

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthrosetorschung  
Universität des Saarlandes  
Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

**rAAV-vermittelte, hydrogel-gebundene  
Überexpression des humanen insulinartigen  
Wachstumsfaktors I (hIGF-I) verbessert die  
Reparatur von fokalen Knorpelschäden und  
reduziert die perifokale Arthrose -  
eine Langzeitstudie in einem Großtiermodell  
der Mikrofrakturierung**

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

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2020

vorgelegt von: Johanna Salome Maihöfer  
geboren am: 5. November 1994 in Herrenberg

Tag der Promotion: 10.12.2020

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry  
Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke  
Prof. Dr. med. Rolf Brenner

für meine Eltern und Felix

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Problematik und Überblick	3
2.2 Osteochondrale Einheit	4
2.3 Einteilung der Knorpeldefekte	5
2.4 Klinische Relevanz von chondralen Defekten	6
2.5 Klinische Therapieoptionen bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	7
2.6 Markraumeröffnende Verfahren	8
2.7 Experimentelle Therapieansätze	9
2.8 Trägermaterialien zur Reparatur chondraler Defekte	10
2.9 Insulinartiger Wachstumsfaktor I (IGF-I)	11
2.10 Gentransfersysteme zur Reparatur chondraler Defekte	12
<b>3. Hypothesen</b>	<b>14</b>
<b>4. Studienaufbau</b>	<b>15</b>
<b>5. Material</b>	<b>16</b>
5.1 Puffer, Medien und Lösungen	16
5.2 Chemikalien	16
5.3 Biologisches Material	17
5.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	17
5.4.1 Geräte	17
5.4.2 Computersoftware	18
5.4.3 Operationsmaterialien und –instrumentarien	18
5.4.4 Verbrauchsmaterialien	18
<b>6. Methoden</b>	<b>20</b>
6.1 Herstellung rAAV-Vektoren	20
6.2 Großtiermodell	20
6.2.1 Berechnung der Tierzahl	20
6.3 Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung	21
6.4 Evaluierung des Knorpelreparaturgewebes	22
6.4.1 Makroskopische Evaluierung	22
6.4.2 Mikro-computertomographische Evaluierung	23
6.4.3 Magnetresonanztomographische Evaluierung	26



6.4.4	Histologische Evaluierung .....	28
6.4.5	Evaluierung der Zellularität .....	33
6.4.6	Evaluierung der Ausrichtung der kollagenen Fasern .....	34
6.4.7	Immunhistologische Evaluierung .....	34
<b>6.5</b>	<b>Evaluierung des angrenzenden Gewebes .....</b>	<b>38</b>
6.5.1	Histologische Evaluierung der Arthrosebildung .....	38
6.5.2	Immunhistologische Evaluierung der IGF-I-Immunaktivität .....	40
<b>6.6</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>Immunhistologische Auswertung der IGF-I Überexpression .....</b>	<b>41</b>
<b>7.2</b>	<b>Mikro-computertomographische Auswertung des Defektgewebes .....</b>	<b>42</b>
7.2.1	Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte .....	42
7.2.2	Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa .....	44
7.2.3	Analyse der Mikrostruktur des Knorpels .....	44
7.2.4	Auswertung der manuellen histomorphometrischen Messungen .....	45
<b>7.3</b>	<b>Makroskopische Auswertung des Defektgewebes .....</b>	<b>46</b>
<b>7.4</b>	<b>Magnetresonanztomographische Auswertung des Defektgewebes .....</b>	<b>47</b>
<b>7.5</b>	<b>Histologische Auswertung des Defektgewebes .....</b>	<b>48</b>
7.5.1	Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	48
7.5.2	Bewertungssystem nach Fortier <i>et al.</i> .....	51
7.5.3	Bewertungssystem nach Wakitani <i>et al.</i> .....	51
7.5.4	Analyse der Kollagenfasern durch Polarisationsmikroskopie .....	52
7.5.5	Bestimmung der Zellularität .....	52
<b>7.6</b>	<b>Immunhistologische Auswertung .....</b>	<b>53</b>
7.6.1	Auswertung der Typ-I-Kollagen-Immunaktivität .....	53
7.6.2	Auswertung der Typ-II-Kollagen-Immunaktivität .....	54
7.6.3	Auswertung der Typ-X-Kollagen-Immunaktivität .....	55
7.6.4	Auswertung der Aggrecan-Immunaktivität .....	56
<b>7.7</b>	<b>Auswertung des angrenzenden Gewebes .....</b>	<b>56</b>
7.7.1	Beurteilung der subchondralen Knochenplatte sowie der sub- artikulären Spongiosa .....	56
7.7.2	Bewertungssystem zur Beurteilung der perifokalen Arthrose .....	57
7.7.3	Bestimmung der Chondrozytendichte .....	59
7.7.4	Bestimmung der IGF-I-Immunaktivität .....	60
<b>7.8</b>	<b>Korrelationsanalysen .....</b>	<b>61</b>
7.8.1	Korrelationsanalyse zwischen Dicke der subchondralen Knochen- platte und verschiedener Parameter des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i> .....	61

7.8.2 Korrelationsanalyse zwischen IGF-I-Immunaktivität und histologischen Parametern .....	61
7.8.3 Korrelationsanalyse zwischen verschiedenen Parametern des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i> ....	61
7.8.4 Korrelationsanalyse zwischen Typ-II-Kollagen-Immunaktivität und Parametern des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i> .....	61
7.8.5 Korrelationsanalyse zwischen IGF-I-Immunaktivität und Kategorien des Bewertungssystems zur Beurteilung von Arthrose .....	62
7.8.6 Korrelationsanalyse zwischen dem Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> und dem Bewertungssystem zur Beurteilung von Arthrose .....	62
<b>8. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
8.1 <b>Effektive genetische Modifikation und Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen durch an Alginat gebundene, kontrollierte rAAV-Vektor Freisetzung .....</b>	<b>65</b>
8.2 <b>Evaluierung der IGF-I Überexpression .....</b>	<b>65</b>
8.3 <b>Evaluierung der subchondralen Knochenplatte und der sub-artikulären Spongiosa .....</b>	<b>66</b>
8.4 <b>Evaluierung des Reparaturgewebes .....</b>	<b>66</b>
8.4.1 Magnetresonanztomographische Evaluierung .....	66
8.4.2 Makroskopische Evaluierung .....	67
8.4.3 Histologische und immunhistochemische Evaluierung .....	67
8.5 <b>Evaluierung des angrenzenden Knorpels .....</b>	<b>70</b>
8.6 <b>Limitationen und Stärken der Studie .....</b>	<b>71</b>
8.7 <b>Ausblick .....</b>	<b>72</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>10. Publikationen .....</b>	<b>90</b>
<b>11. Danksagungen .....</b>	<b>91</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>92</b>

**Abbildungen**

Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des porcinen hyalinen Gelenkknorpels .....	5
Abbildung 2: Einteilung chondraler und osteochondraler Defekte .....	6
Abbildung 3: Schema der verwendbaren Trägermaterialien .....	11
Abbildung 4: Schema zur Wirkungsweise von rAAV-Vektoren .....	12
Abbildung 5: Schema des experimentellen Aufbaus .....	15
Abbildung 6: Mikro-CT Bilder mit Markierung der Regionen von Interesse .....	24
Abbildung 7: Repräsentative Histologie der porcinen Trochlea ohne Defekt .....	30
Abbildung 8: Repräsentative Histologie zur Begutachtung der Zellularität .....	34
Abbildung 9: Repräsentative Immunhistologie der defektfreien porcinen Trochlea ..	37
Abbildung 10: Repräsentative Immunhistologie für IGF-I .....	42
Abbildung 11: Repräsentative Micro-CT-Scans und 3D Rekonstruktion .....	43
Abbildung 12: Repräsentative makroskopische Bilder .....	46
Abbildung 13: Repräsentative magnetresonanztomographische Bilder .....	48
Abbildung 14: Repräsentative Histologie .....	50
Abbildung 15: Repräsentative Histologie unter Polarisationsmikroskopie .....	52
Abbildung 16: Repräsentative Histomorphometrie .....	53
Abbildung 17: Repräsentative Immunhistologie für Typ-I Kollagen .....	54
Abbildung 18: Repräsentative Immunhistologie für Typ-II-Kollagen .....	55
Abbildung 19: Repräsentative Immunhistologie für Typ-X-Kollagen .....	55
Abbildung 20: Repräsentative Immunhistologie für Aggrecan .....	56
Abbildung 21: Repräsentative Histologie des angrenzenden Knorpels .....	59
Abbildung 22: Repräsentative Immunhistologie des angrenzenden Gewebes .....	60
Abbildung 23: Graphen zu den Korrelationsanalysen .....	63

**Tabellen**

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien .....	16
Tabelle 2: Chemikalien .....	17
Tabelle 3: Antikörper und Enzyme .....	17
Tabelle 4: Laborgeräte .....	18
Tabelle 5: Modifiziertes Bewertungssystem aus Oswestry .....	22
Tabelle 6: Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	23
Tabelle 7: Bewertungssystem MOCART 3D .....	27
Tabelle 8: Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	31
Tabelle 9: Bewertungssystem nach Fortier <i>et al.</i> .....	32
Tabelle 10: Bewertungssystem nach Wakitani <i>et al.</i> .....	33
Tabelle 11: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunaktivität .....	36
Tabelle 12: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung von Arthrose .....	39
Tabelle 13: Ergebnisse Immunaktivität für IGF-I .....	41
Tabelle 14: Ergebnisse der mikro-CT-Analyse der SCBP (Defekt) .....	43
Tabelle 15: Ergebnisse der mikro-CT-Analyse der SAS (Defekt) .....	44
Tabelle 16: Ergebnisse der mikro-CT-Analyse des Knorpels Graustufe: 89-255 .....	45
Tabelle 17: Ergebnisse der CT-Analyse des Knorpels Graustufe 30-89 .....	45
Tabelle 18: Ergebnisse der Histomorphometrie im mikro-CT (Defekt) .....	45
Tabelle 19: Ergebnisse des Bewertungssystems aus Oswestry .....	46
Tabelle 20: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel <i>et al.</i> .....	46
Tabelle 21: Ergebnisse des Bewertungssystem MOCART 3D .....	47
Tabelle 22: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i> .....	49
Tabelle 23: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Fortier <i>et al.</i> .....	51
Tabelle 24: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Wakitani <i>et al.</i> .....	52
Tabelle 25: Ergebnisse der Bestimmung der Zellularität .....	52
Tabelle 26: Ergebnisse Immunaktivität für Typ-I-Kollagen .....	53
Tabelle 27: Ergebnisse Immunaktivität für Typ-II-Kollagen .....	54
Tabelle 28: Ergebnisse Immunaktivität für Typ-X-Kollagen .....	55
Tabelle 29: Ergebnisse Immunaktivität für Aggrecan .....	56
Tabelle 30: Ergebnisse der CT-Analyse der SCBP (angrenzendes Gewebe) .....	57
Tabelle 31: Ergebnisse der CT-Analyse der SAS (angrenzendes Gewebe) .....	57
Tabelle 32: Ergebnisse der CT-Histomorphometrie (angrenzendes Gewebe) .....	57
Tabelle 33: Ergebnisse des Bewertungssystems für Arthrose gesamt .....	58
Tabelle 34: Ergebnisse des Bewertungssystems für Arthrose lateral .....	58
Tabelle 35: Ergebnisse des Bewertungssystems für Arthrose medial .....	58
Tabelle 36: Ergebnisse Zellularität (angrenzendes Gewebe) .....	60
Tabelle 37: Ergebnisse Immunaktivität für IGF-I (angrenzendes Gewebe) .....	60

**Abkürzungen**

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
(r)AAV	(rekombinantes) adeno-assoziiertes Virus
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
<i>aqua bidest.</i>	<i>aqua bidestillata - destilliertes Wasser</i>
BMD	Knochenmineraldichte ( <i>bone mineral density</i> )
BS/BV	Knochenoberflächen/Volumen ( <i>bone surface/volume ratio</i> )
BS/TV	Knochenoberflächendichte ( <i>bone surface density</i> )
BW	Bandbreite ( <i>band width</i> )
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CMV-IE	Cytomegalie immediate-early
CtTh	kortikale Dicke ( <i>cortical thickness</i> )
cDNS	komplementäre-Desoxyribonukleinsäure
Conn.Dn.	Netzdichte ( <i>connectivity density</i> )
DA	Grad der Anisotropie ( <i>degree of anisotropy</i> )
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliea</i> und andere
FA	Pulswinkel ( <i>flip angle</i> )
FD	Fraktale Dimension ( <i>fractal dimension</i> )
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor-2 ( <i>fibroblast growth factor-2</i> )
GEE	Allgemeine Schätzungsanalyse ( <i>generalized estimating equation</i> )
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	Hydroxyapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF-I	Insulinartiger Wachstumsfaktor-I ( <i>insulin-like growth factor-I</i> )
ICRS	<i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
μA	Mikroampere
Mikro-CT	Mikrofokus-Computertomographie
μl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MW	Mittelwert

---

NEX	Excitationsnummer ( <i>number of excitations</i> )
NIH	Nationale Gesundheitsinstitute ( <i>National Institutes of Health</i> )
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEOT/PBT	Poly(ethylenoxid)-Terephthalat/Poly(butylen)-Terephthalat
Po(cl)	Geschlossene Poren ( <i>closed porosity</i> )
Po(op)	offene Poren ( <i>open porosity</i> )
Po(to)	komplette Poren ( <i>total porosity</i> )
ROI	Region von Interesse ( <i>region of interest</i> )
s	Sekunde
SAS	subartikuläre Spongiosa ( <i>subarticular spongiosa</i> )
SCBP	subchondrale Knochenplatte ( <i>subchondral bone plate</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> )
TGF- $\beta$ 1	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 ( <i>transforming growth factor beta 1</i> )
TE	Echozeit ( <i>time of echo</i> )
TR	Repetitionszeit ( <i>repetition time</i> )
TZP	Trikalziumphosphat
VOI	Volumen von Interesse ( <i>volume of interest</i> )

---



# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

Chondrale Defekte regenerieren nicht, stattdessen bildet sich ein qualitativ minderwertiges Regenerationsgewebe. Trotz etablierter klinischer Ansätze, wie markraumstimulierende Verfahren, können diese Defekte ein Ausgangspunkt für Arthrose sein. Ein erfolgsversprechender experimenteller Ansatz zur Verbesserung der Knorpelheilung ist die lokale Überexpression von therapeutischen Sequenzen durch Gentransfervektoren, die an Biomaterialien gekoppelt sind. Wachstumsfaktoren können so kontrolliert, kontinuierlich, lokal und präzise abgegeben werden, ohne einen wesentlichen Einfluss auf die Gelenkhomöostase auszuüben.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Langzeiteffekte einer rekombinanten adenoassoziierten Virus (rAAV)-Vektor vermittelten hydrogel-gebundenen (Alginat, AlgPH155) Überexpression des humanen insulinartigen Wachstumsfaktors I (hIGF-I) (IGF-I/AlgPH155) in einem Minischweinmodell der Therapie vollschichtiger Knorpeldefekte durch Mikrofrakturierung.

Ein Jahr postoperativ fand sich *in vivo* eine signifikant verstärkte IGF-I-Immunreaktivität in der tiefen Zone des Reparaturgewebes als Zeichen einer persistierenden Transgenexpression im Vergleich zur Überexpression des Kontrollvektors *lacZ* (*lacZ*/AlgPH155). Zudem führte die Behandlung mit IGF-I/AlgPH155 zu signifikant verbesserten Strukturparametern wie „Defektfüllung“, „Oberflächenbeschaffenheit“, „Zellmorphologie“ sowie insbesondere zu einer signifikanten Verbesserung der Gesamtpunktzahl des histologischen Bewertungssystems. Flankierend hierzu führte die Therapie mit IGF-I/AlgPH155 zu einer signifikant vermehrten Typ-II-Kollagenbildung in der oberen Zone des Reparaturgewebes. Die Analyse der Mikrostruktur des subchondralen Knochens zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Der histologische Schweregrad der defektassoziierten perifokalen Arthrose war ein Jahr postoperativ durch Therapie mit IGF-I/AlgPH155 signifikant vermindert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine rAAV-vermittelte, hydrogelgebundene lokale Überexpression von hIGF-I positive Langzeiteffekte auf die Heilung von Knorpeldefekten hat und sich zudem protektiv auf den umgebenden Knorpel auswirkt.



## 1.2 Abstract

Articular cartilage defects do not regenerate, instead they are filled with a cartilaginous repair tissue of lesser quality. Despite established clinical approaches such as marrow stimulating techniques, these defects can represent a starting point of secondary osteoarthritis (OA). A promising experimental approach to enhance articular cartilage repair is the local biomaterial-guided overexpression of therapeutic sequences delivered by gene transfer vectors. Growth factors can be released in a controlled, continuous, local and precise manner without having a significant influence on joint homeostasis.

The present study investigated the long-term effects of recombinant adeno-associated viral (rAAV)-vector and hydrogel (alginate, AlgPH155) guided overexpression of the human insulin-like growth-factor-I (hIGF-I) (IGF-I/AlgPH155) in a minipig model of full-thickness chondral defects treated with microfracture.

One year postoperatively, IGF-I immunoreactivity was significantly increased in the deep zone of the repair tissue as sign of persistent transgene overexpression compared to the overexpression of the control vector *lacZ* (*lacZ*/AlgPH155) *in vivo*. In addition, treatment with IGF-I/AlgPH155 led to significantly improved structural parameters “defect filling”, “surface quality”, “cell morphology” as well as a significant improvement in the overall score of the histological evaluation system. Furthermore type-II collagen expression was significantly enhanced in the upper zone of the cartilaginous repair tissue upon treatment with IGF-I/AlgPH155. Analysis of the microstructure of the subchondral bone showed no significant differences between the treatment groups. Of note, the histological severity of the defect-associated perifocal OA was significantly reduced following therapy with IGF-I/AlgPH155 at 1 year postoperatively.

The results of the present work show that rAAV-mediated, hydrogel-guided overexpression of hIGF-I has positive long-term effects on the healing of cartilage defects and protects the surrounding articular cartilage.

## 2. Einleitung

### 2.1 Problematik und Überblick

Die langfristige Heilung von Knorpeldefekten ist aufgrund der schwachen Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpels eines der bedeutendsten und aktuellsten Probleme der klinischen Orthopädie und Unfallchirurgie (Madry *et al.*, 2011a). Bis heute gibt es keinen Therapieansatz, der eine vollständige Regeneration verspricht (Madry *et al.*, 2016a; Buckwalter *et al.*, 1998a).

Unabhängig von der Ätiologie des Knorpelschadens sind die Symptome der Patienten verminderte Beweglichkeit, ein damit einhergehender Funktionsverlust und Schmerzen. Die häufigste Ursache für Knorpelschäden ist Trauma gefolgt von Osteochondrosis dissecans, Arthrose, Stoffwechselstörungen, sowie Entzündungskrankheiten. Der Defekt wird durch Reparaturgewebe, das aus Faserknorpel besteht, gedeckt. Dieser hat ähnliche Eigenschaften wie hyaliner Knorpel, hält allerdings der mechanischen Belastung im Gelenk nicht stand. Dadurch entstehen noch stärkere Schäden und es kann sich sekundäre Arthrose ausbilden (Madry *et al.*, 2008; Orth, 2008; Simon *et al.*, 2018).

Ziel der experimentellen Forschung ist es, dass das Regenerationsgewebe ähnliche Eigenschaften wie hyaliner Knorpel aufweist und dadurch den unterschiedlichen Belastungen standhält. Besonders Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel der insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I), eignen sich zur experimentellen Therapie. IGF-I hat eine proliferative Wirkung auf Chondrozyten. Diese führt zu einer vermehrten Mitose, sowie einer verbesserten Zelldifferenzierung, wodurch die Chondrozyten vermehrt Proteoglykane und Typ-II-Kollagen in die extrazelluläre Matrix sezernieren. Zudem führt eine Überexpression von IGF-I zu einer vermehrten anabolischen Aktivität in den Zellen (Frisch *et al.*, 2014; Weimer *et al.*, 2012).

Rekombinante-Adeno-assoziierte-virale (rAAV)-Vektoren eignen sich dazu, die Überexpression durch indirekte Freisetzung zu gewährleisten. Diese zeichnen sich durch eine geringe Toxizität, wenig immunogenes Potential und die Freisetzung von IGF-I über einen längeren Zeitraum aus (Bellavia *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Minischweinmodell untersucht, ob die Reparatur chondraler Defekte durch eine rAAV-Vektoren vermittelte IGF-I Therapie nach einem Jahr postoperativ *in vivo* verbessert ist und ob diese Therapie die perifokale Arthrose reduziert.

## 2.2 Osteochondrale Einheit

Hyaliner Gelenkknorpel ist bradytroph, avaskulär, anerval und alymphatisch (Orth, 2008). Die für das Knorpelgewebe spezifischen Chondrozyten sind für die Knorpelherstellung verantwortlich. Sie machen 10 % des Volumens aus und werden durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit ernährt (Buckwalter, 1983). Ihre Aktivität ist altersabhängig, so dass nach Abschluss der Wachstumsphase sowohl die Zellzahl, als auch ihre metabolische und mitogene Aktivität sinkt (Buckwalter *et al.*, 1993; Buckwalter *et al.*, 1998b; Martin *et al.*, 2003).

Die von den Chondrozyten produzierte extrazelluläre Matrix besteht aus makromolekularen Protein-Polysacchariden, den Proteoglykanen. Charakteristisch für den hyalinen Knorpel ist Aggrecan (Hardingham *et al.*, 1992). Durch die Bindung der Proteoglykane an Hyaluronsäure entsteht eine hydrophile Wirkung, die ausschlaggebend für die hohe Druckelastizität des hyalinen Knorpels ist (Orth, 2008; Schmal, 2017). Die extrazelluläre Matrix enthält zudem weitere Makromoleküle wie kartilaginäres oligomeres Matrixprotein (*Cartilage oligomeric matrix protein*; COMP), Fibronectin, Decorin und Fibromodulin (Hardingham *et al.*, 1992).

Mit einem Anteil von 50 % der Trockenmasse und 90 - 95 % des Gesamtkollagens ist Typ-II-Kollagen das Hauptkollagen im hyalinen Knorpel. Neben den Proteoglykanen ist es maßgeblich für die Materialeigenschaften des hyalinen Knorpelgewebes verantwortlich (Bora *et al.*, 1987). Im Vergleich zu Typ-II-Kollagen ist Typ-I-Kollagen typisch für den fibrösen Knorpel und befindet sich vor allem im Reparationsgewebe bei vorliegenden Knorpelschäden. Neben Typ-II-Kollagen lassen sich zusätzlich Typ-V, -VI, -IX, -X und -XIV im hyalinen Knorpelgewebe finden (Orth, 2008).

Der hyaline Knorpel ist vierschichtig aufgebaut. Dabei stellt die Lamina splendens die Gelenkoberfläche dar. Diese besteht aus parallel zur Gelenkoberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen und dient als topische Barriere, da der hyaline Knorpel durch Diffusion versorgt wird. Basal davon liegt die Tangentialzone, welche sich durch abgeflachte in Dupletts oder alleinliegende Chondrozyten auszeichnet. Weiter basal folgt die Transitionalzone, in der die Chondrozyten, meist Dupletts oder Tripletts, senkrecht zur Oberfläche in Säulen angeordnet sind. Zusätzlich sind sie deutlich runder. Wie die Chondrozyten sind auch die Kollagenfasern senkrecht angeordnet. Dadurch können sich die einzelnen Schichten des hyalinen Knorpels nicht voneinander lösen.

Die Grenze zwischen der Transitionalzone und der Zone des verknöcherten Knorpels ist die *Tidemark*. Die Zone des verknöcherten Knorpels zeichnet sich durch hypertrophe Chondrozyten aus, die oft als Zellnester angeordnet sind. Ebenfalls entstehen in der

Zone des verknöcherten Knorpels starke Verbindungen, dadurch werden die Scherkräfte vom Gelenkknorpel auf den subchondralen Knochen übertragen (Orth, 2008).

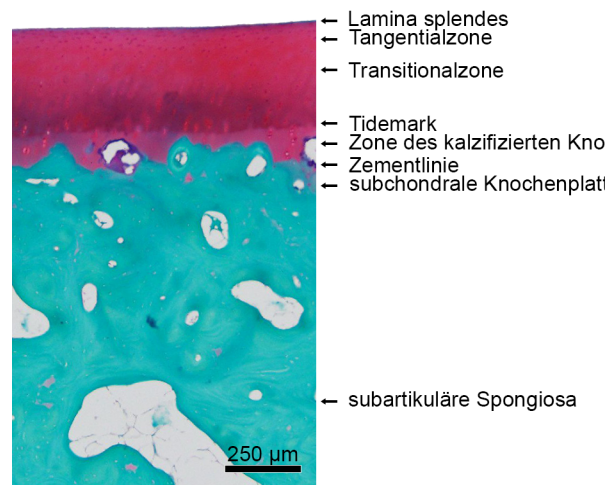


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des porcinen hyalinen Gelenkknorpels in Safranin-O/Echtgrün-Färbung.

### 2.3 Einteilung der Knorpeldefekte

Das ausschlaggebende Kriterium für die Einteilung von Knorpeldefekten ist die Ausdehnungstiefe des Defekts. Knorpeldefekte reichen maximal bis zur Lamina ossea subchondralis und können wie folgt unterteilt werden: teilschichtig (*partial thickness*) und vollschichtig (*full thickness*). Teilweise können sie durch einwandernde Synovialozyten gedeckt werden (Hunziker *et al.*, 1996 und 2002; Orth, 2008).

Osteochondrale Defekte hingegen betreffen sowohl das Knorpelgewebe als auch den darunterliegenden subchondralen Knochen. Die Defektdeckung erfolgt zumeist über mesenchymale Stammzellen, die aus dem Knochenmark einwandern. Diese ermöglichen die Neubildung von chondralem und ossärem Gewebe (Furukawa *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 2001).

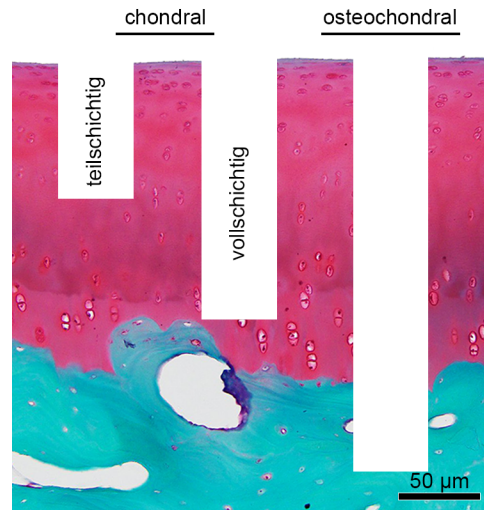


Abbildung 2: Einteilung chondraler und osteochondraler Defekte.

Im Verlauf bauen sich beide Reparaturgewebetypen, sowohl die Synovialozyten als auch die mesenchymalen Stammzellen, faserartig um. Dieser Faserknorpel wiederum hält der mechanischen Belastung im Gelenk auf lange Zeit nicht Stand und es kommt zur Degeneration (Jackson *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass es zu einer Größenausdehnung des Defekts kommt. Zudem kann der fokale Knorpeldefekt ein Ausgangspunkt für Arthrose sein. Die oben beschriebenen Reparaturgewebe zeichnen sich durch ähnlichen Aufbau und Struktur wie hyaliner Knorpel aus.

Im Vergleich zum Reparaturgewebe ist Regenerationsgewebe vom benachbarten defektfreien Gewebe weder auf histologischer, biochemischer noch auf biomechanischer Ebene zu unterscheiden. Es kommt zu einer vollständigen Ausheilung des Defekts (Madry, 2004; Orth *et al.*, 2014).

Im klinischen Alltag kann zur (arthroskopischen) Beurteilung des Reparaturgewebes das Bewertungssystem aus Oswestry (Smith *et al.*, 2005) oder nach Outerbridge (Outerbridge, 1961) verwendet werden. Die Klassifikation von Noyes und Stabler (Noyes *et al.*, 1989) oder der *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society (ICRS)* beschreiben zusätzlich die Defekttiefe (Schmal, 2017).

## 2.4 Klinische Relevanz von chondralen Defekten

Schäden des Gelenkknorpels betreffen weltweit Millionen von Menschen. Insbesondere in den Ländern des globalen Nordens ist die Inzidenz steigend. Dies zeigt sich darin, dass circa 10 % aller 60-jährigen Männer betroffen sind. Bei einer Arthroskopie wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 11 % bis zu 72 % ein asymptomatischer Knorpelschaden

gefunden. Aufgrund der verbesserten diagnostischen Möglichkeiten werden vermehrt symptomatische Knorpeldefekte erkannt und dann auch operiert (Hjelle *et al.*, 2002; Mirza *et al.*, 2015; Årøen *et al.*, 2004).

Unbehandelte Knorpeldefekte führen häufig zu sekundärer Arthrose (Sanders *et al.*, 2017; Everhart *et al.*, 2019a). Diese Pathogenese wird durch verstärkte Gelenkbelastung, wie zum Beispiel durch Adipositas, beschleunigt (Klets *et al.*, 2018). Arthrose zeichnet sich durch den Verlust von Proteoglykanen und dem für den hyalinen Knorpel spezifischen Typ-II-Kollagen aus. Es kommt zu einer irreversiblen Degeneration. Zusätzlich lässt sich ein Umbau und eine Sklerosierung des subchondralen Knochens sowie eine vermehrte Bildung von Knochenzysten und Osteophyten beobachten (Buckwalter *et al.*, 1998a).

## **2.5 Klinische Therapieoptionen bei fokalen Gelenkknorpeldefekten**

In der klinischen Orthopädie und Unfallchirurgie gibt es verschiedene Therapieoptionen zur Behandlung von symptomreichen, fokalen Gelenkdefekten. Kleine Defekte, die nicht über 50 % der Knorpeldicke reichen, werden konservativ behandelt (Schmal, 2017). Um Schmerzen zu lindern, werden nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) sowie teilweise auch Opioide verwendet (Fritz *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2018). Hinzu kommen Physiotherapie, Kryotherapie und Hilfsmittel aus der Orthopädietechnik zur Gewährleistung der Stabilität des Gelenks. Die konservative Therapie kommt unabhängig von Größe und Ausdehnung des Gelenkknorpeldefekts zusätzlich bei älteren Patienten, sowie bei Patienten, die das Gelenk wenig belasten, zum Einsatz (Schmal, 2017).

Die operativen Therapiemöglichkeiten lassen sich in zwei große Untergruppen einteilen: zellbasierte und gewebebasierte Verfahren.

Zu den markeröffnenden Verfahren gehören die subchondrale Bohrung nach Pridie (Pridie, 1959), die Abrasionsarthroplastik (Johnson, 1986) und die Mikrofrakturierung (Steadman *et al.*, 1999). Ziel ist die Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen (siehe bitte auch in 2.3.). Diese Verfahren eignen sich laut ICRS für kleine Defekte bis zu 3 cm<sup>2</sup> (Schmal, 2017). Eine zellbasierte Therapiemöglichkeit ist die autologe Chondrozytentransplantation, die primär für größere Defekte geeignet ist. Diese kann ohne oder mit biodegenerierbaren Trägersubstanzen erfolgen (Brittberg *et al.*, 1994; Ochi *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2020). Im Unterschied zu den oben genannten Techniken wird hier der Markraum nicht eröffnet.

Bei den gewebsbasierten Techniken werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus gering belasteten Regionen in den Knorpeldefekt transplantiert. Dabei kommt die Mosaikplastik und das osteochondrale-Autograft-Transfersystem zum Einsatz (Imhoff *et al.*, 1999; Hangody *et al.*, 2001).

Durch die chirurgisch-rekonstruktiven Verfahren kann meist die Implantation eines Gelenkersatzes hinausgezögert werden, da sie die Funktionalität des Gelenks verbessern. Allerdings führen sie nicht zu einer Knorpelregeneration (Madry *et al.*, 2011b).

### **2.6 Markraumeröffnende Verfahren**

Markraumeröffnenden Verfahren sind bei symptomatischen kleinflächigen chondralen Defekten indiziert. Sie werden häufig im klinischen Alltag angewandt (Brophy *et al.*, 2009) und sind gut etabliert. Zu ihnen gehören die Abrasionsarthroplastik, die Pridie-Bohrung, sowie die Mikrofrakturierung. Alle drei werden meist arthroskopisch durchgeführt und beginnen mit der Abtragung des kompletten kalzifizierten Knorpels (Brittberg *et al.*, 1994). Die Abrasionsarthroplastik wird vor allem bei retropatellaren Defekten angewandt (Johnson, 1986; Johnson, 2001). Bei der Mikrofrakturierung können auch schwer zugängliche Knorpelareale erreicht werden (Steadman *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 2007). Sowohl bei der Mikrofrakturierung als auch bei den Pridie-Bohrung werden die Bohrung/Mikrofrakturierungen jeweils so tiefgesetzt, dass eine Blutung sichtbar wird (Pape *et al.*, 2010). Um die Stabilität der subchondralen Knochenplatte zu wahren werden die einzelnen Mikrofrakturierungen, in einem Abstand von 3-4 mm gesetzt (Steadman *et al.*, 2003; Gomoll *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2020). Das durch die Blutung entstandene Gerinnsel bildet die Grundlage für das Reparaturgewebe, welches aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen besteht, die sich sowohl zu Osteoblasten, als auch zu Chondroblasten differenzieren können (Compston, 2002; Longo *et al.*, 2012).

Im Reparaturgewebe bilden sich nach 1 - 2 Wochen fibroblastenartige Zellen, die vermehrt Typ-I-Kollagen sezernieren. Es entsteht ein faserknorpelähnliches Gewebe (Beickert, 2005; Moran *et al.*, 2014). Nach 1 - 2 Monaten besteht die extrazelluläre Matrix vermehrt aus Typ-II-Kollagen (Furukawa *et al.*, 1980; Cucchiari *et al.*, 2005), jedoch ist die Belastbarkeit und Elastizität des Reparaturgewebes geringer als beim hyalinem Knorpel (Müller *et al.*, 1999; Beickert, 2005). Mit der Zeit wird durch die Apoptose von ortständigen Chondrozyten (Shapiro *et al.*, 1993) die vertikale Integrationszone zwischen Reparaturgewebe und hyalinem Knorpel zellärmer wodurch es dort zu Rissen kommen kann (Mithoefer *et al.*, 2005). Nach einigem Monaten folgt sowohl im Reparaturgewebe, als auch im angrenzenden hyalinen Knorpel eine Degenerationen (Jackson *et al.*

*al.*, 2001; Madry *et al.*, 2010; Orth *et al.*, 2019). In der subchondralen Knochenplatte zeigen 30-50 % der Patienten postoperative Veränderungen (Mithoefer *et al.*, 2005), die sich meist durch eine Erhöhung der subchondralen Knochenplatten und eine Verschiebung der *Tidemark* in Richtung Oberfläche äußern, wodurch das Knorpelreparaturgewebe ausgedünnt wird (Henderson *et al.*, 2005; Madry *et al.*, 2010). Dadurch ist die gesamte osteochondrale Einheit weniger elastisch und weniger beanspruchbar (Atkinson *et al.*, 1998; Madry *et al.*, 2010).

## 2.7 Experimentelle Therapieansätze

Bislang wurde weder ein konservatives noch ein experimentelles Verfahren entwickelt, das zu einer Knorpelregeneration hätte führen können. Experimentelle Therapien verfolgen deshalb den Ansatz, die Knorpeldefektareale mit therapeutischen Faktoren, wie zum Beispiel IGF-I, Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) oder dem Transkriptionsfaktor *Sox9* zu behandeln. Ziel ist es, eine vermehrte Knorpelaktivität zu stimulieren. Das bedeutet, dass sowohl Zellproliferation als auch Zellreifung gefördert werden sollen, wodurch dann auch vermehrt Bestandteile der extrazellulären Matrix produziert werden (Trippel, 1997; Goldberg, 2001).

Die verschiedenen Faktoren können in Proteinform direkt intraartikulär appliziert werden (Jentsch *et al.*, 1980; van Beuningen *et al.*, 1994; Rogachefsky *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 2004) oder an verschiedene Trägermaterialien gebunden 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). Die beiden Methoden werden vor allem durch die kurze Halbwertszeit, insbesondere von IGF-I und FGF-2, stark limitiert (Chuma *et al.*, 2004). So wird der Faktor oft schon nach einer Stunde nicht mehr in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen (Shida *et al.*, 1996). Durch die Verwendung von höheren Konzentrationen (Fujimoto *et al.*, 1999) oder durch die kontinuierliche Applikation kann der Spiegel des Faktors und damit dessen Wirkung über längere Zeit aufrechterhalten werden (Mizuta *et al.*, 2004). Die Faktoren wirken über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden oder über membrangebundene Rezeptoren (Fortier *et al.*, 2004).

Um die kontinuierliche Sekretion der therapeutischen Faktoren zu gewährleisten kann auch die DNS, die für die therapeutischen Faktoren kodiert in die Zellen eingeschleust werden. Dieses Konzept des Gentransfers gestaltete sich anfangs schwierig, da die viralen, adeno- oder retroviralen Systeme die Knorpelmatrix nicht durchdringen konnten. Dadurch blieb auch der gewünschte Effekt auf die Chondrogenese aus. Erst seit der Entwicklung von hocheffizienten Transfersystemen, zum Beispiel durch rAAV-Vektoren,



ist eine Intrusion in das Knorpelgewebe möglich (Madry *et al.*, 2003; Pascher *et al.*, 2004; Ulrich-Vinther *et al.*, 2004; Cucchiari *et al.*, 2005).

## 2.8 Trägermaterialien zur Reparatur chondraler Defekte

Die Trägermaterialien werden in solide Trägermaterialien, Hybride und Hydrogele unterteilt. Solide Trägermaterialien sind zum Beispiel Hydroxyapatit (HA), Trikalziumphosphat (TZP), poröses Titan und Tantalum. Werden soliden Trägermaterialien mit einem Hydrogel verbunden, werden sie als Hybrid bezeichnet. Beide, sowohl solide Trägermaterialien als auch Hybride werden in der Klinik, hauptsächlich in der Therapie solider Knochendefekt verwendet (Chang *et al.*, 1998; Gotterbarm *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2014; Lopa *et al.*, 2014).

Hydrogele hingegen zeichnen sich ebenfalls durch gute mechanische Eigenschaften aus. Zusätzlich bilden sie eine geschmeidige Knorpeloberfläche und schützen die Chondrozyten, so dass diese ihre Morphologie beibehalten (Qi *et al.*, 2012; Madry, 2020). Hydrogele können verschiedenen Bestandteile enthalten. Im klinischen Alltag werden besonders Membranen aus Typ-I/III-Kollagen verwendet, sowie eine Kombination aus Hyaluronsäure und Albumin. Hyaluronsäure ist Teil der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels und führt zusätzlich zu einer geschmeidigeren Oberfläche desselben (Rey-Rico *et al.*, 2016; Madry, 2020; Vainieri *et al.*, 2020).

In der experimentellen Therapie werden zusätzlich noch Hydrogele aus synthetischen Polymeren wie Polylactidsäure, Polyglycolidsäure oder dem Copolymer Polylactid-glycolidsäure verwendet. Zu ihren positiven Eigenschaften gehören, dass sie die Umgebung für die Chondrogenese verbessern, gute mechanische Eigenschaften haben und bei der Zellanheftung im Defektgewebe unterstützen (Duan *et al.*, 2013; Madry, 2020). Eine weitere Kombination aus Stoffen, welche in der experimentellen Therapie verwendet werden, sind Agarose und Alginat, natürliche Kohlenhydratpolymere, sowie Poloxamere (Lopa *et al.*, 2014; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015). Hydrogele sind zudem eine gute Basis für Gentransfersysteme (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015; Rey-Rico *et al.*, 2016; Madry, 2020).

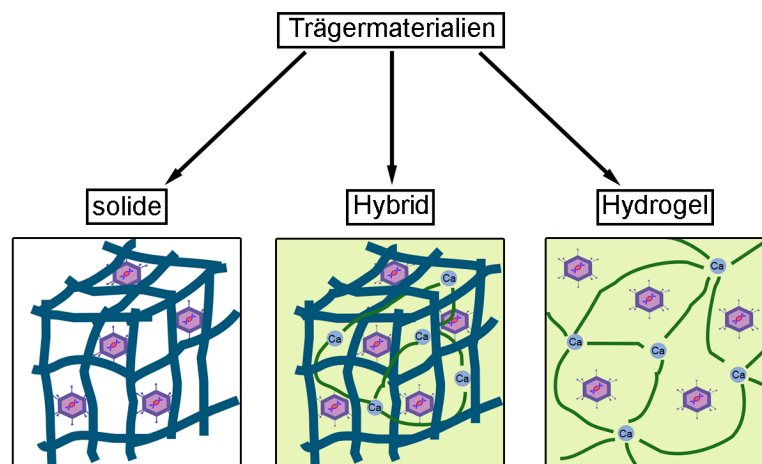


Abbildung 3: Schema der verwendbaren Trägermaterialien zur Reparatur chondraler Defekte.

## 2.9 Insulinartiger Wachstumsfaktor I (IGF-I)

Der Wachstumsfaktor IGF-I ist ein 7,6kDA großes Polypeptid (Madry *et al.*, 2005), welches an einen spezifischen membrangebundenen Rezeptor, einen Tyrosinkinase-rezeptor, bindet. Durch diese spezifische Bindung hat IGF-I Einfluss auf den Zell-metabolismus (Lo *et al.*, 1995).

IGF-I ist ein anabol wirkender Wachstumsfaktor, durch den Zellproliferation und Zelldifferenzierung induziert werden (Trippel *et al.*, 1983 und 1989; Trippel, 1995). Zudem wird durch IGF-I eine verstärkte DNS-Bildung angeregt (Fortier *et al.*, 2002). IGF-I fördert die Synthese der verschiedenen Matrixproteine wie zum Beispiel Aggrecan sowie verschiedene andere Proteoglykane. Zusätzlich wird das für den hyalinen Knorpel charakteristische Typ-II-Kollagen durch eine vermehrte Expression in IGF-I in der Knorpelzelle verstärkt produziert (Trippel *et al.*, 1989; Madry *et al.*, 2005). Auch Typ-X-Kollagen, welches Bestandteil von Chondrozyten in der hypertrophen Zone ist, sowie der Transkriptionsfaktor SOX9 werden durch IGF-I vermehrt exprimiert (Frisch *et al.*, 2017). Insgesamt kommt es, unter dem Einfluss von IGF-I, zu einer deutlichen Steigerung der metabolischen Aktivität der Zelle (Fortier *et al.*, 1999).

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass IGF-I bei vorliegenden Verletzungen oder Beschädigung der Knorpeloberfläche, zum Beispiel durch Arthrose, anti-inflammatorische wirkt. Diese Wirkung zeigt sich insbesondere durch die Hemmung der Aktivität der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-I und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (Tyler, 1989; Fortier *et al.*, 2002; Weimer *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013a).

Genbasierte IGF-I-Therapie führt im Bezug auf Knorpeldefekte zu einer verbesserten Knorpelheilung, insbesondere die Oberflächenarchitektur als auch die Defektfüllung sind verbessert (Madry *et al.*, 2005). Zusätzlich lässt sich bei einer Behandlung von Knorpeldefekten mit IGF-I eine verbesserte Bildung der subchondralen Knochenplatte sowie eine verstärkte Verbindung von Knorpel und subchondraler Knochenplatte feststellen. Dadurch wird der Defekt weniger anfällig für Spätfolgen, wie Arthrose (Nixon *et al.*, 1999).

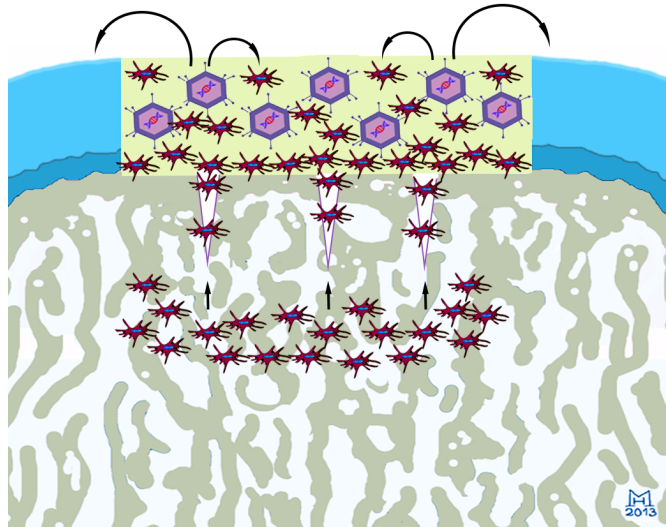


Abbildung 4: Schema zur Wirkungsweise von mit IGF-I transduzierten rAAV-Vektoren.

### 2.10 Gentransfersysteme zur Reparatur chondraler Defekte

Gentransfersysteme zur Reparatur chondraler Defekte lassen sich in nicht-virale und virale Systeme unterteilen. Nichtvirale Systeme verwenden verschiedene physikalische Methoden, zum Beispiel Überdruck (Mann *et al.*, 1999). Chemische Methoden beruhen auf dem Prinzip, dass die DNS mit negativer Oberflächenspannung an positive Kationen bindet. Es entstehen extrazelluläre Komplexe (Orth, 2008). Heute sind die lipid-basierten Komplexe die häufigste Variante (Schwendener, 2007; Gao *et al.*, 2007; Orth *et al.*, 2008).

Für viralen Gentransfer, auch Transduktion genannt, werden vor allem Adeno-, adenoassoziierte- (AAV) und Retroviren, seltener auch Herpes oder Lentiviren eingesetzt (Lazo *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2003). Virale Vektoren transduzieren besonders gut in Stütz- und Bindegewebe, wie zum Beispiel Muskel-, Knochen- und Knorpelzellen (Kawashima *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Ketola *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2007). Die eingesetzten Viren sind replikationsdefekt und besitzen nur noch die Fähigkeit zur Transduktion. Es besteht allerdings die unwahrscheinliche Möglichkeit,

dass sie ihre Replikationsfähigkeit zurück erlangen (Crystal, 1995a und 1995b; Tripathy *et al.*, 1996). Zusätzlich besteht die Gefahr einer überschießenden Immunantwort aufgrund der immunogenen und onkogenen Eigenschaften der Viren (Yei *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2002; Bessis *et al.*, 2004; Vandenberghe *et al.*, 2007).

Rekombinante rAAV-Vektoren benötigen keine Zellteilung zur Vektorintegration in die Zelle und sind damit besonders effizient. Zudem wird durch die Bildung von Konkameren, Wiederholungssequenzen der DNS, die Wirkung deutlich verstärkt (Orth, 2008; Cucchiari *et al.*, 2013; Bellavia *et al.*, 2018). Zudem zeigten verschiedene Studien eine gute Verträglichkeit der rAAV und wenig Immunreaktionen durch die Synovialmembran, wodurch keine Schäden am Knorpel entstehen (Asen *et al.*, 2018; Ortved *et al.*, 2015).

### 3. Hypothesen

Im einem Modellsystem der Reparatur chondraler Defekte in der Trochlea femoris adulter Minischweine nach Mikrofrakturierung wurden ein Jahr postoperativ folgende Hypothesen untersucht:

- (1) Die Applikation eines Hydrogels, bestehend aus Alginat, Kalzium und rAAV-Vektoren, welche eine hIGF-I cDNS tragen (rAAV-IGF-I), führt zu einer persistierenden Transgenexpression im Reparaturgewebe.
- (2) Die Applikation eines Hydrogels, bestehend aus Alginat, Kalzium und rAAV-Vektoren, welche eine hIGF-I cDNS tragen (rAAV-hIGF-I), verbessert die chondrale Reparatur im Vergleich zu Kontrolldefekten, die Hydrogel, bestehend aus Alginat, Kalzium und rAAV-*lacZ*-Vektoren, erhielten.
- (3) Die Applikation eines Hydrogels, bestehend aus Alginat, Kalzium und rAAV-Vektoren, welche eine hIGF-I cDNS tragen (rAAV-hIGF-I), verringert die perifokale Arthroseentstehung im Vergleich zu Kontrolldefekten, die Hydrogel, bestehend aus Alginat, Kalzium und rAAV-*lacZ*-Vektoren, erhielten.

## 4. Studienaufbau

Im Minischweinmodell wurde ein zirkulärer vollschichtiger chondraler Defekt (Durchmesser 4 mm) an der distal-lateralen Femurtrochlea gesetzt. Die Defekte wurden in zwei Studiengruppen unterteilt: Die erste Studiengruppe wurde mit rAAV-*lacZ*, die zweite mit rAAV-hIGF-I Hydrogel behandelt. Die Vektoren wurden, gebunden an ein Hydrogel, jeweils nach Mikrofrakturierung in die Defekte appliziert.

Ein Jahr postoperativ wurde die Reparatur der chondralen Defekte analysiert. Dazu wurden sowohl magnetresonanztomographische (MRT), makroskopische, histologische und immunhistologische Bewertungssysteme verwendet. Zusätzlich wurde mittels Mikrofokus-Computertomographie (Mikro-CT) die Mikroarchitektur des Knorpels, des subchondralen Knochens sowie der subartikulären Spongiosa analysiert.

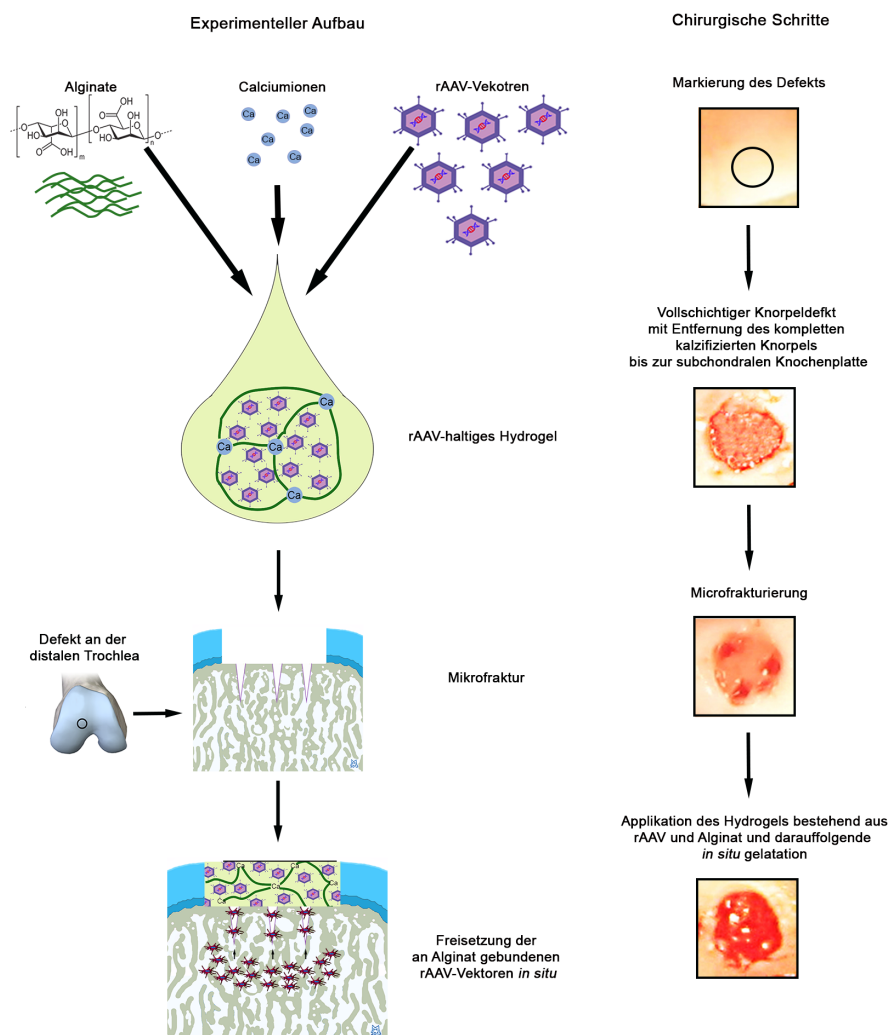


Abbildung 5: Schema des experimentellen Aufbaus und der chirurgischen Schritte.

## 5. Material

### 5.1 Puffer, Medien und Lösungen

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit *aqua bidest.* angesetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien.

Lösung, Puffer, Medium	Inhaltsstoffe	Konzentration/Volumen/ Menge
Blockierungspuffer	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung	H <sub>2</sub> O	5 ml
	Puffer pH (7,5)	2 Tropfen
	3-3'-Diaminobenzidin (DAB)	4 Tropfen
	Substratreagenz	2 Tropfen
Echtgrün-Lösung	Echtgrün	200 mg
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Entkalkungslösung	Natrium-Citrat	100 mg
	Ameisensäure (90 %)	250 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 750 ml
HCl-Lösung (Salzsäure) (0,1 %)	HCL (37 %)	5,4 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10 mM
Safranin-Orange-Lösung	Safranin Orange	15 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1 %)	Trypsin-Stammlösung (25 %)	200 µl
	H <sub>2</sub> O	200 ml
Trypsinstammlösung	Trypsin	25 % (V/V)
	PBS	75 % (V/V)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,3 %) (Wasserstoff-Peroxid-Lösung)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,6 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml

### 5.2 Chemikalien

Zur Erzeugung von Puffern und Lösungen wurden überwiegend Laborchemikalien der Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Weitere Chemikalien siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (100 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin (4 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert (A & B)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Harris	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraplast X-TRA Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)
Salzsäure (1 %)	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)
Xylol	Fischer (Saarbrücken, Deutschland)

### 5.3 Biologisches Material

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden folgende Antikörper und Enzyme verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Antikörper und Enzyme.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-IgG (biotiniliert)	Kaninchen	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-Maus-IgG (biotiniliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-IGF-I-Antikörper	Kaninchen	Novus Biologicals (Centennial, CO, USA)
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Typ-X-Kollagen	Maus	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Aggrecan-IgG (ab 3778)	Maus	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Trypsin	-	Sigma (Traufkirchen, Deutschland)

### 5.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

#### 5.4.1 Geräte

Zusätzlich zu den allgemeinen Laborgeräten wurden folgende Geräte verwendet (Tabelle 4).



## Material

Tabelle 4: Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Digitalkamera Camedia C-5050 ZOOM	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 (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74 °C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana, PG, Italien)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer multi stirr 4	Bellco Glass (Vineland, NJ, USA)
Mikrofokus-Computertomographie-Scanner	Skyscan (Kontich, Belgien)
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

Zur statistischen Analyse wurden Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA), SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) sowie Stata (StataCorp LCC, College Station, TX, USA) verwendet. Die Daten des Mikrofokus-Computertomographie-Scanners wurden mit „NRcon“ (Skyscan, Kontich, Belgien) rekonstruiert. Die Betrachtung erfolgte mit „DataViewer“ (Skyscan), die Auswertung mit „CT-Analyzer“ (Skyscan). Die MRT-Bilder wurden mit RadiANT DICOM Viewer (Medixant, Poznan, Polen) ausgewertet. Für die Auswertung der histologischen Bilder wurde „CellSens“ Version 1.12 (Olympus, Tokio, Japan) verwendet. Für die anschließende Bearbeitung und das Zusammensetzen der Bilder wurde „Adobe Photoshop CS6“ (Adobe System, San José, CA, USA) verwendet.

### 5.4.3 Operationsmaterialien und –instrumentarien

Hersteller der Spritzen, Kanülen und Nahtmaterialien war die Firma Braun (Melsungen, Deutschland). Weitere chirurgische Instrumente, wie zum Beispiel Pinzetten, Skalpelle und Scheren stammten von den Firmen Medicon (Tuttlingen, Deutschland), A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz), Mergo (Wesel, Deutschland) und Martin (Tuttlingen, Deutschland). Der chondrale Defekt wurde mithilfe eines 4,0 mm kanülierten AO-Bohrers mit Führungshandgriff der Firma Synthese (West Chester, PA, USA) gesetzt.

### 5.4.4 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Plastikartikel und Glasbehälter wurden von den Firmen Falcon (Beckton, Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fischer (Schwerte, Deutschland), neoLab

(Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Paraffin-kassetten sowie die Plastikabdeckungen für die Paraffin-Einbettung der Proben stammten von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die Klängen des Rotations-mikrotoms stellte die Firma Leica (Nussloch, Deutschland) her.

## 6. Methoden

### 6.1 Herstellung rAAV-Vektoren

Die Vektoren rAAV-*lacZ* und rAAV-IGF-I stammten von pSSV9 einem AAV-2 genomischem Klon ab. Der Vektor rAAV-*lacZ* trug dabei das  $\beta$ -Galaktosidasegen des *Escherichia coli*, welches unter der Promoterkontrolle eines intermediär-frühen Cytomegalievirus (CMV-IE), stand. Der IGF-I-tragenden Vektor wurde nach dem gleichen Prinzip aufgebaut, er trug statt der *lac-Z* Region die DNS von IGF-I. Die Beladung der Vektoren erfolgte durch konventionelle Vektoren und mit freien Helfern, die mittels Plasmidtransfektionssystemen des Plasmids pXX2 und des Adenovirus-helferplasmids pXX6 eingedeckt wurden. Anschließend an die Beladung folgte eine Waschung und Titrierung mit Hilfe einer Echtzeit-PCR, so dass durchschnittliche  $10^{10}$  Transgenkopien pro ml vorlagen. Die Vektoren wurden in Hydrogel, basierend auf Alginate (AlgPH155) verkapselt, um zeitlich verzögert freigegeben zu werden (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015).

### 6.2 Großtiermodell

Der Tierversuch wurde durch die saarländische Tierschutzkommission genehmigt (Zulassungsnummer 07/2013). Des Weiteren wurden die Versuche entsprechend der deutschen Tierschutzgesetze und den Richtlinien der Nationalen Gesundheitsinstitute der Vereinigten Staaten von Amerika (*National Institutes of Health, NIH*) für die Betreuung und Nutzung von Labortieren (*Guidelines for the care and use of laboratory animals*, NIH Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985) durchgeführt. Die ausgewählten Versuchstiere waren ausgewachsene, gesunde, weiblich Minischweine (Alter 18-22 Monate, durchschnittliches Körpergewicht  $42,75 \pm 6,54$  kg). Die Versorgung erfolgte über einen standardisierten Ernährungsplan, aqua ad libitum sowie veterinärer Überwachung.

#### 6.2.1 Berechnung der Tierzahl

Basierend auf einer Poweranalyse und früheren Studien zur Reparatur von chondralen und osteochondralen Defekten im translationalen Großtiermodell wurde ein bilateraler Studienaufbau mit 8 Tieren angewandt. (Orth *et al.*, 2013a; Cucchiarini *et al.*, 2014; Asen *et al.* 2018). Dieser ist aussagekräftig, da Unterschiede von 4 Punkten mit einer Standardabweichung von 3 Punkten im histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* zu sehen waren.

### **6.3 Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung**

Die Operation wurde steril im Operationssaal der experimentellen Chirurgie Homburg durchgeführt. Zunächst wurde die Narkose mit 30 mg/kgKG Ketamin (Ketanest, S Pfizer, Berlin, Deutschland), 2 mg/kgKG Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 1 mg Atropin (Atropin, B.Braun, Melsungen, Deutschland), eingeleitet. Nach der Narkoseeinleitung wurden die Minischweine intubiert und die Narkose wurde ergänzt durch eine Bolusgabe von 20 ml 2%igem Propofol (Astrazeneca, Wendel, Deutschland) und mittels einer balancierten Anästhesie mit der Kombination aus 6-12 mg/kgKG/h Propofol und 1,5%igem Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) aufrechterhalten.

Nach der Rasur der Hinterläufe wurden diese steril mit 10%igem Jod abgewaschen und bis auf das Operationsgebiet abgedeckt. Über eine mediale parapatellare Miniarthrotomie (Operateur: Prof. Dr. med. Henning Madry, Assistenz: Dr. med. Lars Goebel) konnte die Trochlea durch eine Flexionsstellung freigelegt werden. Es wurde ein chondraler, 4 mm breiter und 5 mm tiefer, runder Defekt am distalen lateralen Ende der Trochlea gesetzt. Der Knorpel wurde bis zur subchondralen Knochenplatte abgetragen und anschließend wurden 3 Mikrofrakturierungen (Durchmesser: 1,2 mm, Tiefe: 5,00 mm) gesetzt. Nachdem die Blutung eintrat, wurde 25 µl des sterile Hydrogels bestehend aus Alginat, Kalziumionen und rAAV-*lacZ* oder rAAV-IGF-I mittels Pipette auf das Defektareal appliziert. Nach erfolgter *in situ* Gelation wurde das Knie gespült, passiv mobilisiert, die Gelenkkapsel und die Haut sorgfältig vernäht sowie mit einem Sprühpflaster vollständig verschlossen.

Postoperativ wurden die Tiere täglich zur Wundinspektion und Kontrolle der Vitalparameter visitiert. Dies erfolgte über 10 Tage. Die postoperative Versorgung erfolgte zum einen über eine Schmerzprophylaxe mit 100 µg/h Fentanyl transdermal (durogescic, Janssen, Gilag, Neuss, Deutschland) und Analgesie intraoperativ und postoperativ nach Bedarf mit Caprofen (Rimadyl, Pfizer, Berlin, Deutschland) von 4 mg/kgKG. Eine Ruhigstellung oder Entlastung der Gelenke war nicht nötig, da keine Beeinträchtigung in Bewegung und Konstitution des Tieres durch die Knochen-, Knorpel- und Weichteilmanipulation vorlag. Die Euthanasie erfolgte 1 Jahr postoperativ in Allgemeinanästhesie durch eine Überdosis Pentobarbital. Die Gelenke wurden entnommen und bei -74 °C, bis zur Fixierung mit 4%igem Formalin, eingefroren.

### **6.4 Evaluierung des Knorpelreparaturgewebes**

#### **6.4.1 Makroskopische Evaluierung**

Die Defektareale wurden sowohl während der Probeentnahme als auch postoperativ fotografiert. Zur verblindeten Beurteilung wurden zwei etablierte Bewertungssysteme

## Methoden

---

aus Oswestry (Smith *et al.*, 2005) und nach Goebel *et al.* (Goebel *et al.*, 2016), verwendet. Die erste Evaluierung erfolgte anhand der postoperativen Bilder mittels des modifizierten Bewertungssystem aus Oswestry (Smith *et al.*, 2005). Da dieses in der Klinik bei Arthroskopien angewendet wird, fiel in dieser Versuchsanordnung der Punkt „Steifheit der Oberfläche“ (*stiffness on probing*) weg. Die vollständige Reparatur des Defekts wird mit der maximalen Punktzahl von 8 Punkten beschrieben, 0 Punkte hingegen beschreiben eine fehlende Reparatur des Knorpeldefekts (Tabelle 5). Danach erfolgte die Evaluierung mittels des Bewertungssystems nach Goebel *et al.* (Goebel *et al.*, 2016), in welchem die maximale Punktzahl von 20 Punkten eine fehlende Knorpelreparatur beschreibt, wohingegen 0 Punkte eine vollständige Knorpelreparatur anzeigt (Tabelle 6).

Tabelle 5: *Modifiziertes Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur aus Oswestry.*

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	perlmutter- und hyalin-ähnlich	2
	weiß	1
	gelber Knochen	0
2. Oberflächenbeschaffenheit 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 6: 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 Reparaturgewebe	keine sichtbaren Blutgefäße	0
	< 25 % des Reparaturgewebes	1
	25 - 50 % des Reparaturgewebes	2
	50 - 75 % des Reparaturgewebes	3
	> 75 % des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächenbeschaffenheit 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	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	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	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4

## 6.4.2 Mikro-computertomographische Evaluierung

### 6.4.2.1 Standardisierte Einstellung des Mikrocomputertomographen

Die Trochleas der Minischweine (n = 16) wurden für die Analyse mittels Mikro-CT Skyscan 1176 (Bruker mikro-CT, Kontich, Belgien) aus der Kühlung (-74 °C) genommen und in einer Plastikvorrichtung zum Schutz der Proben verpackt. Dann wurden sie mit dem distalen Ende voraus gescannt. Die bewegliche 11 Megapixel-Kamera sowie die Röntgenröhre ermöglichten eine räumliche Auflösung von bis zu 9 µm. Voreinstellung der Röhrenspannung waren eine Spannung von 90 kV, bei einer Stromstärke von 278 µA, wodurch sich eine Raumaufklärung von 18 µm Pixel Größe ergab. Ein 0,5 µm

Aluminium-Kupferfilter wurde zwischen Detektor und Röntgenstrahlquelle platziert. Die Röntgenröhre rotierte mit  $0,4^\circ$  bei einer Expositionszeit von 270 ms, so dass durchschnittlich 3 Bilder in jeder Position entstanden. Die Rekonstruktion erfolgte entsprechenden empirischen Daten aus Vorexperimenten (Oláh *et al.*, 2018). Zur optimalen Darstellung der Knochenparameter wurde die Graustufe zwischen -0,000023 und 0,020154 gewählt. Für die Berechnung der Knochenmineraldichte (*Bone mineral density*, BMD) diente ein Kalziumhydroxyapatit-Phantom mit bekannten BMD Werten von 250 und 750 CaHA/cm<sup>3</sup> als Eichparameter. Der BMD wurde anhand von Graumittelstufen errechnet.

### 6.4.2.2 Standardisierte Evaluierung der Mikro-CT- Bilder

Um die Mikroarchitektur des Knochens und Knorpels zu erfassen wurden mithilfe des Programmes CT-Analyzer (Skyscan) verschiedene *Regions of Interest* (ROI, „Regionen des Interesses“) erstellt: subchondrale Knochenplatte (*subchondral bone plate*, SCBP), subartikulären Spongiosa (*subarticular spongiosa*, SAS) und Knorpel. Diese wurden sowohl im Defektbereich mit einem Durchmesser von 4 mm als auch im angrenzenden Gewebe gezeichnet (Asen *et al.*, 2018). Als Orientierung für die ROIs der subchondralen Knochenplatte diente das histologische Korrelat, die Lamina cementalis. Pro Defekt wurden 6 ROIs gezeichnet, so dass insgesamt 96 ROIs erstellt wurden, welche durch dreidimensionale Extrapolation zu *Volumes of interest* (VOI, „Volumen des Interesses“) kalkuliert wurden.

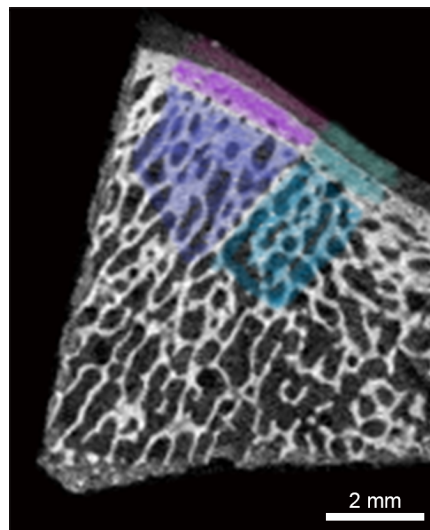


Abbildung 6: Repräsentatives mikro-CT Bild der defektfreien procinen Trochlea mit schematischer Markierung der verschiedenen Regionen des Interesses; lila Defektbereich, blau an den Defekt angrenzendes Gewebe; oben Knorpel, mittig subchondrale Knochenplatte, unten subartikuläre Spongiosa.

### 6.4.2.3 Mikro-CT-Parameter

Für jedes VOI wurde mit der CT-Analyzer-Software die Schwellenwertobergrenzen von 255 und -untergrenze von 89 gewählt. Zusätzlich wurden für die VOI der Knorpelareale die Schwellenwertobergrenze 89 und -untergrenze 30 gewählt um knorpelhaltige Strukturen besser beurteilen zu können. Nach passender Schwellenwertwahl wurden folgende dreidimensionalen Parameter (Nomenklatur der *American Society for Bone and Mineral Research*) ermittelt (Asen *et al.*, 2018):

- Geschlossene Poren in % (*closed porosity in %*, Po[cl])
- Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD)
- Knochenoberfläche/Volumen Verhältnis (*bone surface/volume ratio*, BS/BV),
- Knochenoberflächendichte (*bone surface density*, BS/TV).
- Komplette Poren in % (*total porosity in %*, Po[to])
- Offene Poren in % (*open porosity in %*, Po[op])
- Prozentuales Knochenvolumen (*percent bone volume*, PBV)
- Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th),

Zusätzlich wurden bei den VOI der SAS folgende Parameter bestimmt:

- Fraktale Dimension (*fractal dimension*, FD)
- Grad der Anisotropie (*degree of anisotropy*, DA)
- Netzdicke (*connectivity density*, Conn.Dn.)
- Struktur-Model-Index (*structure model index*, SMI)
- Trabekelabstand (*trabecular separation*, Tb.Sp)
- Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N)
- Trabekelmusterfaktor (*trabecular pattern factor*, Tb.Pf)

Anschließend wurde mit dem Computerprogramm CT-Analyzer noch die BMD berechnet. Die 3D Rekonstruktion und die Modellierung der Trabekeldicke, Dicke der subchondralen Knochenplatte als auch die Dicke des Knorpels wurde mit Unterstützung von PhD Tamás Oláh mittels CTVox v. 3.2.0. (Bruker Mikro-CT) erstellt. Durch die Einstellungen Schatten (*shadow*) und Oberflächenbeleuchtung (*surface lighting*) wurde die Sichtbarkeit der Oberflächenstruktur verbessert. Die Dicke der subchondralen Knochenplatte sowie des Knorpels wurde mit Hilfe der Funktionen Farbkodierung (*color coding*) visualisiert (Oláh *et al.*, 2019).

### 6.4.2.4 Manuelle Messung der Micro-CT-Bilder

Zur besseren Abschätzung der Dicke des Knorpels und der subchondralen Knochenplatte, sowie zur Erfassung der Erhöhung bzw. der Absenkung der subchondralen Knochenplatte, wurden für die unten aufgeführten Parameter zusätzlich je 3



repräsentative manuelle Messungen alle 50 Bilder durchgeführt. Folgende Parameter wurden gemessen:

- Dicke des Knorpels im Defekt
- Dicke der subchondralen Knochenplatte im Defekt
- Breite des Defekts im Knorpel
- Erhöhung/Absenkung der subchondralen Knochenplatte
- Erhöhung/Absenkung des Knorpels

### **6.4.3 Magnetresonanztomographische Evaluierung**

Die defektarealenthaltenden Trochleas ( $n = 16$ ) wurden mit einem 9.4 Tesla (T) MRT der Firma Bruker (Biospec Avance III 9.4/20, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) analysiert. Die tiefgefrorenen Proben wurden durch eine Plastikvorrichtung geschützt. Dann wurden sie distal voraus in ihrem längsten Durchmesser in einer zirkulären, polarisierten Volumenspule (innerer Durchmesser: 40 mm) im Magnetfeld des Scanners platziert. Durch die gewählte Ausrichtung verkürzte sich die Aufnahmezeit, wodurch eine übermäßige Erhitzung der Proben vermieden wurde. Als Standardeinstellung wurden die bereits in früheren Versuchen für Knorpel und Knochen erprobten Einstellungen (Goebel *et al.*, 2015) verwendet: Repetitionszeit (TR) 10 ms, Echozeit (TE) 3 ms, Pulswinkel (FA)  $10^\circ$ , Excitationsnummer (NEX) 10, Bandbreite 98.684,2 kHz. Die dreidimensionale gradiente Echosequenz wurde gewählt, um isovolumetrische Bilder der Knorpeldefekte zu erstellen. Es wurden fünf Untersequenzen in drei Ebenen erstellt. Die Standardvoxel-einstellung betrug  $120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}$  (Größe eines Voxels), dadurch konnte multiplanar rekonstruiert werden, ohne dass sich die Auflösung verschlechterte. Die Bilder wurden mit derselben Leerraumauflösung in 3 Ebenen mit Paravision 5.1 JIVE Tool (Bruker Biospin) rekonstruiert und mit Image J (Version 1.45, NIH, Bethesda, MD, USA) nochmals analysiert. Die Darstellung der fertig rekonstruierten Bildersequenzen erfolgte durch RadiANT DICOM Viewer (Medixant, Poznan, Polen) und wurde durch 3 verblindete Beobachter anhand des MOCART (*magnetic resonance observation of cartilage repair tissue*) 3D Bewertungssystem evaluiert (Goebel *et al.*, 2014). Die maximale Punktzahl von 100 Punkten zeigt eine vollständige Reparatur an, 0 Punkte kein Reparaturgewebe (Tabelle 7).

Tabelle 7: Bewertungssystem nach MOCART 3D.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	0 %	0
	0 - 25 %	3
	25 - 50 %	5
	50 - 75 %	10
	75 - 100 %	15
	100 %	20
	100 - 125 %	15
	125 - 150 %	7
	150 - 200 %	3
	> 200 %	0
2. Knorpelschnittstelle	komplett	10
	abgrenzbare Umrahmung	8
	Defekt sichtbar < 50 %	3
	Defekt sichtbar > 50 %	0
3. Knochenschnittstelle	intakt	10
	unvollständigen Schichtspaltung	5
	vollständige Schichtspaltung oder periostale Lasche	0
4. Oberflächenstruktur	intakt	10
	Beschädigung < 50 %	5
	Beschädigung > 50 %	0
5. Struktur	homogen	10
	inhomogen	5
	gespaltene Anteile	2
	kein Reparaturgewebe	0
6. Signalintensität	normal (identisch mit anschließendem Knorpel)	10
	fast normal (kleines Areal mit Signalsteigerung)	5
	abnormal (großes Areal mit Signalsteigerung)	0
7. Knorpelosteophyten	keine	5
	< 50 % der Knorpeldicke	3
	> 50 % der Knorpeldicke	0
8. Vollständigkeit der subchondralen Knochenplatte	> 75 %	10
	50 - 75 %	8
	25 - 50 %	5
	0 - 25 %	3
	0 %	0
9. Subartikuläre Spongiosa	intakt	10
	Granulationsgewebe	8
	Sklerose	8

## Methoden

	Zyste	5
	Granulationsgewebe und Sklerose	5
	Granulationsgewebe und Zyste	2
	Sklerose und Zyste	2
	Granulationsgewebe, Sklerose und Zyste	0
10. Adhäsion	nein	3
	ja	0
11. Erguss	nein	2
	ja	0

### 6.4.4 Histologische Evaluierung

#### 6.4.4.1 Entkalkung und Aufbewahrung

Postoperativ wurden die Proben bei -74 °C zur Fixierung eingefroren und jeweils nur für die Messungen im Mirko-CT sowie im MRT bei Raumtemperatur gelagert. Nach 12 Monaten wurden die Proben für 24 h in 4%iges Formaldehyd gelegt, danach in 70%igen Alkohol und 2,5 ml/l 100%ige Essigsäure überführt. Die Proben wurden in einer Entkalkungslösung bestehend aus 90%iger Ameisensäure, Natriumcitrat und H<sub>2</sub>O entkalkt. Dabei wurden die Proben jeden Tag bewegt und alle 3 Wochen wurde die Entkalkungslösung gewechselt. Anschließend wurden die Proben erneut in 70%igen Alkohol mit 2,5 ml/l 100%iger Essigsäure überführt.

#### 6.4.4.2 Einbetten der Proben und Schneiden mit Rotationsmikrotom

Die Defektareale wurden aus den Trochlen quadratisch mit einem Sicherheitsabstand von 3 mm herausgeschnitten und danach in der Mitte des Defekts geteilt, wodurch beim Schneiden mit dem Rotationsmikrotom die Defektareale direkt sichtbar wurden. Die entkalkten Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe, 1 h in 70%igem Alkohol, 1 h in 80%igem Alkohol, 2 h in 95%igem Alkohol, 2 h 100%igem Alkohol, mit Wechsel nach einer Stunde, gewaschen. Danach wurden die Proben zweimal eine halbe Stunde in Xylol gelagert, anschließend in ein 1:1 Xylol-Paraffin-Gemisch überführt und im Wärmeschrank bei 62 °C (Wärmeschrank) inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Xylol-Paraffin-Gemisch durch reines Paraffin ersetzt und die Proben wurden über Nacht in einen Wärmeschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurde das Paraffin im Abstand von 1 h zweimal gewechselt. Daraufhin wurden die Proben mit dem Defekt nach unten in Metallkassetten eingebettet und danach bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert um am nächsten Tag eine bessere Schneidbarkeit mit dem Rotationsmikrotom (Leica, Nussloch, Deutschland) zu erreichen. Die Proben wurden nach dem Anschnitt für 30 min mit den Defektarealen nach unten auf eine in Entkalkungslösung getränkte Kompresse

gelegt um eine bessere Schneidbarkeit zu erreichen. Anschließend wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden maximal 2 min in ein 36 °C warmes Wasserbad (Leica, Nussloch, Deutschland) zur Entfaltung gelegt und von dort auf die Objektträger überführt. Diese wurden zur Fixierung auf eine Wärmeplatte gelegt. Über Nacht erfolgte eine Wärmefixierung bei 62 °C im Wärmeschrank. Pro Defektareal wurden 20 Objektträger, davon 10 beschichtet mit 2,5%igem Albumin und 10 mit SuperFrost®, vorbereitet. Auf diesen wurden je 2 Schnitte fixiert, so dass insgesamt 320 Objektträger mit 640 Schnitten hergestellt wurden.

#### **6.4.4.3 Safranin-O/Echtgrün-Färbung**

Die Proben wurden zuerst 10 min in Xylol entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe, 5 min in 100%igem Alkohol, 5 min in 95%igem Alkohol und abschließend 2,5 min in 80%igem Alkohol, hydriert. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger 10 min in Hämatoxylin nach Weigert gefärbt, anschließend drei Mal in Leitungswasser getaucht und 5 min in Echtgrün-Lösung gefärbt. Um die Oberfläche aufzurauen wurden die Proben dreimal in Essigsäure getaucht, damit anschließend das Safranin-Orange besser bindet. Um eine optimale Färbung des hyalinen Knorpels zu erreichen, wurde ein Probeschnitt ohne Defekt jeweils mit 1%igem, 1,5%igem, 2%igem und 2,5%igem Safranin-Orange gefärbt. Die dem Original getreueste Anfärbbarkeit ergab sich mit 1,5%igem Safranin-Orange, welches dann durchgehend standardisiert wurde. Nach kurzem Eintauchen in Leitungswasser zum Abwaschen der überschüssigen Farbe auf dem Objektträger wurden die Proben 1 min in 80%igem, 2 min in 95%igem und 2 min in 100%igem Alkohol dehydriert und schließlich erneut 10 min in Xylol getaucht. Mithilfe des Roti-Histo-Kitts II wurden die Proben eingedeckt und über Nacht getrocknet. Die Zellkerne und Chromosomen erscheinen aufgrund ihrer Basophilie schwarz-violett. Im Gegensatz dazu imponieren azidophile Strukturen, wie das Zytoplasma, Kollagene und Kernmembranen, grün. Proteoglykane färben sich orange-rot an.

#### **6.4.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Deparaffinierung und Hydratation erfolgte wie in 6.5.4.3. beschrieben. Anschließend wurden die Proben 10 min in Hämatoxylin nach Harris gefärbt und danach dreimal in Leitungswasser eingetaucht. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger 10 s in HCl getaucht und anschließend in 60 °C warmem Wasser 4 min lang inkubiert. Daraufhin wurden die Proben erneut 2,5 min in Hämatoxylin nach Harris gefärbt und wiederum dreimal in Leitungswasser getaucht. Es folgte eine 30 s Inkubation in Eosin und anschließend wurden die Proben 10 s mit Leitungswasser gespült. Danach schloss sich die Dehydrierung durch 2,5 min in 80%igem Alkohol, 5 min in 95%igem Alkohol und 5 min in 100%igem Alkohol an. Schließlich wurden die Proben 10 min in Xylol getaucht,

mit Hilfe des Roti-Histo-Kitts II eingedeckt und über Nacht getrocknet. Die Zellkerne und DNS färben sich aufgrund ihrer basophilen Eigenschaften blau-violett an. Azidophile Strukturen hingegen werden durch den synthetischen Farbstoff Eosin rot/orange gefärbt. Beispiele hierfür sind Proteine des Zytosplasmas und des Bindegewebes.

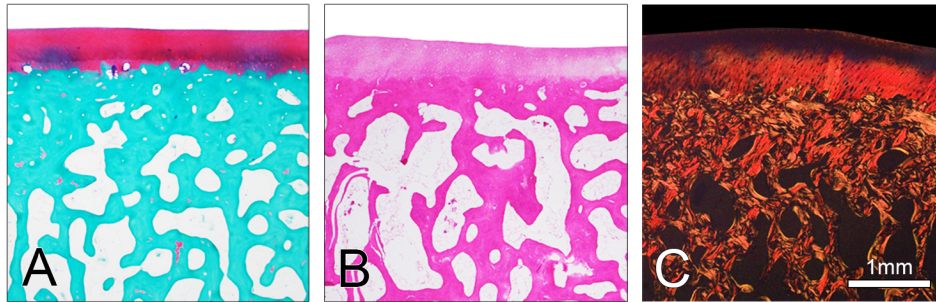


Abbildung 7: Repräsentative Histologie der porcinen Trochlea ohne Defekt; A: Safranin-O/Echtgrün-Färbung, B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; C: Polarisationsmikroskopie.

### 6.4.4.5 Evaluierung der Defektareal nach Sellers *et al.*, Fortier *et al.* und Wakitani *et al.*

In der Safranin-O/Echtgrün-Färbung sowie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ließen sich die Knorpel und Knochenareale besonders gut beurteilen. Die Evaluierung erfolgte verblindet anhand 3 etablierter Bewertungssysteme. Im komplexen inversen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* (Sellers *et al.*, 1997) bedeutet die maximale Punktzahl von 31 keine Defektheilung, wohingegen 0 Punkte eine vollständige Heilung hinweisen. Eine weitere Auswertung erfolgte anhand des Bewertungssystems nach Fortier *et al.* (Fortier *et al.*, 2002). Hier zeigt eine hohe Punktzahl von 20 keine Defektheilung, 0 Punkte hingegen zeigen ein komplettes Ausheilen des Defektes an. Des Weiteren wurde das Bewertungssystem nach Wakitani *et al.* (Wakitani *et al.*, 1994) verwendet, wobei der letzte Punkt „Integration des Spendergewebes“ als Integration des Reparaturgewebes gewertet wurde. Eine vollständige Reparatur des Knorpels entspricht der Punktzahl 0, eine fehlende Reparatur wird mit 14 Punkten beschrieben. Insgesamt wurden 160 Schnitte, mindestens 8 pro Defekt, jeweils in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung, betrachtet. In der Polarisationsmikroskopie konnten zusätzlich die Kollagenfasern betrachtet werden (Orth *et al.*, 2011a).

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/Echtgrün	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 und 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 und 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. Höhe des subchondralen Knochens unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	91 - 110 %	0
	76 - 90 % oder 111 - 125 %	1
	51 - 75 % oder 126 - 150 %	2
	26 - 50 % oder 151 - 175 %	3
	< 25 % oder > 175 %	4

## Methoden

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 in den angrenzenden 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/Echtgrün im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	normal	0
	< 25 % vermindert	1
	> 25 % vermindert	2

Tabelle 10: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Wakitani *et al.*

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Zellmorphologie	hyaliner Knorpel	0
	überwiegend hyaliner Knorpel	1
	überwiegend Faserknorpel	2
	überwiegend kein Knorpel	3
	kein Knorpel	4
2. Matrixanfärbbarkeit	normal im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	0
	etwas vermindert	1
	deutlich vermindert	2
	keine Anfärbbarkeit	3
3. Oberflächenregelmäßigkeit	weich ( $> 3/4$ )	0
	moderat ( $> 1/2 - 3/4$ )	1
	irregulär ( $1/4 - 1/2$ )	2
	stark unregelmäßig ( $< 1/4$ )	3
4. Dicke des Knorpels	$> 2/3$	0
	$1/3 - 2/3$	1
	$< 1/3$	2
5. Integration des Spenderknorpels	beide Enden integriert	0
	ein Ende integriert	1
	kein Ende integriert	2

#### 6.4.5 Evaluierung der Zellularität

Um die Zellularität der Defekte zu evaluieren, wurden diese in eine obere und eine untere Zone eingeteilt. Die Defekte wurden über die Defektausdehnung in sechs Gesichtsfelder eingeteilt. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die verschiedenen Gesichtsfelder einmal pro Defekt auf einem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt ausgezählt (Asen *et al.*, 2018). Die Evaluierung der Zellularität im angrenzenden Gewebe erfolgte wie oben beschrieben, allerdings wurde das Gesichtsfeld nicht in zwei Zonen unterteilt.



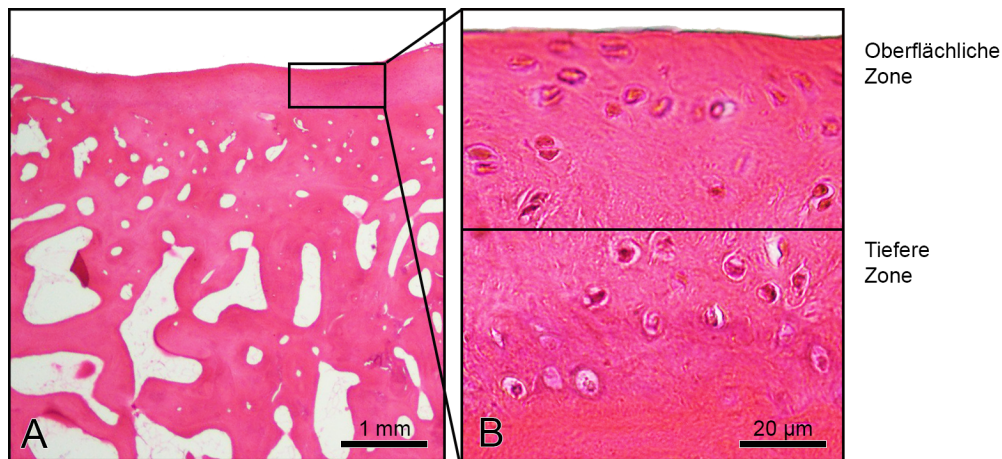


Abbildung 8: Repräsentative histologische Schnitte zur Begutachtung der Zellularität; Darstellung eines Gesichtsfelds in 40-facher Vergrößerung in Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

#### 6.4.6 Evaluierung der Ausrichtung der kollagenen Fasern

Von jedem Defektareal wurde ein Polarisationsmikroskopiebild in eine obere und untere Zone unterteilt. Diese wurden jeweils mit Photoshop CS6 (Adobe, San José, CA, USA) ausgeschnitten und in ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) eingefügt. Dort wurde mit der Zusatzversion OrientationJ Distribution (NIH, Bethesda, MD, USA) die Ausrichtung der Kollagenfasern durch Diagramme ermittelt.

#### 6.4.7 Immunhistologische Evaluierung

##### 6.4.7.1 Immunhistologische Typ-I-Kollagen-Färbung

Von jeder Probe wurde ein Objektträger mit zwei Schnitten zuerst 10 min in Xylol deparaffiniert und anschließend jeweils 2 min in 100%igem, 95%igem, und 80%igem Alkohol hydriert. Danach wurden die Proben 2 min in Leitungswasser getaucht und bei Raumtemperatur in einer 0,3%igen  $H_2O_2$ -Lösung bestehend aus 0,6 ml  $H_2O_2$  und 200 ml Leitungswasser inkubiert. Darauf folgte eine 10-minütige Waschung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und die Proben wurden anschließend bei 37 °C im Wärmeschrank in eine 0,1%ige Trypsinlösung aus 200 µl 2,5%igem Trypsin und 200 ml PBS gestellt. Danach erfolgte abermals eine Waschung von 10 min in PBS. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in einem Blockierungspuffer, welcher sich aus 200 ml PBS und 6 ml 7,5%igem Bovines Serum Albumin (BSA) zusammensetzt. Während der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung, welche aus 1977,8 ml Blockierungspuffer und 22,2 µl des Anti-Typ-I-Kollagen-Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK) bestand, hergestellt. Um ein Auslaufen der Antikörperlösung zu vermeiden, wurden die Schnitte jeweils mit einem Fettstift (Roth, Karlsruhe, Deutschland) umkreist. Daraufhin wurde jeder Schnitt mit 100 µl der Antikörperlösung betropft. Die Objektträger wurden

anschließend in eine Nasskammer gelegt und über Nacht bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt.

Am nächsten Morgen wurden die Proben 15 min in PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die sekundäre Antikörperlösung bestehend aus 10 µl biotiniertem Anti-Mous-IgG Ziege (Vector, Burlingame, CA, USA) und 1990 µl PBS hergestellt. Es wurde jeweils 100 µl der Antikörperlösung auf die Schnitte aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Nasskammer inkubiert. 15 min vor Ablauf der Stunde wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz (ABC-Reagenz) aus 5 ml PBS, einem Tropfen Lösung A und einem Tropfen Lösung B hergestellt. Auf die Inkubation mit Antikörperlösung folgte eine 15-minütige Waschung in PBS, anschließend wurden jeweils 100 µl des ABC-Reagenz auf die Schnitte aufgetragen und die Objektträger wurden für 30 min bei Raumtemperatur in die Nasskammer gelegt. Darauf folgte eine 15-minütige Waschung in PBS. In den letzten Minuten der Waschung wurde die 3-3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung) aus 5 ml destilliertem H<sub>2</sub>O, zwei Tropfen Puffer, vier Tropfen DAB und zwei Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter stetigem Schütteln hergestellt. Anschließend wurden je 100 µl der DAB-Lösung auf die Probe gegeben und in einer Nasskammer für 7 min inkubiert. Daraufhin wurden die Proben 15 min in PBS und anschließend 1 min in Leitungswasser gewaschen. Es folgte jeweils für 2 min die umgekehrte Alkoholreihe, zuerst 80%ig, dann 95%ig und schließlich 100%ig. Zuletzt wurden die Proben für 10 min in Xylol getaucht und mit dem Roti-Histo-Kitt II eingedeckt.

#### **6.4.7.2 Immunhistologische Typ-II-Kollagen-Färbung**

Die Deparaffinierung und Vorbereitung der Proben erfolgte wie in 6.5.5.1. Während der Inkubation mit dem Blockierungspuffer erfolgte die Herstellung der Antikörperlösung in einem Verhältnis von 1:90, sprich 44,4 µl Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörper (Acris Antibodies, Herford, Deutschland) und 1956,6 µl Blockierungspuffer. Von dieser wurden je 100 µl Antikörperlösung, nach Umfahren der Proben mit dem Fettstift, auf die Schnitte pipettiert. Die darauffolgenden Schritte entsprechen 6.5.5.1.

#### **6.4.7.3 Immunhistologische Typ-X-Kollagen-Färbung**

Die Deparaffinierung und Vorbereitung der Proben wurde wie in 6.5.5.1 beschrieben durchgeführt. Während der Inkubation mit Blockierungspuffer erfolgte die Herstellung der Antikörperlösung in einem Verhältnis von 1:1000, sprich 2 µl Anti-Typ-X-Kollagen-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) und 1998 µl Blockierungspuffer. Je 100 µl Antikörperlösung wurden, nach Umfahren der Präparate mit dem Fettstift, auf die Schnitte pipettiert. Die darauffolgenden Schritte entsprechen 6.5.5.1.

#### **6.4.7.4 Immunhistologische Anti-IGF-I-Färbung**

Die Schritte bis zur Antikörperherstellung entsprechen 6.5.5.1. Die Antikörperlösung setzte sich aus 100 µl Anti-IGF-I-Antikörper (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) und 1900 µl Blockierungspuffer zusammen. Nachdem die einzelnen Schnitte mit dem Fettstift umfahren wurden, wurden 100 µl pro Schnitt aufgetragen. Die Objektträger wurden in eine Nasskammer gelegt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 15-minütige Waschung in PBS, währenddessen wurde der sekundäre Antikörper aus 10 µl biotiniliertem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Vector, Burlingame, CA, USA) und 1990 µl PBS hergestellt. Es wurden auf jeden Schnitt 100 µl sekundäre Antikörperlösung pipettiert. Die darauffolgenden Schritte entsprechen den Schritten in 6.4.6.1.

#### **6.4.7.5 Immunhistologische Anti-Aggregan-Färbung**

Bis zur Antikörperherstellung wurden die Schritte wie in 6.5.5.1. durchgeführt. Die Antikörperlösung enthielt 200 µl Anti-Aggregan Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) und 1800 µl Blockierungspuffer. Nach Umfahren der einzelnen histologischen Schnitte mit Fettstift wurden 100 µl Antikörperlösung pro Schnitt aufgetragen. Die Objektträger wurden in eine Nasskammer gelegt und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 15-minütige Waschung in PBS, gleichzeitig wurde die sekundäre Antikörperlösung aus 10 µl biotiniliertem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Vector, Burlingame, CA, USA) und 1990 µl PBS hergestellt. Pro Schnitt wurden 100 µl sekundäre Antikörperlösung mit der Pipette appliziert. Die darauffolgenden Schritte entsprechen den Schritten in 6.4.6.1

#### **6.4.7.6 Evaluierung der immunhistologischen Typ-I-Kollagen-Färbung**

Um die Immunreaktivität des Typ-I-Kollagens zu beurteilen, wurde die subchondrale Knochenplatte als Positivkorrelat und der anliegende hyaline Knorpel als Negativkorrelat verwendet. Das Defektareal wurde in eine untere und obere Zone gegliedert. Die Braunfärbung wurde, wie in Tabelle 11 beschrieben, durch ein semiquantitatives Bewertungssystem evaluiert (Orth, 2008). Pro Defekt wurden je zwei Schnitte in 20- und 40-facher Vergrößerung verblindet betrachtet.

*Tabelle 11: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.*

Intensität der Braunfärbung durch Immunreaktion im Vergleich zum Positivkorrelat	Punkte
keine Immunreaktion	0
signifikant reduzierte Immunreaktion	1
Moderat reduzierte Immunreaktion	2
gleiche Immunreaktion	3
höhere Immunreaktion	4

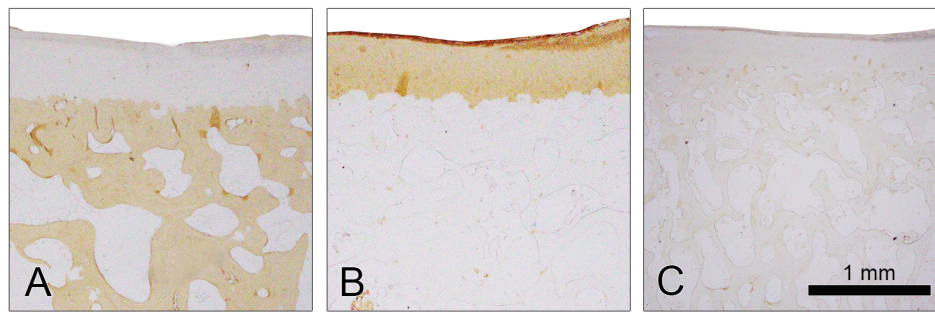


Abbildung 9: Repräsentative immunhistologische Schnitte der porcinen Trochlea ohne Defekt; A: Typ-I-Kollagen, B: Typ-II-Kollagen, C: Anti-IGF-I.

#### **6.4.7.7 Evaluierung der immunhistologischen Typ-II-Kollagen-Färbung**

Zur Beurteilung der Immunreaktivität des Typ-II-Kollagens wurde die subchondrale Knochenplatte als Negativkorrelat betrachtet und der angrenzende hyaline Knorpel als Positivkorrelat. Das Reparaturgewebe wurde in eine obere und untere Zone unterteilt. Danach wurde wie bei Typ-I-Kollagen (6.4.5.4) die Braunfärbung der jeweiligen Zone mit einem semiquantitativen Bewertungssystem evaluiert (Orth, 2008). Es wurden pro Knorpeldefekt zwei Schnitte verblindet in 20- und 40-facher Vergrößerung evaluiert.

#### **6.4.7.8 Evaluierung der immunhistologischen Typ-X-Kollagen-Färbung**

In jedem der 16 Defekte wurde in 2 repräsentativen Gesichtsfeldern die Anzahl der braun gefärbten und nicht angefärbten Zellen bestimmt und daraus ein Prozentsatz berechnet. Dies erfolgte in 40-facher Vergrößerung.

#### **6.4.7.9 Evaluierung der immunhistologischen Anti-IGF-I-Färbung**

Ähnlich wie bei Typ-I Kollagen beschrieben (6.4.5.4.), wurde jedes Defektareal in 2 Zonen, untere und obere Zone, unterteilt. Pro Defekt wurden zwei Schnitte in 20- und 40-facher Vergrößerung nach einem semiquantitativen Bewertungssystem (Orth, 2008) evaluiert. Jedoch wurde die Immunreaktivität durch den Vergleich der Braunfärbung im Defektgewebe und im angrenzenden Knorpel evaluiert. Um eine genauere Betrachtung vornehmen zu können, wurden zusätzlich alle braungefärbten Zellen in 40-facher Vergrößerung gezählt. Dabei wurde je ein Gesichtsfeld an der lateralen und medialen Übergangszone sowie in der Mitte des Defekts ausgewertet.

#### **6.4.7.10 Evaluierung der immunhistologischen Anti-Aggregan-Färbung**

Wie in 6.4.5. beschrieben, wurden die Defektareale in eine obere und untere Zone aufgeteilt. Es wurden pro Defekt 2 Schnitte in 20- und 40-facher Vergrößerung mit einem semiquantitativen Bewertungssystem bewertet (Orth, 2008). Als Vergleich für die Intensität der Braunfärbung diente der angrenzende Knorpel.

## **6.5 Evaluierung des angrenzenden Gewebes**

### **6.5.1 Histologische Evaluierung der Arthrosebildung**

Zur Beurteilung der Arthrosebildung wurden insgesamt 96 histologische Schnitte in Safranin-O/Echtgrün-Färbung in 10-facher, 20-facher und 40-facher Vergrößerung betrachtet. Beurteilt wurden dabei jeweils die laterale und medial an den Defekt angrenzenden Knorpelareale. Zur systematischen Bewertung wurde das etablierte Bewertungssystem für Arthrose nach Little *et al.* (Little *et al.*, 2010) verwendet. Hierbei bedeutet die Maximalpunktzahl von 25 Punkten schwerwiegende Arthrose, wohingegen 0 Punkte keine arthrotischen Veränderungen bedeuten (Tabelle 12). Die lateral und medial erhobenen Daten wurden im Anschluss gemittelt.

Tabelle 12: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung von Arthrose.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Struktur des Knorpels	normal	0
	leichte Oberflächenunregelmäßigkeiten (Oberfläche kaum unterbrochen)	1
	mäßige Oberflächenunregelmäßigkeiten (Oberfläche angeraut)	2
	massive Oberflächenunregelmäßigkeiten (Unterbrechungen, Rissen/Fibrillationen < 10 % Tiefe)	3
	Fissuren bis zur Übergangszone (1/3 Tiefe)	4
	Fissuren bis zur Radiärzone (2/3 Tiefe)	5
	Fissuren bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	6
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	7
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	8
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	9
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zum subchondralen Knochen	10
2. Chondrozytendichte	normal	0
	erhöht oder leicht erniedrigt	1
	mäßig erniedrigt	2
	massiv erniedrigt	3
	keine Zellen	4
3. Zellklone	normal	0
	einzelne Duplets	1
	viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	vielfache Zellnester oder keine Zellen im Bereich	4
4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung	normal	0
	verringerte Anfärbbarkeit bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
	verringerte Anfärbbarkeit bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
	verringerte Anfärbbarkeit bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	3
	keine Anfärbbarkeit	4
5. <i>Tidemark</i> / kalzifizierter Knorpel/ subchondraler Knochen	intakte subchondrale Knochenplatte und einzelne <i>Tidemark</i>	0
	intakte subchondrale Knochenplatte und verdoppelte <i>Tidemark</i>	1
	Blutgefäße durchbrechen subchondrale Knochenplatte bis zum kalzifizierten Knorpel	2
	Blutgefäße durchbrechen <i>Tidemark</i>	3

### **6.5.2 Immunhistologische Evaluierung der IGF-I-Immunaktivität**

Um auch parakrine Effekte durch rAAV-IGF-I sehen zu können, wurden medial und lateral der Defektareale die braungefärbten Zellen gezählt. Pro Defektareal wurden zwei histologische Schnitte in 40-facher Vergrößerung betrachtet und je ein Gesichtsfeld medial und lateral ausgezählt.

## **6.6 Statistische Analyse**

Die vergleichende Auswertung zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde mit SPSS Version 23.0 (SPSS, Inc/IBM, Chicago, IL, USA) und Stata Stata (StataCorp LCC, College Station, TX, USA) durchgeführt. Es galt die alpha-Fehlerakkumulierung zu vermeiden, da es sich um unverbundene Stichproben mit Mehrfachvergleich handelte. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, dass eine Normalverteilung vorlag, weshalb danach eine allgemeine Schätzungsanalyse (general estimating equation, GEE) durchgeführt wurde. Diese wurde ebenfalls angewendet, da sie berücksichtigt, dass in verschiedenen Methoden mehrere Daten pro Defekt erhoben wurden. Lag pro Defekt nur ein Wert vor, wie zum Beispiel bei der Mikro-CT-Auswertung, wurde ein T-Test durchgeführt.  $P$ -Werte  $< 0,05$  (5 %) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Auch hier wurde ein  $P$ -Wert von  $< 0,05$  (5 %) als statistisch signifikant gewertet (Goebel *et al.*, 2014).

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Immunhistologische Auswertung der IGF-I Überexpression

Die Defektareale wurden in obere und untere Zonen unterteilt. Die Bewertung jeder Zone erfolgte anhand eines semiquantitativen Bewertungssystems. Es ließ sich eine Tendenz zur vermehrten Anfärbung durch IGF-I/AlgPH155 erkennen. Dabei ergab sich in der unteren Zone eine signifikant ( $P = 0,041$ ) vermehrte Immunaktivität durch IGF-I/AlgPh155 im Vergleich zu *lacZ*/AlgPH155. In den beiden anderen Zonen zeigte sich jeweils eine Tendenz hin zur vermehrten Anfärbbarkeit. Um die Immunaktivität genauer beurteilen zu können wurden zusätzlich die braun angefärbten Zellen an verschiedenen repräsentativen Stellen des Reparaturgewebes gezählt, wobei keine signifikanten Unterschiede vorlagen.

Tabelle 13: Ergebnisse der Anzahl an gefärbten Zellen und des semiquantitativen Bewertungssystems für IGF-I; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	<i>lacZ</i> /AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
angefärbte Zellen lateral	13,13 $\pm$ 8,54	19,50 $\pm$ 13,34	0,274
angefärbte Zellen medial	14,13 $\pm$ 6,83	20,00 $\pm$ 15,95	0,354
angefärbte Zellen mittig	12,00 $\pm$ 8,43	12,50 $\pm$ 8,82	0,909
angefärbte Zellen gesamt	39,25 $\pm$ 18,50	52,00 $\pm$ 33,86	0,366
Immunaktivität obere Zone	3,63 $\pm$ 0,52	3,75 $\pm$ 0,46	0,619
Immunaktivität untere Zone	3,13 $\pm$ 0,35	3,63 $\pm$ 0,52	<b>0,041</b>
Immunaktivität gesamt	3,50 $\pm$ 0,53	3,63 $\pm$ 0,52	0,642



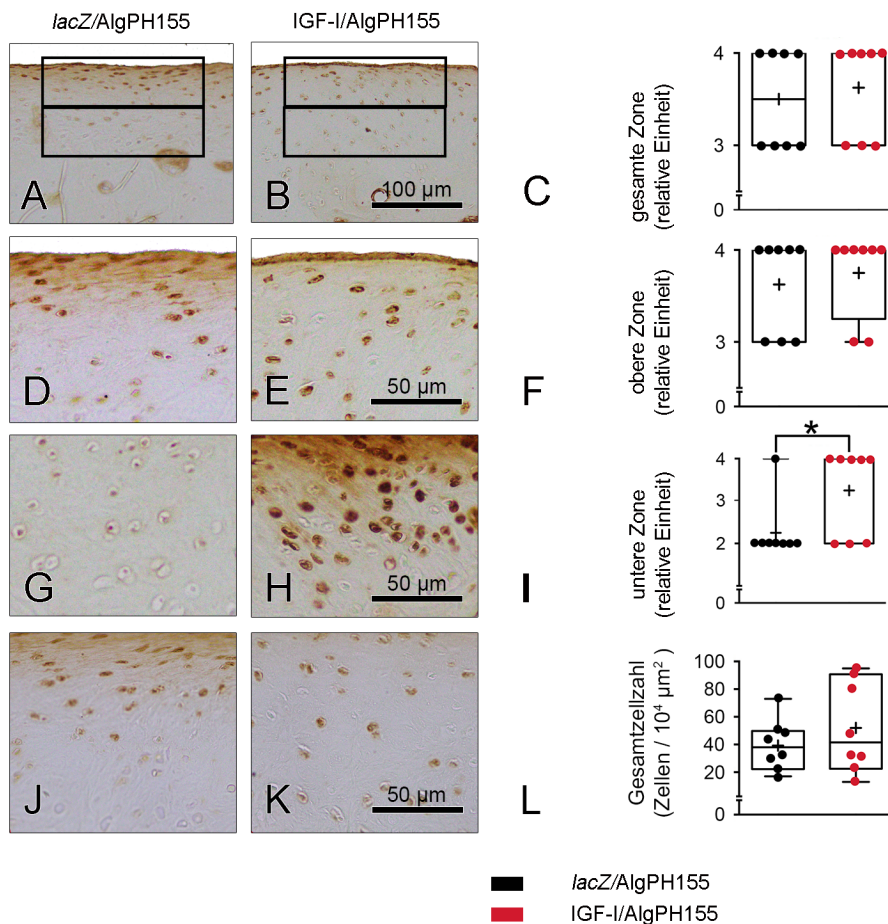


Abbildung 10: Repräsentative immunhistologisch gefärbte Schnitte für IGF-I ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+); \*:  $P < 0,05$ .

## 7.2 Mikro-computertomographische Auswertung des Defektgewebes

### 7.2.1 Analyse der Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte

Die Analyse der subchondralen Knochenplatte zeigte beim Vergleich der Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Bereich der BMD ließ sich eine Tendenz zu einem positiven Effekt des IGF-I/AlgPh155 auf die Heilung der osteochondralen Einheit erkennen.

Tabelle 14: Ergebnisse der CT-Analyse der subchondralen Knochenplatte im Defektbereich; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	658,28 $\pm$ 60,76	690,25 $\pm$ 58,67	0,302
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	10,12 $\pm$ 1,09	10,50 $\pm$ 2,03	0,658
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	9,34 $\pm$ 0,69	9,77 $\pm$ 1,47	0,462
Po(cl), %	0,46 $\pm$ 0,36	0,31 $\pm$ 0,22	0,326
Po(op), %	6,93 $\pm$ 6,14	5,69 $\pm$ 4,19	0,717
Po(to), %	7,37 $\pm$ 6,05	6,25 $\pm$ 4,27	0,675
PBV, %	92,63 $\pm$ 6,05	93,75 $\pm$ 4,27	0,675
Tb.Th, mm	0,31 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,04	0,586

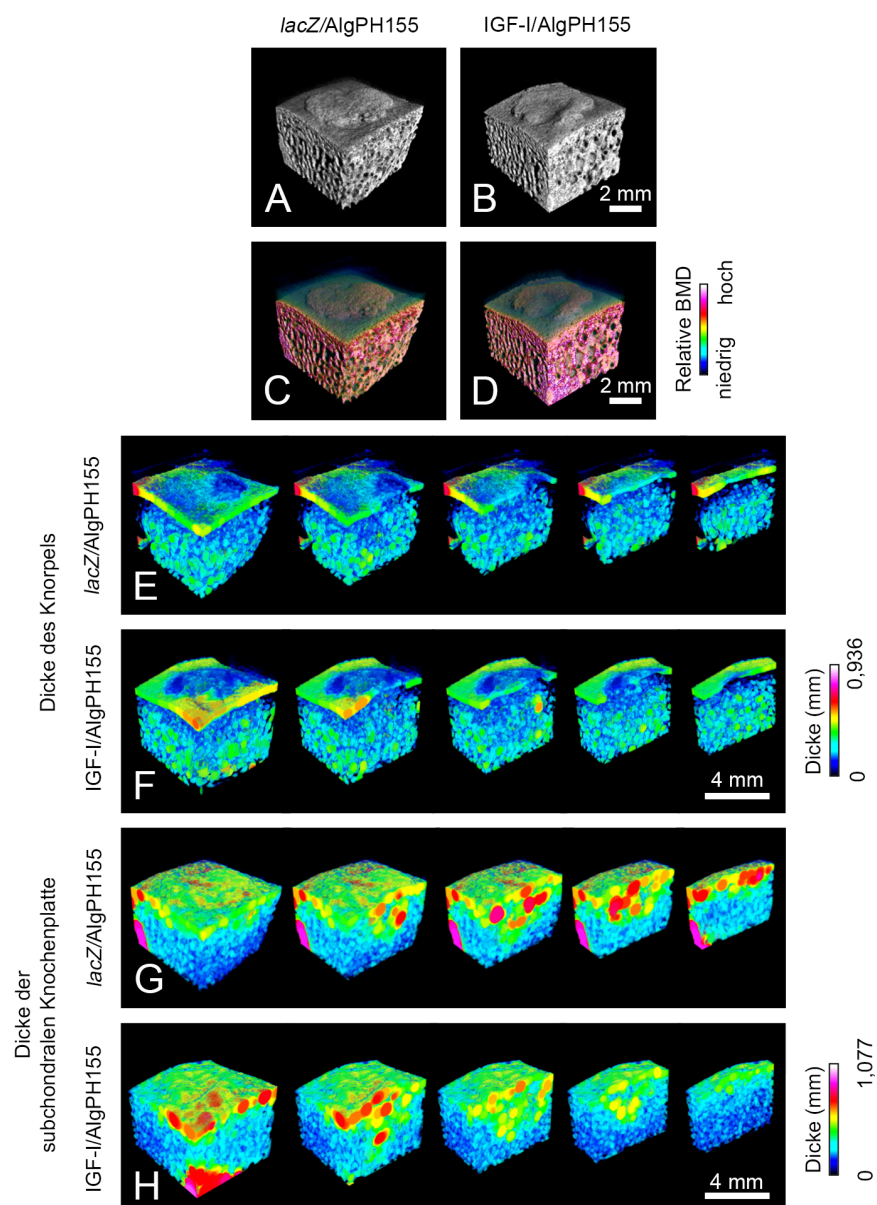


Abbildung 11: Repräsentative Micro-CT-Scans und farbkodierte 3D Rekonstruktion der Defektareale ein Jahr postoperativ; lacZ/AlgPH155 (A, C, E, G), IGF-I/AlgPh155 (B, D, F, H); Übersichtsbild (A, B), farbkodierte BMD (C, D), farbkodierte Dicke des Knorpels (E, F), farbkodierte Dicke der subchondralen Knochenplatte (G, H).

### 7.2.2 Analyse der Mikrostruktur der subartikulären Spongiosa

Die beiden Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant. Wie bei der subchondralen Knochenplatte wurde ebenfalls eine nichtsignifikante Tendenz zur stärkeren BMD durch die Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 festgestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse der CT-Analyse der subartikulären Spongiosa im Defektbereich; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	<i>lacZ</i> /AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	658,17 $\pm$ 36,81	676,00 $\pm$ 50,92	0,436
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	14,16 $\pm$ 3,17	12,92 $\pm$ 3,14	0,442
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	9,04 $\pm$ 1,14	8,51 $\pm$ 3,10	0,350
Conn.Dn.	83,86 $\pm$ 34,91	72,17 $\pm$ 23,51	0,444
DA	1,31 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,06	0,977
FD	2,51 $\pm$ 0,05	2,51 $\pm$ 0,05	0,947
PBV, %	65,38 $\pm$ 8,69	68,38 $\pm$ 11,28	0,581
SMI	0,40 $\pm$ 1,04	-0,21 $\pm$ 1,05	0,389
Tb.Sp, mm	0,17 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,04	0,943
Tb.N, 1/mm	2,62 $\pm$ 0,20	2,54 $\pm$ 0,19	0,424
Tb.Pf, 1/mm	-6,49 $\pm$ 3,24	-7,78 $\pm$ 4,40	0,515
Tb.Th, mm	0,25 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,06	0,492

### 7.2.3 Analyse der Mikrostruktur des Knorpels

Die Analyse der Mikrostruktur des Knorpels ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen IGF-I/AlgPH155 und *lacZ*/AlgPH155, weder bei der Grundeinstellung mit Graustufenwahl von 89-255, noch bei den spezifisch für den Knorpel besser geeigneten Graustufen 30-89. Die Ergebnisse mit für den Knorpel spezifisch gewählten Graustufen zeigten eine Tendenz zu Unterschieden im Bereich der Knorpeloberflächendichte (BS/TV) zwischen den Behandlungsgruppen.

Tabelle 16: Ergebnisse der CT-Analyse des Knorpels im Defektbereich mit Graustufenwahl 89-255; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-II/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	522,11 $\pm$ 80,26	534,22 $\pm$ 105,47	0,800
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	36,88 $\pm$ 20,15	37,37 $\pm$ 22,41	0,963
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	7,17 $\pm$ 2,20	7,51 $\pm$ 2,25	0,765
Po(cl), %	0,05 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,07	0,900
Po(op), %	74,65 $\pm$ 15,41	70,18 $\pm$ 21,30	0,637
Po(to), %	74,67 $\pm$ 15,40	70,20 $\pm$ 21,27	0,637
PBV, %	32,45 $\pm$ 20,48	36,06 $\pm$ 20,48	0,716
Tb.Th, mm	0,15 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,09	0,692

Tabelle 17: Ergebnisse der CT-Analyse des Knorpels im Defektbereich mit Graustufenwahl 30-89; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-II/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	41,54 $\pm$ 31,82	61,95 $\pm$ 23,54	0,167
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	20,36 $\pm$ 9,76	16,09 $\pm$ 12,14	0,340
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	13,83 $\pm$ 3,09	11,36 $\pm$ 1,86	0,073
Po(cl), %	0,56 $\pm$ 0,25	0,52 $\pm$ 0,19	0,662
Po(op), %	31,49 $\pm$ 16,47	33,97 $\pm$ 20,14	0,791
Po(to), %	36,42 $\pm$ 12,18	35,45 $\pm$ 18,07	0,902
PBV, %	63,58 $\pm$ 12,14	64,55 $\pm$ 18,07	0,902
Tb.Th, mm	0,15 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,05	0,289

## 7.2.4 Auswertung der manuellen histomorphometrischen Messungen

Bei der manuellen Messungen an drei verschiedenen repräsentativen Stellen alle 50 Bilder wurde im Bereich der Defektausdehnung an der Oberfläche eine Tendenz zur geringeren Ausdehnung durch die Applikation durch IGF-II/AlgPh155 nachgewiesen. In den restlichen Parametern unterschieden sich die Defekte behandelt mit lacZ/AlgPH155 und IGF-II/AlgPh155 nur geringfügig voneinander.

Tabelle 18: Ergebnisse der manuellen histomorphometrischen Messung des Defekts im computer-tomographischen Bild; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-II/AlgPh155	P-Wert
Erhöhung der subchondralen Knochenplatte	-0,15 $\pm$ 0,09	-0,14 $\pm$ 0,13	0,755
Dicke des Knorpels	0,30 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,12	0,580
Dicke der subchondralen Knochenplatte	0,45 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,11	0,316
Weite des Defekts an der Oberfläche	3,19 $\pm$ 1,73	2,32 $\pm$ 1,11	0,289
Erhöhung des Knorpels	0,11 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,08	0,284

### 7.3 Makroskopische Auswertung des Defektgewebes

Im Bewertungssystem aus Oswestry war der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant. Zu sehen waren lediglich Tendenzen einer besseren Knorpelheilung in der Kategorie „Integration zum angrenzend Knorpel“ bei der Behandlung mit IGF-I/AlgPh155.

Nach der makroskopischen Evaluierung der Proben durch drei verblindete Betrachter, ließ sich im Bewertungssystem nach Goebel *et al.* in der Kategorie der „Oberflächenbeschaffenheit“ eine Tendenz zur besseren Defektheilung unter IGF-I/AlgPh155 erkennen. In allen Kategorien waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Tabelle 19: Ergebnisse des Bewertungssystems aus Oswestry, 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
1. Farbe	0,83 $\pm$ 0,69	0,58 $\pm$ 0,60	0,441
2. Oberflächenbeschaffenheit	1,13 $\pm$ 0,73	1,19 $\pm$ 0,49	0,523
3. Defektfüllung	0,88 $\pm$ 0,89	0,67 $\pm$ 0,81	0,425
4. Integration zum angrenzenden Knorpel	0,44 $\pm$ 0,64	0,50 $\pm$ 0,67	0,286
Gesamtpunktzahl	3,75 $\pm$ 1,91	3,38 $\pm$ 1,58	0,419

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

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
1. Farbe	1,38 $\pm$ 0,79	1,79 $\pm$ 0,81	0,245
2. Blutgefäße	0,79 $\pm$ 0,60	1,13 $\pm$ 0,79	0,475
3. Oberflächenbeschaffenheit	1,13 $\pm$ 0,66	1,08 $\pm$ 0,73	0,470
4. Defektfüllung	1,00 $\pm$ 0,94	1,38 $\pm$ 1,01	0,396
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	1,42 $\pm$ 0,89	1,79 $\pm$ 1,17	0,371
Gesamtpunktzahl	5,63 $\pm$ 2,62	7,08 $\pm$ 3,03	0,377

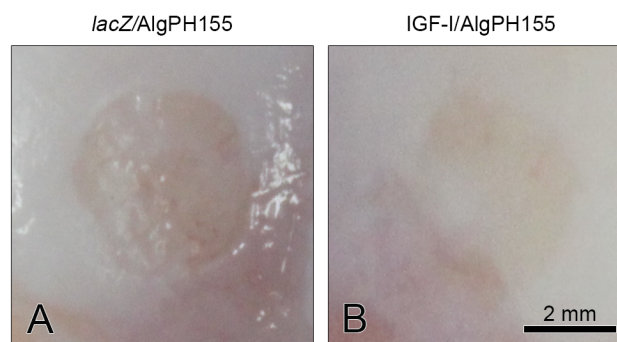


Abbildung 12: Repräsentative makroskopische Bilder der chondralen Defekte ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155.

## 7.4 Magnetresonanztomographische Auswertung des Defektgewebes

Die Betrachtung der MRT-Bilder durch drei verblindete Betrachter in koronarer und sagittaler Ebene ergab in den Kategorien „Vollständigkeit der subchondralen Knochenplatte (SCBP)“ und „subartikuläre Spongiosa“ eine Tendenz zur verbesserten Knorpelheilung durch IGF-II/AlgPH155 im Vergleich zu *lacZ*/AlgPH155. In der Gesamtpunktzahl des MOCART 3D waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Tabelle 21: Bewertungssystem MOCART 3D, 100 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	<i>lacZ</i> /AlgPH155	IGF-II/AlgPh155	P-Wert
1. Defektfüllung	14,83 $\pm$ 1,61	10,46 $\pm$ 4,76	0,743
2. Knorpelschnittstelle	4,04 $\pm$ 2,70	1,73 $\pm$ 1,59	0,859
3. Knochenschnittstelle	9,58 $\pm$ 1,18	9,58 $\pm$ 1,18	1,000
4. Surface	3,54 $\pm$ 1,65	2,50 $\pm$ 2,14	1,000
5. Struktur	4,40 $\pm$ 1,32	3,23 $\pm$ 2,13	0,694
6. Signalintensität	5,00 $\pm$ 1,18	5,73 $\pm$ 1,75	0,894
7. Knorpelosteophyten	0,94 $\pm$ 1,59	2,02 $\pm$ 1,73	0,424
8. Vollständigkeit der subchondralen Knochenplatte	10,00 $\pm$ 0,00	9,92 $\pm$ 0,24	0,334
9. Subartikuläre Spongiosa	8,25 $\pm$ 0,39	8,83 $\pm$ 0,36	0,497
10. Adhäsion	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	1,000
11. Erguss	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,000
Gesamtpunktzahl	65,58 $\pm$ 5,87	59,00 $\pm$ 12,21	0,723

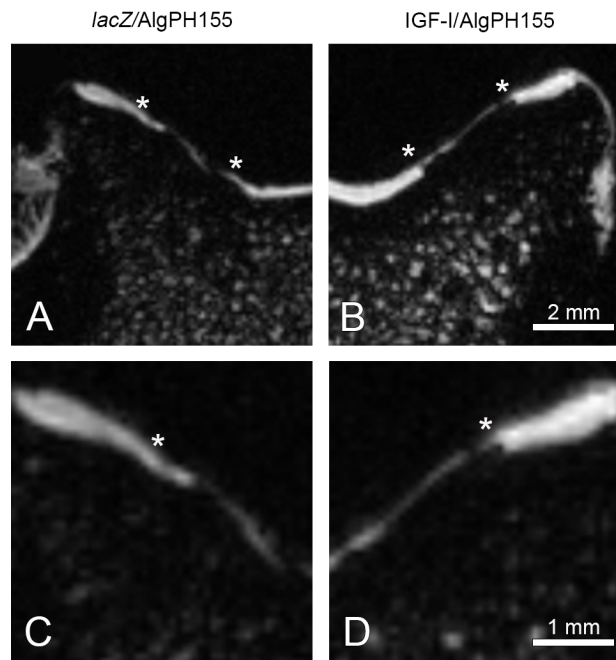


Abbildung 13: Repräsentative magnetresonanztomographische Bilder der Defektareale ein Jahr post-operativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155 und rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155.

## 7.5 Histologische Auswertung des Defektgewebes

### 7.5.1 Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Nach der Betrachtung von 160 histologischen Schnitten in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung zeigte sich im Bewertungssystem nach Sellers *et al.* in der Gesamtpunktzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ( $P = 0,0159$ ). Zudem ließen sich nach Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 in den Kategorien „Defektfüllung“ ( $P < 0,001$ ), „Zellmorphologie“ ( $P < 0,001$ ) und „Oberflächenarchitektur“ ( $P < 0,001$ ) signifikante Unterschiede im Vergleich zu mit lacZ/AlgPH155 behandelten Defekten feststellen. Die Kategorien Defektarchitektur ( $P = 0,008$ ) und subchondrale Knochenplatte ( $P = 0,019$ ) wiesen signifikant verbesserte Werte für die Applikation von lacZ/AlgPH155 auf.

Bei Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 war der Defekt meist über 75 % gefüllt, hingehend zu einer Tendenz eher über 110 % gefüllt zu sein. Nach Applikation von lacZ/AlgPH155 hingegen war der Defekt teilweise auch nur unter 75 % gefüllt. In der Kategorie der Matrixanfärbung unterschieden sich die beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant. In beiden Therapiegruppen waren die Zellen vorwiegend rund, allerdings waren sie durch die Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 vermehrt in Säulen angeordnet. Die Oberflächenarchitektur war bei mit IGF-I/AlgPh155 therapierten chondralen Defekten nahezu normal und wies teilweise leichte Fibrillationen auf, wohingegen die Kontrollgruppe mit

*lacZ*/AlgPH155 meist leichte Fibrillationen aufwies, die teilweise auch bis zu mittelmäßigen Fibrillationen an der Oberfläche tendierten. Ebenfalls war in der Behandlungsgruppe mit IGF-I/AlgPh155 teilweise eine *Tidemark* über geringe Strecken nachweisbar, was nach Applikation von *lacZ*/AlgPH155 nicht der Fall war.

Die mit *lacZ*/AlgPH155 behandelten Defekte hatten eine signifikant verbesserte Defektarchitektur, möglicherweise da bei 2 Tieren in der IGF-I/AlgPh155 Behandlungsgruppe große Risse in der Defektarchitektur vorlagen, obwohl die restlichen Tiere der Gruppe nur kleine Defekte aufwiesen. Zudem wurde im modifizierten Bewertungssystem nach Sellers *et al.* ein signifikant vermehrtes Vorkommen einer stärkeren Anhebung der subchondralen Knochenplatte durch eine Therapie mit IGF-I/AlgPh155 gesehen.

Tabelle 22: Ergebnisse des Bewertungssystems zur Knorpelreparatur nach Sellers *et al.*, 31 fehlende Knorpelreparatur, 0 vollständige Knorpelreparatur; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	<i>lacZ</i> /AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
1. Defektfüllung	1,57 $\pm$ 0,82	0,92 $\pm$ 0,24	<b>&lt; 0,001</b>
2. Integration	1,13 $\pm$ 0,13	1,22 $\pm$ 0,42	0,183
3. Matrixanfärbbarkeit	2,56 $\pm$ 0,61	2,50 $\pm$ 0,69	0,561
4. Zellmorphologie	1,85 $\pm$ 0,21	1,63 $\pm$ 0,46	<b>&lt; 0,001</b>
5. Defektarchitektur	1,03 $\pm$ 0,52	1,29 $\pm$ 1,06	<b>0,008</b>
6. Oberflächenarchitektur	1,12 $\pm$ 0,23	0,88 $\pm$ 0,23	<b>&lt; 0,001</b>
7. Neubildung des subchondralen Knochens	1,23 $\pm$ 1,16	1,44 $\pm$ 0,94	<b>0,019</b>
8. <i>Tidemark</i>	4,00 $\pm$ 0,00	3,96 $\pm$ 0,11	0,334
Gesamtpunktzahl	14,49 $\pm$ 2,73	13,84 $\pm$ 2,36	<b>0,015</b>



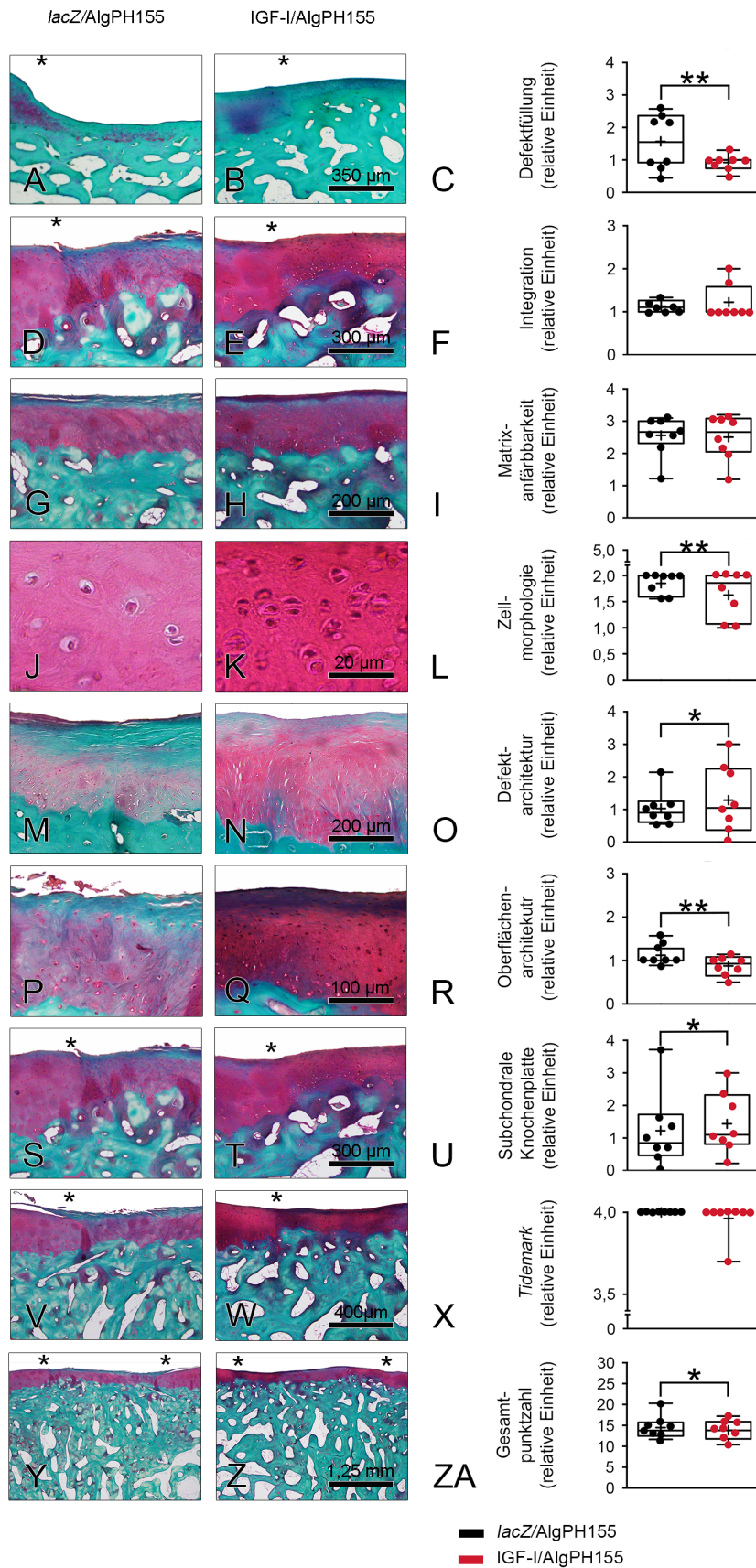


Abbildung 14: Repräsentative histologische Schnitte der Defektareale ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; in Safranin-O/Echtzeitgrün (A, B, D, E, G, H, M, N, P, Q S, T, V, W, Y, X), in Hämatoxylin-Eosin (J, K); \* kennzeichnen die Integrationszone; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+); \*: P < 0,05, \*\*: P < 0,001.

### 7.5.2 Bewertungssystem nach Fortier *et al.*

Nach verblindeter Evaluierung der histologischen Schnitte in 10-facher, 20-facher und 40-facher Vergrößerung war im Bewertungssystem nach Fortier *et al.* ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen in der Kategorie „Oberflächenarchitektur“ ( $P = 0,05$ ) auszumachen. Die Oberflächenarchitektur war nach der Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 signifikant glatter als mit *lacZ*/AlgPH155. Während die Zellen im Defektareal der Kontrollgruppe mit *lacZ*/AlgPH155 in der Tendenz eher zu 50-75 % eine normale Zellmorphologie auswiesen, war die Zellmorphologie in der Behandlungsgruppe mit IGF-I/AlgPh155 morphologisch eher zu 75 % denen hyalinen Knorpels ähnlich. In den Kategorien Zellularität und *Tidemark* sowie in der Gesamtpunktzahl fanden sich zwischen den Behandlungsgruppen keine Unterschiede.

Tabelle 23: Ergebnisse des Bewertungssystems zur Knorpelreparatur nach Fortier *et al.*, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur, 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	<i>lacZ</i> /AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
1. Defektfüllung	1,64 $\pm$ 0,71	0,87 $\pm$ 0,40	0,097
2. Integration	0,23 $\pm$ 0,23	0,25 $\pm$ 0,40	0,527
3. Oberflächenarchitektur	1,06 $\pm$ 0,23	0,74 $\pm$ 0,34	<b>0,021</b>
4. Zellmorphologie und Organisation	1,93 $\pm$ 0,18	1,61 $\pm$ 0,51	0,079
5. Zellularität	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	0,999
6. <i>Tidemark</i>	4,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	0,999
7. Matrixanfärbbarkeit	1,94 $\pm$ 0,14	1,86 $\pm$ 0,31	0,493
Gesamtpunktzahl	12,79 $\pm$ 0,90	11,32 $\pm$ 1,44	0,084

### 7.5.3 Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*

Die mikroskopische Begutachtung von jeweils 10 histologischen Schnitten pro Defektareal ergab im Bewertungssystem nach Wakitani *et al.* keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. In der Kategorie der Matrixanfärbbarkeit ließen sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erkennen. Im Bereich der Oberflächenregelmäßigkeit war eine Tendenz zur weichen Oberfläche bei der Behandlung mit IGF-I/AlgPh155 erkennbar, wohingegen bei einer Therapie mit *lacZ*/AlgPH155 eine moderate Oberflächenregelmäßigkeit vorlag.

## Ergebnisse

Tabelle 24: Ergebnisse des Bewertungssystems zur Knorpelreparatur nach Wakitani et al., 14 Punkte fehlende Knorpelreparatur, 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
1. Zellmorphologie	1,63 $\pm$ 0,33	1,92 $\pm$ 0,48	0,461
2. Matrixanfärbarkeit	1,72 $\pm$ 0,31	1,70 $\pm$ 0,37	0,679
3. Oberflächenregelmäßigkeit	1,01 $\pm$ 1,23	0,47 $\pm$ 0,46	0,327
4. Dicke des Knorpels	0,80 $\pm$ 0,64	1,09 $\pm$ 0,52	0,772
5. Integration des Spenderknorpels	0,26 $\pm$ 0,70	0,14 $\pm$ 0,38	0,190
Gesamtpunktzahl	5,42 $\pm$ 1,34	5,33 $\pm$ 1,45	0,927

### 7.5.4 Analyse der Kollagenfasern durch Polarisationsmikroskopie

Jedes Defektareal wurde in obere und untere Zonen aufgeteilt und ausgeschnitten. Die Analyse durch das Zusatzprogramm OrientationJ Distribution brachte keine signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hervor. Die Kollagenfasern waren in beiden Zonen überwiegend parallel zur Oberfläche angeordnet.

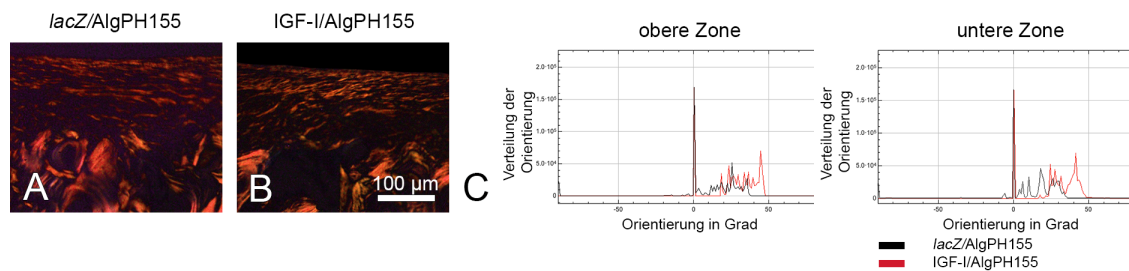


Abbildung 15: Repräsentative histologische Schnitte unter Polarisationsmikroskopie ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155, Diagramm zur Kollagenorientierung (C).

### 7.5.5 Bestimmung der Zellularität

Das Defektareal wurde auf den in Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitten in zwei Zonen, oberflächliche und tiefe Zone, unterteilt. Die Evaluierung der einzelnen Zonen in 40-facher Vergrößerung ergab keine signifikanten Unterschiede, allerdings ließ sich ein leichter Trend zu vermehrter Zellularität durch IGF-I/AlgPh155 erkennen.

Tabelle 25: Ergebnisse der Bestimmung der Zellularität im Defektareal in 40-facher Vergrößerung; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
Zellzahl oberflächliche Zone	145,88 $\pm$ 32,17	148,86 $\pm$ 33,46	0,577
Zellzahl tiefe Zone	123,00 $\pm$ 32,27	122,29 $\pm$ 38,60	0,737
Zellzahl gesamt	268,88 $\pm$ 61,50	271,14 $\pm$ 70,70	0,648

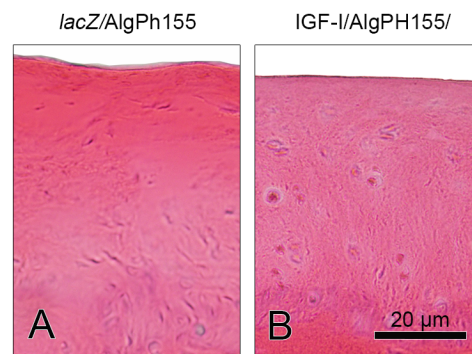


Abbildung 16: Repräsentative histologische Schnitte der Defektareale in Hämatoxylin-Eosin zur Evaluierung der Zellularität ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPH155.

## 7.6 Immunhistologische Auswertung

### 7.6.1 Auswertung der Typ-I-Kollagen-Immunaktivität

Pro Defekt wurden zwei histologische Schnitte nach einem semiquantitativen Bewertungssystem evaluiert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Tabelle 26: Ergebnisse des semiquantitativen Bewertungssystems für Anti-Typ-I-Kollagen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
Immunaktivität obere Zone	1,88 $\pm$ 0,64	2,13 $\pm$ 0,99	0,559
Immunaktivität tiefere Zone	1,63 $\pm$ 0,52	1,63 $\pm$ 0,52	1,000
Immunaktivität gesamt	1,63 $\pm$ 0,52	1,88 $\pm$ 0,64	0,405

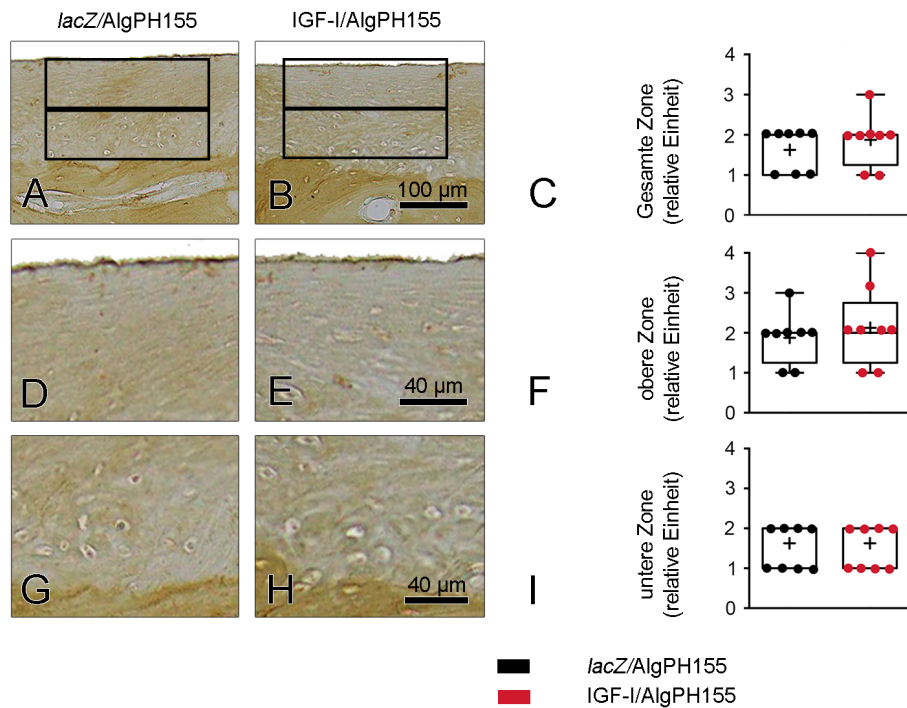


Abbildung 17: Repräsentative immunhistologische gefärbte Schnitte für Typ-I-Kollagen ein Jahr post-operativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+).

### 7.6.2 Auswertung der Typ-II-Kollagen-Immunaktivität

Die Defektareale wurden in obere und untere Zonen unterteilt und die jeweiligen Zonen mit einem semiquantitativen Bewertungssystem bewertet. Dabei ließ sich in der oberen Zone signifikant ( $P = 0,041$ ) eine vermehrte Immunaktivität durch eine Therapie mit IGF-I/AlgPh155 im Vergleich zur Therapie mit lacZ/AlgPH155 nachweisen. In der tieferen Zone sowie insgesamt war eine Tendenz zur verstärkten Immunaktivität vorhanden.

Tabelle 27: Ergebnisse des semiquantitativen Bewertungssystems für Anti-Typ-II-Kollagen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
Immunaktivität obere Zone	1,88 $\pm$ 0,35	2,38 $\pm$ 0,52	<b>0,041</b>
Immunaktivität tiefere Zone	2,50 $\pm$ 0,53	2,63 $\pm$ 0,74	0,705
Immunaktivität gesamt	2,25 $\pm$ 0,46	2,75 $\pm$ 0,71	0,116



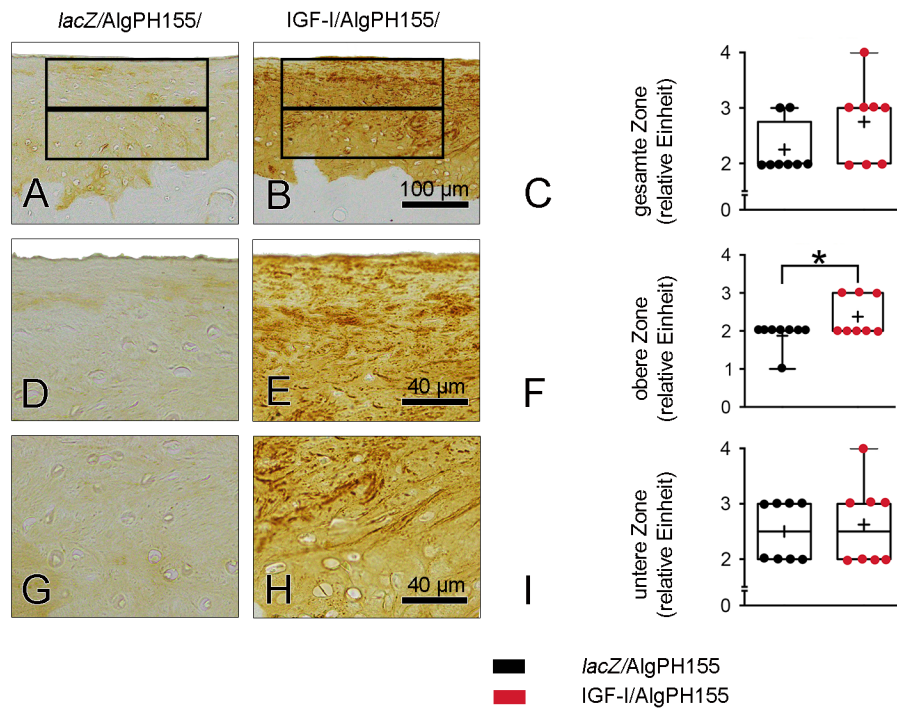


Abbildung 18: Repräsentative immunhistologisch gefärbte Schnitte für Typ-II-Kollagen ein Jahr post-operativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+); \*:  $P < 0,05$ .

### 7.6.3 Auswertung der Typ-X-Kollagen-Immunität

Pro Defektareal wurde an je zwei repräsentativen Stellen in der lateralen und medialen Integrationszone die gefärbten Zellen sowie die nicht immunhistologisch gefärbten Zellen in der tiefen Zone des Defekts gezählt. Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Tabelle 28: Ergebnisse der prozentualen Berechnung für Anti-Typ-X-Kollagen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
Immunität tiefere Zone	11,21 $\pm$ 9,40	13,39 $\pm$ 8,06	0,626

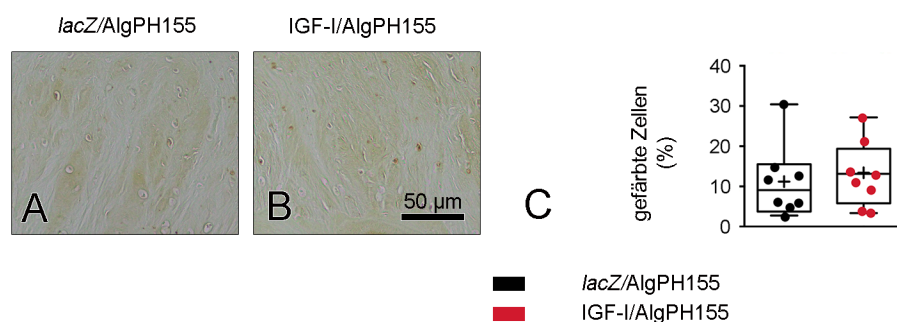


Abbildung 19: Repräsentative immunhistologisch gefärbte Schnitte für Typ-X-Kollagen ein Jahr post-operativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+).

### 7.6.4 Auswertung der Aggrecan-Immunaktivität

Pro Defektareal wurden zwei histologische Schnitte in 20- und 40-facher Vergrößerung nach einem semiquantitativen Bewertungssystem evaluiert. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen feststellen.

Tabelle 29: Ergebnisse des semiquantitativen Bewertungssystems für Anti-Aggrecan; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
Immunaktivität obere Zone	3,38 $\pm$ 0,52	3,25 $\pm$ 0,46	0,619
Immunaktivität tiefere Zone	3,00 $\pm$ 0,53	3,25 $\pm$ 0,46	0,334
Immunaktivität gesamt	3,00 $\pm$ 0,53	3,00 $\pm$ 0,00	1,000

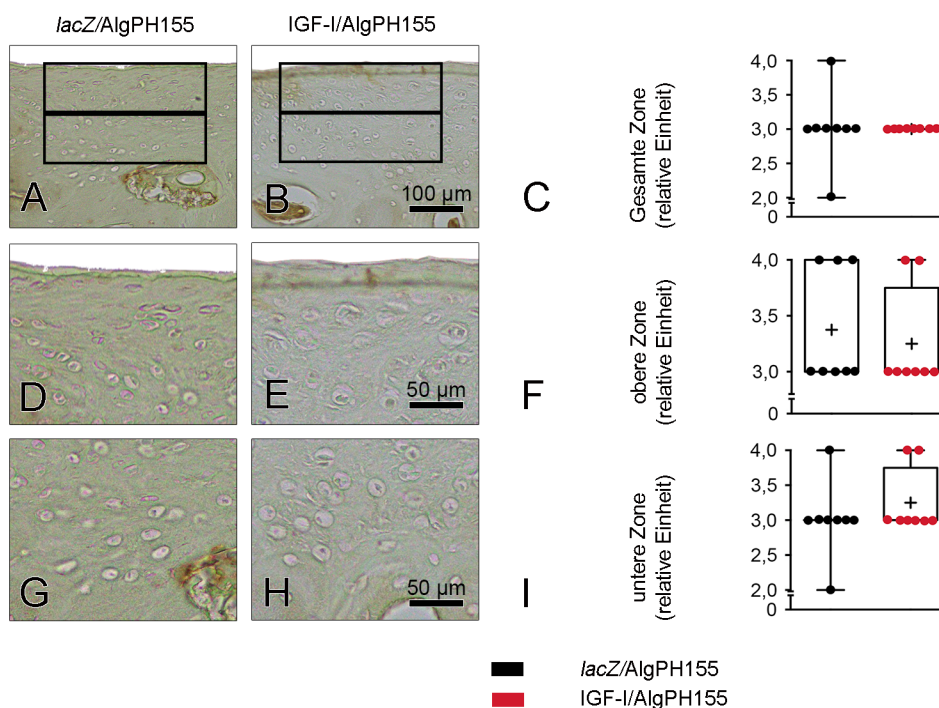


Abbildung 20: Repräsentative immunhistologisch gefärbte Schnitte für Anti-Aggrecan ein Jahr post-operativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPh155; Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+).

## 7.7 Auswertung des angrenzenden Gewebes

### 7.7.1 Beurteilung der subchondralen Knochenplatte sowie der subartikulären Spongiosa

In der Mikro-CT Auswertung des angrenzenden Gewebes waren sowohl in der subchondralen Knochenplatte als auch in der subartikulären Spongiosa keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nachweisbar. Die manuelle histomorphometrische Messung machte ebenfalls keine Unterschiede sichtbar.

Tabelle 30: Ergebnisse der CT-Analyse der subchondralen Knochenplatte im angrenzenden Gewebe; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	640,21 $\pm$ 46,40	638,45 $\pm$ 29,02	0,929
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	10,43 $\pm$ 1,88	11,26 $\pm$ 1,09	0,300
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	9,87 $\pm$ 1,56	10,65 $\pm$ 0,67	0,212
Po(cl), %	0,42 $\pm$ 0,25	0,47 $\pm$ 0,29	0,691
Po(op), %	4,65 $\pm$ 3,13	4,67 $\pm$ 3,60	0,987
Po(to), %	5,04 $\pm$ 3,14	5,12 $\pm$ 3,71	0,965
PBV, %	94,96 $\pm$ 3,14	94,88 $\pm$ 3,71	0,965
Tb.Th, mm	0,30 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,03	0,304

Tabelle 31: Ergebnisse der CT-Analyse der subartikulären Spongiosa im angrenzenden Gewebe; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
BMD, mg/cm <sup>3</sup>	588,90 $\pm$ 34,53	610,72 $\pm$ 44,69	0,293
BS/BV, mm <sup>-1</sup>	20,07 $\pm$ 2,52	18,58 $\pm$ 2,79	0,279
BS/TV, mm <sup>-1</sup>	11,03 $\pm$ 0,96	10,46 $\pm$ 0,52	0,160
Conn.Dn.	114,83 $\pm$ 51,33	91,75 $\pm$ 26,34	0,277
DA	1,33 $\pm$ 0,16	1,42 $\pm$ 0,13	0,254
FD	2,53 $\pm$ 0,04	2,50 $\pm$ 0,07	0,225
PBV, %	55,66 $\pm$ 8,27	57,17 $\pm$ 7,04	0,700
SMI	0,84 $\pm$ 0,57	0,94 $\pm$ 0,54	0,719
Tb.Sp, mm	0,17 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,02	0,571
Tb.N, 1/mm	3,09 $\pm$ 0,17	2,96 $\pm$ 0,12	0,115
Tb.Pf, 1/mm	4,94 $\pm$ 4,30	-3,76 $\pm$ 2,16	0,497
Tb.Th, mm	0,18 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,239

Tabelle 32: Ergebnisse der manuellen histomorphometrischen Messung im angrenzenden Gewebe im computertomographischen Bild; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPh155	P-Wert
Dicke des Knorpels	0,49 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,10	0,373
Dicke der subchondralen Knochenplatte	0,43 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,04	0,997

### 7.7.2 Bewertungssystem zur Beurteilung der perifokalen Arthrose

Die lateral und medial an den Defekt anschließenden Knorpelareale wurden jeweils an sechs histologischen Schnitten getrennt evaluiert. Anschließend wurde der Mittelwert in den einzelnen Kategorien jeweils für medial und lateral gebildet. Es war in der Gesamtpunktzahl ein signifikanter ( $P = 0,048$ ) Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen nachweisbar, wobei eine Therapie mit IGF-I/AlgPH155 insgesamt zu weniger Arthrosezeichen führte. In den anderen Kategorien ließ sich insgesamt eine Tendenz zur verbesserten Knorpelheilung durch IGF-I/AlgPH155 erkennen. Lateral ließ sich nach



## Ergebnisse

Applikation von IGF-I/AlgPH155 eine signifikant ( $P = 0,036$ ) verbesserte Struktur im Vergleich zu lacZ/AlgPH155 feststellen.

Tabelle 33: Ergebnisse der Evaluierung des angrenzenden Knorpels durch ein Bewertungssystem zur Beurteilung von Arthrose, 25 starke Arthrosezeichen, 0 keine Arthrosezeichen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
1. Struktur Knorpel	1,18 $\pm$ 0,63	0,76 $\pm$ 0,68	0,081
2. Chondrozytendichte	1,33 $\pm$ 0,47	1,39 $\pm$ 0,49	0,738
3. Zellklone	3,54 $\pm$ 0,71	3,49 $\pm$ 0,81	0,946
4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung	1,11 $\pm$ 0,32	1,07 $\pm$ 0,25	0,585
5. Tidemark/kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen	1,83 $\pm$ 0,37	1,52 $\pm$ 0,69	0,159
Gesamtpunktzahl	9,00 $\pm$ 1,05	7,70 $\pm$ 2,46	<b>0,048</b>

Tabelle 34: Ergebnisse der Evaluierung des lateral angrenzenden Knorpels durch ein Bewertungssystem zur Beurteilung von Arthrose, 25 starke Arthrosezeichen, 0 keine Arthrosezeichen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
1. Struktur Knorpel lateral	1,00 $\pm$ 0,53	0,64 $\pm$ 0,43	<b>0,036</b>
2. Chondrozytendichte lateral	1,50 $\pm$ 0,41	1,39 $\pm$ 0,40	0,642
3. Zellklone lateral	3,40 $\pm$ 0,72	3,58 $\pm$ 0,74	0,813
4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung lateral	1,17 $\pm$ 0,32	1,00 $\pm$ 0,00	0,195
5. Tidemark/kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen lateral	1,81 $\pm$ 0,19	1,44 $\pm$ 0,65	0,129
Gesamtpunktzahl	8,88 $\pm$ 1,02	6,90 $\pm$ 3,29	0,063

Tabelle 35: Ergebnisse der Evaluierung des medial angrenzenden Knorpels durch ein Bewertungssystem zur Beurteilung von Arthrose, 25 starke Arthrosezeichen, 0 keine Arthrosezeichen; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
1. Struktur Knorpel medial	1,19 $\pm$ 0,56	0,88 $\pm$ 0,64	0,267
2. Chondrozytendichte medial	1,21 $\pm$ 0,19	1,40 $\pm$ 0,37	0,155
3. Zellklone medial	3,40 $\pm$ 0,72	3,64 $\pm$ 0,70	0,954
4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung medial	1,06 $\pm$ 0,18	1,14 $\pm$ 0,38	0,662
5. Tidemark/kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen medial	1,81 $\pm$ 0,19	1,55 $\pm$ 0,64	0,239
Gesamtpunktzahl	8,67 $\pm$ 1,08	8,62 $\pm$ 1,53	0,580

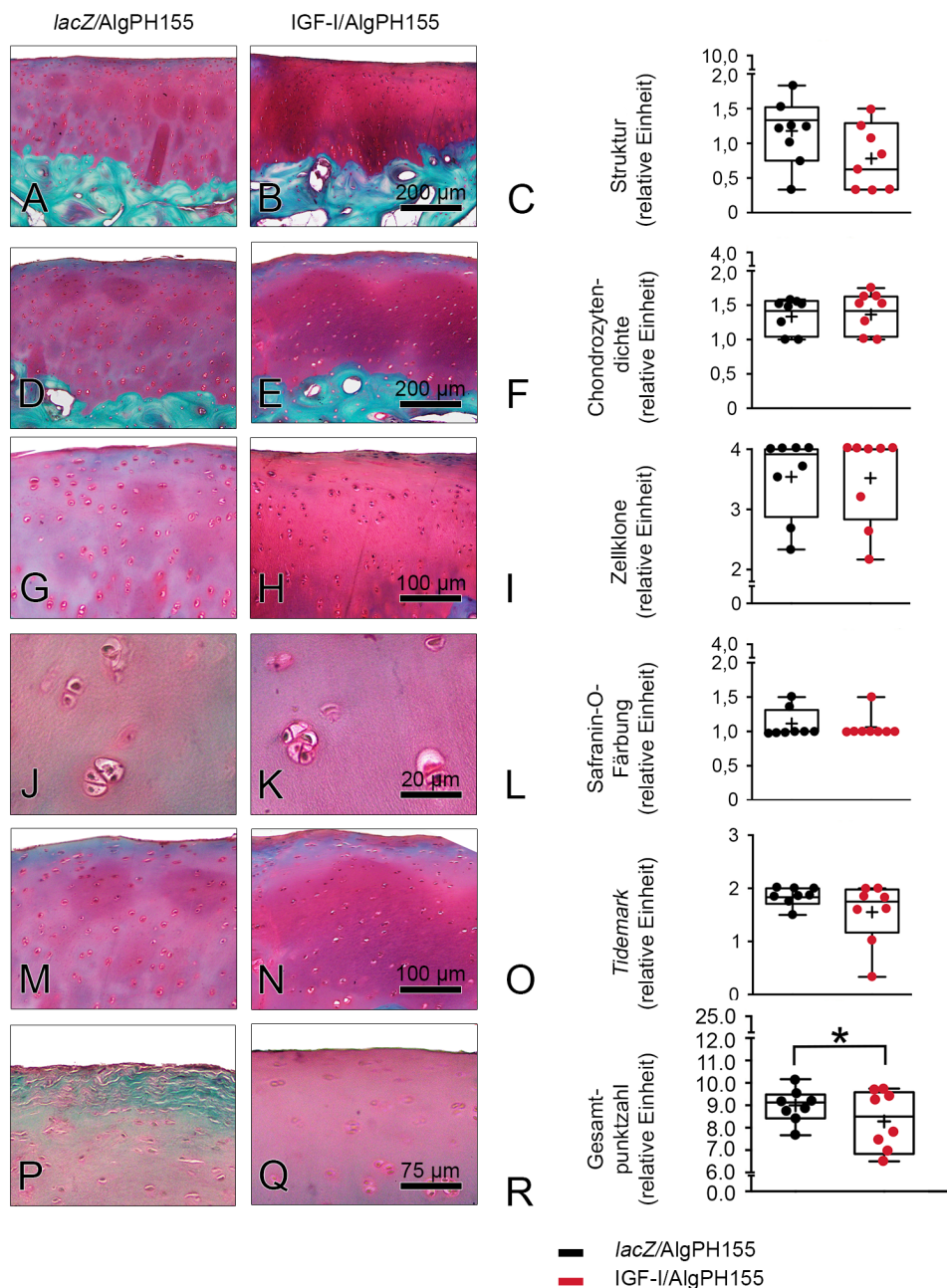


Abbildung 21: Repräsentative histologische Schnitte des angrenzenden Knorpels ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPH155; in Safranin-O/Echtgrün (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N, P, Q, S, T); Boxplots zeigen sowohl die Werte der einzelnen Tiere, als auch den Mittelwert in der jeweiligen Kategorie (+); \*:  $P < 0,05$ .

### 7.7.3 Bestimmung der Chondrozytdichte

Die an das Defektgewebe angrenzenden Areale wurden in 40-facher Vergrößerung betrachtet. Dabei manifestierten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

## Ergebnisse

Tabelle 36: Ergebnisse der Bestimmung der Zellularität in den Arealen angrenzend an das Defektgewebe in 40-facher Vergrößerung; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
Zellzahl angrenzender Knorpel lateral	81,50 $\pm$ 18,55	81,00 $\pm$ 25,31	0,967
Zellzahl angrenzender Knorpel medial	92,50 $\pm$ 28,15	82,88 $\pm$ 22,28	0,461

### 7.7.4 Bestimmung der IGF-I-Immunität im angrenzenden Gewebe

Um die Effekte von IGF-I/AlgPH155 auch im angrenzenden Gewebe besser beurteilen zu können wurden jeweils lateral und medial des Defektareals die braungefärbten Zellen gezählt. Dabei war eine verstärkte Tendenz zu Anfärbung durch eine Applikation von IGF-I/AlgPH155 im Vergleich zu lacZ/AlgPH155 auszumachen.

Tabelle 37: Ergebnisse der Anzahl gefärbter Zellen im angrenzenden Gewebe; MW  $\pm$  SD.

Kategorie	lacZ/AlgPH155	IGF-I/AlgPH155	P-Wert
angefärbte Zellen angrenzender Knorpel lateral	5,00 $\pm$ 4,72	12,25 $\pm$ 10,36	0,093
angefärbte Zellen angrenzender Knorpel medial	20,13 $\pm$ 12,84	19,88 $\pm$ 17,03	0,974

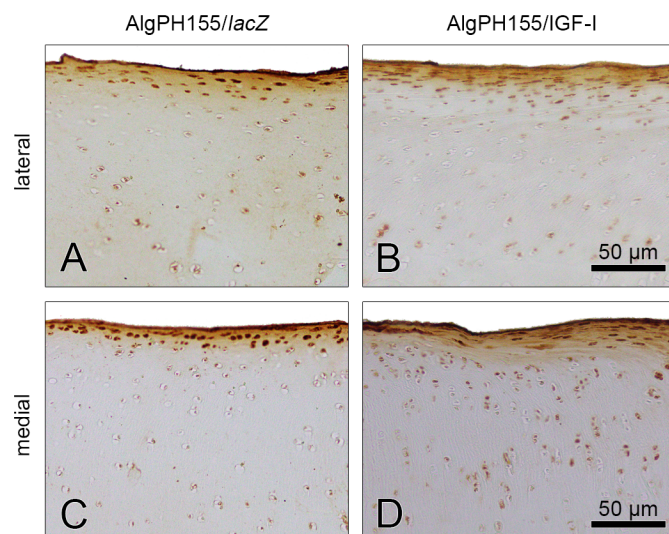


Abbildung 22: Repräsentative immunhistologisch gefärbte Schnitte mit Anti-IGF-I des angrenzenden Knorpelgewebes ein Jahr postoperativ; linke Spalte: lacZ/AlgPH155, rechte Spalte: IGF-I/AlgPH155.

## 7.8 Korrelationsanalysen

### 7.8.1 Korrelationsanalyse zwischen Dicke der subchondralen Knochenplatte und verschiedener Parameter des Bewertungssystems nach Sellers *et al.*

Die Korrelationsanalyse zwischen der Dicke der subchondralen Knochenplatte als auch verschiedener Parameter der Mikro-CT Auswertung und der einzelnen Kategorien des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* ergab keine signifikanten Korrelationen.

### 7.8.2 Korrelationsanalyse zwischen IGF-I-Immunaktivität und histologischen Parametern

Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine negative Korrelation in der Behandlungsgruppe mit IGF-I/AlgPH155 in den Kategorien „Defektfüllung“ ( $r: -0,836$ ;  $P = 0,010$ ) und „Defektarchitektur“ ( $r: -0,784$ ;  $P = 0,033$ ) aus dem Bewertungssystem nach Sellers *et al.* und der Gesamtwertung des semiquantitativen Bewertungssystems für die IGF-I-Immunaktivität. Die Defektfüllung bzw. die Defektarchitektur war somit besonders gut, wenn die Zellen im Knorpeldefekt vermehrt braun angefärbt waren. In der Kontrollgruppe ließ sich eine entsprechende negative Korrelation nicht nachweisen.

### 7.8.3 Korrelationsanalyse zwischen verschiedenen Parametern des Bewertungssystems nach Sellers *et al.*

Es ließ sich eine positive Korrelation zwischen einer verstärkten Matrixanfärbbarkeit und der verbesserten Gesamtpunktzahl durch die Applikation von IGF-I/AlgPH155 ( $r: 0,771$ ;  $P = 0,030$ ) feststellen. Das bedeutet, je stärker die Matrixanfärbbarkeit und der damit gemessene Proteoglykangehalt des Reparaturgewebes, umso besser das Reparaturgewebe. Diese Korrelation ließ sich in der Kontrollgruppe nicht erkennen ( $r: 0,557$ ;  $P = 0,151$ ).

### 7.8.4 Korrelationsanalyse zwischen Typ-II-Kollagen-Immunaktivität und Parametern des Bewertungssystems nach Sellers *et al.*

In der Korrelationsanalyse zwischen der Typ-II-Kollagen-Immunaktivität der oberen Zone und der Matrixanfärbbarkeit ließ sich eine positive Korrelation ( $r: -0,757$ ;  $P = 0,03$ ) bei Behandlung mit IGF-I/AlgPH155 ausmachen. Dies bedeutet, dass bei hohem Proteoglykangehalt auch ein hoher Typ-II-Kollagen Gehalt vorhanden ist. In der Kontrollgruppe mit *lacZ*/AlgPH155 ließ sich dieser Zusammenhang nicht nachweisen ( $r: -0,071$ ;  $P = 0,868$ ).

### **7.8.5 Korrelationsanalyse zwischen IGF-I-Immunaktivität und Kategorien des Bewertungssystems zur Beurteilung von Arthrose**

Die Korrelationsanalyse zwischen den mit Anti-IGF-I angefärbten Zellen und den verschiedenen Kategorien des Bewertungssystems zur Beurteilung von Arthrose ergab keine signifikanten Unterschiede in beiden Behandlungsgruppen. So ließ sich beispielsweise keine verbesserte Struktur oder Chondrozytendichte bei Defekte erkennen, welche vermehrt mit Anti-IGF-I angefärbte Zellen zeigten.

### **7.8.6 Korrelationsanalyse zwischen dem Bewertungssystem nach Sellers *et al.* und dem Bewertungssystem zur Beurteilung von Arthrose**

In der Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen den einzelnen Parametern des Bewertungssystems zur Beurteilung der Arthrose im umliegenden Gewebe und der Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* gab es keine signifikanten Differenzen. Dabei ließen sich in beiden Behandlungsgruppen keine Unterschiede erkennen. Bei besonders guter Defektheilung konnten nicht weniger Zeichen einer perifokalen Arthrose festgestellt werden.

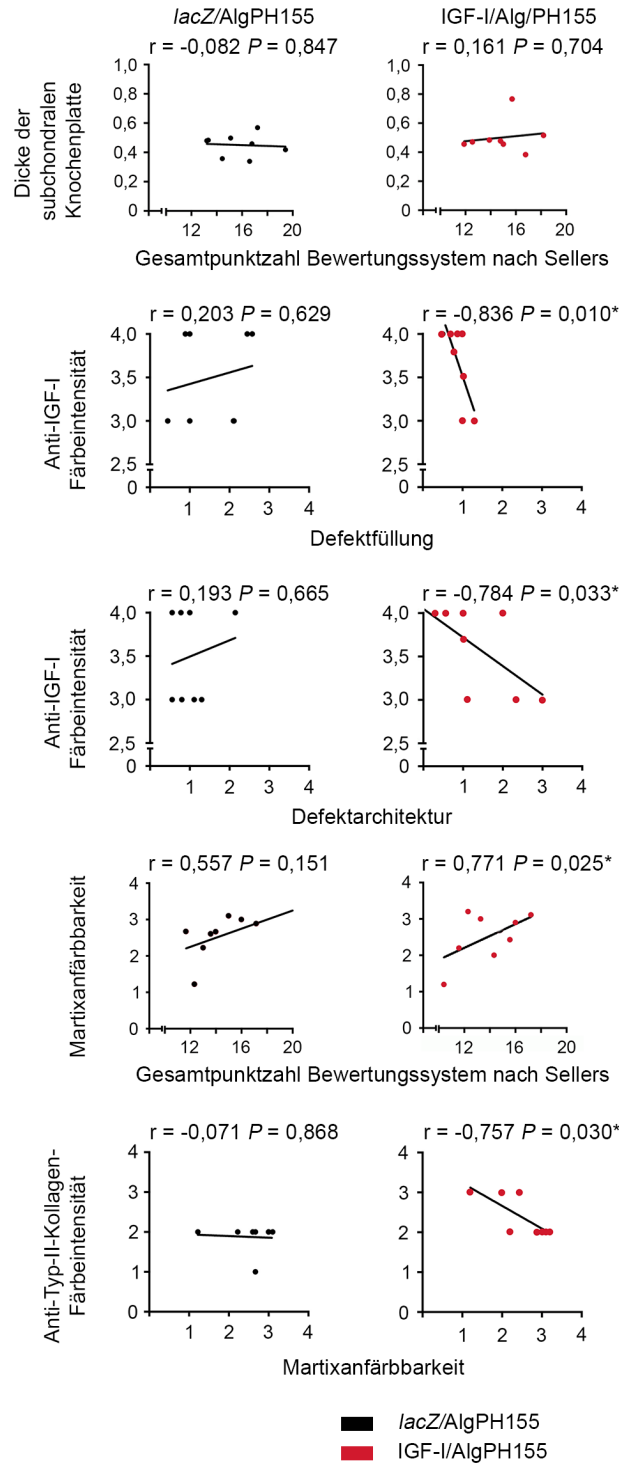


Abbildung 23: Graphen zu den Korrelationsanalysen zwischen Anti-IGF-I Färbeintensität, verschiedenen Parametern des Bewertungssystem nach Sellers et al. und der Anti-Typ-II-Kollagen Färbeintensität; linke Spalte: *lacZ/AlgPH155*, rechte Spalte: *IGF-I/AlgPH155*; r: Korrelationskoeffizient; \*:  $P < 0,05$ .

## 8. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Langzeiteffekte einer rAAV-vermittelten hydrogelgebundenen Überexpression des Wachstumsfaktors IGF-I auf die Reparatur von chondralen Defekten im Großtier-Modellsystem der Mikrofrakturierung. Die Daten zeigten erstens eine signifikant verstärkte IGF-I-Immunreaktivität in der unteren Zone des Reparaturgewebes als Zeichen einer bis zu 1 Jahr postoperativ persistierenden Transgenexpression. Zweitens waren individuelle Parameter des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* wie „Defektfüllung“, „Oberflächenbeschaffenheit“, „Zellmorphologie“ und insbesondere die Gesamtpunktzahl der Knorpelreparatur signifikant durch eine Therapie mit IGF-I/AlgPH155 verbessert. Flankierend dazu lag eine signifikant verstärkte Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität in der oberen Zone des Reparaturgewebes vor. Die Analyse der Mikrostruktur des subchondralen Knochens zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Drittens reduzierte die Therapie mit IGF-I/AlgPH155 signifikant den histologischen Schweregrad der defektassoziierten perifokalen Arthrose.

IGF-I spielt eine zentrale Rolle in der Chondrogenese. Besonders die Matrixproduktion, Proliferation aber auch die Differenzierung der Zellen wird durch IGF-I verbessert (Weimer *et al.*, 2012; Frisch *et al.*, 2014). Die signifikant verbesserte Knorpelreparatur waren besonders im histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* zu erkennen. Es wurde deutlich, dass sowohl die Parameter „Defektfüllung“, „Oberflächenbeschaffenheit“, „Zellmorphologie“ als auch die Gesamtpunktzahl signifikant verbessert waren. Der Parameter Defektarchitektur war bei Therapie mit *lacZ*/AlgPH155 signifikant verbessert. Zudem wird die These, dass IGF-I/AlgPH155 zu einer verbesserten Knorpelheilung führt durch den signifikant verbesserten Parameter „Oberflächenarchitektur“ im Bewertungssystem nach Fortier *et al.* unterstützt. In den immunhistologischen Verfahren zeigte sich insbesondere in der gelenknahen Zone des Knorpels ein signifikant vermehrtes Vorkommen von Typ-II-Kollagen nach Therapie mit IGF-I/AlgPH155.

Bei der Beurteilung verschiedener Arthroseparameter zeigte sich in der Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems, dass durch die Therapie mit IGF-I/AlgPH155 signifikant weniger Zeichen einer perifokalen Arthrose auftreten. Die positiven Eigenschaften durch IGF-I auf die Chondrogenese und damit die Defektreparatur zeigten sich damit nicht nur im Defektareal.

## 8.1 Effektive genetische Modifikation und Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen durch an Alginat gebundene, kontrollierte rAAV-Vektor Freisetzung

Hydrogele, die an Alginat gebundene rAAV-Vektoren enthalten, vermitteln eine effektive Freisetzung von therapeutischen Sequenzen an lokale mesenchymale Stammzellen, die nach einer Mikrofrakturierung die Chondrogenese im Reparaturgewebe initiieren. Die Freisetzungsrates von an Alginat gebundenen rAAV-Vektoren ist von der Vernetzungstemperatur abhängig. Hydrogele vermitteln dabei eine hohe Transduktionsrate *in vitro* ohne negative Effekte auf die Zellvitalität und die Zelldifferenzierung. In den vorgelegten Daten werden *ex vivo* gefundene Ergebnisse *in vivo* bestätigt.

## 8.2 Evaluierung der IGF-I Überexpression

In der basalen Zone, in der Nähe der subchondralen Knochenplatte, wurden bei mit IGF-I/AlgPH155 behandelten Defekten eine signifikant erhöhte Konzentration von IGF-I nachgewiesen. Obwohl die aus dem Knochenmark migrierten mesenchymalen Stammzellen auch endogenen IGF-I sezernieren, deutet der signifikante Unterschied der Färbintensität auf eine Fortbestehen des Transgens bis zu einem Jahr *in vivo* hin. Diese Ergebnisse bestätigen früheren Studien, die eine Transgenpersistenz durch rAAV-hIGF-I in humanen mesenchymalen Stammzellen über 20 Tage *in vitro* (Frisch *et al.*, 2014; Weimer *et al.*, 2012) als auch 60 Tage *in situ* (Weimer *et al.*, 2012) beschrieben. Translationale Kleintierstudien zeigten eine signifikante Persistenz des Transgens nach 3 Wochen (Madry *et al.*, 2013; Cucchiari *et al.*, 2014). Im equinen Modell zeigte sich ein Trend zur erhöhten IGF-I Aktivität durch rAAV5-IGF-I *in vivo* (Ortved *et al.*, 2015). Die tiefe Zone des Reparaturgewebes könnte optimale Bedingungen für die lange Transgenpersistenz bieten, da die mesenchymalen Stammzellen durch die Mikrofrakturierung direkt dorthin migrieren.

Vorherige Studien zeigten, dass rAAV zu einer verbesserten Chondrogenese und Proliferation in den Chondrozyten führte, ohne dass sich Synovialitis, verstärkter fibrotischer Umbau oder Osteophyten nachweisen ließen (Cucchiari *et al.*, 2005; Cucchiari *et al.*, 2014). Diese deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der ebenfalls keine Irritationen in der Synovia gefunden wurden. Der bei Fortier *et al.* beschriebene positive protektive Effekt von IGF-I auf das Synovium konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Fortier *et al.*, 2002). Dies könnte durch den späteren Probenentnahmezeitpunkt oder die protein-basierte Therapie mit IGF-I im Gegensatz zur genbasierten Therapie, wie in der vorliegenden Studie, bedingt sein.



### **8.3 Evaluierung der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa**

Wie bei allen markraumeröffnenden Verfahren zeigten sich nach einer Mikrofrakturierung sowohl Veränderungen in der subchondralen Knochenplatte als auch in der subartikulären Spongiosa (Mithoefer *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2020). Bei den vorliegenden Ergebnissen zeigten sowohl die Analyse der subchondralen Knochenplatte als auch der subartikulären Spongiosa weder im Mikro-CT noch im MRT signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Im modifizierten semiquantitativen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* hingegen zeigte sich eine vermehrte Erhöhung der subchondralen Knochenplatte durch IGF-I/AlpPH155, die durch histomanometrische Messungen nicht bestätigt werden konnte. Diese könnte bedeuten, dass sich entweder die Effekte des IGF-I/AlpPH155 vor allem auf das Reparaturgewebe auswirken oder die Veränderungen in einem früheren Stadium, als nach einem Jahr zu sehen sind (Holstein *et al.*, 2008).

In beiden Behandlungsgruppen wurde eine Erhöhung der subchondralen Knochenplatte gefunden, was sowohl mit vorherigen Studien im Kleintiermodell (Orth *et al.*, 2012) also auch mit langjährigen klinischen Patientenstudien übereinstimmt (Henderson *et al.*, 2005; Kreuz *et al.*, 2006). Zudem zeigte sich keine Korrelation zwischen der Dicke bzw. der Erhöhung der subchondralen Knochenplatte und der Knorpelreparatur. Das könnte aussagen, dass sich der subchondrale Knochen und das Knorpelreparaturgewebe relativ unabhängig voneinander entwickeln.

### **8.4 Evaluierung des Reparaturgewebes**

#### **8.4.1 Magnetresonanztomographische Evaluierung**

Das Bewertungssystem *MOCART 3D* ist ein wichtiges Instrument, um die Struktur des Reparaturgewebes sowohl in der klinischen Diagnostik (Marlovits *et al.*, 2006) als auch in experimentellen Modellen (Goebel *et al.*, 2014) zu beurteilen. Durch die Verwendung von MRT-Bildern können ethische Probleme, die eine osteochondrale Biopsie als Kontrollinstrument hervorrufen würde, vermieden werden. Allerdings korreliert das MRT Bild nicht in allen Fällen mit der Klinik des Patienten (Salzmann *et al.*, 2014; McCarthy *et al.*, 2018). In den vorliegenden Daten zeigte sich die in der histologischen Evaluation bestätigte signifikant verbesserte Knorpelreparatur nicht im 9.4 T MRT. Das könnten bedeuten, dass die histologische Evaluation der Goldstandard bei der Evaluierung des Reparaturgewebes bleibt.

Goebel *et al.* beschrieben in ihrer Arbeit eine Korrelation zwischen *MOCART-3D* und dem histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* in den Bereichen Defekt-

füllung und subchondraler Knochenplatte (Goebel *et al.*, 2014). Diese ließ sich in den gezeigten Ergebnissen nicht erkennen. Grund dafür könnte zum einen die in der vorliegenden Arbeit späte Probenentnahme sein, oder auch, dass sich die signifikante Korrelation für die ovine Kondyle gezeigt wurden und nicht für die wie hier behandelte porcine Trochlea.

#### **8.4.2 Makroskopische Evaluierung**

In den vorliegenden Ergebnissen wurden bei der makroskopischen Betrachtung keine signifikanten Unterschiede zwischen *lacZ/AlgPH155* und *IGF-I/AlgPH155* deutlich. In Studien mit genbasierter IGF-I Überexpression in Großtiermodellen waren wie in den oben gezeigten Ergebnissen lediglich Tendenzen zu einer verbesserten Defektheilung nachweisbar (Griffin *et al.*, 2016; Ortved *et al.*, 2015). Bei der Behandlung der Knorpeldefekte mit nativem IGF-I gebunden an Fibrin oder Chondrozyten konnten signifikante Unterschiede insbesondere in den Kategorien „Defektfüllung“, „Oberflächenarchitektur“ sowie „Integration“ festgestellt werden. Die Probenentnahme erfolgte nach 8 Monaten (Fortier *et al.*, 2002). Bei ähnlichem Studienaufbau ließen sich bei der Behandlung mit nativem IGF-I nur Tendenzen erkennen (Goodrich *et al.*, 2007).

Die makroskopische Beurteilung im lapinen Modell ergab bei der genbasierten Behandlung mit rAAV-IGF-I eine signifikante Verbesserungen der Heilung von osteochondralen Defekten (Orth *et al.*, 2011b; Madry *et al.*, 2013). Diese signifikanten makroskopischen Verbesserungen konnten ebenfalls bei der Therapie von osteochondralen Defekten mit nicht genbasiertem IGF-I nachgewiesen werden (Gugjoo *et al.*, 2017).

In den meisten Großtierstudien ließen sich im Vergleich zum lapinen Modell keine signifikanten Unterschiede in der makroskopischen Evaluation feststellen. Dies könnte zum einen an der unterschiedlichen Beschaffenheit des Gelenkknorpels bei den verschiedenen Tieren liegen. Zum anderen könnte die späte Probeentnahme eine entscheidene Rolle spielen, so dass nur noch die histologische Begutachtung genauen Aufschluss auf die Effekte von rAAV-IGF-I auf die Morphologie und Beschaffenheit des Reparaturgewebes gibt.

#### **8.4.3 Histologische und immunhistochemische Evaluierung**

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit ist, dass die mit *IGF-I/AlgPH155* behandelten Defekte ein Jahr postoperativ ein verbessertes Reparaturgewebe aufwiesen. In der histologischen Evaluierung bestätigte sich die Hypothese, dass *IGF-I/AlgPH155* zu einer verbesserten Knorpelheilung führt. Die Ergebnisse zeigten eine

signifikant verbesserte Defektfüllung, Oberflächenarchitektur, Zellmorphologie sowie Gesamtpunktzahl.

In der immunhistochemischen Evaluierung zeigte sich, dass Typ-II-Kollagen, ein wichtiges spezifisches Kollagen in der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels, in der oberen Zone des Reparaturgewebes bei einer Behandlung mit IGF-I/AlgPH155 signifikant vermehrt exprimiert wurde. Ähnliche Effekte durch rAAV-IGF-I Überexpression wurden an humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* nachgewiesen (Weimer *et al.*, 2012; Frisch *et al.*, 2014, Frisch *et al.*, 2016). Im Kleintiermodell eines osteochondralen Defekt ließ sich sowohl durch genbasierte (Cucchiaroni *et al.*, 2014) als auch durch proteinbasierte (Tuncel *et al.*, 2005) IGF-I Überexpression eine signifikant verstärkte Immunaktivität evaluieren. Bei der nicht genbasierten Überexpression wurde deutlich, dass je höher die IGF-I Konzentration ist, desto stärker ist auch die Immunanfärbbarkeit für Typ-II-Kollagen (Zhang *et al.*, 2017). Studien, die mit IGF-I modifizierte Chondrozyten transplantieren, wiesen ebenfalls eine signifikant erhöhte Typ-II-Kollagen Aktivität nach (Madry *et al.*, 2001; Madry *et al.*, 2002). *In vivo* waren im equine Modell eine ähnlich hohe Expression von Typ-II-Kollagen nach proteinbasierter Behandlung mit IGF-I zu sehen (Fortier *et al.*, 2002; Goodrich *et al.*, 2007). Die Ergebnisse dieser Studie lassen auf den positiven Effekt von rAAV-IGF-I auf die oberen Knorpelschichten schließen. Zudem bestätigen sich die Ergebnisse früherer Studien, dass IGF-I die Knorpelzellen zu einer vermehrten Bildung von Typ-II-Kollagen anregt. Dadurch entsteht ein Knorpel, der in seinem Matrixaufbau dem hyalinen Knorpel ähnlicher sein könnte. Das wiederum könnte eine verbesserte Funktion und Belastbarkeit des Knorpels zur Folge haben.

Eine leichte Tendenz zur verstärkten Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität durch eine Behandlung mit IGF-I/AlgPH155 war erkennbar. Bei einer Transfektion von peripheren Blutzellen mit rAAV-IGF-I wurde eine starke Überexpression von knochenbildenden Faktoren nachgewiesen, sowie eine vermehrte immunhistologische Färbung mit Typ-I-Kollagen (Frisch *et al.*, 2017). In verschiedenen Tierstudien zeigte sich im lapinen Defektgewebe in der Kontrollgruppe eine vermehrte Expression von Typ-I-Kollagen (Tuncel *et al.*, 2005). Im equine Tiermodell zeigte sich in der Therapiegruppe mit IGF-I teilweise Typ-I-Kollagen vermehrt in der mittleren Zone des Reparaturgewebes (Nixon *et al.*, 1999). In einer anderen Studie zeigte sich eine vermehrte Anfärbbarkeit von Typ-I-Kollagen in der Kontrollgruppe, jedoch nur bei der Hälfte der Tiere (Fortier *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das diffuse Auftreten von Typ-I-Kollagen. Dies könnte an der anabolen Eigenschaft von IGF-I, sowie an der Eigenschaft, vermehrt die Produktion von knochenbildenden Faktoren zu bewirken, liegen.

Die Defektfüllung nach einer Therapie mit Mikrofrakturierung und IGF-I/AlgPH155 war signifikant erhöht, was ebenfalls in früheren Studien mit Kleintieren beschrieben wurde (Madry *et al.*, 2005; Tuncel *et al.*, 2005; Orth *et al.*, 2011b). Bisher zeigte sich in Großtierstudien mit proteinbasierter IGF-I Expression lediglich ein Trend hin zu einer verbesserten Defektfüllung nach 8 Monaten in der Histologie. Die makroskopische Evaluierung hingegen wies einen signifikanten Unterschied auf. (Fortier *et al.*, 2004; Goodrich *et al.*, 2007). Bei einer rAAV-vermittelten Überexpression von IGF-I im lapinen Modell zeigte sich ebenfalls 4 Wochen postoperativ eine signifikant verbesserte Defektfüllung (Madry *et al.*, 2013; Cucchiari *et al.*, 2014). Neueste Studien wiesen nach, dass die Defektfüllung ein wichtiger individueller klinischer Parameter ist, der mit den Symptomen der Patienten korreliert (McCarthy *et al.*, 2018). In der Kategorie Integration lässt sich in den vorliegenden Daten keine Tendenz zu einer verbesserten Knorpelheilung durch IGF-I Überexpression erkennen. Gleichwohl zeigt sich insgesamt eine gute Integration des Reparaturgewebes, das nur vereinzelt Spalten in der Übergangzone aufweist.

Die Zellmorphologie des Reparaturgewebes wurde durch eine Therapie mit IGF-I/AlgPH155 signifikant verbessert. Das bedeutet, dass vermehrt Zellen für den hyalinen Knorpel typischen in Säulen angeordnet waren. Frühere Kleintierstudien mit proteinbasiertem Ansatz (Madry *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2017) sowie mit genbasiertem Ansatz (Madry *et al.*, 2013; Cucchiari *et al.*, 2014) zeigten ebenfalls 4 Wochen postoperativ eine verbesserte Zellmorphologie. Die Zellzahl hingegen unterschied sich zwischen den beiden Behandlungsgruppe nicht signifikant. Das könnte darauf hinweisen, dass eine Therapie mit IGF-I/AlgPH155 zu einer verbesserten Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen führt und sie besser differenzieren. Jedoch führt dies nach einem Jahr zu keinem vermehrten Anstieg der Zellzahl. Dies deckt sich mit früheren *in vitro* Studien, die den Effekt von IGF-I auf die Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen beschreiben (Worster *et al.*, 2001; Longobardi *et al.*, 2006; Frisch *et al.*, 2016). Trotz der verbesserten Morphologie der Chondrozyten zeigte sich eine schlechtere Defektarchitektur nach Applikation von IGF-I/AlgPH155 als nach Therapie mit *lacZ*/AlgPH155. Der Grund dafür könnte sein, dass zwei Minischweine mit großen Rissen im Reparaturgewebe, nicht aus der Statistik ausgeschlossen wurden, um eine Beeinträchtigung der statistischen Analyse zu vermeiden. Diese beiden Minischweine wiesen eine verminderte IGF-I-Immunität im Vergleich zu anderen Tieren auf, so dass es denkbar ist, dass die Transgenexpression vermindert war, was zu einer verminderten Qualität des Reparaturgewebes geführt haben könnte. Diese Hypothese

wird durch die Korrelationsanalyse verstärkt, die zeigte, dass eine stärkere IGF-I Färbeintensität mit einer verbesserten Defektarchitektur signifikant korreliert.

Die Oberflächenarchitektur der mit IGF-I/AlgPH155 behandelten Defekte wiesen signifikant weniger Fibrillationen auf. Dies entspricht Ergebnissen von Kleintierstudien, die 4 Wochen postoperativ Daten erhoben. Hier wurden die Knorpeldefekte mit in Alginat eingekapseltem IGF-I behandelt (Madry *et al.*, 2005; Orth *et al.*, 2011b). Auch bei einer rAAV-IGF-I vermittelten Überexpression zeigte sich 4 Wochen postoperativ eine signifikant verbesserte Oberflächenarchitektur (Cucchiari *et al.*, 2014). Neben der Defektfüllung ist die Defektoberfläche ein wichtiger klinischer Parameter, der mit den Symptomen der Patienten korreliert (McCarthy *et al.*, 2018).

Zudem ließ sich auch in der Gesamtpunktzahl des histologischen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* ein signifikant verbessertes Reparaturgewebe erkennen, wenn Defekte nach der Mikrofrakturierung mit IGF-I/AlgPH155 therapiert wurde. Dies stimmt mit dem 3-4 Wochen postoperativ erhobenem Ergebnis verschiedener Kleintierstudien überein, in denen die IGF-I Überexpression nicht viral (Madry *et al.*, 2005; Orth *et al.*, 2011b) und viral (Madry *et al.*, 2013; Cucchiari *et al.*, 2014) vermittelt wurde. Im Großtiermodell zeigte sich ebenfalls eine verbesserte Gesamtpunktzahl des histologischen Bewertungssystems 8 Monate nach Applikation von IGF-I gebunden an Fibringerinnsel (Nixon *et al.*, 1999).

Insgesamt könnten die Ergebnisse der histologischen Evaluierung darauf hindeuten, dass durch die Überexpression von IGF-I ein dem hyalinen Knorpel ähnlicheres Reparaturgewebe entsteht. Diese Hypothese wird besonders durch die signifikant verbesserte Defektfüllung, Oberflächenarchitektur und Zellmorphologie unterstützt. Diese Parameter, sowie die signifikante Verbesserung der Gesamtparameter könnten auf eine vermehrte Belastbarkeit des Gewebes hindeuten. Das hätte zur Folge, dass Spätschäden, wie Arthrose und die typische Klinik mit Schmerzen und Bewegungseinschränkung später auftreten.

### **8.5 Evaluierung des angrenzenden Knorpels**

Arthrose ist eine sozioökonomisch herausragende Krankheit (Angele *et al.*, 2016; Madry *et al.*, 2016b), die auch sekundär durch unbehandelte Knorpeldefekte entstehen kann (Sanders *et al.*, 2017). Ein Jahr postoperativ ließen sich sowohl im medialen als auch im lateral an den Defekt angrenzende Knorpel in beiden Behandlungsgruppen Zeichen von perifokaler Arthrose nachweisen. Von besonderer Bedeutung ist, dass die Gesamtpunktzahl des Arthrosebewertungssystems signifikant weniger Zeichen von Arthrose bei Defekten, die mit IGF-I/AlgPH155 behandelt wurden, zeigte. Rogachefsky *et al.*

beobachteten, dass durch eine intraartikuläre IGF-I-Injektion weniger Zeichen von Arthrose auftreten und sich IGF-I somit protektiv auf von Arthrose betroffene Knorpelareale auswirkt (Rogachefsky *et al.*, 1993). Auch *in vivo* konnten die positiven Effekte von genbasierter IGF-I Überexpression auf von Arthrose betroffenen Chondrozyten nachgewiesen werden (Weimer *et al.*, 2012). Es zeigte sich ein geringerer Verlust von Matrixproteinen durch die Hemmung von Interleukin 1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  vermittelt durch IGF-I (Tyler, 1989; Shi *et al.*, 2013). Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Spätschäden, wie zum Beispiel sekundäre Arthrose, zu einem späteren Zeitpunkt auftreten. Große klinische Studien haben eine Korrelation zwischen Knorpeldefekten und der Entstehung von Arthrose identifiziert (Everhart *et al.* 2019a). Vollsichtige Knorpeldefekte erhöhen zudem signifikant das Risiko, im weiteren Verlauf eine Endoprothese zu benötigen (Everhart *et al.* 2019b).

## 8.6 Limitationen und Stärken der Studie

In der Studie wurden 8 ausgewachsene weibliche Minischweine operiert und in die Trochleas der beiden Hinterläufe jeweils ein vollschichtiger Knorpeldefekt gesetzt. Eine Stärke dieses Modells ist, dass sowohl die Dicke des Gelenkknorpels, als auch der Gelenkaufbau des Minischweins dem menschlichen Gelenk ähneln. Im Gegensatz dazu wurde aber nur eine Dosis IGF-I/AlgPH155 appliziert. Zudem gab es keine Kontrollgruppe in der nur rAAV-hIGF-I oder Alginat appliziert wurde. Durch den bilateralen Zugang waren keine Kontrollen des Reparaturgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten möglich. Um vermehrte Kontrollen zu ermöglichen und gleichzeitig eine robuste statistische Analyse zu gewährleisten, müsste die Anzahl der Minischweine deutlich erhöht werden (Orth *et al.*, 2013a). Zudem gilt es zu beachten, dass Patienten nach einer Operation immer mehrere Wochen postoperativ das Gelenk entlasten, wohingegen die Minischweine die Hinterläufe relativ zügig wieder voll belasten und eine mit der klinischen Situation vergleichbare Entlastung aus Gründen des Tierschutzes nicht praktikabel ist. Um keine Schäden an den osteochondralen Einheiten *ex vivo* zu verursachen konnten aufgrund der Erhebung der subchondralen Knochenplatte, keine biomechanischen Prüfungen durchgeführt werden. Die porcine subchondrale Knochenplatte ist im Durchschnitt 0,43 mm dick, somit vergleichbar mit der im Durchschnitt 0,54 mm dicken humanen subchondralen Knochenplatte (Oláh *et al.*, 2019). Die Trochlea wurde gewählt, da sie, im Vergleich zur Kondyle flacher ist, wodurch eine einheitliche Defektbeurteilung besser möglich ist (Orth *et al.*, 2013b).

Die Anzahl der acht Tiere wurde aufgrund von Power-Analyse und Erfahrungen aus früheren Studien gewählt, wonach schon 6 Tiere ausreichend sind, um geringe Differenzen von 4 Punkten im histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* mit

einer Standardabweichung von 3 Punkten zu zeigen. Das Bewertungssystem nach Sellers *et al.* reicht von 0 Punkten (vollständige Gelenkknorpelregeneration) bis 31 Punkte (keine Reparatur), weshalb eine Differenz von 4 Punkten als robust betrachtet wurde, da geringe Punktdifferenzen sich nicht in der Klinik des Patienten zeigen (Orth *et al.*, 2013a; Cucchiari *et al.*, 2014). Durch die hohe Power können auch schon geringe Unterschiede in den verschiedenen Bewertungssystemen detektiert werden.

Eine Stärke dieser Studie ist, dass sie durch die Probeentnahme ein Jahr postoperativ Auskunft über Langzeiteffekte gibt. Von Vorteil ist, dass so die Späteffekte von IGF-I auf die Chondrogenese und Knorpelreparatur evaluiert werden konnten, wodurch verschiedenen Studien zu *in vitro*- und *in vivo*-Früheffekten von IGF-I ergänzt werden können (Madry *et al.*, 2005; Tuncel *et al.*, 2005; Weimer *et al.*, 2012; Madry *et al.*, 2013, Cucchiari *et al.* 2014; Frisch *et al.*, 2016). Des Weiteren konnte durch die Studie Rückschlüsse auf die unerwünschten Nebenwirkungen durch rAAV-IGF-I über ein Jahr gezogen werden. Die Früheffekte sowie die Konzentration von IGF-I in der Synovialflüssigkeit konnten jedoch durch diesen Studienaufbau nicht evaluiert beurteilt werden. Außerdem wurden verschiedene robuste Bewertungssysteme zur Evaluation der Knorpeldefekte verwendet. Die makroskopische Evaluierung erfolgte mittels Bewertungssystem nach Goebel *et al.* (Goebel *et al.*, 2016) und aus Oswestry (Smith *et al.*, 2005). Die MRT Bilder wurden mittels MOCART-3D Bewertungssystem beurteilt (Goebel *et al.*, 2014), die subchondrale Knochenplatte und die subartikuläre Spongiosa wurden mittels etablierter Mikro-CT-Auswertung (Orth *et al.*, 2012; Oláh *et al.*, 2018), evaluiert. Die histologische Auswertung erfolgte nach dem inversen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* (Sellers *et al.*, 1997). Die Beurteilung der Arthrosezeichen wurden durch ein Arthrosebewertungssystem gewährleistet (Little *et al.*, 2010). Diese Bewertungssysteme machen die genaue Beurteilung des Reparaturgewebes und des angrenzenden Knorpels möglich. Aufgrund ihrer hohen Objektivität können auch Tendenzen als relevant betrachtet werden. Zudem wird die Aussagenkraft durch den oft erfolgten Vergleich von zwei individuellen Bewertungssystemen verstärkt.

### **8.7 Ausblick**

Zusammenfassend zeigen diese Daten positive therapeutische Effekte von rAAV-IGF-I auf die Chondrogenese und den perifokalen Knorpel nach einem Jahr auf. Dabei waren individuelle Parameter sowie die Gesamtpunktzahl der Knorpelreparatur signifikant verbessert. Ebenso waren signifikant weniger Zeichen von perifokaler Arthrose zu erkennen, woraus sich protektive Effekte auf den angrenzenden Knorpel ableiten lassen.

Künftig könnte IGF-I/AlgPH155 nach einer arthroskopischen Mikrofrakturierung in der gleichen Sitzung appliziert werden. Dadurch könnte, ähnlich wie bei den Minischweinen in der vorliegenden Arbeit, die Chondrogenese der in den Defekt eingewanderten mesenchymalen Stammzellen verbessert werden. Das wiederum könnte zu einer strukturellen und auch funktionellen Verbesserung der Qualität des Reparaturgewebes führen. Bei einer möglichen klinischen Anwendung könnte auch eine Kombination aus verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel FGF-2 und TGF- $\beta$ 1, einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Chondrogenese und die Struktur des Reparaturgewebes haben. Die präzise Steuerung der genbasierten Applikation dieser Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel durch gewebespezifische Promotoren oder anti-hypertrophe Faktoren, ist ebenfalls ein interessanter zukünftiger Ansatz. Die langfristigen Effekte der lokalen Behandlung mit rAAV auf andere Gelenkstrukturen und Organsysteme sollten systematisch, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, auf ihre Sicherheit evaluiert werden. Die hier gezeigten positiven Langzeiteffekte sind wünschenswert, da bei Patienten nach einer Mikrofrakturierung oft mit einer langfristigen Degenerationen zu rechnen ist (Kreuz *et al.*, 2006; Orth *et al.*, 2019). Der Zeitpunkt eines endoprothetischen Gelenkersatzes könnte so verzögert werden (Minas *et al.*, 2009).



## 9. Literaturverzeichnis

Ahn, J. L., Lee, T., Oh, J., Kim, S., Kim, H., Park, I., Choi, B. & Im, G . (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.

Angele, P., Madry, H. & Kon, E. (2016). Early OA: point of no return or a chance for regenerative approaches. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 24(6), S. 1741 - 1742.

Årøen, A., Løken, S., Heir, S., Alvik, E., Ekeland, A., Granlund, O. G. & Engebretsen, L. (2004). Articular Cartilage Lesions in 993 Consecutive Knee Arthroscopies. *Am J Sports Med*, 32(1), S. 211 - 215.

Asen, A. K., Goebel, L., Rey-Rico, A., Sohler, J., Zurakowski, D., Cucchiari, M. & Madry, H. (2018). Sustained spatiotemporal release of TGF- $\beta$ 1 confers enhanced very early chondrogenic differentiation during osteochondral repair in specific topographic patterns. *FASEB J*, 32(10), S. 5298 - 5311.

Atkinson, T. S., Haut, R. C. & Altiero, N. J. (1998). An investigation of biphasic failure criteria for impact-induced fissuring of articular cartilage. *J Biomech Eng*, 120(4), S. 536 - 537.

Beickert, R. (2005). Mikrofrakturierung bei fokalem Knorpelschaden. *Arthroskopie*, 18(3), S. 186 - 192.

Bellavia, D., Veronesi, F., Carinina, 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., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M. C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther*, 11(1), S. 10 - 17.

Bora, F. J. & Miller, G. (1987). Joint physiology, cartilage metabolism and etiology of osteoarthritis. *Hand Clin*, 3(3), S. 325 - 336.

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.

Brophy, R. H., Rodeo, S. A., Warren, R. F., Barnes, R. P. & Powell, J. W. (2009). Knee Articular Cartilage Injuries in the National Football League Epidemiology and Treatment Approach by Team Physicians. *J Knee Surg*, 22(4), S. 331 - 338.

Buckwalter, J. & Mankin, H. (1998a). Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*, 41(8), S. 1331 - 1342.

Buckwalter, J. (1983). Articular cartilage. *Instr Course Lect*, (32), S. 349 - 370.

Buckwalter, J., Woo, S., Goldberg, V., Hadley, E., Booth, F. & Eyer, D. (1993). Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am*, 75, S. 1533 - 1548.

Buckwalter, J. & Mankin, H. (1998b). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, (47), S. 477 - 486.

Cao, B. & Huard, J. (2004). Gene transfer to skeletal muscle using herpes simplex virus-based vectors. *Methods Mol Biol*, (246), S. 301 - 308.

Chang, Y. S., Gu, H. O., 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(3), S. 205 - 213.

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 Cartilage*, 12(10), S. 834 - 842.

Compston, J. E. (2002). Bone marrow and bone: A functional unit. *J Endocrinol*, 173(3), S. 387 - 394.

Crystal, R. (1995a). The gene as the drug. *Nat Med*, 1(1), S. 15 - 17.

Crystal, R. (1995b). Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*, 270(5235), S. 404 - 410.

Cucchiarini, M., Madry, H., Ma, C., Thurn, T., Zurakowski, D., Menger, M. D., Kohn, D., Trippel, S. B. & Terwilliger, E. F. (2005). Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther*, 12(2), S. 229 - 238.

Cucchiarini, 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.

Cucchiarini, 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.

Dai, J. & Rabie, A. (2007). The use of recombinant adeno-associated virus for skeletal gene therapy. *Orthod Craniofac Res*, 10(1), S. 1 - 14.

Díaz-Rodríguez, P., Rey-Rico, A., Madry, H., Landin, M. & Cucchiarini, M. (2015). Effective genetic modification and differentiation of hMSCs upon controlled release of rAAV vectors using alginate/poloxamer composite systems. *Int J Pharm*, (496), S. 614 - 626.

Everhart, J. S., Abouljoud, M. M. & Flanigan, D. C. (2019a). Role of full-thickness cartilage defects in knee osteoarthritis (OA) incidence and progression: Data from the OA Initiative. *J Orthop Res*, 37(1), S. 77 - 83.

Everhart, J. S., Abouljoud, M. M., Kirven, J. C. & Flanigan, D. C. (2019b). Full-Thickness Cartilage Defects Are Important Independent Predictive Factors for Progression to Total Knee Arthroplasty in Older Adults with Minimal to Moderate Osteoarthritis: Data from the Osteoarthritis Initiative. *J Bone Joint Surg Am*, 101(1), S. 56 - 63.

Fortier, L. A., Mohammed, H. O., Lust, G. & Nixon, A. J. (2002). Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surgery Am*, 84(2), S. 276 – 288.

Fortier, L. A., Deak, M. M., Semevolos, S. A. & Cerione, R. A. (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. A., Lust, G., Mohammed, H. O. & Nixon, A. J. (1999). Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res*, 17(4), S. 467 - 474.

Frisch, J., Venkatesan, J. K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Madry, H. & Cucchiarini, M. (2014). Influence of insulin-like growth factor-I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 5(4), S. 1 - 12.

Frisch, J., Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Madry, H., Kohn, D., Cucchiarini, M. (2017). Peripheral blood aspirates overexpressing IGF-I via rAAV gene transfer undergo enhanced chondrogenic differentiation processes. *J Cell Mol Med*, 21(11), S. 2748 - 2758.

Frisch, J., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Madry, H., & Cucchiarini, M. (2016). rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF- $\beta$  and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair. *Gene Ther*, 23(3), S. 245 - 255.

Fritz, J., Gaissmaier, C., Schewe, B. & Weise, K. (2006). Gelenkreparatur im Kniegelenk. *Unfallchirurg*, 109(7), S. 563 - 574.

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. R., Koide, S. & Glimcher, M. J. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*, 62(1), S. 79 - 89.

Gao, X., Kim, K.-S. & Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J*, 9(1), S. 92 - 104.

Goebel, L., Orth, P., Cucchiarini, M., Pape, D. & Madry, H. (2016). Macroscopic cartilage repair scoring of defect fill, integration and total points correlate with corresponding items in histological scoring systems - a study in adult sheep. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(4), S. 581 - 588.

Goebel, Lars, Müller, A., Bücken, A. & Madry, H. (2015). High resolution MRI imaging at 9.4 Tesla of the osteochondral unit in a translational model of articular cartilage repair. *BMC Musculoskeletal Disord*, 16(1), S. 1 - 12.

Goebel, L., Zurakowski, D., Müller, A., Pape, D., Cucchiaroni, M. & Madry, H. (2014). 2D and 3D MOCART scoring systems assessed by 9.4T high-field MRI correlate with elementary and complex histological scoring systems in a translational model of osteochondral repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 22(10), S. 1386 - 1395.

Goldberg, A. (2001). Effects of growth factors on articular cartilage. *Ortop Traumatol Rehabil*, 3(2), S. 209 - 212.

Gomoll, A. H., Farr, J., Gillogly, S. D., Kercher, J. S. & Minas, T. (2011). Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *Instr Course Lect*, (60), S. 461 - 483.

Goodrich, L. R., Hidaka, C., Robbins, P. D., Evans, C. H. & Nixon, A. J. (2007). Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br*, 89(5), S. 672 - 685.

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, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials*, 27(18), S. 3387 – 3395.

Griffin, D. J., Orved, K. F., Nixon, A. J. & Bonassar, L. J. (2016). Mechanical properties and structure-function relationships in articular cartilage repaired using IGF-I gene-enhanced chondrocytes. *J Orthop Res*, 34(1), S. 149 - 153.

Gugjoo, M. B., Amarpal, Abdelbaset-Ismail, A., Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Pawde, A. M., Kumar, G. S. & Sharma, G. T. (2017). Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Biomed Pharmacother*, (93), S. 1165 - 1174.

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 Suppl* (391), S. 328 - 336.

Hardingham, T. & Fosang, A. (1992). Proteoglycans: many forms and functions. *FASEB J*, 6(3), S. 861 - 870.

Henderson, I. J. P. & La Valette, D. P. (2005). Subchondral bone overgrowth in the presence of full-thickness cartilage defects in the knee. *Knee*, 12(6), S. 435 - 440.

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.

Holstein, J. H., Klein, M., Garcia, P., Histing, T., Culemann, U., Pizanis, A., Laschke, M. W., Scheuer, C. & Menger, M. D. (2008). Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol*, 154(5), S. 1055 - 1062.

Hunziker, E. B. (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. B. & Rosenberg, L. C. (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.

Imhoff, A. B., Ottl, G. M., Burkart, A. & Traub, S. (1999). Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde*, 28(1), S. 33 - 44.

Jackson, D. W., Lalor, P. A., Aberman, H. M. & Simon, T. M. (2001). Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model: A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*, 83(1), S. 53 - 64.

Jentsch, K. D., 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.

Johnson, L. L. (1986). Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroscopy*, 2(1), S. 54 - 69.

Johnson, L. L. (2001). Arthroscopic abrasion arthroplasty: A review. *Clin Orthop Relat Res, Suppl* (39), S. 3006 - 3017.

Kawashima, H., Ogose, A., Yoshizawa, T., Kuwano, R., Hotta, Y., Hotta, T., Hantano, 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.

Klets, O., Mononen, M. E., Liukkonen, M. K., Nevalainen, M. T., Nieminen, M. T., 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.

Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M. & Südkamp, N. (2006). Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(11), S. 1119 - 1125.

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

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

Little, C. B., Smith, M. M., Cake, M. A., Read, R. A., Murphy, M. J. & Barry, F (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(3), S. 80 - 92.

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

Longo, U. G., Petrillo, S., Franceschetti, E., Berton, A., Maffulli, N. & Denaro, V. (2012). Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.*, 2012(168385), S. 1 - 9.

Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W., Moses, H., & Spagnoli, A. (2006). Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- $\beta$  signaling. *J Bone Miner Res*, 21(4), S. 626 - 636.

Lopa, S. & Madry, H. (2014). Bioinspired Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *Journal of Tissue Engineering Part A*, 20(15 - 16), S. 2057 - 2076.

Madry, H., Grün, U. W., & Knutsen, G. (2011a). Cartilage Repair and Joint Preservation: medical and surgical treatment options. *Deutsches Aerzteblatt International*, 108(49), S. 669 - 677.

Madry, H., Kon, E., Condello, V., Peretti, G. M., Steinwachs, M., Seil, R., Berruto, M., Engebretsen, L., Filardo, G. & Angele, P. (2016a). Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc*, 24(6), S. 1753 - 1762.

Madry, H. & Pape, D. (2008). Autologe Chondrozytentransplantation. *Orthopäde*, (37/8), S. 756 - 763.

Madry, H. Operative und rekonstruktive Behandlung. In: *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie Knie*, 1. Edition. S. 367 - 379. Herausgeber: Wirth, C., Zichner, L., Kohn, D. Verlag: Thieme, 2004.

Madry, H., Orth, P. & Cucchiari, M. (2011b). Gene therapy for cartilage repair. *Cartilage*, 2(3), S. 201 - 225.

Madry, H., van Dijk, C. N. & Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc*, 18(4), S. 419 - 433.

Madry, H., Cucchiari, M., Terwilliger, E. F. & Trippel, S. B. (2003). Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors Efficiently and Persistently Transduce Chondrocytes in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. *Hum Gene Ther*, 14(4), S. 393 - 402.

Madry, H. Tissue-Engineered Cartilage. In: *Principles of Tissue Engineering*, 5. Edition. S. 1034 - 45. Herausgeber: Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. Verlag: Elsevier, 2020.



Madry, H., Kaul, G., Cucchiarini, 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., Kaul, G., Zurakowski, D., Vunjak-Novakovic, G. & Cucchiarini, M. (2013). Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater*, (25), S. 229 - 247.

Madry, H., Zurakowski, D. & Trippel, S. B. (2001). Overexpression of human insulin like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther*, 8(19), S. 1443 - 1449.

Madry, H., Padera, R., Seidel, J., Langer, R., Freed, L. E., Trippel, S. B. & Vunjak-Novakovic, G. (2002). Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther*, 13(13), S. 1612 - 1630.

Madry, H., Orth, P. & Cucchiarini, M. (2016b). Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg*, 24(4), S. 45 - 46.

Mann, M. J., Gibbons, G. H., Hutchinson, H., Poston, R. S., Hoyt, E. G., Robbins, R. C. & Dzau, V. J. (1999). Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), S. 6411 - 6416.

Marlovits, S., Singer, P., Zeller, P., Mandl, I., Haller, J. & Trattnig, S. (2006). Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: Determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol*, 57(1), S. 16 - 23.

Martin, J. & Buckwalter, J. (2003). The role of chondrocyte senescence into the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85(A), S. 106 - 110.

Matsunaga, D., Akizuki, S., Takizawa, T., Yamazaki, I. & Kuraishi, J. (2007). Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis. *Knee*, 14(6), S. 465 - 471.

McCarthy, H. S., McCall, I. W., Williams, J. M., Mennan, C., Dugard, M. N., Richardson, J. B. & Roberts, S. (2018). Magnetic Resonance Imaging Parameters at 1 Year Correlate With Clinical Outcomes Up to 17 Years After Autologous Chondrocyte Implantation. *Orthop J Sports Med*, 6(8), S. 1 - 10.

Mierisch, C. M., Cohen, S. B., Jordan, L. C., Robertson, P. G., Balian, G. & Diduch, D. R. (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.

Minas, T., Gomoll, A. H., Rosenberger, R., Royce, R. O. & Bryant, T. (2009). Increased Failure Rate of Autologous Chondrocyte Implantation After Previous Treatment With Marrow Stimulation Techniques. *Am J Sports Med*, 37(5), S. 902 - 908.

Mirza, M. Z., Swenson, R. D. & Lynch, S. A. (2015). Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques. *Curr Rev Musculoskelet Med* 8(4), S. 452 - 456.

Mithoefer, K., Williams, R., Warren, R., Potter, H., Spock, C., Jones, E., Wickiewicz, T. L. & Marx, R. (2005). The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee: A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am*, 87(9), S. 1911 - 1920.

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 and Cartilage*, 12(7), S. 586 - 596.

Moran, C. J., Pascual-Garrido, C., Chubinskaya, S., Potter, H. G., Warren, R. F., Russell, F., Cole, B. J. & Rodeo, S. A. (2014). Restoration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 96(4), S. 336 - 344.

Müller, B. & Kohn, D. (1999). Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Orthopäde*, 28(1), S. 4.

Nixon, A. J., Fortier, L. A., 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.

Noyes, F. R. & Stabler, C. L. (1989). A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med*, 17(4), S. 505 - 513.

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 Am*, 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(1), S. 1 - 16.

Oláh, T., Reinhard, J., Gao, L., Haberkamp, S., Goebel, L. K. H., Cucchiari, M. & Madry, H. (2019). Topographic modeling of early human osteoarthritis in sheep. *Sci Transl Med*, 11(508), eaax6775.

Orth, P. (2008). Gentransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur.

Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Madry, H. & Cucchiari, M. (2014). Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 16(7), S. 1 – 17.

Orth, P., Gao, L. & Madry, H. (2019). Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc*, 28(3), S. 607 - 706.

Orth, P., Weimer, A., Kaul, G., Kohn, D., Cucchiari, M. & Madry, H. (2008). Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol*, 38(2), S. 137 - 144.

Orth, P., Alini, M., Zurakowski, D., Cucchiari, M. & Madry, H. (2013a). 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. (2011a). 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.

Orth, P., Goebel, L., Wolfram, U., Ong, M. F., Gräber, S., Kohn, D., Cucchiari, M., Ignatius, A., Pape, D. & Madry, H. (2012). 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., Kaul, G., Cucchiari, M., Zurakowski, D., Menger, M. D., Kohn, D. & Madry, H. (2011b). Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc*, 19(12), S. 2119 - 2130.

Orth, P. & Madry, H. (2013b). A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. *BMC Musculoskeletal Disord*, 14(5), S. 1 - 8.

Ortved, K. F., Begum, L., Mohammed, H. O., & Nixon, A. J. (2015). Implantation of rAAV5-IGF-I transduced autologous chondrocytes improves cartilage repair in full-thickness defects in the equine model. *Mol Ther*, 23(2), S. 363 - 373.

Outerbridge, R. (1961). The etiology of the chondromalacia patellae. *Bone Joint Surg Am*, 43(B), S. 752 - 757.

Pape, D., Filardo, G., Kon, E., van Dijk, C. N. & Madry, H. (2010). Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc*, 18(4), S. 448 - 462.

Pascher, A., Palmer, G. D., Steinert, A., Oligino, T., Gouze, E., Gouze, J. N., Betz, O., Spectro, M., Robbins, P. D., Evans, S. C. & Ghivizzani, S. C. (2004). Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther*, 11(2), S. 131 - 141.

Pridie K. H. (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Joint Surg Br*, 41, S. 618 - 619.

Qi, Y., Du, Y., Li, W., Dai, X., Zhao, T. & Yan, W. (2014). 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.

Rey-Rico, A., Madry, H. & Cucchiari, M. (2016). Hydrogel-Based Controlled Delivery Systems for Articular Cartilage Repair. *BioMed Res Int*, 2016 (1215263), S. 1 - 15.

Rogachefsky, R. A., Dean, D. D., Howell, D. S. & Altman, R. D. (1993). Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis Cartilage*, 1(2), S. 105 - 114.

Salzmann, G. M., Erdle, B., Porichis, S., Uhl, M., Ghanem, N., Schmal, H., Kubosch, D., Südkamp, N. P. & Niemeyer, P. (2014). Long-term T2 and qualitative MRI morphology after first-generation knee autologous chondrocyte implantation: Cartilage ultrastructure is not correlated to clinical or qualitative MRI outcome. *Am J Sports Med*, 42(8), S. 1832 - 1840.

Sanders, T. L., Pareek, A., Obey, M. R., Johnson, N. R., Carey, J. L., Stuart, M. J. & Krych, A. J. (2017). High rate of osteoarthritis after osteochondritis dissecans fragment excision compared with surgical restoration at a mean 16-Year Follow-up. *Am J Sports Med*, 45(8), S. 1799 - 1805.

Schmal, H. (2017). Knorpelverletzungen am Kniegelenk, *Orthopädie und Unfallchirurgie. Up2date*, (12), S. 179 - 197.

Schwendener, R. A. (2007). Liposomes in biology and medicine. *Adv Exp Med Biol* (620), S. 117 - 128.

Sellers, R. S., Peluso, D. & Morris, E. A. (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. J. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of the full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75(4), S. 532 - 553.

Shi, S., Mercer, S., Eckert, G. J. & Trippel, S. B. (2013). Growth factor transgenes interactively regulate articular chondrocytes. *J Cell Biochem*, 114(4), S. 908 - 919.

Shida, J. I., 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.

Simon, T. M. & Jackson, D. W. (2018). Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports Med Arthrosc Rev* 26(1), S. 31 - 39.

Smith, G. D., Taylor, J., Almqvist, K. F., Erggelet, C., Knutsen, G., Portabella, M. G., Smith, T. & Richardson, J. B. (2005). Arthroscopic assessment of cartilage repair: A validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy*, 21(12), S. 1462 - 1467.

Sohier, J., Hamann, D., Koenders, M., Cucchiari, M., Madry, H., van Blitterswijk, C., de Groot, K. & Bezemer, J. M. (2007). Tailored release of TGF- $\beta$ 1 from porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Pharm*, 332(1 - 2), S. 88 - 89.

Steadman, J R, Rodkey, W. G., Briggs, K. K. & Rodrigo, J. J. (1999). Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde*, 28(1), S. 26 - 32.

Steadman, J. Richard, Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J. & Rodkey, W. G. (2003). Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 19(5), S. 477 - 484.

Sun, Y., Kwak, J. M., Kholinne, E., Zhou, Y., Tan, J., Koh, K. H. & Jeon, I. H. (2020). Small Subchondral Drill Holes Improve Marrow Stimulation of Rotator Cuff Repair in a Rabbit Model of Chronic Rotator Cuff Tear. *Am J Sports Med* 48(3), S. 706 - 714.

Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. (2003). Progress and Problems With the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nat Rev Genet* 4(5), S. 346 - 358.

Tripathy, S. K., Black, H. B., Goldwasser, E. & Leiden, J. M. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovims vectors. *Nat Med*, 2(5), S. 545 - 550.

Trippel, S. (1997). Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect*, (46), S. 473 – 476.

Trippel, S., Van Wyk, J., Foster, M. & Svoboda, M. (1983). Charaterization of a specific somatomedian-c receptor on insolated bovine growth plate chondrocytes. *Endocrinology*, 112(6), S. 2128 - 2136.

Trippel, S., Corvol, M. T., Dumontier, M. F., Rappaport, R., Hung, H. H. & Mankin, H. J. (1989). Effect of the somatomedin-C/insulin like-growth factor-I and growth hormone on cultured growth plate articular chondrocytes. *Pediatr Res*, 25(1), S. 76 – 82.

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

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.

Tyler, J. (1989). Insulin-like growth factors I can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J*, 260(2), S. 543 - 548.

Ulrich-Vinther, M., Duch, M. R., Søballe, K., O'Keefe, R. J., Schwarz, E. M. & Pedersen, F. S. (2004). In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector. *J Orthop Res*, 22(4), S. 726 - 734.

Vainieri, M. L., Lolli, A., Kops, N., D'Atri, D., Eglin, D., Yayon, A., Alini, M., Grad, S., Sivasubramaniya, K. & van Osch, G. J. V. M. (2020). Evaluation of biomimetic hyaluronic-based hydrogels with enhanced endogenous cell recruitment and cartilage matrix formation. *Acta Biomater* 101(1), S. 293 - 303.

van Beuningen, H. M., van der Kraan, P. M., Arntz, O. J. & van den Berg, W. B. (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.

Vandenberghe, L. & Wilson, J. (2007). AAV as An Immunogen. *Current Gene Ther*, 7(5), S. 325 - 333.

Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. & Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76(4), S. 579 - 592.

---

Walter, C., Trappe, D., Beck, A., Jacob, C., & Krister Hoffmann, U. (2020). Effect of graft positioning on dissipated energy in knee osteochondral autologous transplantation. *J Orthop Res*, *in press*, doi: 10.1002/jor.24612.

Weimer, A., Madry, H., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Frisch, J., Wezel, A., Jung, J., Kohn, D., Terwillinger, E. F., Trippel, S. B. & Cucchiari, M. (2012). Benefits of Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV)- Mediated Insulinlike 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(1)*, S. 346 - 358.

Worster, A. A., Brower-Toland, B. D., Fortier, L. A., Bent, S. J., Williams, J. & Nixon, A. J. (2001). Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- $\beta$ 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res*, *19(4)*, S. 738 - 749.

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.

Yei, S., Mittereder, N., Tang, K., O'Sullivan, C. & Trapnell, B. C. (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.

Zhang, Z., Li, L., Yang, W., Cao, Y., Shi, Y., Li, X. & Zhang, Q. (2017). The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, *25(2)*, S. 309 - 320.



## 10. Publikationen

### Manuskript:

Maihöfer, J., Madry, H., Rey-Rico, A., Goebel, L., Oláh, T., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Speicher-Mentges, S., Gao, L., Zurakowski, D., Menger, M. D., Laschke M. W., Cucchiarini, M. (submitted). Hydrogel-guided, rAAV-mediated overexpression of IGF-I improves long-term cartilage repair and protects against perifocal osteoarthritis in a large animal model of chondral defects *in vivo*. Manuskript eingereicht im Journal: „*Bio-materials*“ am 01.02.2020. Status „*Under Review*“ (24.04.2020).

## 11. Danksagungen

Die vorgelegte Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroserforschung der Universität des Saarlandes geschrieben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

*Herrn Prof. Dr. med. Henning Madry*, meinem Doktorvater, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, sowie für die Planung und Organisation der durchgeführten Studie. Zudem für die konstruktiven Diskussionen und die schnelle und ausführliche Korrektur meiner Arbeit.

*Frau Prof. Dr. rer. nat. Magali Madry* für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten, die hilfreichen Diskussionen, die Korrektur des Papers und für die Herstellung der rAAV-Vektoren.

*Herrn Dr. med. Lars Goebel* für die konstruktiven Ratschläge zu Methode und Statistik.

*Herrn Dr. rer. nat. Tamás Oláh* für die Unterstützung bei der Auswertung der Mikro-CT-Analyse und deren graphischer Darstellung.

*Frau Gertrud Schmitt* für die kompetente und freundliche Unterstützung im Labor.

*Frau Susanne Speicher-Mentges* für die kompetente und freundliche Unterstützung im Labor.

*Frau Dr. rer. nat. Ana Rey Rico* für die Herstellung und Vorbereitung der implantieren rAAV-Vektoren.

*Herrn Dr. rer. nat. Andreas Müller* für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der magnetresonanztomographischen Analyse der Proben.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern *Elke* und *Conrad Maihöfer* sowie meinem Partner *Felix Timmer* für die Korrekturen, die Motivation und Unterstützung in jeder Phase der Entstehung der Arbeit.

## **12. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.