

Aus dem
Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung
Universität des Saarlandes
Prof. Dr. med. H. Madry

**rAAV-vermittelter Gentransfer von humanem
IGF-I verbessert die Reparatur der
osteocondralen Einheit im translationalen
Schafmodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2025

Vorgelegt von: Carolin Michaela Peifer

Geboren am 17. November 1988 in Zweibrücken

Tag der Promotion:

05.08.2026

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Hannig

Berichterstatter

Prof. Dr. Henning Madry

Prof. Dr. Matthias W. Laschke

Prof. Dr. Tobias Winkler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Anmerkung der Autorin	IX
1. Zusammenfassung	1
Abstract:	3
2. Einführung	5
2.1 Übersicht und Problematik	5
2.2 Biologische Grundlagen	6
2.2.1 Gelenkknorpel	6
2.2.2 Mikroskopischer Aufbau	7
2.3 Einteilung der Knorpeldefekte	8
2.4 Therapiestrategien	9
2.4.1 Aktuelle Therapiestrategien für fokale Knorpeldefekte	9
2.4.2 Experimentelle Therapieansätze.....	12
2.5.1 Grundlagen der Gentherapie	13
2.5.2 Gentransfersysteme.....	14
2.5.3 Nicht-viraler Gentransfer (Transfektion)	14
2.5.4 Viraler Gentransfer (Transduktion).....	15
2.5.6 rAAV-Vektor	16
2.5.7 Gentransferstrategie	17
2.6 Therapeutische Kandidaten	18
2.6.1 Allgemein	18
2.6.2 Wachstumsfaktoren in der Therapie fokaler Knorpelschäden	18
2.6.3 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I)	19
2.7 Gentransfer-basierte Therapie fokaler Gelenkknorpeldefekte	20

3. Hypothesen	21
4. Studiendesign	22
5. Material.....	23
5.1 Lösungen, Puffer, Medien	23
5.2 Chemikalien und Enzyme	25
5.3 Antikörper	26
5.4 Tierstämme	26
5.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
5.6 Computerprogramme	28
5.7 Operationsinstrumentarium und –materialien.....	28
5.8 Verbrauchsmaterialien.....	28
6. Methoden.....	29
6.1 Operation	29
6.2 Sektion und Probengewinnung.....	30
6.3 Makroskopische Evaluation der Gelenkknorpeldefekte	31
6.4 Mikrofokus-Computertomographie.....	33
6.4.1 Durchführung der Mikrofokus-Computertomographie	34
6.4.2 Definierung der Volumina von Interesse (<i>volumes of interest, VOI</i>)	34
6.4.2 Analyse der benachbarten Areale und Normwerte	36
6.4 Histologische Evaluation	37
6.4.1 Herstellung der histologischen Präparate.....	37
6.4.2 Histologische Färbung	38
6.4.3 Vorbereitung der Färbung.....	38
6.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38
6.4.5 Masson-Goldner-Färbung	39
6.4.6 Toluidin-Blau-Färbung.....	39
6.4.7 Safranin-Orange-Echtgrün-Färbung	40
6.5 Mikroskopische Evaluation des Reparaturgewebes innerhalb des Defektareals ...	41
6.6 Evaluation von degenerativen Schäden im angrenzenden Knorpel	43
6.7 Polarisationsmikroskopie	45
6.8 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes	45

6.8.1 Hoechst 33258 Test (DNS-Bestimmung)	45
6.8.2 Protein-Bestimmung (bicinchoninic acid Test; BCA-Test).....	46
6.8.3 Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)	47
6.9 Immunhistochemische Untersuchungen	47
6.9.1 Evaluation der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen und Typ-II-Kollagen	48
6.9.2 Evaluation der Immunreaktivität für IGF-I	49
6.10 Statistische Analysen.....	49
7. Ergebnisse	51
7.1 Reparatur des Gelenkknorpels.....	52
7.1.1 Makroskopische Begutachtung des Reparaturgewebes.....	52
7.1.2 Ergebnisse der biochemischen Evaluation des Reparaturgewebes.....	54
7.1.3 Histologische Beurteilung der osteochondralen Reparatur.....	55
7.1.4 Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes	60
Nachweis der Überexpression von IGF-I	60
Analyse der Immunreaktivität von Typ-II-Kollagen.....	60
Analyse der Immunreaktivität von Typ-I-Kollagen.....	61
7.1.5 Polarisationsmikroskopie	62
7.2 Reparatur des subchondralen Knochens	62
7.2.1 Auswertung der subchondralen Knochenplatte im Defekt	62
7.3.2 Auswertung der subartikulären Spongiosa im Defekt	63
7.3 Beurteilung der benachbarten Areale	66
7.3.1 Mikroskopische Analyse von arthrotischen Veränderungen im perifokal benachbarten Knorpel	66
7.3.2 Mikro-CT Analyse der angrenzenden subchondralen Knochenplatte und subartikulären Spongiosa.....	69
7.4 Ergebnisse der multivarianten Analysen und Rangkorrelationen nach Spearman	72
8. Diskussion.....	75
8.1 Vektor basierte Verfahren	76
8.2 Eignung des Schafes als Tiermodell für osteochondrale Reparatur	77
8.3 Bewertungssysteme zur Evaluation des Defektareales	78
8.3.1 Operativer Zugang.....	80
8.4 Reparatur des Gelenkknorpels.....	80
8.4.1 Makroskopische Beurteilung des Reparaturgewebes	80

8.4.2 Histologische und immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes	81
8.4.3 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes	83
8.5 Reparatur des subchondralen Knochens	84
8.6 Effekte des rAAV basierten Gentransfers mittels IGF-I auf den angrenzenden Knorpel	86
8.6.1 Wirkung auf die makroskopische und histologische Evaluation des angrenzenden Knorpels	86
8.6.2 Veränderungen des angrenzenden subchondralen Knochens	88
8.7 Schwächen und Stärken der Studie	88
 9. Klinische Relevanz und Ausblick.....	90
 10. Literaturverzeichnis.....	91
 11. Publikationen.....	105
 12. Danksagungen.....	106
 13. Lebenslauf	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau der osteochondralen Einheit	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Studiendesigns.....	22
Abbildung 3: Chirurgische Anlage der osteochondralen Defekte.....	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>regions of interest</i> (ROI) an einem mikrocomputertomographischen Schnittbild.....	36
Abbildung 5: Gegenüberstellung der genutzten Färbemethoden	40
Abbildung 6: Histologische Beurteilung eines osteochondralen Defektes durch das Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	41
Abbildung 7: Histologische Beurteilung des perifokal angrenzenden Knorpels durch das Bewertungssystem nach Little <i>et al.</i>	43
Abbildung 8: Darstellung der Defektauswertung an der Schafstrochlea	51
Abbildung 9: Makroskopische Begutachtung der Defektreparatur	53
Abbildung 10: Ergebnisse der histologischen Auswertung durch das Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	56
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der histologischen Evaluation durch das Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	59
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung gegen IGF-I im Defektgewebe.....	60
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung gegen Typ-II-Kollagen.....	61
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung gegen Typ-I-Kollagen.....	61
Abbildung 15: Polarisationsmikroskopische Darstellung	62
Abbildung 16: Analyse der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens im Defekt ..	65
Abbildung 17: Darstellung der Auswertung durch das Bewertungssystem nach Little <i>et al.</i>	66
Abbildung 18: Grafische Darstellung der histologischen Analysen des benachbarten Knorpels.....	67
Abbildung 19: Ergebnisse der einzelnen Kategorien durch das Bewertungssystem nach Little <i>et al.</i>	68
Abbildung 20: Analyse der Mikroarchitektur des angrenzenden subchondralen Knochens.....	70
Abbildung 21: Ergebnis multivarianter Analysemethoden.....	72
Abbildung 22: Streudiagramm und lineare Regressionsanalyse nach Spearman.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen, Puffer, Medien	23
Tabelle 2: Chemikalien und Enzyme	25
Tabelle 3: Antikörper	26
Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 5: Computerprogramme	28
Tabelle 6: Modifiziertes makroskopisches Bewertungssystem aus Oswestry	32
Tabelle 7: Makroskopisches Homburger Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i>	33
Tabelle 8: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers <i>et al.</i>	42
Tabelle 9: Bewertungssystem zur Beurteilung des benachbarten Knorpels nach Little <i>et al.</i>	44
Tabelle 10: Standardreihe Hoechst 33258	45
Tabelle 11: Mischungsstandard BSA für BCA-Test.....	46
Tabelle 12: Mischungsstandard DMMB-Test.....	47
Tabelle 13: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.....	49
Tabelle 14: Ergebnisse nach dem Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i>	53
Tabelle 15: Ergebnisse nach dem Bewertungssystem aus Oswestry	54
Tabelle 16: Ergebnisse der biochemischen Auswertung	54
Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Evaluation nach dem Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	58
Tabelle 18: Darstellung der Mikro-CT Messwerte der Korticalis im Defektareal	63
Tabelle 19: Darstellung der Mikro-CT Messwerte der subartikulären Spongiosa im Defektareal.....	64
Tabelle 20: Auswertung des benachbarten Knorpels durch das Bewertungssystem nach Little <i>et al.</i>	67
Tabelle 21: Darstellung der Mikro-CT Messwerte im angrenzenden subchondralen Knochen.....	71

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
aqua bidest.	<i>aqua bidestillata</i>
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bit	Binärziffer (<i>binary digit</i>)
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)
BMP-2	Knochenmorphogenetisches Protein 2 (<i>bone morphogenetic protein 2</i>)
BS/BV	Verhältnis Knochenoberfläche/Volumen (<i>bone surface/ bone volume</i>)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)
BV/TV	Knochenvolumen Anteil (<i>bone volume fraction</i>)
bzw.	beziehungsweise
cDNS	komplementäre (<i>copied</i>) Desoxyribonukleinsäure
DA	Geometrischer Grad der Anisotropie
DAB	3'3 Diaminobenzidin
DMMB	Dimethylmethylenblau (<i>dimethylmethylene blue</i>)
dSDNS	Dopplesträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	auf Englisch
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (<i>fibroblast growth factor 2</i>)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
ICRS	<i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>
IGF-I	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (<i>insulin-like growth factor I</i>)
IGFBP 1-6	IGF-I Bindeproteine 1-6 (<i>insulin-like growth factor-binding protein</i>)
IL-1, IL-17	Interleukin 1 und 17
kB	Kilobasen
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt

I	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
M	mol
mA	Milliampere
MACT	Matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomografie
ms	Millisekunde(n)
n.s.	nicht signifikant
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
nm	Nanometer
OA	Arthrose (<i>osteoarthritis</i>)
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
rAAV-Vektor	rekombinanter adeno-assoziiertes viraler Vektor
ROI	Bereiche von Interesse (<i>regions of interest</i>)
s	Sekunde
SAS	Subartikuläre Spongiosa (<i>subarticular spongiosa</i>)
SCBP	Subchondrale Knochenplatte (<i>subchondral boneplate</i>)
SMI	Struktur Model Index (<i>structure model index</i>)
SOX9	SRY-Box-Transkriptionsfaktor 9, <i>SRY (sex determining region Y)-related HMG Box 9</i>
Tb. N	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)
Tb. Pf	Trabekulärer Musterfaktor (<i>trabecular pattern</i>)
Tb. Sp	Trabekuläre Separation (<i>trabecular separation</i>)
Tb. Th	Trabekeldicke (<i>trabecular thickness</i>)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TNE	Tris-HCl- NaCl-EDTA-Pufferlösung
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
U	Einheiten (<i>units</i>)
VOI	Volumen von Interesse (<i>volumes of interest</i>)
μCT	Mikrofokus-Computertomographie
μg	Mikrogramm
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
μl	Mikroliter

Anmerkung der Autorin

Die dieser Dissertation zu Grunde liegende Studie wurde bereits in u. g. wissenschaftlicher Zeitschrift in englischer Sprache veröffentlicht [142]. Die Autorin dieser Dissertation ist Erstautorin der Veröffentlichung.

Peifer C, Oláh T, Venkatesan JK, Goebel L, Orth P, Schmitt G, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiaroni M, Madry H. Locally Directed Recombinant Adeno- Associated Virus-Mediated IGF-1 Gene Therapy Enhances Osteochondral Repair and Counteracts Early Osteoarthritis In Vivo. *Am J Sports Med.* 2024 Apr;52(5):1336-1349

1. Zusammenfassung

Vorlage für Zusammenfassung und Abstract: Peifer et al. [142]

Hintergrund: Osteochondrale Defekte stellen ein großes Behandlungsproblem in Orthopädie und Unfallchirurgie dar. Sie weisen keine Spontanheilung auf und führen auf lange Sicht zu Gelenkbeschwerden und Arthrose. Neben etablierten Verfahren, stellt die Gentherapie einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung osteochondraler Defekte dar. Wachstumsfaktoren, zu denen auch der insulinähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) gehört, stimulieren spezielle Mechanismen der osteochondralen Reparatur.

Hypothese: In dieser Arbeit wurden im translationalen Großtiermodell die Hypothesen getestet, dass die Überexpression von IGF-I durch rekombinante Adeno-assoziierte virale (rAAV) Vektoren (rAAV-IGF-I) die osteochondrale Reparatur verbessert und Parameter der frühen perifokalen Arthrose nach sechs Monaten *in vivo* reduziert.

Methoden: Standardisierte zirkuläre osteochondrale Defekte (Durchmesser 3,5 mm, Tiefe 5 mm) wurden bilateral in der *Trochlea lateralis femoris* von ausgewachsenen weiblichen Merinoschafen erzeugt und mit rAAV-IGF-I oder rAAV-*lacZ* (Kontrolle) behandelt (n = 24 Defekte in n = 6 Kniegelenke pro Gruppe). Nach sechs Monaten *in vivo* wurden die osteochondrale Reparatur und die perifokale Arthrose durch etablierte makroskopische, histologische und immunhistochemische Bewertungssysteme sowie biochemische und mikrocomputertomographische Auswertungen beurteilt.

Ergebnisse: Die Applikation von rAAV-IGF-I führt zu einer längeren (sechs Monate) IGF-I Überexpression ohne erkennbare Nebenwirkungen, wodurch eine deutlich bessere Gesamtknorpeldefektreparatur erreicht wurde. Das Reparaturgewebe der Behandlungsgruppe zeigte eine deutlich verbesserte Defektfüllung, Färbung der extrazellulären Matrix, Zellmorphologie und Oberflächenarchitektur im Vergleich zu rAAV-*lacZ*. Die Expression von Typ-II-Kollagen sowie der

Proteoglykangehalt in der IGF-I-Gruppe nahm signifikant zu, die Expression von Typ-I-Kollagen verringerte sich signifikant. Die subchondrale Knochenreparatur und Neubildung der *Tidemark* wurden deutlich verbessert, die Dicke der subchondralen Knochenplatte und die Knochenmineraldichte der subchondralen Spongiosa normalisierten sich wieder. Die Arthrose-Parameter perifokale Struktur, Zellklonierung und Färbung der extrazellulären Matrix blieben bei rAAV-IGF-I im Vergleich zu rAAV-*lacZ* deutlich besser erhalten. Weiterhin wurden neue mechanistische Zusammenhänge zwischen Parametern der osteochondralen Reparatur und der Arthrose identifiziert.

Schlussfolgerung: Der rAAV-vermittelte Gentransfer erzielte eine prolongierte Überexpression von IGF-I über den Zeitraum von sechs Monaten. Dieser verbesserte die osteochondrale Reparatur im klinisch relevanten Schafmodell nach sechs Monaten *in vivo* ohne Anzeichen ungewünschter Nebenwirkungen. Zudem hemmte die Applikation von rAAV-IGF-I wesentliche Parameter der Entwicklung perifokaler Arthrose. Diese Ergebnisse könnten zur weiteren Entwicklung von gentherapeutisch-basierten Strategien zur Therapie osteochondraler Defekte beim Patienten helfen.

Abstract:

Background: Osteochondral defects are a major treatment problem in orthopedic and trauma surgery. They do not heal spontaneously and can lead to joint problems and osteoarthritis (OA) over time. In addition to established procedures, gene therapy represents a promising approach to the treatment of osteochondral defects. Growth factors, including insulin-like growth factor I (IGF-I), stimulate specific mechanisms of osteochondral repair.

Hypothesis: This study investigates the hypotheses that overexpression of IGF-I by using recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors (rAAV-IGF-I) improves osteochondral repair and reduces parameters of early perifocal OA in a translational large animal model after 6 months *in vivo*.

Methods: Standardized circular osteochondral defects (diameter 3.5 mm, depth 5 mm) were created bilaterally in the *trochlea lateralis femoris* of adult female merino sheep and treated with rAAV-IGF-I or rAAV-*lacZ* (control) (n = 24 defects in n = 6 knees per group). After 6 months *in vivo*, osteochondral repair and perifocal OA were assessed by established macroscopical, histological, and immunohistochemical scoring systems as well as biochemical and microcomputed tomographic evaluations.

Results: Application of rAAV-IGF-I lead to prolonged (6 months) IGF-I overexpression with no detectable side effects, resulting in significantly better overall cartilage repair. The repair tissue of the treatment group showed significantly improved defect filling, extracellular matrix staining, cell morphology and surface architecture compared to rAAV-*lacZ*. The expression of type II collagen and the proteoglycan content in the IGF-I group increased significantly, while the expression of type I collagen decreased significantly. Subchondral bone repair and new tidemark formation were significantly improved, the thickness of the subchondral bone plate and the bone mineral density of the subchondral spongiosa returned to normal. The OA parameters perifocal structure, cell cloning and staining of the extracellular matrix were significantly better preserved with

rAAV-IGF-I compared to rAAV-*lacZ*. Furthermore, new mechanistic relationships between osteochondral repair parameters and OA were identified.

Conclusion: The rAAV-mediated gene transfer achieved prolonged overexpression of IGF-I over the 6-month period. This improved osteochondral repair in the clinically relevant sheep model after 6 months *in vivo* without signs of adverse side effects. In addition, application of rAAV-IGF-I suppressed key parameters of perifocal OA development. These results could help in the further development of gene therapy-based strategies for the treatment of osteochondral defects in patients.

2. Einführung

2.1 Übersicht und Problematik

Knorpelschäden sind ein weit verbreitetes Krankheitsbild. Sie entstehen häufig im Rahmen von Traumata oder als Folge der Arthrose, seltener durch Störungen des subchondralen Knochens bei Osteonekrose, Osteochondrosis dissecans oder durch metabolische Erkrankungen [25, 147]. Gelenkknorpeldefekte verursachen oft Schmerzen, Schwellneigung sowie eine eingeschränkte Beweglichkeit eines Gelenkes [33, 79, 94]. Die Schwierigkeit in der Behandlung von Knorpelschäden besteht darin, dass adulter Gelenkknorpel aufgrund seiner biologischen Eigenschaften nur eine geringe intrinsische Heilungskapazität besitzt [25, 95].

Osteochondrale Defekte nehmen eine Sonderstellung unter den Knorpeldefekten ein, da sich der Schaden über den hyalinen Knorpel hinaus bis in den subchondralen Knochen fortsetzt. Durch diese Verbindung zum Markraum kann sich ein Blutgerinnsel bilden, welches sich im Verlauf zu Faserknorpel differenziert [50]. Faserknorpel weist zwar Ähnlichkeiten gegenüber hyalinem Knorpel auf, ist ihm jedoch in struktureller und funktioneller Hinsicht unterlegen und der mechanischen Belastung auf Dauer nicht gewachsen [94], weshalb sich ausgehend von einem Knorpeldefekt eine sekundäre Arthrose ausbreiten kann [22, 93, 99, 106, 168]. Trotz etablierter Therapieansätze stellt die Behandlung fokaler Knorpelschäden weiterhin ein ungelöstes Problem dar, da es bislang nicht gelungen ist, Knorpelschäden durch gleichwertiges Gewebe aufzufüllen oder ihn zur Regeneration anzuregen [8, 25, 27, 98, 113, 125].

Neue innovative Therapieansätze liegen in der Gentherapie. Durch Gentherapie ist es möglich, Reparaturvorgänge innerhalb eines osteochondralen Defektes zu fördern, indem chondroreparative Botenstoffe wie beispielsweise Wachstumsfaktoren durch Gentransfer im Defekt bereitgestellt werden [8, 25, 91, 92, 100, 167, 177]. Insbesondere die Verwendung des rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektors gilt als hocheffiziente, sichere Art Gentransfer durchzuführen [8, 25, 99, 152] und eine Transgenexpression über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen [5, 22, 24, 105, 152]. Die Anwendung von

insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I) erscheint vielversprechend, um die Reparatur osteochondraler Defekte zu verbessern (24, 42, 103, 105), da dieser simultan die Matrix-Synthese der extrazellulären Matrix stimuliert und die Proliferation von Chondrozyten fördert [44, 103, 185]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass der Gentransfer von IGF-I durch rAAV-Vektoren die Reparatur von osteochondralen Defekten im Schafmodell *in vivo* über einen Untersuchungszeitraum von sechs Monaten verbessert.

2.2 Biologische Grundlagen

2.2.1 Gelenkknorpel

Knorpelgewebe ist ein Stützgewebe mesenchymaler Herkunft. Es besteht aus Chondrozyten (Knorpelzellen), welche in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix sind Proteoglykane und Kollagenfibrillen, welche die biomechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe maßgeblich bestimmen [145]. Knorpel zeichnet sich durch eine druckelastische, feste, formstabile Konsistenz aus. Je nach Anteil zusätzlicher Matrix-Komponenten, kann man ihn in drei Gruppen einteilen: Hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel.

Hyaliner Knorpel stellt die häufigste Art dar und fungiert als Gelenküberzug [145]. Dort ermöglicht er durch seine glatte Oberfläche ein reibungsloses Gleiten der Gelenkflächen gegeneinander [137, 170]. Hyaliner Knorpel ist belastbar, formstabil und druckelastisch, sodass er wie ein Stoßdämpfer fungiert und die auf ihn einwirkenden Kräfte gleichmäßig auf den unter ihm liegenden Knochen verteilt [57]. Hyaliner Gelenkknorpel ist ein bradytrophes, avaskuläres, anervales und alymphatisches Gewebe [125]. Chondrozyten werden durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit ernährt. Sie stellen beim Erwachsenen nur etwa 2-5 % der Knorpelmasse und produzieren die extrazelluläre Matrix, in die sie eingebettet sind [14]. Mit zunehmendem Alter reduzieren sie ihre mitotische als auch metabolische Aktivität und sprechen weniger auf Wachstumsfaktoren an [14, 15]. Die extrazelluläre Matrix ist ein kompliziertes dreidimensionales Netzwerk aus Kollagenfibrillen und Proteoglykanen [17]. Typisch für hyalinen Gelenkknorpel ist

der hohe Anteil an Typ-II-Kollagen [7]; weiterhin finden sich aber auch noch Kollagene vom Typ V, VI, IX, X, XI und XVI sowie weitere Makromoleküle [145]. Unter dem Polarisationsmikroskop ist die arkadenartige Anordnung der Kollagenfibrillen erkennbar, welche lichtmikroskopisch verborgen bleibt [137]. Diese Anordnung ist ein wesentlicher Stabilisator des Knorpels und mitverantwortlich für seine Viskoelastizität. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Knorpelgewebes sind die Proteoglykane mit ihrem Hauptvertreter Aggrecan. Proteoglykane sind makromolekulare Protein-Polysaccharid-Komplexe, welche stark hydrophil wirken, daher eine hohe Wasserbindungsstärke besitzen und für den hohen hydrodynamischen Druck des Knorpelgewebes verantwortlich sind [158, 170]. Knorpel besteht zu mehr als 70 % aus Wasser. Der hohe Anteil an Proteoglykanen ermöglicht es, dass er sowohl verformbar ist, aber nach Nachlassen der Kraft wieder in seine ursprüngliche Form zurückkehrt [149, 158]. Diese biomechanische Eigenschaft wird als Druckelastizität oder auch Viskoelastizität bezeichnet und ist das Resultat des Zusammenspiels zwischen Proteoglykanen und Kollagenfibrillen. Bei Belastung wird Wasser an die Umgebung abgegeben, welches bei Entlastung wieder zurückströmt. Hierdurch erklärt sich die Ernährung des Knorpels durch Diffusion, welche durch das Walken bei Bewegung gewährleistet wird [158, 170].

2.2.2 Mikroskopischer Aufbau

Hyaliner Knorpel zeigt mikroskopisch eine zonale Gliederung, welche durch die jeweils charakteristische Anordnung der Chondrozyten bestimmt wird [145]. Diese lagern sich zu sogenannten Chondronen zusammen. Chondrone sind isogene Gruppen, welche während der Entwicklung entstehen und von extrazellulärer Matrix umgeben sind. Der Gelenkknorpel bildet vier Schichten. Oberflächlich zum Gelenk hin liegt die *Lamina splendens*, welche durch abgeflachte horizontal verlaufende Chondrozyten gekennzeichnet ist. Es folgt die Tangentialzone mit abgeflachten Chondrozyten. Die breiteste Schicht bildet die Transitionalzone, in welcher die Chondrozyten typischerweise säulenartig angeordnet sind. Als *Tidemark* bezeichnet man die Grenze zwischen dem kalzifizierten Knorpelgewebe und der Transitionalzone. Im kalzifizierten Knorpel liegen hypertrophe

Chondrozyten. Hier wird über feste Verbindungen die Übertragung von Scherkräften vom Gelenkknorpel auf den subchondralen Knochen ermöglicht [126]. Unter dem Polarisationsmikroskop ist die arkadenartige Anordnung der Kollagenfibrillen sichtbar, welche den Knorpel fest mit dem subchondralen Knochen verankern [137].

2.3 Einteilung der Knorpeldefekte

Gelenkknorpeldefekte werden anhand ihrer Ausdehnungstiefe eingeteilt. Man unterscheidet chondrale von osteochondralen Defekten. Für den klinischen Alltag erscheinen die arthroskopischen Klassifikationen nach Noyes und Stabler von 1989 [121] oder der *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society* (ICRS) [13] am sinnvollsten, allerdings findet auch weiterhin die klassische Klassifikation nach Outerbridge Verwendung [141]. Da sich chondrale und osteochondrale Defekte in ihrer Heilungstendenz elementar unterscheiden ist es wichtig, diese getrennt voneinander zu betrachten [137, 149].

Chondrale Defekte

Chondrale Defekte beschränken sich auf das Knorpelgewebe und werden weiter in oberflächliche, teilschichtige (*partial thickness*) und vollschichtige (*full thickness*) Defekte unterteilt, welche sich bis in den kalzifizierten Knorpel erstrecken. Chondralen Defekte fehlt der Zugang zur Blutversorgung und daher auch zu pluripotenten Stammzellen. Rein chondrale Defekte bereiten initial oft wenige Beschwerden, können aber nur Chondrozyten aus den Randzonen des Defektes sowie Synovialzellen zur Reparatur rekrutierten, sodass sie nur zum Teil mit minderwertigem Reparaturgewebe gefüllt werden und schicksalhaft zu einer Knorpeldegeneration der angrenzenden Bereiche führen [71, 137].

Osteochondrale Defekte

Penetriert der vollschichtige Knorpeldefekt auch den subchondralen Knochen, so liegt ein osteochondraler Defekt vor. Sie entstehen häufig als Folge eines Traumas. Durch die bei einem osteochondralen Defekt bestehende Verbindung zwischen Knorpel und Knochenmark kann sich ein Blutgerinnsel im Defekt bilden, in welches

pluripotente mesenchymale Stammzellen migrieren, die sich unter dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu Chondrozyten differenzieren und die Neubildung von faserknorpeligem Reparaturgewebe ermöglichen [74, 165]. Dennoch kommt es um den Defekt herum zu degenerativen Veränderungen, welche über einen längeren Zeitraum zu einer unikompartimentellen Arthrose führen kann. Somit sollte das Augenmerk der Therapie nicht nur auf der symptomatischen Behandlung der fokalen osteochondralen Defekte liegen, sondern außerdem langfristig die Entwicklung einer Arthrose verhindern.

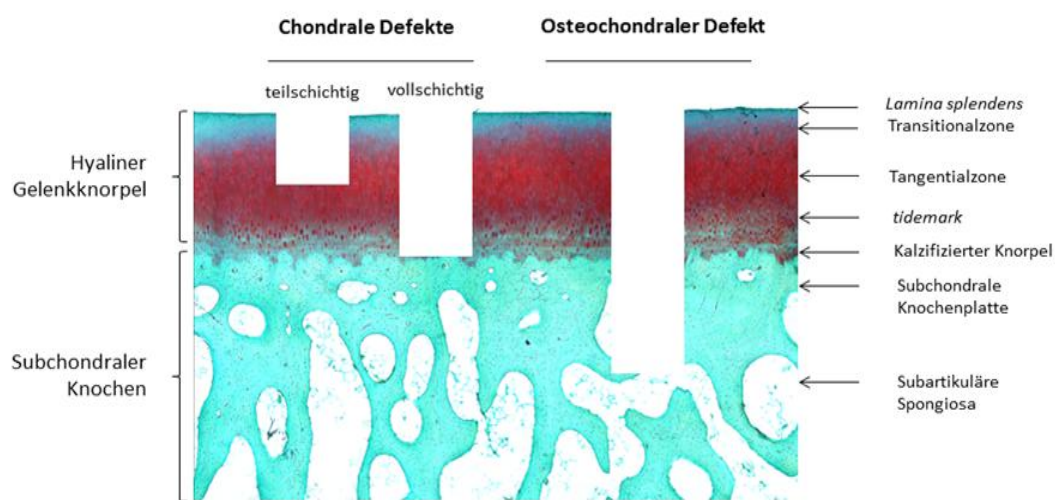


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau der osteochondralen Einheit. Die verschiedenen Defekttiefen der chondralen und osteochondralen Defekte wurden beispielhaft in einer normalen ovinen osteochondralen Einheit eingezeichnet. Färbung: Safranin-O-Echtgrün.

2.4 Therapiestrategien

2.4.1 Aktuelle Therapiestrategien für fokale Knorpeldefekte

In der klinischen Praxis werden verschiedene Verfahren zur Behandlung von fokalen Gelenkknorpelverletzungen genutzt [18, 149, 158]. Ziel dabei ist es eine möglichst schmerzfreie und uneingeschränkte Bewegung des Gelenkes zu ermöglichen und sekundären degenerativen Schäden vorzubeugen [99, 105]. Zu den konservativen Maßnahmen gehören neben Physiotherapie, physikalische Maßnahmen wie Kryotherapie, Wärmetherapie, Elektrotherapie auch intraartikuläre Infiltrationen mit Cortison oder auch Hyaluronsäure sowie die orale

Schmerzmittelgabe [161]. In der klinischen Praxis werden Analgetika nach WHO-Stufenschema verabreicht. Dabei kommen beispielsweise Präparate wie nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAR) bei leichten und kurzfristig nach strenger Indikationsstellung Opioide bei starken Schmerzen zum Einsatz [79]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit durch orthopädietechnische Maßnahmen wie bspw. das Anpassen varisierender oder valgisierender Schuhrenderhöhungen das erkrankte Gelenkkompartiment zu entlasten oder durch das Tragen von Orthesen oder Bandagen zur Stabilisierung des Kniegelenkes beizutragen [99]. Präventiv hilft eine Gewichtsreduktion durch Ernährungstherapie und Bewegungstraining zum langfristigen Erhalt der Gelenkfunktion, Schmerzreduktion sowie zum Herauszögern chirurgischer Maßnahmen [31, 94, 99].

Die operativen Therapieansätze sind indiziert, wenn fokale Knorpelschäden trotz konservativer und medikamentöser Therapie symptomatisch bleiben oder eine Tiefe von 50 % der Knorpeldicke überschreiten [175]. Ziel ist hierbei sekundär degenerative Prozesse aufzuhalten, sodass es sinnvoll ist, frühzeitig tätig zu werden [94]. Zur Auswahl des richtigen operativen Verfahrens müssen verschiedene Parameter in Betracht gezogen werden wie u. a. Defektgröße, Tiefenausdehnung und Lage des Defektes, Ätiologie, Begleitverletzungen, Achsfehlstellungen, aber auch patientenspezifische Eigenschaften wie Alter und Körpermasseindex (BMI), Kooperationsbereitschaft und Aktivitätsniveau sowie Begleiterkrankungen des Patienten spielen für die Auswahl des Verfahrens eine entscheidende Rolle [58, 83, 94]. Man unterscheidet die operativen Therapiestrategien generell in zellbasierte und gewebebasierte Verfahren. Viele gewebebasierte Verfahren nutzen die Eröffnung des Markraumes um eine Verbindung zwischen dem Knochenmark und dem Defekt zu schaffen. Durch die Eröffnung des Markraumes können pluripotente mesenchymale Stammzellen in den Defekt migrieren und sich zu Osteo- und Chondroblasten differenzieren um Reparaturgewebe aus Faserknorpel zu bilden [52, 55, 87]. Im Falle eines gut erhaltenen chondralen oder osteochondralen freien Gelenkkörpers sollte primär versucht werden, diesen in den Defekt einzubringen und zu refixieren.

Operative Therapiestrategien chondraler Defekte

Beispiele für markraumeröffnende Verfahren sind die Pridiebohrung [146], Mikrofrakturierung [171] und die Abrasionsarthroplastik [77]. Markraumeröffnende Verfahren sind bei fokalen Knorpeldefekten mit einer kleinen Fläche von 2-3 cm² Verfahren der ersten Wahl [50, 112]. In der klinischen Praxis angewandt werden neuerdings auch Verfahren, bei denen ein zuvor mit Mikrofrakturierung behandelter Defekt mit einer Kollagenmembran abgedeckt wird, was nach Herstellerangaben zu einer verbesserten Chondrogenese führen soll. Bezüglich eines Vorteils gegenüber etablierter Verfahren besteht jedoch noch keine ausreichende Evidenzlage [51]. Bei 3-10 cm² großen, vollschichtigen chondralen Defekten ist die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) die Therapie der Wahl [4, 58]. Bei der ACT werden in einem ersten Eingriff zunächst gesunde Chondrozyten in einer Knorpelbiopsie gewonnen, in der Zellkultur vermehrt und im Rahmen eines zweiten Eingriffes in den Defekt reimplantiert [11, 82]. Seit das Verfahren der ACT in den 1980er Jahren erstmals beschrieben wurde [11], hat sich die Technik weiterentwickelt, sodass die Chondrozyten aktuell in eine biodegradierbare Matrix eingebettet in den Knorpeldefekt eingebracht werden (MACT, matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation) [3, 12]. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Chondrozyten gleichmäßig in der Matrix verteilt sind und gekoppelt an das Trägermaterial im Defekt verbleiben [93]. Hauptindikation für die MACT sind symptomatische, vollschichtige große Knorpeldefekte bei jungen, sportlich aktiven Patienten (> 3-14 cm²) [83].

Operative Therapiestrategien osteochondrale Defekte

Eine andere Strategie ist die Transplantation von autologem Gewebe wie beispielsweise osteochondraler Zylinder [73]. Autologe zylindrische osteochondrale Transplantate werden mit einer Stanze einer wenig beanspruchten Gelenkregion entnommen und in den Defekt transplantiert. Dieses System ist eine gute Therapieoption zur Behandlung kleiner fokaler Defekte (< 1,5 cm²) [94]. Ein besonders gutes klinisches Ergebnis hat diese Methode bei jüngeren

aktiven Patienten unter Verwendung von einzelnen Zylindern ($< 1,5 \text{ cm}^2$) gezeigt [62, 63, 69]. Die Mosaikplastik, bestehend aus mehreren osteochondralen Zylindern, ist aufgrund möglicher Komplikationen wie Stufenbildung, Dislokation und der Notwendigkeit mehrere Hebedefekte zu erschaffen bei größeren Defekten der ACT unterzuordnen [94, 119], wobei die Techniken sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern auch parallel nebeneinander verwendet werden können. Für große osteochondrale Defekte ist es sinnvoll die sogenannte „Sandwichtechnik“ anzuwenden [123]. Hierbei wird zunächst der Knochen mit einer autologen Spongiosaplastik aufgefüllt und dann mit einer MACT abgedeckt [94]. Bestehen neben einem Knorpeldefekt auch Achsfehlstellungen wie bspw. ein Knorpelschaden der medialen Femurkondyle mit begleitender Varusfehlstellung, so sollte neben dem knorpelchirurgischen Eingriff auch eine lokale Druckentlastung durch eine Umstellung der Beinachse durchgeführt werden, um ein langfristig gutes Ergebnis zu erzielen [33, 39, 48, 66, 78, 148, 162, 164].

Trotz all dieser Bemühungen ist es bislang nicht gelungen ein Verfahren zu entwickeln, was eine suffiziente Knorpelregeneration herbeiführen kann und ein dem natürlichen hyalinen Gelenkknorpel in seinen biomechanischen Eigenschaften ebenbürtiges Reparaturgewebe zu erschaffen [18, 99, 105, 164]. Daher zielen aktuelle Therapien auf eine Steigerung der Lebensqualität durch Schmerzlinderung, Erhalt der Beweglichkeit sowie hinauszögern des endoprothetischen Ersatzes ab [31].

2.4.2 Experimentelle Therapieansätze

Da es durch die klinisch etablierten Therapiestrategien bislang noch nicht gelungen ist eine langfristig anhaltende Knorpelregeneration zu erlangen, wird weiterhin an experimentellen Therapien geforscht [18, 25]. Es besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von chondrogenen Faktoren, welche in die Knorpelhomöostase eingreifen, fokale Gelenkknorpeldefekte zu behandeln. Das Ziel ist es die Knorpelmasse zu steigern indem entweder anabole Prozesse gefördert oder katabole Prozesse gehemmt werden [60]. Die Applikation solcher Faktoren kann direkt in das Gelenk erfolgen [76, 187], wobei die kurze

Halbwertszeit der rekombinanten Faktoren von wenigen Minuten den Effekt mindert [20, 32]. Eine langanhaltende, effektive Stimulation im Knorpeldefekt kann durch den Einsatz von gentransferbasierten Therapiekonzepten erreicht werden [22, 25]. Dadurch, dass das therapeutische Gen isoliert, in seine cDNS umgeschrieben und in einen Gentransfervektor integriert wird, ist es möglich eine kontinuierliche Sekretion dieser Faktoren lokal zu erreichen [92, 103, 105].

2.5.1 Grundlagen der Gentherapie

Der zur Gentherapie benötigte Gentransfer bezeichnet das Einschleusen von fremder DNS in somatische Zielzellen zur Behandlung einer Krankheit [36, 88, 91, 118]. Zunächst wurde dieser Therapieansatz vor allem bei Krankheitsbildern verfolgt, welche auf einem singulärem Gendefekt beruhen, aber auch die orthopädische Chirurgie hat ihr Potential erkannt und Therapien der Arthrose, chronischer Polyarthritits, fokaler Knorpeldefekte und der Frakturheilung werden aktuell erforscht [38, 91]. Zur erfolgreichen Gentherapie muss zunächst festgestellt werden, welches Gen sich potentiell zur Therapie der Erkrankung eignet und wie dieses in ausreichendem Maß in die Zielzellen gebracht werden kann [5, 91]. Anschließend wird dieses Gen isoliert, in seine cDNS umgeschrieben und in einen Expressionsvektor kloniert [89]. Vektoren dienen als Vehikel eine DNS-Sequenz in eine Zelle einzuschleusen und können viralen oder aviralen Ursprungs sein. Nutzt man ein nicht-virales Gentransfersystem spricht man von Transfektion, im Falle eines viralen Vektors von Transduktion. Beide Gentransfersysteme haben Vor- und Nachteile, da sie sich in Eigenschaften wie Sicherheit, Immunogenität, Mutationsrate, Transduktionseffizienz und Dauer der Wirkung deutlich unterscheiden. Die Interaktion des Vektors mit der Zielzelle kann entweder durch unspezifische Adsorption an der Lipiddoppelschicht der Zellmembran ablaufen oder durch eine Verbindung mit einem spezifischen Oberflächenrezeptor [89]. Im Zellinneren wird die DNS in Endosomen verkapselt und gelangt über Zwischenschritte in den Zellkern. Das übertragene genetische Material (Transgen) wird entweder in das Wirtsgenom integriert oder verbleibt extrachromosomal als Episom im Zellkern. Je nachdem ist die anschließende Genexpression langanhaltend oder transient. Das Transgen wird zu mRNS

transkribiert und als Protein translatiert. Ziel der Gentherapie ist es, genügend hohe Dosen eines Zielproteins zu bilden, um eine therapeutische Wirkung zu erreichen. Dies kann entweder durch eine hohe transfizierte Zellzahl oder eine sehr hohe Proteinproduktion pro Zelle erzielt werden [91].

2.5.2 Gentransfersysteme

Gentransfersysteme stellen eine heterogene Gruppe aus diversen viralen, chemischen und physikalischen Methoden dar. Handelt es sich um einen nicht-viralen Vektor wird dieser Vorgang als Transfektion bezeichnet. Bei einem viralen Vektor spricht man von Transduktion [179]. Ein idealer Gentransfervektor sollte nicht toxisch und einfach in der Anwendung sein sowie eine gezielte Zellpopulation effizient über eine gewisse Zeit so transduzieren, dass sie das Genprodukt in therapeutischem Maße produziert [89].

2.5.3 Nicht-viraler Gentransfer (Transfektion)

Bestimmte chemische Stoffe sind in der Lage gemeinsam mit der zu transferierenden DNS positiv geladene Makromoleküle zu bilden. Hier ist bspw. die Calciumphosphattransfektion [173] zu nennen, welche schon seit den 1960er Jahren bekannt ist. Des Weiteren werden Liposomen und andere Transfersysteme auf Lipidbasis genutzt, um die Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu durchdringen. Diese stellen derzeit die meist genutzte Substanzgruppe der chemischen Gentransfersysteme dar [130] zu welchen auch Lipide Nanopartikel (LNP) gehören, wie sie in mRNA-Impfstoffen gegen COVID-19 vorkommen [39].

Als physikalische Methoden sind unter anderem die Mikroinjektion, die Ultraschalltransfektion, der Partikelbeschuss und die Elektroporation zu nennen [91]. Bei der Mikroinjektion wird jeweils nur eine einzige Zelle transfiziert, was zwar zu einer hohen Erfolgsrate führt, allerdings aufgrund des großen zeitlichen und labortechnischen Aufwandes in der klinischen Anwendbarkeit begrenzt ist. Weitere physikalische Methoden basieren auf der Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran nach einem physikalischen Impuls z.B. durch Ultraschall oder Elektroporation [91].

Vorteile der nicht-viralen Gentransfersysteme bestehen im Allgemeinen in ihrer geringen Immunogenität, geringer Toxizität sowie Unabhängigkeit vom Zellzyklus [155, 186]. Nachteilig ist zu sehen, dass sie oftmals eine geringe Transfektionseffizienz aufweisen und eine zeitlich begrenzte Genexpression, von einem Tag bis zu einer Woche, hervorrufen [10, 25, 130]. Die Anwendungsbereiche für nicht-virale Genvektoren liegen insbesondere in *ex vivo* Gentransferansätzen [75].

2.5.4 Viraler Gentransfer (Transduktion)

Virale Transfersysteme nutzen die natürliche Eigenschaft von Viren ihr Genom in eine Wirtszelle einzuschleusen [91, 179]. Dabei werden die Viren zunächst so verändert, dass sie als apathogene replikationsdefekte Vehikel für den DNS-Transport genutzt werden können. Verwendet werden derzeit hauptsächlich Vektoren auf Basis von Retroviren [70, 156], Adenoviren [157, 184], adeno-assoziierten Viren [85, 183], Lentiviren [81, 181] oder Herpesviren [35, 88]. Da sich die Viren in ihren Eigenschaften wie beispielsweise dem Integrationsvermögen, der Expressionsdauer, der Immunogenität, sowie dem Vermögen ruhende oder in Mitose befindliche Zellen zu transduzieren unterscheiden, ist der geeignete Vektor vor Therapiebeginn zu wählen [8]. Virale Vektoren kann man wiederum in integrierende und nicht-integrierende Vektoren unterscheiden, je nachdem, ob sie ihr Genom stabil in den Zellkern des Wirts integrieren können. Dem entsprechend kann dies zu einer langanhaltenden oder transienten Wirkung führen. Retrovirale Viren sind in der Lage ihr Genom in das Wirtsgenom zu integrieren was zu einer langanhaltenden Gen-Expression führt [88]. Adenoviren zeichnen sich durch eine besonders hohe Immunogenität aus, weshalb fulminante Immunreaktionen auftreten können und weshalb sie in Deutschland nicht mehr als systemische Vektoren eingesetzt werden dürfen [89]. Adeno-assoziierte Viren sind apathogen und zeichnen sich durch ihre hohe Transduktionseffizienz, hohe Sicherheit sowie das Vermögen sich teilende als auch ruhende Zellen zu infiltrieren aus [25, 89]. Wie viele Studien belegen, sind virale Systeme in der Lage, Chondrozyten effizient zu transduzieren [28]. Vorteile der Verwendung von viralen Systemen bestehen u. a. in der hohen Transduktionseffizienz und der länger

anhaltenden Dauer. Als Nachteile sind mögliche Immunreaktionen, onkogenes Potential sowie ein geringes residuales Mutations- und Replikationsrisiko zu nennen [8].

2.5.6 rAAV-Vektor

Als adeno-assoziierte Viren (AAV), auch adeno-assoziierte Dependoparvoviren genannt, bezeichnet man kleine, nicht behüllte Einzelstrang-DNS Parvoviren. Mit einer Größe von 20-25 nm gehören sie zu den kleinsten Viren. Sie sind apathogen und für die Replikation in einer Wirtszelle von einem Helfervirus abhängig [2]. Unter den AAV gibt es mindestens zwölf verschiedene Serotypen, wobei sich gezeigt hat, dass sich AAV5 besonders gut für die Transduktion von Chondrozyten eignet [28]. Um einen rekombinanten AAV (rAAV-) Vektor herzustellen, müssen zunächst Strukturgene für die Virusreplikation entfernt und durch das gewünschte Therapiegen ersetzt werden. Zur Internalisierung nutzt der rAAV-Vektor Rezeptoren und Co-Rezeptoren an der Zelloberfläche um in die Zelle zu gelangen. Anschließend penetriert es den Nukleus, das Einzelstrang-Vektorgenom wird freigesetzt und in eine Doppelstrang DNS konvertiert [28]. In den meisten Fällen wird das Vektorgenom in Form von extrachromosomalen Episomen gespeichert (d. h. nicht in das Wirtsgenom integriert) und die transduzierte Zelle sekretiert das gewünschte Genprodukt. Im Fall des rAAV wird die Information extrachromosomal in Episomen gespeichert und geht in der Regel bei Mitose verloren, was zu einer vorübergehenden Transgenexpression führt. Ein Vorteil hierbei ist die geringe Chance der Mutation, was mit einem geringen onkogenen Potential einhergeht [8]. rAAV-Vektoren haben die Fähigkeit, sich sowohl in teilende, als auch nicht-teilende Zellen zu integrieren, sodass auch in der Matrix liegende Chondrozyten erreicht werden [25, 61, 102]. Dies ist im Falle adulten hyalinen Knorpels von besonderer Wichtigkeit, da adulte Chondrozyten sich nicht mehr teilen und nur eine limitierte mitotische Aktivität zeigen [107]. Somit haben rAAV-Vektoren viele Vorteile gegenüber anderen Gentransfervehikeln, da sie apathogen, wenig toxisch, geringes mutagenes Potential, effizient, relativ sicher, geringe Immunreaktion und in der Lage sind sowohl sich teilende, als auch ruhende Zellen zu transduzieren [25, 26, 53, 61]. Daher erscheinen rAAV-Vektoren

das größte Potential bei der Behandlung menschlicher Krankheiten zu haben [151].

2.5.7 Gentransferstrategie

Der Ansatz, Gentransfer-Technologien zur Behandlung von Gelenkerkrankungen zu nutzen, wurde zunächst von Evans *et al.* in den frühen 1990er Jahren beschrieben und fand Anwendung in der Behandlung von rheumatoider Arthritis [37]. Man unterscheidet grundlegend den *in vivo* und den *ex vivo* Gentransfer. Bei der *ex vivo* Transduktion müssen zunächst die Zielzellen gewonnen, unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet und genetisch modifiziert werden, bevor sie im Rahmen eines zweiten Eingriffes reimplantiert werden. Ein Vorteil hierbei ist die kontrollierte Umgebung sowie die mögliche Kontrolle der Effektivität und Sicherheit [122]. Meist werden Chondrozyten, mesenchymale Stammzellen oder Synoviozyten zur Gentherapie von Knorpeldefekten verwendet. Als Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe technische, zeitliche und Kostenaufwand zu sehen. Bei *in vivo* Strategien werden die Genvektoren entweder durch intravenöse Injektion systemisch appliziert oder lokal durch Injektion oder Implantation an das Ziel gebracht [8]. In Bezug auf die Knorpelreparatur erscheint der *in vivo* Gentransfer die deutlich effektivere Methode zu sein. Insbesondere seit der Etablierung von rAAV-Vektoren, welche in der Lage sind eine sichere und effiziente Transduktion im Gelenkknorpel durchzuführen, sind die Forschungsbemühungen im Bereich der *in vivo* Transduktion deutlich angestiegen.

Im Falle dieser Arbeit wurde der Vektor durch eine Arthrotomie direkt in die osteochondralen Defekte eingebracht. Aus den o. g. Gründen ergibt sich, dass die *in vivo* Gentherapie für den klinischen Alltag größere Relevanz haben wird, da die Durchführung einzeitig, technisch weniger anspruchsvoll und kostengünstiger ist.

2.6 Therapeutische Kandidaten

2.6.1 Allgemein

Gene, die sich zur Therapie fokaler Knorpelschäden eignen, sollten generell entweder anabole Prozesse im Knorpelgewebe anregen oder katabole Effekte hemmen. Hieraus ergibt sich die Relevanz von Wachstumsfaktoren auf diesem Gebiet, da sie u. a. die Chondrogenese, Zellproliferation und Matrixsynthese fördern, an der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten beteiligt sind und degenerative Vorgänge hemmen. Wachstumsfaktoren binden an die Oberflächenrezeptoren von Chondrozyten und wirken über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden auf die Chondrogenese ein [43]. Im Fokus der Studien liegen u. a. der transformierende Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor*, TGF- β), die knochenmorphogenetischen Proteine (*bone morphogenetic proteins*, BMP), der insulinähnliche Wachstumsfaktor I (*insulin-like growth factor I*, IGF-I), der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (*fibroblast growth factor 2*, FGF-2) und Vertreter der Sox-Transkriptionsfamilie (*SRY-related High-Mobility Group box family of DNA binding proteins*, insbesondere Sox5, Sox6 und Sox9) [8].

2.6.2 Wachstumsfaktoren in der Therapie fokaler Knorpelschäden

Als Wachstumsfaktoren bezeichnet man eine Gruppe von Polypeptiden, die vom Körper gebildet werden und Wachstum, Zellteilung und Differenzierung anregen. Durch ihre Fähigkeit anabolische Prozesse zu stimulieren und Katabolische zu hemmen, zeigen sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* großes Potenzial in der Behandlung fokaler Knorpelschäden [43]. Während des gesamten Lebens regulieren verschiedene Wachstumsfaktoren gemeinsam die Entwicklung und Homöostase von hyalinem Knorpel [56]. Unter der Annahme, dass bioaktive Wachstumsfaktoren in der Lage sind die Knorpelreparatur zu verbessern und auch therapeutisch in den Verlauf von Arthrose einzugreifen, sind sie schon seit vielen Jahren in den Fokus wissenschaftlicher Bemühungen gerückt. Unter anderem werden die Auswirkungen von IGF-I, TGF- β 1, BMP-2, BMP-7, FGF-2, FGF-18, PDGF

genauer betrachtet [20, 26, 44, 46, 64, 84, 103, 115, 116, 131, 139, 143]. Die Knorpelreparatur wird dabei durch die Stimulation der Chondrozyten zur Proteoglykansynthese wie Aggrecan und Typ-II-Kollagen, Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und deren Differenzierung zu Chondrozyten sowie die Drosselung kataboler Effekte von Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-I (IL-I) unterstützt [147]. Jeder Wachstumsfaktor hat spezifische Eigenschaften, die man therapeutisch nutzen möchte. Viele Studien betrachten die Wirkungen einzelner Wachstumsfaktoren unabhängig voneinander, jedoch sind auch sinnvolle synergistische Kombinationen denkbar [43].

2.6.3 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I)

Die Rolle von IGF-I in Zusammenhang mit dem Stoffwechsel von hyalinem Gelenkknorpel ist schon lange Gegenstand der Forschung [24, 29, 42, 103, 105, 120, 131, 139, 188]. Der Wachstumsfaktor IGF-I ist ein 7,6 kDA großes Polypeptid [90], welches in seiner Sequenz Insulin ähnelt und über einen membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor wirkt, welcher sich an fast allen Körperzellen findet. Als anaboler Wachstumsfaktor induziert IGF-I Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie eine vermehrte DNS-Bildung [176]. IGF-I wird vor allem in der Leber nach Stimulation durch Somatotropin aus der Hirnanhangdrüse produziert. Besonders in der Wachstumsphase spielt IGF-I eine große Rolle. Es erreicht normalerweise den Gelenkknorpel über die Synovialflüssigkeit und ist an der Knorpelhomöostase beteiligt, da es maßgeblich für den Metabolismus von Proteoglykanen durch die Chondrozyten verantwortlich ist. Insbesondere die Produktion von Typ-II-Kollagen, welches typisch für hyalinen Gelenkknorpel ist, aber auch Typ-X-Kollagen und der Transkriptionsfaktor SOX9 werden durch eine vermehrte Expression von IGF-I von den Chondrozyten vermehrt produziert [47, 90, 139]. Mit zunehmendem Alter der Chondrozyten hat sich gezeigt, dass sie weniger auf die Stimulation durch IGF-I reagieren [108]. Ebenfalls reagieren Chondrozyten im entzündeten Milieu sowie im Rahmen einer Arthrose weniger auf die anabolen Effekte von IGF-I [180]. Dennoch konnte eine antiinflammatorische Wirkung durch die Hemmung entzündungsfördernder Zytokine wie Interleukin-I und Tumornekrosefaktor- α bei Arthrose nachgewiesen werden [42, 167, 185, 189]. Im

Serum, aber auch in der Synovialflüssigkeit befinden sich verschiedene IGF-I-Bindeproteine (*insulin-like growth factor-binding protein*; IGFBP 1-6), welche die Menge an freiem IGF-I regulieren. Bei Patienten mit Arthrose haben sich sehr hohe Konzentrationen dieses Bindeproteins in der Synovialflüssigkeit gezeigt, was ebenfalls zu einer Minderung des anabolen Effekts führen könnte [159].

2.7 Gentransfer-basierte Therapie fokaler Gelenkknorpeldefekte

Gentherapie bietet eine Möglichkeit lokal anabole Stoffe freizusetzen und so die Differenzierung von Zellen innerhalb eines Knorpeldefektes zu beeinflussen. Das Ziel des Gentransfers ist es die Zellen innerhalb des Knorpeldefektes so zu verändern, dass sie über einen längeren Zeitraum therapeutische Dosen bspw. Wachstumsfaktoren freisetzen und so die lokale Knorpelreparatur und die Differenzierung von Progenitorzellen zu Chondrozyten fördern.

3. Hypothesen

Wir überprüfen die übergeordnete Fragestellung, ob durch Gentransfer von IGF-I durch rAAV-Vektoren die Reparatur von osteochondralen Defekten im Schafmodell *in vivo* verbessert wird. Speziell wurden folgende drei Hypothesen getestet:

- 1) Die Überexpression von IGF-I durch rAAV vermittelten Gentransfer verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ* Kontrollgruppe.
- 2) Therapeutisch mit rAAV-IGF-I behandelte osteochondrale Defekte zeigen eine verbesserte Reparatur der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens im Vergleich zur rAAV-*lacZ* Kontrollgruppe.
- 3) Die Überexpression von rAAV-IGF-I verringert die Entwicklung arthrotischer Veränderungen in dem Defekt angrenzenden Gelenkknorpel im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* behandelten Kontrolldefekten.

4. Studiendesign

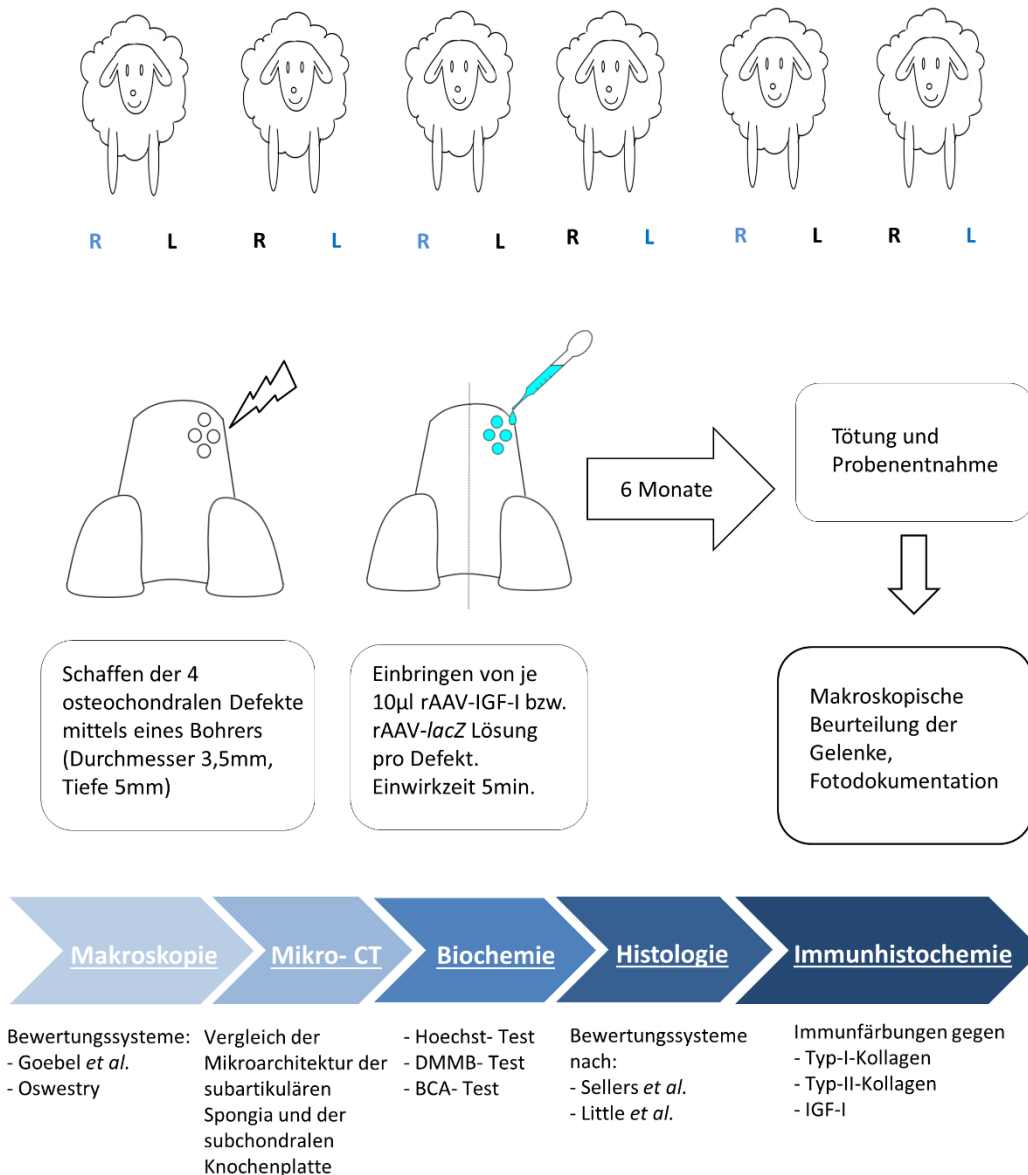


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Studiendesigns. Im Rahmen einer Mini-open Arthrotomie wurden vier zylindrische, osteochondrale Defekte in beiden Trochleae ossis femoris von sechs skelettreifen Merinoschafen geschaffen ($n = 6$ Schafe; $n = 12$ Knie, insgesamt $n = 48$ Defekte). In diese wurde alterierend je 10 µl rAAV-IGF-I oder rAAV-lacZ eingebracht und das Knie nach einer Einwirkzeit von 5 min verschlossen. Die Tiere wurden nach 6 Monaten eingeschläfert und die Proben für die weiteren Untersuchungen (Makroskopie, Mikro-CT, Biochemie, Histologie und Immunhistochemie) entnommen. Abkürzungen: BCA: Bicinchoninsäure, DMMB: Dimethylmethylenblau; IGF-I: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I; LacZ: β -Galactosidase-Gen

5. Material

5.1 Lösungen, Puffer, Medien

Die Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt.

Tabelle 1: Lösungen, Puffer, Medien

Lösungen, Puffer, Medium	Inhaltstoffe	Konzentration, Menge, Volumen
Blockierungspuffer	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung (3'3 Diaminobenzidin)	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH 7,5)	2 Tropfen
	DAB-Substratreagenz	4 Tropfen
DMMB-Lösung A	H ₂ O ₂	2 Tropfen
	D-Cysteinhydrochlorid- monohydrat	0,05 g
	PBE	30 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitin-6-Sulfat- Natriumsalz	0,053 g
	Lösung A	1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung A	24,95 ml
	Lösung B	0,05 ml
DMMB-Färbelösung (pH 3,5)	1,9-Dimethylenblau	16 mg
	Natriumhydroxid (1M)	25,6 ml
	Ethanol (95 %)	5 ml
	Ameisensäure (90 %)	3 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Echtgrün-Lösung	Echtgrün	200 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entkalkungslösung A	Na-Citrat	100 g
	H ₂ O	500 ml
Entkalkungslösung B	Ameisensäure	250 ml
	H ₂ O	250 ml
Entkalkungslösung	Lösung A	
	Lösung B	

5. Material

Lösungen, Puffer, Medium	Inhaltstoffe	Konzentration, Menge, Volumen
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O ₂	ad 2000 ml
Essigsäure 1 %	Essigsäure 99,7 %	1 ml
	H ₂ O	100 ml
Fast- Green 0,02 %	Fast-Green	0,2 g
	H ₂ O	1000 ml
Hämatoxinlösung (n. Harris)	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100 %)	120ml
	Natrium-Iodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
	H ₂ O ₂	ad 2000 ml
HCL-Lösung (0,1 %)	HCL (40 %)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	PBS	ad 40 ml
PBS	Na ₂ HPO ₄	7,1 g
	EDTA	1,86 g
	H ₂ O	500 ml
Salzsäure-Lösung	HCl (37 %)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Safranin-Orange (0,1 %)	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	1000 ml
TNE-Puffer	NaCl	5,8 g
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	372 mg
	Tris/(HCl) (pH 7,4)	1322 mg
Trypsin-Lösung (0,1 %)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 ml
	PBS	ad 200 ml
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3 %)	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	200 ml

5.2 Chemikalien und Enzyme

Die Laborchemikalien zur Herstellung von Puffern und Medien bezogen wir grundsätzlich von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland). Weitere Chemikalien bezogen wir von:

Tabelle 2: Chemikalien und Enzyme

Produkt	Hersteller (Standort)
ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase)-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, Kanada)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Ameisensäure	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Blocking Buffer	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BSA (bovines Serum Albumin) (7,5 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Echtgrün (FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (99,7 %)	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
Ethanol (99,8 %)	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
Fast-Green	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin (10 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin (n. Weigert)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Echtgrün	Morphisto (Frankfurt a.M., Deutschland)
Na-Citrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Papain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Paraffin-Granulat: Paraplast X-tra	Leica (Nussloch, Deutschland)
PBS	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Peroxidase Substrate kit	Vector Laboratories (Burlingame, Kanada)
Pierce-BCA-Protein-Assay-Reagent-A	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Produkt	Hersteller (Standort)
Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin	Morphisto (Frankfurt a.M., Deutschland)
Standard-DNS-Lösung	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Stop-Lösung	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Orange G	Morphisto (Frankfurt a.M., Deutschland)
Streptavidin-HRP Konzentration	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Trypsinlösung (0,1 %)	GE Healthcare (Pasching, Österreich)
Typ-I-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Typ-II-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Waschpufferkonzentrat	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Wasserstoffperoxid (0,3 %)	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Xylol	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)

5.3 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende monoklonalen Antikörper verwendet:

Tabelle 3: Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller (Standort)
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Axxora, Enzo Life Sciences Inc. (Farmingdale, NY, USA)
Anti-IGF-I	Ziege	R&D Bio-Techne (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

5.4 Tierstämme

Für die Studie operierten wir gesunde, skelettreife weibliche Merino-Schafe zwischen 2 – 4 Jahren. Ihr durchschnittliches Gewicht betrug 70 ± 20 kg. Sie erhielten Wasser *ad libitum* und Futter nach Standardprotokoll. Vor Studienbeginn wurde radiologisch präoperativ eine Arthrose ausgeschlossen. Alle

Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Nationalen Richtlinien für Tierschutz (*guidelines for the care and use of laboratory animals*, NIH-Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985) sowie dem saarländischen Tierschutzgesetz durchgeführt.

5.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller (Standort)
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Deckgläser	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (Mikroskop)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG1140H	Leica (Nussloch, Deutschland)
Fotoapparat Canon Powershot A480	Canon (Neuhausen, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlplatte EG1140C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Liquidblocker Fettstift	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Mikroskop BX45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CX31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom RM2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Mischplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Qualitron Mikrozenrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Röntgenröhre (μCT)	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)
Scanner (μCT)	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62 °C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

5.6 Computerprogramme

Tabelle 5: Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
analySIS	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Cellsense Standard	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Citavi 6 for windows	Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)
CT Analyser	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
CT Recon	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
DataViewer	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
Exel	Microsoft Corp. (Redmond, WA, USA)
IBM SPSS Statistics 25	IBM Corporation (Armonk, NY, USA)
Paint.net	dotPDN LL dot (Washington, WA, USA)
Past v. 4.04	Hammer Ø., University of Oslo (Oslo, Norwegen)
Prism v. 8.2.1	GraphPad Software Inc. (Boston, MA, USA)
XFLuor4 version 4.51	TECAN (Wiesbaden, Deutschland)

5.7 Operationsinstrumentarium und –materialien

Die Spiralbohrer mit dem Durchmesser 3,5 mm zur Erzeugung der Defekte stammten von der Fa. Synthes (Umkirchen, Deutschland). Das Nahtmaterial, Spritzen, Nadeln sowie alle anderen chirurgischen Utensilien stammten von Braun (Melsungen, Deutschland) sowie Ethicon (Somerville, MA, USA).

5.8 Verbrauchsmaterialien

Die Objektträger (SuperFrost und SuperFrost Plus) und Eindeckgläser zur Auswertung der histologischen Schnitte stammten von R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland). Die metallische Ausgießschälchen sowie Gewebekassetten Metallkassetten und Plastikabdeckungen zur Paraffin-Einbettung wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Klingen für das Rotationsmikrotom kamen von der Firma Leica (Nussloch, Deutschland). Restliche Plastikartikel und Glasbehälter lieferte Falcon (Beckton Dickison, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland).

6. Methoden

Alle Experimente wurden unter Einhaltung des nationalen Rechts für Tierschutz und den NIH-Richtlinien für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren (*guidelines for the care and use of laboratory animals*, NIH-Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985) und mit Genehmigung der saarländischen Tierschutzkommission durchgeführt. Für das hier dargestellte Experiment wurden gesunde, skelettreife, weibliche Merinoschafe im Alter zwischen zwei bis vier Jahren verwendet. Das Körpergewicht betrug durchschnittlich 70 kg $\pm$ 20 kg. Präoperativ wurde eine Arthrose der Kniegelenke radiologisch ausgeschlossen. Während der Versuchszeit von sechs Monaten bekamen die Schafe Wasser *ad libitum* und Futter nach Standardprotokoll. Eine Überwachung der Tiere fand während des gesamten Zeitraums durch den Operateur und einen Veterinärmediziner statt.

6.1 Operation

Nach 12 h Nahrungskarenz wurden die Tiere mit 2 % Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland) 0,05 mg/kg KG sediert und nach i.v. Gabe von 20 ml 2 % Propofol (AstraZenca, Wedel, Deutschland) und Caprofol (1,4 mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Berlin, Deutschland) endotracheal intubiert. Die Narkose wurde mittels Isofluran-Inhalation 1,5 % (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) sowie i.v. Gabe von Propofol (6-12 mg/kg KG/h) aufrechterhalten. Die Tiere wurden am 20.03.2012 von Prof. Dr. med. H. Madry operiert. Der Zugang zum Kniegelenk erfolgte durch einen medialen parapatellaren Mini-Zugang, welcher im Gegensatz zum klassischen Zugang auf die intraoperative Luxation der Patella verzichtet und postoperativ ein sehr viel geringeres Risiko für Patellaluxationen zeigt [133]. Mittels eines Spiralbohrers (Durchmesser 3,5 mm) wurden an der lateralen Facette der *Trochlea ossis femoris* vier rautenförmig angeordnete osteochondrale Defekte von 5 mm Tiefe gesetzt (Abbildung 3). Eine Blutung aus dem Bohrkanal war stets sichtbar. In die Defekte wurde jeweils 10 μ l rAAV-IGF-I beziehungsweise 10 μ l rAAV-*lacZ* eingebracht. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde das Kniegelenk anschließend gründlich gespült und schichtweise verschlossen. Postoperativ erfolgte eine Antibiotikaphylaxe mit Amoxicillin/Clavulansäure (Pfizer, 30mg/kg KG). Jedes Schaf erhielt 3 ml Fenpipramide/Levomethadon 0,25%

(MSD, Unterschleißheim, Deutschland) und über die nachfolgenden 14 Tage 1,8 mg/kg KG Caprofen subkutan. Es erfolgte weder eine Entlastung noch eine Ruhigstellung der operierten Kniegelenke. Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei allen Tieren komplikationslos. Während der ersten fünf Wochen wurden die Tiere täglich, für die Restdauer der sechs Monate wöchentlich untersucht.

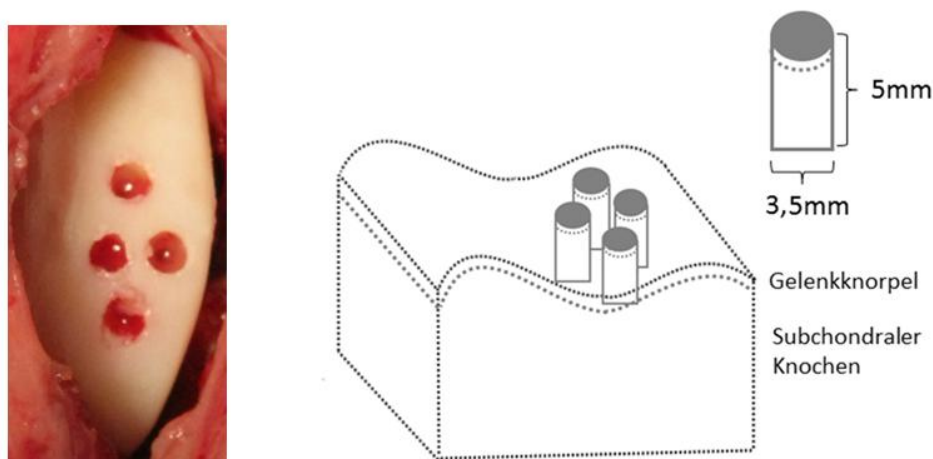


Abbildung 3: Chirurgische Anlage der osteochondralen Defekte. Links: Intraoperative Fotografie der lateralen Trochlealfacetten nach Bohrung der osteochondralen Defekte. Eine Blutung aus der Tiefe der Bohrlöcher war stets sichtbar. Rechts: Schematische Darstellung der Trochlea ossis femoris mit den reihenförmig angeordneten Bohrungen an der lateralen Facette sowie schematische Darstellung der Ausmaße der osteochondralen Defekte.

6.2 Sektion und Probengewinnung

Die zweite Operation zur Probengewinnung erfolgte 6 Monate nach der Anlage der osteochondralen Defekte wiederum im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Tiere wurden von einem Veterinärmediziner nach einer Narkoseeinleitung wie oben beschrieben durch die intravenöse Injektion einer Überdosis Pentobarbital und Luft unter Analgosedierung eingeschläfert. Die Probenentnahme erfolgte daraufhin unter unsterilen Bedingungen durch Prof. Dr. med. H. Madry. Nach Präparation des distalen Femurs erfolgte eine makroskopische Begutachtung der Gelenkverhältnisse. Es zeigte sich in keinem Fall eine Synovialitis, Entzündung, Erguss oder Patellaluxation. Es folgte die Entnahme der Kniegelenke. Die Trochlea

wurde aus verschiedenen Winkeln heraus fotografiert (Canon Powershot A480 mit Makrolinse, Neu-Isenburg, Deutschland), um eine spätere makroskopische Evaluation zu ermöglichen. Das osteochondrale Reparaturgewebe aus den Defekten 2 und 3 (Abbildung 5) wurde *in toto* mit einem scharfen Löffel gewonnen und individuell in Reaktionsgefäßen bei -80 °C konserviert. Anschließend wurde das Femur mit einer Zange fixiert und die Femurkondylen standardisiert abgetrennt. Es erfolgte eine 24 h Fixierung in Formalin bevor die Proben zur weiteren Mikro-CT Diagnostik in 70 % Ethanol überführt wurden.

6.3 Makroskopische Evaluation der Gelenkknorpeldefekte

Die Trochlea ossis femoris wurde sechs Monate postoperativ entnommen und zur Dokumentation fotografiert. Anhand dieser Fotografien wurde das Reparaturgewebe sowie der angrenzende Knorpel makroskopisch verblindet evaluiert. Hierzu kamen sowohl das Homburger Bewertungssystem nach Goebel *et al.* [54] als auch das modifizierte Bewertungssystem aus Oswestry [169] zum Einsatz.

Das modifizierte Bewertungssystem aus Oswestry besteht aus vier Kategorien, welche den Knorpel jeweils mit 0, 1 oder 2 Punkten bewertet werden können (Tabelle 6). Die fünfte Kategorie, welche die Elastizität des Knorpels erfasst, wurde in dieser Arbeit nicht erfasst und der Bewertungssystem dahingehend modifiziert. 0 Punkte entsprechen dem schlecht möglichsten Ergebnis (kein Reparaturgewebe, Knochenglatze), 2 Punkte entsprechen einem Normalbefund. Hieraus ergibt sich eine mögliche Spannweite der Ergebnisse von 0-8 Punkten, wobei eine hohe Punktzahl einer guten Reparatur, eine niedrige Punktzahl einer schlechten Reparatur entspricht. Durch diese Punkteverteilung ist das Oswestry-Bewertungssystem eher zur Aufdeckung von groben Unterschieden geeignet.

6. Methoden

Tabelle 6: Modifiziertes makroskopisches Bewertungssystem aus Oswestry [169]

Kategorie		Punkte
1. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Unterhalb	0
	Oberhalb	1
	Im Niveau	2
2. Integration mit dem benachbarten Knorpel	Größere Unterbrechungen >25 %	0
	Kleinere Unterbrechungen <25 %	1
	Vollständig	2
3. Oberflächenbeschaffenheit des Reparaturgewebes	Aufgefasert	0
	Inhomogen	1
	Glatt, homogen	2
4. Farbe des Reparaturgewebes	Gelber subchondraler Knochen	0
	Weiß	1
	Hyalinartig	2
Summe		8

Das validierte Homburger Bewertungssystem nach Goebel *et al.* ist ein inverses Bewertungssystem und besteht aus 5 Kategorien, welche jeweils 0-4 Punkte erhalten können, sodass ein Gesamtwert von 0-20 Punkten zustande kommen kann. Im Unterschied zum Oswestry-Bewertungssystem werden gute Ergebnisse durch eine niedrige Punktzahl widerspiegelt, schlechte durch eine hohe (Tabelle 7). Generell erfassen beide Bewertungssysteme die Füllhöhe, die Integration, die Farbe des Reparaturgewebes und die Oberfläche. Das Homburger Bewertungssystem besitzt zusätzlich eine Kategorie, welche die Einsprossung von Blutgefäßen in das Defektareal widerspiegelt.

Tabelle 7: Makroskopisches Homburger Bewertungssystem nach Goebel et al. [54]

Kategorie		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
	Aufgefasert	2
	Inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	Kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Im Niveau	0
	>50 % der Defekttiefe	1
	<50 % der Defekttiefe	2
	0 % der Defekttiefe	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4
5. Beschaffenheit 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
	Beschädigter subchondraler Knochen	4
Summe		20

6.4 Mikrofokus-Computertomographie

Die hochauflösende Mikro-CT bietet eine sehr genaue Möglichkeit den subchondralen Knochen darzustellen und seine Qualität durch objektive Messungen der 3D Mikroarchitektur zu quantifizieren [40].

6.4.1 Durchführung der Mikrofokus-Computertomographie

Die Durchführung der Mikrofokus-Computertomographie erfolgte anhand von empirischen Vorversuchen sowie nach in unserem Labor üblichen Protokollen, welche bereits in vorangegangenen Studien beschrieben wurden [34, 116, 132, 138]. Die Trochleae der Schafe ($n = 12$) wurden zugeschnitten, in 70 % Ethanol gelagert und die distalen Defekte mittels des Mikro-CT-Scanners (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Belgien) im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes analysiert. Der Mikro-CT-Scanner nutzt eine drehbare Abtastplatte, eine bewegliche 11 Mp Kamera sowie einer Mikrofokus-Röntgenröhre (Spotgröße $< 5 \mu\text{m}$; Hamamatsu, Japan), sodass eine maximale Auflösung von $0,8 \mu\text{m}$ erzielt werden kann. Pro Scan wurden zwischen 900 und 2000 16 bit Röntgenbilder erstellt (Röhrenspannung 70 kV, Stromstärke $13 \mu\text{A}$, räumliche Auflösung $15 \mu\text{m}$). Um Strahlenaufhärtingsartefakte zu minimieren wurde ein 0,5 mm Aluminium/Kupfer-Filter zwischen Röntgenstrahlenquelle und Detektor platziert. Die Kamera rotierte um $0,4^\circ$ pro Röntgenbild um die Probe bei einer Belichtungszeit von 2400 ms. Die Parameter *frame averaging*, *random movement* und *ring artifact correction* wurden anhand o.g. Vorversuchen mit 3, 15 und 7 (ohne Einheit) eingestellt. Die Rekonstruktion der Bilder erfolgte durch einen modifizierten Feldcamp Cone-Beam Algorithmus (NRecon, Bruker Skyscan, Kontich, Belgien). Wie bereits in vorangegangenen Studien, wurde zur Verbesserung der Bildqualität die Einstellung der binären Bilder Graustufen-Schwellenwerte von 89 bzw. 255 gewählt [34, 116, 132, 138]. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) wurde mittels der Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten) ermittelt, nachdem das Gerät mit zwei Calciumhydroxyapatit (CaHA) Phantomen (in 70 % Ethanol) mit bekannten Werten der Knochenmineraldichte von 250 und 750 mg CaHA/cm^3 geeicht wurde.

6.4.2 Definierung der Volumina von Interesse (*volumes of interest*, VOI)

Zum Einzeichnen der Regionen von Interesse (*Region of Interest*, ROI) kam das Programm CT-Analyser (CTAN, Bruker Skyscan, Kontich, Belgien) zum Einsatz. Hierbei wurden die subchondrale Knochenplatte (*subchondral bone plate*, SCBP)

und die subartikuläre Spongiosa (*subarticular spongiosa*, SAS) innerhalb des Defektareales eingezeichnet. Hierzu wurde zunächst das Bild mit maximalem Durchmesser von 3,5 mm in den Mikro-CT Schnitten ermittelt und im Bildstapel als Defektmitte definiert. Daraufhin wurden oberhalb und unterhalb in gleichem Abstand der Bildstapel von Interesse ausgewählt, welcher den Defekt abbildet (*top and bottom of selection*). Daraufhin wurden die Regionen von Interesse an den beiden Enden schmal und in der Defektmitte mit maximalem Ausmesser eingezeichnet. Mittels dynamisch interpolierenden Regionen von Interesse wurde der grobe Verlauf des Volumens von Interesse durch das Programm CTAN berechnet und anschließend manuell an die individuellen Verhältnisse exakt angepasst. Die Messtiefe innerhalb der subartikulären Spongiosa wurde mit 4 mm von der Obergrenze der subchondralen Knochenplatte definiert. Dies entspricht einer Bohrkanaltiefe von 5 mm (1 mm Knorpel + 4 mm Knochen).

Aus den eingezeichneten Regionen von Interesse wurden mittels des Programms CTAn (CTAnalyser, Skyscan) die Volumina von Interesse berechnet und aus diesen im 3D- Modell folgende strukturelle Parameter bestimmt:

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

In der subartikulären Spongiosa wurden außerdem folgende Parameter bestimmt:

- trabekulärer Musterfaktor (*trabecular pattern*, Tb.Pf)
- Struktur Model Index (*structure model index*, SMI)
- Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th)
- Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N)
- Trabekuläre Separation (*trabecular separation*, Tb.Sp)
- Fraktale Dimension (*fractal dimension*, FD)
- DA (Geometrischer Grad der Anisotropie)

Die kortikale Dicke (*cortical thickness*, Ct.th) wurde nur in der subchondralen Knochenplatte bestimmt. Hierzu wurde die Dicke jeweils an den beiden Enden, sowie mittig im Defekt gemessen und aus den Werten der Mittelwert gebildet.

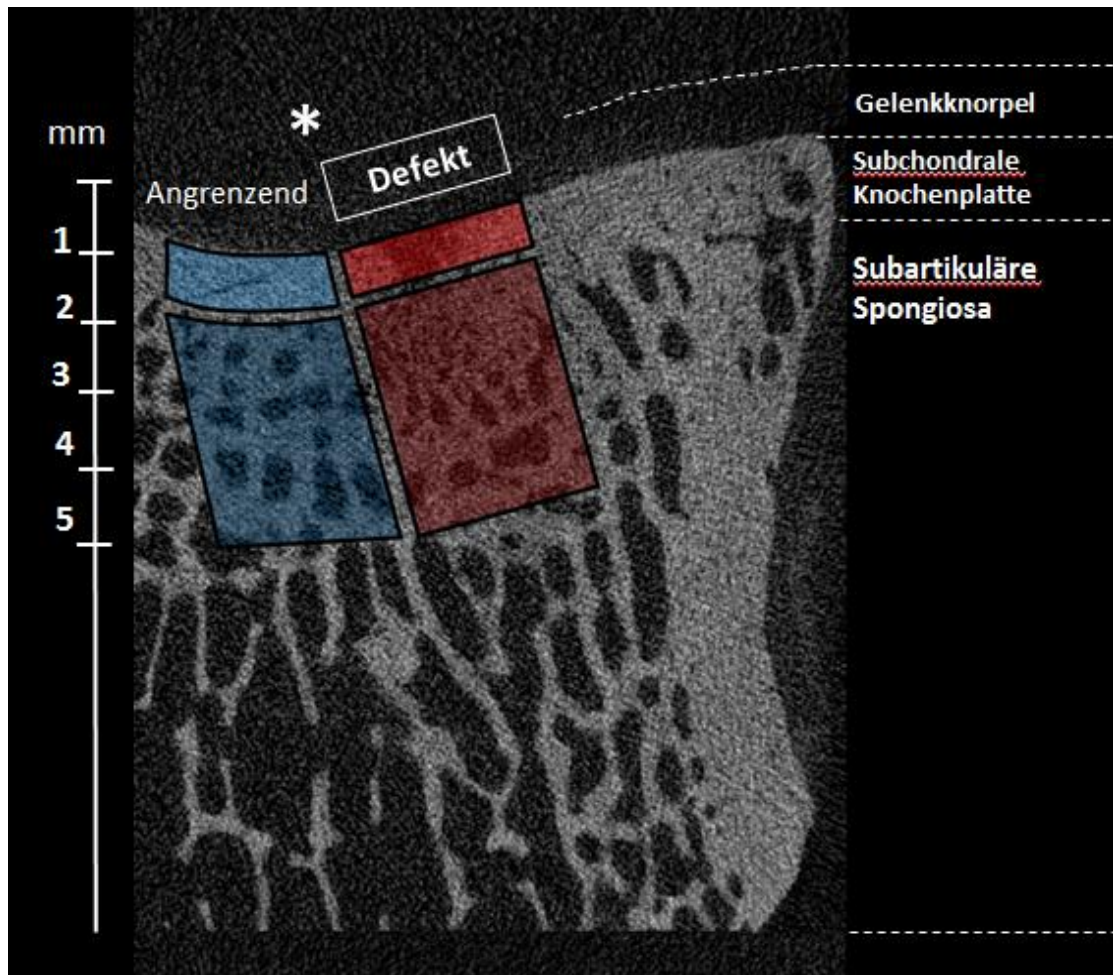


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Regions of interest (ROI) an einem mikrocomputertomographischen Schnittbild, welche durch das Computerprogramm CTAn (CTAnalyser, Skyscan) zu Volumes of interest (VOI) berechnet wurden. Die Defektregion wurde exemplarisch in rot, die angrenzende Region in blau eingezeichnet. * markiert die Integrationszone.

6.4.2 Analyse der benachbarten Areale und Normwerte

Um die Auswirkungen auf den angrenzenden Knochen festzustellen, wurden hier ebenfalls Regionen von Interesse (*SCBP und SAS adjacent*) eingezeichnet. Die Breite wurde mit 2 mm definiert. Im Bereich der subchondralen Knochenplatte wurde die Tiefe entsprechend angepasst. Wie auch innerhalb des Defektareales betrug die Tiefe der angrenzenden Regionen von Interesse in der subartikulären Spongiosa 4 mm gemessen ab der Oberkante (1 mm Knorpel + 4 mm Knochen entsprechend des Bohrkanals). Dieses entspricht auch den Maßen, welche für das

Bewertungssystem nach Little *et al.* [86] zur Beurteilung von Arthrose in benachbarten Arealen verwendet wurde, um hier eine Korrelation von Knorpelschaden und Knochen zu ermöglichen. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle in einem möglichst weit entfernten Areal (sowohl der subchondralen Knochenplatte, als auch der subartikulären Spongiosa) eingezeichnet, um als Normwert zu dienen.

6.4 Histologische Evaluation

6.4.1 Herstellung der histologischen Präparate

Nach der radiologischen Untersuchung durch die Mikro-CT wurden die Proben in 4%igem Formalin 24 h fixiert. Zum Entkalken wurden die Proben zwölf Wochen lang in Entkalkungslösung gelagert, wobei ein wöchentlicher Wechsel des Entkalkungsmediums stattfand. Anschließend an die Entkalkung wurden die Proben in Leitungswasser gereinigt (2 x 2 h), bevor die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70%igem Ethanol begann. Die Proben wurden jeweils 1 h in 70 %, 95 %, 95 % und 100 % Ethanol belassen. Daraufhin wurden die Proben zweimal eine Stunde in Xylol gelagert. Um die Einbettung in Paraffin vorzubereiten, wurden die Blöcke bei 60 °C 1 h in einem Xylol-Paraffin-Gemisch inkubiert und anschließend in reines Paraffin (15 h über Nacht bei 62 °C) überführt. Zur Herstellung der Paraffinblöcke kam eine Einbettmaschine mit Kühlplatte (-10 °C) (Leica, Nussloch, Deutschland), metallische Ausgießschälchen und Gewebekassetten aus Plastik (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zum Einsatz. Bei der Einbettung wurde darauf geachtet, den Paraffinblock mit der defektnahen Seite zur Oberfläche hin (auf den Boden des Ausgießschälchens zu platzieren) in die Form einzubetten. Nach dem kompletten Aushärten des Paraffins wurden die Blöcke bei – 20 °C im Gefrierschrank (Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland) bis zum Schneiden gelagert. Mithilfe des Rotationsmikrotoms (Leica, Nussloch, Deutschland) wurden die Paraffinblöcke in einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten. Diese wurden anschließend mittels eines Pinsels in ein 24 °C warmes Wasserbad (Leica, Nussloch, Deutschland) in *aqua bidest.* überführt und auf einem mit Trypsin (GE Healthcare, Pasching, Österreich) benetzten Objektträger (R.

Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht. Dieser wurde anschließend auf einer Wärmeplatte (Leica, Nussloch, Deutschland) bei 42 °C getrocknet und 10 h über Nacht bei 60 °C inkubiert.

Für die histologische Evaluation wurden bei einem ursprünglichen Defektdurchmesser von 3,5 mm nur Schnitte verwendet, welche eine Defektgröße von mindestens 2 mm abbildeten, um einen möglichst großen Evaluationsraum zu untersuchen. Die Schnitte für klassische histologische Färbemethoden wie beispielsweise die Safranin-O-Echtgrün Färbung wurden SuperFrost Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) verwendet. Schnitte, die zur Immunhistochemie bestimmt waren, wurden auf SuperFrost Plus Objektträgern (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht, welche sich erfahrungsgemäß durch eine bessere Haftung der Probe am Objektträger während des Färbeprozesses auszeichnen.

6.4.2 Histologische Färbung

Alle histologischen Färbungen wurden in Glasbehältern mit 200 ml Lösung durchgeführt. Es wurden jeweils acht Schnitte gleichzeitig in einer Färbekassette gefärbt.

6.4.3 Vorbereitung der Färbung

Die Proben wurden unter dem Abzug zwei Mal jeweils fünf Minuten lang in Xylol entparaffiniert und anschließend durch jeweils zwei Minuten in der absteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 2x 95 %, 1x 80 %) hydriert.

6.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, welche dem Betrachter durch relativ geringen technischen Aufwand schnell eine Übersicht über die Probe, im Sinne der Zellverteilung, Kern-Plasma-Relation und der Anfärbbarkeit verschafft [41]. Hierbei stellen sich die Zellkerne blau, das Zellplasma rot dar. Nach entsprechender Vorbereitung (s. 6.4.3) wurden die Schnitte nach

Standardprotokoll gefärbt. Es erfolgte die Überführung der Schnitte in Hämatoxylin nach Harris für 10 min zur Kernfärbung, das Waschen in Leitungswasser, die Differenzierung für 10 s in 1%iger HCl-Lösung, das Bläuen durch Inkubation in 60 °C warmen Leitungswasser, die erneute Färbung mit Hämatoxylin nach Harris für 2,5 min und das Abspülen mit Leitungswasser. Zum Gegenfärben des Plasmas kamen die Schnitte für 2,5 min in Eosin. Dieses wird im Überschuss angeboten und im folgenden Schritt der Entwässerung und Differenzierung durch die aufsteigende Alkoholreihe zum Teil wieder entfernt. Eine Dauerfixierung wurde durch die Überführung der Schnitte in Xylol (2 x 5 min) und die Eindeckung mit Roti-Histokitt II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) erzielt.

6.4.5 Masson-Goldner-Färbung

Durch diese Färbemethode erscheinen die Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma rötlich und das Bindegewebe grün. Nach entsprechender Vorbereitung (s. 5.4.3) wurden die Schnitte mit Eisenhämatoxylin-Lösung (2-3 min) gefärbt und in Leitungswasser gebläut (10 min). Es folgte der Transfer in die Goldner-Lösung-I (5 min), die Differenzierung in Essigsäure (1 %), die Goldner-Lösung-II (4 min) und die erneute Differenzierung in Essigsäure (1 %) sowie die Gegenfärbung mit Goldner-Lösung-III (5 min). Nach erneutem Eintauchen der Schnitte in Essigsäure (1 %, 3 min) folgte die Entwässerung sowie die Dauerfixierung wie bereits in 6.4.4 beschrieben.

6.4.6 Toluidin-Blau-Färbung

Nach entsprechender Vorbereitung (s. 6.4.3) kamen die Schnitte in die Nasskammer. Hier beträufelten wir die Schnitte mit 1-2 Tropfen der Toluidin-Blau-Lösung und spülten die Schnitte nach 15 min mit Leitungswasser ab. Die Entwässerung und Dauerfixierung erfolgten wie in 6.4.4 beschrieben. Toluidin-Blau-Lösung färbt Glykosaminoglykane im hyalinen Gelenkknorpel blau an. Hierbei korreliert die Intensität mit dem Gehalt an Proteoglykanen, sodass diese Färbung als semiquantitative Methode zur Bestimmung des Proteoglykangehaltes im Knorpel herangezogen werden kann [6].

6.4.7 Safranin-Orange-Echtgrün-Färbung

Die Safranin-Orange-Echtgrün-Färbung wird häufig zur Darstellung von Knorpel herangezogen. Die Safranin-O-Lösung färbt Glykosaminoglykane orangerot an, wobei die Farbintensität den Gehalt an Glykosaminoglykanen widerspiegelt. Daher kommt es bei gesundem hyalinem Gelenkknorpel zu einer orangeroten Anfärbung. Dieses, bei leicht reduziertem Gehalt zeigt sich eine helle orange Färbung, ein stark reduzierter Anteil zeigt sich weißlich und ein Fehlen von Proteoglykanen präsentiert sich blaugrün. Die Zellkerne erscheinen schwarz, das Zytoplasma und Kollagen färbt sich grün [154]. Durch diese Proportionalität ist die Safranin-O-Echtgrün-Färbung als semiquantitative Methode zum Nachweis von Proteoglykanen geeignet [154]. Die Färbung wurde anhand eines empirisch an Schafsknorpel modifizierten Standardprotokoll durchgeführt, da die Verbleibdauer der Schnitte in Safranin-Orange für 5 min keine ausreichende Färbeergebnisse aufwies. Daher wurde die Verweildauer im Gegensatz zum Standardprotokoll auf 8 min verlängert. Die Entparaffinierung und Rehydrierung fand wie in 6.4.3 beschrieben statt. Die Proben wurden 10 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert inkubiert, mit Leitungswasser abgespült, 4 min in Echtgrün (0,02 %) belassen, zum Aufhellen 3 x kurz in Essigsäure (1 %) getaucht, und 8 min in Safranin-Orange gegengefärbt. Die Entwässerung und Dauerfixierung erfolgten wie bereits in 6.4.4 beschrieben.



Abbildung 5: Gegenüberstellung der genutzten Färbemethoden der ovinen osteochondralen Einheit. Von links nach rechts: Safranin-O-Echtgrün-Färbung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Masson-Goldner-Färbung und Toluidinblau-Färbung.

6.5 Mikroskopische Evaluation des Reparaturgewebes innerhalb des Defektareals

Die Evaluation des Reparaturgewebes erfolgte anhand des etablierten histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [163]. Dieses komplexe Bewertungssystem besteht aus maximal 31 Punkten, was einem leeren Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe entspricht. Das Minimum von 0 Punkten wird vergeben bei kompletter Reparatur mit hyalinem Knorpel (Tabelle 8). Es wurden je zwei Defekte pro Knie untersucht. Von diesen 24 Proben wurden jeweils 20 Schnitte mit Safranin-O-Echtgrün (je 2 auf einem Objektträger) und je eine Probe mit Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner sowie mit Toluidinblau gefärbt. Zusätzlich wurden jeweils sechs Schnitte auf drei SuperFrost Plus Objektträgern zur immunhistochemischen Färbung gegen Typ-I-Kollagen, Typ-II-Kollagen und IGF-I verteilt. Von den Safranin-O-Echtgrün gefärbten Schnitten wurden zehn Schnitte durch das Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [163] in verschiedenen Vergrößerungen (4x, 10x, 20x) verblindet beurteilt (Abbildung 6, Tabelle 8). Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zu Rate gezogen, da sich in dieser Färbung die Zellen besonders gut demarkieren.

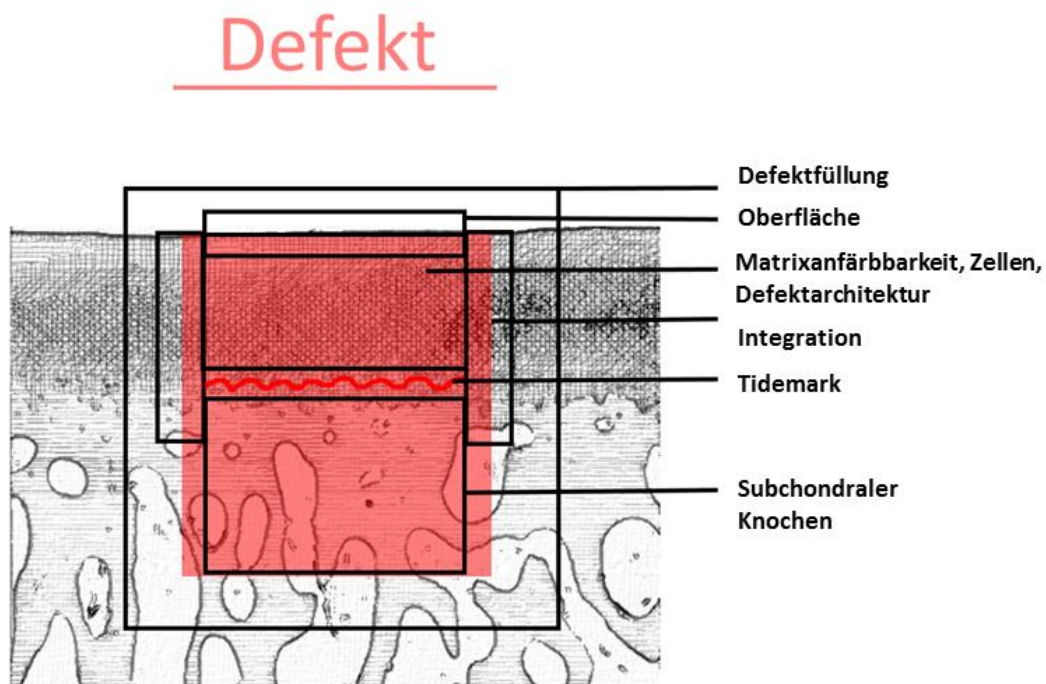


Abbildung 6: Histologische Beurteilung eines Knorpeldefektes durch das Bewertungssystem nach Sellers *et al.*. Dargestellt sind die einzelnen Kategorien, welche den osteochondralen Defekt (rot) beschreiben. Es ist darauf zu achten, dass sich die einzelnen Kategorien nicht überschneiden, um eine Doppelbewertung auszuschließen.

6. Methoden

Tabelle 8: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung von Knorpelreparatur nach Sellers et al. [163]

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
	Spalten auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O	Normal	0
	Leicht vermindert	1
	Mittelstark vermindert	2
	Stark vermindert	3
	Keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie	(a) normal	0
	(b) vorwiegend runde Zellen, Chondrozytenmorphologie:	
	75 % der Zellen in Säulen in der Radiärzone	0
	25-75 % der Zellen in Säulen in der Radiärzone	1
	<25 % in Säulen in der radialen Zone	2
	(c) 50 % runde Zellen, Chondrozytenmorphologie:	
	75 % der Zellen in Säulen in der Radiärzone	2
	25-75 % der Zellen in Säulen in der Radiärzone	3
	<25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	(d) vorwiegend Fibroblasten ähnliche Zellen	5
	Normal	0
	1-3 kleine Defekte	1
	1-3 große Defekte	2
	>3 große Defekte	3
6. Oberflächenarchitektur Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	Risse/Spalten	4
	Normal	0
	Leichte Fibrillation	1
	Mittelstarke Fibrillation	2
7. Neubildung des subchondralen Knochens unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	Starke Fibrillation	3
	90-100 %	0
	75-89 %	1
	50-74 %	2
	25-49 %	3
8. Formierung der Tidemark	<25 %	4
	vollständig	0
	75-89 %	1
	50-74 %	2
	25-49 %	3
	<25 %	4

6.6 Evaluation von degenerativen Schäden im angrenzenden Knorpel

Die Erfassung von degenerativen Veränderungen in den Defekt angrenzenden Gebieten erfolgte anhand des etablierten Bewertungssystems nach Little *et al.* [86], wobei dieses modifiziert wurde, da wir statt der Farbintensität von Toluidinblau-Färbung, Safranin-O-Echtgrün-Färbung nutzten. Es handelt sich hierbei um ein inverses Bewertungssystem, welches eine maximale Zerstörung des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen mit einem Maximalwert von 25 Punkten beschreibt. Ein normaler, gesunder Knorpel wird mit 0 Punkten bewertet (Tabelle 9). Es wurden hierfür jeweils drei Schnitte pro Defekt (sechs Schnitte pro Tier) ausgewählt und jeweils medial und lateral des Defektes beurteilt. Dabei wurde auf eine weite Verteilung der Schnitte im Defekt geachtet. Wir definierten den zu beurteilenden Bereich als das Areal, welches angrenzend an die Integrationszone die doppelte Knorpeldicke (entsprechend 2 mm) betrug (Abbildung 7). Dieser Bereich entspricht dem Areal, welches ebenso im Mikro-CT als angrenzend beurteilt wurde, sodass hier eine Erstellung von Korrelationen möglich war.

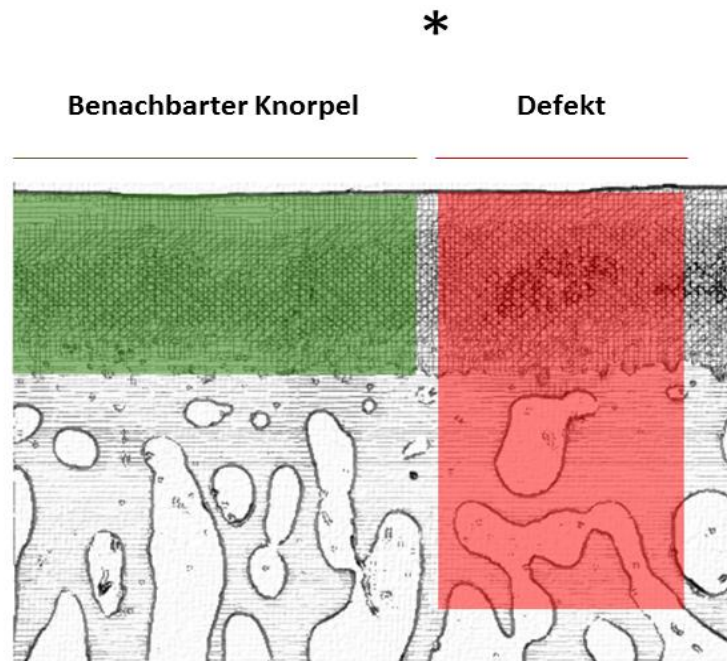


Abbildung 7: Histologische Beurteilung des angrenzenden Knorpels durch das Bewertungssystem nach Little *et al.*. Grün: Benachbarter Knorpel in einer Breite von 2 mm entsprechend der doppelten Knorpelhöhe. Rot: Defekt. *: Integrationszone, welche nicht im Little Bewertungssystem beurteilt werden darf, um Überlappungen der beurteilten Areale auszuschließen.

6. Methoden

Tabelle 9: Beurteilung des benachbarten Knorpels anhand des modifizierten Little Bewertungssystems [86] (modifiziert da die Safranin-O-Farbintensität statt Toluidinblau-Farbintensität bewertet wird).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Struktur (Beurteilung des schlechtesten Arealen)	Normal	0
	Leichte Oberflächen-Irregularitäten	1
	Moderate Oberflächen-Irregularitäten	2
	Massive Oberflächen-Irregularitäten (Riss, Fissur oder Fibrillation <10 % Tiefe)	3
	Fissuren bis zur Translationszone	4
	Fissuren bis zur radialen Zone	5
	Fissuren bis zur kalzifizierten Zone	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 (Beurteilung des gesamten Arealen)	Normal	0
	Erhöht oder leicht erniedrigt	1
	Moderat erniedrigt	2
	Massiv erniedrigt	3
	Keine Zellen	4
3. Zellklone	Normal	0
	Einzelne Duplets	1
	Viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	Multiple Zellnester oder keine Zellen	4
4. Safranin-O- Färbung (Beurteilung des schlechtesten Arealen)	Normal	0
	Erniedrigte Färbung bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
	Erniedrigte Färbung bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
	Erniedrigte Färbung bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	3
	Keine Färbung	4
5. Tidemark/Kalzifizierter Knorpel/subchondraler Knochen (Beurteilung des schlechtesten Arealen)	Intakte subchondrale Knochenplatte + Tidemark	0
	Intakte subchondrale Knochenplatte + doppelte Tidemark	1
	Blutgefäße penetrieren die subchondrale Knochenplatte bis zur kalzifizierten Zone	2
	Blutgefäße penetrieren die Tidemark	3

6.7 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie ermöglicht die Darstellung des Kollagenfaserverlaufs und Doppelbrechungen durch Anbringung der Polarisationsfilter am Lichtmikroskop. So konnten diese im Bereich der Defekte mit denen im normalen Knorpel verglichen werden.

6.8 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes

Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde direkt nach der Probenentnahme das Reparaturgewebe aus zwei der vier Defekte mit Hilfe eines scharfen Löffels gewonnen und bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurden 24 Proben (rAAV-*lacZ* = 12, rAAV-IGF-I = 12) biochemisch auf ihren DNS-Gehalt (Hoechst Test), ihren Proteoglykangehalt (DMMB-Test) und ihren Proteingehalt (BCA-Test) untersucht.

Vorbereitungen, Papain-Verdau

Die Proben wurden jeweils mit 400 µl verdünnter Papain-Lösung (25 mg/dl Papain-Lösung + 0,5 mg/dl PBS) versetzt und über Nacht bei 60 °C inkubiert.

6.8.1 Hoechst 33258 Test (DNS-Bestimmung)

Es erfolgte das Anlegen einer Standardreihe in den Vertiefungen A-F (in Doppelbestimmung) in einer schwarzen Mikrotitrierplatte mit 96 Vertiefungen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Standardreihe Hoechst 33258

Standard	A	B	C	D	E	F
DNS-Standard	0 µl	5 µl	10 µl	20 µl	50 µl	90 µl
TNE	100 µl	95 µl	90 µl	80 µl	50 µl	10 µl
DNS-Gehalt	0 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	900 ng

Zu je 10 µl der papainverdauten Probe wurden 90 µl TNE-Puffer in die Vertiefungen pipettiert. Hoechst 33258 wurde lichtgeschützt mit TNE verdünnt (1:500) und jeweils 100 µl zügig zu den Proben hinzugefügt. Da Hoechst 33258

eine zeit- und lichtabhängige Reaktion zeigt wurde auf ein zügiges und lichtgeschütztes Arbeiten geachtet. Die Auswertung erfolgte durch den GENios Microplatereader von TECAN (Crailsheim, Deutschland), welcher bei der Exzitationswellenlänge von 365 nm die Emissionen der Wellenlänge 458 nm misst. Durch die Standardreihe konnte eine Kalibrierungsgerade erstellt und anhand dieser der DNS-Gehalt der Proben berechnet werden.

6.8.2 Protein-Bestimmung (bicinchoninic acid Test; BCA-Test)

Eine Standardreihe A-I wurde in Doppelbestimmung in einer transparenten Mikrotitrierplatte mit 96 Vertiefungen angelegt, wobei in jede Vertiefung je 25 µl der Standardlösung pipettiert wurde (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mischungsstandard BSA für BCA-Test

Lösung	H ₂ O	BSA (Stock 2 mg/ml)	BSA- Konzentration
A	0 µl	75 µl stock	2000 µg/ml
B	31,3 µl	93,8 µl stock	1500 µg/ml
C	81,3 µl	81,3 µl stock	1000 µg/ml
D	43,8 µl	43,8 µl B	750 µg/ml
E	81,3 µl	81,3 µl C	500 µg/ml
F	81,3 µl	81,3 µl E	250 µg/ml
G	81,3 µl	81,3 µl F	125 µg/ml
H	100 µl	25 µl G	25 µg/ml
I	100 µl	0 µl	0 µg/ml

Anschließend wurden 10 µl der verdauten Probe mit 200 µl des nach Angaben des Herstellers präparierten Arbeitsreagenz (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo, Rockford, IL, USA) versetzt, abgedeckt auf dem Plattenschüttler für 30 s gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand der Absorption innerhalb der Standardreihe konnte eine Kalibrierungsgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Proben anhand dieser berechnet werden.

6.8.3 Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)

Zunächst wurden die Lösungen A, B und C hergestellt. Für Lösung A mischten wir 0,05 g D-Cysteinhydrochloridmonohydrat mit 30 ml PBE, für Lösung B 0,053 g Chondroitin-6-sulfat-Natriumsalz und 1 ml von Lösung A, für Lösung C 24,95 ml von Lösung A mit 0,05 ml von Lösung B. Eine Standardreihe wurde nach dem in Tabelle 12 ersichtlichen Schema in einer transparenten Mikrotitrierplatte angelegt.

Tabelle 12: Mischungsstandard DMMB-Test

Vertiefung	Lösung C	Lösung A	Konzentration
A	40 µl	0 µl	100 %
B	32 µl	8 µl	80 %
C	24 µl	16 µl	60 %
D	16 µl	24 µl	40 %
E	8 µl	32 µl	20 %
F	0 µl	40 µl	0 %

Je 10 µl der papainverdauten Probe wurden mit 30 µl von Lösung A in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurde allen je 250 µl DMMB-Lösung hinzugefügt und im Mikroplatten-Reader die Absorption bei 530 nm ermittelt. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt, an deren Formel der Proteoglykangehalt der Proben berechnet werden konnte.

6.9 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Proben wurden wie in 6.4.3 beschrieben entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe hydriert. Anschließend wurden die Objektträger in Leitungswasser gewaschen (2 x 1 min), in 0,3%iger Wasserstoffperoxid Lösung 30 min bei Raumtemperatur belassen, mit PBS-Lösung gespült (2x) und mit 0,1%iger Trypsinlösung bei 37 °C 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gespült (5 min) und in Blockierungspuffer (*blocking buffer*) 30 min bei Raumtemperatur gelassen. Daraufhin wurde mit einem Fettstift ein Rand um die Schnitte gezogen und die Objektträger in der Nasskammer ausgelegt. Die Schnitte

wurden mit jeweils 200 µl der primären Anti-Typ-I-Kollagen-PBS-Lösung (Verdünnung 1:90 des Antikörpers in Blockierungspuffer) bzw. bei Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörpern (Verdünnung 1:45 in Blockierungspuffer) sowie Anti-IGF-I-Antikörpern (Verdünnung 1:100 in Blockierungspuffer) vollständig benetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 h wurden die Objektträger zwei Mal mit PBS gespült und mit dem sekundären Antikörper (biotinyliert Anti-Goat Verdünnung 1:200 in PBS) beträufelt und wiederum für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reste wurden durch baden in PBS (3 x 5 min) abgespült. Das ABC-Reagenz wurde nach Herstellerangaben 30 min vor Anwendung gemischt, auf die Schnitte gegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit PBS gespült (3 x 5 min). Die DAB-Lösung wurde nach Herstellerangaben direkt vor Anwendung hergestellt. Nach dem Aufbringen der DAB-Lösung (Einwirkzeit 7 min) erfolgte die erneute Waschung mit PBS (3x), sowie mit *aqua bidest.* (1x). Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe. Eine Dauerfixierung wurde durch die Überführung der Schnitte in Xylol (2 x 5 min) und die Eindeckung mit Roti-Histokitt II erzielt. Durch das ABC-Reagenz (Peroxidase) kommt es zu einer braunen Farbreaktion an den sekundären Antikörpern. Die Intensität der Färbung ist proportional zum Gehalt der jeweils getesteten Substanz, was man sich zur Evaluation der Immunreaktivität zu Nutzen macht [134].

6.9.1 Evaluation der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen und Typ-II-Kollagen

Zur Bewertung der Immunreaktivität gegen Typ-I- und Typ-II-Kollagen kam das semiquantitative Bewertungssystem wie in Tabelle 13 beschrieben zur Anwendung. Hierbei wird von der Intensität der Braunfärbung auf die Menge des vorhandenen Kollagens geschlossen. Begutachtet man Typ-I-Kollagen, so dient der subchondrale Knochen als Positivkontrolle, der normale hyaline Gelenkknorpel als Negativkontrolle. Genau andersherum verhält es sich bei Typ-II-Kollagen. Hier gilt der normale Knorpel als Positiv-, der subchondrale Knochen als Negativkontrolle [134]. Insgesamt wurden je 24 Schnitte (je 2 pro Tier) auf die Immunreaktivität für Typ-I- sowie Typ-II-Kollagen untersucht und verblindet evaluiert.

Tabelle 13: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität

Intensität der Immunreaktion	Punkte
Keine Immunreaktion	0
Signifikant weniger Immunreaktion	1
Moderat weniger Immunreaktion	2
Gleiche Immunreaktion	3
Höhere Immunreaktion	4

6.9.2 Evaluation der Immunreaktivität für IGF-I

Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Darstellung der gegen IGF-I gefärbten Schnitte. Hierbei wurden Bilder mehrerer Sektionen unter 400-facher Vergrößerung angefertigt und die Zellen sowie die Zellen mit IGF-I Expression ausgezählt. Aus dem sich ergebenden Quotienten ergab sich das Maß der IGF-I Expression der beiden Gruppen in Prozent.

6.10 Statistische Analysen

Die erhobenen Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test sowie dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Daten für die histologische Analyse des Sellers-Bewertungssystems und des benachbarten Knorpels nach dem Little-Bewertungssystem wurden auf F-Test-Basis im gemischten Modell der ANOVA berechnet. Dieser Teil der statistischen Analysen wurde von D. Zurakowski, Ph.D, Department of Biostatistics, Harvard University (Boston, MA, USA) unter Verwendung der Stata Software (Release 15, StataCorp., College Station, TX, USA) durchgeführt. Gemäß den Tests für Normalverteilung waren die Daten für die makroskopische Analyse nicht normalverteilt und ein Mann-Whitney U-Test (unabhängige Werte) wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zu vergleichen. Die biochemischen Analysen waren normalverteilt und ein T-Test für zwei Seiten mit gleicher Varianz wurde durchgeführt (SPSS Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Für die Auswertungen der Mikro-CT-Daten wurde, abhängig von der Normalverteilung, eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich der drei Gruppen (Normal, rAAV-*lacZ* und rAAV-IGF-I) sowie ein Tukey Test für paarige Mehrfachvergleiche

oder eine Kruskal-Wallis Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche (SPSS Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal components analysis*, PCA) und eine *Analysis of Similarities* (ANOSIM) wurden durchgeführt und die P-Werte, sofern notwendig, nach der Bonferroni-Methode angepasst. Zur Untersuchung osteochondraler Interaktionen wurden Korrelationsanalysen der histopathologischen Bewertungssysteme und der Entwicklung perifokaler Arthrose durch den Spearman Korrelationskoeffizienzen (r) berechnet. Diese Berechnungen wurden mittels Prism v.8.2.1 (GraphPad Software Inc., CA, USA) oder Past v. 4.04 (Hammer Ø., University of Oslo, Oslo, Norwegen) durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts oder Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt, soweit angegeben. Ein P-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

7. Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden entsprechend der aufgestellten Hypothesen die makroskopischen, histologischen sowie immunhistochemischen und biochemischen Auswertungen, die Ergebnisse der Mikro-CT zur Evaluation des subchondralen Knochens sowie die degenerativen Veränderungen im benachbarten Knorpel betrachtet (Abbildung 8). Ein Defekt wurde aufgrund intraoperativer Fehlanlage (zu weit lateral) von der Beurteilung komplett ausgeschlossen. In einem Schaf zeigte der Defekt 4 sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Behandlungsgruppe eine intraossäre Zystenbildung sowie keinerlei Reparaturgewebe. Diese beiden Defekte wurden ebenfalls von allen Beurteilungen ausgeschlossen.

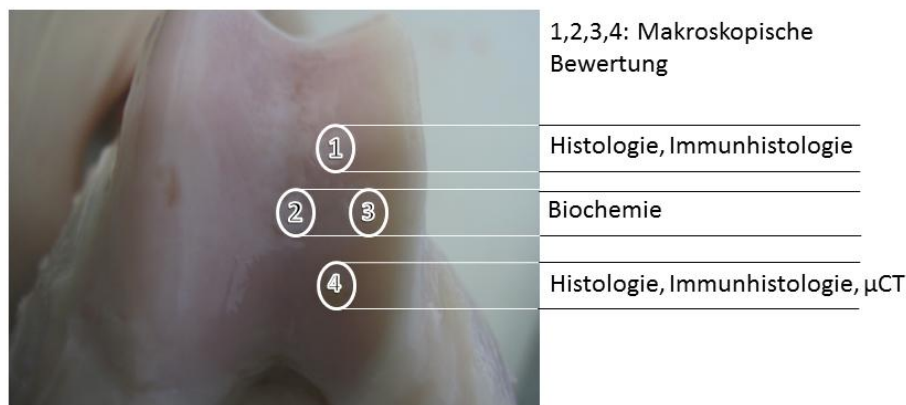


Abbildung 8: Darstellung der Defektauswertung an der Schafstrochlea. Die Defekte wurden wie im Bild dargestellt nummeriert. Alle Defekte wurden zunächst makroskopisch anhand von Fotografien untersucht. Defekt 1 wurde weiterhin histologisch und immunhistologisch untersucht. Die Defekte 2 und 3 wurden ausgekratzt und biochemisch untersucht. Defekt 4 wurde mit Hilfe von Mikrocomputertomographie (μ CT) sowie histologisch und immunhistologisch untersucht.

7.1 Reparatur des Gelenkknorpels

7.1.1 Makroskopische Begutachtung des Reparaturgewebes

Sechs Monate postoperativ wurden die Proben entnommen und makroskopisch beurteilt. Ein Kniegelenkserguss, eine Synovialitis oder eine Luxation der Patella konnte bei keinem Tier beobachtet werden. Die Defekte waren stets prompt identifizierbar. Zur genaueren makroskopischen Evaluation der Defektreparatur wurden im Rahmen der Probenentnahme Fotografien angefertigt und das Gewebe anhand der Bewertungssysteme zur makroskopischen Beurteilung von Knorpelreparaturgewebe nach Goebel *et al.* [54] und aus Oswestry [169] beurteilt. Die Farbe des Reparaturgewebes war in beiden Gruppen hauptsächlich weiß bis hyalinartig. Einsprossende Blutgefäße waren in einer Probe der Kontrollgruppe, sowie in drei Proben der Behandlungsgruppe nachweisbar, beschränkten sich aber in allen Fällen auf weniger als 25 % des Reparaturgewebes. Die Oberfläche wies sowohl innerhalb der Kontrollgruppe, als auch in der Behandlungsgruppe zum Großteil Fibrillationen auf. Das Reparaturgewebe füllte den Defekt in beiden Gruppen in den meisten Fällen zu 50-100 % aus. Der subchondrale Knochen war in keinem Fall freigelegt. Bei drei Defekten der rAAV-IGF-I Gruppe kam es zu einer Hypertrophie des Reparaturgewebes über das Knorpelniveau des angrenzenden Knorpels hinaus. Im angrenzenden Knorpel wurden häufig Kontinuitätsunterbrechungen sowie Fibrillationen in der Integrationszone und teilweise diffuse arthrotische Veränderungen beobachtet. Durch das makroskopische Bewertungssystem aus Oswestry (Tabelle 6) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen. Auch bei Untersuchung der Proben mittels des Homburger Bewertungssystems (Tabelle 7), welches sich durch eine genauere Punkteverteilung innerhalb der Bewertungskategorien auszeichnet, konnte kein statistisch relevanter Unterschied im makroskopischen Erscheinen der rAAV-IGF-I Gruppe und der rAAV-lacZ-Gruppe gefunden werden. In Zusammenschau der Daten zeigte sich weder in den einzelnen Kategorien noch im Gesamtwert ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$ in allen Kategorien) (Abbildung 9, Tabelle 14 und 15).

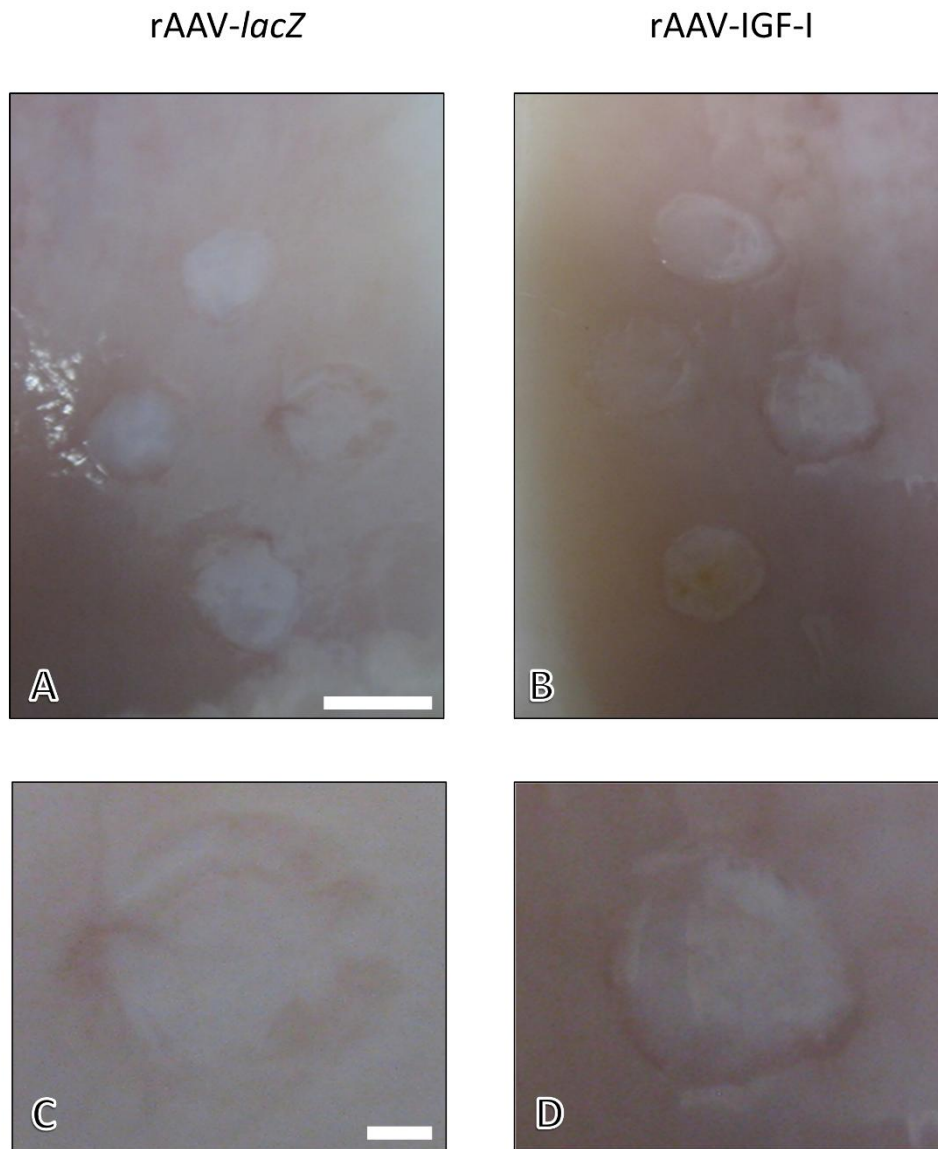


Abbildung 9: Makroskopische Begutachtung der Defektreparatur durch Fotografien der ovinen Trochlea ossis femoris post sectionem. Die Bildauswahl entspricht jeweils dem durch das Bewertungssystem nach Goebel et al. ermittelten Mittelwert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen ($p > 0,05$ in allen Kategorien).

A, C: rAAV-lacZ; B, D: rAAV-IGF-I. Der Maßstabsbalken entspricht in A: 3,5 mm, in C: 1 mm

Tabelle 14: Ergebnisse nach dem makroskopischen Bewertungssystem nach Goebel et al. MW $\pm$ SD. 0 Punkte = Normalbefund, komplette Reparatur, 20 Punkte = fehlende Knorpelreparatur, Knochenglatze

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-IGF-I	P-Wert
Färbung	1,00 $\pm$ 0,74	0,91 $\pm$ 0,68	0,67
Blutgefäße	0,04 $\pm$ 0,21	0,23 $\pm$ 0,53	0,13
Oberfläche	2,00 $\pm$ 0,80	2,00 $\pm$ 0,44	1
Defektfüllung	0,74 $\pm$ 0,75	0,64 $\pm$ 0,66	0,63
Benachbarter Knorpel	1,57 $\pm$ 0,73	1,45 $\pm$ 0,74	0,62
Summe	5,35$\pm$2,37	5,23$\pm$2,16	0,86

Tabelle 15: Ergebnisse nach dem makroskopischen Bewertungssystem aus Oswestry, MW $\pm$ SD. 0-8 Punkte. 0 Punkte = fehlende Knorpelreparatur/ Knochenglatze, 8 Punkte = Normalbefund, komplette Reparatur

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-IGF-I	P-Wert
Defektfüllung	1,71 $\pm$ 0,69	1,50 $\pm$ 0,66	0,29
Integration	1,17 $\pm$ 0,70	1,25 $\pm$ 0,68	0,68
Oberflächenbeschaffenheit	1,08 $\pm$ 0,78	0,92 $\pm$ 0,58	0,40
Farbe	1,29 $\pm$ 0,62	1,50 $\pm$ 0,66	0,27
Summe	5,25$\pm$2,03	5,17$\pm$2,04	0,89

7.1.2 Ergebnisse der biochemischen Evaluation des Reparaturgewebes

Zur biochemischen Evaluation des Reparaturgewebes führten wir die Hoechst-, DMMB- sowie BCA-Tests durch, um den Gesamtgehalt der DNS, der Proteoglykane sowie der Proteine zu bestimmen. Die so gewonnenen Messwerte wurden in Relation zueinander gesetzt und die Quotienten Proteoglykan/Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$), DNS/Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$) und Proteoglykan/DNS ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) gebildet, was eine qualitative Aussage über das Reparaturgewebe zulässt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Ergebnisse der biochemischen Auswertung, MW $\pm$ SD. * Statistisch signifikant.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-IGF-I	P-Wert
Proteoglykan / Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	78,09 $\pm$ 22,32	54,58 $\pm$ 7,54	0,005*
DNS / Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	532,99 $\pm$ 252,11	335,92 $\pm$ 208,51	0,061
Proteoglykan / DNS ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	0,22 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,20	0,318

Proteoglykane pro Gesamtprotein

Es zeigte sich ein statistisch relevanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe in Bezug auf den Gehalt von Proteoglykanen pro Gesamtprotein ($p = 0,005$) (Tabelle 16).

DNS pro Gesamtprotein

Es zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe in Bezug auf den DNS-Gehalt pro Gesamtprotein im Reparaturgewebe ($p = 0,061$). In Betrachtung der Einzelwerte zeigt sich eine

erhöhte Zellzahl in den mit rAAV-*lacZ* behandelten Defekten im Vergleich zu den mit rAAV-IGF-I behandelten Behandlungsgruppe (Tabelle 16).

Proteoglykane pro DNS

Betrachtet man den Quotienten von Proteoglykanen pro DNS, so können Rückschlüsse auf die Matrixsyntheseleistung der Zellen im Defekt gezogen werden. Hierbei lag kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe vor ($p = 0,318$) (Tabelle 16).

7.1.3 Histologische Beurteilung der osteochondralen Reparatur

Die histologische Bewertung der Defekte erfolgte anhand der verschiedenen Färbungen (Abbildung 10) wobei der Safranin-O-Echtgrün-Färbung aufgrund ihrer semiquantitativen Eigenschaften eine besondere Rolle in der Untersuchung der Knorpeldefekte zukommt.

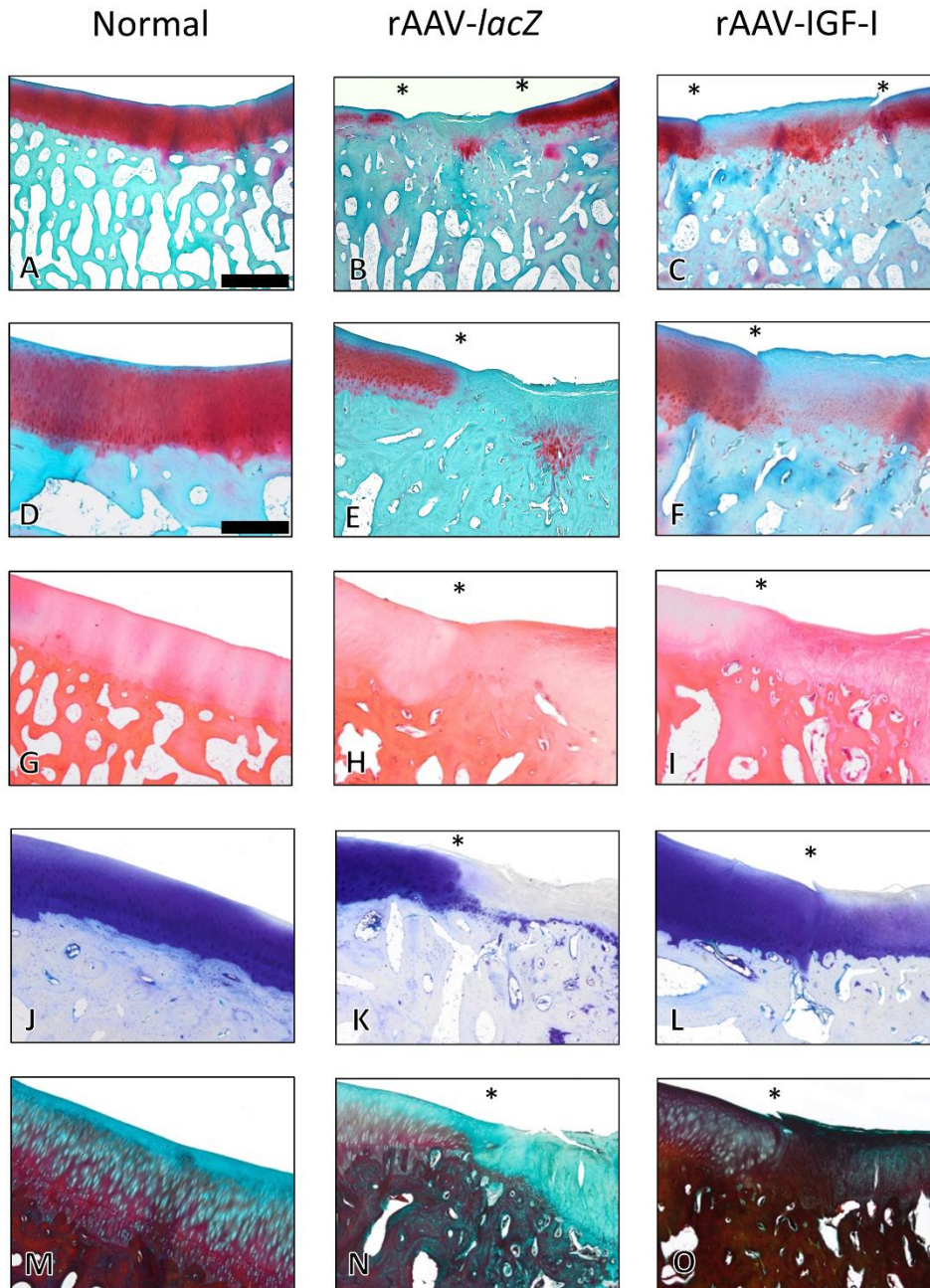


Abbildung 10: Ergebnisse der histologischen Auswertung durch das Bewertungssystem nach Sellers et al.. Die verschieden gefärbten Schnitte zur Beurteilung werden dargestellt (1. und 2. Zeile Safranin-O-Echtgrün-, 3. Zeile Hämatoxylin-Eosin-, 4. Zeile Toluidin-Blau- und in der 5. Zeile Masson-Goldner-Färbung). In den Spalten werden von links nach rechts: normaler Knorpel, die Kontrollgruppe (rAAV-lacZ) und die Behandlungsgruppe (rAAV-IGF-I) gezeigt. Die Bildauswahl entspricht jeweils dem gefundenen Mittelwert im histologischen Sellers-Bewertungssystem. * markiert die Defektgrenzen. Der Maßstabsbalken entspricht in A: 1 mm, in D: 500 μ m. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

Histologische Auswertung durch das Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

In beiden Gruppen war der Defekt immer identifizierbar. Die Integrationszone wies stets eine geringere Zelldichte auf. In der rAAV-IGF-I-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe war das Reparaturgewebe meist auf beiden Seiten mit dem benachbarten Knorpel verbunden, manchmal zeigte sich eine Unterbrechung auf einer der beiden Seiten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen in Bezug auf die Integration des Reparaturgewebes im Nachbargewebe ($p = 0,17$). Die Defektfüllung war in der rAAV-IGF-I-Gruppe mit einem Mittelwert von 0,53 Punkten im Sellers Bewertungssystem durchschnittlich zwischen 90 und 125 %. In einer Probe zeigte sich in der IGF-I-Gruppe eine deutliche Hypertrophie von über 125 %. Die Füllung der rAAV-*lacZ*-Gruppe war mit einem Mittelwert von 0,93 Punkten signifikant tiefer ($p < 0,001$) als die der Behandlungsgruppe. Eine Hypertrophie konnte in keinem Fall festgestellt werden. Die Matrixanfärbbarkeit zeigte sich in der rAAV-IGF-I Gruppe meist gering bis moderat reduziert. In der rAAV-*lacZ* Gruppe hingegen war die Matrixanfärbbarkeit häufig stark reduziert. In Bezug auf die Matrixanfärbbarkeit lag ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Gruppen vor. Die Zellen zeichneten sich nach Behandlung mit rAAV-IGF-I häufig zu 50 % durch eine runde Chondrozytenmorphologie aus. Diese waren allerdings nur in 25-75 % der Radiärzone in säulenartigen Stapeln angeordnet. Die Zellen in der Kontrollgruppe waren häufig fibroblastenähnlich spindelförmig, teilweise chondrozytenähnlich rund, allerdings meist unorganisiert angeordnet. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$). Die Architektur der Oberfläche zeigte in der Behandlungsgruppe häufig leichte bis mittelgradige Fibrillationen und Unregelmäßigkeiten. In der rAAV-*lacZ*-Gruppe gab es häufiger mittelgradige Fibrillationen wie auch Unterbrechungen und Risse in der Oberfläche ($p < 0,001$). Im Bereich des subchondralen Knochens zeigte sich in der rAAV-IGF-I-Gruppe im Durchschnitt eine Neubildung von 75-80 % des zerstörten Knochengengerüsts im Vergleich zum benachbarten subchondralen Knochen. Im Vergleich hierzu zeigte die rAAV-*lacZ*-Gruppe eine signifikant niedrigere Regeneration im Bereich des subchondralen Knochens von durchschnittlich 60 % ($p < 0,001$). Die *Tidemark* war in keinem Fall vollständig regeneriert. Es zeigte sich eine teilweise Wiederherstellung der *Tidemark* in der

rAAV-IGF-I Gruppe von durchschnittlich 45 % der Strecke in der rAAV-*lacZ*-Gruppe von 35 %. In der Summe der Mittelwerte ergibt sich somit in der rAAV-IGF-Gruppe ein Gesamtwert von $15,2 \pm 0,32$ Punkten, in der rAAV-*lacZ*-Gruppe ein Wert von $21,72 \pm 0,30$ Punkten, welcher insgesamt zu einem signifikant ($p < 0,001$) besseren histologischen Ergebnis der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe im komplexen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [163] führt.

Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Evaluation nach dem Bewertungssystem nach Sellers *et al.*. Die *p*-Werte wurden auf *F*-Test-Basis im gemischten Modell der ANOVA berechnet. * Statistisch signifikant basierend auf der Bonferroni-Methode für Mehrfachvergleiche ($\alpha = 0,05/9$ oder $P < 0,006$).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-IGF-I	Mittlere Differenz (95 % KI)	P-Wert
Defektfüllung	$0,93 \pm 0,07$	$0,53 \pm 0,08$	-0,40 (-0,61 bis -0,20)	<0,001*
Integration	$1,42 \pm 0,07$	$1,29 \pm 0,07$	-0,13 (-0,33 bis 0,06)	0,17
Matrixanfärbbarkeit	$3,34 \pm 0,10$	$1,94 \pm 0,10$	-1,40 (-1,67 bis -1,13)	<0,001*
Zellmorphologie	$4,87 \pm 0,10$	$2,71 \pm 0,10$	-2,16 (-2,43 bis -1,88)	<0,001*
Architektur (Defekt)	$3,15 \pm 0,14$	$2,71 \pm 0,14$	-0,44 (-0,82 bis -0,04)	0,032
Architektur (Oberfläche)	$2,59 \pm 0,08$	$2,20 \pm 0,09$	-0,39 (-0,63 bis -0,16)	0,001*
Subchondraler Knochen	$2,18 \pm 0,12$	$1,43 \pm 0,13$	-0,75 (-1,11 bis -0,40)	<0,001*
<i>Tidemark</i>	$3,24 \pm 0,09$	$2,39 \pm 0,10$	-0,85 (-1,11 bis -0,59)	<0,001*
Summe	$21,72 \pm 0,30$	$15,2 \pm 0,32$	-6,52 (-7,39 bis -5,66)	<0,001*

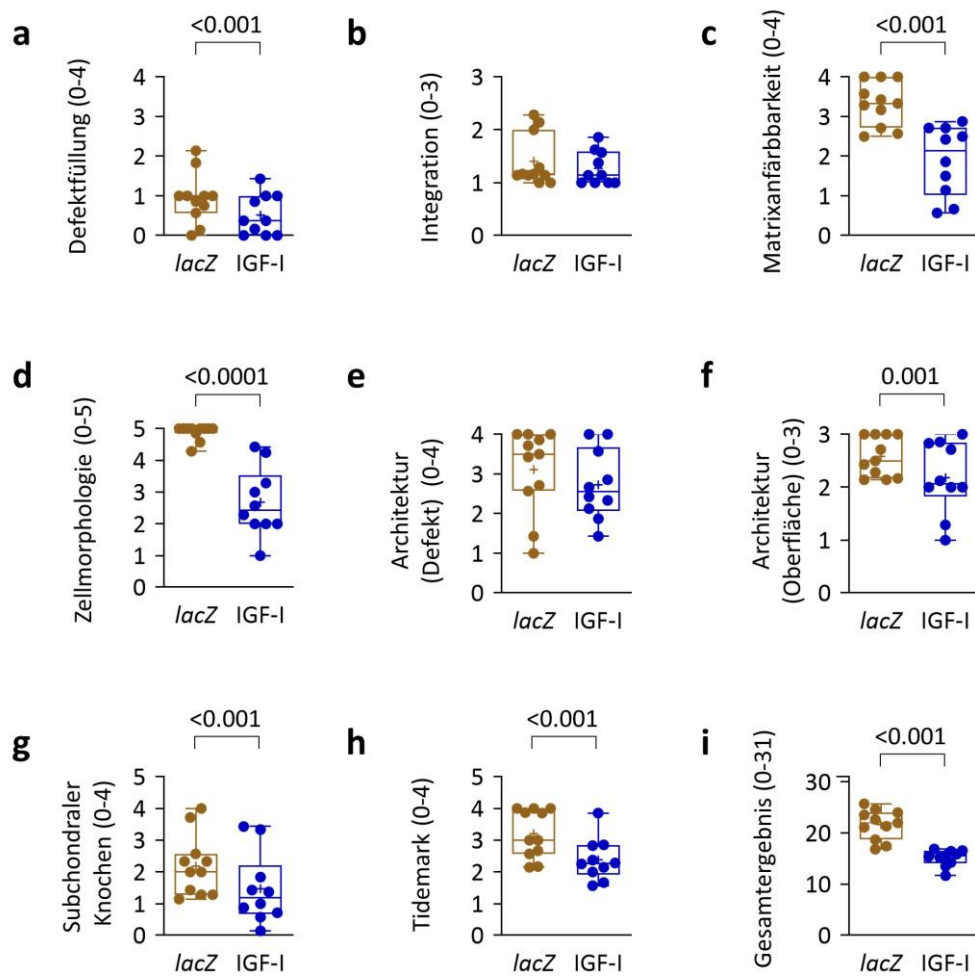


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der histologischen Evaluation durch das Bewertungssystem nach Sellers et al.. Boxplots der Kategorien des Bewertungssystems nach Sellers et al. (a) Defektfüllung, (b) Integration, (c) Matrixanfärbbarkeit, (d) Zellmorphologie, (e) Architektur im Defekt, (f) Architektur der Oberfläche, (g) Subchondraler Knochen, (h) Tidemarkformation und (i) Gesamtergebnis. Die Boxplots zeigen jeweils die 75. Und 25. Perzentile, den Median, die „Whiskers“ den minimalen und maximalen Wert, sowie die Einzelwerte als Punkte. Die p-Werte wurden auf F-Test-Basis im gemischten Modell der ANOVA berechnet. * Statistisch signifikant basierend auf der Bonferroni-Methode für Mehrfachvergleiche ($\alpha = 0,05/9$ oder $P < 0,006$). Braun: lacZ, Blau: IGF-I. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

7.1.4 Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Nachweis der Überexpression von IGF-I

Die immunhistochemische Untersuchung zeigte eine signifikant höhere Anreicherung von IGF-I-exprimierenden Zellen im Bereich der mit rAAV-IGF-I ($33,54 \pm 8,61$ %) im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* ($6,2 \pm 2,66$ %) behandelten Defekten im Reparaturgewebe ($p = 0,006$). Eine langanhaltende Überexpression von IGF-I wurde durch den rAAV-vermittelten Gentransfer *in vivo* nach 6 Monaten nachgewiesen (Abbildung 12).

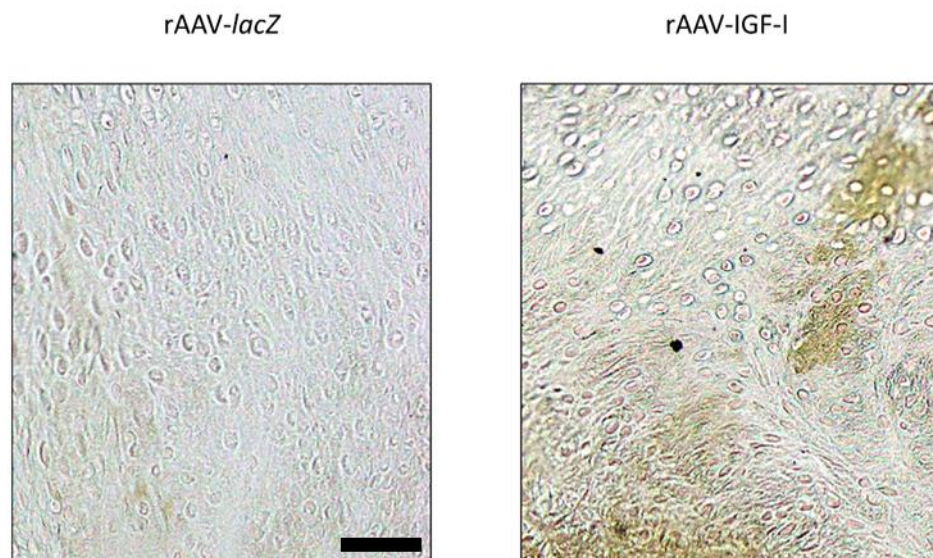


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung gegen IGF-I im Defektgewebe. Die Braunfärbung zeigt die Immunreaktion gegen IGF-I an. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von IGF-I in der Behandlungsgruppe ($p = 0,006$). Der Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

Analyse der Immunreaktivität von Typ-II-Kollagen

Die Immunreaktivität gegenüber Typ-II-Kollagen war in der Behandlungsgruppe (rAAV-IGF-I, $3,45 \pm 0,43$) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ*, $1,63 \pm 0,74$, $p < 0,001$) (Abbildung 13).

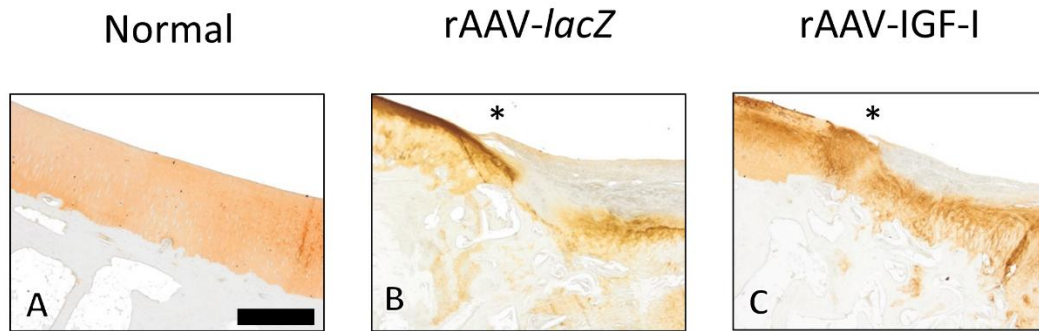


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung gegen Typ-II-Kollagen. Die Intensität der Braunfärbung zeigt den Gehalt an Typ-II-Kollagen an. A: Normalbefund, B: rAAV-lacZ, C: rAAV-IGF-I. Die Bilder entsprechen dem gefundenen Mittelwert. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

Analyse der Immunreaktivität von Typ-I-Kollagen

Zwischen der Behandlungsgruppe (rAAV-IGF-I MW $0,74 \pm 0,63$) und der Kontrollgruppe (rAAV-lacZ MW: $1,35 \pm 0,65$) zeigte sich in Bezug auf die Immunreaktivität gegenüber Typ-I-Kollagen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,03$). Die starke Braunfärbung des subchondralen Knochens, bewies die korrekte Immunfärbung, welche als Positivkontrolle für Typ-I-Kollagen dient. Normalerweise findet man in gesundem Knorpelgewebe hauptsächlich Typ-II-Kollagen, weshalb in Abbildung 14 A keine Immunreaktion stattfindet, in B und C zeigt sich eine geringe Immunreaktivität gegen Typ-I-Kollagen innerhalb des knorpeligen Reparaturgewebes.

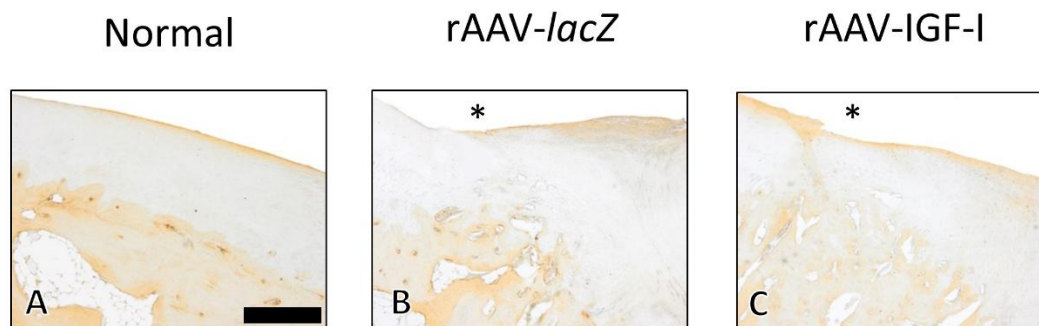


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung gegen Typ-I-Kollagen. Die Intensität der Braunfärbung zeigt den Gehalt an Typ-I-Kollagen an. A: Normalbefund, B: rAAV-lacZ, C: rAAV-IGF-I. Die Bilder entsprechen dem gefundenen Mittelwert. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

7.1.5 Polarisationsmikroskopie

Durch die Polarisationsmikroskopie kann der Verlauf der Kollagenfasern sichtbar gemacht werden. Wir konnten zeigen, dass sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe eine normale Architektur nicht wieder hergestellt werden konnte (Abbildung 15).

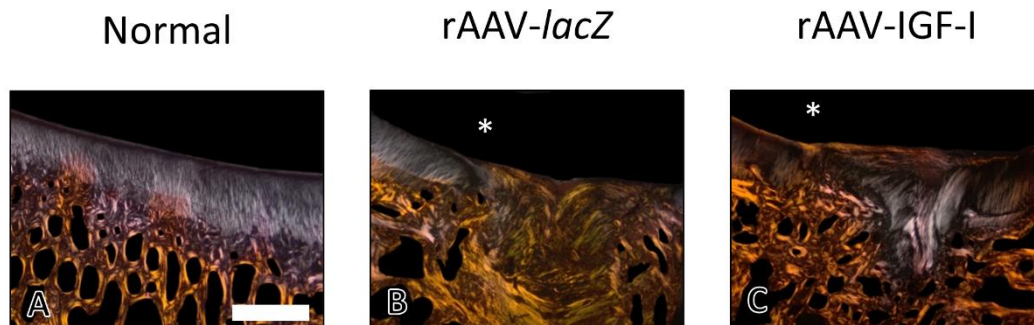


Abbildung 15: Polarisationsmikroskopische Darstellung. Während normalerweise die Kollagenfasern im hyalinen Knorpel einem geordneten Verlauf folgen (A), kann man innerhalb der Defektareale (B u. C) erkennen, dass dieser unterbrochen ist und die Fasern keinem erkennbaren Muster folgen. * markiert die Integrationszone. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

7.2 Reparatur des subchondralen Knochens

Im Rahmen der Mikro-CT-Auswertung wurden wie in 6.4 beschrieben vier verschiedene VOI definiert und ausgewertet. Die Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden sowohl miteinander als auch mit Normwerten verglichen (Tabelle 18 und Tabelle 19).

7.2.1 Auswertung der subchondralen Knochenplatte im Defekt

Die Knochenstrukturparameter der Mikro-CT-Untersuchung zeigten im Bereich der subchondralen Knochenplatte im Defekt zwischen der rAAV-lacZ und der rAAV-IGF-I-Gruppe keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,2$). In Betrachtung der Parameter im Vergleich zu den Normwerten zeigte sich kein Unterschied der Knochenmineraldichte (BMD) zwischen den Gruppen. Das Knochenvolumen (BV/TV), Knochenoberfläche/Volumen (BS/BV) und Knochenoberflächendichte (BS/TV) zeigten zwar im Vergleich von rAAV-IGF-I zu rAAV-lacZ keinen

signifikanten Unterschied, jedoch waren sie signifikant gegenüber der Norm verändert. Das Knochenvolumen (BV/TV) war bei rAAV-*lacZ* sowie rAAV-IGF-I reduziert. Knochenoberfläche/Volumen (BS/BV) war in beiden Fällen im Vergleich zur Norm erhöht. Die kortikale Dicke (Ct. Th.) zeigte bei rAAV-IGF-I keinen signifikanten Unterschied zur Norm und war im Durchschnitt deutlich dicker als in der rAAV-*lacZ* Gruppe (Tabelle 18).

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der Mikro-CT Messwerte der Kortikalis im Defektareal. Die Mikro-CT Messwerte im Defektareal sind als MW $\pm$ SD dargestellt. Zum Vergleich wurden die Normwerte aufgeführt. Die spezifischen P-Werte kommen wie folgt zu Stande: L/I: rAAV-IGF-I vs. rAAV-*lacZ*, L/N: rAAV-*lacZ* vs. Normal, I/N: rAAV-IGF-I vs. Normal, * statistisch signifikant.

Subchondrale Knochenplatte, Defekt							
Parameter	Einheit	Normal	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-IGF-I	Spezifische P-Werte		
					L/I	L/N	I/N
BMD	mg/cm ³	676,87 $\pm$ 53,63	640,98 $\pm$ 53,63	686,16 $\pm$ 78,25	0,23	0,214	0,815
BV/TV	%	66,12 $\pm$ 8,42	33,09 $\pm$ 10,25	38,50 $\pm$ 12,33	0,43	0,0001*	0,001*
BS/BV	mm ⁻¹	48,66 $\pm$ 4,65	63,89 $\pm$ 4,77	61,09 $\pm$ 10,51	0,56	0,0002*	0,024*
BS/TV	mm ⁻¹	31,91 $\pm$ 2,52	20,93 $\pm$ 5,50	23,47 $\pm$ 7,72	0,53	0,001*	0,029*
Ct. Th	mm	0,54 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,20	0,60	0,040*	0,204

7.3.2 Auswertung der subartikulären Spongiosa im Defekt

Auch im Vergleich der subartikulären Spongiosa im Defektareal zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit rAAV-IGF-I behandelten Defekten und den mit rAAV-*lacZ* behandelten Kontrolldefekten. Die Knochenmineraldichte wies in der rAAV-*lacZ*-Gruppe eine signifikant niedrigere Dichte als die normale Kontrollgruppe auf, die der rAAV-IGF-I erwies sich hingegen im Durchschnitt nur leicht erniedrigt. Das Knochenvolumen (BV/TV) zeigte in beiden Gruppen physiologische Verhältnisse. Die Knochenoberfläche/Volumen (BS/BV) und Knochenoberflächendichte (BS/TV) waren sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe signifikant erhöht, wohingegen die trabekuläre Separation (Tb. Sp) sich in beiden Gruppen erniedrigt darstellte. Obwohl der trabekuläre Musterfaktor (Tb. Pf) keinen signifikanten Unterschied zu physiologischen Verhältnissen aufwies ist eine Tendenz einer erniedrigten Konnektivität der Trabekel in den Defektarealen zu verzeichnen. Die Anzahl der Trabekel (Tb. N) hat sich jedoch signifikant in beiden Untersuchungsgruppen vermehrt wie aus Tabelle 19 zu entnehmen ist.

7. Ergebnisse

Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der Mikro-CT Messwerte der subartikulären Spongiosa im Defektareal. Die Mikro-CT Messwerte sind als MW $\pm$ SD dargestellt. Zum Vergleich wurden die Normwerte aufgeführt. Die spezifischen P-Werte kommen wie folgt zu Stande: L/I: rAAV-IGF-I vs. rAAV-lacZ, L/N: rAAV-lacZ vs. Normal, I/N: rAAV-IGF-I vs. Normal. * statistisch signifikant.

Subartikuläre Spongiosa, Defekt							
Parameter	Einheit	Normal	rAAV-lacZ	rAAV-IGF-I	Spezifische P-Werte		
					L/I	L/N	I/N
BMD	mg/cm ³	764,64 $\pm$ 45,26	684,22 $\pm$ 34,17	727,10 $\pm$ 88,06	0,29	0,006*	0,375
BV/TV	%	36,37 $\pm$ 7,56	38,11 $\pm$ 5,18	40,06 $\pm$ 5,99	0,56	0,652	0,370
BS/BV	mm ⁻¹	37,08 $\pm$ 5,02	52,53 $\pm$ 3,77	51,16 $\pm$ 10,00	0,76	0,0001*	0,012*
BS/TV	mm ⁻¹	13,41 $\pm$ 2,76	20,01 $\pm$ 2,94	20,32 $\pm$ 3,61	0,89	0,002*	0,004*
Ct. Th	mm	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
Tb. Th	mm	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,54	0,0003*	0,004*
Tb. Sp	mm	0,19 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,03	0,89	0,102	0,080
Tb. Pf	mm ⁻¹	-19,48 $\pm$ 8,36	-27,37 $\pm$ 5,51	-28,79 $\pm$ 7,17	0,71	0,082	0,065
Tb. N	mm ⁻¹	4,44 $\pm$ 1,05	6,30 $\pm$ 1	6,42 $\pm$ 1,09	0,85	0,010*	0,009*
SMI	-/-	-0,66 $\pm$ 0,87	-0,17 $\pm$ 0,35	-0,37 $\pm$ 0,65	0,52	0,223	0,519
DA	-/-	0,34 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,03	0,37	0,17	0,55
FD	-/-	2,52 $\pm$ 0,05	2,54 $\pm$ 0,03	2,55 $\pm$ 0,01	0,64	0,384	0,220

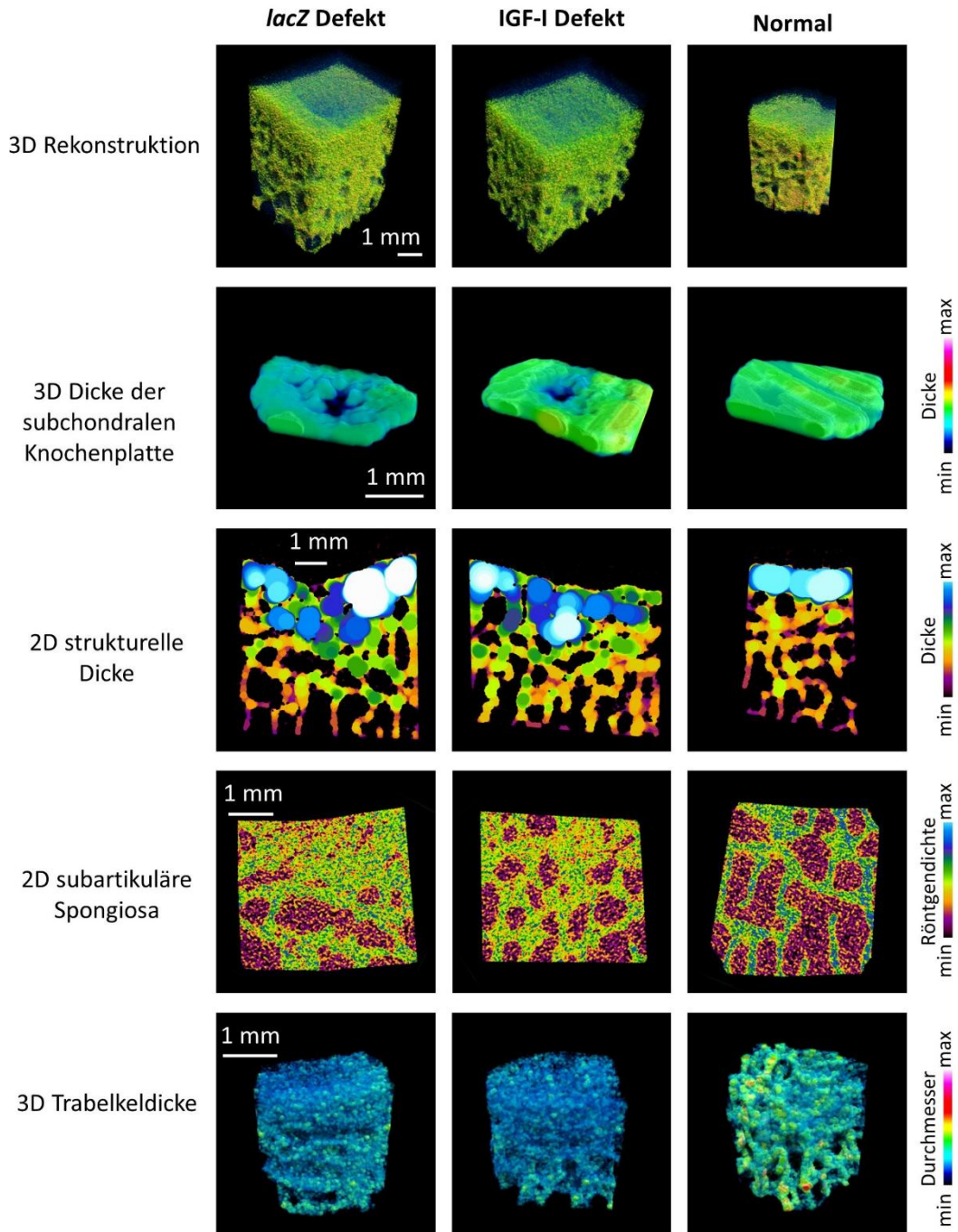


Abbildung 16: Analyse der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens im Defektareal. Dargestellt sind repräsentative Mikro-CT Schnittbilder sowie farbkodierte 3D-Rekonstruktionen der osteochondralen Einheit. Maßstabsbalken jeweils 1 mm. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

7.3 Beurteilung der benachbarten Areale

7.3.1 Mikroskopische Analyse von arthrotischen Veränderungen im perifokal benachbarten Knorpel

Um arthrotische Veränderungen in den Defekt angrenzenden Bereichen zu ermitteln, wurden anhand der Safranin-O-Echtgrün gefärbten Schnitte wie in 6.6 beschrieben durch das Bewertungssystem nach Little *et al.* [86] untersucht.

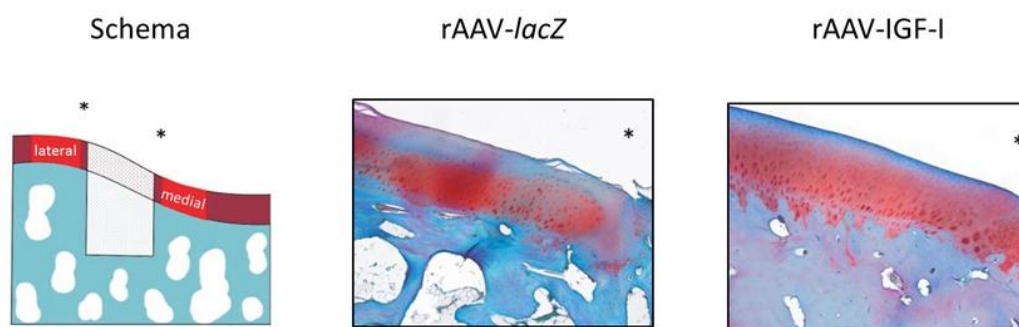


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Auswertung durch das Bewertungssystem nach Little *et al.*. Die Bildauswahl entspricht den gefundenen Mittelwerten der Gruppen. Es zeigte sich eine statistisch signifikant besserer Gesamtpunktwert in der Behandlungsgruppe ($p = 0,039$) und somit weniger arthrotische Veränderungen im benachbarten Knorpel der mit rAAV-IGF-I behandelten Defekte. * markiert die Integrationszone

Der angrenzende Knorpel zeigte einen signifikanten Unterschied für die beiden Gruppen. Wie in Abbildung 17 und 19 zu erkennen, zeigt die Kontrollgruppe eine geringere Anfärbbarkeit mit Safranin-O sowie Irregularitäten an der Knorpeloberfläche. Die rAAV-IGF-I-Gruppe zeigt nur eine dezent abgeschwächte Anfärbbarkeit, die *Tidemark* und Oberflächenbeschaffenheit entsprechen der Norm. Im Bereich der Integrationszone erkennt man bei in der Behandlungsgruppe einige Zellcluster, die sich der Integrationszone anschließen (Abbildung 19). Sowohl im Gesamtvergleich ($p = 0,039$) als auch in den Kategorien Zellklone ($p = 0,004$), Safranin-O-Färbung ($p = 0,0002$) sowie in der Formierung der *Tidemark* ($p = 0,023$) wurden signifikant bessere Werte in der rAAV-IGF-I-Gruppe erzielt. In den Kategorien Struktur als auch der Chondrozytendichte zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Tabelle 20, Abbildung 18 u. 19).

7. Ergebnisse

Tabelle 20: Auswertung des benachbarten Knorpels durch das Bewertungssystem nach Little et al.. MW±SD.
* Statistisch signifikant.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-IGF-I	P-Wert
Struktur	1,62±1,22	1,48±1,22	0,54
Chondrozytendichte	1,70±0,58	1,78±0,77	0,51
Zellklone	2,67±0,75	2,26±0,78	0,004*
Safranin-O-F.	2,82±0,80	2,13±0,87	0,0002*
Tidemark/k/s	0,09±0,29	0±0	0,023*
Summe	8,89±2,04	7,65±2,08	0,039*

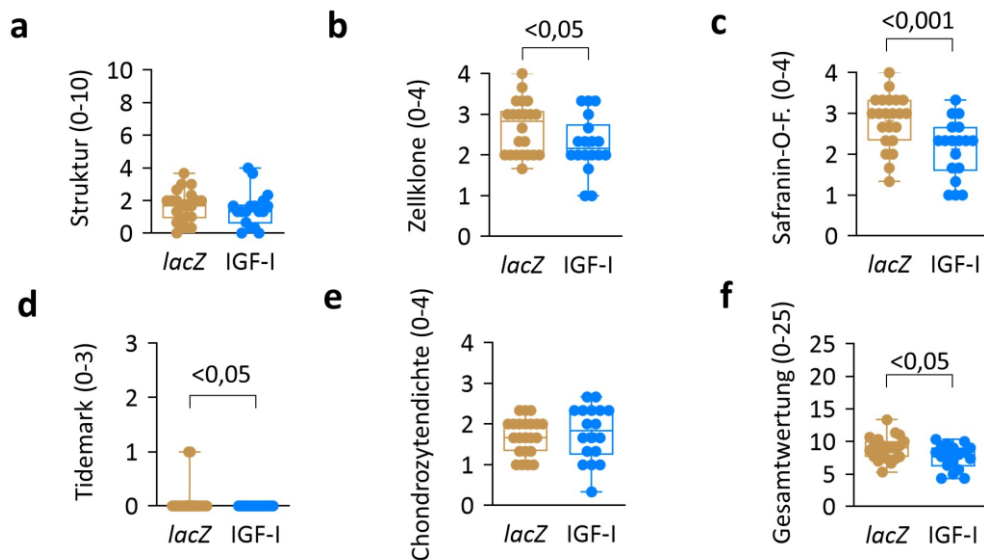


Abbildung 18: Graphische Darstellung der histologischen Analysen des benachbarten Knorpels. Boxplots der semiquantitativen Beurteilung der (a) Struktur, (b) Zellklone, (c) Safranin-O.-Färbung, (d) Tidemark, (e) Chondrozytendichte und (f) Gesamtauswertung des perifokal benachbarten Knorpels anhand des Beurteilungssystems nach Little et al. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

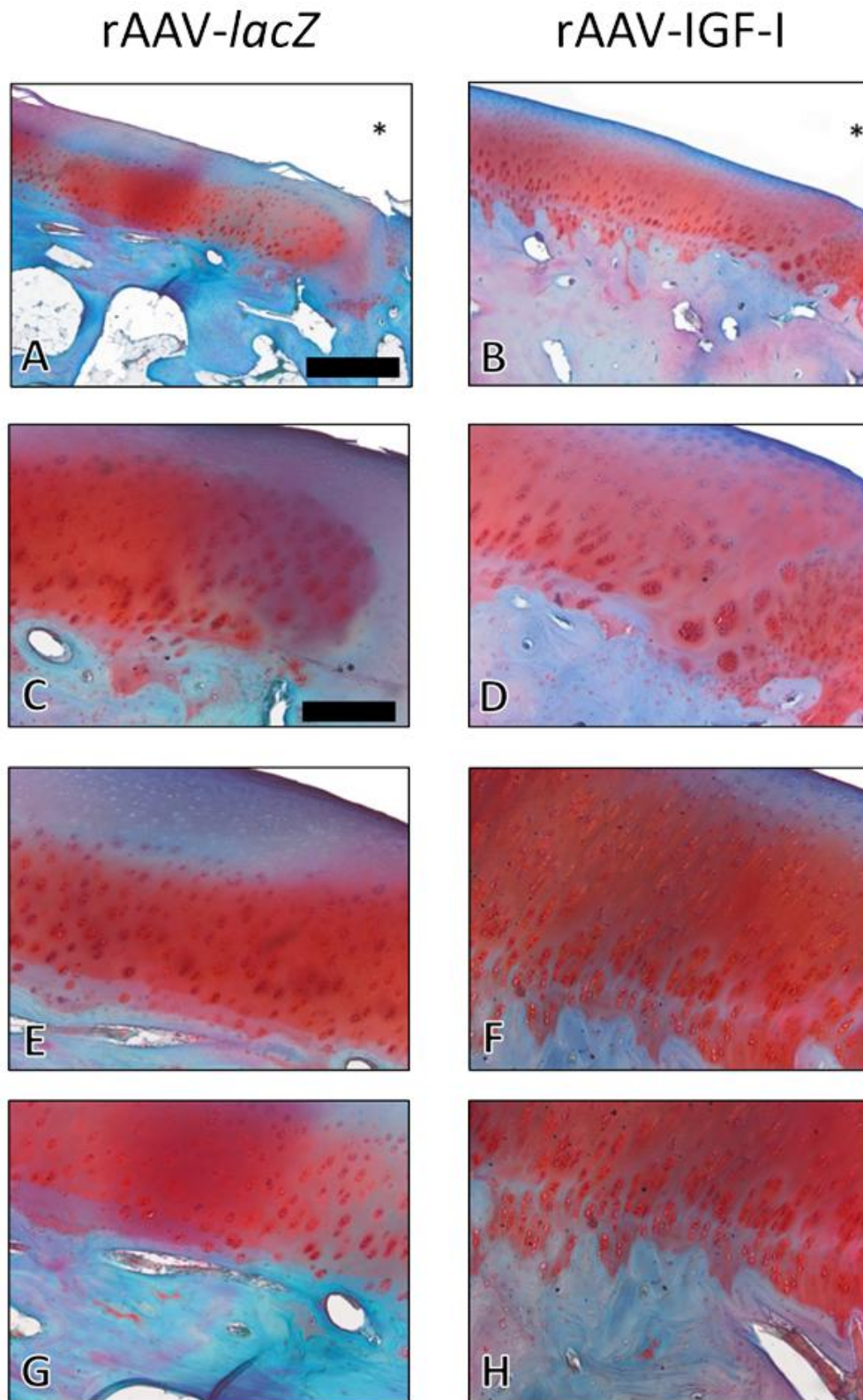


Abbildung 19: Ergebnisse der einzelnen Kategorien durch das Bewertungssystem nach Little et al. Die Schnitte wurden entsprechend der Gruppenmittelwerte ausgewählt. A, B: Übersicht, C, D: Zellklone, E, F: Anfärbbarkeit, G, H: Tidemark. * markiert die Integrationszone. Der Maßstabsbalken entspricht in A: 1 mm, in C: 250 μ m. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

7.3.2 Mikro-CT Analyse der angrenzenden subchondralen Knochenplatte und subartikulären Spongiosa

Im Vergleich der Mikro-CT-Messwerte der dem Defekt benachbarten Areale durch den studentischen T-Test zeigte sich weder im Bereich der subchondralen Knochenplatte noch der subartikulären Spongiosa ein signifikanter Unterschied zwischen den mit rAAV-IGF-I behandelten Defekten und den Kontrollen mit rAAV-*lacZ* (Abbildung 20, Tabelle 21). Im Vergleich mit den physiologischen Normwerten zeigte sich die kortikale Dicke (Ct.th) in beiden Fällen signifikant verdickt ($p < 0,0001$) was einer durchschnittlichen Dickenzunahme von 0,1 mm entspricht. Der dem Defekt benachbarte Knochen scheint weitestgehend unbeeinträchtigt durch den Defekt zu sein. Lediglich im Bereich der Knochenmineraldichte der subchondralen Knochenplatte ließ sich eine Tendenz der Dichtezunahme zeigen (Normal 676 mg/cm³, rAAV-*lacZ* 691 mg/cm³, rAAV-IGF-I 724 mg/cm³). Die Fraktale Dimension (FD) zeigt sich in beiden Gruppen signifikant im Vergleich zur Norm erniedrigt. Das Verhältnis von Knochenoberfläche/Volumen (BS/BV) zeigt sowohl in der Kontrollgruppe als auch der Behandlungsgruppe eine Erhöhung wobei diese nur in der *lacZ*-Gruppe signifikant ist ($p < 0,05$).

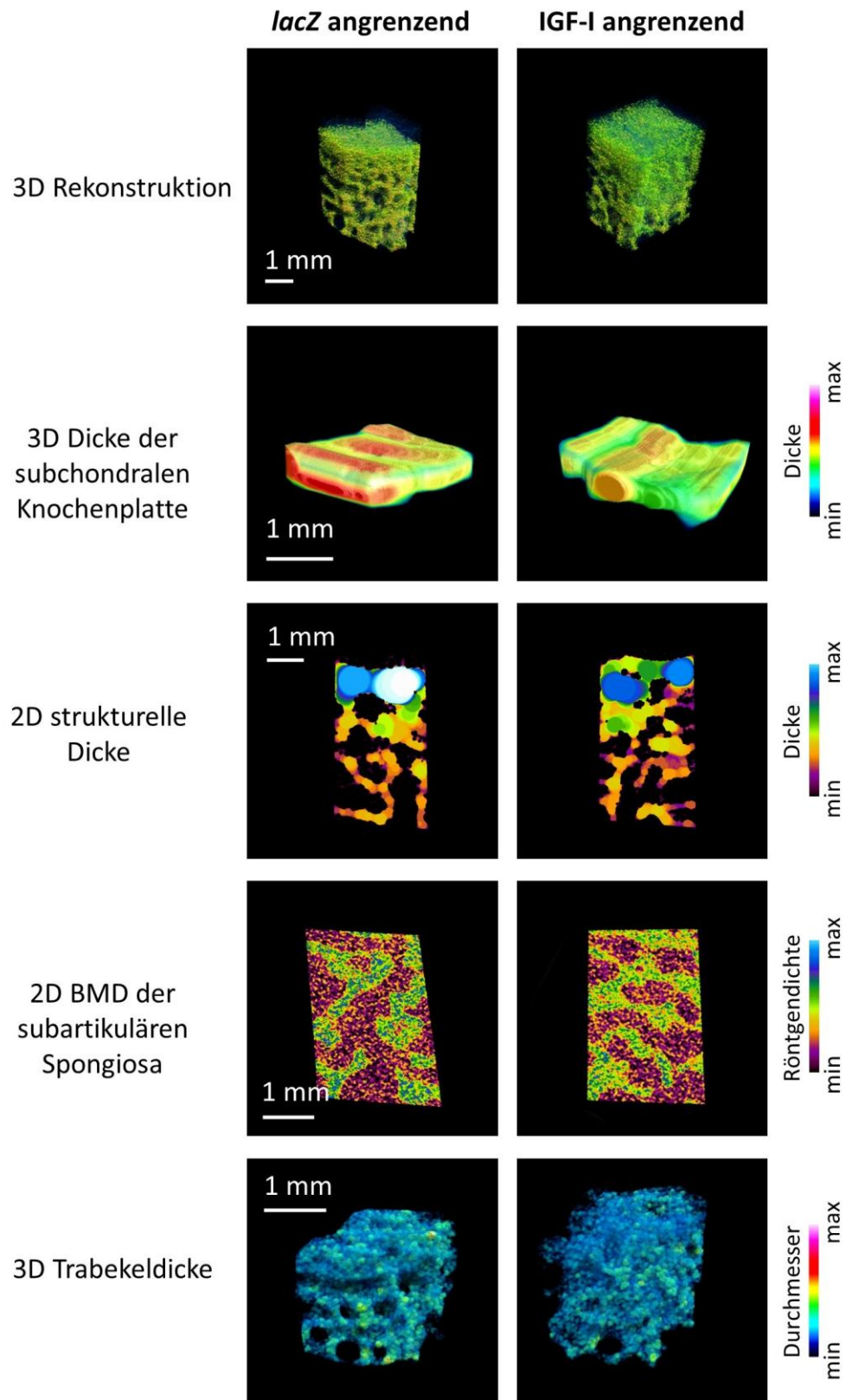


Abbildung 20: Analyse der Mikroarchitektur des angrenzenden subchondralen Knochens. Von oben nach unten sind zu sehen: Repräsentative 3D-Mikro-CT-Rekonstruktionen der Trabekelstruktur, farbkodierte 3D-Rekonstruktionen der Dicke der subchondralen Knochenplatte, farbkodierte 2D-Bilder der strukturellen Dicke der subchondralen Knochenplatte und der Trabekel, farbkodierte 2D-Bilder der Knochenmineraldichte (BMD) der subartikulären Spongiosa und farbkodierte 3D-Rekonstruktionen der Trabekeldicke der subartikulären Spongiosa. Maßstabsbalken je 1 mm.

7. Ergebnisse

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Mikro-CT Messwerte im perifokal angrenzenden subchondralen Knochen. MW $\pm$ SD. Zum Vergleich wurden auch die Normwerte dargestellt. Die spezifischen P-Werte setzen sich wie folgt zusammen L/I: rAAV-IGF-I vs. rAAV-lacZ, L/N: rAAV-lacZ vs. Normal, I/N: rAAV-IGF-I vs. Normal. * Statistisch signifikant.

Subchondrale Knochenplatte, angrenzend an den Defekt							
Parameter	Einheit	Normal	rAAV-lacZ	rAAV-IGF-I	Spezifische P-Werte		
					L/I	L/N	I/N
BMD	mg/cm ³	676,87 $\pm$ 53,63	691,25 $\pm$ 43,86	724,55 $\pm$ 85,81	0,42	0,62	0,28
BV/TV	%	66,12 $\pm$ 8,42	66,70 $\pm$ 5,00	63,99 $\pm$ 10,88	0,59	0,89	0,71
BS/BV	mm ⁻¹	48,66 $\pm$ 4,65	46,23 $\pm$ 4,03	48,88 $\pm$ 11,87	0,62	0,36	0,97
BS/TV	mm ⁻¹	31,91 $\pm$ 2,52	30,70 $\pm$ 1,64	30,25 $\pm$ 3,07	0,76	0,35	0,33
Ct. Th	mm	0,54 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 0,30	0,64 $\pm$ 0,17	0,98	<0,0001*	<0,0001*
Subartikuläre Spongiosa, angrenzend an den Defekt							
BMD	mg/cm ³	764,64 $\pm$ 45,26	735,79 $\pm$ 43,88	777,25 $\pm$ 86,44	0,32	0,29	0,76
BV/TV	%	36,37 $\pm$ 7,56	38,12 $\pm$ 6,35	39,73 $\pm$ 8,14	0,73	0,69	0,47
BS/BV	mm ⁻¹	37,08 $\pm$ 5,02	43,49 $\pm$ 4,75	43,80 $\pm$ 6,83	0,93	<0,05*	0,08
BS/TV	mm ⁻¹	13,41 $\pm$ 2,76	16,91 $\pm$ 3,04	17,22 $\pm$ 3,42	0,87	0,06	0,06
Ct. Th	mm	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
Tb. Th	mm	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,98	0,13	0,17
Tb. Sp	mm	0,19 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,3	0,98	0,34	0,28
Tb. Pf	mm ⁻¹	-19,48 $\pm$ 8,36	-25,98 $\pm$ 6,12	-26,84 $\pm$ 9,71	0,86	0,16	0,19
Tb. N	mm ⁻¹	4,44 $\pm$ 1,05	5,28 $\pm$ 1,01	5,39 $\pm$ 1,22	0,87	0,19	0,18
SMI	-/-	-0,66 $\pm$ 0,87	-0,60 $\pm$ 0,51	-0,62 $\pm$ 0,77	0,94	0,87	0,94
DA	-/-	0,34 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,04	0,66	0,75	0,46
FD	-/-	2,52 $\pm$ 0,05	2,46 $\pm$ 0,03	2,46 $\pm$ 0,02	0,66	0,03*	0,014*

7.4 Ergebnisse der multivarianten Analysen und Rangkorrelationen nach Spearman

Zur Feststellung wichtiger Wechselwirkungen zwischen der knöchernen und kartilaginären Reparatur im Defekt, als auch zum benachbarten Knorpel und Knochen wurden multivariate Analyseverfahren durchgeführt. Diese beinhalteten die PCA (*Principal Component Analysis*; Hauptkomponentenanalyse), ANOSIM (*Analysis of similarity*) sowie die Rangkorrelation nach Spearman.

Die PCA und ANOSIM ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, als alle subchondralen Knochen- und Knorpelparameter der osteochondralen Reparatur zusammen untersucht wurden ($P = 0,062$, $R = 0,19$) (Abbildung 21c). Betrachtet man isoliert die Reparatur des subchondralen Knochens in der Defektzone (Abbildung 21a, 21b), unterscheiden sich beide Gruppen signifikant vom normalen subchondralen Knochen (beide $P \leq 0,002$), aber nicht voneinander ($P = 1.000$). Jedoch ist der subchondrale Knochen in Defekten, welche mit rAAV-IGF-I behandelt wurden, der normalen Vergleichsgruppe etwas ähnlicher ($R = 0,61$) als in denen der *lacZ*-Gruppe ($R = 0,77$).

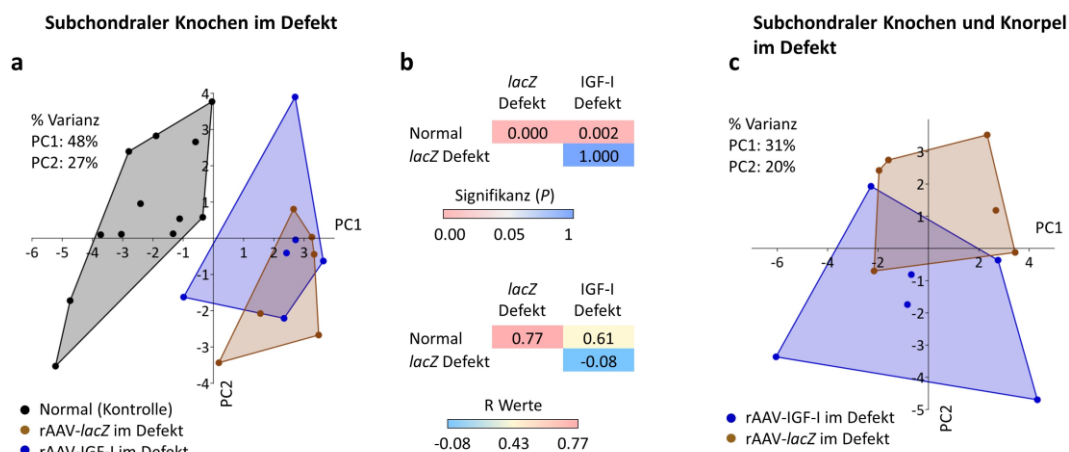


Abbildung 21: Ergebnisse multivarianter Analysemethoden. Dargestellt sind: (a) Hauptkomponentenanalyse (PCA) und (b) ANOSIM (one way analysis of similarities) des subchondralen Knochens sowie (c) gemeinsame PCA der subchondralen Knochen- und Knorpelparameter im osteochondralen Defekt nach 6 Monaten. Die Punkte repräsentieren einzelne Proben. Ein höherer R Wert bedeutet einen größeren Unterschied zwischen den Gruppen. Abkürzungen: IGF-I: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I, *lacZ*: β -Galactosidase-Gen. Abbildung adaptiert nach Peifer et al. [142].

Um weitere osteochondrale Wechselwirkungen zwischen dem Reparaturgewebe und der Entstehung perifokaler Arthrose zu untersuchen, wurden im Folgenden Spearman-Korrelationsanalysen durchgeführt. Die signifikante, positive, mäßige bis sehr starke Korrelation zwischen den Kategorien des Bewertungssystems nach Sellers „Integration“, „Zellmorphologie“ sowie „Gesamtergebnis“ und den Kategorien zur Beurteilung des benachbarten Areales nach Little „Matrixanfärbbarkeit“, „Zellklone“ sowie „Gesamtergebnis“ ($P \leq 0,04$, $0,463 \leq r \leq 0,879$) (Abbildung 22a-22e) zeigt einen klaren Zusammenhang zwischen Parametern der Knorpelreparatur und Entstehung perifokaler Arthrose des angrenzenden Knorpels. Mikrostrukturparameter im Defekt und im angrenzenden subchondralen Knochen zeigen signifikant positive, starke bis sehr starke Korrelationen ($P \leq 0,026$, $0,650 \leq r \leq 0,916$), darunter die Knochenmineraldichte und Dicke der subchondralen Knochenplatte (SCBP) sowie die Knochenmineraldichte und Trabekuläre Dicke (Tb. Th.) der subartikulären Spongiosa (SAS) (Abbildung 22i, j und q, r). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der reparierte subchondrale Knochen im osteochondralen Defekt eine ähnliche Struktur aufweist wie der angrenzende subchondrale Knochen.

In der angrenzenden osteochondralen Einheit korrelierten die meisten Knochen-Knorpel-Parameter nicht signifikant miteinander ($P \geq 0,615$, $-0,081 \leq r \leq 0,161$) (Abbildung 22k-m). Es wurden signifikant starke, negative Korrelationen ($P \leq 0,012$, $-0,744 \leq r \leq -0,709$) zwischen dem makroskopischen Gesamtergebnis der Defektreparatur und der Knochenmineraldichte der subchondralen Knochenplatte und Tb. N der subartikulären Spongiosa festgestellt (Abbildung 22 o und p). Des Weiteren zeigten sich signifikant starke, negative Korrelationen ($P = 0,007$, $r = -0,748$) zwischen dem Parameter "Prozentsatz des neuen subchondralen Knochens im Defekt" des histologischen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* und dem mikrostrukturellen Knochenvolumenanteil (BV/TV) der subchondralen Knochenplatte (Abbildung 22n). Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse des makroskopischen Bewertungssystems nach Goebel *et al.*, als auch der o. g. Kategorie "Prozentsatz des neuen subchondralen Knochens" auf der Grundlage zuverlässiger objektiver mikrostruktureller Daten des Mikro-CT.

In Zusammenschau lassen sich durch die Korrelationsanalysen grundlegende Zusammenhänge zwischen einzelnen Parametern der osteochondralen Reparatur und der Entwicklung früher Arthroseentwicklung erkennen.

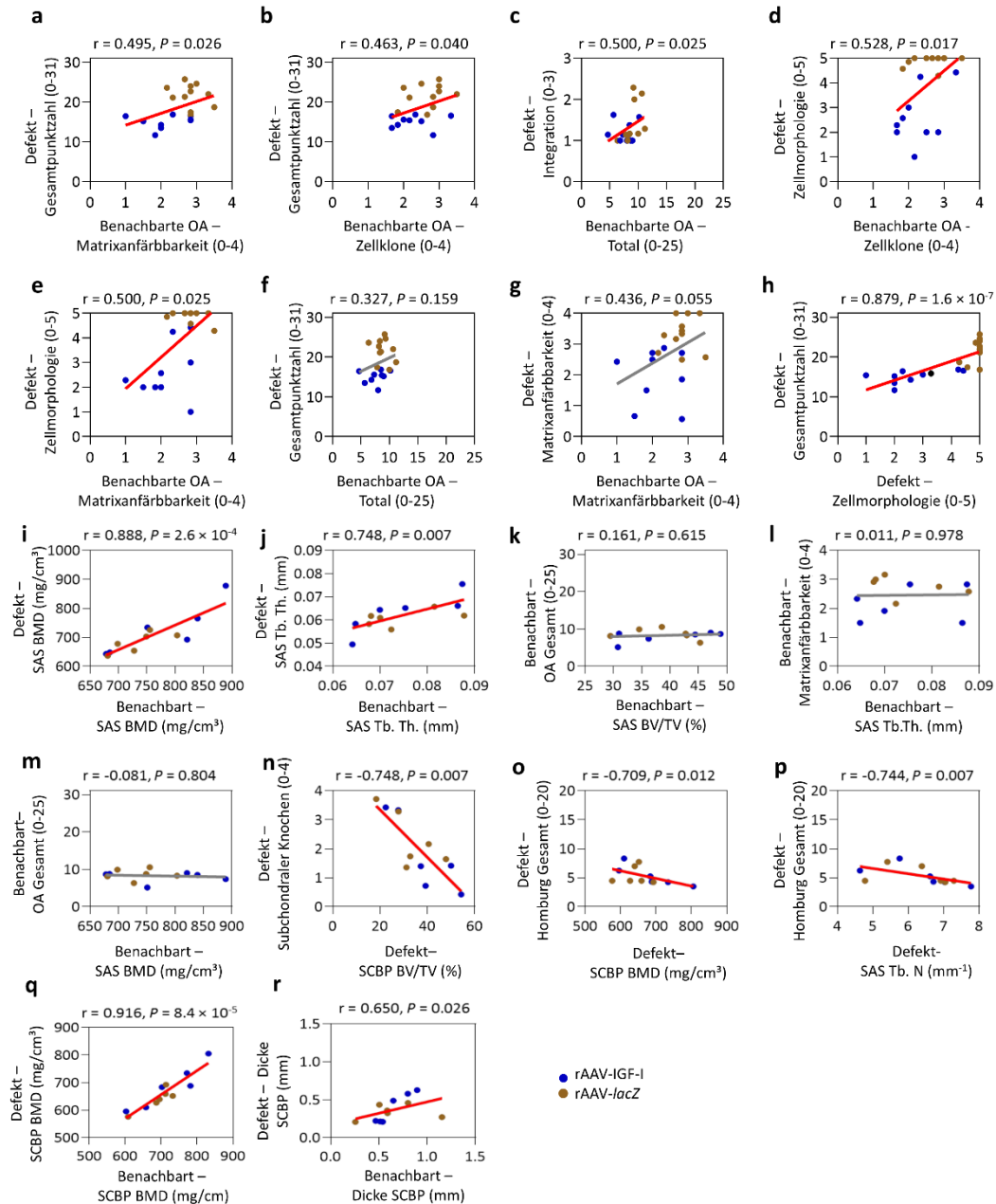


Abbildung 22: Streudiagramm und lineare Regressionsanalyse nach Spearman. Korrelierte Kategorien wie an der x-/y-Achse angegeben. „Defekt“ beziehend auf das histologische Bewertungssystem nach Sellers, das makroskopische Homburger Bewertungssystem sowie Mikrostrukturparameter. „Angrenzend“ beziehend auf die Untersuchung der Proben auf die Entstehung perifokaler Arthrose mittels des histologischen Bewertungssystems nach Little, das makroskopische Homburger Bewertungssystem und Mikrostrukturparameter. Abkürzungen: BMD: Knochendichte, BV/TV: Knochenvolumenanteil, OA: Arthrose (Osteoarthritis) SAS: Subartikuläre Spongiosa, SCBP: subchondrale Knochenplatte, Tb. Th.: Trabekuläre Dicke, Tb. N.: Trabekelanzahl. Rote Regressionslinien zeigen eine signifikante Korrelation an ($P \leq 0,05$). Höhere R-Werte zeigen einen größeren Unterschied zwischen den Gruppen. Punkte zeigen Einzelwerte. Blau: rAAV-IGF-I, Braun: rAAV-lacZ

8. Diskussion

Die vorliegende Arbeit überprüfte die drei Hypothesen, dass die Überexpression von IGF-I durch rAAV-vermittelten Gentransfer (1) die Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ* Kontrollgruppe verbessert, (2) zu einer verbesserten Reparatur der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens im Vergleich zur rAAV-*lacZ* Kontrollgruppe führt und (3) die Entwicklung arthrotischer Veränderungen in dem Defekt angrenzenden Gelenkknorpel im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* behandelten Kontrolldefekten verringert. Sechs Monate postoperativ zeigte die Behandlung durch rAAV-IGF-I und rAAV-*lacZ* keine Zeichen eines intraartikulären Ergusses oder makroskopische Synovialitis. Die signifikant höhere Immunreaktivität im Knorpelreparaturgewebe gegen IGF-I nach rAAV-IGF-I Gentransfer bestätigt eine persistierende Transduktion.

(1) Die Behandlung der osteochondralen Defekte mit rAAV-IGF-I war histologisch im Bereich der Knorpelreparatur generell überlegen. Anhand des histologischen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* zeigte die Behandlungsgruppe in den Kategorien „Defektfüllung“, „Matrixanfärbbarkeit“, „Zellmorphologie“, „Oberflächenarchitektur“, „subchondraler Knochen“ sowie „*Tidemark* Formation“ signifikant bessere Reparaturergebnisse als die Kontrollgruppe. Die mit rAAV-IGF-I behandelten Defekte zeigten bezüglich der Immunreaktion gegenüber Typ-II-Kollagen eine signifikant höhere Anreicherung, sowie eine signifikant niedrigere Anreicherung an Typ-I-Kollagen.

(2) In den mikro-computertomographischen Untersuchungen des subchondralen Knochens zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der IGF-I und der *lacZ*-Gruppe, histologisch war die Behandlungsgruppe jedoch in den Kategorien „subchondraler Knochen“ und „*Tidemark* Formation“ überlegen mit einem signifikant höheren Wiederaufbau des subchondralen Knochens im Defekt. Im Vergleich zu normalem ovinen Knochen war die Knochenmineraldichte der subartikulären Spongiosa in der *lacZ*-Gruppe signifikant verringert, wohingegen sie in der IGF-I-Gruppe keinen Unterschied zur Norm zeigte. Eine bessere knöcherne Reparatur könnte sich positiv auf chondrale Reparaturvorgänge (1), als auch auf die Entwicklung perifokaler Arthrose auswirken (3).

(3) Auch im Bereich des angrenzenden Knorpels bewies sich die IGF-I-Behandlungsgruppe histologisch überlegen. Anhand des Little-Arthrose-Bewertungssystems wurde in dem Defekt angrenzenden Areal signifikant bessere Parameter für die Kategorien „Zellklone“, „Safranin-O-Anfärbbarkeit“ sowie „*Tidemark* Formation“ für die IGF-I-Gruppe erzielt was als Zeichen für reduzierte arthrotische Veränderungen gewertet werden kann. Mikrocomputertomographisch kam es in beiden Gruppen zu einer perifokalen Zunahme der kortikalen Dicke (Ct.th) um den Defekt, was für eine beginnende subchondrale Sklerosierung sprechen könnte.

8.1 Vektor basierte Verfahren

Um die Effekte einer Überexpression von IGF-I auf osteochondrale Reparaturvorgänge *in vivo* zu untersuchen, wurde der Genvektor in Form einer rAAV-Vektorlösung im Rahmen einer Mini-Arthrotomie am Kniegelenk des Schafes direkt in osteochondrale Defekte appliziert und nach sechs Monaten untersucht. Wie vorausgehende Studien zeigen konnten, ist rAAV in der Lage sowohl *in vitro*, *in situ* als auch *in vivo* zu einer erfolgreichen, effektiven und langanhaltenden Expression des Transgens in den Zielzellen zu führen [22, 24, 44, 84, 90, 102, 105, 116, 185]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Überexpression des Genproduktes (IGF-I) über den Zeitraum von sechs Monaten durch immunhistochemische Untersuchungen nachgewiesen werden. Da insbesondere Wachstumsfaktoren wie IGF-I über eine sehr kurze Halbwertszeit im Gelenk verfügen und dadurch bei beispielsweise einmaliger i.a. Injektion schon nach einer Stunde nicht mehr im Gelenk nachweisbar sind [20, 76, 187], erscheint die Gentherapie als attraktiver Weg, um durch die einmalige Gabe eines therapeutischen Genvektors eine langanhaltende Sekretion des Genproduktes vor Ort zu erzielen, dadurch die Konzentration des therapeutischen Faktors zu erhöhen und so Reparaturvorgänge im Bereich eines der osteochondralen Einheit zu fördern. Wie in zuvor durchgeführten Studien gezeigt werden konnte, ist es möglich durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-I, TGF- β , BMPs und Sox9 durch adenoviralen oder rAAV-vermittelten Gentransfer die Heilungskapazität von Chondrozyten zu verstärken [84, 90, 105, 116]. Aufgrund

seiner geringen Immunogenität und Toxizität sowie episomaler Stabilität [152, 164], gehört der rAAV-Vektor zu den bevorzugten Gentransfersystemen zur Behandlung menschlicher Erkrankungen und lässt sich daher auch im Tiermodell als ethisch unbedenklich einstufen. Dennoch ist eine Vektorleckage mit einer unkontrollierbaren Verteilung des Genproduktes im Gelenk denkbar. In einer vorangegangenen Studie mit vergleichbarem Versuchsaufbau, wurde jedoch weder eine signifikante Anreicherung an IGF-I in der Synovialflüssigkeit noch in den das Gelenk umgebenden Strukturen (u. a. Ligamentum Patellae, Hoffascher Fettkörper, Gelenkschleimhaut und Quadrizepssehne) gefunden [24]. Insbesondere in menschlichen Studien wurden Immunreaktionen gegen das Viruskapsid beschrieben und könnten so zu einem vorzeitigen Verlust des Genproduktes führen [88, 152]. Ein neuerer innovativer Ansatz beschäftigt sich mit der Kopplung eines Genvektors an biokompatible Trägermaterialien wie beispielsweise PEO-PPO-PEO Poloxamers [Polyethylene oxide(PEO), Polypropylene oxid (PPO)] [97]. Durch den Abbau des Trägermaterials kann die Abgabe des Vektors räumlich und zeitlich kontrolliert erfolgen und so nur die in unmittelbarer Nähe befindlichen Zellen transduzieren [97]. Die durchgeführte direkte Applikation des Genvektors erscheint jedoch weniger invasiv, einzeitig, kostengünstig als auch im klinischen Alltag praktikabler als andere therapeutische Ansätze [24].

8.2 Eignung des Schafes als Tiermodell für osteochondrale Reparatur

Tiermodelle sind seit langem wichtiger Bestandteil der Forschung im Bereich der osteochondralen Reparatur [21, 110, 150]. Es ist möglich anhand der Daten, welche durch ein Tiermodell erhoben wurden, die Auswirkungen einer neuen Behandlung auf das Gelenk sowie auf den Organismus abzuschätzen. Der Nutzen und die Sicherheit einer Behandlung sind dabei eine Grundvoraussetzung für klinische Studien am Menschen [68, 72]. Daher ist das Tiermodell noch heute ein unerlässlicher Bestandteil der Forschung [100, 128]. Grundlage von Tierversuchen ist das 3R-Prinzip, welches besagt, dass Tierversuche sofern möglich zu vermeiden (*Replacement*), sowie die Zahl der Tiere (*Reduction*) und das Leiden (*Refinement*)

auf ein Minimum zu reduzieren sind [174]. Dies wurde auch in der hier beschriebenen Studie u. a. durch den bilateralen Ansatz umgesetzt [135]. Die Auswahl der Versuchstiere richtet sich zum einen nach der zu untersuchenden Hypothese [21] als auch nach entsprechenden Vorversuchen. So ist es üblich zunächst an Nagetieren und auf eine kurze Behandlungsdauer hin eine Hypothese zu überprüfen [129], bevor sie im Großtiermodell und mit einer längeren Behandlungsdauer getestet wird [114]. Klassisch werden Kleintiere wie Kaninchen und Ratten, aber auch Großtiere wie Minischweine, Schafe, Ziegen oder Pferde als Versuchstiere genutzt [114, 128, 129].

Das Schafmodell hat sich im Bereich der osteochondralen Reparatur als besonders geeignet erwiesen [96]. Im Vergleich ist das Schafsknie ein um ein Drittel kleineres humanes Knie [140]. Das adulte Schaf zeigt Ähnlichkeiten zum humanen Knie in Bezug auf seinen anatomischen Aufbau [1, 128], das Körpergewicht (± 70 kg Körpergewicht) [114], die Dicke des hyalinen Gelenkknorpels sowie sein Heilungspotential [21, 133, 160]. Insbesondere hervorzuheben ist, dass adulter Schafsknorpel kein spontanes Heilungspotential besitzt und tiefreichende Defekte mit fibrokartilaginärem Ersatzgewebe aufgefüllt werden [30, 110]. Obwohl die Anatomie des Schafknies dem des Menschen ähnelt gibt es dennoch einige wichtige Unterschiede. Zu diesen gehören unter anderem die intraartikuläre Lagebeziehung zur Sehne des M. extensor digitorum longus (kraniallateral), das Fehlen des kranialen meniscomemorale Ligamentes sowie der Ursprung der Patellarsehne am kranialen Pol der Patella anstelle des distalen Poles wie beim Menschen [1]. Obwohl es nicht möglich ist Ergebnisse aus Tierversuchen direkt auf den Menschen zu übertragen, sind sie dennoch bislang unerlässlich zur Etablierung neuer Therapieverfahren am Menschen.

8.3 Bewertungssysteme zur Evaluation des Defektareales

Bei den angewandten Bewertungssystemen handelt es sich um etablierte Verfahren zur Evaluation von knorpeligem Reparaturgewebe, wobei der histologischen Auswertung der Defekte als Goldstandard der Evaluation besondere Bedeutung beigemessen wird [136]. Makroskopisch kamen sowohl validierte Bewertungssysteme aus Oswestry [169] mit einer Punktevergabe von 0-

8 Punkten als auch aus Homburg [54] mit einer möglichen Gesamtpunktzahl von 20 Punkten zum Einsatz. Durch die detailliertere Punktevergabe lässt sich durch das Homburger Bewertungssystem eine genauere Beschreibung des makroskopischen Erscheinungsbildes erzielen.

Die histologischen Schnitte wurden nach Anwendung verschiedener Färbetechniken begutachtet [68], wobei die histologische Bewertung insbesondere die mit Safranin-O-Echtgrün gefärbten Schnitte nutzt. Diese Färbung zählt zu den Standardfärbemethoden für Knorpelgewebe, da sich der Proteoglykangehalt anhand der Rotfärbung semiquantitativ abschätzen lässt. Diese Eigenschaft wird unter anderem in der Kategorie „Matrixanfärbbarkeit“ im Bewertungssystem nach Sellers genutzt, um die Qualität des Reparaturgewebes histologisch zu evaluieren. Dieses komplexe Bewertungssystem beschreibt mit seinen acht Kategorien sehr genau die wichtigsten Parameter der Knorpelreparatur und kann als Weiterentwicklung älterer Bewertungssysteme wie beispielsweise O'Discoll [124], Pineda [144] und Wakitani et al. [182] gesehen werden.

Zur Untersuchung arthrotischer Veränderungen des angrenzenden Knorpels kam das Bewertungssystem nach Little *et al.* zum Einsatz [86]. Zur Beurteilung der Mikroarchitektur sowie der Knochendichte des subchondralen Knochens wurde eine Mikro-CT-Analyse durchgeführt, welche eine geeignete Methode zur Beurteilung des subchondralen Knochens darstellt [117]. Die beschriebene Einteilung in Volumina von Interesse erfolgte wie auch schon in vorangegangenen Studien und erlaubt eine genaue Berechnung der angegebenen Werte [138].

Jedoch korrelieren gute histologische Ergebnisse nicht immer mit einem guten klinischen Langzeitergebnis [65, 79, 99], weshalb auch eine biomechanische Testung bei zukünftigen Auswertungen des Reparaturgewebes durchgeführt werden sollte. Dennoch lässt sich postulieren, dass bei signifikant besserer histologischer sowie immunhistochemischer Zusammensetzung des Reparaturknorpels auch von einem biomechanisch belastbareren Reparaturgewebe der mit rAAV-IGF-I behandelten Defekte im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* behandelten Defekten ausgegangen werden kann.

8.3.1 Operativer Zugang

Zur Exponierung der *Trochlea ossis femoris* kam ein in unserem Lehrstuhl entwickelter Mini-Zugang zum Einsatz, welcher ohne eine intraoperative Luxation der Patella auskommt [133]. Der Sinn dieser Methode ist, eine postoperative Instabilität sowie die Luxation der Patella des Schafes zu minimieren. Wie auch in vorangegangenen Studien [84, 116, 133], kam es auch hier postoperativ zu keiner Luxation der Patella.

8.4 Reparatur des Gelenkknorpels

8.4.1 Makroskopische Beurteilung des Reparaturgewebes

Durch die makroskopischen Bewertungssysteme konnte sowohl in den Gesamt- als auch in den Einzelpunktwerten kein signifikanter Unterschied zwischen den mit rAAV-IGF-I und den mit rAAV-*lacZ* behandelten Defekten festgestellt werden. Die oben beschriebenen Ergebnisse decken sich mit denen vorangegangener Studien genbasierter IGF-I Überexpression im Großtiermodell, die lediglich positive Tendenzen der makroskopischen Defektheilung, jedoch keine signifikante makroskopische Verbesserung zeigten [59, 105, 139].

Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe um Fortier im Jahre 2002 einen verbesserten Gesamtpunktwert als auch eine überlegene Integration zum benachbarten Gewebe in der makroskopischen Beurteilung, als diese den Einfluss von IGF-I auf vollschichtige Knorpeldefekte im Pferdmodell prüften, indem sie ein Gemisch aus Chondrozyten und polymerisierten Fibrin mit IGF-I versetzen [42]. Bereits zuvor haben andere Arbeitsgruppen mit IGF-I behandelte Knorpeldefekte makroskopisch im lapinen Kleintiermodell untersucht und vielversprechende Ergebnisse erzielt [24, 42, 101, 103, 105, 131, 139, 188]. In einer Studie über drei Wochen im Kaninchen-Modell zeigte durch eine Co-Überexpression von IGF-I und FGF-2 eine signifikante Verbesserung der makroskopischen Parameter „Farbe des Defekts“ und „Defektfüllung“ osteochondraler Defekte [131].

Ein bedeutsamer Unterschied dieser Studien zu der vorliegenden Arbeit liegt u. a. im unterschiedlichen Versuchsaufbau (verschiedene Tiermodelle, verschiedene zeitliche Endpunkte, verschiedene Defekttiefen etc.), sodass die Ergebnisse nur bedingt mit unseren vergleichbar sind. Kleintiere zeichnen sich im Allgemeinen durch ein relativ größeres Reparaturpotential unbehandelter osteochondraler Defekte aus, sodass die Durchführung von Studien am Großtier im Rahmen von Langzeitstudien sich unabdingbar anschließend müssen, um vielversprechende erste Ergebnisse zu validieren [114].

8.4.2 Histologische und immunhistochemische Evaluation des Reparaturgewebes

In der Evaluation der Reparaturvorgänge der osteochondralen Einheit kommt der histologischen Beurteilung eine besonders wichtige Rolle zu und gilt als Goldstandard [137]. Die histologische Evaluierung bestätigte die Hypothese, dass eine Überexpression von IGF-I durch rAAV-vermittelten Gentransfer die Knorpelheilung nach histologischen Gesichtspunkten im Schafmodell nach sechs Monaten verbessert. Dies lässt sich durch eine signifikant bessere Punktzahl in den Kategorien „Defektfüllung“, „Matrixanfärbbarkeit“, „Zellmorphologie“, „Oberflächenarchitektur“, „subchondraler Knochen“, „*Tidemark* Formation“ sowie der Gesamtpunktzahl bestätigen.

Die immunhistochemische Beurteilung bezüglich Typ-II-Kollagen ergab eine signifikant erhöhte Expression in der Behandlungsgruppe. Typ-II-Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil von hyalinem Gelenkknorpel und maßgeblich mit für seine biomechanischen Eigenschaften verantwortlich [16]. Vorangegangene Studien kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Überexpression von IGF-I zu einer vermehrten Bildung von Typ-II-Kollagen im Defektareal führt [24, 42, 101, 103, 105, 139]. Im Kleintiermodell zeigte sich, dass mit höheren IGF-I-Konzentrationen lapine Knorpelzellen zu einer höheren Typ-II-Kollagen-Bildung angeregt werden können, als mit einer Niedrigeren [188]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Befunde, dass IGF-I einen positiven Effekt auf die Typ-II-Kollagen-Bildung hat. Die Arbeitsgruppe um Lisa Fortier bewies 2015

in einem Pferdmodell ebenfalls eine signifikant bessere histologische Reparatur von chondralen, vollschichtigen Defekten, welche mit rAAV5-IGF-I transduzieren Chondrozyten behandelt und nach 8 Monaten untersucht wurden [139]. Auch die Typ-II-Kollagen Produktion zeigte eine Hochregulation nach Behandlung mit rAAV5-IGF-I im Vergleich zu rAAV5-GFP-Gruppe (*green fluorescent protein*, GFP) [139].

Im Gegensatz zu Typ-II-Kollagen findet sich Typ-I-Kollagen hauptsächlich im subchondralen Knochen sowie in Faserknorpel, welcher als Reparaturgewebe bei unbehandelten Knorpelschäden entsteht. Im Hinblick auf Typ-I-Kollagen fand sich in den immunhistochemischen Analysen signifikant mehr Typ-I-Kollagen in der *lacZ*-Gruppe, was für einen höheren fibrotischen Anteil des Reparaturgewebes in der Kontrollgruppe spricht. Jedoch wiesen wir in beiden Gruppen Typ-I-Kollagen in dem den Defekt füllendem Reparaturgewebe nach. Eine Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels war in keinem Fall zu beobachten. Defektfüllung und Oberflächenbeschaffenheit sind wichtige Parameter der Defektreparatur, da sie klinisch mit den Symptomen von Patienten korrelieren [109]. Diese beiden histologischen Parameter waren in der rAAV-IGF-I Gruppe signifikant erhöht, was auch vorangegangene Kleintierstudien zeigten [90, 104, 131]. In der *lacZ*-Gruppe traten signifikant häufiger Fibrillationen und Einrisse im Bereich der Knorpeloberfläche auf, was als Hinweis auf minderwertigeres Reparaturgewebe zu werten ist, welches bereits nach kurzer Zeit Degenerationserscheinungen aufweist und dem biomechanischen Anspruch nicht gewachsen ist.

Bereits 2005 zeigte eine Studie an Kaninchen, dass eine Überexpression von IGF-I durch transplantierte Chondrozyten die Reparatur von osteochondralen Defekten *in vivo* verbessert [90]. Hierzu wurden lapine allogene Chondrozyten *ex vivo* nichtviral transfiziert und in Alginat verkapselt. Diese Alginat-Sphäroide wurden anschließend in osteochondrale Defekte in der Trochlea passgenau eingebracht und das Reparaturgewebe nach drei sowie nach 14 Wochen quantitativ und qualitativ untersucht. Die transplantierten IGF-I-Sphäroide verbesserte die Knorpelreparatur sowie die Heilung des subchondralen Knochens zu beiden Zeitpunkten im Gegensatz zu *lacZ*. Im Bewertungssystem nach Sellers et al. zeigte

sich zu beiden Zeitpunkten eine signifikant bessere Knorpelreparatur für IGF-I in allen Kategorien [90].

In einer aktuellen Studie im Minischwein-Modell verzeichnete Maihöfer *et al.* eine signifikante Verbesserung der histologischen Reparatur nach Therapie mit Mikrofrakturierung und IGF-I/AlgPH155 (Hydrogel-gebundenen Alginat, AlgPH155). Die Kategorien „Füllung des Defektes“, „Zellmorphologie“, „Architektur im Defekt“ als auch der Gesamtpunktwert waren im Sellers Bewertungssystem signifikant besser als in der Kontrollgruppe [105]. IGF-I führt zu einer verbesserten Chondrogenese, da sich mesenchymale Stammzellen vermehrt differenzieren, wie in *in vitro* Studien zuvor beschrieben wurde [45]. Die Zellmorphologie wurde durch die Behandlung mit rAAV-IGF-I signifikant verbessert, es zeigten sich chondrozytenähnliche, proteoglykanproduzierende Zellen, welche in der Radiärzone teilweise zu säulenartigen Stapeln angeordnet waren, wie es für hyalinen Knorpel typisch ist. Die Zellen in der Kontrollgruppe waren hingegen häufig fibroblastenähnlich spindelförmig, teilweise chondrozytenähnlich rund, allerdings meist unorganisiert angeordnet und wiesen in der Defektarchitektur größere Lücken auf. Dies deckt sich mit den Befunden im Kleintiermodell [24, 90, 104, 188], welche ebenfalls eine verbesserte Zellmorphologie nach Behandlung mit IGF-I feststellten. Es lässt sich zudem postulieren, dass Reparaturgewebe, welches nach der Behandlung mit IGF-I entsteht durch seine vermehrte Ähnlichkeit zu hyalinem Knorpel ihm auch in seinen biomechanischen Eigenschaften ähnlicher und belastbarer ist.

8.4.3 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Zur biochemischen Analyse des Reparaturgewebes wurden die Defekte mit dem scharfen Löffel ausgekratzt und das so gewonnene Gewebe wie in 6.8 beschrieben aufbereitet und analysiert. Der Quotient aus Proteoglykangehalt zu DNS-Gehalt beschreibt die Matrixsyntheseleistung und damit die Qualität des Reparaturgewebes. Proteoglykane werden durch Chondrozyten gebildet und sind maßgeblich an den biomechanischen Eigenschaften von hyalinem Knorpel beteiligt. Demnach kann ein erniedrigter Proteoglykangehalt für ein

minderwertigeres Reparaturgewebe sprechen. Die Proteoglykane pro DNS zeigten sich in der Behandlungsgruppe mit IGF-I signifikant erhöht, was für eine höhere Chondrozytendichte spricht. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass IGF-I die Synthese von Proteoglykanen wie beispielsweise Aggrecan fördert [24, 42, 159]. Interessanterweise zeigte sich die Zellzahl, welche durch den Quotienten von DNS pro Protein bestimmt wird, in der Kontrollgruppe signifikant gegenüber der Behandlungsgruppe erhöht. In Zusammenschau kann daher postuliert werden, dass in der Kontrollgruppe insbesondere Fibroblasten zu finden sind, da diese keine Proteoglykane produzieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem histologischen Bewertungssystem, in welchem vermehrt fibroblastenähnliche, spindelförmige Zellen gesehen wurden. Von einer hohen Zellzahl bei geringem Proteoglykananteil berichteten wir zuvor bei einer Untersuchung von faserknorpeligem Reparaturgewebe nach fehlgeschlagener Markraumstimulation bei beginnender Arthrose [80]. In vorangegangenen Studien zeigte IGF-I zellproliferative Eigenschaften [24, 90], welche in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden können. Zusammenfassend zeigten die biochemischen Daten, dass die rAAV-IGF-I-Überexpression zu einer Stimulation der Matrixsyntheseleistung führte (Proteoglykansynthese und Typ-II-Kollagen) und die Differenzierung zu Chondrozyten förderte.

8.5 Reparatur des subchondralen Knochens

Innerhalb der osteochondralen Einheit spielt der subchondrale Knochen eine wichtige Rolle, da er Kräfte verteilt und metabolische Funktion besitzt [132]. Durch einen osteochondralen Defekt ist definitionsgemäß der subchondrale Knochen mitbetroffen und muss daher bei der Beurteilung der Reparaturvorgänge gemeinsam mit dem Knorpelgewebe betrachtet werden. Die Wiederherstellung des subchondralen Knochens bis auf seine ursprüngliche Höhe ist eine Voraussetzung für eine gute osteochondrale Reparatur [57, 58]. Zur Evaluation des subchondralen Knochens nutzten wir histologische und radiologische Methoden.

In der histologischen Auswertung zeigte sich die Reparatur des subchondralen Knochens nach Therapie mit IGF-I signifikant überlegen, was sich in einem

durchschnittlichen höheren Wiederaufbau des Knochens im Bereich des ehemaligen Defektes äußerte. In den Analysen der radiologischen Parameter der subartikulären Knochenplatte als auch der subartikulären Spongiosa fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. In beiden Gruppen konnten mikrostrukturelle Veränderungen des knöchernen Reparaturgewebes im Vergleich mit normalem ovinen subchondralem Knochen nachgewiesen werden, wie sechs Monate nach Anlage eines osteochondralen Defektes zu erwarten war. Unter anderem erhöhte sich die Anzahl der Trabekel (Tb. N.) durch Umbauprozesse in beiden Gruppen, bei gleichzeitig verminderten Dicken (Tb. th.) Dieser. Die Knochenmineraldichte der subartikulären Spongiosa war in der *lacZ*-Gruppe signifikant erniedrigt zur Norm, wohingegen sie in der IGF-I Gruppe nicht abwich. Obwohl die Knochenmineraldichte den Mineralgehalt des Knochens nachweist und nicht direkt für eine höhere Knochenqualität steht, kann es sein, dass sich dieses bessere knöcherne Fundament auch positiv auf die Knorpelheilung sowie die perifokale Arthrose auswirkt. Eine Verminderung der Knochenmineraldichte wurde zuvor in arthrotischem Knochen nachgewiesen [172]. Die Korrelationsanalyse zeigte eine signifikant starke Korrelation zwischen einer guten makroskopischen Knorpelreparatur und mikrostrukturellen Parametern (Knochenmineraldichte des subchondralen Knochens und der Trabekelanzahl der subartikulären Spongiosa), was dafürspricht, dass eine gute Knochenreparatur eine Voraussetzung für eine gute Knorpelreparatur sein könnte.

Die Mikro-CT dient seit ihrer Einführung der quantitativen Messung der mikrostrukturellen Parameter des Knochens [40] und macht den Knochen so einer nicht destruktiven, dreidimensionalen Analyse zugänglich [67, 127]. Auf diese Weise können selbst subtile Veränderungen bspw. bei Arthrose festgestellt werden [49, 154]. Orth *et al.* beschrieb, dass die Rekonstruktion von lapinem subchondralen Knochen im Rahmen von osteochondralen Defekten in einer definierten zeitlichen Abfolge abläuft. Zunächst befindet sich der subchondrale Knochen unterhalb seiner ursprünglichen Höhe, nach vier bis sechs Monaten erreicht er sein normales Niveau und nach einem Jahr kommt es häufig zur Hypertrophie im Sinne von intraläsionalen Osteophyten [49, 132]. Dem gegenüber

zeigte sich in derselben Studie die Knorpelreparatur in den ersten Monaten zunehmend, im Verlauf bis zu einem Jahr jedoch wieder abnehmend [132]. In der vorliegenden Arbeit liegt der subchondrale Knochen histologisch in der IGF-I Gruppe durchschnittlich bei 80 %, in der *lacZ*-Gruppe bei 60 % der ursprünglichen Höhe und es wurden keinerlei subchondrale Knochenzysten oder intraläsionale Osteophyten beobachtet, was an der Untersuchungsdauer von sechs Monaten liegen könnte. Somit wäre es interessant das Experiment auf einen längeren Zeitraum zu verlängern, um bessere Aussagen über die langfristigen Auswirkungen treffen zu können.

8.6 Effekte des rAAV basierten Gentransfers mittels IGF-I auf den angrenzenden Knorpel

8.6.1 Wirkung auf die makroskopische und histologische Evaluation des angrenzenden Knorpels

Unbehandelte Knorpelschäden führen auf lange Sicht zu Arthrose des benachbarten Knorpels, weshalb die Behandlung eines Knorpelschadens mit suffizientem Reparaturgewebe von höchster präventiver Relevanz ist, um Folgeschäden des Gelenkes zu verhindern. Die vorliegende Arbeit untersuchte ebenfalls die Hypothese, dass rAAV-vermittelter Gentransfer von IGF-I einen positiven Effekt auf die Entwicklung perifokaler Arthrose hat.

Zunächst erfolgte die makroskopische Begutachtung der Proben. Das Homburger Bewertungssystem, welches speziell für die makroskopische Begutachtung von Knorpeldefekten im Großtiermodell designt wurde, beinhaltet eine Kategorie, welche den benachbarten Knorpel beschreibt [54]. In dieser Kategorie zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen. Histologisch wurden die Schnitte durch das etablierte Bewertungssystem von Little und Kollegen beurteilt [86]. Es zeigte sich ein signifikant besseres histologisches Ergebnis in den Kategorien „Zellklone“, „Safranin-O-Lichtgrün-Färbung“, „*Tidemark* Formation“ sowie einem besseren Gesamtpunktwert auf Seiten der Behandlungsgruppe. Diese Ergebnisse ähneln denen von Maihöfer und Kollegen, welche ebenfalls

einen chondroprotektiven Effekt von IGF-I im benachbarten Knorpel nach einem Jahr im Minischwein-Modell feststellten. Sie beobachteten ebenfalls eine Verbesserung des histologischen Bewertungssystems, wobei das makroskopische Ergebnis ebenfalls statistische Signifikanz verfehlte [105]. Die Erkenntnis, dass rAAV-vermittelter Gentransfer von IGF-I mittelfristig (über sechs Monate) die Entstehung von arthrotischen Veränderungen im benachbarten Knorpel im Großtiermodell histologisch reduziert, passt zu den bekannten chondroprotektiven Eigenschaften des Wachstumsfaktors, welche den Pathomechanismen der Arthrose entgegenwirken. Ebenfalls unterstützt wird dies durch die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, welche zeigten, dass überlegenes Reparaturgewebe im Defekt mit geringeren arthrotischen perifokalen Veränderungen einhergeht. Dies erscheint zum einen in sich logisch, könnte jedoch auch eine Folge der o. g. Eigenschaften von IGF-I sein. Die Ergebnisse ergänzen die einer vorangegangene Studie im Kaninchenmodell, welche ebenfalls eine Reduktion der Arthrose beobachtete, nachdem in osteochondrale Defekte Konstrukte aus IGF-I transfizierten Chondrozyten und Polyhydroxyessigsäure (*polyglycolic acid*) für 28 Wochen implantiert wurden [104]. Zhang *et al.* untersuchten die unterschiedliche Wirkung verschiedener Dosen von IGF-I auf vollschichtige Knorpeldefekte indem sie eine mit IGF-I beladene Kollagenmembran einbrachten und hierbei drei Gruppen (reine Kollagenmembran, niedrige Dosis IGF-I 10 ng/cm², hohe Dosis IGF-I 100 ng /cm²) untersuchten. Hierbei zeigte sich nach acht Wochen in allen drei Gruppen Reparaturgewebe, jedoch gab es Hinweise auf eine bessere makroskopische Reparatur nach Gabe der hohen Dosis von 100 ng/cm² [188]. Insbesondere nach der ersten Woche erschien die Hochdosis-Gruppe den benachbarten Knorpel zu bewahren, was im Verlauf die Reparatur des Knorpelschadens positiv beeinflussen kann. Dennoch ist die optimale Dosis noch unklar, um einen Knorpelschaden zu behandeln, Nebenwirkungen jedoch so gering wie möglich zu halten. In Zusammenschau der o. g. Argumente kann auf einen chondroprotektiven Effekt von IGF-I in Bezug auf die Entwicklung perifokaler Arthrose geschlossen werden.

8.6.2 Veränderungen des angrenzenden subchondralen Knochens

Die Effekte auf den benachbarten subchondralen Knochen wurden mittels Analyse von mikro-computertomographischen Parametern untersucht. Durch das zunehmende Verständnis der Pathophysiologie von osteochondralen Defekten sowie der Entwicklung von Arthrose, wird deutlich, dass sich die Erkrankung nicht nur auf den oberflächlichen Knorpel, sondern auf die gesamte osteochondrale Einheit auswirkt [9, 58]. Betrachtet man die Arthrose im Verlauf, stellt man fest, dass sich die Veränderungen in der Früh- und der Spätphase deutlich unterscheiden. Zeichnet sich die Frühphase noch durch eine Ausdünnung der subchondralen Knochenplatte bei gleichzeitig erhöhter Porosität und Schädigung der subchondralen Trabekel aus, zeigt sich bei weiterem Fortschreiten eine Verdickung der subchondralen Knochenplatte, subchondrale Knochenzysten, subchondrale Mikroverletzungen sowie subchondrale trabekuläre Sklerose [154, 172]. Es wird davon ausgegangen, dass diese unter anderem durch vermehrten Knochenumbau bei Mikroverletzungen verursacht wird [172]. Die Analyse des angrenzenden subchondralen Knochens ergab eine signifikante Zunahme der kortikalen Dicke von 0,54 mm auf 0,64 mm in beiden Untersuchungsgruppen im Vergleich zur normalen osteochondralen Einheit ($p < 0,0001$) und wurde als Hinweis auf eine beginnende Arthrose in beiden Defektgruppen gewertet. Die weiteren Messwerte der angrenzenden subchondralen Knochenplatte zeigten keine Signifikanzen zwischen den Gruppen. Dennoch auffällig zeigte sich eine Zunahme der Knochenmineraldichte in der rAAV-IGF-I Gruppe, welche sogar oberhalb der Norm lag, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. In anderen Studien zeigte sich, dass höhere Serum-IGF-I Spiegel zu einer höheren Knochenmineraldichte und somit zu einer höheren Knochenqualität beitragen können [19, 33].

8.7 Schwächen und Stärken der Studie

Die vorliegende Arbeit reiht sich chronologisch nach *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Kurzzeit Kleintiermodellen zur Untersuchung der Effekte von IGF-I auf die

Knorpelreparatur osteochondraler Defekte ein [24, 90, 104, 131] und ergänzt diese als translationales Großtiermodell über einen Untersuchungszeitraum von sechs Monaten. Eine Stärke des ovinen Modells ist sowohl die Dicke des Gelenkknorpels, als auch der Gelenkaufbau und die Kraftverhältnisse des Gelenkes, welche denen des Menschen ähneln [129]. Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung etablierter Evaluationsverfahren der osteochondralen Reparatur sowie die Nutzung einer statistisch relevanten Studiengröße, wobei durch den bilateralen Ansatz die Anzahl der Versuchstiere auf das nötige Minimum reduziert werden konnte [135]. Jedoch wurde auf Zwischenevaluationen sowie auf eine dritte Kontrollgruppe z. B. mit Leer-Defekten ohne Therapie verzichtet u. a., weil diese die Anzahl der Versuchstiere stark erhöht hätten um weiterhin eine robuste statistische Analyse zu garantieren. Die Verwendung des klinisch relevanten rAAV-Vektors ist ethisch unproblematisch und wird teilweise schon im Menschen angewendet, sodass diese Therapiestrategie als für die Zukunft relevant eingeschätzt werden kann. Die Betrachtung der gesamten osteochondralen Einheit ist notwendig, um die Auswirkungen der Therapie sowohl auf den Knorpel, als auch auf den Knochen untersuchen zu können. Insbesondere die Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens mittels Mikrofokus-Computertomographie sowie den Vergleich zu normalem subchondralen Knochen nach Therapie mit rAAV-IGF-I ist hervorzuheben. Durch die hohe Objektivität und standardisierte Durchführung der Bewertung mittels der o. g. Bewertungssysteme ist deren Aussagekraft hoch. In der klinischen Praxis ist es üblich, die Patienten postoperativ nach knorpelchirurgischen Eingriffen entlasten zu lassen, was jedoch im Tiermodell nicht durchführbar ist. Die direkt postoperative Vollbelastung könnte die Reparaturergebnisse im ovinen Modell negativ beeinflussen. In Zukunft erscheint es sinnvoll auch biomechanische Testungen an dem Untersuchungsgewebe vorzunehmen. Insbesondere im Hinblick auf die vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der Prävention perifokaler Arthrose, sollten weitere Studien über einen längeren Zeitraum angestrebt werden, um die langfristigen Folgen einer Behandlung mit rAAV-IGF-I und deren Sicherheit zu untersuchen.

9. Klinische Relevanz und Ausblick

Knorpeldefekte haben von Natur aus ein geringes Heilungspotenzial und führen unbehandelt zu Arthrose. Bislang ist es noch nicht gelungen diese Defekte zu heilen [18]. Gentherapie ist ein vielversprechender Ansatz, um Chondrozyten zu stimulieren und Knorpelgewebe zur Reparatur anzuregen. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass direkter rAAV-vermittelter Gentransfer von IGF-I die Knorpelreparatur von osteochondralen Defekten im Großtiermodell signifikant *in vivo* verbesserte. Der bereits in klinischer Erprobung befindliche rAAV-Vektor konnte über einen Zeitraum von sechs Monaten zu einer Überexpression des Wachstumsfaktors IGF-I führen und dadurch die Knorpelreparatur fördern. Weitere Studien über einen längeren Zeitraum können weitere Auskünfte über die biomechanischen Eigenschaften sowie die Standhaftigkeit des Reparaturgewebes unter Belastung bringen. Des Weiteren erscheinen innovative Trägermaterialien mit einer kontrollierten Abgabe von rAAV-Genabgabesysteme von verschiedenen therapeutischen Faktoren großes Potenzial zu besitzen [10, 23, 27, 105, 111, 178]. Durch diese kann eine unregulierte kontinuierliche Expression verhindert und das potentielle Risiko der malignen Degeneration und Zytotoxizität minimiert werden [22]. Auch der Einsatz sinnvoller Kombinationen von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Sox9, FGF-2 oder TGF- β sollten weiter untersucht werden [8, 25, 43, 95, 166]. Der Nutzen und die Sicherheit einer Behandlung sind eine Grundvoraussetzung für klinische Studien am Menschen. Um diese zu ermöglichen ist das Tiermodell auch heute noch ein unverzichtbarer Bestandteil der Forschung. Insbesondere die Prävention von sekundärer Arthrose wird im Vordergrund stehen, da diese ein weit verbreitetes Krankheitsbild und von großer sozioökonomischer Bedeutung ist [66, 99]. Der Therapieerfolg in der Humanmedizin wird in Jahren und Jahrzehnten sowie der Verbesserung der Lebensqualität gemessen. Es müssen weitere präklinische Studien folgen, um die vielversprechenden Möglichkeiten der Gentherapie auf dem Gebiet der osteochondralen Reparatur auszuschöpfen und neue innovative Therapieansätze in den klinischen Alltag zu überführen.

10. Literaturverzeichnis

1. Allen M. et al (1998) The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. *Vet Surg.* 1998 Nov-Dec;27(6):596-605
2. Atchinson R. et al (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science (New York, N.Y.)* 149(3685):754–756
3. Basad E. et al (2010) Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Versus Microfracture in the Treatment of Cartilage Defects of the Knee: A 2-Year Randomised Study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):519-27
4. Behrens P. et al (2004) Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2004 Sep-Oct;142(5):529-39.
5. Bellavia D. et al (2018) Gene Therapy for Chondral and Osteochondral Regeneration: Is the Future now? *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb;75(4):649-667
6. Bergholt N. et al (2019) A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage.* 2019 Jul;10(3):370-374
7. Bora F. et al (1987) Joint Physiology, Cartilage Metabolism, and the Etiology of Osteoarthritis. *Hand Clin.* 1987 Aug;3(3):325-36.
8. Bougioukli S. et al (2018) Gene Therapy to Enhance Bone and Cartilage Repair in Orthopaedic Surgery. *Curr Gene Ther.* 2018;18(3):154-170
9. Brandt K. et al (2006) Yet more Evidence that Osteoarthritis is Not a Cartilage Disease. *Ann Rheum Dis.* 2006 Oct;65(10):1261-4.
10. Brinkman J.-M. et al (2008) Osteotomies Around the Knee: Patient Selection, Stability of Fixation and Bone Healing in High Tibial Osteotomies. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Dec;90(12):1548-57.
11. Brittberg M. et al (1994) Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95
12. Brittberg M. (2010) Cell Carriers as the Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Repair: A Review of the Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Procedure. *Am J Sports Med.* 2010 Jun;38(6):1259-71
13. Brittberg M. (2003) Evaluation of Cartilage Injuries and Repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:58-69
14. Buckwalter J. (1983) Articular Cartilage. *Instr Course Lect.* 1983;32:349-70

15. Buckwalter J. et al (1998) Articular Cartilage: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47:487-504
16. Buckwalter J. et al (2005) Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-80
17. Burr D. (2004) Anatomy and Physiology of the Mineralized Tissues: Role in the Pathogenesis of Osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S20-30
18. Cengiz I. et al (2018) Orthopaedic Regenerative Tissue Engineering en Route to the Holy Grail: Disequilibrium between the Demand and the Supply in the Operating Room. *J Exp Orthop.* 2018 May 22;5(1):14
19. Chen L.-Y. et al (2018) Association Among Serum Insulin-Like Growth Factor-1, Frailty, Muscle Mass, Bone Mineral Density, and Physical Performance Among Community-Dwelling Middle-Aged and Older Adults in Taiwan. *Rejuvenation Res.* 2018 Jun;21(3):270-277
20. Chuma H. et al (2004) One Day Exposure to FGF-2 was Sufficient for the Regenerative Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage in Rabbits. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Oct;12(10):834-42
21. Cook J. et al (2014) Animal Models of Cartilage Repair. *Bone Joint Res.* 2014 Apr 2;3(4):89-94
22. Cucchiari M. et al (2005) Gene Therapy for Cartilage Defects. *J Gene Med.* 2005 Dec;7(12):1495-509
23. Cucchiari M. et al (2014) A Vision on the Future of Articular Cartilage Repair. *Eur Cell Mater.* 2014 May 6;27:12-6
24. Cucchiari M. et al (2014) Overexpression of Human IGF-I via Direct rAAV-Mediated Gene Transfer Improves the Early Repair of Articular Cartilage Defects In Vivo. *Gene Ther.* 2014 Sep;21(9):811-9
25. Cucchiari M. et al (2018) Advances in Gene Therapy for Cartilage Repair. *Ann. Jt.* 2018 Nov;3:97
26. Cucchiari M. et al (2018) Effects of TGF- β Overexpression via rAAV Gene Transfer on the Early Repair Processes in an Osteochondral Defect Model in Minipigs. *Am J Sports Med.* 2018 Jul;46(8):1987-1996
27. Cucchiari M. et al (2019) Biomaterial-Guided Delivery of Gene Vectors for Targeted Articular Cartilage Repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2019 Jan;15(1):18-29
28. Dai J. et al (2007) The Use of Recombinant Adeno-Associated Virus for Skeletal Gene Therapy. *Orthod Craniofac Res.* 2007 Feb;10(1):1-14

29. Davies L. et al (2008) The Potential of IGF-1 and TGFbeta1 for Promoting "Adult" Articular Cartilage Repair: An In Vitro Study. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jul;14(7):1251-61
30. Dias I. et al (2018) Large Animal Models for Osteochondral Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1059:441-501
31. Diehl P. et al (2013) Konservative Therapie der Gonarthrose. *Orthopäde*. 2013 Feb;42(2):125-39
32. Dunbar C. et al (2018) Gene Therapy Comes of Age. *Science*. 2018 Jan 12;359(6372):eaan4672
33. Eklund E. et al (2021) IGF-I and IGFBP-1 in Relation to Body Composition and Physical Performance in Female Olympic Athletes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Aug 16;12:708421
34. Eldracher M. et al (2014) Small Subchondral Drill Holes Improve Marrow Stimulation of Articular Cartilage Defects. *Am J Sports Med*. 2014 Nov;42(11):2741-50
35. Epstein A. et al (2005) HSV-1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy. *Curr Gene Ther*. 2005 Oct;5(5):445-58
36. Evans C. et al (1995) Possible Orthopaedic Applications of Gene Therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 1995 Jul;77(7):1103-14
37. Evans C. et al (1996) Pathways to Gene Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1996 May;8(3):230-4
38. Evans C. et al (2005) Gene Therapy for the Treatment of Musculoskeletal Diseases. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Jul-Aug;13(4):230–242
39. Eygeris Y. et al (2022) Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Acc Chem Res*. 2022 Jan 4;55(1):2-12
40. Feldkamp L. et al (1989) The Direct Examination of Three-Dimensional Bone Architecture In Vitro by Computed Tomography. *J Bone Miner Res*. 1989 Feb;4(1):3-11
41. Fischer A. et al (2008) Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *CSH Protoc*. 2008 May 1;2008:pdb.prot4986
42. Fortier L. et al (2002) Insulin-Like Growth Factor-I Enhances Cell-Based Repair of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Mar;84(2):276-88
43. Fortier L. et al (2011) The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Oct;469(10):2706-15
44. Frisch J. et al (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.* 2014 Aug 27;5(4):103.
45. Frisch J. et al (2015) Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I. *Tissue Eng Part A.* 2015 Sep;21(17-18):2460-71
46. Frisch J. et al (2016) rAAV-Mediated Overexpression of sox9, TGF- β and IGF-I in Minipig Bone Marrow Aspirates to Enhance the Chondrogenic Processes for Cartilage Repair. *Gene Ther.* 2016 Mar;23(3):247-55
47. Frisch J. et al (2017) Peripheral Blood Aspirates Overexpressing IGF-I via rAAV Gene Transfer undergo Enhanced Chondrogenic Differentiation Processes. *J Cell Mol Med.* 2017 Nov;21(11):2748-2758
48. Fujisawa Y. et al (1979) The Effect of High Tibial Osteotomy on Osteoarthritis of the Knee. An Arthroscopic Study of 54 Knee Joints. *Orthop Clin North Am.* 1979 Jul;10(3):585-608
49. Gao L. et al (2016) A Novel Algorithm for a Precise Analysis of Subchondral Bone Alterations. *Sci Rep.* 2016 Sep 6;6:32982
50. Gao L. et al (2018) Subchondral Drilling for Articular Cartilage Repair: A Systematic Review of Translational Research. *Dis Model Mech.* 2018 Jun 19;11(6):dmm034280
51. Gao L. et al (2019) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Am J Sports Med.* 2019 Jan;47(1):222-231
52. Gerter R. et al (2012) New Insights into Cartilage Repair - the Role of Migratory Progenitor Cells in Osteoarthritis. *Matrix Biol.* 2012 Apr;31(3):206-13
53. Gil-Farina I. et al (2016) Recombinant AAV Integration Is Not Associated with Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients. *Mol Ther.* 2016 Jun;24(6):1100-1105
54. Goebel L. et al (2017) 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.* 2017 Apr;25(4):581-588
55. Goldberg A. et al (2017) The Use of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair and Regeneration: A Systematic Review. *J Orthop Surg Res.* 2017 Mar 9;12(1):39
56. Goldring M. et al (2006) The Control of Chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2006 Jan 1;97(1):33-44
57. Goldring S. et al (2016) Changes in the Osteochondral Unit during Osteoarthritis: Structure, Function and Cartilage-Bone Crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Nov;12(11):632-644

58. Gomoll A. et al (2010) The Subchondral Bone in Articular Cartilage Repair: Current Problems in the Surgical Management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):434-47
59. Goodrich L. et al (2007) Genetic Modification of Chondrocytes with Insulin-Like Growth Factor-1 Enhances Cartilage Healing in an Equine Model. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 May;89(5):672-85
60. Graceffa V. et al (2018) State of Art and Limitations in Genetic Engineering to Induce Stable Chondrogenic Phenotype. *Biotechnol Adv.* 2018 Nov 15;36(7):1855-1869
61. Grimm D. et al (2017) Small but Increasingly Mighty: Latest Advances in AAV Vector Research, Design, and Evolution. *Hum Gene Ther.* 2017 Nov;28(11):1075-1086
62. Gudas R. et al (2005) A Prospective Randomized Clinical Study of Mosaic Osteochondral Autologous Transplantation Versus Microfracture for the Treatment of Osteochondral Defects in the Knee Joint in Young Athletes. *Arthroscopy.* 2005 Sep;21(9):1066-75
63. Gudas R. et al (2012) Ten-year Follow-up of a Prospective, Randomized Clinical Study of Mosaic Osteochondral Autologous Transplantation Versus Microfracture for the Treatment of Osteochondral Defects in the Knee Joint of Athletes. *Am J Sports Med.* 2012 Nov;40(11):2499-508
64. Gugjoo M. et al (2017) Mesenchymal Stem Cells with IGF-1 and TGF- β 1 in Laminin Gel for Osteochondral Defects in Rabbits. *Biomed Pharmacother.* 2017 Sep;93:1165-1174
65. Knutsen G. (2004) Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. A Randomized Trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Mar;86(3):455-64
66. Haberkamp S. et al (2020) Analysis of Spatial Osteochondral Heterogeneity in Advanced Knee Osteoarthritis Exposes Influence of Joint Alignment. *Sci Transl Med.* 2020 Sep 23;12(562):eaba9481
67. Hilderbrand T. et al (1999) Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of Human Cancellous Bone: Microstructural Data from Spine, Femur, Iliac Crest, and Calcaneus. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1167-74
68. Hoemann C. et al (2011) International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage.* 2011 Apr;2(2):153-72
69. Horas U. et al (2003) Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint. A Prospective, Comparative Trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Feb;85(2):185-92

70. Hu W. et al (2000) Design of Retroviral Vectors and Helper Cells for Gene Therapy. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):493-511
71. Hunziker E. et al (1996) Repair of Partial-Thickness Defects in Articular Cartilage: Cell Recruitment from the Synovial Membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 1996 May;78(5):721-33
72. Hurtig M. et al (2011) Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage.* 2011 Apr;2(2):137-52
73. Imhoff A. et al (1999) Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde.* 1999 Jan;28(1):33-44.
74. Jackson D. et al (2001) Spontaneous Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model. A Preliminary Study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 Jan;83(1):53-64
75. Jagadeesh K. Venkatesan (2018) Controlled Release of Gene Therapy Constructs from Solid Scaffolds for Therapeutic Applications in Orthopedics. *Discov Med.* 2018 Apr;25(138):195-203
76. Jentzsch K. et al (1980) A Bovine Brain Fraction with Fibroblast Growth Factor Activity Inducing Articular Cartilage Regeneration In Vivo. *Acta Biol Med Ger.* 1980;39(8-9):967-71
77. Johnson L. (1986) Arthroscopic Abrasion Arthroplasty Historical and Pathologic Perspective: Present Status. *Arthroscopy.* 1986;2(1):54-69
78. Kanamiya T. et al (2002) The Influences of Biomechanical Factors on Cartilage Regeneration after High Tibial Osteotomy for Knees with Medial Compartment Osteoarthritis: Clinical and Arthroscopic Observations. *Arthroscopy.* 2002 Sep;18(7):725-9
79. Katz J. et al (2020) Disease Modification in Osteoarthritis; Pathways to Drug Approval. *Osteoarthr Cartil Open.* 2020 Mar 10;2(2):100059
80. Kaul G. et al (2012) Failed Cartilage Repair for Early Osteoarthritis Defects: A Biochemical, Histological and Immunohistochemical Analysis of the Repair Tissue after Treatment with Marrow-stimulation Techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Nov;20(11):2315-24
81. Kay M. et al (2001) Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):33-40
82. Knutsen G. et al (2016) A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J Bone Joint Surg Am.* 2016 Aug 17;98(16):1332-9

83. Krill M. et al (2018) Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Defects: A Review of Indications, Technique, and Outcomes. *JBJS Rev.* 2018 Feb;6(2):e5
84. Lange C. et al (2021) rAAV-Mediated *sox9* Overexpression Improves the Repair of Osteochondral Defects in a Clinically Relevant Large Animal Model Over Time In Vivo and Reduces Perifocal Osteoarthritic Changes. *Am J Sports Med.* 2021 Nov;49(13):3696-3707
85. Li C. et al (2020) Engineering Adeno-Associated Virus Vectors for Gene Therapy. *Nat Rev Genet.* 2020 Apr;21(4):255-272
86. Little C. et al (2010) The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in Sheep and Goats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Oct;18 Suppl 3:S80-92
87. Longo U. et al (2012) Stem Cells and Gene Therapy for Cartilage Repair. *Stem Cells Int.* 2012;2012:168385
88. Lundstrom K. (2018) Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases.* 2018 May 21;6(2):42
89. Madry H. (2002) Gentransfer in der Kreuzbandchirurgie. Naturwissenschaftliche Grundlagen und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Orthopäde.* 2002 Aug;31(8):799-809.
90. Madry H. (2005) Enhanced Repair of Articular Cartilage Defects In Vivo by Transplanted Chondrocytes Overexpressing Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). *Gene Ther.* 2005 Aug;12(15):1171-9
91. Madry H. et al (2006) Gentherapie in der Orthopädie. *Orthopäde.* 2006 Nov;35(11):1193-202.
92. Madry H. et al (2007) Tissue-Engineering zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer. Aktuelle Forschungsergebnisse und Literaturübersicht. *Orthopäde.* 2007 Mar;36(3):236-47.
93. Madry H. et al (2008) Autologe Chondrozytentransplantation. *Orthopäde.* 2008 Aug;37(8):756-63.
94. Madry H. et al (2011) Cartilage Repair and Joint Preservation: Medical and Surgical Treatment Options. *Dtsch Arztebl Int.* 2011 Oct;108(40):669-77
95. Madry H. et al (2011) Clinical Potential and Challenges of Using Genetically Modified Cells for Articular Cartilage Repair. *Croat Med J.* 2011 Jun;52(3):245-61
96. Madry H. (2015) Large Animal Models in Experimental Knee Sports Surgery: Focus on Clinical Translation. *J Exp Orthop.* 2015 Dec;2(1):9

97. Madry H. et al (2020) Thermosensitive Hydrogel Based on PEO-PPO-PEO Poloxamers for a Controlled in Situ Release of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Effective Gene Therapy of Cartilage Defects. *Adv Mater.* 2020 Jan;32(2):e1906508
98. Madry H. et al (2021) 'Actum ne agas'. *Osteoarthritis Cartilage.* 2021 Mar;29(3):300-303
99. Madry H. (2021) Arthrosetherapie. *Orthopäde.* 2021 Oct;50(10):781-784.
100. Madry H. et al (2021) The Future of Basic Science in Orthopaedics and Traumatology: Cassandra or Prometheus? *Eur J Med Res.* 2021 Jun 14;26(1):56
101. Madry H. et al (2002) Gene Transfer of a Human Insulin-Like Growth Factor I cDNA Enhances Tissue Engineering of Cartilage. *Hum Gene Ther.* 2002 Sep 1;13(13):1621-30
102. Madry H. et al (2003) Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors Efficiently and Persistently Transduce Chondrocytes in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. *Hum Gene Ther.* 2003 Mar 1;14(4):393-402
103. Madry H. (2005) Enhanced Repair of Articular Cartilage Defects In Vivo by Transplanted Chondrocytes Overexpressing Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). *Gene Ther.* 2005 Aug;12(15):1171-9
104. Madry H. (2013) Cartilage Constructs Engineered from Chondrocytes Overexpressing IGF-I Improve the Repair of Osteochondral Defects in a Rabbit Model. *Eur Cell Mater.* 2013 Apr 16;25:229-47
105. Maihöfer J. et al (2021) Hydrogel-Guided, rAAV-Mediated IGF-I Overexpression Enables Long-Term Cartilage Repair and Protection against Perifocal Osteoarthritis in a Large-Animal Full-Thickness Chondral Defect Model at One Year In Vivo. *Adv Mater.* 2021 Apr;33(16):e2008451
106. Mankin H. (1982) The Response of Articular Cartilage to Mechanical Injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982 Mar;64(3):460-6
107. Mankin H. et al (1996) Restoration of the Osteoarthrotic Joint. *J Bone Joint Surg Am.* 1996 Jan;78(1):1-2
108. Martin J. et al (1997) Age-Related Decline in Chondrocyte Response to Insulin-Like Growth Factor-I: The Role of Growth Factor Binding Proteins. *J Orthop Res.* 1997 Jul;15(4):491-8
109. McCarthy H. et al (2018) Magnetic Resonance Imaging Parameters at 1 Year Correlate with Clinical Outcomes Up to 17 Years After Autologous Chondrocyte Implantation. *Orthop J Sports Med.* 2018 Aug 7;6(8):2325967118788280

110. McCoy A. (2015) Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol.* 2015 Sep;52(5):803-18
111. Meng W. et al (2020) rAAV-Mediated Overexpression of SOX9 and TGF- β via Carbon Dot-Guided Vector Delivery Enhances the Biological Activities in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Nanomaterials (Basel).* 2020 Apr 28;10(5):855
112. Mithoefer K. et al (2009) Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee: An Evidence-Based Systematic Analysis. *Am J Sports Med.* 2009 Oct;37(10):2053-63
113. Mollon B. et al (2013) The Clinical Status of Cartilage Tissue Regeneration in Humans. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Dec;21(12):1824-33
114. Moran C. et al (2016) The Benefits and Limitations of Animal Models for Translational Research in Cartilage Repair. *J Exp Orthop.* 2016 Dec;3(1):1
115. Morscheid S. et al (2019) Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomittant Gene Transfer and Overexpression of TGF- β and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 May 27;20(10):2591
116. Morscheid Y. et al (2021) rAAV-Mediated Human FGF-2 Gene Therapy Enhances Osteochondral Repair in a Clinically Relevant Large Animal Model Over Time In Vivo. *Am J Sports Med.* 2021 Mar;49(4):958-969
117. Müller R. et al (1996) Morphometric Analysis of Noninvasively Assessed Bone Biopsies: Comparison of High-Resolution Computed Tomography and Histologic Sections. *Bone.* 1996 Mar;18(3):215-20
118. Mulligan R. (1993) The Basic Science of Gene Therapy. *Science.* 1993 May 14;260(5110):926-32.
119. Niemeyer P. et al (2016) Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Cartilage Defects of the Knee: A Guideline by the Working Group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee.* 2016 Jun;23(3):426-35
120. Nixon A. J. (2001) Exogenous Insulin-Like Growth Factor-I Stimulates an Autoinductive IGF-I Autocrine/Paracrine Response in Chondrocytes. *J Orthop Res.* 2001 Jan;19(1):26-32
121. Noyes F. et al (1989) A System for Grading Articular Cartilage Lesions at Arthroscopy. *Am J Sports Med.* 1989 Jul-Aug;17(4):505-13
122. Oberholzer A. et al (2006) Stellenwert der Gentherapie in Unfallchirurgie und Orthopädie. *Unfallchirurg.* 2006 Jul;109(7):521-7

- 123.Ochs B. et al (2011) Remodeling of Articular Cartilage and Subchondral Bone after Bone Grafting and Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation for Osteochondritis Dissecans of the Knee. *Am J Sports Med.* 2011 Apr;39(4):764-73
- 124.O'Driscoll S. et al (1986) The Chondrogenic Potential of Free Autogenous Periosteal Grafts for Biological Resurfacing of Major Full-Thickness Defects in Joint Surfaces under the Influence of Continuous Passive Motion. An Experimental Investigation in the Rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986 Sep;68(7):1017-35
- 125.O'Driscoll S. (1998) The Healing and Regeneration of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 Dec;80(12):1795-812
- 126.Oegema T. et al (1997) The Interaction of the Zone of Calcified Cartilage and Subchondral Bone in Osteoarthritis. *Microsc Res Tech.* 1997 May 15;37(4):324-32
- 127.Oláh T. et al (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.* 2018 Jan 8;8(1):75
- 128.Oláh T. et al (2021) Comparative Anatomy and Morphology of the Knee in Translational Models for Articular Cartilage Disorders. Part I: Large Animals. *Ann Anat.* 2021 May;235:151680
- 129.Oláh T. et al (2021) Comparative Anatomy and Morphology of the Knee in Translational Models for Articular Cartilage Disorders. Part II: Small Animals. *Ann Anat.* 2021 Mar;234:151630
- 130.Orth P. et al (2008) Analysis of Novel Nonviral Gene Transfer Systems for Gene Delivery to Cells of the Musculoskeletal System. *Ann Anat.* 2021 Mar;234:151630
- 131.Orth P. et al (2011) Transplanted Articular Chondrocytes Co-Overexpressing IGF-I and FGF-2 Stimulate Cartilage Repair In Vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011 Dec;19(12):2119-30
- 132.Orth P. et al (2012) Temporal and Spatial Migration Pattern of the Subchondral Bone Plate in a Rabbit Osteochondral Defect Model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012 Oct;20(10):1161-9
- 133.Orth P. et al (2013) A Low Morbidity Surgical Approach to the Sheep Femoral Trochlea. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013 Jan 3;14:5
- 134.Orth P. et al (2013) Parathyroid Hormone 1-34 Improves Articular Cartilage Surface Architecture and Integration and Subchondral Bone Reconstitution in Osteochondral Defects In Vivo. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Apr;21(4):614-24
- 135.Orth P. et al (2013) Reduction of Sample Size Requirements by Bilateral Versus Unilateral Research Designs in Animal Models for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013 Nov;19(11):885-91

- 136.Orth P. et al (2015) Comprehensive Analysis of Translational Osteochondral Repair: Focus on the Histological Assessment. *Prog Histochem Cytochem.* 2015 Oct;50(3):19-36
- 137.Orth P. et al (2016) Knorpeldefekte. Natürlicher Verlauf und autologes Reparaturpotenzial. *Arthroskopie* 29(2):68–74
- 138.Orth P. et al (2016) Small-Diameter Awls Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *Am J Sports Med.* 2016 Jan;44(1):209-19
- 139.Ortved K. et al (2015) Implantation of rAAV5-IGF-I Transduced Autologous Chondrocytes Improves Cartilage Repair in Full-Thickness Defects in the Equine Model. *Mol Ther.* 2015 Feb;23(2):363-73
- 140.Osterhoff G. et al (2011) Comparative Anatomical Measurements of Osseous Structures in the Ovine and Human Knee. *Knee.* 2011 Mar;18(2):98-103
- 141.Outerbridge R. (1961) The Etiology of Chondromalacia Patellae. *J Bone Joint Surg Br.* 1961 Nov;43-B:752-7
142. Peifer C. (2024) Locally Directed Recombinant Adeno- Associated Virus-Mediated IGF-1 Gene Therapy Enhances Osteochondral Repair and Counteracts Early Osteoarthritis In Vivo. *Am J Sports Med.* 2024 Apr;52(5):1336-1349
- 143.Peng X.-B. et al (2019) IGF-1 and BMP-7 Synergistically Stimulate Articular Cartilage Repairing in the Rabbit Knees by Improving Chondrogenic Differentiation of Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem.* 2019 Apr;120(4):5570-5582
- 144.Pineda S. et al (1992) A Semiquantitative Scale for Histologic Grading of Articular Cartilage Repair. *Acta Anat (Basel).* 1992;143(4):335-40
- 145.Poole A. R. (2001) Composition and Structure of Articular Cartilage. A template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S26-33
- 146.Pridie, K.H., Gordon, G. (1959) A Method of Resurfacing Osteoarthritic Knee Joints. *J Bone Joint Surg Br.* 1959 Aug; 41(3):618–619
- 147.Rackwitz L. et al (2017) Neue experimentelle Ansätze in der Knorpelchirurgie. *Orthopäde.* 2017 Nov;46(11):947-953
- 148.Rackwitz L. et al (2020) Arthroseprävention und mögliche zukünftige Ansätze der Arthrosetherapie – Sicht der Orthopädie und Unfallchirurgie. *Akt Rheumatol.* 2020 Jan;45(01):96–105
- 149.Rath B. et al (2017) Knorpelreparative Eingriffe am Kniegelenk. *Orthopäde.* 2017 Nov;46(11):919-927

150. Reinholz G. et al (2004) Animal Models for Cartilage Reconstruction. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1511-21
151. Rey-Rico A. et al (2015) Determination of Effective rAAV-Mediated Gene Transfer Conditions to Support Chondrogenic Differentiation Processes in Human Primary Bone Marrow Aspirates. *Gene Ther*. 2015 Jan;22(1):50-7
152. Rey-Rico A. et al (2016) Controlled Release Strategies for rAAV-Mediated Gene Delivery. *Acta Biomater*. 2016 Jan;29:1-10
153. Roemer F. W. et al (2022) Imaging in Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022 Jul;30(7):913-934
154. Rosenberg L. (1971) Chemical Basis for the Histological Use of Safranin O in the Study of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1971 Jan;53(1):69-82
155. Sainz-Ramos M. et al (2021) How Far Are Non-Viral Vectors to Come of Age and Reach Clinical Translation in Gene Therapy? *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 14;22(14):7545
156. Schambach A. et al (2016) Retroviral Vectors for Cancer Gene Therapy. *Recent Results Cancer Res*. 2016;209:17-35
157. Schiedner G. et al (1998) Genomic DNA Transfer with a High-Capacity Adenovirus Vector Results in Improved In Vivo Gene Expression and Decreased Toxicity. *Nat Genet*. 1998 Feb;18(2):180-3
158. Schmal H. (2017) Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 12(02):179–197
159. Schmidt M. et al (2006) A Review of the Effects of Insulin-Like Growth Factor and Platelet Derived Growth Factor on In Vivo Cartilage Healing and Repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 May;14(5):403-12
160. Schneider-Wald B. et al (2013) Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier. *Orthopäde*. 2013 Apr;42(4):242-53
161. Schrenker S. et al (2019) Zukunftsaspekte der klinischen Arthrosetherapie im Kontinuum der translationalen Forschung. *Z Orthop Unfall*. 2019 Dec;157(6):629-643
162. Schuster P. et al (2018) Ten-Year Results of Medial Open-Wedge High Tibial Osteotomy and Chondral Resurfacing in Severe Medial Osteoarthritis and Varus Malalignment. *Am J Sports Med*. 2018 May;46(6):1362-1370
163. Sellers R. S. et al (2000) The Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) on the Healing of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1997 Oct;79(10):1452-63
164. Shah S. et al (2020) Current Applications of Growth Factors for Knee Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2020 Dec;13(6):641-650.

165. Shapiro F. et al (1993) Cell Origin and Differentiation in the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Apr;75(4):532-53
166. Shi S. et al (2012) Regulation of Articular Chondrocyte Aggrecan and Collagen Gene Expression by Multiple Growth Factor Gene Transfer. *J Orthop Res.* 2012 Jul;30(7):1026-31
167. Shi S. et al (2013) Growth Factor Transgenes Interactively Regulate Articular Chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2013 Apr;114(4):908-19
168. Simon T. et al (2018) Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2018 Mar;26(1):31-39
169. Smith G. et al (2005) Arthroscopic Assessment of Cartilage Repair: A Validation Study of 2 Scoring Systems. *Arthroscopy.* 2005 Dec;21(12):1462-7
170. Sophia Fox A. et al (2009) The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health.* 2009 Nov;1(6):461-8
171. Steadman J. et al (2001) Microfracture: Surgical Technique and Rehabilitation to Treat Chondral Defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S362-9
172. Suri S. et al (2012) Osteochondral Alterations in Osteoarthritis. *Bone.* 2012 Aug;51(2):204-11
173. Szybalska E. et al (1962) Genetics of Human Cell Line. IV. DNA-Mediated Heritable Transformation of a Biochemical Trait. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962 Dec 15;48(12):2026-34.
174. Tannenbaum J. et al (2015) Russell and Burch's 3Rs then and now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015 Mar;54(2):120-32
175. Tetteh E. et al (2012) Basic Science and Surgical Treatment Options for Articular Cartilage Injuries of the Knee. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2012 Mar;42(3):243-53
176. Trippel S. (1995) Growth Factor Actions on Articular Cartilage. *J Rheumatol Suppl.* 1995 Feb;43:129-32
177. Venkatesan J. et al (2018) Controlled Release of Gene Therapy Constructs from Solid Scaffolds for Therapeutic Applications in Orthopedics. *Discov Med.* 2018 Apr;25(138):195-203
178. Venkatesan J. et al (2020) Enhanced Chondrogenic Differentiation Activities in Human Bone Marrow Aspirates via SOX9 Overexpression Mediated by pNaSS-Grafted PCL Film-Guided rAAV Gene Transfer. *Pharmaceutics.* 2020 Mar; 21;12(3):280
179. Verma I. (1990) Gene Therapy. *Sci Am.* 1990 Nov;263(5):68-72, 81-4

180. Verschure, P. J. et al. (1996) Articular Cartilage Destruction in Experimental Inflammatory Arthritis: Insulin-Like Growth Factor-1 Regulation of Proteoglycan Metabolism in Chondrocytes. *Histochem J.* 1996 Dec;28(12):835-57
181. Vigna E. et al (2000) Lentiviral Vectors: Excellent Tools for Experimental Gene Transfer and Promising Candidates for Gene Therapy. *J Gene Med.* 2000 Sep-Oct;2(5):308-16
182. Wakitani S. et al (1994) Mesenchymal Cell-Based Repair of Large, Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994 Apr;76(4):579-92
183. Wang D. et al (2019) Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 May;18(5):358-378
184. Wei Q. et al (2017) Engineering the Rapid Adenovirus Production and Amplification (RAPA) Cell Line to Expedite the Generation of Recombinant Adenoviruses. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(6):2383-2398
185. Weimer A. et al (2012) Benefits of Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV)-Mediated Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Overexpression for the Long-Term Reconstruction of Human Osteoarthritic Cartilage by Modulation of the IGF-I Axis. *Mol Med.* 2012 May 9;18(1):346-58
186. Wu P. et al (2018) Non-Viral Gene Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration. *J Transl Med.* 2018 Feb 15;16(1):29
187. Yamamoto T. et al (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.* 2004 Aug;12(8):636-41
188. Zhang Z. et al (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.* 2017 Feb;25(2):309-320
189. Zhou, K., Yuan, M., Sun, J. et al. Co-delivery of IL-1Ra and SOX9 via AAV Inhibits Inflammation and Promotes Cartilage Repair in Surgically Induced Osteoarthritis Animal Models. *Gene Ther.* 2025 Jan; doi: 10.1038/s41434-025-00515-y. Epub ahead of print.

11. Publikationen

Peifer, C., Oláh T., Venkatesan J.K., Goebel L., Orth P., Schmitt G., Zurakowski D., Menger M.D., Laschke M.W., Cucchiari M., Madry H. (2024) Locally Directed Recombinant Adeno- Associated Virus-Mediated IGF-1 Gene Therapy Enhances Osteochondral Repair and Counteracts Early Osteoarthritis In Vivo. *Am J Sports Med.* 2024 Apr;52(5):1336-1349. Impact-Faktor: 6,2

Orth, P., **Peifer, C.**, Goebel, L., Cucchiari M., Madry, H. (2015) Comprehensive Analysis of Translational Osteochondral Repair: Focus on the histological assessment. *Prog. Histochem Cytochem*, 50(3): 19-36. Impact-Faktor: 3,6

12. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthrosecforschung der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Mein größter Dank gilt *Herrn Prof. Dr. med. Henning Madry*, der mich mit seiner Begeisterung für Knorpelforschung ansteckte und mich auf dieser herausfordernden Reise der Dissertation immer wieder neu motivierte. Dafür, dass er mich mit seinem fundierten Wissen, seiner Erfahrung sowie seinen gleichermaßen kritischen und hilfreichen Anmerkungen begleitete, bin ich sehr dankbar.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei *Frau Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiaroni* für ihre fachlich kompetente Betreuung und stets freundliche Art.

Herrn Prof. Dr. med. Patrick Orth und *Herrn Dr. rer. nat. Tamás Oláh* danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Ratschläge.

Ich bedanke mich bei allen *Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle Orthopädie und Arthrosecforschung* für die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere bei *Frau Gertrud Schmitt* für die Anleitung bei der Durchführung der Experimente, die Unterstützung und die vielen freundlichen Gespräche.

Herrn Dr. rer. nat. Jagadeesh Venkatesan danke ich für die Anfertigung der Vektoren und seine Freundschaft.

Des Weiteren danke ich *Herrn David Zurakowski* für die statistische Auswertung der histologischen Analysen.

Bei *Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger*, *Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke* und den *Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie Homburg* bedanke ich mich für die Tierhaltung und die Unterstützung bei der Durchführung der Operationen.

Meinen *Eltern* danke ich für die Unterstützung in jeder Phase meines Lebens, ohne die das Erlangen meiner Ziele nicht möglich gewesen wäre. Meiner *Schwester* möchte ich für ihren positiven Zuspruch danken, welcher mir das Durchhaltevermögen gab, diese Dissertation auch neben meiner beruflichen Tätigkeit als Ärztin zu vollenden. Letztlich möchte ich noch meinem Mann *Andreas* dafür danken, dass er jeden Tag ein bisschen schöner macht.

13. Lebenslauf

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

