subchondrale Knochenplatte Defekt (<i>subchondral bone plate defect</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SMI	Struktur-Model-Index (<i>structure model index</i>)
Tb.Sp	Trabekelabstand (<i>trabecular separation</i>)
Tb.Th	Trabekeldicke (<i>trabecular thickness</i>)
Tb.N	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)
Tb.Pf	trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (<i>trabecular pattern factor</i>)
TCP	Trikalziumphosphat
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (<i>transforming growth factor beta 1</i>)
VOI	Volumen von Interesse (<i>volume of interest</i>)

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Fragestellung: Die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten ist durch eine unvollständige Chondrogenese gekennzeichnet. Die Regulierung ihrer Frühphase *in vivo* ist jedoch weitgehend unklar. Die kontinuierliche Anwesenheit des transformierenden Wachstumsfaktors beta (TGF- β) ist hierbei von entscheidender Bedeutung, um eine wirksame Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der frühen Chondrogenese unter Einfluss von TGF- β im Knorpeldefekt untersucht. Hierzu wurde der Wachstumsfaktor in osteochondralen Defekten einerseits durch verzögerte Freisetzung aus implantierten soliden Trägermaterialien, andererseits durch Überexpression mittels rekombinanter adeno-assoziiierter viraler (rAAV) Vektoren (rAAV-TGF- β 1) in einem Minischweinmodell *in vivo* bereitgestellt.

Methoden: Osteochondrale Defekte in den Femurkondylen von Minischweinen wurden einerseits mit TGF- β 1-freisetzenden Trägermaterialien (TGF- β 1-Trägermaterialien; Kontrolle: normale Trägermaterialien), andererseits mit rAAV-Vektoren (rAAV-TGF- β 1; Kontrolle: rAAV- β -Galaktosidase, rAAV-*lacZ*) behandelt. Die Knorpelreparatur wurde vier Wochen postoperativ durch etablierte makroskopische, histologische und immunhistochemische Bewertungssysteme evaluiert. Die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens wurde durch Mikrofokus-Computertomographie beurteilt.

Ergebnisse: Implantation von TGF- β 1-Trägermaterialien stellte anhaltende Konzentration von TGF- β 1 im Defekt für mindestens vier Wochen bereit und verbesserte signifikant die frühe Knorpelreparatur *in vivo*. Sowohl die frühe Aggrecan- als auch die Typ-II-Kollagen-Produktion war in spezifischen topographischen Mustern im Reparaturgewebe erhöht. TGF- β 1 erhöhte auch die Zellzahl im Reparaturgewebe signifikant, v. a. innerhalb der oberflächlichen und tiefen Zonen. Direkter Gentransfer von TGF- β 1 mittels rAAV-Vektoren führte zu einer lokalen Überexpression von TGF- β 1. Zudem wurden die zellulären und metabolischen Aktivitäten innerhalb des Defekts im Vergleich zu rAAV-*lacZ* induziert. Gleichzeitig führte diese Behandlung zu einer signifikanten Produktion von Typ-II- und Typ-X-Kollagen. Beide Strategien waren ohne Effekte die Mikrostruktur des subchondralen Knochens.

Schlussfolgerungen: Diese Daten identifizieren einen Mechanismus, durch den TGF- β 1 die frühe Chondrogenese moduliert, indem es die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht, sowie deren Differenzierung und Matrixproduktion steigert, was zu verbesserten Strukturparametern führt. Diese Daten unterstreichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 während der frühen Chondrogenese bei der Knorpelreparatur.

1.2 Abstract

Introduction: Incomplete chondrogenesis occurs during the repair of articular cartilage defects. However, regulation of its very early phases *in vivo* remains unclear. The continuous presence of transforming growth factor beta (TGF- β) is critically important to induce effective chondrogenesis of recruited mesenchymal stem cells. The present study investigated the mechanisms of TGF- β 1 on early chondrogenesis in osteochondral defects. TGF- β 1 was supplied in the osteochondral defect within continuous release of solid scaffolds and on the other hand via overexpression of recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) in a minipig model *in vivo*.

Methods: Osteochondral defects in the femoral condyles were treated on the one hand with solid scaffolds (TGF- β 1-scaffold; control: control scaffolds), on the other with recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV-TGF- β 1; control: rAAV-*lacZ*). Cartilage repair was evaluated four weeks postoperatively with established macroscopic, histological and immunohistochemical scoring systems. Reconstitution of the subchondral bone and its microarchitecture were examined by micro-computed tomography analysis.

Results: The implantation of multiblock scaffolds provided sustained presence of TGF- β 1 at four weeks and significantly promoted early overall cartilage repair *in vivo*. Furthermore, early aggrecan and type-II-collagen production were both increased in specific topographical patterns in the cartilaginous repair tissue. Sustained release of TGF- β 1 also increased the cell numbers within the repair tissue, especially within the superficial and deep zones. Direct gene transfer of TGF- β 1 via rAAV-vectors leads to a successful local overexpression of TGF- β 1. Thus, applied here it triggered the cellular and metabolic activities within the defect relative to rAAV-*lacZ*. At the same time, it led to a noticeable production of type-II- and type-X-collagen without further effects on the subchondral bone.

Conclusions: These data identify a mechanism by which TGF- β 1 modulates early chondrogenesis by primarily increasing progenitor cell number, their differentiation and matrix production, resulting in enhanced structural parameters. These data highlight the pivotal role of TGF- β 1 during early chondrogenesis in cartilage repair.

2. Einleitung

2.1 Thematik

Die Heilung von osteochondralen Defekten ist vor allem aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels ein ungelöstes Problem der klinischen Orthopädie (Madry *et al.*, 2011a; Boushell *et al.*, 2016). Bislang führt kein Therapieansatz zu einer vollständigen Regeneration des hyalinen Knorpels (Buckwalter *et al.*, 1998a und 1998b; Madry *et al.*, 2016).

Schädigungen des Gelenkknorpels gehen mit Struktur- und dadurch zusätzlich mit Funktionsverlusten einher. Dies bedingt Schmerzen einhergehend mit einer eingeschränkten Gelenkbeweglichkeit. Am häufigsten tritt diese Symptomatik bei Arthrose auf, was eine degenerative, also alters- und verschleißbedingte Schädigung des Gelenkknorpels beschreibt. Jedoch sind auch andere Mechanismen für die Entstehung von osteochondralen Defekten verantwortlich, wie traumatische Schädigungen, Osteochondrosis dissecans oder auch Entwicklungs-, Stoffwechsel- und Entzündungskrankheiten. Das Reparaturgewebe dieser Defekte besteht überwiegend aus Faserknorpel, welcher zwar eine ähnliche Struktur wie das hyaline Knorpelgewebe aufweist, allerdings nicht in der Lage ist, mechanischen Belastungen so gut Stand zu halten, wie gesunder Knorpel. Daraus resultieren wiederum stärkere Schäden des Knorpelgewebes und häufig konsekutiv eine sekundäre Arthrose (Mankin, 1982; Madry *et al.*, 2008, Orth, 2008; Simon *et al.*, 2018). Deshalb haben experimentelle Ansätze das Ziel, ein Reparatur- oder im besten Fall ein Regenerationsgewebe zu schaffen, welches mit dem hyalinen Knorpel identisch ist und somit der physiologischen Belastung besser standhält.

Zur Verbesserung der Knorpelreparatur erscheint die Anwendung von Wachstumsfaktoren, insbesondere des transformierenden Wachstumsfaktors beta1 (TGF- β 1) vielversprechend. Diese therapeutischen Faktoren sollen die Chondrogenese und damit die Knorpelreparatur verbessern, indem sie die Anzahl der Vorläuferzellen erhöhen, sowie deren Differenzierung und die Matrixsynthese verbessern (Trippel, 1997; Goldberg, 2001). Aufgrund der kurzen intraartikulären Halbwertszeit dieser Polypeptide eröffnet ein direkter Transfer der Wachstumsfaktoren in den osteochondralen Defekt die neue Möglichkeit, über einen klinisch relevanten Zeitraum eine lokale Wirkung zu erzielen (Shida *et al.*, 1996; Chuma *et al.*, 2004).

Dies kann beispielsweise durch kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus, in den Defekt implantierten, soliden Trägermaterialien realisiert werden. Die mit dem

Faktor beladenen Trägermaterialien schaffen - in den subchondralen Knochen implantiert - eine zusätzliche mechanische Stabilität und setzen über einen längeren Zeitraum kontinuierlich den gewünschten Wachstumsfaktor frei.

Ein weiterer neuer Therapieansatz ist die Anwendung von Gentransfer-Vektoren, um den Wachstumsfaktor indirekt im Defekt bereitzustellen. Eine aufgrund ihrer positiven Eigenschaften gut geeignete Klasse der Gentransfer-Vektoren sind die rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV-)Vektoren. Neben ihrer hohen Effizienz beim Transfer weisen sie eine geringe Toxizität und kaum immunogenes Potential auf (Bellavia *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Gentransfer von humanem TGF- β 1 einerseits durch solide Trägermaterialien oder andererseits durch rAAV-Vektoren die Reparatur von osteochondralen Defekten in einem Minischweinmodell *in vivo* verbessert.

2.2 Die osteochondrale Einheit

Hyaliner Gelenkknorpel ist alymphatisch, anerval, avaskulär und bradytroph (Orth, 2008). Die spezifischen Zellen des Knorpelgewebes, die Chondrozyten, machen nur ca. 10 % des Knorpelgewebes aus. Sie produzieren die sie umgebende extrazelluläre Matrix und ernähren sich mittels Diffusion von der Synovialflüssigkeit (Buckwalter, 1983). Sowohl die metabolische und mitotische Aktivität, als auch die Anzahl der Chondrozyten im hyalinen Knorpel verringern sich nach Abschluss der Wachstumsphase (Buckwalter *et al.*, 1993, 1998a und 1998b; Martin *et al.*, 2003).

Die extrazelluläre Matrix ist reich an Aggrecan und umgibt die Chondrozyten vollständig. Aggrecan zählt zu den Proteoglykanen und wird als ein Komplex aus Eiweiß und mehreren Zuckermolekülen beschrieben (Hardingham *et al.*, 1992). Die Anlagerung der Untereinheiten der Proteoglykane an Hyaluronsäure weist starke wasserbindende Eigenschaften auf. Diese bedingt deshalb den hohen hydrodynamischen Druck des Knorpelgewebes und damit die Druckelastizität (Orth, 2008).

Ein weiterer Hauptbestandteil des hyalinen Knorpels sind Kollagene Typ-II, -V, -VI, -IX, -X, -XI und -XIV. Das Typ-II-Kollagen ist mit 50 % der Trockenmasse das Hauptkollagen und somit für die spezifischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich (Bora *et al.*, 1987). Ein erhöhter Anteil an Typ-X-Kollagen wird in der metabolisch aktiven Zone des Knorpels synthetisiert.

Die Kollagene liegen in Fibrillen vor und sind arkadenartig angeordnet. Aus der tiefsten Zone steigen sie radiär auf und ziehen nach einem kurzen tangentialen Verlauf zurück in die tiefen Zonen. Hieraus ergibt sich die charakteristische vierschichtige Gliederung des hyalinen Knorpels (Orth, 2008; Abbildung 1).

Die apikale Oberfläche des Gelenkknorpels bildet eine fibröse Schicht, die sogenannte *Lamina splendens*. Eine selektive Barriere der trophischen Versorgung der Chondrozyten bilden hier zahlreiche, parallel zur Oberfläche angeordnete Kollagenfibrillen. Basal davon befindet sich eine Zone mit abgeflachten Chondrozyten, die Tangentialzone. Im weiteren Verlauf schließt sich die Transitionalzone an. Rundliche Knorpelzellen sind hier in Säulen senkrecht zur Oberfläche angeordnet. Parallel dazu verlaufen Kollagenfasern, die dem Knorpel Stabilität geben, indem sie verhindern, dass sich die einzelnen Schichten voneinander ablösen. Die Grenze zwischen kalzifiziertem Knorpelgewebe und Transitionalzone wird *Tidemark* genannt und ist nur histologisch sichtbar. Basal hierzu findet sich eine Zone kalzifizierten Knorpels mit hypertrophen Chondrozyten. Die hierdurch entstehende solide Verbindung ist für die Übertragung von Scherkräften vom Gelenkknorpel auf den subchondralen Knochen verantwortlich (Orth, 2008).

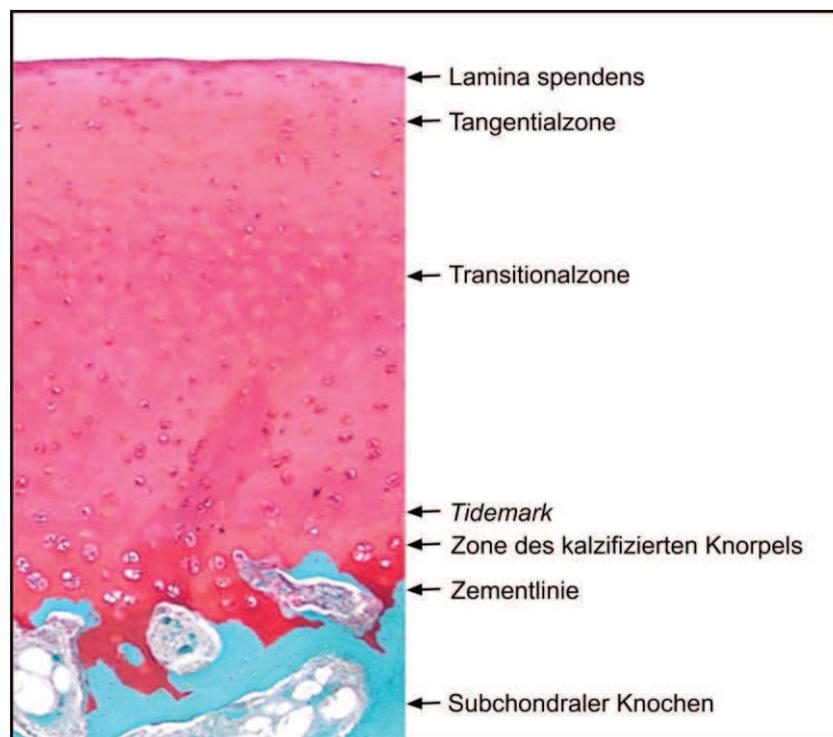


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des porcinen hyalinen Gelenkknorpels in Safranin-Orange-Färbung in 40-facher Vergrößerung (nach Orth, 2008).

2.3 Einteilung der Knorpeldefekte

Die Klassifikation der Knorpeldefekte erfolgt nach der Ausdehnungstiefe (Abbildung 2). Unter chondralen Defekten versteht man eine auf das Knorpelgewebe beschränkte Läsion. Unterteilt werden diese in teilschichtige (*partial thickness*) und vollschichtige (*full thickness*) Defekte, die bis auf die *Lamina ossea subchondralis* hinabreichen. Chondrale Knorpeldefekte können partiell durch eingewanderte Synoviozyten aufgefüllt werden (Hunziker *et al.*, 1996 und 2002; Orth, 2008).

Von osteochondralen Defekten spricht man, wenn der Defekt durch die subchondrale Knochenplatte bis in die subartikuläre Spongiosa reicht. Da hierdurch das betroffene Knorpelareal mit dem dortigen Knochenmark verbunden wird, kann sich ein Blutgerinnsel im Defekt bilden. Durch die darin enthaltenen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen bildet sich sowohl knorpeliges als auch knöchernes Reparaturgewebe (Furukawa *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 2001).

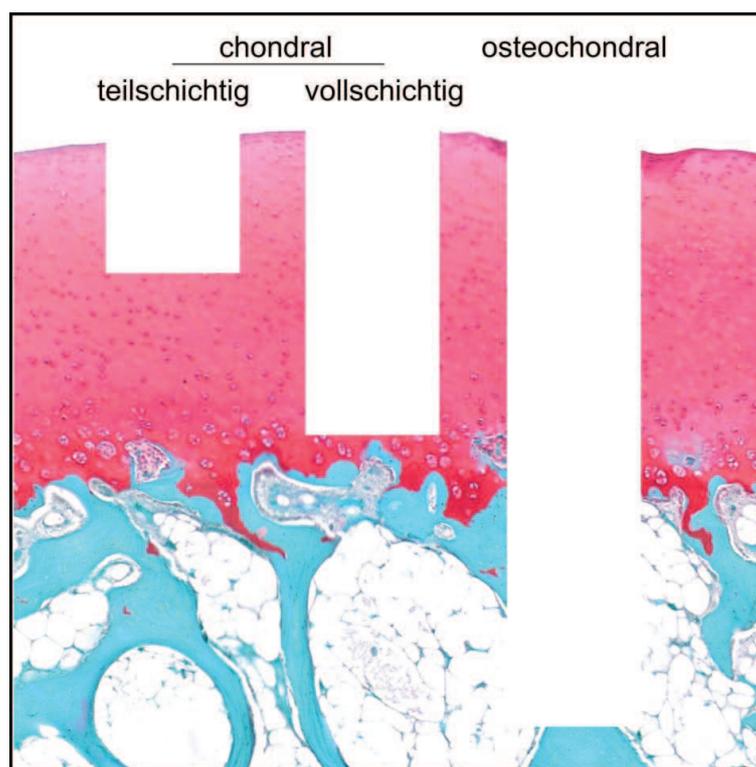


Abbildung 2: Einteilung chondraler und osteochondraler Defekte (nach Orth, 2008).

Das knorpelige Reparaturgewebe weist (unabhängig vom Typ des Defekts) bereits nach einiger Zeit faserknorpelige Eigenschaften auf und kann dadurch teilweise mechanischer Beanspruchung über längere Zeiträume nicht Stand halten, was zu einer frühzeitigen Degeneration des Reparaturgewebe führen kann (Jackson *et al.*, 2001). Häufig breitet sich auch der Defekt in angrenzende Knorpelregionen aus. Der Begriff

der Knorpelreparatur bezieht sich auf die Bildung eines Gewebes, welches makroskopisch und hinsichtlich der Zelltypen lediglich strukturelle Ähnlichkeiten mit dem originalen hyalinen Knorpel aufweist. Im Gegensatz dazu führt eine Knorpelregeneration zu einer vollständigen Ausheilung des Knorpels auf histologischer, biochemischer und biomechanischer Ebene, so dass das Gewebe nicht vom benachbarten unverletzten und gesunden Knorpel zu unterscheiden ist (Buckwalter *et al.*, 1998a und 1998b; Madry, 2004; Orth, 2008; Orth *et al.*, 2014).

Diese Einteilungen der Knorpel-Knochen-Defekte sind auch im klinischen Alltag von Bedeutung. Am bekanntesten und häufigsten verwendet sind das Oswestry-Arthroskopie-Bewertungssystem (Goebel *et al.*, 2012), sowie die Klassifikationen nach Outerbridge und der *International Cartilage Research Society* (Brittberg *et al.*, 2003), die durch eine exakte Beschreibung der Defekttiefe gekennzeichnet sind (Schmal, 2017).

2.4 Klinische Relevanz von osteochondralen Defekten

Weltweit sind Millionen Menschen von Schäden des Gelenkknorpels betroffen und v. a. in Industrieländern ist die Inzidenz weiter steigend. Die genaue Inzidenz ist nicht erfassbar, da viele Patienten von asymptomatischen Knorpeldefekten betroffen sind. So werden bei Arthroskopien bei 11 % bis 72 % der Patienten durch Zufall asymptomatische (osteo-)chondrale Defekte gefunden. Aufgrund verbesserter diagnostischer Möglichkeiten steigt die Zahl der Operationen zur Knorpelreparatur an (Curl *et al.*, 1997; Hjelle *et al.*, 2002; Arøen *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2007; Mirza *et al.*, 2015). Trotzdem führen unbehandelte Knorpeldefekte im Verlauf häufig sekundär zu Arthrose, speziell wenn eine zusätzliche Belastung des Gelenks beispielsweise durch Adipositas vorherrscht (Klets *et al.*, 2018). Das Hauptkennzeichen einer Arthrose ist der Verlust von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen, wesentlicher Komponenten der extrazellulären Matrix, durch eine fortschreitende, irreversible Degeneration. Mit diesem Verlust gehen auch Umbau und Sklerosierung des subchondralen Knochens, sowie die Bildung von subchondralen Knochenzysten und Randausziehungen, sogenannten Osteophyten einher (Buckwalter *et al.*, 1998a und 1998b; Weimer *et al.*, 2013).

2.5 Klinische Therapie der Knorpeldefekte

Die klinische Orthopädie und Unfallchirurgie verfolgt viele Ansätze, um Knorpeldefekte zu behandeln. Mit Hilfe von Analgetika wie nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR)

und Opioiden können die Schmerzen der Patienten gelindert werden (Fritz *et al.*, 2006, Simon *et al.*, 2018). Weitere konservative Maßnahmen wie frühfunktionelle Physiotherapie, orthopädietechnische Versorgung mit Orthesen oder Kryo- bzw. Elektrotherapie können die Symptomatik zusätzlich verbessern (Simon *et al.*, 2018). Vor allem kleine und nicht tiefreichende Defekte werden nach Empfehlung der *International Cartilage Repair Society* (ICRS) v. a. konservativ oder nur durch Entfernung instabiler Knorpelanteile therapiert. Diese Behandlung kann dem Patienten beispielsweise bei geringem funktionellem Anspruch und fortgeschrittenem Alter durchaus gerecht werden (Schmal, 2017).

Chirurgisch-rekonstruktive Verfahren sind bei symptomatischen Defekten indiziert. Um eine Knorpelreparatur zu induzieren, werden bei tieferen fokalen Knorpelverletzungen verschiedene rekonstruktiv-operative Behandlungsmethoden angewandt, die in zell- bzw. gewebebasierte Verfahren unterteilt werden. Die Eröffnung des Markraums zur Induktion der Bildung eines Blutgerinnsels und der damit einhergehenden Einwanderung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen wird durch verschiedene Operationstechniken für symptomatische kleine Defekte ermöglicht. Hierfür wird die Mikrofrakturierung (Steadman *et al.*, 1999), Pridie-Bohrungen (Pridie, 1959) sowie die Abrasionsarthroplastik (Johnson, 1986) verwendet. Diese führen jedoch nicht immer zu den gewünschten und langfristigen Ergebnissen (Mirza *et al.*, 2015).

Zur Reparatur von symptomatischen großflächigen und tiefgreifenden Knorpelläsionen werden hauptsächlich autologe Chondrozyten (Brittberg *et al.*, 1994; Ochi *et al.*, 2002; Schmal, 2017) in einer biologisch abbaubaren Trägersubstanz verwendet. Speziell bei unilateraler Gonarthrose mit gleichzeitig bedeutender Achsabweichung ist eine Korrektur der Beinachse durch eine Umstellungsosteotomie indiziert. Dies verringert die einseitige Belastung des Kniegelenkes und führt zur Entlastung der beschädigten Knorpelgelenkanteile.

Weiterhin können kleine osteochondrale Defekte durch autologe oder allogene osteochondrale Transplantate behandelt werden. Zylinder aus Knorpel- und Knochengewebe können im Rahmen der osteochondralen Transplantation bzw. der Mosaikplastik aus Regionen mit geringer Belastung in den Bereich der osteochondralen Defekte implantiert werden (Imhoff *et al.*, 1999; Hangody *et al.*, 2001).

Durch diese chirurgisch-rekonstruktiven Verfahren ist es meist möglich, die Gelenkfunktion zu verbessern und dadurch die Implantation eines

Gelenkoberflächenersatzes hinauszögern. Allerdings führen sie nicht zu einer vollständigen Knorpelregeneration (Madry *et al.*, 2011b).

2.6 Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Da weder die konservativen noch die operativen Verfahren zu einer Knorpelregeneration führen, werden verschiedene alternative Verfahren experimentell erprobt. Die Applikation therapeutischer Faktoren in die Defektareale ist hierbei zentral. Diese fördern anabole Prozesse, hemmen im Idealfall gleichzeitig katabole Prozesse und begünstigen hierdurch die Regeneration des Knorpels. Die Faktoren können entweder frei in die Gelenkhöhle injiziert (Jentzsch *et al.*, 1980; Rogachefsky *et al.*, 1993; van Beuningen *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2004) oder - an eine Trägersubstanz gebunden - direkt in den Defekt eingebracht werden (Sellers *et al.*, 1997; Nixon *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 2002; Mierisch *et al.*, 2002; Tuncel *et al.*, 2005; Sohler *et al.*, 2007).

Diese therapeutischen Faktoren haben die Eigenschaft, anabol stimulierend auf die Chondrogenese zu wirken, die Zellproliferation und Zellreifung im Defektgewebe zu induzieren, sowie die Matrixbiosynthese zu steigern (Trippel, 1995 und 1997; Goldberg, 2001). Diese Effekte auf Chondrozyten werden über spezifische, membrangebundene Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse induziert (Lo *et al.*, 1995; Fortier *et al.*, 2004). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit, speziell bei intraartikulärer Injektion, kann der therapeutische Effekt nur über Dosissteigerung einerseits oder kontinuierliche Freisetzung andererseits erreicht werden (Fujimoto *et al.*, 1999; Chuma *et al.*, 2004; Mizuta *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 2004).

Auch die gentransferbasierte Behandlung osteochondraler Defekte kann angewandt werden. Hierbei werden DNS-Sequenzen der therapeutischen Faktoren in die Zellen eingebracht, die das Defektareal besiedeln. Durch diese genetische Modifikation erfolgt eine kontinuierliche Abgabe der Faktoren lokal innerhalb der Läsion, welche die Aufrechterhaltung eines hohen Wirkspiegels im Defektareal bewirkt. Die Genvektoren können entweder durch Implantation genetisch modifizierter Zellen oder durch direkte Injektion in osteochondrale Defekte nach Arthrotomie appliziert werden (Cucchiari *et al.*, 2005a).

Lange Zeit war es durch direkte Injektion klassischer Gentransfermethoden wie viraler, adenoviraler oder retroviraler Systeme nicht möglich, dass die Vektoren die Knorpelmatrix penetrieren. Die Gene konnten somit nicht in die Chondrozyten

gelangen und nicht ihre Wirkung dort entfalten. Durch die Entwicklung hocheffizienter Transfersysteme wie den rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren (rAAV), konnte diese Problematik gelöst werden (Madry *et al.*, 2003b; Pascher *et al.*, 2004; Ulrich-Vinther *et al.*, 2004; Cucchiari *et al.* [ép. Madry] *et al.*, 2005b).

2.7 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β 1)

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Effekt des Transformierenden Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β 1) auf die Chondrogenese im Knorpeldefekt. TGF- β 1 gehört zur TGF- β -Superfamilie, der die zuvor genannten nötigen Eigenschaften eines Wachstumsfaktors zur Stimulierung der Chondrogenese erfüllt (Joyce *et al.*, 1990; Hanada *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2006).

Die Ausschüttung von TGF- β 1 wird sowohl direkt durch Hypoxie, als auch indirekt über Leptin und den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) induziert. Über die Rezeptoren TGF β RI und TGF β RII wird der Smad1/5/8-Signalweg aktiviert, welcher die terminale Differenzierung der Chondrozyten initiiert. Dies steht im Gleichgewicht mit der Aktivierung von Smad2/3, bei dem die antihypertrophen Effekte im Vordergrund stehen (van der Kraan *et al.*, 2009; Cucchiari *et al.* [ép. Madry] *et al.*, 2016). Zusätzlich wird durch diesen in Kombination mit der Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinase1/2* (ERK1/2) die Proliferation der Chondrozyten gesteigert und die extrazelluläre Matrix durch die Bildung von Hyaluron, Aggrecan und der Kollagene Typ-II, -IX, -X und -XI gestärkt (Zhu *et al.*, 2015; Frisch *et al.*, 2016a). Die Ergebnisse verschiedener *in vivo*-Studien bestätigen, dass der Differenzierungszustand der Chondrozyten für die Funktion des TGF- β 1-Signals ausschlaggebend ist und dass die terminale Chondrozytendifferenzierung durch TGF- β 1 gefördert wird (Grafe *et al.*, 2017).

Die kurze Halbwertszeit von TGF- β 1 limitiert einen der oben genannten therapeutischen Ansätze, die intraartikuläre Injektion (Chuma *et al.*, 2004). Bereits eine Stunde nach der Intervention ist kein Nachweis des Wachstumsfaktors in der Synovialflüssigkeit möglich (Shida *et al.*, 1996). Der therapeutische Effekt der Faktoren kann somit entweder nur über hohe Dosen (Fujimoto *et al.*, 1999) oder über eine kontinuierliche Freisetzung im Defektareal erreicht werden (Mizuta *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 2004).

2.8 Einteilung von Trägermaterialien zur Reparatur osteochondraler Defekte

Ein neuer Therapieansatz zur Reparatur osteochondraler Defekte ist die Implantation verschiedener Trägermaterialien. Diese geben dem Reparaturgewebe mechanische Stabilität und setzen auch über längere Zeiträume Wachstumsfaktoren in das Defektareal frei. Verschiedene Typen von Trägermaterialien stehen zur Reparatur von osteochondralen Defekten zur Verfügung (Abbildung 3) (Lopa *et al.*, 2014).

Für die subchondrale Regeneration können solide Trägermaterialien aus Hydroxyapatit (HA) oder Trikalziumphosphat (TCP) verwendet werden. Bei diesen integriert sich das Knochengewebe leicht in das Implantat, woraus eine hohe lokale Stabilität resultiert (Ahn *et al.*, 2009; Gotterbarm *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Im *et al.*, 2010; Marquass *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011). Auch metallische Materialien wie poröses Titan oder Tantalum unterstützen das Knochenwachstum und werden mit synthetischen Hydrogelen zu Kompositwerkstoffen kombiniert (Chang *et al.*, 1998; Mrosek *et al.*, 2010; Bal *et al.*, 2010; Lopa *et al.*, 2014).

Synthetische polymere Materialien wie Polyglykolsäure (PGA) und Polymilchsäure-Co-Glykolsäure (PLGA) eignen sich durch Eigenschaften wie der auswählbaren Porengröße besser als natürliche Materialien. Durch biphasische PLGA-Trägermaterialien mit verschiedenen Porengrößen kann sowohl das Knorpel- als auch das Knochenwachstum verbessert werden (Qi *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013; Lopa *et al.*, 2014).

Natürliche Hydrogele, die beispielsweise Fibrin oder Hyaluronsäure enthalten, werden v. a. für die Verbesserung der chondralen Reparatur genutzt. Diese zeichnen sich - verglichen mit synthetischen Materialien - durch ihre gute Interaktion mit Zellen aus, wodurch die Migration dieser in das Implantat begünstigt wird (Knutsen *et al.*, 2007; Lopa *et al.*, 2014).

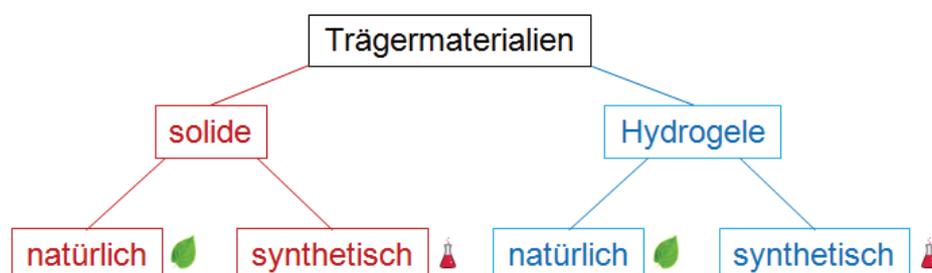


Abbildung 3: Übersicht verwendbarer Trägermaterialien.

2.9 Einteilung von Gentransfersystemen zur Reparatur osteochondraler Defekte

Gentransfersysteme können in virale und nicht-virale Systeme unterteilt werden. Sie ermöglichen eine schnelle Aufnahme von genetischem Material in die Zielzelle (Abbildung 4).

Gentransfer mit viralen Systemen wird auch als Transduktion bezeichnet. Speziell Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates wie Muskel-, Knochen- und Knorpelzellen können sehr gut durch virale Systeme transduziert werden, wie in zahlreichen Studien bestätigt werden konnte (Kawashima *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Ketola *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2007). Für die Transduktion können unterschiedliche Viren verwendet werden. Am häufigsten werden rekombinante Adeno-, Adeno-assoziierte (AAV) und Retroviren eingesetzt, seltener Herpes- oder Lentiviren (Lazo *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2003).

Die verwendeten Viren sind replikationsdefekt, um die unkontrollierte Ausbreitung im Menschen zu verhindern. Lediglich die Eigenschaft, die genetisch modifizierte Information in die Fremdzelle zu transduzieren soll genutzt werden. Jedoch verbleibt bei der Verwendung viraler Systeme stets das Risiko eine Replikations-Kompetenz zu erwerben (Crystal, 1995a und 1995b; Tripathy *et al.*, 1996). Auch die onkogenen (Anderson, 1992; Li *et al.*, 2002) und immunogenen Eigenschaften (Yei *et al.*, 1994; Bessis *et al.*, 2004; Vandenberghes *et al.*, 2007) und die damit verbundene überschießende Immunantwort sind zu berücksichtigende Faktoren. Die rAAV-Vektoren stellen das Produkt der übermittelten Gensequenz sehr effizient her, da sie zum einen keine Zellteilung oder Vektorintegration in die Zellen benötigen. Zudem wird die übermittelte DNS durch die Formierung von Konkatomeren, also Wiederholungssequenzen der DNS, geschützt (Orth, 2008; Cucchiari *et al.*, 2013; Bellavia *et al.*, 2018).

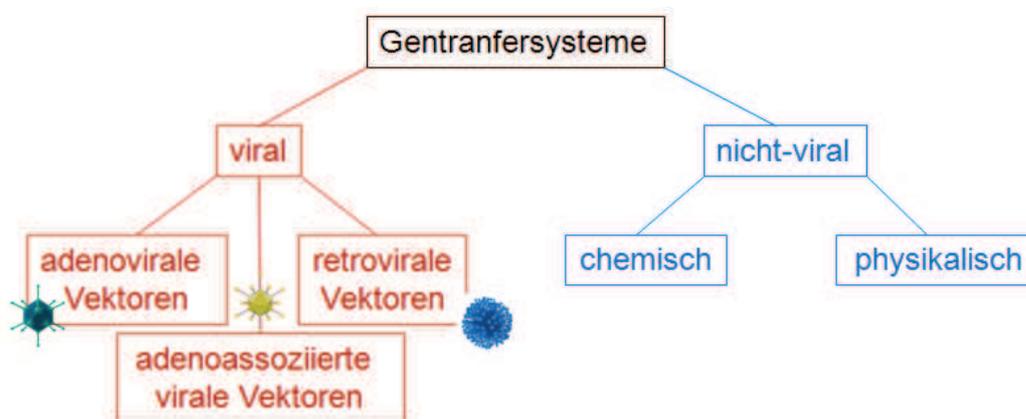


Abbildung 4: Übersicht verwendbarer Gentransfersysteme.

3. Hypothesen

In einem Modellsystem zur Reparatur osteochondraler Defekte in den Femurkondylen adulter Minischweine wurden folgende Hypothesen untersucht:

(1) Die Implantation eines kontinuierlich TGF- β 1 freisetzenden Trägermaterials („TGF- β 1-Trägermaterial“) verbessert die frühe osteochondrale Reparatur im Vergleich zum alleinigen Trägermaterial („Kontroll-Trägermaterial“).

(2) Gentransfer mit rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren, welche eine TGF- β 1 cDNS tragen („rAAV-TGF- β 1“), verbessert die frühe osteochondrale Reparatur im Vergleich zu Kontroll-Vektoren mit lacZ („rAAV-lacZ“).

(3) Die frühe osteochondrale Reparatur ist nach Implantation eines Trägermaterials ohne Wachstumsfaktor („Kontroll-Trägermaterial“) im Vergleich zu rekombinanten adeno-assoziierten viralen Kontroll-Vektoren mit lacZ („rAAV-lacZ“) verbessert.

(4) Die frühe osteochondrale Reparatur ist nach Implantation eines kontinuierlich TGF- β 1 freisetzenden Trägermaterials („TGF- β 1-Trägermaterial“) im Vergleich zum Gentransfer mit rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren, welche eine TGF- β 1 cDNS tragen („rAAV-TGF- β 1“), verbessert.

4. Studienaufbau

Im präklinischen Minischweinmodell wurden zylindrische osteochondrale Defekte (Durchmesser: 3,2 mm, Tiefe: 5,0 mm) in den Femurkondylen beider Hinterbeine erzeugt. Diese wurden in zwei Studienarmen in insgesamt vier Behandlungsgruppen eingeteilt (Tabelle 1). Im ersten Studienarm wurden stets solide Trägermaterialien aus Poly(ethylen oxid)-Terephthalat/ Poly(butylen)-Terephthalat (PEOT/PBT) implantiert. Diese wurden mit TGF- β 1 beladen („TGF- β 1-Trägermaterial“) oder alternierend als Kontrolle unbeladen gelassen („Kontroll-Trägermaterial“).

Im zweiten Studienarm wurden die Defekte je mit rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektoren behandelt. Die Defekte wurden alternierend mit TGF- β 1 („rAAV-TGF- β 1“) oder Kontrollvektoren („rAAV-*lacZ*“) behandelt.

Somit standen sich vier Behandlungsgruppen gegenüber:

Tabelle 1: Übersicht der Behandlungsarten.

Studienarm	Defektart	Behandlung	Gruppe	Bezeichnung
A	osteochondral	Trägermaterial	Kontrolle	Kontroll-Trägermaterial
	osteochondral	Trägermaterial	TGF- β 1-Behandlung	TGF- β 1-Trägermaterial
B	osteochondral	rAAV	Kontrolle <i>lacZ</i>	rAAV- <i>lacZ</i>
	osteochondral	rAAV	TGF- β 1-Behandlung	rAAV-TGF- β 1

Jeweils vier Wochen postoperativ wurde die Reparatur der osteochondralen Einheit analysiert. Es wurde die Reparatur des Gelenkknorpels mittels etablierter makroskopischer, histologischer und immunhistochemischer Methoden evaluiert. Zudem wurde per Mikro-CT die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens analysiert. Die Ergebnisse wurden untereinander und mit der normalen porcinen osteochondrale Einheit (OCE) verglichen.

5. Material

5.1 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Lösungen, Puffer und Medien.

Lösung, Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration / Menge / Volumen
Blockierungspuffer	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH=7,5)	2 Tropfen
	3'3 Diaminobenzidin (DAB)	4 Tropfen
	Substratreagenz	2 Tropfen
Echtgrün-Lösung	H ₂ O ₂	
	Echtgrün	200 mg
Entkalkungs-Lösung	H ₂ O	ad 1000 ml
	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90 %)	250 ml
Eosin-Lösung	H ₂ O	ad 750 ml
	Eosin G	10 g
Formalin-Lösung (pH 7,4)	H ₂ O	ad 2000 ml
	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
Hämatoxylin-Lösung (nach Harris)	H ₂ O	ad 1000 ml
	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100 %)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
HCl-Lösung (Salzsäure)	H ₂ O	ad 2000 ml
	HCl (40 %)	5,4 ml
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	H ₂ O	ad 200 ml
	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
Safranin-O-Lösung	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	10 mM
	Safranin-Orange	1 g
Trypsin-Lösung (0,1%)	H ₂ O	ad 1000 ml
	Trypsin-Stammlösung (25 %)	800 ml
Trypsin-Stammlösung	PBS	ad 200 ml
	Trypsin	25 % (V/V)
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3 %)	PBS	75 % (V/V)
	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	200 ml

5.2 Chemikalien

Laborchemikalien für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden vorwiegend von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen weiterer Chemikalien (Tabelle 3):

Tabelle 3: Chemikalien.

Produkt	Hersteller
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Echtgrün (FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin (4 %)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert (A & B)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraplast X-TRA	Leica (Nussloch, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylol	Fischer (Saarbrücken, Deutschland)

5.3 Biologische Materialien

5.3.1 Antikörper und Enzyme

Folgende monoklonale Antikörper und Enzyme fanden für die immunhistochemische Färbungen des Reparaturgewebes Verwendung (Tabelle 4):

Tabelle 4: Antikörper und Enzyme.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-Aggregan-IgG (ab 3778)	Maus	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-IgG (biotiniliert)	Kaninchen	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-Maus-IgG (biotiniliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-TGF- β 1-Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Typ-X-Kollagen	Maus	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin	-	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

5.3.2 Tierstämme

Ausgewachsene weibliche Minischweine (Alter 18-22 Monate, durchschnittliches Körpergewicht $38,5 \pm 5,1$ kg) wurden von Ellegaard (Dalmore, Dänemark) bezogen.

5.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

5.4.1 Großgeräte

Neben allgemeinen Laborgeräten wurden folgende Geräte verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Bosch (Gerlingern-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74 °C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana, PG, Italien)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Mikrofokus-Computertomographie-Scanner	Skyscan (Kontich, Belgien)
Mikrofokus-Computertomographie-Röntgenröhre	Hamamatsu (Hamamatso Stadt, Japan)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62 °C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wärmeschrank 37 °C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad HI 1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

5.4.2 Computersoftware

Die statistischen Analysen wurden mit „SPSS“ Version 23.0 (SPSS Inc/IBM, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Bilder des Mikro-CTs wurden mit der Software „NRecon“ (Skyscan, Kontich, Belgien) rekonstruiert, mit dem Programm „DataViewer“ (Skyscan) betrachtet und mit dem Programm „CT-Analyzer“ (Skyscan) ausgewertet. Die Bilder der histologischen Präparate wurden mit dem Programm „cellSens“ Version 1.12 (Olympus, Tokio, Japan) erstellt und mit „Adobe Photoshop CS3“ Version 6.1 (Adobe Systems, San José, CA, USA) zusammengefügt.

5.4.3 Operationsinstrumentarium und –materialien

Nahtmaterial, Spritzen und Kanülen stammten von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland). Von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen,

Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz) wurden weitere chirurgische Instrumente wie Scheren, Pinzetten, Skalpelle etc. bezogen. Die Erzeugung der osteochondralen Defekte erfolgte durch einen 3,2 mm kanülierten AO-Bohrer mit Führungshandgriff der Firma Synthes (West Chester, PA, USA).

5.4.4 Verbrauchsmaterialien

Die für die Paraffin-Einbettung benötigten Metallkassetten und Plastikabdeckungen sowie die für die histologische Auswertung benötigten Objektträger und Deckgläser wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Klingen für das Rotationsmikrotom lieferte die Firma Leica (Nussloch, Deutschland). Von den Firmen Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fischer (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) stammten sämtliche Glasbehälter und Plastikartikel.

6. Methoden

6.1 Herstellung der Trägermaterialien

Die Trägermaterialien dienen zur Einbringung des Wachstumsfaktors in den Defekt. Die gamma-sterilisierte Poly(ethylen oxid)-Terephthalat/Poly(butylen)-Terephthalat (PEOT/PBT) Trägermaterialien (Abbildung 5) wurden von der Abteilung für Gewebsregeneration der Universität Twente (Enschede, Niederlande) bezogen und von Herrn Dr. Jérôme Sohier am Institut für Proteinbiologie und -chemie des *Centre national de la recherche scientifique* (Lyon, Frankreich) durch Emulsionsbeschichtung nach folgender Vorgehensweise mit dem Wachstumsfaktor beladen (Sohier *et al.*, 2003 und 2007; Rey-Rico *et al.*, 2015c): Eine TGF- β 1 enthaltende Wasser-Öl-Emulsion wurde durch Mischen einer sterilen wässrigen TGF- β 1 Lösung mit einer 1000PEOT80PBT20-Copolymer-Lösung hergestellt. Unter aseptischen Bedingungen wurde die Emulsion durch ein Vakuum von 300 mbar in die porösen Trägermaterialien eingearbeitet, um das Innere der Trägermaterialien mit TGF- β 1 zu beladen. Diese Trägermaterialien wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff gefroren und für 24 h in einer hermetischen Box bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefriergetrocknet. Um eine Kontamination zu vermeiden wurde die Box mit einem $0,4\text{ }\mu\text{m}$ -Filter verbunden.

Für die Herstellung der Kontroll-Trägermaterialien wurde, unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, eine sterile TGF- β 1-freie 4 mM -HCl-Lösung benutzt. Die Effektivität des TGF- β 1-Einbaus in das Trägermaterial lag bei $37,1\text{ }\%$ (5 ng TGF- β 1/mg Trägermaterial) und hielt für drei Wochen an (Abgabe insgesamt von ca. $10\text{ }\%$ des Wachstumsfaktors) (Rey-Rico *et al.*, 2015c).

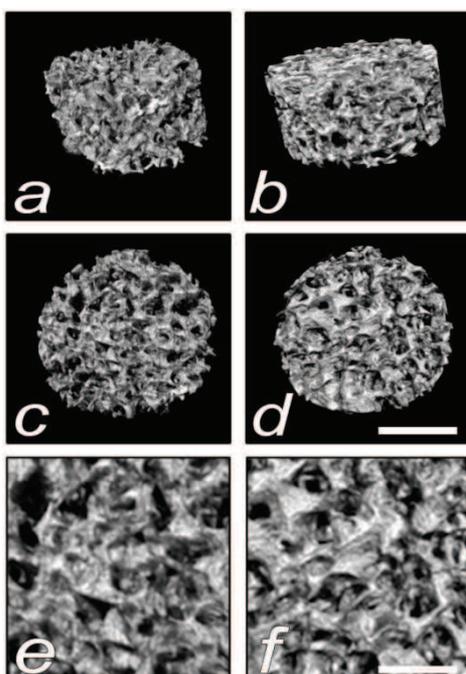


Abbildung 5: Mikro-CT-Scans der Trägermaterialien in 3D-Rekonstruktion; a, c, e: Kontroll-Trägermaterial; b, d, f: TGF- β 1-Trägermaterial; Skala a-d: 3 mm , e-f: $250\text{ }\mu\text{m}$.

6.2 Herstellung der rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren

Frau Prof. Dr. rer. nat. Cucchiarini [ép. Madry] entwickelte ein Biplasmidtransfektionssystem, bei dem unter Zuhilfenahme des Verpackungsplasmids pXX2 und des Adenovirushelferplasmids pXX6 die Vektoren rAAV-*lacZ* und rAAV-TGF- β 1 hergestellt wurden. Mit rAAV-*lacZ* ist ein *lacZ*-Gen tragendes AAV-2-basiertes Plasmid bezeichnet, das für β -Galactosidase kodiert (Samulski *et al.*, 1987 und 1989). Von rAAV-hTGF- β wird statt der *lacZ*-Sequenz ein 1,2 kb großes komplementär-DNS-(cDNS)-Fragment „pFF-hTGFB1“ (Invivogen, Toulouse, Frankreich) des menschlichen transformierenden Wachstumsfaktor beta 1 (hTGF- β 1) getragen. Beide stehen unter der Kontrolle des *Cytomegalovirus immediate-early* (CMV-IE)-Promotors.

Die Vektorpräparate wurden gereinigt und durch eine Echtzeit-PCR titriert, wodurch etwa 10^{10} transgene Kopien/ml, mit einem Verhältnis von viralem Partikel-zu-Funktionsvektor von 500/1 entstehen (Madry *et al.*, 2003b; Cucchiarini [ép. Madry] *et al.*, 2007 und 2009; Venkatesan *et al.*, 2013; Weimer *et al.*, 2013).

6.3 Großtiermodell

Alle Experimente wurden mit Genehmigung der saarländischen Tierschutzkommission (Zulassungsnummer: 70/2013) sowie in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den allgemeinen Richtlinien der Nationalen Gesundheitsinstitute der Vereinigten Staaten von Amerika (*National Institutes of Health; NIH*) für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren („*guidelines for the care and use of laboratory animals*“, NIH Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985) durchgeführt. Es wurden gesunde, ausgewachsene, weibliche Minischweine (Alter: 18-22 Monate; durchschnittliches Körpergewicht: $38,5 \pm 5,1$ kg) verwendet. Alle Schweine erhielten Wasser *ad libitum*, wurden nach einem standardisierten Ernährungsplan gefüttert und durch einen Veterinärmediziner klinisch überwacht.

6.4 Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung

Die Eingriffe erfolgen unter streng sterilen Bedingungen in den Operationssälen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren 30 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketanest S, Pfizer, Berlin, Deutschland), 2 mg/kg KG Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und je 1 mg Atropin (Atropin, B. Braun, Melsungen, Deutschland) im Stall verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere intubiert. Die Narkose wurde intravenös mit

20 ml 2%igem Propofol (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) eingeleitet und intravenös mit 6-12 mg/kg KG/h Propofol sowie inhalativ mit 1,5 % Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) aufrechterhalten.

Nach Rasur, sterilem Abwaschen und Abdecken beider Hinterläufe erfolgte der Zugang zum Kniegelenk über eine mediale parapatellare Miniarthrotomie (Operateur: Prof. Dr. med. Henning Madry, Assistenz: Ann-Kathrin Asen). Hierbei können die Femurkondylen in 60° Flexionsstellung dargestellt werden. Ein zirkulärer osteochondraler Defekt (Durchmesser 3,2 mm, Tiefe 5,0 mm mit senkrechten Randwällen zum umgebenden Knorpel) wurde mit einem 3,2 mm kanülierten AO-Bohrer mit Führungshandgriff zentral auf der medialen bzw. lateralen Femurkondyle jedes Knies erzeugt. Die Reste des Knorpels und des subchondralen Knochens wurden vollständig aus dem Defektareal entfernt. Anschließend erfolgte die Einbringung der Biomaterialien oder Genvektoren in die osteochondralen Defekte. Die medialen Kondylen wurden mit Trägermaterial versorgt (alternierend Kontroll- oder TGF- β 1-Trägermaterial) und die lateralen mit 12 μ l des rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektors (alternierend rAAV-*lacZ* bzw. rAAV-TGF- β 1). Nach Spülung der Gelenke erfolgte die passive Mobilisierung des Gelenkes. Hiernach wurde die Wunde schichtweise mit einer sorgfältigen Naht der Gelenkkapsel und resorbierbarer Hautnaht verschlossen und zusätzlich durch einen Sprühverband versiegelt.

Das postoperative Monitoring beinhaltete eine tägliche Visite mit Kontrolle der Wunde und Vitalfunktionen für mindestens zehn Tage. Jedes Tier erhielt intraoperativ, am ersten postoperativen Tag, sowie im Anschluss nach Bedarf 4 mg/kg KG Caprofen (Rimadyl, Pfizer, Berlin, Deutschland) als Analgetikum. Postoperativ erfolgte eine Analgesie mit 100 μ g/h Fentanyl transdermal (Durogesic, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland). Es erfolgte keine Entlastung oder Ruhigstellung der operierten Gelenke, da von der operativ gesetzten Knochen-, Knorpel- und Weichteilverletzung keine weitere Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens oder der Mobilität der Tiere ausging. Über den Versuchszeitraum von vier Wochen verblieben die Tiere im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Dort wurden sie für die restliche Beobachtungsdauer in Gruppen gehalten und bekamen unter kontrollierten Bedingungen Auslauf.

Am Ende der Beobachtungsdauer von vier Wochen wurden die Tiere in Allgemeinanästhesie durch eine Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Die Kniegelenke wurden entnommen und über 24 h in 4%igem Formalin fixiert. Nach der

Fixierung wurden die Proben in einer Mischung aus 70%igem Ethanol und 2,5 ml/l 100%iger Essigsäure bis zur Entkalkung und anschließenden Einbettung gelagert.

Ein Tier wurde wegen postoperativen Komplikationen zwei Tage postoperativ euthanasiert. Es verblieben für jede der vier Behandlungsgruppen je sieben Defekte zur Evaluation.

6.5 Evaluation des Reparaturgewebes

6.5.1 Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes

Vier Wochen postoperativ wurden die Defektareale während und nach der Probenentnahme fotografiert. Die makroskopische Begutachtung erfolgte verblindet anhand zweier etablierter Bewertungssysteme. Die erste Evaluation erfolgte nach dem modifizierten Oswestry-Bewertungssystem. Dieses wird im klinischen Alltag bei Arthroskopien angewandt, weshalb die Kategorie „Aufklappbarkeit des Gelenks“ in dem hier vorliegenden Studienaufbau nicht erhoben werden konnte. Bei diesem Bewertungssystem ist die vollständige Knorpelreparatur durch die maximal erreichbare Punktzahl 8 und die fehlende durch die Punktzahl 0 beschrieben (Tabelle 6). Zum anderen erfolgte eine Bewertung nach dem für experimentelle Ansätze entwickelten System nach Goebel *et al.*, in welchem die maximal erreichbare Punktzahl von 20 für eine fehlende Knorpelreparatur, die Punktzahl 0 für eine vollständige Knorpelreparatur steht (Tabelle 7, Goebel *et al.*, 2012).

Tabelle 6: Modifiziertes Oswestry-Bewertungssystem: Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	perlmutter und hyalin-ähnlich	2
	weiß	1
	gelber Knochen	0
2. Oberflächen-Beschaffenheit des Reparaturgewebes	glatt	2
	feine Unregelmäßigkeiten	1
	viele Unregelmäßigkeiten oder Fibrillationen	0
3. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	im Niveau	2
	oberhalb des Niveaus	1
	unterhalb des Niveaus	0
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	vollständig	2
	kleine Unregelmäßigkeiten (< 25 % der Fläche)	1
	große Unregelmäßigkeiten (> 25 % der Fläche)	0

Tabelle 7: Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur nach Goebel et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	hyalin oder weiß	0
	vorwiegend weiß (> 50 %)	1
	vorwiegend transparent (> 50 %)	2
	transparent	3
	kein Reparaturgewebe vorhanden	4
2. Sichtbare Blutgefäße im Reparaturgewebes	keine sichtbaren Blutgefäße	0
	< 25 % des Reparaturgewebes	1
	25-50 % des Reparaturgewebes	2
	50-75 % des Reparaturgewebes	3
3. Oberflächen-Beschaffenheit des Reparaturgewebes	glatt, homogen	0
	glatt, inhomogen	1
	Fibrillationen	2
	inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	im Niveau	0
	> 50 % der Defekttiefe ausgefüllt oder hervorstehend	1
	< 50 % der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0 % der Defekttiefe ausgefüllt Beschädigung des subchondralen Knochens	3 4
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	normal	0
	Risse und/oder Fibrillationen in der Integrationszone	1
	diffuse arthrotische Veränderungen	2
	Ausbreitung des Defekts in den angrenzenden Knorpel Beschädigung des subchondralen Knochens	3 4

6.5.2 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

6.5.2.1 Lagerung und Entkalkung

Vier Wochen nach der Operation wurden die Proben entnommen, für 24 h in 4%igem Formalin gelagert und dann in eine Mischung aus 70%igem Ethanol und 2,5 ml/l 100%iger Essigsäure überführt. Während der Aufnahmen im Mikro-CT wurden die Proben für jeweils 10 h in 70%igem Ethanol gelagert. Anschließend wurden sie zur Entkalkung in eine Lösung aus Natriumcitrat, 90%iger Ameisensäure und H₂O gelegt. Die Lösung wurde nach drei Wochen gewechselt und die Proben konnten nach insgesamt fünf Wochen eingebettet werden.

6.5.2.2 Einbetten der Proben

Die Proben wurden zunächst zugeschnitten. Speziell der Defektbereich war von Interesse, sodass am distalen Defektende direkt am Defekt geschnitten wurde und am proximalen ca. einen mm dahinter, wodurch die Länge des Präparats noch ca. 0,4 cm betrug.

Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe, jeweils 90 min in 70%igem und 80%igem Ethanol, je 75 min in zweimal 95%igem und zweimal in 100%igem Ethanol entwässert und zweimal 30 min in Xylol gelagert. Anschließend ruhten sie zunächst für 90 min in einem 1:1 Xylol-Paraffin-Gemisch bei 62 °C (Wärmeschrank), welches über Nacht für 10 h durch 62 °C warmes, flüssiges Paraffin ersetzt wurde. Am Folgetag wurde das Paraffin nochmals gewechselt und die Proben verblieben weitere 2 h bei 62 °C. Danach wurden die Proben, mit der distalen Seite Richtung Arbeitsfläche zeigend, in mit flüssigem Paraffin gefüllte Metallkassetten schrittweise einbettet und direkt für 5 min auf die Eisplatte zur Kühlung überführt und im Anschluss bei -20 °C (Gefrierschrank) gelagert.

6.5.2.3 Schneiden der Paraffinblöcke

Die Paraffinblöcke wurden bei -20 °C gelagert, um ein besseres Schnittergebnis durch das härtere Paraffin zu erzielen. Zudem wurden sie kurz vor dem Schneiden mit dem Rotationsmikrotom auf eine Kühlplatte (Leica) gelegt, um die Oberfläche lokal noch stärker zu kühlen. Pro Probe wurden 60 jeweils 3 µm dicke Schnitte aus der Mitte des Defekts (Breite ca. 1,5 mm) hergestellt, welche direkt in ein 24 °C warmes Wasserbad überführt wurden, wodurch jeweils zwei Schnitte faltenfrei auf 20 manuell mit 2,5%igem Albumin (Sigma) beschichtete Objektträger sowie auf 10 SuperFrost® Plus Objektträger speziell für die Immunfärbungen aufgebracht werden konnten. Im Anschluss wurden sie auf der Wärmeplatte ca. 1 h bei 42 °C gelagert. Über Nacht wurden sie bei 62 °C zur vollständigen Aushärtung gebracht.

6.5.2.4 Safranin Orange/Fast Green-Färbung

Als Vorbereitung wurden die Proben nach der Entparaffinierung zweimal für 5 min in Xylol und noch jeweils zweimal 2,5 min in 100%igem und 95%igem, sowie einmal für 2,5 min in 80%igem Ethanol hydriert.

Durch die Safranin Orange/Fast Green-Färbung lässt sich v. a. der Knorpelchemismus gut differenzieren, da das Ausmaß der roten Färbung direkt den Proteoglykangehalt des Gewebes angibt. Azidophile (basische) Strukturen, wie das Zytoplasma, Kollagen und die Kernmembran färben sich grün an, basophile (saure) Strukturen, wie Zellkerne, Chromosomen und Nucleoli dunkelrot bis violett-schwarz (Abbildung 6a). Die Proben wurden 10 min in Hämatoxylin Weigert gefärbt, anschließend durch kurzes Eintauchen in drei verschiedene Behälter mit Leitungswasser gespült, bevor sie 5 min in die 0,02%ige Echtgrün-Lösung überführt wurden. Zum Anrauen wurden die Proben dreimal in 1%ige Essigsäure eingetaucht (2 ml 100%ige Essigsäure in 200 ml H₂O) und im Anschluss 8 min mit Safranin-O koloriert. Nach Spülung in Leitungswasser für 10 s, erfolgte die Dehydrierung für jeweils 30 s in 80%igem, 95%igem und 100%igem Ethanol sowie zweimal 5 min in Xylol. Im Anschluss wurden die Proben mit Roti-Histokitt II eingedeckt und trockneten über Nacht.

6.5.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Entparaffinierung und Hydratation erfolgten wie unter Punkt 6.5.2.4 beschrieben. Durch den natürlichen Farbstoff Hämatoxylin werden basophile (saure) Strukturen, wie der Zellkern und die DNS, blau-violett gefärbt. Im Gegensatz dazu markiert Eosin, ein synthetischer Farbstoff, azidophile (basische) Strukturen, wie die Proteine des Zytoplasmas und das Fasergeflecht des Bindegewebes, rot/orange (Abbildung 6b).

Anschließend wurden die Schnitte zunächst 10 min in Hämatoxylin nach Harris gefärbt, durch dreimaliges Eintauchen in Leitungswasser gewaschen und in 1%iger Salzsäure für 10 s entfärbt. Nach der Bläuung in 60 °C warmem Leitungswasser für 4 min, erfolgte die erneute Färbung in Hämatoxylin nach Harris für 2,5 min. Nach der erneuten Spülung mit Leitungswasser wurden die Proben 30 s in Eosin gefärbt, wonach sie wieder 10 s in Leitungswasser gespült wurden. Die Entwässerung, sowie das Eindecken und Aushärten erfolgten wie unter Punkt 6.5.2.4 beschrieben.

6.5.2.6 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Entparaffinierung und Hydratation erfolgten wie unter Punkt 6.5.2.4 beschrieben. Diese klassische Trichrom-Färbung färbt die Zellkerne mit Eisenhämatoxylin nach Weigert braun-schwarz, das Zellplasma mit Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin rot, Muskulatur mit Orange G leuchtend orange und Bindegewebsfasern mit Lichtgrün grün an (Abbildung 6c).

Die Schnitte wurden im Anschluss 10 min in Hämatoxylin nach Weigert gefärbt, in *aqua bidest.* gewaschen, für 10 min mit Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin gefärbt und im Anschluss 1 min in 0,5%iger Essigsäure entfärbt. Dann wurden sie 5 min in Orange G und 8 min in Lichtgrün gefärbt. Dazwischen wurden sie jeweils wiederum 1 min in 0,5%iger Essigsäure entfärbt. Die Entwässerung, sowie das Eindecken und Aushärten erfolgten wie unter Punkt 6.5.2.4 beschrieben.

6.5.2.7 Histologische Evaluation des osteochondralen Reparaturgewebes nach Sellers

Durch die Safranin-O-Färbung und die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung ließen sich der Knorpel, die Spongiosa sowie das Reparaturgewebe gut beurteilen (Abbildung 6). Die Polarisationsmikroskopie wurde verwendet, um die Kollagenfasern des Reparaturgewebes darstellen zu können (Orth *et al.*, 2013a). Die Evaluation des Reparaturgewebes erfolgte mittels eines etablierten Bewertungssystems zur Knorpelregeneration dem komplexen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* (Sellers *et al.*, 1997; Orth *et al.*, 2012b). Die maximale Punktzahl von 31 Punkten beschreibt einen leeren Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe, 0 Punkte die vollständige Reparatur des Defekts mit hyalinem Knorpel (Tabelle 8). Bei der Evaluation der Trägermaterialien wurde zusätzlich das inverse Bewertungssystem nach Fortier *et al.* angewandt, bei dem eine maximale Punktzahl von 20 Punkten einen leeren Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe, 0 Punkte die vollständige Reparatur des Defekts mit hyalinem Knorpel darstellen (Tabelle 9, Orth *et al.*, 2012b). Bei 28 Proben wurden insgesamt mehr als 224 Schnitte (mind. 8 Schnitte/Probe) in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung verblindet evaluiert.

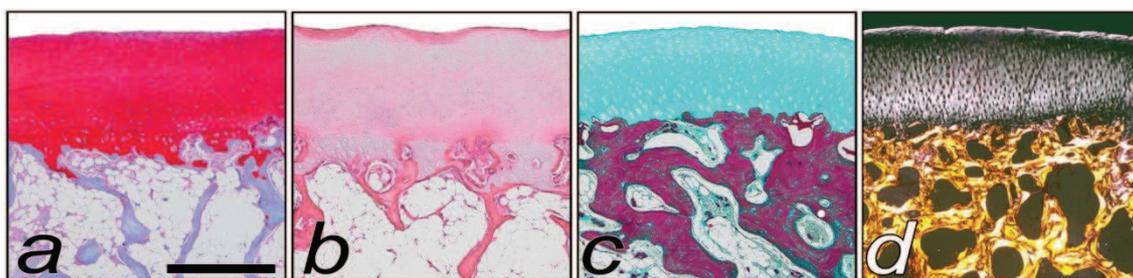


Abbildung 6: Repräsentative Histologie Kondylen ohne Defekt; a: Safranin-O-Färbung, b: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, c: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung, d: Polarisationsmikroskopie zur Darstellung der Kollagenfasern; Skala: 1 mm.

Tabelle 8: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel	91 – 110 %	0
	76 – 90 % oder 111 – 125 %	1
	51 – 75 %	2
	26 – 50 %	3
	< 25 %	4
2. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	normale Kontinuität	0
	verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O	normal	0
	leicht vermindert	1
	mittelstark vermindert	2
	stark vermindert	3
	keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie	4.1 normal	0
	4.2 überwiegend runde Zellen. Chondrozytenmorphologie:	
	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	4.3 ca. 50 % runde Zellen. Chondrozytenmorphologie:	
	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
	4.4 Vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	normal	0
	leichte Fibrillationen	1
	mittelstarke Fibrillationen	2
	starke Fibrillationen	3
7. Neubildung des subchondralen Knochens unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	90 – 100 %	0
	75 – 89 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4
8. Tidemark	vollständig	0
	75 – 89 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4

Tabelle 9: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Fortier et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	91 – 110 %	0
	76 – 90 % oder 111 – 125 %	1
	51 – 75 %	2
	26 – 50 %	3
	< 25 %	4
2. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	normale Kontinuität	0
	Spalte auf einer Seite	1
	Spalte auf beiden Seiten	2
3. Oberflächenarchitektur Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	normal, glatt	0
	leichte Fibrillationen	1
	mittelstarke Fibrillationen	2
	starke Fibrillationen	3
4. Zellmorphologie und Organisation	100 % normal	0
	> 75 % normal	1
	25 - 75 % normal	2
	< 25 % normal	3
5. Zellularität im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	normal	0
	< 10 % vermindert oder erhöht	1
	> 10 % vermindert oder erhöht	2
6. Tidemark	vollständig	0
	75 – 90 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4
7. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	normal	0
	< 25 % vermindert	1
	> 25 % vermindert	2

6.5.2.8 Bestimmung der Zellularität des Reparaturgewebes

Von jedem Defekt wurden Schnitte in Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung in 40-facher Vergrößerung betrachtet. Jeder Defekt ließ sich in sechs Gesichtsfelder unterteilen, von denen bei jeweils vieren die Zellzahl in der Gelenkknorpelzebene bestimmt wurde. Diese Gesichtsfelder mit einer Breite von 300 µm und einer Tiefe von ca. 700 µm wurden jeweils in eine oberflächliche, mittlere und tiefe Zone eingeteilt (Abbildung 7).

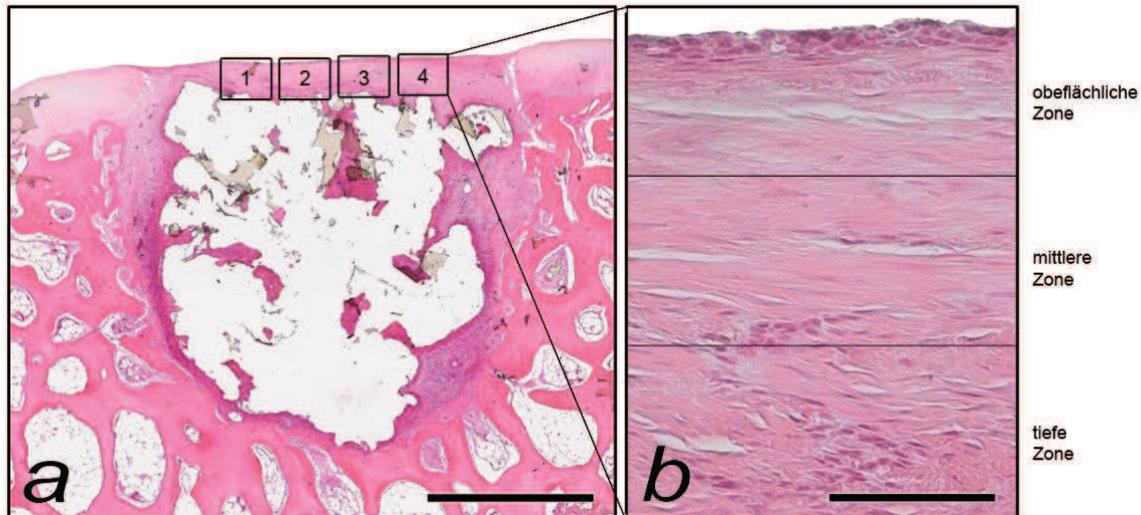


Abbildung 7: Repräsentative HE-Färbung zur Bestimmung der Zellzahl; a: Darstellung der ausgezählten Gesichtsfelder 1, 2, 3 und 4; b: Darstellung eines Gesichtsfeldes in 40-facher Vergrößerung mit Gliederung in 3 Zonen; Skala a: 2 mm, b: 300 µm.

6.5.3 Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

6.5.3.1 Typ-II-Kollagen-Färbung

Die Entparaffinierung und Hydratation erfolgten wie unter Punkt 6.5.2.4 beschrieben. Währenddessen wurden 600 µl Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit 200 ml H_2O zu 0,3%igem H_2O_2 verdünnt. In diesem wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) für je 5 min erfolgte die Inkubation der Proben in zuvor hergestelltem 0,1%igem Trypsin (200 ml H_2O und 200 µl Trypsin Stammlösung) für 10 min bei 37 °C im Wärmeschrank. Die Proben wurden zweimal in PBS für je 5 min gewaschen und 30 min bei RT mit Blockierungspuffer (200 ml PBS und 6 ml Bovines Serum Albumin, BSA) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der erste Antikörper vorbereitet: 1900 µl des Blockierungspuffers wurden mit 100 µl des Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörpers (Maus; Acris Antibodies, Herford, Deutschland) zu einer 1:20 Mischung vermischt. Um den Antikörper direkt auf die Schnitte aufzubringen und ein Auslaufen zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Roth) eingekreist, wonach je 200 µl des ersten Antikörpers auf die Schnitte aufgebracht wurde und diese in der Nasskammer über Nacht für 8 h im Kühlschrank bei 8 °C inkubiert wurden.

Am nächsten Morgen erfolgte ein zweimaliges Waschen in PBS für je 5 min, wobei währenddessen der sekundäre Antikörper (16 µl Anti-Maus-IgG [biotiniliert], Ziege, Vector Burlingame, CA, USA mit 3584 µl PBS) im Verhältnis 1:200 vorbereitet wurde. Die Nasskammer mit je 200 µl des sekundären Antikörpers wurde für 1 h bei RT inkubiert. Parallel wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz (ABC-Reagenz)

vorbereitet, indem zunächst 10 ml PBS mit zwei Tropfen A durch Schütteln vermischt wurden und dann mit zwei Tropfen B, wonach die Lösung für 30 min ruhte. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Proben dreimal in PBS für je 5 min gewaschen. Danach wurden sie mit je 200 µl ABC-Reagenz für 30 min bei RT inkubiert. Während des erneuten dreimaligen Waschens in PBS für je 5 min wurde die 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung) hergestellt: 5 ml destilliertes Wasser wurden durch Schütteln zuerst mit zwei Tropfen Puffer, dann mit vier Tropfen DAB und mit zwei Tropfen H₂O vermischt. In je 200 µl dieser Lösung wurden die Proben für 90 s bei RT inkubiert. Die braune Farbreaktion wird dadurch bewirkt, dass sich die Peroxidase des ABC-Reagenz an den sekundären Antikörper anheftet. Die Konzentration des entsprechenden Kollagens kann von der Intensität der Braunfärbung abgeleitet werden. In einem letzten Schritt erfolgte eine dreimalige Spülung in PBS für je 5 min, sowie in Leitungswasser für 1 min.

Die Proben wurden je 1 min in 80%igem, 95%igem und 100%igem Ethanol sowie zweimal 5 min in Xylol entwässert und mit dem Roti-Histokitt II (Roth) eingedeckt und über Nacht getrocknet.

6.5.3.2 Typ-X-Kollagen-Färbung

Die Vorbereitungen wie die Entparaffinierung, Hydratation und die Behandlung mit Trypsin und PBS erfolgten wie unter Punkt 6.5.3.1 beschrieben. 1960 µl des Blockierungspuffers wurden mit 40 µl des Anti-Typ-X-Kollagen-Antikörpers (Maus; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zu einer 1:50 Mischung vermischt, wobei nach Umkreisung der Proben mit einem Fettstift je 200 µl des ersten Antikörpers auf die Schnitte aufgebracht wurde und diese in der Nasskammer über Nacht für 8 h im Kühlschrank bei 8 °C inkubiert wurden. Die nachfolgenden Schritte unterschieden sich nicht von den unter 6.5.3.1 beschriebenen.

6.5.3.3 Anti-Aggregan-Färbung

Die Vorbereitungen wie die Entparaffinierung, Hydratation und die Behandlung mit Trypsin und PBS erfolgten wie unter Punkt 6.5.3.1 beschrieben. 1980 µl des Blockierungspuffers wurden mit 20 µl des Anti-Aggregan-Antikörpers (Maus; Abcam, Cambridge, Großbritannien) zu einer 1:100 Mischung vermischt, wobei nach Umkreisung der Proben mit einem Fettstift je 200 µl des ersten Antikörpers auf die Schnitte aufgebracht wurde und diese in der Nasskammer über Nacht für 8 h im

Kühlschrank bei 8 °C inkubiert wurden. Die nachfolgenden Schritte unterschieden sich nicht von den unter 6.5.3.1 beschriebenen.

6.5.3.4 Anti-TGF- β 1-Färbung

Die Vorbereitungen wie die Entparaffinierung, Hydratation und die Behandlung mit Trypsin und PBS erfolgten wie unter Punkt 6.5.3.1 beschrieben. 1960 μ l des Blockierungspuffers wurden mit 40 μ l des Anti-TGF- β 1-Antikörpers (Kaninchen; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) vermengt, um eine 1:50 Mischung zu erhalten. Nach Umkreisung der Proben mit einem Fettstift wurden je 200 μ l des ersten Antikörpers auf die Schnitte aufgebracht und diese in der Nasskammer über Nacht für 8 h bei RT inkubiert. Die nachfolgenden Schritte unterschieden sich lediglich durch die Art und Konzentration des sekundären Antikörpers (16 μ l Anti-Kaninchen-IgG [biotiniliert]; Kaninchen; Vector Burlingame, CA, USA mit 3584 μ l PBS im Verhältnis 1:200) von den unter 6.5.3.1 beschriebenen.

6.5.3.5 Evaluation der Immunaktivität für Typ-II-Kollagen

Die Immunreaktivität von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe wurde durch ein semiquantitatives Bewertungssystem evaluiert (Orth, 2008). Zur Beurteilung des Typ-II-Kollagens fungierte der normale Gelenkknorpel als Positiv- und der subchondrale Knochen als Negativkontrolle (Abbildung 8a). Die Intensität der Braunfärbung lässt Aussagen über die Immunreaktivität zu (Tabelle 10). Es wurde ein Schnitt jedes Defekts bei 20- und 40-facher Vergrößerung verblindet evaluiert.

Tabelle 10: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.

Punktevergabe	Intensität der Färbeintensität entsprechend der Immunreaktivität (stets im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle)
0	keine Immunreaktion
1	signifikant reduzierte Immunreaktion
2	moderat reduzierte Immunreaktion
3	gleiche Immunreaktion
4	höhere Immunreaktion

6.5.3.6 Evaluation der Immunaktivität für Typ-X-Kollagen

Die Immunreaktivität von Typ-X-Kollagen im Reparaturgewebe wurde durch den Prozentsatz der gefärbten Zellen evaluiert (Cucchiari *et al.*, *pending on revision*). Zur Beurteilung des Typ-X-Kollagens fungierte der Extrazellulärraum als Negativkontrolle (Abbildung 8b). Es wurde ein Schnitt jedes Defekts bei 40-facher Vergrößerung verblindet evaluiert.

6.5.3.7 Evaluation der Immunaktivität für Aggrecan

Die Immunreaktivität von Aggrecan im Reparaturgewebe wurde ähnlich wie bei Typ-II-Kollagen (6.5.3.5) durch ein semiquantitatives Bewertungssystem evaluiert (Orth, 2008). Der Intrazellulärraum fungierte als Negativkontrolle, wobei die Intensität der Braunfärbung im Vergleich beurteilt wurde (Tabelle 10). Es wurde ein Schnitt jedes Defekts bei 20- und 40-facher Vergrößerung verblindet evaluiert.

6.5.3.8 Evaluation der Immunaktivität für TGF- β 1

Die Immunreaktivität auf TGF- β 1 im Reparaturgewebe wurde ähnlich wie bei Typ-II-Kollagen (6.5.3.3) durch ein semiquantitatives Bewertungssystem evaluiert (Orth, 2008). Dabei wurde die Immunreaktivität anhand der intrazellulären Intensität der Braunfärbung im Vergleich zum Extrazellulärraum beurteilt (Abbildung 8c, Tabelle 10). Es wurde ein Schnitt jedes Defekts bei 20- und 40-facher Vergrößerung verblindet evaluiert.

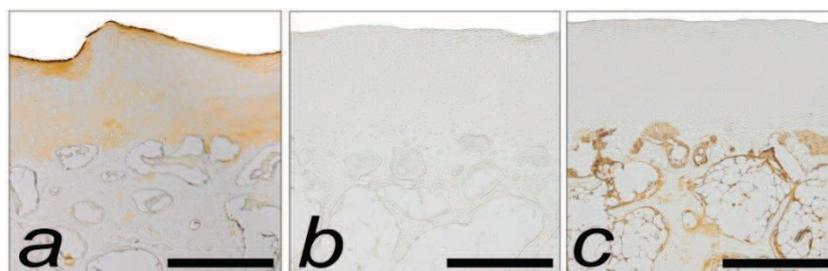


Abbildung 8: Repräsentative Immunhistologie Kondylen ohne Defekt; a: Typ-II-Kollagen-Färbung, b: Typ-X-Kollagen-Färbung, c: Anti-TGF- β 1-Färbung; Skala: 1 mm.

6.5.4 Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes

Die porcinen Kondylen (n = 28) wurden in einem Mikro-CT (Skyscan 1172) analysiert. Ausgestattet ist das Gerät mit einer drehbaren Abtastbühne, einer beweglichen

10 Megapixel Kamera, sowie einer Mikrofokus-Röntgenröhre (hohe Ortsauflösung bei Spotgröße unter 5 μm ; Hamamatsu, Japan), um eine größtmögliche Auflösung von 0,8 μm zu gewährleisten. Mit einer Röhrenspannung von 70 kV, einer Stromstärke von 141 μA und einer räumlichen Auflösung von 15 μm wurden zwischen 900-1200 16 bit Röntgenbilder pro Probe (in 70%igem Ethanol gelagert) erstellt. Zwischen Röntgenstrahlenquelle und Detektor wurde ein 0,5 mm Aluminium/Kupfer-Filter platziert. Die Kamera rotierte mit einer Belichtungszeit von 2000 ms pro Röntgenbild 0,4° um die Probe. Entsprechend empirischer Vorversuche am Schafmodell wurden die Parameter *frame averaging*, *random movement* und *ring artifact correction* mit 3, 15, 7 (jeweils ohne Einheit) gewählt. Durch einen modifizierten Feldkamp Cone-Beam Algorithmus (NRecon, Skyscan) wurden die Bilder im Anschluss rekonstruiert (Feldkamp *et al.*, 1989).

Vorversuche zeigten, dass Graustufen-Schwellenwerte von 8 bzw. 255 für die Einstellung binärer Bilder den Knochen im Vergleich zu den unbearbeiteten Rohbildern bestmöglich nachahmen. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; BMD) errechnete sich anhand der ermittelten Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten). Als Eichparameter dienten zwei Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome (in 70%igem Ethanol) mit bekannten BMD-Werten von 250 und 750 mg CaHA/cm³ (Oláh *et al.*, 2018).

6.5.4.1 Standardisierte Definition des „volume of interest“ (VOI)

Zur Ermittlung der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens wurden vier verschiedene zweidimensionale *regions of interest* (ROIs; „Regionen von Interesse“) definiert, die durch dreidimensionale Extrapolation zu vier *volumes of interest* (VOIs; „Volumen von Interesse“) hochgerechnet wurden. Die Grenzen der VOIs orientieren sich gemäß der Histologie an der subchondralen Knochenplatte, der *Linea cementalis* und der subartikulären Spongiosa. Zur Bearbeitung der Mikro-CT Bilder wurde das Programm „CT-Analyzer“ (Skyscan, 2008) verwendet.

Um die Bewertung der Mikro-CT Bilder zu standardisieren, wurden pro Probe jeweils zwei VOIs in der subchondralen Knochenplatte und zwei weitere in der subartikulären Spongiosa definiert (Abbildung 9). In der subchondralen Knochenplatte wurden folgende VOIs bestimmt: Die Defektzone wird von „subchondrale Knochenplatte Defekt“ (*subchondral bone plate defect*, SBP_D) repräsentiert. Die seitlich an die Defektzone angrenzende subchondrale Knochenplatte wurde als „angrenzende subchondrale Knochenplatte“ (*subchondral bone plate adjacent*, SBP_A) definiert.

Analog zur Unterteilung der subchondralen Knochenplatte, erfolgte diejenige der subartikulären Spongiosa. Das Defektareal bis 3 mm Tiefe wurde von „subartikuläre Spongiosa Defekt“ (*subarticular spongiosa defect*; SAS_D) beschrieben, die seitlich angrenzende Zone wieder bis zu einer Tiefe von 3 mm wurde von „angrenzende subartikuläre Spongiosa“ (*subarticular spongiosa adjacent*; SAS_A) repräsentiert.

Zwei übereinanderliegende VOIs überschreiten die Eindringtiefe der Bohrlöcher von 5 mm nicht. Zudem verliefen die Grenzen der nebeneinanderliegenden VOIs parallel zueinander, wodurch eine Überschneidung verhindert wurde. Insgesamt wurden bei den 28 operierten Kondylen 112 VOIs, bei den 16 nativen Kondylen 64 VOIs definiert. Die von den nativen Kondylen repräsentierten Normwerte werden im Folgenden als „normale osteochondrale Einheit“ (OCE) bezeichnet.

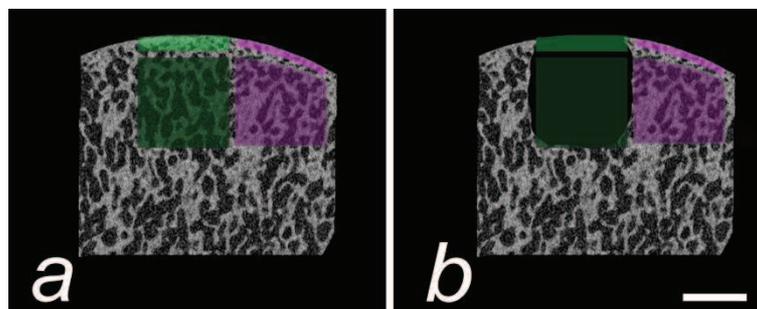


Abbildung 9: Repräsentative Regionen von Interesse in den Kondylen ohne (a) und mit Defekt (b); Grün Defektbereich, Lila an den Defekt angrenzend; oben jeweils subchondrale Knochenplatte, unten subartikuläre Spongiosa, Skala: 2 mm.

6.5.4.2 Mikro-CT Parameter

Folgende dreidimensionale Parameter (Nomenklatur der *American Society for Bone and Mineral Research*) wurden mit der CT-Analyzer-Software von Skyscan für jedes VOI berechnet:

- Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD),
- Knochenvolumenanteil (*bone volume fraction*, BV/TV),
- Knochenoberfläche/Volumen Verhältnis (*bone surface/volume ratio*, BS/BV),
- Knochenoberflächendichte (*bone surface density*, BS/TV).

In der subchondralen Knochenplatte wurde zusätzlich die kortikale Dicke (Ct.Th) bestimmt, wohingegen in der subartikulären Spongiosa folgende Parameter bestimmt wurden:

- Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th),
- Trabekelabstand (*trabecular separation*, Tb.Sp),
- Trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (*trabecular pattern factor*, Tb.Pf),
- Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N),
- Struktur-Model-Index (*structure model index*, SMI),
- Grad der Anisotropie (*degree of anisotropy*, DA),
- Fraktale Dimension (*fractal dimension*, FD).

6.6 Statistische Analyse der erhobenen Daten

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm „SPSS“ Version 23.0 (SPSS Inc/IBM, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Es wurden Vergleiche zwischen allen vier Behandlungsgruppen („Kontroll-Trägermaterial“, „TGF- β 1-Trägermaterial“, „rAAV-*lacZ*“, „rAAV-TGF- β 1“) sowie bei den Parametern der Mikro-CT-Analyse zusätzlich zwischen der porcinen „normalen osteochondralen Einheit“ durchgeführt. Da es sich hierbei um unverbundene Stichproben handelt und Mehrfachvergleiche durchgeführt wurden, galt es eine Alphafehlerkummulierung zu vermeiden. Deshalb wurde zunächst ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um eine Normalverteilung nachzuweisen. Daraufhin wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Diese zeigt an, ob es zwischen den vier bzw. fünf Gruppen signifikante Unterschiede gibt. Im Anschluss wurde der Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt, der überspannte Mittelwerte bei gleicher Stichprobengröße vergleicht und eine Aussage darüber zulässt, welche Mittelwerte sich signifikant unterscheiden. *P*-Werte $< 0,05$ (= 5 %) wurden als statistisch signifikant angesehen.

7. Ergebnisse

7.1 Trägermaterialien

7.1.1 Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes

Bei der makroskopischen Begutachtung der beiden Behandlungsgruppen (jeweils $n = 7$) stellte sich die Farbe des Reparaturgewebes sowohl bei den Kontroll-Trägermaterialien als auch bei den TGF- β 1-Trägermaterialien vorwiegend weiß dar. Blutgefäße waren durchschnittlich in 25-50 % des Reparaturgewebes sichtbar. Die Oberflächen der Defekte beider Gruppen zeigten Fibrillationen. Zusätzlich waren durchschnittlich über 50 % der Defekte mit Reparaturgewebe aufgefüllt, wobei der angrenzende Knorpel selten durch Einrisse degeneriert war.

Weder im modifizierten Oswestry-Bewertungssystem noch im Bewertungssystem nach Goebel zeigten sich signifikante Veränderungen zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($P \geq 0,918$; Abbildung 10, Tabelle 11 und Tabelle 12).

Tabelle 11: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems; 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
1. Farbe	0,86 \pm 0,90	0,71 \pm 0,76	0,991
2. Oberflächenbeschaffenheit	0,57 \pm 0,79	0,57 \pm 0,53	1,000
3. Defektfüllung	0,29 \pm 0,76	0,29 \pm 0,76	1,000
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	0,86 \pm 0,69	1,00 \pm 0,82	0,989
5. Summe	2,57 \pm 2,64	2,57 \pm 2,37	1,000

Tabelle 12: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
1. Farbe	1,43 \pm 1,27	1,43 \pm 1,27	1,000
2. Blutgefäße	2,43 \pm 1,27	2,43 \pm 1,51	1,000
3. Oberflächenbeschaffenheit	2,00 \pm 1,15	2,14 \pm 0,90	0,996
4. Defektfüllung	1,43 \pm 0,98	1,43 \pm 1,13	1,000
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	0,43 \pm 0,53	0,29 \pm 0,49	0,918
6. Summe	7,71 \pm 4,46	7,71 \pm 4,64	1,000

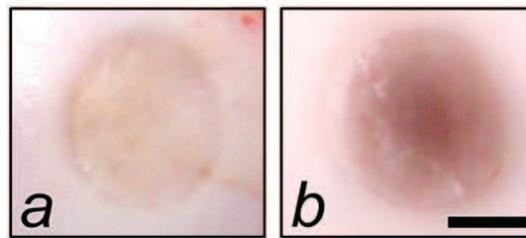


Abbildung 10: Repräsentative makroskopische Bilder des osteochondralen Defekts vier Wochen nach Implantation eines Trägermaterials ohne TGF- β 1 (a) oder mit TGF- β 1 (b); Skala 2 mm.

7.1.2 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

7.1.2.1 Histologische Evaluation nach Sellers und Fortier

Beim histologischen Bewertungssystem nach Fortier zeigte sich die Zellmorphologie bei den TGF- β 1-Trägermaterialien über 25 % normal, bei den Kontroll-Trägermaterialien unter 25 % mit einem signifikanten Unterschied von $P = 0,017$. Auch bei der Zellularität lagen die TGF- β 1-Trägermaterialien bei einer Verminderung der Zellen von < 10 %, die Kontroll-Trägermaterialien mit > 10 % darüber ($P = 0,028$). Die Matrixanfärbbarkeit war bei den Kontroll-Trägermaterialien durchschnittlich > 25 % vermindert, bei den TGF- β 1-Trägermaterialien ca. 25 % ($P = 0,027$). Auch die Summe des Bewertungssystems zeigte sich mit $P = 0,012$ signifikant unterschiedlich. Es waren keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Defektfüllung, die Integration, die Oberflächenarchitektur und die *Tidemark* erkennbar.

Die Defektfüllung war bei den Kontroll-Trägermaterialien durchschnittlich über 50 % des Niveaus, bei den TGF- β 1-Trägermaterialien darunter. Bei der Integration wiesen alle Proben beider Gruppen mindestens eine verminderte Zellularität auf, teilweise fanden sich Unterbrechungen des Reparaturgewebes auf einer Seite. Es zeigten sich mittelstarke Fibrillationen der Defektoberfläche. Die *Tidemark* war bei keiner Gruppe auszumachen (Tabelle 13).

Im Gegensatz dazu gab es bei der histologischen Evaluation nach Sellers keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Matrixanfärbbarkeit war sowohl bei den Kontroll-Trägermaterialien als auch bei den TGF- β 1-Trägermaterialien stark vermindert (< 30 %). In der Zellmorphologie konnten mit < 50 % runder Zellen vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen nachgewiesen werden. Bei beiden Gruppen zeigten sich über drei große Defekte im Reparaturgewebe („Architektur des Defektes“). Außerdem bildete sich in beiden Gruppen durchschnittlich ca. 25 % des subchondralen Knochens neu (Tabelle 14). Die Kategorien

„Defektfüllung“, „Integration“, „Oberflächenarchitektur“ und „Tidemark“ stellten sich wie beim Bewertungssystem nach Fortier dar (Abbildung 11).

Tabelle 13: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Fortier.; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
1. Defektfüllung	2,99 \pm 0,84	2,54 \pm 1,50	0,497
2. Integration	0,66 \pm 0,58	0,36 \pm 0,42	0,287
3. Oberflächenarchitektur	2,03 \pm 0,76	1,75 \pm 0,42	0,402
4. Zellmorphologie	2,57 \pm 0,53	1,57 \pm 0,79	0,017
5. Zellularität	1,71 \pm 0,49	1,00 \pm 0,58	0,028
6. Tidemark	4,00 \pm 0,00	4,00 \pm 0,00	1,000
7. Matrixanfärbbarkeit	1,91 \pm 0,16	1,58 \pm 0,31	0,027
8. Summe	15,88 \pm 2,15	12,80 \pm 1,76	0,012

Tabelle 14: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 31 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
1. Defektfüllung	2,99 \pm 0,84	2,54 \pm 1,50	0,795
2. Integration	1,66 \pm 0,58	1,36 \pm 0,42	0,569
3. Matrixanfärbbarkeit	3,44 \pm 0,63	2,76 \pm 0,85	0,409
4. Zellmorphologie	4,96 \pm 0,08	4,95 \pm 0,13	1,000
5. Defektarchitektur	3,56 \pm 0,43	3,57 \pm 0,40	1,000
6. Oberflächenarchitektur	2,03 \pm 0,76	1,75 \pm 0,42	0,811
7. Neubildung des subchondralen Knochens	3,61 \pm 0,40	3,53 \pm 0,42	0,996
8. Tidemark	4,00 \pm 0,00	4,00 \pm 0,00	1,000
9. Summe	26,26 \pm 2,52	24,92 \pm 2,45	0,201

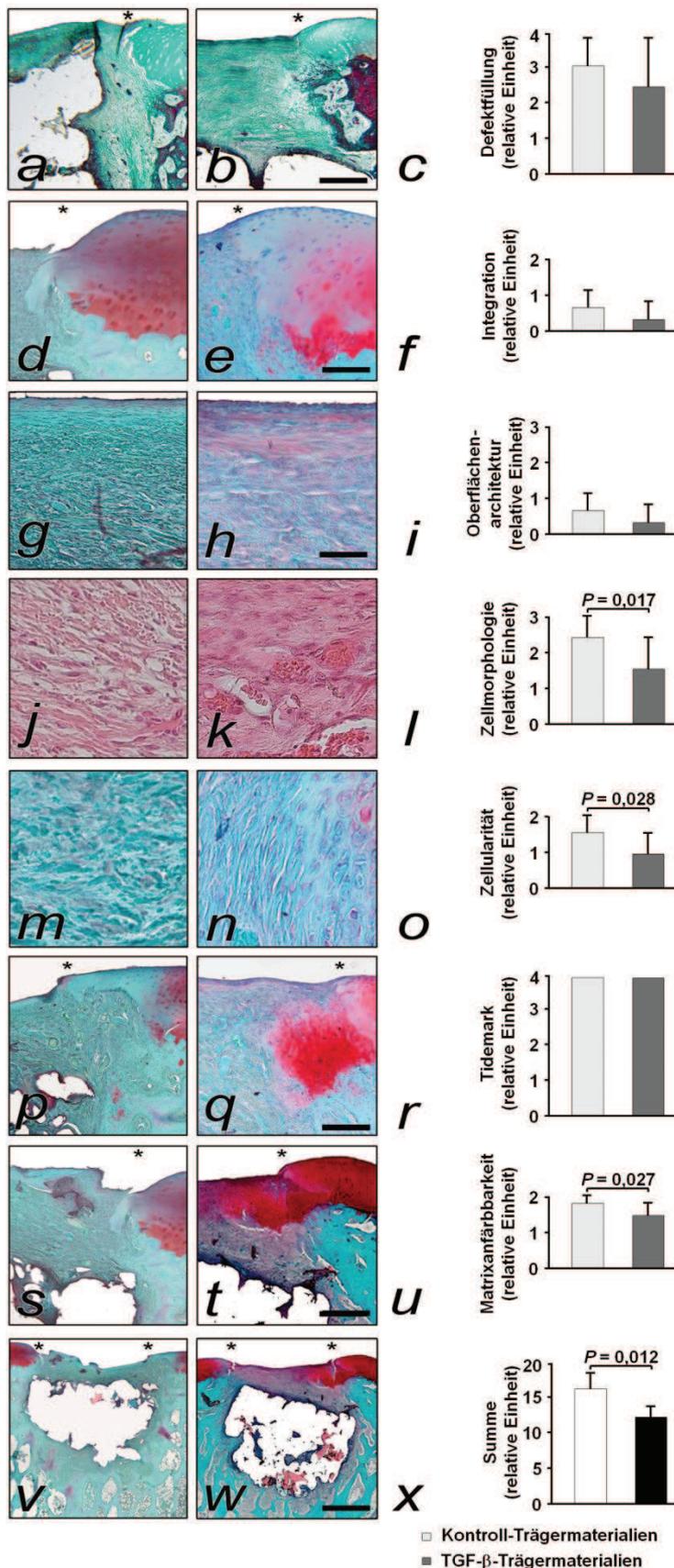


Abbildung 11: Repräsentative Histologie nach Implantation der Trägermaterialien;
 1. Spalte: Kontroll-Trägermaterialien, 2. Spalte: TGF-β1-Trägermaterialien;
 d, e, g, h, m, n, p, q, s, t, v, w: Safranin-O-Färbung, j-k: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, a-b: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung, c, f, i, l, o, r, u, x: graphische Darstellung der Evaluation mit dem Bewertungssystem nach Fortier (maximale Punktzahl angeführt),
 Skala: a, b, s, t 1 mm; d, e 500 µm; g, h 300 µm; j, k, m, n 100 µm; p, q 700 µm; v, w 2 mm.

7.1.2.2 Bestimmung der Zellularität des Reparaturgewebes

Mit Hilfe der HE-Färbung konnte wie unter 6.5.2.8 beschrieben in 40-facher Vergrößerung die Zellanzahl in vier definierten Bildausschnitten in der oberflächlichen, mittleren und unteren Zone bestimmt werden.

Das Reparaturgewebe wies nach der Behandlung mit TGF- β 1-Trägermaterialien in der oberflächlichen und tiefe Zone, sowie gesamt eine signifikant höhere Zellzahl auf ($P \leq 0,004$; Abbildung 12, Tabelle 15).

Tabelle 15: Zellzahl des Reparaturgewebes in HE-Färbung in 40-facher Vergrößerung; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
Zellzahl oberflächliche Zone	26,57 \pm 3,03	48,86 \pm 14,94	0,001
Zellzahl mittlere Zone	17,52 \pm 6,85	18,95 \pm 6,19	0,981
Zellzahl tiefe Zone	27,62 \pm 5,81	42,71 \pm 10,41	0,004
Zellzahl gesamt	71,71 \pm 6,80	110,52 \pm 13,16	< 0,001

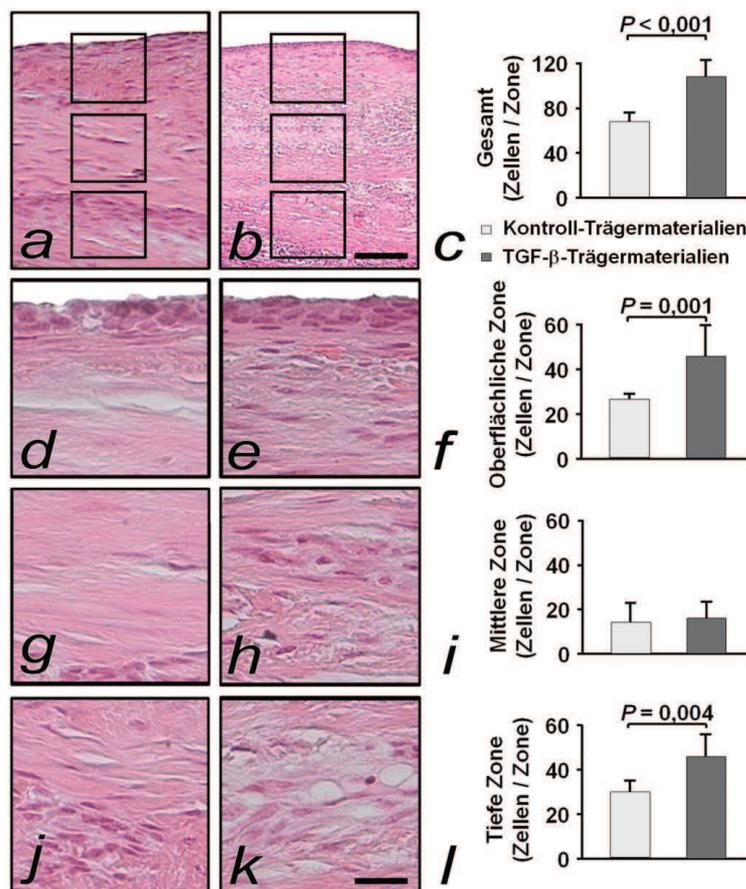


Abbildung 12: Repräsentative HE-Färbung eines Bildausschnittes in 40-facher Vergrößerung zur Bestimmung der Zellzahl; a, d, g, j: Kontroll-Trägermaterialien, b, e, h, k: TGF- β 1-Trägermaterialien; d, e, g, h, j und k sind Vergrößerungen aus a und b, wobei d und e die oberflächliche, g und h die mittlere und j und k die tiefe Zone repräsentieren. Die Diagramme c, f, i und l zeigen die durchschnittliche Zellzahl pro Zone. Skala: a, b 300 μ m; d, e, g, h, j, k 100 μ m.

7.1.3 Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

7.1.3.1 Typ-II-Kollagen

Das Reparaturgewebe zeigte bei der Behandlung mit den TGF- β 1-Trägermaterialien in der tiefen Zone ($P = 0,030$) sowie gesamt ($P = 0,035$) eine signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Vergleich zu den Kontroll-Trägermaterialien (Abbildung 13, Tabelle 16).

Tabelle 16: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
Immunaktivität oberflächliche Zone	0,24 \pm 0,16	0,29 \pm 0,13	0,552
Immunaktivität mittlere Zone	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,000
Immunaktivität tiefe Zone	0,62 \pm 0,13	1,00 \pm 0,33	0,030
Immunaktivität gesamt	0,29 \pm 0,06	0,43 \pm 0,14	0,035

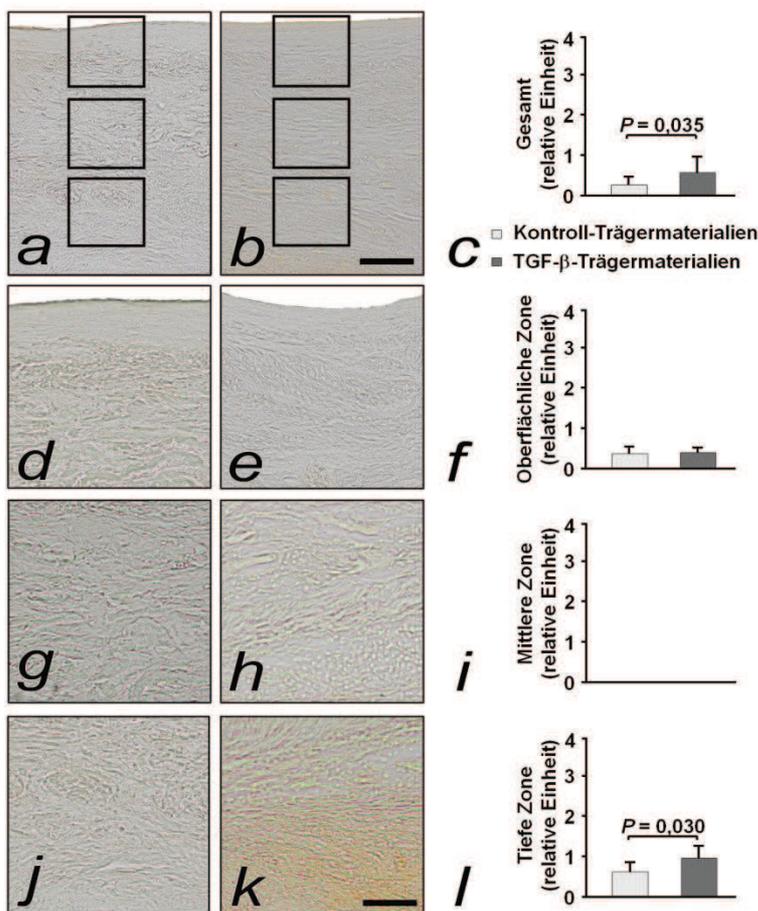


Abbildung 13: Repräsentative Typ-II-Kollagen-Immunhistologie nach Implantation der Trägermaterialien; a, d, g, j: Kontroll-Trägermaterialien, b, e, h, k: TGF- β 1-Trägermaterialien; d, e, g, h, j und k sind Vergrößerungen aus a und b, wobei d und e die oberflächliche, g und h die mittlere und j und k die tiefe Zone repräsentieren. Die Diagramme c, f, i und l zeigen die durchschnittliche Immunreaktivität jeder Zone. Skala: a, b 300 μ m; d, e, g, h, j, k 100 μ m.

7.1.3.3 Anti-TGF- β 1

Das Reparaturgewebe bei der Behandlung mit TGF- β 1-Trägermaterialien zeigte eine signifikant höhere Immunreaktivität für TGF- β 1 in allen Zonen im Vergleich zur Gruppe ohne TGF- β 1 (Abbildung 15, Tabelle 18).

Tabelle 18: Immunaktivität für TGF- β 1; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll-Trägermaterial	TGF- β 1-Trägermaterial	P-Wert
Immunaktivität oberflächliche Zone	0,43 \pm 0,25	3,52 \pm 0,18	< 0,001
Immunaktivität mittlere Zone	0,05 \pm 0,13	3,38 \pm 0,23	< 0,001
Immunaktivität tiefe Zone	0,19 \pm 0,33	3,81 \pm 0,18	< 0,001
Immunaktivität gesamt	0,22 \pm 0,13	3,57 \pm 0,08	< 0,001

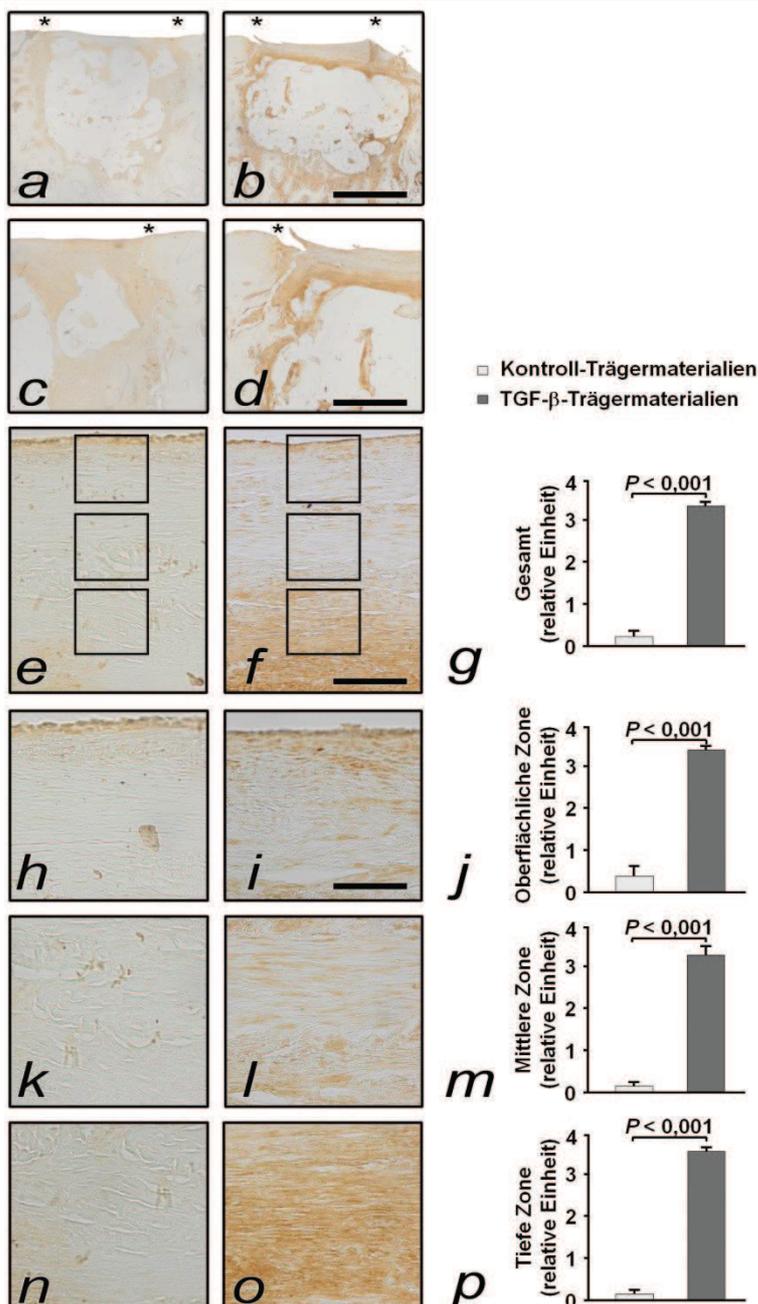


Abbildung 15: Repräsentative TGF- β 1-Immunhistologie nach Implantation der Trägermaterialien; a, c, e, h, k, n: Kontroll-Trägermaterialien, b, d, f, i, l, o: TGF- β 1-Trägermaterialien; c, d, e, f, h, i, k, l, n und o sind Vergrößerungen aus a und b, wobei h und i die oberflächliche, k und l die mittlere und n und o die tiefe Zone repräsentieren. Die Diagramme g, j, m und p zeigen die durchschnittliche Immunreaktivität jeder Zone. Skala: a, b 2 mm, c, d 1 mm, e, f 300 μ m; h, i, k, l, n, o 100 μ m.

7.1.4 Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes

Sowohl die subchondralen Knochenplatte als auch die subartikuläre Spongiosa wurden, wie unter 6.5.4.1 beschrieben in jeweils zwei VOIs unterteilt. Die Normwerte der porcinen Mikro-CT-Parameter durch Scannen der Kondylen ohne Defekt werden von der Gruppe „normale osteochondrale Einheit“ (OCE) repräsentiert.

7.1.4.1 Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte

Die subchondrale Knochenplatte zeigte bei der Behandlung mit TGF- β 1 keine signifikant besseren Ergebnisse auf ($P \geq 0,623$; Abbildung 16, Tabelle 19).

Sowohl die Knochenmineraldichte (BMD), das Knochenvolumen im Vergleich zum Totalvolumen (BV/TV), als auch die Knochenoberfläche in Relation zum Volumen (BS/BV) bzw. zum Gesamtvolumen (BS/TV) unterschieden sich jeweils signifikant ($P \leq 0,002$) von den beiden Behandlungsgruppen. Die kortikale Dicke (Ct.Th) blieb jedoch unverändert.

Bei der Gegenüberstellung der an den Defekt angrenzenden Areale konnten zwischen den Behandlungsgruppen und auch im Vergleich zu den Normwerten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden ($P \geq 0,621$; Tabelle 20).

Tabelle 19: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekts der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Parameter	Kontroll- Trägermaterial	TGF- β 1 Trägermaterial	P-Wert Kontrolle- TGF- β 1	normale OCE	P-Wert OCE - Kontrolle	P-Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	780,01 \pm 42,48	771,17 \pm 45,05	0,999	894,42 \pm 45,01	0,002	0,001
BV/TV, %	6,17 \pm 2,55	6,30 \pm 3,21	1,000	88,43 \pm 3,08	< 0,001	< 0,001
BS/BV, mm ⁻¹	69,22 \pm 7,72	78,66 \pm 16,48	0,623	45,18 \pm 5,00	0,001	< 0,001
BS/TV, mm ⁻¹	4,17 \pm 1,35	4,57 \pm 1,92	0,999	39,93 \pm 4,52	< 0,001	< 0,001
Ct.Th, mm	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,809	0,07 \pm 0,01	0,533	0,052

Tabelle 20: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Parameter	Kontroll- Trägermaterial	TGF- β 1 Trägermaterial	P-Wert Kontrolle- TGF- β 1	normale OCE	P-Wert OCE - Kontrolle	P-Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	874,95 \pm 53,81	851,07 \pm 66,22	0,927	884,23 \pm 30,75	0,996	0,681
BV/TV, %	86,96 \pm 3,2	80,58 \pm 13,02	0,799	84,63 \pm 10,62	0,989	0,918
BS/BV, mm ⁻¹	44,32 \pm 8,38	52,22 \pm 7,39	0,598	45,69 \pm 6,80	0,998	0,621
BS/TV, mm ⁻¹	38,4 \pm 6,57	42,13 \pm 9,02	0,960	39,01 \pm 7,98	1,000	0,962
Ct.Th, mm	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,671	0,07 \pm 0,01	0,999	0,691

7.1.4.2 Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa

Auch bei der Analyse der subartikulären Spongiosa des Defekts zeigten sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede ($P \geq 0,171$).

Die Knochenmineraldichte (BMD), das Knochenvolumen im Vergleich zum Totalvolumen (BV/TV), die Knochenoberfläche in Relation zum Volumen (BS/BV) bzw. zum Gesamtvolumen (BS/TV), die Trabekelanzahl (Tb.N), die Konnektivität (Tb.Pf) und der Struktur-Model-Index (SMI) beider Behandlungsgruppen unterschieden sich jeweils signifikant von den Normwerten der OCE ($P \leq 0,022$; Abbildung 16, Tabelle 21).

Wie auch bei der Analyse des Defekts zeigten sich bei der Auswertung des an den Defekt angrenzenden Materials keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($P \geq 0,540$). Die Konnektivität der TGF- β 1-Behandlungsgruppe unterschied sich signifikant ($P = 0,033$) von den Normwerten der osteochondralen Einheit (OCE) (Tabelle 22).

Tabelle 21: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekt der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Parameter	Kontroll- Trägermaterial	TGF- β 1 Trägermaterial	P-Wert Kontrolle- TGF- β 1	normale OCE	P-Wert OCE - Kontrolle	P-Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	781,27 \pm 33,5	796,06 \pm 22,76	0,964	856,99 \pm 32,98	0,003	0,022
BV/TV, %	12,72 \pm 5,51	17,89 \pm 8,09	0,579	47,92 \pm 6,55	< 0,001	< 0,001
BS/BV, mm ⁻¹	38,83 \pm 7,71	34,99 \pm 4,41	0,663	28,08 \pm 3,22	0,001	0,050
BS/TV, mm ⁻¹	5,12 \pm 3,28	6,11 \pm 2,65	0,904	13,3 \pm 1,23	< 0,001	< 0,001
Tb.Th, mm	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,877	0,11 \pm 0,01	0,940	0,996
Tb.Sp, mm	0,29 \pm 0,10	0,27 \pm 0,06	0,999	0,16 \pm 0,02	0,254	0,419
Tb.N, mm ⁻¹	1,27 \pm 0,81	1,54 \pm 0,72	0,923	4,19 \pm 0,51	< 0,001	< 0,001
Tb.Pf, mm ⁻¹	24,68 \pm 13,01	18,86 \pm 12,96	0,721	-8,14 \pm 5,76	< 0,001	< 0,001

SMI, -/-	3,46 ± 1,17	3,08 ± 1,30	0,947	-0,33 ± 0,9	< 0,001	< 0,001
DA, -/-	1,56 ± 0,12	1,41 ± 0,13	0,171	1,53 ± 0,12	0,993	0,173
FD, -/-	2,44 ± 0,09	2,44 ± 0,07	0,999	2,44 ± 0,04	0,999	1,000

Tabelle 22: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subartikulären Spongiosa; MW ± SD.

Parameter	Kontroll- Trägermaterial	TGF-β1 Trägermaterial	P-Wert Kontrolle- TGF-β1	normale OCE	P-Wert OCE - Kontrolle	P-Wert OCE - TGF-β1
BMD, mg/cm ³	857,28 ± 25,57	845,61 ± 48,48	0,989	855,99 ± 38,36	1,000	0,986
BV/TV, %	48,66 ± 5,94	44,35 ± 8,02	0,934	44,19 ± 7,82	0,871	1,000
BS/BV, mm ⁻¹	26,47 ± 4,42	28,59 ± 3,7	0,947	30,19 ± 4,55	0,553	0,964
BS/TV, mm ⁻¹	12,81 ± 2,23	12,48 ± 1,63	0,997	13,05 ± 1,19	0,998	0,958
Tb.Th, mm	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,945	0,11 ± 0,02	0,505	0,949
Tb.Sp, mm	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,999	0,17 ± 0,03	0,659	0,828
Tb.N, mm ⁻¹	3,87 ± 0,68	3,67 ± 0,44	0,968	3,85 ± 0,43	1,000	0,955
Tb.Pf, mm ⁻¹	-0,54 ± 3,56	2,78 ± 2,9	0,540	-2,75 ± 4,29	0,744	0,033
SMI, -/-	0,75 ± 0,50	1,14 ± 0,48	0,671	0,45 ± 0,61	0,753	0,061
DA, -/-	1,58 ± 0,16	1,62 ± 0,16	0,995	1,70 ± 0,19	0,618	0,874
FD, -/-	2,34 ± 0,09	2,3 ± 0,14	0,935	2,31 ± 0,07	0,958	0,999

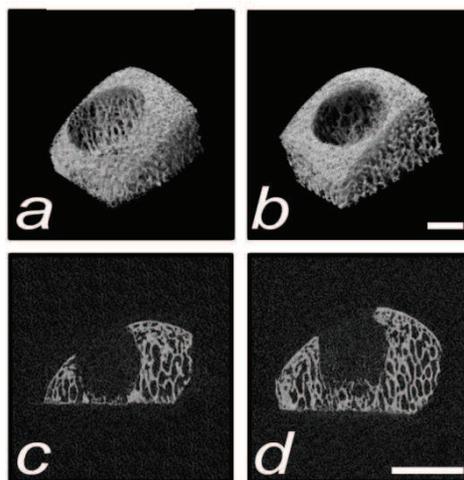


Abbildung 16: Mikro-CT-Scans in 3D-Rekonstruktion des Defektareals (a, b) sowie sagittaler Schnitt durch den Defekt in 2D (c, d); a, c: Kontroll-Trägermaterialien, b, d: TGF-β1-Trägermaterialien. Skala 2,5 mm.

7.2 Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren

7.2.1 Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes

Wie bereits bei den Defekten mit Trägermaterialien wurde auch von den Defekten mit rAAV vier Wochen postoperativ Fotos zur makroskopischen Begutachtung aufgenommen. Im Oswestry-Bewertungssystem zeigten sich in den Bewertungskategorien „Farbe“, „Oberflächenbeschaffenheit“, „Integration“ und in der Summe bei den mit rAAV-TGF- β 1 behandelten Kondylen signifikant bessere Werte, als bei den mit rAAV-*lacZ* behandelten ($P \leq 0,015$; Tabelle 23). Ebenso konnten im Bewertungssystem nach Goebel bei der Evaluation der Parameter „Farbe“, „Blutgefäße“ und „Oberflächenbeschaffenheit“ mit $P \leq 0,019$ signifikant bessere Werte für rAAV-TGF- β 1 nachgewiesen werden (Abbildung 17).

Bei der makroskopischen Bewertung zeigten sich die mit rAAV-TGF- β 1 behandelten Proben weiß, wohingegen die Kontrollen mit rAAV-*lacZ* überwiegend transparent waren. Die Blutgefäße nahmen bei der Kontrolle mit rAAV-*lacZ* 50 - 75 % des Reparaturgewebes ein, bei rAAV-TGF- β 1 überschritten sie 50 % nicht. An der Oberfläche waren bei rAAV-*lacZ* Fibrillationen und eine inkomplette Reparatur des Knorpels, bei rAAV-TGF- β 1 eine inhomogene glatte Fläche nachweisbar. Die Defekte waren bei der Behandlung mit rAAV-*lacZ* unter 50 %, mit rAAV-TGF- β 1 über 50 % aufgefüllt. Bei keiner der Gruppen war der angrenzende Knorpel durch Einrisse oder ähnliches degeneriert. Die Integration zeigte im Oswestry-Bewertungssystem bei rAAV-*lacZ* kleine Unregelmäßigkeiten, die bei rAAV-TGF- β 1 nicht auszumachen waren (Tabelle 24).

Tabelle 23: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems; 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Farbe	0,29 \pm 0,76	1,43 \pm 0,53	0,007
2. Oberflächenbeschaffenheit	0,43 \pm 0,79	1,57 \pm 0,53	0,002
3. Defektfüllung	0,00 \pm 0,00	0,14 \pm 0,38	0,974
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	0,57 \pm 0,53	1,57 \pm 0,79	0,015
5. Summe	1,29 \pm 1,38	4,71 \pm 1,38	0,002

Tabelle 24: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Farbe	2,14 \pm 1,21	0,57 \pm 0,53	0,010
2. Blutgefäße	3,14 \pm 1,07	1,43 \pm 1,13	0,019
3. Oberflächenbeschaffenheit	2,71 \pm 0,95	1,43 \pm 0,53	0,014
4. Defektfüllung	1,86 \pm 0,90	1,00 \pm 0,00	0,154
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	0,14 \pm 0,38	0,00 \pm 0,00	0,918
6. Summe	10,00 \pm 3,56	4,43 \pm 2,07	0,010

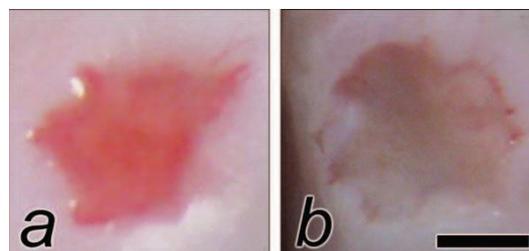


Abbildung 17: Repräsentative makroskopische Bilder des osteochondralen Defekts vier Wochen nach Implantation von rAAV-lacZ (a) oder rAAV-TGF- β 1(b); Skala 2 mm.

7.2.2 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

7.2.2.1 Histologische Evaluation nach Sellers

Es wurden mind. acht Schnitte in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung begutachtet, um für das histologische Bewertungssystem nach Sellers repräsentative Ergebnisse zu erzielen.

Bei der histologischen Evaluation nach Sellers zeigten sich in der Neubildung des subchondralen Knochens ($P = 0,001$) sowie in der Summe ($P = 0,032$) signifikante Verbesserungen bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 im Vergleich zu rAAV-lacZ. In den übrigen Kategorien waren lediglich Tendenzen zu erkennen.

Die Defekte der Proben mit rAAV-TGF- β 1 waren durchschnittlich über 50 % des Niveaus mit Reparaturgewebe aufgefüllt, die mit rAAV-lacZ darunter. Bei der Integration zeigte sich bei rAAV-TGF- β 1 eine verminderte Zellularität, bei rAAV-lacZ waren Spalten im Reparaturgewebe auf einer Seite sichtbar. Die Matrixanfärbbarkeit war bei rAAV-TGF- β 1 mittelstark, bei rAAV-lacZ stark vermindert. Im Hinblick auf die Zellmorphologie fanden sich bei rAAV-lacZ vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen, bei rAAV-TGF- β 1 unter 50 % runde Zellen bei < 25 % Zellen in Säulen in der radialen Zone. Bei rAAV-TGF- β 1 zeigten sich ein bis drei große Defekte in der Architektur des

Defektes, bei rAAV-*lacZ* über drei sowie mittelstarke Fibrillationen in der Oberflächenarchitektur beider Gruppen. Die mit rAAV-TGF- β 1 behandelte Gruppe bildete über 50 % des subchondralen Knochens neu, die mit rAAV-*lacZ* weniger als 50 %. Bei beiden Behandlungsgruppen war die *Tidemark* nicht auszumachen (Abbildung 18, Tabelle 25).

Tabelle 25: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers, 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 31 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Defektfüllung	3,00 \pm 0,82	2,18 \pm 0,40	0,271
2. Integration	1,78 \pm 0,58	1,34 \pm 0,27	0,204
3. Matrixanfärbbarkeit	3,09 \pm 1,17	2,29 \pm 0,97	0,251
4. Zellmorphologie	4,90 \pm 0,16	4,64 \pm 0,41	0,076
5. Defektarchitektur	2,30 \pm 0,91	1,91 \pm 0,61	0,593
6. Oberflächenarchitektur	2,22 \pm 0,68	2,05 \pm 0,57	0,963
7. Neubildung des subchondralen Knochens	3,00 \pm 0,76	2,06 \pm 0,44	0,001
8. Tidemark	4,00 \pm 0,00	4,00 \pm 0,00	1,000
9. Summe	24,31 \pm 3,83	20,48 \pm 2,42	0,032

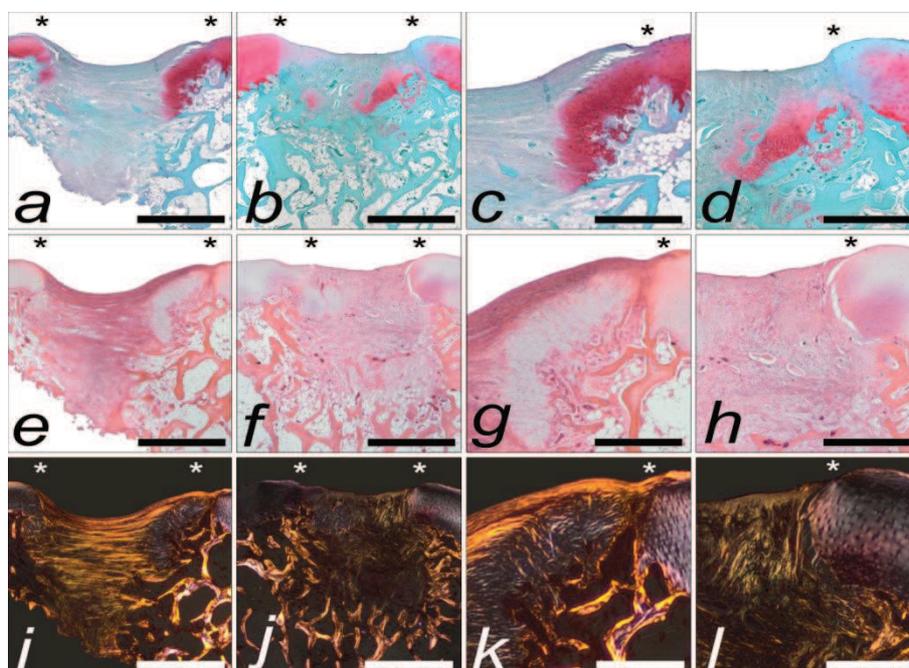


Abbildung 18: Repräsentative Histologie nach Implantation der rAAV-Vektoren; 1. und 3. Spalte: rAAV-*lacZ*, 2. und 4. Spalte: rAAV-TGF- β 1; a-d: Safranin-O-Färbung (c-d: Detailaufnahme der Integrationszone), e-h: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (g-h: Detailaufnahme der Integrationszone), i-l Polarisationsmikroskopie (k-l: Detailaufnahme der Integrationszone), Skala a-b, e-f, i-j 2 mm; c-d, g-h, k-l 1 mm.

7.2.2.2 Bestimmung der Zellularität des Reparaturgewebes

Mit der HE-Färbung konnte wie unter 6.5.2.8 beschrieben die Zellanzahl in vier definierten Bildausschnitten in der oberflächlichen, mittleren und tiefen Zone bestimmt werden. Das Reparaturgewebe wies nach der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 in jeder einzelnen Zone sowie gesamt eine signifikant höhere Zellzahl auf (Abbildung 19, Tabelle 26).

Tabelle 26: Zellzahl des Reparaturgewebes in HE-Färbung in 40-facher Vergrößerung; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Zellzahl obere Zone	28,68 \pm 7,76	37,67 \pm 5,58	0,026
Zellzahl mittlere Zone	14,43 \pm 4,32	29,81 \pm 9,77	0,002
Zellzahl tiefe Zone	22,95 \pm 5,82	39,05 \pm 6,29	0,002
Zellzahl gesamt	66,05 \pm 14,41	106,52 \pm 16,52	< 0,001

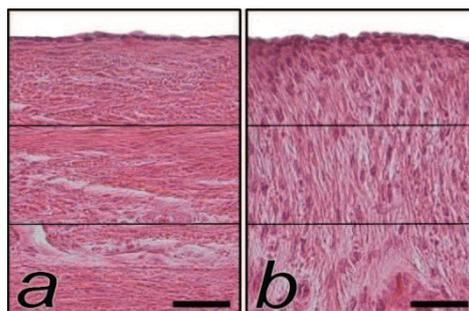


Abbildung 19: Repräsentative HE-Färbung zur Bestimmung der Zellzahl; a: rAAV-lacZ, b: rAAV-TGF- β 1, Skala 300 μ m.

7.2.3 Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

7.2.3.1 Typ-II-Kollagen

Das Reparaturgewebe bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 zeigte eine signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Vergleich zu rAAV-lacZ ($P = 0,006$; Abbildung 20, Tabelle 27).

Tabelle 27: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivität	1,17 \pm 0,41	2,17 \pm 0,41	0,006

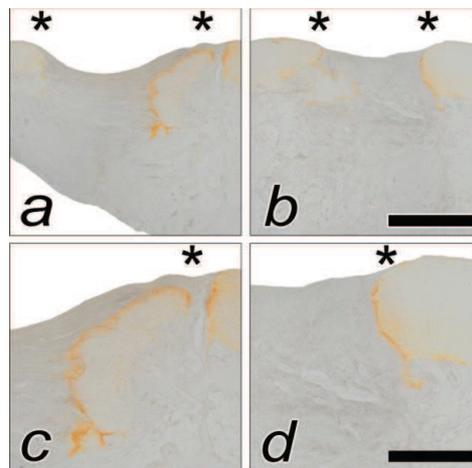


Abbildung 20: Repräsentative Typ-II-Kollagen-Immunhistologie nach Implantation der rAAV-Vektoren; a, c: rAAV-lacZ, b, d: rAAV-TGF- β 1; Skala a, b 2 mm; c, d 1 mm.

7.2.3.2 Typ-X-Kollagen

Das Reparaturgewebe bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 zeigte mit $81,83 \pm 3,66$ % eine signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen im Vergleich zu rAAV-lacZ ($P < 0,001$; Abbildung 21, Tabelle 28).

Tabelle 28: Immunaktivität für Typ-X-Kollagen; Angabe in % der gefärbten Zellen; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivität	$3,83 \pm 1,47$	$81,83 \pm 3,66$	< 0,001

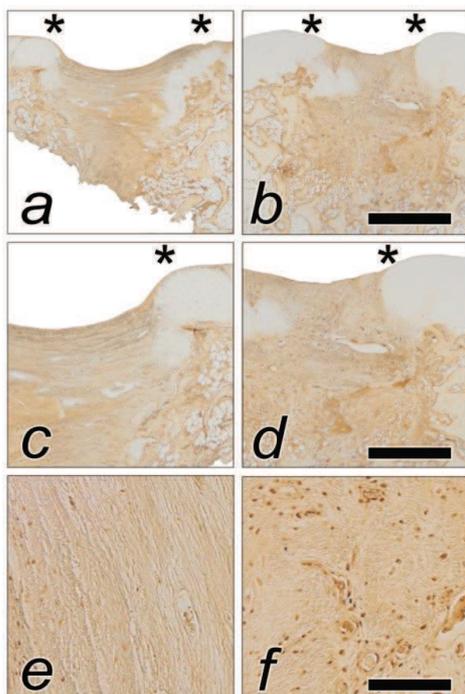


Abbildung 21: Repräsentative Typ-X-Kollagen-Immunhistologie nach Implantation der rAAV-Vektoren; a, c, e: rAAV-lacZ, b, d, f: rAAV-TGF- β 1; Skala a, b 2 mm; c, d 1 mm; e, f 200 μ m.

7.2.3.3 Anti-TGF- β 1

Das Reparaturgewebe bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 wies eine signifikant höhere Immunreaktivität ($P < 0,001$) für TGF- β 1 im Vergleich zu rAAV-*lacZ* auf (Abbildung 22, Tabelle 29).

Tabelle 29: Immunaktivität für TGF- β 1; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; $MW \pm SD$.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivität	0,29 \pm 0,49	3,14 \pm 0,38	< 0,001

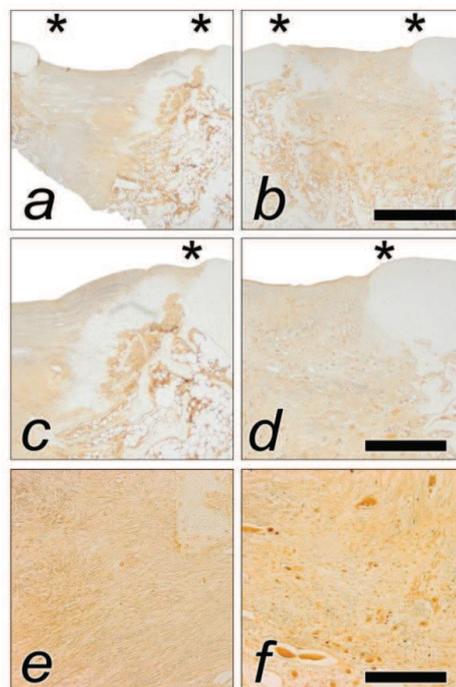


Abbildung 22: Repräsentative TGF- β 1-Immunhistologie nach Implantation der rAAV-Vektoren; a, c, e: rAAV-*lacZ*, b, d, f: rAAV-TGF- β 1; Skala a, b 2 mm; c, d 1 mm; e, f 200 μ m.

7.2.4 Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes

Wie unter Punkt 7.1.4 beschrieben, wurden die subchondrale Knochenplatte und die subartikuläre Spongiosa jeder Probe nach dem Schema unter Punkt 6.5.4.1 in jeweils zwei VOIs unterteilt.

7.2.4.1 Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte

Bei der Auswertung der subchondralen Knochenplatte mit dem Mikro-CT zeigten sich weder im Defektareal noch im daran angrenzenden Areal signifikante Veränderungen zwischen den Behandlungsgruppen. Beim Vergleich des Defektareals der

subchondralen Knochenplatte beider Behandlungsgruppen mit der normalen osteochondralen Einheit, unterschieden sich die Knochenmineraldichte (BMD), das Knochenvolumen im Vergleich zum Totalvolumen (BV/TV), als auch die Knochenoberfläche in Relation zum Volumen (BS/BV) bzw. zum Gesamtvolumen (BS/TV) signifikant voneinander ($P \leq 0,001$; Abbildung 23, Tabelle 30, Tabelle 31).

Tabelle 30: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekts der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert lacZ - TGF- β 1	normale OCE	P-Wert OCE - lacZ	P-Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	845,04 \pm 111,44	775,14 \pm 54,66	0,225	894,42 \pm 45,01	0,398	0,001
BV/TV, %	12,76 \pm 3,18	9,21 \pm 3,34	0,219	88,43 \pm 3,08	< 0,001	< 0,001
BS/BV, mm ⁻¹	68,06 \pm 16,8	71,97 \pm 18,42	0,977	45,18 \pm 5,00	0,002	< 0,001
BS/TV, mm ⁻¹	8,83 \pm 3,91	6,15 \pm 0,83	0,566	39,93 \pm 4,52	< 0,001	< 0,001
Ct.Th, mm	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,876	0,07 \pm 0,01	0,176	0,778

Tabelle 31: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert lacZ - TGF- β 1	normale OCE	P-Wert OCE - lacZ	P-Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	865,67 \pm 84,75	845,46 \pm 56,12	0,959	884,23 \pm 30,75	0,946	0,542
BV/TV, %	82,21 \pm 15,75	84,82 \pm 6,14	0,991	84,63 \pm 10,62	0,987	1,000
BS/BV, mm ⁻¹	56,39 \pm 18,58	45,93 \pm 9,32	0,322	45,69 \pm 6,80	0,160	1,000
BS/TV, mm ⁻¹	46,18 \pm 19,02	38,69 \pm 6,38	0,653	39,01 \pm 7,98	0,543	1,000
Ct.Th, mm	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,504	0,07 \pm 0,01	0,485	0,999

7.2.4.2 Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa

Alle Parameter waren bei der Mikro-CT-Analyse der subartikulären Spongiosa unterhalb des Defekts zwischen den beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant verändert. Es wurden im Vergleich zur Norm signifikante Veränderungen des Knochenvolumens im Vergleich zum Totalvolumen (BV/TV), der Knochenoberfläche in Relation zum Gesamtvolumen (BS/TV), des Trabekelabstands (Tb.Sp), der Trabekelanzahl (Tb.N), der Konnektivität (Tb.Pf), des Struktur-Model-Indices (SMI) und des Grad der Anisotropie (DA) festgestellt ($P \leq 0,001$; Tabelle 32).

Auch die Analyse des an den Defekt angrenzenden Materials zeigte außer beim Grad der Anisotropie zwischen der normalen osteochondralen Einheit und rAAV-TGF- β 1 keine signifikanten Veränderungen ($P = 0,048$; Tabelle 33).

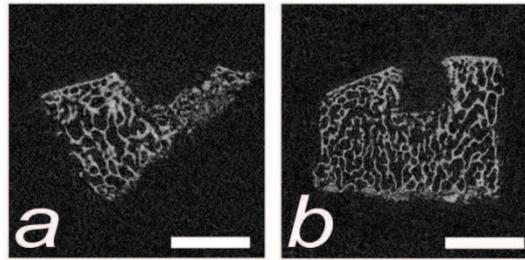


Abbildung 23: Repräsentative Mikro-CT-Scans im sagittalen Schnitt durch den Defekt in 2D mit rAAV-lacZ (a) und rAAV-TGF- β 1 (b); Skala 4 mm.

Tabelle 32: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekts der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	<i>P</i> -Wert lacZ - TGF- β 1	normale OCE	<i>P</i> -Wert OCE - lacZ	<i>P</i> -Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	831,76 \pm 76,87	804,99 \pm 34,76	0,756	856,99 \pm 32,98	0,677	0,067
BV/TV, %	20,08 \pm 7,3	25,33 \pm 4,42	0,566	47,92 \pm 6,55	< 0,001	< 0,001
BS/BV, mm ⁻¹	34,02 \pm 7,44	33,81 \pm 4,89	1,000	28,08 \pm 3,22	0,121	0,144
BS/TV, mm ⁻¹	6,57 \pm 2,08	8,53 \pm 1,84	0,428	13,3 \pm 1,23	< 0,001	< 0,001
Tb.Th, mm	0,12 \pm 0,03	0,12 \pm 0,02	0,998	0,11 \pm 0,01	1,000	0,996
Tb.Sp, mm	0,43 \pm 0,32	0,25 \pm 0,07	0,130	0,16 \pm 0,02	0,001	0,616
Tb.N, mm ⁻¹	1,74 \pm 0,62	2,23 \pm 0,54	0,590	4,19 \pm 0,51	< 0,001	< 0,001
Tb.Pf, mm ⁻¹	8,45 \pm 6,73	8,63 \pm 5,07	1,000	-8,14 \pm 5,76	0,001	0,001
SMI, -/-	2,12 \pm 0,84	2,00 \pm 0,53	0,999	-0,33 \pm 0,90	< 0,001	< 0,001
DA, -/-	1,31 \pm 0,12	1,39 \pm 0,14	0,697	1,53 \pm 0,12	0,002	0,097
FD, -/-	2,35 \pm 0,12	2,45 \pm 0,06	0,078	2,44 \pm 0,04	0,083	0,986

Tabelle 33: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	<i>P</i> -Wert lacZ - TGF- β 1	normale OCE	<i>P</i> -Wert OCE - lacZ	<i>P</i> -Wert OCE - TGF- β 1
BMD, mg/cm ³	875,97 \pm 62,41	846,48 \pm 51,97	0,740	855,99 \pm 38,36	0,865	0,990
BV/TV, %	48,51 \pm 17,77	42,59 \pm 10,86	0,817	44,19 \pm 7,82	0,885	0,997
BS/BV, mm ⁻¹	29,57 \pm 8,87	29,69 \pm 4,97	1,000	30,19 \pm 4,55	0,999	1,000
BS/TV, mm ⁻¹	13,04 \pm 2,09	12,32 \pm 2,41	0,945	13,05 \pm 1,19	1,000	0,898
Tb.Th, mm	0,12 \pm 0,03	0,12 \pm 0,02	0,993	0,11 \pm 0,02	0,988	1,000
Tb.Sp, mm	0,17 \pm 0,07	0,17 \pm 0,05	0,991	0,17 \pm 0,03	0,978	1,000
Tb.N, mm ⁻¹	3,93 \pm 0,71	3,65 \pm 0,76	0,888	3,85 \pm 0,43	0,998	0,937
Tb.Pf, mm ⁻¹	-1,97 \pm 4,89	1,49 \pm 3,72	0,498	-2,75 \pm 4,29	0,993	0,158
SMI, -/-	0,51 \pm 0,63	0,91 \pm 0,4	0,643	0,45 \pm 0,61	1,000	0,365
DA, -/-	1,58 \pm 0,16	1,47 \pm 0,16	0,783	1,70 \pm 0,19	0,551	0,048
FD, -/-	2,23 \pm 0,06	2,34 \pm 0,13	0,178	2,31 \pm 0,07	0,266	0,969

7.3 Vergleich des trägermaterialbasierten mit dem gentransferbasierten Vorgehen ohne Wachstumsfaktor

Im Folgenden sind Behandlungsmethoden (trägermaterialbasiert versus gentransferbasiert) untereinander, jeweils ohne Wachstumsfaktor, zur Evaluation der Spontanheilung gegenübergestellt.

7.3.1 Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes

Bei der makroskopischen Begutachtung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 34 und Tabelle 35).

Tabelle 34: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems; 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
1. Farbe	0,86 \pm 0,90	0,29 \pm 0,76	0,376
2. Oberflächenbeschaffenheit	0,57 \pm 0,79	0,43 \pm 0,79	0,986
3. Defektfüllung	0,29 \pm 0,76	0,00 \pm 0,00	0,750
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	0,86 \pm 0,69	0,57 \pm 0,53	0,874
5. Summe	2,57 \pm 2,64	1,29 \pm 1,38	0,559

Tabelle 35: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
1. Farbe	1,43 \pm 1,27	2,14 \pm 1,21	0,554
2. Blutgefäße	2,43 \pm 1,27	3,14 \pm 1,07	0,660
3. Oberflächenbeschaffenheit	2,00 \pm 1,15	2,71 \pm 0,95	0,352
4. Defektfüllung	1,43 \pm 0,98	1,86 \pm 0,90	0,768
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	0,43 \pm 0,53	0,14 \pm 0,38	0,464
6. Summe	7,71 \pm 4,46	10,00 \pm 3,56	0,615

7.3.2 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

7.3.2.1 Histologische Evaluation nach Sellers

Bei der histologischen Evaluation nach Sellers unterschied sich die Defektarchitektur der beiden Gruppen signifikant voneinander ($P < 0,001$). Die Gruppe mit dem Trägermaterial zeigte über drei große Defekte, rAAV-lacZ stets unter drei (Tabelle 36).

Tabelle 36: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 31 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
1. Defektfüllung	2,99 \pm 0,84	3,00 \pm 0,82	0,998
2. Integration	1,66 \pm 0,58	1,78 \pm 0,58	0,979
3. Matrixanfärbbarkeit	3,44 \pm 0,63	3,09 \pm 1,17	0,895
4. Zellmorphologie	4,96 \pm 0,08	4,90 \pm 0,16	0,986
5. Defektarchitektur	3,56 \pm 0,43	2,30 \pm 0,91	< 0,001
6. Oberflächenarchitektur	2,03 \pm 0,76	2,22 \pm 0,68	0,945
7. Neubildung des subchondralen Knochens	3,61 \pm 0,40	3,00 \pm 0,76	0,063
8. Tidemark	4,00 \pm 0,00	4,00 \pm 0,00	1,000
9. Summe	26,25 \pm 3,24	24,31 \pm 3,83	0,496

7.3.2.2 Bestimmung der Zellularität des Reparaturgewebes

Das Reparaturgewebe der beiden Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl auf (Tabelle 37).

Tabelle 37: Zellzahl des Reparaturgewebes in HE-Färbung in 40-facher Vergrößerung; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
Zellzahl oberflächliche Zone	26,57 \pm 3,03	28,68 \pm 7,76	0,972
Zellzahl mittlere Zone	17,52 \pm 6,85	14,43 \pm 4,32	0,844
Zellzahl tiefe Zone	27,62 \pm 5,81	22,95 \pm 5,82	0,639
Zellzahl gesamt	71,71 \pm 6,80	66,05 \pm 14,41	0,853

7.3.3 Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

7.3.3.1 Typ-II-Kollagen

Die Behandlung mit rAAV-lacZ zeigte eine signifikant höhere Immunaktivität für Typ-II-Kollagen des Reparaturgewebes im Vergleich zu den Kontroll-Trägermaterialien ($P = 0,017$; Tabelle 38).

Tabelle 38: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
Immunaktivität	0,29 \pm 0,06	1,17 \pm 0,41	0,017

7.3.3.2 Anti-TGF- β 1

Das Reparaturgewebe wies keine signifikant höhere Immunreaktivität für TGF- β 1 für die Behandlung mit dem Kontroll-Trägermaterial im Vergleich zur *lacZ*-Kontrolle auf (Tabelle 39).

Tabelle 39: Immunaktivität für TGF- β 1; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV- <i>lacZ</i>	P-Wert
Immunaktivität	0,22 \pm 0,13	0,29 \pm 0,49	0,933

7.3.4 Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes

Sowohl die subchondralen Knochenplatte als auch die subartikuläre Spongiosa wurden, wie unter 6.5.4.1 beschrieben, in jeweils zwei VOIs unterteilt.

7.3.4.1 Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte

Die subchondrale Knochenplatte wies bei der Behandlung mit rAAV-*lacZ* im Vergleich zum Trägermaterial ohne Wachstumsfaktor eine signifikant größere Knochenoberfläche in Relation zum Volumen (BS/BV) auf ($P = 0,002$; Tabelle 40).

Bei der Gegenüberstellung der an den Defekt angrenzenden Areale zeigten sich bei der subchondralen Knochenplatte keine signifikanten Veränderungen zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Tabelle 41).

Tabelle 40: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekts der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV- <i>lacZ</i>	P-Wert
BMD, mg/cm ³	780,01 \pm 42,48	845,04 \pm 111,44	0,290
BV/TV, %	6,17 \pm 2,55	12,76 \pm 3,18	0,002
BS/BV, mm ⁻¹	69,22 \pm 7,72	68,06 \pm 16,8	1,000
BS/TV, mm ⁻¹	4,17 \pm 1,35	8,83 \pm 3,91	0,088
Ct.Th, mm	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,973

Tabelle 41: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
BMD, mg/cm ³	874,95 \pm 53,81	865,67 \pm 84,75	0,998
BV/TV, %	86,96 \pm 3,2	82,21 \pm 15,75	0,920
BS/BV, mm ⁻¹	44,32 \pm 8,38	56,39 \pm 18,58	0,194
BS/TV, mm ⁻¹	38,4 \pm 6,57	46,18 \pm 19,02	0,621
Ct.Th, mm	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,496

7.3.4.2 Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa

Bei der Analyse der subartikulären Spongiosa des Defekts zeigten sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen im Defektareal bei der Konnektivität (Tb.Pf; $P = 0,010$) und dem Grad der Anisotropie (DA; $P = 0,004$) signifikante Unterschiede (Tabelle 42).

Bei der Analyse des an den Defekt angrenzenden Materials wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Tabelle 43).

Tabelle 42: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekt der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
BMD, mg/cm ³	781,27 \pm 33,5	831,76 \pm 76,87	0,184
BV/TV, %	12,72 \pm 5,51	20,08 \pm 7,30	0,234
BS/BV, mm ⁻¹	38,83 \pm 7,71	34,02 \pm 7,44	0,452
BS/TV, mm ⁻¹	5,12 \pm 3,28	6,57 \pm 2,08	0,705
Tb.Th, mm	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03	0,968
Tb.Sp, mm	0,29 \pm 0,10	0,43 \pm 0,32	0,344
Tb.N, mm ⁻¹	1,27 \pm 0,81	1,74 \pm 0,62	0,618
Tb.Pf, mm ⁻¹	24,68 \pm 13,01	8,45 \pm 6,73	0,010
SMI, -/-	3,46 \pm 1,17	2,12 \pm 0,84	0,088
DA, -/-	1,56 \pm 0,12	1,33 \pm 0,11	0,004
FD, -/-	2,44 \pm 0,09	2,39 \pm 0,09	0,122

Tabelle 43: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Kategorie	Kontroll- Trägermaterial	rAAV-lacZ	P-Wert
BMD, mg/cm ³	857,28 \pm 25,57	875,97 \pm 62,41	0,937
BV/TV, %	48,66 \pm 5,94	48,51 \pm 17,77	1,000
BS/BV, mm ⁻¹	26,47 \pm 4,42	29,57 \pm 8,87	0,817
BS/TV, mm ⁻¹	12,81 \pm 2,23	13,04 \pm 2,09	0,999
Tb.Th, mm	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03	0,878
Tb.Sp, mm	0,15 \pm 0,03	0,17 \pm 0,07	0,964
Tb.N, mm ⁻¹	3,87 \pm 0,68	3,93 \pm 0,71	0,999
Tb.Pf, mm ⁻¹	-0,54 \pm 3,56	-1,97 \pm 4,89	0,962
SMI, -/-	0,75 \pm 0,50	0,51 \pm 0,63	0,919
DA, -/-	1,58 \pm 0,16	1,58 \pm 0,16	1,000
FD, -/-	2,34 \pm 0,09	2,23 \pm 0,06	0,163

7.4 Vergleich der trägermaterialbasierten mit der gentransferbasierten Bereitstellung von TGF- β 1

Im Folgenden sind Behandlungsmethoden (trägermaterialbasiert versus gentransferbasiert) untereinander, jeweils mit TGF- β 1, gegenübergestellt.

7.4.1 Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes

Bei der makroskopischen Begutachtung zeigten sich in der „Oberflächenbeschaffenheit“ signifikante Unterschiede ($P = 0,021$; Tabelle 44 und Tabelle 45).

Tabelle 44: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems; 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Farbe	0,71 \pm 0,76	1,43 \pm 0,53	0,157
2. Oberflächenbeschaffenheit	0,57 \pm 0,53	1,57 \pm 0,53	0,021
3. Defektfüllung	0,29 \pm 0,76	0,14 \pm 0,38	0,849
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	1,00 \pm 0,82	1,57 \pm 0,79	0,325
5. Summe	2,57 \pm 2,37	4,71 \pm 1,38	0,088

Tabelle 45: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Farbe	1,43 \pm 1,27	0,57 \pm 0,53	0,310
2. Blutgefäße	2,43 \pm 1,51	1,43 \pm 1,13	0,318
3. Oberflächenbeschaffenheit	2,14 \pm 0,90	1,43 \pm 0,53	0,256
4. Defektfüllung	1,43 \pm 1,13	1,00 \pm 0,00	0,611
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	0,29 \pm 0,49	0,00 \pm 0,00	0,314
6. Summe	7,71 \pm 4,64	4,43 \pm 2,07	0,227

7.4.2 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

7.4.2.1 Histologische Evaluation nach Sellers

Bei den Bewertungskategorien „Defektarchitektur“ ($P = 0,001$), „Neubildung des subchondralen Knochens“ ($P < 0,001$) sowie in der Summe ($P = 0,027$) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen TGF- β 1-Trägermaterial sowie rAAV-TGF- β 1 (Tabelle 46).

Tabelle 46: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 31 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
1. Defektfüllung	2,54 \pm 1,50	2,18 \pm 0,40	0,110
2. Integration	1,36 \pm 0,42	1,34 \pm 0,27	0,993
3. Matrixanfärbbarkeit	2,76 \pm 0,85	2,29 \pm 0,97	0,661
4. Zellmorphologie	4,95 \pm 0,13	4,64 \pm 0,41	0,103
5. Defektarchitektur	3,57 \pm 0,40	1,91 \pm 0,61	0,001
6. Oberflächenarchitektur	1,75 \pm 0,42	2,05 \pm 0,57	0,586
7. Neubildung des subchondralen Knochens	3,53 \pm 0,42	2,06 \pm 0,44	< 0,001
8. Tidemark	4,00 \pm 0,00	4,00 \pm 0,00	1,000
9. Summe	24,92 \pm 2,22	20,48 \pm 2,42	0,027

7.4.2.2 Bestimmung der Zellularität des Reparaturgewebes

Die Zellzahl der mittleren Zone des Reparaturgewebes unterschied sich signifikant zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($P = 0,039$; Tabelle 47).

Tabelle 47: Zellzahl des Reparaturgewebes in HE-Färbung in 40-facher Vergrößerung; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Zellzahl oberflächliche Zone	48,86 \pm 14,94	37,67 \pm 5,58	0,120
Zellzahl mittlere Zone	18,95 \pm 6,19	29,81 \pm 9,77	0,039
Zellzahl tiefe Zone	42,71 \pm 10,41	39,05 \pm 6,29	0,787
Zellzahl gesamt	110,52 \pm 13,16	106,52 \pm 16,52	0,941

7.4.3 Immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

7.4.3.1 Typ-II-Kollagen

Sowohl bei der Behandlungsgruppe mit dem rAAV Vektor als auch mit dem Trägermaterial zeigten sich signifikante Unterschiede der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen des Reparaturgewebes ($P = 0,001$; Tabelle 48).

Tabelle 48: Immunaktivität für Typ-II-Kollagen; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivität	0,43 \pm 0,14	2,17 \pm 0,41	0,001

7.4.3.2 Anti-TGF- β 1

Das Reparaturgewebe zeigte keine signifikant höhere Immunreaktivität für TGF- β 1 für die Behandlung mit dem TGF- β 1-Trägermaterial im Vergleich zu rAAV-TGF- β 1 (Tabelle 49).

Tabelle 49: Immunaktivität für TGF- β 1; 0 Punkte keine Immunreaktion, 4 Punkte höhere Immunreaktion; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivität	3,57 \pm 0,08	3,14 \pm 0,38	0,109

7.4.4 Mikro-computertomographische Analyse des Reparaturgewebes

Sowohl die subchondralen Knochenplatte als auch die subartikuläre Spongiosa wurden, wie unter 6.5.4.1 beschrieben, in jeweils zwei VOIs unterteilt.

7.4.4.1 Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte

Die subchondrale Knochenplatte wies bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 im Vergleich zu den TGF- β 1-Trägermaterialien keine signifikanten Veränderungen auf (Tabelle 50 und Tabelle 51).

Tabelle 50: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekts der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	771,17 \pm 45,05	775,14 \pm 54,66	0,995
BV/TV, %	6,30 \pm 3,21	9,21 \pm 3,34	0,241
BS/BV, mm ⁻¹	78,66 \pm 16,48	71,97 \pm 18,42	0,751
BS/TV, mm ⁻¹	4,57 \pm 1,92	6,15 \pm 0,83	0,498
Ct.Th, mm	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,501

Tabelle 51: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subchondralen Knochenplatte; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	851,07 \pm 66,22	845,46 \pm 56,12	0,988
BV/TV, %	80,58 \pm 13,02	84,82 \pm 6,14	0,798
BS/BV, mm ⁻¹	52,22 \pm 7,39	45,93 \pm 9,32	0,633
BS/TV, mm ⁻¹	42,13 \pm 9,02	38,69 \pm 6,38	0,869
Ct.Th, mm	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,537

7.4.4.2 Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa

Auch bei der Analyse der subartikulären Spongiosa des Defekts zeigten sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine signifikante Unterschiede (Tabelle 52 und Tabelle 53).

Tabelle 52: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des Defekt der subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Kategorie	TGF- β 1- Trägermaterial	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	796,06 \pm 22,76	804,99 \pm 34,76	0,942
BV/TV, %	17,89 \pm 8,09	25,33 \pm 4,42	0,129
BS/BV, mm ⁻¹	34,99 \pm 4,41	33,81 \pm 4,89	0,923
BS/TV, mm ⁻¹	6,11 \pm 2,65	8,53 \pm 1,84	0,130
Tb.Th, mm	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,992
Tb.Sp, mm	0,27 \pm 0,06	0,25 \pm 0,07	0,980

Tb.N, mm ⁻¹	1,54 ± 0,72	2,23 ± 0,54	0,131
Tb.Pf, mm ⁻¹	18,86 ± 12,96	8,63 ± 5,07	0,109
SMI, -/-	3,08 ± 1,30	2,00 ± 0,53	0,108
DA, -/-	1,41 ± 0,13	1,39 ± 0,14	0,971
FD, -/-	2,44 ± 0,07	2,45 ± 0,06	0,930

Tabelle 53: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse des an den Defekt angrenzenden Areals der subartikulären Spongiosa; MW ± SD.

Kategorie	TGF-β1- Trägermaterial	rAAV-TGF-β1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	845,61 ± 48,48	846,48 ± 51,97	1,000
BV/TV, %	44,35 ± 8,02	42,59 ± 10,86	0,964
BS/BV, mm ⁻¹	28,59 ± 3,70	29,69 ± 4,97	0,942
BS/TV, mm ⁻¹	12,48 ± 1,63	12,32 ± 2,41	0,988
Tb.Th, mm	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,918
Tb.Sp, mm	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,793
Tb.N, mm ⁻¹	3,67 ± 0,44	3,65 ± 0,76	0,998
Tb.Pf, mm ⁻¹	2,78 ± 2,90	1,49 ± 3,72	0,814
SMI, -/-	1,14 ± 0,48	0,91 ± 0,40	0,682
DA, -/-	1,62 ± 0,16	1,47 ± 0,16	0,214
FD, -/-	2,30 ± 0,14	2,34 ± 0,13	0,809

8. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der frühen Chondrogenese unter Einfluss von TGF- β 1 im Knorpeldefekt untersucht, da die Regulierung der Frühphase der Chondrogenese *in vivo* weitgehend ungeklärt ist. Sowohl durch Implantation von TGF- β 1-Trägermaterialien als auch von TGF- β 1-rAAV wird eine anhaltende Konzentration von TGF- β 1 im Defekt für mindestens vier Wochen erreicht, was die frühe Knorpelreparatur *in vivo* signifikant verbesserte. Die vorliegenden Daten unterstreichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 während der frühen Chondrogenese, diese durch Erhöhung der Vorläuferzellen zu modulieren und durch Steigerung der Differenzierung und der Matrixproduktion zu verbesserten Strukturparametern zu führen.

8.1 Trägermaterialien

In diesem Studienarm („A“) wurde die Hypothese untersucht, ob die Implantation eines TGF- β 1-Trägermaterials die frühe osteochondrale Reparatur im Vergleich zu einem Kontroll-Trägermaterial verbessert.

Der entscheidende Nachweis dieses Studienarms ist eine höhere Konzentration von TGF- β 1 nach vier Wochen *in vivo* bei den mit TGF- β 1-Trägermaterialien behandelten Defekten. TGF- β 1 induziert hier durch seine Anwesenheit eine beschleunigte Knorpelreparatur. Im Detail ergaben sich signifikant bessere histologische Parameter für „Zellmorphologie“, „Zellularität“, „Matrixanfärbbarkeit“ und in der Summe im histologischen Bewertungssystem nach Fortier. Darüber hinaus war die frühe Expression von Aggrecan und Typ-II-Kollagen in den Defekten mit TGF- β 1-Trägermaterialien verstärkt. Schließlich zeigten histomorphometrische Analysen signifikant erhöhte Zellzahlen innerhalb des neuen knorpeligen Reparaturgewebes in den mit TGF- β 1-Trägermaterialien behandelten Defekten. Bemerkenswerterweise zeigten topographische Quantifizierungen räumliche Differenzen in drei unterschiedlichen Zonen, in denen diese Veränderungen auftraten. Zusammengefasst identifizieren die erhobenen Daten einen Mechanismus, durch den TGF- β 1 die frühe Chondrogenese moduliert, indem es die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht und deren Differenzierung und Matrixablagerung induziert, was zu verbesserten strukturellen Parametern führt. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 während der frühen Chondrogenese in der Knorpelreparatur.

Die TGF- β 1-Signalgebung ist essentiell für die Knorpelbildung in frühen Stadien der Gelenkentwicklung (Wang *et al.*, 2014) und erhöht sowohl die Zellproliferation als auch die Produktion der extrazellulären Matrix signifikant (Kim *et al.*, 2003). Die Aufrechterhaltung einer bestimmten Schwellenkonzentration von TGF- β 1 für eine therapeutisch relevante Zeitspanne ist entscheidend für den Beginn und die Aufrechterhaltung einer effektiven Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen. Mello und Tuan haben bereits in hochdichten Zellkulturen nachgewiesen, dass TGF- β 1 die Zellproliferation und damit auch die Chondrogenese in vier Wochen stimuliert (Mello *et al.*, 2006). Bislang ist unser Wissen und Verständnis der Chondrogenese auf *in vitro*- oder Kleintier-Studien aufgebaut. Deshalb bleibt die Regulation dieses Prozesses der frühen Chondrogenese durch TGF- β 1 *in vivo* teilweise unklar.

Um dies zu ändern, verwendeten wir TGF- β 1-Trägermaterialien, von denen zuvor gezeigt wurde, dass sie die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* induzieren. In der vorliegenden Untersuchung konnten die Mechanismen der frühen Chondrogenese bei Knorpeldefekten *in vivo* weiterführend eruiert werden. Rey-Rico *et al.* zeigten *in vitro*, dass identische TGF- β 1-Trägermaterialien eine ca. 700-fache Hochregulation des Typ-II-Kollagen sowie eine ca. 200-fache Hochregulation der Aggrecan-mRNS induzieren. Als Vergleich dienten Pellets, die direkt mit gelöstem TGF- β 1 behandelt worden waren. Dies unterstreicht, dass durch kontrollierte TGF- β 1-Freisetzung aus soliden, biokompatiblen Trägermaterialien, die Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen trotz eines physikalischen Abstands und auch in Abwesenheit von löslichem TGF- β 1 gefördert wird und ist die Grundlage der hier vorliegenden *in vivo*-Studie (Rey-Rico *et al.*, 2015c).

In einer weiteren Studien wurde gezeigt, dass mit mesenchymalen Stammzellen beladene Trägermaterialien im Vergleich zu zellfreien Kontroll-Trägermaterialien die Knorpelreparatur osteochondraler Defekte in einem Kaninchenmodell verbessern (Barron *et al.*, 2015). Unsere Daten weisen eine relevante TGF- β 1-Konzentration innerhalb des Reparaturgewebes der TGF- β 1-Trägermaterialien *in vivo* nach, während in den Kontroll-Trägermaterialien keine relevante Immunreaktivität für TGF- β 1 beobachtet wurde. Das hier verwendete langsame Freisetzungsprofil von 10 % der Gesamtmenge wurde ausgewählt, um unerwünschte Nebenwirkungen bei der Verwendung hoher Dosen des Wachstumsfaktors zu minimieren (Madry *et al.*, 2014, Rey-Rico *et al.*, 2015c).

Die unveränderte Mikrostruktur des subchondralen Knochens weist auf eine fehlende Wirkung auf die frühe subchondrale Knochenreparatur in diesem Studienaufbau hin.

Einige Studien zeigten eine positive Wirkung auf die Frakturheilung bei kontinuierlicher Zufuhr oder wiederholter Injektion um die Frakturstelle von TGF- β 1 für ungefähr sechs Wochen (Barnes *et al.*, 1999). Dagegen weisen andere Studien keine signifikanten Knochenheilungseffekte von TGF- β 1 nach (Barnes *et al.*, 1999). TGF- β 1 führt in einer instabilen Fraktursituation nicht wie gewünscht zu einer knöchernen, sondern zu einer fibrösen Kallusbildung (Critchlow *et al.*, 1995). Eine weitere Studie behandelte Kalottendefekte bei erwachsenen Pavianen mit einer Kollagenmatrix, die TGF- β 1 enthielt. Nach 30 Tagen - einem ähnlichen Zeitraum wie bei der vorliegenden Studie - war die Menge an Knochen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich (Ripamonti *et al.*, 1996). Ying *et al.* untersuchten die Wirkung von TGF- β 1 sowohl auf den Knorpel, als auch auf den subchondralen Knochen in arthrotischen Kiefergelenken und fanden dosisabhängige erhöhte Proteoglykan-Gehalte bei unveränderten Eigenschaften der subchondralen Knochenmikroarchitektur und ein gut organisiertes, Fibroblasten und Chondrozyten enthaltendes, Reparaturgewebe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, ähnlich den hier vorliegenden Daten (Ying *et al.*, 2013). Einige Variablen zwischen den Studien wie beispielsweise Defektart, Versuchstiere, Beobachtungszeitraum oder TGF- β 1-Dosis, könnten die unterschiedlichen Resultate erklären. Allumfassende Aussagen zum Effekt von TGF- β 1 auf die frühe Osteogenese sind somit nur schwer möglich, auch wenn es sehr wahrscheinlich ist, dass TGF- β 1 einen wichtigen Einfluss auf jeder Phase der Osteogenese hat (Alliston, 2014).

Wir wählten zellfreie Trägermaterialien für diese Studie, um die alleinigen Effekte des freigesetzten TGF- β 1 identifizieren zu können. Die signifikant erhöhten individuellen und Gesamt-Parameter der Chondrogenese unterstreichen die starke Wirkung von TGF- β 1 auf diesen Prozess. Die fast normale Zellmorphologie bestätigt eine vorteilhafte Wirkung von TGF- β 1 auf die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen. In ähnlicher Weise kann auch die signifikant erhöhte Vorläuferzellen-Anzahl TGF- β 1 zugeschrieben werden, wie aus den histologischen Parametern „Zellularität“ im Bewertungssystem nach Fortier und den Ergebnissen der histomorphometrischen Analysen ersichtlich ist. In einer vorherigen Studie war die Reparatur von Defekten in der femoralen Trochlearrinne bei Anwendung eines TGF- β 1-inkorporierten Kollagen-Vitrigels bereits signifikant verbessert (Maruki *et al.*, 2016).

TGF- β 1 hat eine sichtbare Wirkung auf die frühe Synthese von Aggrecan und Typ-II-Kollagen, zwei Hauptbestandteilen der extrazellulären Matrix. Von besonderer Bedeutung ist, dass im vorliegenden Versuchsaufbau die Aggrecan-Produktion in der mittleren Zone signifikant stimuliert wurde. Im gesunden adulten Knorpel synthetisieren

Chondrozyten in der mittleren Zone auch größere Mengen an Aggrecan im Vergleich zu den anderen knorpeligen Zonen (Goldring, 2012). Von ähnlicher Bedeutung ist, dass TGF- β 1 die Produktion von Typ-II-Kollagen zu diesem frühen Zeitpunkt anregte. Interessanterweise wurde Typ-II-Kollagen hauptsächlich in der tiefen Zone in engem Kontakt mit dem TGF- β 1-Trägermaterial beobachtet. Insgesamt bestätigen diese *in-vivo*-Daten die *in-vitro*-Befunde vorheriger Studien, dass TGF- β 1 die Expression von Typ-II-Kollagen und Aggrecan induziert und reguliert (Zhu *et al.*, 2015). Sie legen auch nahe, dass TGF- β 1 die Produktion der extrazellulären Matrix in den verschiedenen räumlichen Zonen in unterschiedlicher Art und Weise reguliert.

Die signifikant erhöhten Zellzahlen in den Defekten, die mit TGF- β 1-Trägermaterialien behandelt wurden, sind möglicherweise ein Ergebnis der Wirkung von TGF- β 1 auf die migrierten mesenchymalen Stammzellen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit früheren *in vitro*-Daten (Chen *et al.*, 2018). In der oberflächlichen Zone könnte die erhöhte Zellzahl aus mechanischen und biochemischen Stimuli - durch Gelenkbewegung und von der Synovia ausgehend - resultieren, während die Freisetzung von TGF- β 1 aus den Trägermaterialien und dessen direkte parakrine Wirkung zur erhöhten Zellzahl in den tieferen Zonen um das Trägermaterial herum führen kann (Kim *et al.*, 2003). Mendelson *et al.* berichten, dass eine kontrollierte Freisetzung von TGF- β 1 zu einer signifikant erhöhten Zellmigration in ein zellfreies Kollagen-Trägermaterial aus benachbarten einschichtigen Kulturen sowie zu erhöhten Typ-II-Kollagen- und Aggrecan-Konzentrationen führte (Mendelson *et al.*, 2011). Im Vergleich zu gelöst vorliegendem TGF- β 1, zeigen Chondrozyten bei gebundenem TGF- β 1 einen signifikant erhöhten DNS-Gehalt, sowie eine erhöhte Produktion von Glykosaminoglykanen und Kollagen über einen Zeitraum von 28 Tagen (Sridhar *et al.*, 2014). Alegre-Aguarón *et al.* beobachteten in einem dreidimensionalen Pelletkulturmodell mit mesenchymalen Stammzellen, dass die Applikation einer 1 ng TGF- β 1/ml enthaltenden Lösung zu einem chondrozytischen Phänotyp mit angepasster Glykosaminoglykan- und Kollagen-Konzentration führte (Alegre-Aguaron *et al.*, 2014). TGF- β 1 könnte somit eine Voraktivierung der migrierten mesenchymalen Stammzellen ausgelöst haben, was den Anstieg der Zellzahl und die chondrogene Differenzierung bedingt.

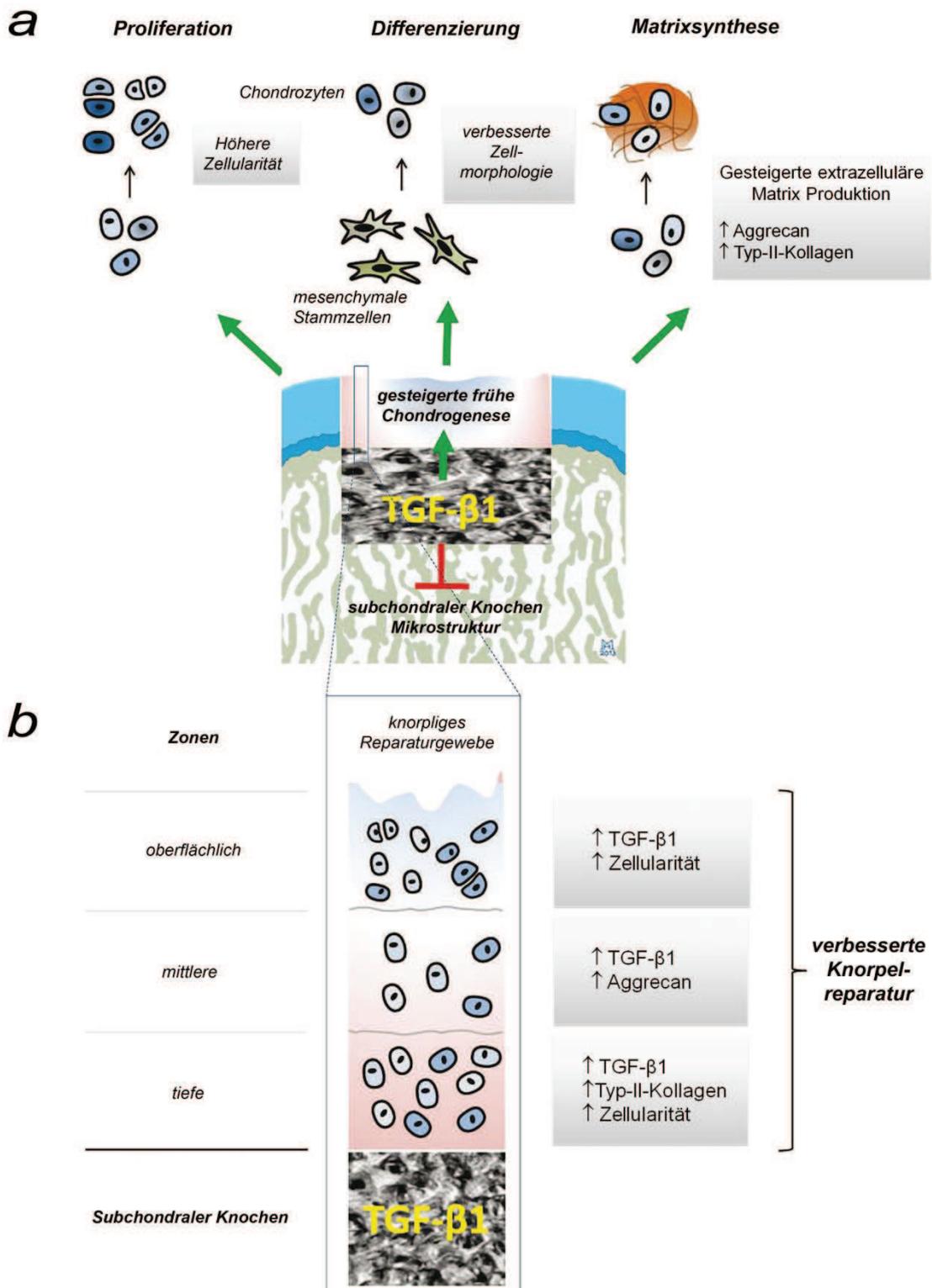


Abbildung 24: Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors beta 1 (TGF-β1) bei der Regulation der frühen Chondrogenese bei Gelenkknorpeldefekten. Die zeitlich und räumlich definierte Freisetzung von TGF-β1 verstärkt die Progenitorzellproliferation, -differenzierung und -synthese von Aggrecan und Typ-II-Kollagen, den Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels (a), während kein Effekt auf die Mikrostruktur des subchondralen Knochens beobachtet wurde (b). Die anhaltende Freisetzung von TGF-β1 moduliert diese frühen chondrogenen Ereignisse im knorpeligen Reparaturgewebe in spezifischen topographischen Mustern, was die zentrale Rolle von TGF-β1 während der frühen Chondrogenese unterstreicht.

Mögliche Einschränkungen dieser Studie sind der kurz gewählte Beobachtungszeitraum von vier Wochen, das ausgewählte Dosis- und Freisetzungsprofil von TGF- β 1 und die Tatsache, dass das hier verwendete Trägermaterial keine zusätzliche (Knorpel-)Schicht enthielt. Die Einführung einer zweiten Trägermaterialschiicht könnte zu einer Verzerrung potentieller Effekte führen, die entweder aus der subchondralen Knochen- oder aus der Knorpelschicht stammen. Dies hätte unter anderem zur Folge, dass eine erhöhte Anzahl an Tieren für eine robuste statistische Analyse benötigt werden würde. Darüber hinaus deuten die gute Füllung des Defekts, sowie die signifikant erhöhte Zellzahl und verbesserte Zellmorphologie - wie im Bewertungssystem nach Fortier gezeigt - darauf hin, dass die Migration mesenchymaler Stammzellen aus dem subchondralen Knochen durch die implantierten Trägermaterialien in keiner Weise beeinträchtigt wurde. Diese Stammzellen differenzieren sich im osteochondralen Defekt zu Chondrozyten und bilden ein suffizientes Reparaturgewebe (Madry *et al.*, 2017). Zu den weiteren Stärken gehört die Verwendung eines translationalen Tiermodells, das die klinische Situation des Menschen nachahmen soll.

Eine mögliche translationale klinische Verwendung dieser Trägermaterialien wäre eine Kombination von Markraumstimulationstechniken und der Implantation dieser Trägermaterialien in den subchondralen Knochen (Gao *et al.*, 2017). Diese TGF- β 1-freisetzenden Trägermaterialien sind in der Lage, Chondrogenese in einem physikalischen Abstand zu induzieren. In einer kontrollierten klinischen Studie unterstrich auch die direkte Anwendung von zellfreien Trägermaterialien die hohe Biokompatibilität dieses Konstrukts (Bartha *et al.*, 2013). Vergleichbare Protein-freisetzende Trägermaterialien wurden bereits erfolgreich angewandt, um die fibrochondrozytische Differenzierung von endogenen Zellen für die Meniskusregeneration in translationalen Umgebungen zu verbessern (Lee *et al.*, 2014). In Zukunft könnte eine solche zeitlich und räumlich definierte Freisetzung von TGF- β 1 als Zusatz zu markraumstimulierenden Ansätzen für die Knorpelregeneration *in vivo* dienen, was die Fähigkeit zur Chondrogenese innerhalb des Knorpeldefekts erhöht.

Zusammenfassend führt die Implantation von TGF- β 1-Trägermaterialien zu einer nachweisbaren Konzentration des Wachstumsfaktors im Knorpeldefekt vier Wochen postoperativ *in vivo*, was signifikant erhöhte Chondrogenese-Parameter zur Folge hat. Die Daten identifizieren einen Mechanismus, durch den TGF- β 1 die frühe Chondrogenese moduliert, indem es die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht und deren Differenzierung und Matrixablagerung induziert, was zu verbesserten strukturellen

Parametern führt. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 während der frühen Chondrogenese in der Knorpelreparatur.

8.2 Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren

In diesem Studienarm („B“) wurde die Hypothese untersucht, ob die Implantation von rAAV-TGF- β 1 die frühe osteochondrale Reparatur im Vergleich zu rAAV-*lacZ* *in vivo* verbessert. Desweiteren sollten die Effekte der Wachstumsfaktor-Überexpression gezeigt werden und gleichzeitig sollte in Anlehnung an frühere Arbeiten *in vitro* bewiesen werden, dass rAAV-TGF- β 1 die Fähigkeit besitzt, die metabolischen und chondrogenen Aktivitäten der mesenchymalen Stammzellen zu stimulieren (Frisch *et al.*, 2014, 2016c und 2016d).

Die Daten zeigten einerseits, dass die frühe makroskopische Reparatur durch direkte Verabreichung von rAAV-TGF- β 1 im Vergleich zu rAAV-*lacZ* signifikant verbessert wurde. Beim Bewertungssystem nach Goebel lagen in den Kategorien „Farbe“, „Gefäße“, „Oberflächenbeschaffenheit“ sowie in der Summe Signifikanzen vor. Dies wurde vom modifizierten Oswestry-Bewertungssystem untermauert, bei dem ebenso in der „Farbe“, „Oberflächenbeschaffenheit“, Summe sowie zudem in der „Integration“ signifikante Veränderungen auftraten (Goebel *et al.*, 2012).

Auf histologischem Niveau wurde eine verbesserte Heilung und Organisation der Defekte in Gegenwart von rAAV-TGF- β 1 beim Bewertungssystem nach Sellers beobachtet, obwohl die statistische Signifikanz zu diesem frühen Zeitpunkt nicht in allen Kategorien erreicht wurde. Die mit rAAV-TGF- β 1 behandelten Defekte zeigen zudem eine verstärkte zelluläre Aktivität einhergehend mit einer verstärkten Proliferation, Proteoglykan- und Typ-II-Kollagen-Synthese. Dies ist vermutlich auf eine effektive und signifikante Überexpression von TGF- β 1 in den Defekten zurückzuführen.

Venkatesan *et al.* erreichten an isolierten Chondrozyten und an arthrotischen Knorpelpräparaten durch rAAV-Genstransfer eine effiziente, verlängerte Expression von TGF- β 1 *in vitro* und *in situ*. Positive Auswirkungen zeigten sich in der Proliferation, im Überleben und in der anabolen Aktivität der Zellen für 21 Tage *in vitro* und für bis zu 90 Tage *in situ* im Vergleich zur Kontrolle. Die anhaltende Produktion von TGF- β 1 in den Chondrozyten bedingt durch rAAV-TGF- β 1 sorgte zudem für eine permanente Umgestaltung des arthrotischen Knorpels (Venkatesan *et al.*, 2013). Dies unterstreicht die signifikant höheren Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung von TGF- β 1 im Defektareal im Vergleich zur Kontrollgruppe mit rAAV-*lacZ* in der vorliegenden Studie. Diese Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung beweisen, dass der bilaterale

Studienaufbau mit rAAV-Vektoren somit ohne Probleme möglich ist, da der Wachstumsfaktor lediglich im Defektareal nachweisbar ist und keine systemische Wirkung zeigt.

Für die Chondrogenese ist die Aufrechterhaltung einer anhaltenden Schwellenkonzentration von TGF- β 1 unerlässlich. Frisch *et al.* wiesen in *in vitro*-Experimenten mit rAAV-TGF- β 1 in humanem peripheren Blut eine hohe und anhaltende Konzentration der transgenen Expression für mind. 21 Tage nach, was früheren Studien mit humanem Knochenmark bei gleichem Vektorkonstrukt entspricht (Yoo *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999; Barry *et al.*, 2001; Rey-Rico *et al.*, 2015a; Frisch *et al.*, 2016c). Außerdem zeigte sich durch TGF- β 1-Überexpression eine Stimulation proliferativer und chondrogener Prozesse im peripheren Blut, welche jedoch niedriger war als die in Knochenmarksaspiraten (Frisch *et al.*, 2016b). Die nachgewiesene höhere Proliferation unterstreicht die Ergebnisse der Histomorphometrie dieser Studie, welche eine erhöhte Zellzahl bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 in der mittleren und tiefen Zone belegt.

Frisch *et al.* verglichen *in vitro* den Effekt von rAAV-TGF- β 1, rAAV-sox9 und rAAV-lacZ auf Knochenmarkaspirate von Minischweinen. Nach 21 Tagen konnte bei rAAV-TGF- β 1 im Vergleich zu rAAV-sox9 und rAAV-lacZ in der HE-Färbung eine signifikant höhere Zelldichte nachgewiesen werden. Die Typ-II- und Typ-X-Kollagen-Gehalte der Aspirate waren verglichen mit der sox9-Behandlung bei rAAV-TGF- β 1 signifikant erhöht (Frisch *et al.*, 2016d). Dies geht mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie einher, bei der neben einer erhöhten Zellzahl eine erhöhte Typ-II- und Typ-X-Kollagen-Konzentration nachgewiesen wurde. Dies bestätigt in der Diskussion über die Wirkung von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie auf den Typ-II-Kollagen-Gehalt die Ergebnisse von Fortier *et al.* (2002) und Capito *et al.* (2007), die eine Steigerung der Synthese *in vitro* beschrieben (Fortier *et al.*, 2002; Capito *et al.*, 2007; Orth, 2008).

Eine Diskrepanz in dieser Studie zeigt sich in der Neubildung des subchondralen Knochens. Bei der Bewertung nach Sellers wurde histologisch eine signifikant bessere Neubildung des subchondralen Knochens festgestellt. Allerdings unterschieden sich die Parameter des Mikro-CT der Behandlungsgruppen nicht signifikant voneinander. Stattdessen wurden jeweils im Vergleich zur normalen osteochondralen Einheit Signifikanzen gefunden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Reparaturgewebe, wahrscheinlich durch die kurze Studiendauer bedingt, durch einen hohen fibrösen Anteil charakterisiert wird. Im Mikro-CT sind fibröse Strukturen nur schwer darstellbar.

Die vorliegende Studie unterstreicht somit das Potential von rAAV-Vektoren, die Chondrogenese und Chondrozytenproliferation *in vivo* anzuregen. Es wurden zudem keine schädlichen Wirkungen im Sinne von Synovialitiden, verstärkter Fibrose oder Osteophytenbildung in Gegenwart von rAAV nachgewiesen. Dies unterstützt die Annahme, dass diese Vektorklasse für den direkten Gentransfer als sicheres Verfahren angesehen werden kann (Cucchiari [ép. Madry] *et al.*, 2005b, 2013 und 2014).

Auch führt die lokale Anwendung im Defektareal von rAAV-TGF- β 1 zu diesem frühem Zeitpunkt zu keinen schädlichen Reaktionen in den umgebenden Geweben des Gelenks. Diese lokale Wirkung und somit das Fehlen einer TGF- β 1-Expression außerhalb des Defekts unterstreicht, dass es bei dieser Art des Gentransfers nicht zu Vektorleckagen und somit zur (unkontrollierten) Verbreitung von Genprodukten kam. Frühere Studien zeigten, dass die direkte intraartikuläre Injektion von rTGF- β 1 (van Beuningen *et al.*, 1994, 1998 und 2000; van Lent *et al.*, 2004) oder eines adenoviralen TGF- β 1-Gen-Vektors (Bakker *et al.*, 2001; Orth *et al.*, 2015) in Kniegelenke bei Mäusen (van Beuningen *et al.*, 1994, 1998 und 2000; Bakker *et al.*, 2001; van Lent *et al.*, 2004) und Kaninchen (Mi *et al.* 2003) unerwünschte Wirkungen induziert. TGF- β 1 kann durch die intraartikuläre Injektion auch anderen Geweben als den mesenchymalen Stammzellen im Defekt, wie der Synovia, zugänglich sein. Dies führt zur Aktivierung der Makrophagen in der Synovialmembran (van Lent *et al.*, 2004) und dadurch zu einer Verdickung der Synovia und einer Synovialitis, einhergehend mit Osteophytenbildung und Fibrose. Insbesondere bei Einzel- oder Mehrfachinjektionen von hrTGF- β 1 oder des adenoviralen TGF- β 1-Vektors bei hohen Dosen (bis zu 200 ng und 10^7 - 10^9 funktionelle Partikel) kann dies der Fall sein (van Beuningen *et al.*, 1994, 1998 und 2000; Bakker *et al.*, 2001; Mi *et al.* 2003; van Lent *et al.*, 2004). In der hier vorliegenden Studie wurde eine einzelne Vektoranwendung bei viel niedrigerer Vektordosis ($2,4 \times 10^5$ funktionelle Partikel) durchgeführt, was einer Produktion des Wachstumsfaktors im Bereich von 20-65 pg/ml/24 h entspricht (Frisch *et al.*, 2014) Dies hebt wiederum die Vorteile des hier angewendeten lokalisierten direkten Gentransfer-Ansatzes hervor.

Zudem konnten Arbeiten mit mesenchymalen Stammzellen *in vitro* (Frisch *et al.*, 2014) zeigen, dass eine Erhöhung der Vektordosis zur Verbesserung der Qualität des Reparaturgewebes und zu einer noch höheren Typ-X-Kollagenexpression führen kann, wie hier bereits als mögliche Auswirkung von rAAV-TGF- β 1 nach kurzer Zeit nachgewiesen (MacKay *et al.*, 1998; Cucchiari [ép. Madry] *et al.*, 2005b; Frisch *et al.*, 2014).

Durch eine bessere Regulierung der Produktion und damit der Auswirkungen von TGF- β 1 im Rahmen des direkten Gentransfers könnte, neben einer signifikanten Verbesserung der Knorpelreparatur einhergehend mit einer Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen, zusätzlich auch die subchondrale Knochenrekonstruktionen kontrolliert optimiert werden (Centrella *et al.*, 1988). Dies könnte durch eine Steuerung der TGF- β 1-Expression erzielt werden, indem regulierbare Tetrazyklin-sensitive oder gewebespezifische Promotoren, wie *sox9* oder Typ-II-Kollagen Promotoren, in das Gentransfersystem integriert werden (Goldring *et al.*, 1994).

Ein weiterer Ansatz könnte die kontrollierte Abgabe von rAAV-TGF- β 1 aus einem biokompatiblen Trägermaterial oder einem Hydrogel sein (Johnstone *et al.*, 1998; Brunger *et al.*, 2014; Rey-Rico *et al.*, 2015b und 2017). Gleichzeitig kann dies in Kombination mit antihypertrophen Faktoren wie *sox9*, Anti-Typ-I Kollagen-shRNA oder Anti-Cbfa-1-siRNA eingesetzt werden (Yao *et al.*, 2010; Cucchiari [ép. Madry] *et al.*, 2013). Selbstverständlich könnten auch indirekte (zellassozierte) Gentransferansätze genutzt werden (Pagnotto *et al.*, 2007; Ivkovic *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013).

Eine Stärke dieser Studie ist, dass die Chondrogenese in der natürlichen biochemischen und biomechanischen Mikroumgebung stattfand (Pascher *et al.*, 2004; Cucchiari [ép. Madry] *et al.*, 2005a; Ivkovic *et al.*, 2010). Gleichzeitig ist es jedoch eine Einschränkung, dass die Tiere direkt Vollbelastung ausübten und auch keine weitere Therapie wie physiotherapeutische Behandlung oder Ähnliches stattfanden. Auch wenn verschiedene *in vitro* Studien nach vier Wochen bereits Effekte zeigen (Venkatesan *et al.*, 2013; Rey-Rico *et al.*, 2015a; Frisch *et al.*, 2016c und 2016d), kann durch mögliche Verzögerungen in der Abgabe des Wachstumsfaktors *in vivo* die Studiendauer zu kurz angesetzt sein. Der Zeitpunkt wurde gewählt, um Früheffekte von TGF- β 1 zu evaluieren. Allerdings bringt diese Gegebenheit auch Nachteile mit sich. An erster Stelle kann so nur unzureichend beurteilt werden, inwieweit das Studienmodell für eine längerfristige Anwendung im Menschen geeignet ist und langfristig die osteochondralen Defekte repariert. Des Weiteren sind mögliche schädliche Nebenwirkungen von TGF- β 1 bei längerfristiger Anwendung wie Osteophytenbildung und Fibrogenese oder der rAAV-Vektoren *in vivo* nur schwer abzuschätzen (Bakker *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2017).

Insgesamt bieten die vorliegenden Ergebnisse eine aussagekräftige Grundlage für die Anwendung eines direkten rAAV-vermittelten therapeutischen Gentransfers von TGF- β 1 zur Behandlung von fokalen Knorpelschäden (Pagnotto *et al.*, 2007; Ivkovic *et al.*,

2010; Yao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Es wird dennoch notwendig sein, in längerfristigen *in vivo*-Studien erneut die Reparatur des Knorpels und des subchondralen Knochens in diesem Versuchsaufbau zu evaluieren und damit herauszufinden, ob diese Behandlung zukünftig zur klinischen Anwendungen kommen könnte.

8.3 Vergleich des trägermaterialbasierten mit dem gentransferbasierten Vorgehen ohne Wachstumsfaktor

Zusätzlich wurde die Hypothese untersucht, dass die frühe osteochondrale Reparatur nach Implantation eines Trägermaterials ohne Wachstumsfaktor („Kontroll-Trägermaterial“) im Vergleich zu rekombinanten adeno-assoziierten viralen Kontroll-Vektoren mit *lacZ* („rAAV-*lacZ*“) verbessert ist. Hierfür wurden neben den beiden großen Studienarmen die einzelnen Negativkontrollen verglichen, um eine mögliche Selbstheilung der osteochondralen Defekte im Minischweinmodell und die Unterschiede der reinen Vektoren auf die Prozesse der Chondrogenese und Osteogenese zu veranschaulichen.

Makroskopisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede an. Es zeigte sich bei der histologischen Bewertung nach Sellers in der „Defektarchitektur“, sowie in der Immunhistochemie für Typ-II-Kollagen ein signifikant besseres Ergebnis für rAAV-*lacZ*. Die Evaluation mittels Mikro-CT-Analyse war für die subchondrale Knochenplatte in Bezug auf das Knochenvolumen in Relation zum Gesamtvolumen (BV/TV) signifikant. Für die subartikuläre Spongiosa zeigt die Evaluation mittels Mikro-CT-Analyse in Bezug auf die Konnektivität (Tb.Pf) und den Grad der Anisotropie (DA) für rAAV-*lacZ* Signifikanzen.

Das bessere Ergebnis der Defektarchitektur des rAAV-Vektors im Vergleich zum Trägermaterial könnte aus der geringeren Irritation vom Defektgrund ausgehen, da hierdurch Defekte im Reparaturgewebe geringer ausfallen könnten. Auch kann die Struktur der Trägermaterialien kann das niedrigere BV/TV, sowie die weniger stark ausgeprägte Konnektivität und den höheren Grad der Anisotropie bedingen.

Kaul *et al.* (2006) und Madry *et al.* (2005) beschrieben bereits in verschiedenen Studien, dass es in unbehandelten Defektarealen zu einer spontanen Zunahme des Typ-II-Kollagen kommen kann (Madry *et al.*, 2005; Kaul *et al.*, 2006; Orth, 2008). Die bei rAAV-*lacZ* vorkommende höhere Typ-II-Kollagen-Konzentration ist nochmals ein Beweis dafür, dass die hier verwendeten rAAV-Gentransfersysteme bereits ohne

Kodierung eines Wachstumsfaktors in der Lage sind, die Typ-II-Kollagen-Produktion als Grundlage für die Chondrogenese zu stimulieren.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Implantation eines Kontroll-Trägermaterials im Vergleich zur Implantation rAAV-Vektoren zur vermeintlichen Erhöhung der Stabilität des Reparaturgewebes nicht von signifikantem Nutzen ist. Eine Beladung der Trägermaterialien mit humanen mesenchymalen Stammzellen könnte in Kombination mit TGF- β 1 zu einer verbesserten Heilung des Defekts führen, wobei klar das Potential der rAAV-Vektoren die Typ-II-Kollagen-Produktion zu steigern, hervorgehoben werden muss, was essentiell für die Induktion und Aufrechterhaltung der Chondrogenese ist.

8.4 Vergleich der trägermaterialbasierten mit der gentransferbasierten Bereitstellung von TGF- β 1

Als weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass die frühe osteochondrale Reparatur nach Implantation eines kontinuierlich TGF- β 1 freisetzenden Trägermaterials („TGF- β 1-Trägermaterial“) im Vergleich zum Gentransfer mit rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren, welche eine TGF- β 1 cDNS tragen („rAAV-TGF- β 1“) verbessert ist. Hierfür wurden die Positivkontrollen der einzelnen Studienarme verglichen, um festzustellen, inwieweit die Art der Einbringung von TGF- β 1 für die Reparatur der osteochondralen Defekte im Minischweinmodell von Bedeutung ist.

Bei der makroskopischen Bewertung nach dem modifizierten Oswestry-Bewertungssystem ergab sich für rAAV-TGF- β 1 in der Oberflächenbeschaffenheit ein signifikant besserer Wert. Bei der histologischen Bewertung nach Sellers zeigen sich in der „Defektarchitektur“, in der „Neubildung des subchondralen Knochens“ und in der Summe signifikante Ergebnisse für rAAV-TGF- β 1. Auch in der mittleren Zone der Zellzählung wies die Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 signifikant mehr Zellen auf. Immunhistochemisch zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität für Typ-II-Kollagen für rAAV-TGF- β 1. Die Evaluation mittels Mikro-CT-Analyse zeigte keine Signifikanzen.

Die signifikant besseren Ergebnisse in der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 einerseits makroskopisch in der „Oberflächenbeschaffenheit“ und andererseits auch histologisch in der „Defektarchitektur“, der „Neubildung des subchondralen Knochens“ und in der Summe des Bewertungssystems nach Sellers, können auf verschiedene Punkte der Einbringungsart des Wachstumsfaktors zurückzuführen sein. Die Trägermaterialien

geben einerseits Stabilität, andererseits rufen sie, beispielsweise bedingt durch einen leichten Bewegungsspielraum innerhalb des Defekts, eine gewisse Reizung des Reparaturgewebes hervor. Dies äußert sich durch oben genannte signifikant bessere Ergebnisse von rAAV-TGF- β 1.

Shi *et al.* extrahierten Stammzellen aus Fettgewebe (ADSCs) und Chondrozyten aus neuseeländischen weißen Kaninchen und kultivierten diese mit TGF- β 1. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Chondrozytenproliferation durch TGF- β 1 nachgewiesen (Shi *et al.*, 2017). TGF- β 1 wirkt hierbei als direkter Promotor der Proliferation, wie bereits durch Almeida *et al.* bewiesen wurde (Almeida *et al.*, 2015). Auch in den vorliegenden Studien erhöhten beide Einbringungsarten wie unter 7.1.2.2 und 7.2.2.2 aufgezeigt die Zellzahl im Defekt im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Gegenüberstellung beider Systeme mit Wachstumsfaktor erhöhte rAAV-TGF- β 1 die Zellzahl in der mittleren Zone im Vergleich zum TGF- β 1-Trägermaterial signifikant. Hierbei wird die positive Wirkung des Wachstumsfaktors hervorgehoben, durch direkten Gentransfer alle Knorpelschichten zu modulieren und nicht nur überwiegend in der lokalen Umgebung des Trägermaterials zu wirken (Venkatesan *et al.*, 2013).

Die Erhöhung des Typ-II-Kollagen-Gehalts durch TGF- β 1 als Grundlage für die Chondrogenese wurde bereits in vielen Studien bestätigt. Die positive Wirkung von rAAV-Vektoren auf die Typ-II-Kollagen-Synthese wird durch den signifikant höheren Typ-II-Kollagen-Gehalt der mit rAAV-TGF- β 1 behandelten Proben nochmals unterstrichen (Zhu *et al.*, 2015). Eine zusätzliche Stimulation könnte durch die Anwendung eines niedrigenergetischen Ultraschall erzeugt werden, welcher positive Effekte auf die Glykosaminoglykane, Typ-II-Kollagen und das Gesamt-Kollagen zeigt (Aliabouzar *et al.*, 2018).

Weitere Studien erreichen durch Einbringung eines chondrozytenenthaltenden dreidimensionalen synthetischen Gewebes (TEC) in chondrale Defekte eine verbesserte Knorpelreparatur. Dieser Ansatz ohne Trägermaterialien könnte möglicherweise eine höhere Sicherheit in der Langzeitanwendung für den Patienten mit sich bringen (Shimomura *et al.*, 2018).

Im Rahmen dieses Vergleiches scheint es, als würde die vermeintliche Stabilität der Trägermaterialien auch negative Effekte auf die Defektheilung haben. Es könnte eine zusätzliche Fixierung des Trägermaterials im Defekt evaluiert werden. Des Weiteren sollte in einer *in vitro*-Studie die hier vorliegende Tendenz bestätigt werden, dass die Einbringung von TGF- β 1 durch rAAV-Vektoren effizienter ist als die direkte

Bereitstellung des Wachstumsfaktors über Trägermaterialien und unter gleichen Bedingungen die Chondrogenese stärker stimuliert.

Zudem könnte, angelehnt an die *in vitro*-Studie von Rey-Rico *et al.* eine Kombination der beiden Methoden durch eine Beladung der Trägermaterialien nicht nur mit TGF- β 1, sondern mit rAAV-TGF- β 1 erfolgen, um die Vorteile beider Systeme, die Stabilität der Trägermaterialien einerseits und die schnelle Transduktion durch direkten Gentransfer mit rAAV-Vektoren andererseits, zu nutzen (Rey-Rico *et al.*, 2016).

8.5 Versuchsaufbau und angewandte Methoden

Für dieses translationale Studienmodell wurden weibliche, ausgewachsene Göttinger Minischweine verwendet. Knorpelexperimente werden häufig mit diesen Schweinen durchgeführt, da sie in Bezug auf den Gelenkaufbau, die Gelenkbelastung und die Knorpeldicke mit dem Menschen vergleichbar sind. Das menschliche TGF- β 1 Gen ist zudem identisch mit dem der Minischweine, weshalb hierdurch die Chondrogenese in osteochondralen Defekten in Minischweinen stimuliert wird (Gotterbarm *et al.*, 2008; Ruehe *et al.*, 2009; Niemi *et al.*, 2014). Durch diese Faktoren wird die klinische Situation beim Menschen nahezu optimal nachgeahmt.

In dieser Studie wurde auf Grundlage einer Power-Analyse und Erkenntnissen vorheriger Studien ein bilateraler Studienaufbau mit sieben Tieren angewandt (Orth *et al.*, 2013b; Cucchiaroni [ép. Madry] *et al.*, 2014). Dieser ist stark genug, um geringe Unterschiede von 4 Punkten im histologischen Bewertungssystem nach Sellers mit einer Standardabweichung von 3 Punkten zu zeigen. Da die histologische Gesamtpunktzahl von 31 (keine Reparatur) bis 0 (Gelenkknorpelregeneration) reicht, wurde eine Differenz von 4 Punkten als robust betrachtet, da bei geringeren Unterschieden keine klinische Bedeutung gegeben wäre. Die erforderliche Anzahl der Versuchstiere für eine robuste statistische Analyse wäre beispielsweise durch die Einführung einer zweiten Schicht in den Trägermaterialien erheblich vergrößert worden.

Die Wahl des frühen Zeitpunktes der Probenentnahme muss differenziert betrachtet werden. Einerseits zielt er darauf ab, Früheffekte der Chondrogenese zu untersuchen und speziell durch die immunhistochemische Evaluation können die genaueren Mechanismen von TGF- β 1 auf die Chondrogenese erfasst werden. Andererseits können so mögliche unerwünschte Nebenwirkungen der Langzeitanwendung von TGF- β 1 oder der Transfersysteme *in vivo* nicht ausreichend evaluiert werden.

In beiden Studienarmen wurden eine Vielzahl robuster Evaluierungstechniken angewandt, wie die beiden makroskopischen Bewertungssysteme (Goebel *et al.*, 2012), das Mikro-CT (Orth *et al.*, 2012a) oder die histologischen Bewertungssysteme nach Sellers und Fortier (Orth *et al.*, 2012b und 2015). Diese dienen der exakten Beurteilung des Reparaturgewebes und sind somit als wichtige Stärke der Studie hervorzuheben. Auch wenn häufig lediglich Tendenzen und wenige statistisch signifikante strukturelle Unterschiede in der osteochondralen Reparatur gefunden wurden, können aufgrund der hohen Objektivität dieser Bewertungssysteme und dem zusätzlichen Vergleich zweier etablierter Bewertungssysteme, diese Ergebnisse von wissenschaftlichem Wert angesehen werden. Insgesamt kann diese Studie helfen, unnötige Replikation einer ähnlichen experimentellen Einstellung zu verhindern, da nun speziell Studien mit längerem Beobachtungszeitraum nötig sind.

8.6 Zusammenfassung und Ausblick

In Zusammenschau identifizieren diese Daten einen Mechanismus, durch den TGF- β 1 die frühe Chondrogenese moduliert, indem es die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht, sowie deren Differenzierung und Matrixproduktion steigert, was zu verbesserten Strukturparametern führt. Diese Daten unterstreichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 während der frühen Chondrogenese bei der Knorpelreparatur.

Bei einer möglichen klinischen Anwendung wird wohl eine Kombination verschiedener Ansätze den größten Nutzen für die Bildung eines suffizienten Reparaturgewebes bringen. Einerseits könnte der direkte Gentransfer von TGF- β 1 mit rAAV-Vektoren durch eine genauere Steuerung der TGF- β 1-Expression zu einer kontrollierten Optimierung der Knorpel- und Knochenreparatur *in situ* führen. Dies könnte beispielsweise durch Integration regulierbarer Tetrazyklin-sensitiver oder gewebespezifischer Promotoren oder anti-hypertropher Faktoren realisiert werden, die zusätzlich unerwünschte Nebenwirkungen minimieren.

Im Rahmen der indirekten (zellassozierten) Gentransferansätze könnte die Transduktion mesenchymaler Stammzellen oder Chondrozyten mit rAAV-TGF- β 1 bereits *in vitro* erfolgen, welche nach Implantation in den Defekt *in vivo* zu einer beschleunigten Chondrogenese führen. Ebenfalls könnte die kontrollierte Abgabe von rAAV-TGF- β 1 aus einem Trägermaterial (solide oder Hydrogel) erfolgen, welches die zeitlich und räumlich definierte Freisetzung optimieren könnte. Hierbei können die Trägermaterialien auch zusätzlich mit mesenchymalen Stammzellen oder Chondrozyten beladen werden. Auch kann die Implantation dieser Trägermaterialien

(ohne oder mit rAAV-Vektoren, Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen) zusätzlich mit markraumstimulierenden Verfahren kombiniert werden. Diese könnten weitere positive Effekte auf die Knochenreparatur haben.

Alle möglichen Ansätze müssen jedoch zunächst *in vitro* und *in vivo* weiter auf ihre Sicherheit und Effizienz geprüft werden.

9. Literaturverzeichnis

Ahn, J.L., Oh, J., Kim, S., Kim, H., Park, I., Choi, B., Im, G.I. (2009). Novel hyaluronate-atelocollagen/beta-TCP-hydroxyapatite biphasic scaffold for the repair of osteochondral defects in rabbits. *Tissue Eng Part A* 15(9), S. 2595-2604.

Alegre-Aguarón, E., Sampat, S.R., Xiong, J.C., Colligan, R.M., Bulinski, J.C., Cook, J.L., Ateshian, G.A., Brown, L.M., Hung, C. (2014). Growth factor priming differentially modulates components of the extracellular matrix proteome in chondrocytes and synovium-derived stem cells. *PLoS One* 9(2), S. e88053.

Aliabouzar, M., Lee, S., Zhou, X., Zhang, G., Sarkar, K. (2018). Effects of scaffold microstructure and low intensity pulsed ultrasound on chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 115(2), S. 495-506.

Alliston, T. (2014). Biological regulation of bone quality. *Curr Osteoporos Rep* 12(3), S. 366-37.

Almeida, H.V., Cunniffe, G. M., Vinardell, T., Buckley, C.T., O'Brien, F.J., Kelly, D.J. (2015). Coupling freshly isolated CD44+ infrapatellar fat pad-derived stromal cells with a TGF- β 3 eluting cartilage ECM-derived scaffold as a single-stage strategy for promoting chondrogenesis. *Adv Healthc Mat* 4(7), S. 1043-1053.

Anderson, W. (1992). Human gene therapy. *Science* 256(5058), S. 808-813.

Aref-Eshghi, E., Liu, M., Harper, P. (2015). Overexpression of MMP13 in human osteoarthritic cartilage is associated with the SMADindependent TGF-b signalling pathway. *Arthritis Res Ther* 17:264, S. 264–271.

Arøen, A., Løken, S. (2004). Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 32(1), S. 211–215.

Bakker, A., van de Loo, F., van Beuningen, H., Sime, P., van Lent, P., van der Kraan, P., Richards, C., van den Berg, W.B. (2001). Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 9(2), S. 128–136.

Bal, B., Rahaman, M., Jayabalan, P., Kuroki, K., Cockrell, M., Yao, J., Cook, J.L. (2010). In vivo outcomes of tissue-engineered osteochondral grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93(1), S. 164-174.

Barnes, G., Kostenuik, P., Gerstenfeld, L., Einhorn, T. (1999). Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14(11), S. 1805-1815.

Barron, V., Merghani, K., Shaw, G., Coleman, C. M., Hayes, J. S., Ansboro, S., Manian, A., O'Malley, G., Connolly, E., Nandakumar, A., van Blitterswijk, C.A., Habibovic, P., Moroni, L., Shannon, F., Murphy, J.M., Barry, F. (2015). Evaluation of cartilage repair by mesenchymal stem cells seeded on a PEOT/PBT scaffold in an osteochondral defect. *Ann Biomed Eng* 43(9), S. 2069-2082.

- Barry, F., Boynton, R., Liu, B. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268(2), S. 189–200.
- Bartha, L., Hamann, D., Pieper, J., Peters, F., Riesle, J., Vajda, A., Novak, P.K., Hangody, L.R., Vasarhelyi, G., Bodó, L., van Blitterswijk, C., Kenyeres, A., Modis, L., Balo, E., Hangody, L. (2013). A clinical feasibility study to evaluate the safety and efficacy of PEOT/PBT implants for human donor site filling during mosaicplasty. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 23(1), S. 81-91.
- Bellavia, D., Veronesi, F., Carina, V., Costa, V., Raimondi, L., De Luca, A., Alessandro, R., Fini, M., Giavaresi, G. (2018). Gene therapy for chondral and osteochondral regeneration: is the future now? *Cell Mol Life Sci* 75(4), S. 649-667.
- Bessis, N., Garcia Cozar, F., Boissier, M. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* (11), S. 10-17.
- Bora, F. J., Miller, G. (1987). Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin* 3(3), S. 325-336.
- Boushell, M., Hung, C., Hunziker, E., Strauss, E., Lu, H. (2017). Current strategies for integrative cartilage repair. *Connect Tissue Res* 58(5), S. 1-14.
- Brittberg, M., Winalski, C. (2003). Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am* (85-A Suppl 2), S. 58-69.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* 331(14), S. 889-895.
- Brunger, J., Huynh, N., Guenther, C., Perez-Pinera, P., Moutos, F., Sanchez-Adams, J., Gersbach, C.A., Guilak, F. (2014). Scaffold-mediated lentiviral transduction for functional tissue engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(9), E798-E806.
- Buckwalter, J. (1983). Articular cartilage. *Instr Course Lect* (32), S. 349-370.
- Buckwalter, J., Mankin, H. (1998). Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41(8), S. 1331-1342.
- Buckwalter, J., Woo, S., Goldberg, V., Hadley, E., Booth, F., Oegama, T., Eyre, D.R. (1993). Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am* 75(10), S. 1533-1548.
- Cao, B., Huard, J. (2004). Gene transfer to skeletal muscle using herpes simplex virus-based vectors. *Methods Mol Biol* (246), S. 301-308.
- Capito, R., Spector, M. (2007). Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering. *Gene Ther* 14(9), S. 721-732.
- Centrella, M., McCarthy, T., Canalis, E. (1988). Skeletal tissue and transforming growth factor beta. *FASEB J* 2(15), S. 3066-3073.

- Chang, Y., Gu, H., Kobayashi, M., Oka, M. (1998). Comparison of the bony ingrowth into an osteochondral defect and an artificial osteochondral composite device in load-bearing joints. *Knee* (5), S. 205.
- Chen, J., Chen, H., Li, P., Diao, H., Zhu, S., Dong, L. (2011). Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32(21), S. 4793-4805.
- Chen, M.J., Whiteley, J.P., Please, C.P., Schwab, A., Ehlicke, F., Waters, S.L., Byrne, H.M. (2018). Inducing chondrogenesis in MSC/chondrocyte co-cultures using exogenous TGF-beta: a mathematical model. *J Theor Biol* (439), S. 1-13.
- Chuma, H., Mizuta, H., Kudo, S., Takagi, K., Hiraki, Y. (2004). One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cart* 12(10), S. 834-842.
- Critchlow, M., Bland, Y., Ashhurst, D. (1995). The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16(5), S. 521-527.
- Crystal, R. (1995). The gene as the drug. *Nat Med* 1(1), S. 15-17.
- Crystal, R. (1995). Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270(5235), S. 404-410.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H. (2005a). Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7(12), S. 1495-509.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H. (2014). Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* 21(9), S. 811-819.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., de Girolamo, L., Filardo, G., Oliveira, J., Orth, P., Pape, D., Reboul, P. (2016). Basic science of osteoarthritis. *J Exp Orthop* 3(1), S. 22.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Ekici, M., Schetting, S. (2011). Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17(15-16), S. 1921-1933.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H., Ma, C., Thurn, T., Zurakowski, D., Menger, M., Kohn, D., Trippel, S.B., Terwilliger, E. (2005b). Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor. *Mol Ther* 12(2), S. 229-238.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Orth, P., Madry, H. (2013). Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J Mol Med (Berl)* 91(5), S. 625-636.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Terwilliger, E., Kohn, D., Madry, H. (2009). Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med* 13(8B), S. 2476-2488.

- Cucchiariini [ép. Madry], M., Thurn, T., Weimer, A., Kohn, D., Terwilliger, E., Madry, H. (2007). Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* 56(1), S. 158–167.
- Cucchiariini [ép. Madry], M., Asen, A., Goebel, L., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Zurakowski, D., Menger, M. D., Laschke, M.W., Madry, H. (*pending on revision*). Effects of TGF- β overexpression via rAAV gene transfer on the early repair processes in an osteochondral defect model in minipigs. *Am J Sports Med*.
- Cui, W., Wang, Q., Chen, G., Zhou, S., Chang, Q., Zuo, Q., Ren, K., Fan, W. (2011). Repair of articular cartilage defects with tissue-engineered osteochondral composites in pigs. *J Biosci Bioeng* 111(4), S. 493-500.
- Curl, W., Krome, J., Gordon, E.S., Rushing, ., Smith, B.P., Poehling, G.G. (1997). Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13(4), S. 456–460.
- Dai, J., Rabie, A. (2007). The use of recombinant adeno-associated virus for skeletal gene therapy. *Orthod Craniofac Res* 10(1), S. 1-14.
- Duan, P., Pan, Z., Cao, L., He, Y., Wang, H., Qu, Z., Dong, J., Ding, J. (2013). The effects of pore size in bilayered poly(lactide-co-glycolide) scaffolds on restoring osteochondral defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 102(1), S. 180-192.
- Feldkamp, L., Goldstein, S., Parfitt, A., Jasion, G., Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4(1), S. 3-11.
- Figuerola, D., Calvo, R. (2007). Knee chondral lesions: incidence and correlation between arthroscopic and magnetic resonance findings. *Arthroscopy* 23(3), S. 312–315.
- Fortier, L., Deak, M., Semevolos, S., Cerione, R. (2004). Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res* 22(2), S. 436-445.
- Fortier, L., Mohammed, H., Lust, G., Nixon, A. (2002). Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 84(2), S. 276-288.
- Frisch, J., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2016a). Gene- and stem cell-based approaches to regulate hypertrophic differentiation in articular cartilage disorders. *Stem Cells and Dev* (20), S. 1495-1512.
- Frisch, J., Orth, P., Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Kohn, D., Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2016b). Genetic modification of human peripheral blood aspirates using recombinant adeno-associated viral vectors for articular cartilage repair with a focus on chondrogenic transforming growth factor- β gene delivery. *Stem Cells Transl Med* 6(1), S. 249-260.

- Frisch, J., Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K. (2016c). TGF- β gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *J Cell Mol Med* 20(3), S. 430–440.
- Frisch, J., Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2016d). rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF- β and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair. *Gene Therapy* 23(3), S. 247-255.
- Frisch, J., Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2014). Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor-beta via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gen Ther* 25(12), S. 1050-1060.
- Fritz, J., Gaissmaier, C., Schewe, B., Weise, K. (2006). Cartilage repair in the knee joint. *Unfallchirurg* 109(7), S. 563-574.
- Fu, W., Zhou, C., Yu, J. (2014). A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med* 42(3), S. 592-601.
- Fujimoto, E., Ochi, M., Kato, Y., Mochizuki, Y., Sumen, Y., Ikuta, Y. (1999). Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg* 119(3-4), S. 139-145.
- Furukawa, T., Eyre, D., Koide, S., Glimcher, M. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62(1), S. 79-89.
- Gao, L., Orth, P., Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H. (2017). Autologous matrix-induced chondrogenesis: A systematic review of the clinical evidence. *Am J Sports Med* , doi: 10.1177/0363546517740575.
- Getgood, A., Kew, S., Brooks, R., Aberman, H., Simon, T., Lynn, A. (2012). Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic scaffold based on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model. *Knee* 19(4), S. 422-430.
- Goebel, L., Orth, P., Muller, A., Zurakowski, D., Bückler, A., Cucchiariini [ép. Madry], M., Pape, D., Madry, H. (2012). Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T--comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 20(9), S. 1046-1055.
- Goldberg, A. (2001). Effects of growth factors on articular cartilage. *Ortop Traumatol Rehabil* 3(2), S. 209-212.
- Goldring, M. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4(4), S. 269-285.

- Goldring, M., Fukuo, K., Birkhead, J., Dudek, E., Sandell, L. (1994). Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 54(1), S. 85-99.
- Gotterbarm, T., Breusch, S., Schneider, U., Jung, M. (2008). The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* 42(1), S. 71–82.
- Gotterbarm, T., Richter, W., Jung, M., Berardi Vilei, S., Mainil-Varlet, P., Yamashita, T., Breusch, S.J. (2006). An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, twolayered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials* 27(18), S. 3387-3395.
- Grafe, I., Alexander, S., Peterson, J., Snider, T., Levi, B., Lee, B., Moshina, Y. (2017). TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a022202.
- Guo, X., Zheng, Q., Yang, S., Shao, Z., Yuan, Q., Pan, Z., Tang, S., Liu, K., Quan, D. (2006). Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater* 1(4), S. 206-215.
- Hanada, K., Solchaga, L., Caplan, A., Hering, T., Goldberg, V., Yoo, J., Johnstone, B. (2001). BMP-2 induction and TGF- β 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81(2), S. 284-294.
- Hangody, L., Feczkó, P., Bartha, L., Bodó, G., Kish, G. (2001). Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Relat Res*. (391 Suppl), S. 328-36.
- Hardingham, T., Fosang, A. (1992). Proteoglycans: many forms and functions. *FASEB J* 6(3), S. 861-870.
- Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R., Brittberg, M. (2002). Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18(7), S. 730–734.
- Hopper, N., Wardale, J., Brooks, R. (2015). Peripheral blood mononuclear cells enhance cartilage repair in in vivo osteochondral defect model. *PLoS One* 10(8), e0133937–e0133951.
- Hunziker, E. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10(6), S. 432-463.
- Hunziker, E., Rosenberg, L. (1996). Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78(5), S. 721-733.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A. (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50(11), S. 3561–3573.

- Im, G., Ahn, J., Kim, S., Choi, B., Lee, S. (2010). A hyaluronate-atelocollagen/beta-tricalcium phosphatehydroxyapatite biphasic scaffold for the repair of osteochondral defects: a porcine study. *Tissue Eng Part A* 16(4), S. 1189-1200.
- Imhoff, A., Ottl, G., Burkart, A., Traub, S. (1999). Autologous osteochondral transplantation on various joints. *Orthopäde* 28(1), S. 33-44.
- Ivkovic, A., Pascher, A., Hudetz, D., Maticic, D., Jelic, M., Dickinson, S., Loparic, M., Haspl, M., Windhager, R., Pecina, M. (2010). Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther* 17(6), S. 779-789.
- Jackson, D., Lalor, P., Aberman, H., Simon, T. (2001). Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 83-A(1), S. 53-64.
- Jentsch, K., Wellmitz, G., Heder, G., Petzold, E., Buntrock, P., Oehme, P. (1980). A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration in vivo. *Acta Biol Med Ger* 39(8-9), S. 967-971.
- Jeon, S., Park, J., Yang, H. (2012). Codelivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* 33(17), S. 4413-4423.
- Johnson, L. (1986). Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2(1), S. 54-69.
- Johnstone, B., Hering, T., Caplan, A., Goldberg, V., Yoo, J. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1), S. 265-272.
- Joyce, M., Roberts, A., Sporn, M., Bolander, M. (1990). Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110(6), S. 2195-2207.
- Kaul, G., Cucchiariini [ép. Madry], M., Arntzen, D., Zurakowski, D., Menger, M., Kohn, D., Trippel, S.B., Madry, H. (2006). Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med* 8(1), S. 100-111.
- Kawashima, H., Ogose, A., Yoshizawa, T., Kuwano, R., Hotta, Y., Hotta, T., Hatano, H., Kawashima, H., Endo, N., (2003). Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in musculoskeletal tumors and mesenchymal tissues: efficacy of adenoviral gene therapy for osteosarcoma. *Cancer Sci* 94(1), S. 70-75.
- Ketola, A., Maatta, A., Pasanen, T., Tulimaki, K., Wahlfors, J. (2004). Osteosarcoma and chondrosarcoma as targets for virus vectors and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. *Int J Mol Med* 13(5), S. 705-710.
- Kim, S. E., Park, J. H., Cho, Y. W., Chung, H., Jeong, S. Y., Lee, E. B., Kwon, I.C. (2003). Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 91(3), S. 365-374.

Klets, O., Mononen, M., Liukkonen, M., Nevalainen, M., Nieminen, M., Saarakkala, S., Korhonen, R.K. (2018). Estimation of the effect of body weight on the development of osteoarthritis based on cumulative stresses in cartilage: Data from the osteoarthritis initiative. *Ann Biomed Eng.* 46(2), S. 334-344.

Knutsen, G., Drogset, J., Engebretsen, L., Grontvedt, T., Isaksen, V., Ludvigsen, T. *et al.* (2007). A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with micro-fracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* (89), S. 2105.

Kopesky, P., Byun, S., Vanderploeg, E., Kisiday, J., Frisbie, D., Grodzinsky, A. (2014). Sustained delivery of bioactive TGF-beta1 from self-assembling peptide hydrogels induces chondrogenesis of encapsulated bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 102(5), S. 1275-1285.

Lazo, A., Yunta, M. (2000). Gene therapy using viral vectors: Strategy and design issues. In Cid-Arregui, A., García-Carrancá, A., *Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy* S. 597-607.

Lee, C.H., Rodeo, S.A., Fortier, L.A., Lu, C., Erisken, C., Mao, J.J. (2014). Protein-releasing polymeric scaffolds induce fibrochondrocytic differentiation of endogenous cells for knee meniscus regeneration in sheep. *Sci Transl Med* 6(266), S. 266ra171.

Li, B., Yang, J., Ma, L., Li, F., Tu, Z., Gao, C. (2013). Fabrication of poly(lactide-co-glycolide) scaffold filled with fibrin gel, mesenchymal stem cells, and poly(ethylene oxide)-bpoly(L-lysine)/TGF-beta1 plasmid DNA complexes for cartilage restoration in vivo. *J Biomed Mater Res A* 101(11), S. 3097-3108.

Li, Y., Tian, A., Ophene, J., Tian, M., Yao, Z., Chen, S., Li, H., Sun, X., Du, H. (2017). TGF- β stimulates endochondral differentiation after denervation. *Int J Med Sci* 14(4), S. 382-389.

Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Külcke, K., Eckert, H.G., Fehse, B., Baum, C. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296(5567), S. 497.

Lo, Y., Cruz, T. (1995). Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of cfos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270(20), S. 11727-11730.

Lopa, S., Madry, H. (2014). Bioinspired scaffolds for osteochondral regeneration. *Tissue Eng A* 20(15-16), S. 2052-2076.

MacKay, A., Beck, S., Murphy, J., Barry, F., Chichester, C., Pittenger, M. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Tissue Eng.* 4(4), S. 415-428.

Madry, H. (2004). Operative und rekonstruktive Behandlung. In Wirth, C., Zichner, L., Kohn, D., *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Knie.* Stuttgart: Thieme, S. 367-379.

- Madry, H., Pape, D. (2008). Autologous chondrocyte transplantation. *Orthopäde* 37(8), S. 756-763.
- Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M., Stein, U., Remberger, K., Menger, M., Kohn, D., Trippel, S.B. (2003a). Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med* 5(6), S. 502-509.
- Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M., Terwilliger, E., Trippel, S. (2003b). Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes on normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 14(4), S. 393-402.
- Madry, H., Gao, L., Eichler, H., Orth, P., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2017). Bone marrow aspirate concentrate-enhanced marrow stimulation of chondral defects. *Stem Cells Int* 2017, doi: 10.1155/2017/1609685 .
- Madry, H., Grün, U., Knutsen, G. (2011a). Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Deutsches Ärzteblatt International* 108(40), S. 669-677.
- Madry, H., Kaul, G., Cucchiariini [ép. Madry], M., Stein, U., Zurakowski, D., Remberger, K., Menger, M.D., Kohn, D., Trippel S.B. (2005). Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 12(15), S. 1171-1179.
- Madry, H., Orth, P., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2011b). Gene therapy for cartilage Repair. *Cartilage* 2(3), S. 201-225.
- Madry, H., Orth, P., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2016). Role of the subchondral bone in articular cartilage degeneration and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 24(4), S. e45-46.
- Madry, H., Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Johnstone, B., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2014). Transforming growth factor Beta-releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 20(2), S. 106-125.
- Mankin, H. (1982). The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64(3), S. 460-466.
- Marquass, B., Somerson, J., Hepp, P., Aigner, T., Schwan, S., Bader, A., Josten, C., Zscharnack, M., Schulz, R.M., (2010). A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects. *J Orthop Res* 28(12), S. 1586-1599.
- Martin, J., Buckwalter, J. (2003). The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* (85-A Suppl 2), S. 106-110.
- Maruki, H., Sato, M., Takezawa, T., Tani, Y., Yokoyama, M., Takahashi, T., Toyoda, E., Okada, E., Aoki, S., Mochida, J., Kato, Y. (2017). Effects of a cell-free method using collagen vitrigel incorporating TGF-beta1 on articular cartilage repair in a rabbit osteochondral defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105(8), 2592-2602.

- Mello, M. A., Tuan, R. S. (2006). Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells. *J Orthop Res* 24(11), S. 2095-2105.
- Mendelson, A., Frank, E., Allred, C., Jones, E., Chen, M., Zhao, W., Mao, J.J. (2011). Chondrogenesis by chemotactic homing of synovium, bone marrow, and adipose stem cells in vitro. *FASEB J* 25(10), S. 3496-3504.
- Mi, Z., Ghivizzani, S., Lechman, E., Glorioso, J., Evans, C., Robbins, P. (2003). Adverse effects of adenovirus-mediated gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees. *Arthritis Res Ther* 5(3), S. R132–R139.
- Mierisch, C., Cohen, S., Jordan, L., Robertson, P., Balian, G., Diduch, D. (2002). Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy* 18(8), S. 892-900.
- Mirza, M., Swenson, R., Lynch, S. (2015). Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques. *Curr Rev Musculoskelet Med* 8(4), S. 451–456.
- Mizuta, H., Kudo, S., Nakamura, E., Otsuka, Y., Takagi, K., Hiraki, Y. (2004). Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12(7), S. 586-596.
- Mrosek, E.H., Schagemann, J.C., Chung, H.W., Fitzsimmons, J.S., Yaszemski, M.J., Mardones, R.M., O'Driscoll, S.W., Reinholz, G.G. (2010). Porous tantalum and polyepsilon-caprolactone biocomposites for osteochondral defect repair: preliminary studies in rabbits. *J Orthop Res* 28(2), S. 141-148.
- Niemietz, T., Zass, G., Hagmann, S., Diederichs, S., Gotterbarm, T. (2014). Xenogeneic transplantation of articular chondrocytes into full-thickness articular cartilage defects in minipigs: fate of cells and the role of macrophages. *Cell Tissue Res* 358(3), S. 749–761.
- Nixon, A., Fortier, L., Williams, J., Mohammed, H. (1999). Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 17(4), S. 475-487.
- Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., Wakitani, S., Iwasa, J. (2002). Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 84(4), S. 571-578.
- Oláh, T., Reinhard, J., Gao, L., Goebel, L., Madry, H. (2018). Reliable landmarks for precise topographical analyses of pathological structural changes of the ovine tibial plateau in 2-D and 3-D subspaces. *Sci Rep* (8:75), doi: 10.1038/s41598-017-18426-3.
- Orth, P. (2008). Gentransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur.
- Orth, P., Cucchiariini [ép. Madry], M., Zurakowski, D., Menger, M., Kohn, D., Madry, H. (2013a). Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 21(4), S. 614-624.

- Orth, P., Goebel, L., Wolfram, U., Ong, M., Graber, S., Kohn, D., Cucchiariini [ép. Madry], M., Ignatius, A., Pape, D., Madry, H. (2012a). Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med* 40(4), S. 828-836.
- Orth, P., Peifer, C., Goebel, L., Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H. (2015). Comprehensive analysis of translational osteochondral repair: Focus on the histological assessment. *Prog Histochem Cytochem* 50(3), S. 19-36.
- Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J., Madry, H., Cucchiariini [ép. Madry], M. (2014). Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* (7), S. 1-17.
- Orth, P., Zurakowski, D., Alini, M., Cucchiariini [ép. Madry], M., Madry, H. (2013b). Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* (19), S. 885-891.
- Orth, P., Zurakowski, D., Wincheringer, D., Madry, H. (2012b). Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods* 19(11), S. 329-339.
- Otsuka, Y., Mizuta, H., Takagi, K., Iyama, K., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Suzuki, F., Hiraki, Y. (2004). Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Dev Growth Diff* 39(2), S. 586-596.
- Pagnotto, M., Wang, Z., Feretti, M., Xiao, X., Chu, C. (2007). Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- β 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14(10), S. 804-813.
- Pascher, A., Palmer, G.D., Steinert, A., Oligino, T., Gouze, E., Gouze, J.N., Betz, O., Spector, M., Robbins, P.D., Evans, C.H., Ghivizzani, S.C. (2004). Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* 11(2), S. 133-141.
- Pei, M., He, F., Boyce, B., Kish, V. (2009). Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. *Osteoarthritis Cartilage* 17(6), S. 714-722.
- Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., Lindahl, A. (2003). Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* (85-A Suppl 2), S. 17-24.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411), S. 143-147.
- Pridie, K. (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Joint Surg Br* (41), S. 618.

- Qi, Y., Du, Y., Li, W., Dai, X., Zhao, T., Yan, W. (2012). Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 22(6), S. 1424-1433.
- Re'em, T., Witte, F., Willbold, E., Ruvinov, E., Cohen, S. (2012). Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone induced by spatially presented TGF-beta and BMP-4 in a bilayer affinity binding system. *Acta Biomater* 8(9), S. 3283-3293.
- Reyes, R., Delgado, A., Sanchez, E., Fernandez, A., Hernandez, A., Evora, C. (2014). Repair of an osteochondral defect by sustained delivery of BMP-2 or TGFbeta1 from a bilayered alginate-PLGA scaffold. *J Tissue Eng Regen Med* 8(7), S. 521-533.
- Rey-Rico, A., Frisch, J., Venkatesan, J.K. (2015a). Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther* 22(1), S. 50-57.
- Rey-Rico, A., Frisch, J., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Rial-Hermida, I., Taboada, P., Concheiro, A., Madry, H., Alvarez-Lorenzo, C., Cucchiari [ép. Madry], M. (2016). PEO-PPO-PEO carriers for rAAV-mediated transduction of human articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8(32), S. 20600-20613.
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Frisch, J., Rial-Hermida, I., Schmitt, G., Concheiro, A., Cucchiari [ép. Madry], M. (2015b). PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. *Acta Biomater* 27(42-52), S. 42-52.
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Concheiro, A., Madry, H., Alvarez-Lorenzo, C., Cucchiari [ép. Madry], M. (2017). rAAV-mediated overexpression of TGF- β via vector delivery in polymeric micelles stimulates the biological and reparative activities of human articular chondrocytes in vivo and in a human osteochondral defect model. *Int J Nanomedicine* (12), S. 6985-6996.
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Sohler, J., Moroni, L., Cucchiari [ép. Madry], M., Madry, H. (2015c). Adapted chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells via controlled release of TGF-beta1 from poly(ethylene oxide)-terephthalate/poly(butylene terephthalate) multiblock scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 103(1), S. 371-383.
- Ripamonti, U., Bosch, C., van den Heever, B., Duneas, N., Melsen, B., Ebner, R. (1996). Limited chondro-osteogenesis by recombinant human transforming growth factor-beta 1 in calvarial defects of adult baboons (*Papio ursinus*). *J Bone Miner Res* 11(7), S. 938-945.
- Rogachefsky, R., Dean, D., Howell, D., Altman, R. (1993). Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF- 1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 1(2), S. 105-114.

- Ruehe, B., Niehues, S., Heberer, S., Nelson, K. (2009). Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108(5), S. 699–706.
- Samulski, R., Chang, L., Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61(10), S. 3096-3101.
- Samulski, R., Chang, L., Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63(9), S. 3822–3828.
- Schmal, H. (2017). Knorpelverletzungen am Kniegelenk Orthopädie und Unfallchirurgie. *up2date* (12), S. 179–197.
- Schnettler, R., Horas, U., Meyer, C. (2008). Autologous osteochondral transplants. *Orthopäde* 37(8), S. 734-742.
- Sellers, R., Peluso, D., Morris, E. (1997). The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79(10), S. 1452-1463.
- Shapiro, F., Koide, S., Glimcher, M. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75(4), S. 532-553.
- Shi, J., Liang, J., Guo, B., Zhang, Y., Hui, Q., Chang, P., Tao, K. (2017). Adipose-derived stem cells cocultured with chondrocytes promote the proliferation of chondrocytes. *Stem Cells Int*, doi: 10.1155/2017/1709582.
- Shida, J., Jingushi, S., Izumi, T., Iwaki, A., Sugioka, Y. (1996). Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res* 14(2), S. 265-272.
- Shimomura, K., Ando, W., Fujie, H., Hart, D., Yoshikawa, H., Nakamura, N. (2018). Scaffold-free tissue engineering for injured joint surface restoration. *J Exp Orthop* 5(1), S. 2.
- Simon, T., Jackson, D. (2018). Articular Cartilage: Injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc Rev* 26(1), S. 31-39.
- Skyscan. (2008). Structural parameters measured by Skyscan™ CT-analyzer software. *Skyscan* , S. 1-36 .
- Sohier, J., Hamann, D., Koenders, M., Cucchiari, M., Madry, H., van Blitterswijk, C. (2007). Tailored release of TGF-beta1 from porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Pharm* 332(1-2), S. 80-89.
- Sohier, J., van Dijkhuizen-Radersma, R., de Groot, K., Bezemer, J. (2003). Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: a feasibility study. *Eur J Pharm Biopharm* 55(2), S. 221-228.

- Sridhar, B.V., Doyle, N.R., Randolph, M.A., Anseth, K.S. (2014). Covalently tethered TGF-beta1 with encapsulated chondrocytes in a PEG hydrogel system enhances extracellular matrix production. *J Biomed Mater Res A* 102(12), S. 4464-4472.
- Steadman, J., Rodkey, W., Briggs, K., Rodrigo, J. (1999). The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopäde* 28(1), S. 26-32.
- Tao, K., Rey-Rico, A., Frisch, J., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Madry, H., Lin J., Cucchiaroni [ép. Madry], M. (2017). Effects of combined rAAV-mediated TGF- β and sox9 gene transfer and overexpression on the metabolic and chondrogenic activities in human bone marrow aspirates. *J Exp Orthop.* 4(1), doi: 10.1186/s40634-017-0077-5.
- Thomas, C., Ehrhardt, A., Kay, M. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4(5), S. 346-358.
- Tripathy, S., Black, H., Goldwasser, E., Leiden, J. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2(5), S. 545-550.
- Trippel, S. (1995). Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* (43), S. 129-132.
- Trippel, S. (1997). Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* (46), S. 473-476.
- Tuncel, M., Halici, M., Canoz, O., Yildirim Turk, C., Oner, M., Ozturk, F., Kabak, S. (2005). Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage. *Knee* 12(2), S. 113-119.
- Ulrich-Vinther, M., Duch, M., Soballe, K., O'Keefe, R., Schwarz, E., Pedersen, F. (2004). In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adenoassociated virus vector. *J Orthop Res* 22(4), S. 726-734.
- van Beuningen, H., Glansbeek, H., van der Kraan, P., van den Berg, W. (1998). Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 6(5), S. 306-317.
- van Beuningen, H., Glansbeek, H., van der Kraan, P., van den Berg, W. (2000). Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* 8(1), S. 25-33.
- van Beuningen, H., van der Kraan, P., van den Berg, W. (1994). Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 71(2), S. 279-290.
- van der Kraan, P., Blaney Davidson, E., Blom, A., van den Berg, W. (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 17(12), S. 1539-1545.

- van Lent, P.L., Blom, A.B., van der Kraan, P., Holthuysen, A.E., Vitters, E., van Rooijen, N., Smeets, R.L., Nabbe, K.C., van den Berg, W.B. (2004). Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 50(1), S. 103-111.
- Vandenbergh, L., Wilson, J. (2007). AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* 7(5), S. 325-333.
- Venkatesan, J.K., Ekici, M., Madry, H. (2012). SOX9 gene transfer via safe, stable, replicationdefective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 3(3), S. 22-36.
- Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A. (2013). rAAV-mediated overexpression of TGF- β stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *Journal of Translational Medicine* (11), S. 211.
- Von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G. G., Stöss, H. (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage - indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis and Rheumatism* 35(7), S. 805-811.
- Wang, W., Rigueur, D., Lyons, K. M. (2014). TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102(1), S. 37-51.
- Weimer, A., Madry, H., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Frisch, J., Wezel, A., Jung, J., Kohn, D., Terwilliger, E.F., Trippel, S.B., Cucchiari [ép. Madry], M. (2013). Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulin-like growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med* (18), S. 346-358.
- Wilke, M. M., Nydam, D. V., Nixon, A. J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* 25(7), S. 913-925.
- Yamamoto, T., Wakitani, S., Imoto, K., Hattori, T., Nakaya, H., Saito, M., Yonenobu, K. (2004). Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 12(8), S. 636-641.
- Yao, Y., Zhang, F., Zhou, R., Su, K., Fan, J., Wang, D. (2010). Effects of combinational adenoviral vector-mediated TGF beta 3 transgene and shRNA silencing type I collagen on articular chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng* 106(5), S. 818-828.
- Yei, S., Mittereder, N., Tank, K., O'Sullivan, C., Trapnell, B. (1994). Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Ther* 1(3), S. 192-200.
- Ying, B., Chen, K., Hu, J., Man, C., Feng, G., Zhang B., Zhu, S. (2013). Effect of different doses of transforming growth factor-beta1 on cartilage and subchondral bone in osteoarthritic temporomandibular joints. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51(3), S. 241-246.

Yoo, J., Barthel, T., Nishimura, K. (1998). The chondrogenic potential of human bonemarrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 80(12), S. 1745–1757.

Zhang, P., Zhong, Z. H., Yu, H. T., Liu, B. (2015). Exogenous expression of IL-1Ra and TGF-beta1 promotes in vivo repair in experimental rabbit osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 44(5), S. 404-411.

Zhou, X., Leung, V., Dong, Q., Cheung, K., Chan, D., Lu, W. (2008). Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acid-hydroxyapatite biphasic scaffold. *Int J Artif Organs* 31(6), S. 480-489.

Zhu, Y., Tao, H., Jin, C., Liu, Y., Lu, X., Hu, X., Wang, X. (2015). Transforming growth factor- β 1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med Rep* 12(4), S. 5573-5579.

10. Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits präsentiert und sind zur Publikation eingereicht:

Posterpräsentation

1) Asen, A., Goebel, L., Rey-Rico, A., Moroni, L., Sohler, J., Zurakowski, D., Cucchiarini [ép. Madry], M., Madry, H. (2017). Effekt der Implantation von TGF- β 1-freisetzenden PEOT/PBT-Multiblockträgermaterialien auf die frühe osteochondrale Defektreparatur - eine translationale Untersuchung im Minischwein. Posterpräsentation auf dem *Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2017* in der Sektion Arthrose und Arthritis, Oktober 2017

Manuskripte

1) Cucchiarini [ép. Madry], M., Asen, A., Goebel, L., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Zurakowski, D., Menger, M.D., Laschke, M.W., Madry, H. (*pending on revision*). Effects of TGF- β overexpression via rAAV gene transfer on the early repair processes in an osteochondral defect model in minipigs. Zur Veröffentlichung eingereicht im *American Journal of Sports Medicine* am 17.10.2017, nach erster Begutachtung wiederholt eingereicht am 21.12.2017, aktuell unter erneuter Begutachtung (Manuskript-Nummer: AMJSPORTS/2017/234260).

2) Asen, A., Goebel, L., Rey-Rico, A., Sohler, J., Zurakowski, D., Cucchiarini [ép. Madry], M., Madry, H. (*submitted*). Sustained spatiotemporal release of TGF- β 1 confers enhanced very early chondrogenic differentiation during osteochondral repair in specific topographical patterns. Zur Veröffentlichung eingereicht im *FASEB Journal* am 18.01.2018, aktuell unter Begutachtung (Manuskript-Nummer: 201800105).

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroserforschung der Universität des Saarlandes erstellt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. med. Henning Madry, meinem Doktorvater, für die wissenschaftliche Betreuung meines Promotionsverfahrens, für die Planung und Organisation der durchgeführten Studien sowie für die motivierenden und kritischen Diskussionen, sowie für die schnellen und ausführlichen Korrekturen der Manuskripte.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Magali Madry für die wertvollen Anregungen zu meiner Promotion und den Veröffentlichungen, für die Koordination der Herstellung der rAAV-Vektoren und für das große Interesse am Erfolg meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Dr. med. Lars Goebel für die Begleitung meiner Promotion und die hilfreichen Ratschläge zu jedem kleinen oder großen Problem.

Herrn PD Dr. med. Patrick Orth für die Unterstützung bei der Auswertung der Mikro-CT-Analysen.

Frau Gertrud Schmitt für die stets freundliche, motivierende und kompetente Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

Frau Dr. rer. nat. Ana Rey-Rico und *Herrn Dr. Jérôme Sohier* für die Vorbereitung der implantierten Trägermaterialien.

Herrn Dr. rer. nat. Jagadeesh Venkatesan für die Vorbereitung der implantierten rAAV-Vektoren.

Herrn Yannik Morscheid für die Unterstützung und vielen Tipps bei der Präparation der Proben für die Mikro-CT-Analysen.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern *Helmut* und *Roswitha Asen*, meinem Partner *Paul Kunkel*, sowie *Lucie Bauer*, *Sabrina Hörsch*, *Evelin Kuder* und *Theresa Schafbauer* für die Motivation und Unterstützung in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.