

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin

**Histologische und molekularbiologische Analysen von mit MR-Kontrastmittel
gelabelter mesenchymaler Stammzellen nach Implantation in osteochondrale
Defekte im Kaninchenmodell**

Megan Judith Fleming

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Stephan Vogt
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 05.10.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 13.10.2021 angenommen

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV-V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1. Hyaliner Gelenkknorpel	1
1.2. Therapieansätze bei Knorpelschäden	3
1.3. Stammzellen für den Einsatz in der Knorpelregenerationstherapie	5
1.4. Monitoring der Stammzellen <i>in vivo</i>	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Material	7
2.1.1. Tiermodell	7
2.1.2. Zellen	7
2.1.3. Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®).....	8
2.1.4. Medikamente/Antikörper/Primer	8
2.1.5. Geräte/Software	10
2.1.6. Verbrauchsmittel/Chemikalien	11
2.2. Methoden	13
2.2.1. Studiendesign	13
2.2.2. Herstellung der Stammzell-Fibrin-Implantate.....	15
2.2.2.1. eGFP Transduktion	15
2.2.2.2. Resovist®-Markierung	15
2.2.2.3. Stammzell-Fibrin-Implantate	15
2.2.3. Operative Eingriffe.....	15
2.2.3.1. Anästhesieprotokoll	16
2.2.3.2. OP-Methode der Implantation	16
2.2.3.3. Nachsorge	17
2.2.3.4. OP-Methode der Explantation	17
2.2.4. Makroskopische Bewertung des Defekts bei Explantation – ICRS 1	18
2.2.5. Histologische Auswertung	20
2.2.5.1. Verarbeitung der Präparate	20
2.2.5.1.1. Fixierung und Entkalkung	20
2.2.5.1.2. Präparierung	20
2.2.5.1.3. Kryoschnitte	21
2.2.5.2. Histochemie	21
2.2.5.2.1. Berliner Blau	21
2.2.5.2.2. Safranin O	22
2.2.5.3. Immunhistochemie	23
2.2.5.3.1. eGFP - enhanced green fluorescent protein	24
2.2.5.3.2. Kollagen II	24

2.2.5.3.3. Aggrecan	25
2.2.6. Mikroskopische Bewertung des Defekts in den Gewebeschnitten – ICRS 2	25
2.2.7. Molekularbiologische Analysen	26
2.2.7.1. mRNA Isolierung aus Proben der Defektfüllung	26
2.2.7.2. Expressionsanalyse genspezifischer mRNA-Transkripte mittels qPCR	27
2.2.7.2.1. Abfolge der qPCR	27
2.2.7.2.2. CT-Wert Bestimmung	29
2.2.7.2.3. Schmelzkurve	30
2.2.7.2.4. Relative Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode	30
2.2.8. Statistische Auswertverfahren	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Molekularbiologischen Analysen	33
3.1.1. Allgemeine Verteilung der Differenzierungsmarker	33
3.1.1.1. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Aggrecan	35
3.1.1.2. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Kollagen II	35
3.1.1.3. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für COMP	36
3.1.1.4. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Sox9	38
3.1.2. Allgemeine Verteilung der Dedifferenzierungsmarker	39
3.1.2.1. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Kollagen I	39
3.1.2.2. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Kollagen X	40
3.1.1. Verteilung der Entzündungsmarker	41
3.1.2. Zusammenfassung molekularbiologischer Analysen	42
3.2. Histologische Auswertung	43
3.2.1. Deskriptive Darstellung: Resovist [®] - und eGFP-Nachweis	43
3.2.1.1. Nachweis Resovist [®] durch Berliner Blau Färbung	43
3.2.1.2. Nachweis eGFP durch immunhistochemische Färbung	45
3.2.2. Vergleich positiver Färbungsergebnisse in Resovist [®] -markierten Präparaten	46
3.2.3. Zusammenfassung des histologischen Resovist [®] - und eGFP-Nachweis	46
3.2.4. Auswertung der International Cartilage Repair Society Bewertungen	47
3.2.4.1. Auswertung ICRS 1 – makroskopische Bewertung	47
3.2.4.2. Auswertung ICRS 2 – mikroskopische Bewertung	51
3.2.5. Zusammenfassung ICRS Bewertungen	54
4. Diskussion	55
4.1. Nachweis markierter Zellen	56
4.1.1. Verbleib der markierten Zellen	57
4.1.2. Methodische Limitationen des Nachweises markierter Zellen	58
4.2. Einfluss der Resovist[®]-Markierung auf die Knorpeldefektheilung	60
4.2.1. Histologische Beurteilung der Knorpeldefektheilung	60

4.2.2. Molekularbiologische Beurteilung der Knorpeldefektheilung.....	63
4.2.2.1. Differenzierungsmarker	64
4.2.2.2. Dedifferenzierungsmarker	68
4.2.2.3. Entzündungsmarker	70
4.3. Ausblick	72
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Anhang	88
7.1. Therapiemonitoring	88
7.2. Aufsteigende Alkoholreihe	89
8. Danksagungen	90

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ASC	<i>Adipose tissue derived stem cells</i> [Stammzellen aus dem Fettgewebe]
BB (+/-)	Berliner Blau (positiv/negativ)
BMSC	<i>Bone marrow derived stem cells</i> [Stammzellen aus dem Knochenmark]
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
cm/cm ²	Zentimeter/ Quadratzentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i> [oligomeres Knorpelmatrixprotein]
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
(c)DNA	<i>(complementary) deoxyribonucleic acid</i> [komplementäre Desoxyribonukleinsäure]
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix
dTTP,	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ESM	<i>Electronic Supplementary Materials</i>
et al.	et altera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
G	<i>Gauge</i> (Einheit)
g, µg, mg, kg	Gramm, Mikrogramm, Milligramm, Kilogramm
HCL	Salzsäure
i.v.	intravenös
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
IL-1β	Interleukin-1β
IQR	<i>Interquartile range</i> [Interquartilbereich]
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KM	Kontrastmittel

mAB	<i>monoclonal Antibody</i>
MACT	Matrix-assoziierte autologe Chondrozyten Transplantation
min	Minuten
mM	Millimol
mm, mm ²	Millimeter, Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
(h)MSC	(humane) Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
NZW	<i>New Zealand White</i> [Kaninchen]
p	Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test)
p_x	Exakte Signifikanz (zweiseitiger Test)
PAP-Pen	Wasserabweisender Stift (0.3% Ligroin, 0.1% Bromopropane)
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
r (r_s)	Korrelationskoeffizient (nach Spearman-Rho)
R+, R-	Resovist positiv, Resovist negativ
RQ	<i>Relative Quantification</i> [relative Expressionsrate]
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
s	Sekunden
s.	siehe
S.	Seite
s.c.	<i>subcutan</i>
Sox9	<i>Sex determining region Y-type high mobility group box containing 9</i>
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxide</i>
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zonierung des Gelenkknorpels (angelehnt an Schünke et al., 2007, S. 16, 44, 5).....	2
Abb. 2: Studiendesign	14
Abb. 3: Operative Setzung des Defekts.....	17
Abb. 4: Aufsicht auf ein eröffnetes Kniegelenk zum Zeitpunkt der Explantation	18
Abb. 5: Makroskopische Bewertungskriterien der Knorpelregeneration nach ICRS 1	19
Abb. 6: Präparation	21
Abb. 7: Schema der Immunhistochemische Färbung	23
Abb. 8: Mikroskopische Bewertungsskala nach ICRS 2 Kriterien	26
Abb. 9a: Real-Time PCR Kurve mehrerer mRNA Konzentrationen der 24-Wochen-Gruppe für Kollagen X.....	29
Abb. 10: Verteilung der relativen Expressionsrate der Differenzierungsmarker.....	34
Abb. 11: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Aggrecan.....	35
Abb. 12: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Kollagen II	36
Abb. 13: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von COMP	37
Abb. 14: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Sox9.....	38
Abb. 15: Boxplot der Verteilung der relativen Expressionsrate der Dedifferenzierungsmarker	39
Abb. 16: Deskriptive Statistik und Verteilung der relative Expressionsrate von Kollagen I	40
Abb. 17: Deskriptive Statistik und Verteilung der relativen Expressionsrate von Kollagen X für Resovist®- und Wochengruppen.....	41
Abb. 18: Deskriptive Statistik Verteilung der relativen Expressionsrate der Entzündungsmarker IL-1 β und TNF- α	42
Abb. 19: Auswertung der Präparate nach Berliner Blau	44
Abb. 20: Berliner Blau Färbung 4 Wochen Präparate	44
Abb. 21: Auswertung der Präparate nach eGFP	45
Abb. 22: eGFP Färbung der Präparate (40x).....	45
Abb. 23: Vergleich eGFP- und Berliner Blau-positiven Objekte in den Resovist®-markierten Präparaten der 4. Woche und 12. Woche	46
Abb. 24: Defekte makroskopisch bei Explantation	49
Abb. 25: Darstellung der ICRS 1 Bewertung in den verschiedenen Wochengruppen	49
Abb. 26: Mikroskopischer Vergleich verschiedener Färbungen in R+4W (Nr. 409) und R-24W (Nr. 2408) (5x).....	50
Abb. 27: Darstellung der ICRS 2 Gesamtbeurteilung in den verschiedenen Wochengruppen.....	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Therapieoptionen für Knorpelschäden	4
Tab. 2: Chronologischer Ablauf der RT- PCR mit dem <i>7900HT Fast Real-Time PCR</i> System	28
Tab. 3: Verteilung der Expressionsrate der Differenzierungsmarker über Resovist®- und Wochengruppen	34
Tab. 4: Median und Interquartilbereich des ICRS 1 nach <i>in vivo</i> Standzeiten aufgeteilt	48
Tab. 5: Nichtparametrische Testung der Verteilung der ICRS 1 Unterkategorien über die Wochengruppen	48
Tab. 6: Aufstellung der Mediane und Interquartilbereich der einzelnen ICRS 2 Unterkategorien	53
Tab. 7: Nichtparametrische Testung der Verteilung der ICRS 2 Unterkategorien über die Wochengruppen	53

1. Einleitung

1.1. Hyaliner Gelenkknorpel

Mit Knorpelschäden assoziierte Gelenkerkrankungen betreffen weltweit Millionen von Menschen. Die große Prävalenz von Knorpelschäden kann man mit den hohen mechanischen Belastungen im Gelenk sowie dem schlechten Regenerationspotential des Gewebes begründen, eine Schädigung des hyalinen Gelenkknorpels heilt langsam und unzureichend (Bartlett et al., 2005, S. 640; Brittberg et al., 1994, S. 889; Hjelle et al., 2002, S. 731-3). Es kommt daher oft zur Progression der Läsion und Chronifizierung der Beschwerden mit fortschreitender Degeneration bis hin zur Arthrose (Insall, 1967, S. 211; Murray et al., 2015, S. 2159-62). Laut den letzten Erhebungen des statistischen Bundesamts verursacht Arthrose Gesundheitskosten um 7,6 Milliarden Euro/Jahr und ein Verlust von 7% der Erwerbstätigkeitsjahre (Robert Koch-Institut, 2013, S. 22-3).

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel, einem avaskulären Gewebe. Nur 2% des Knorpelgesamtvolumens besteht aus Chondrozyten, den Knorpelzellen, welche aus dem Mesenchym stammen. Sie produzieren eine typisch hyaline Extrazellulärmatrix (EZM) und bilden isogene Gruppen (Alford & Cole, 2005a, S. 296), die nicht in unmittelbarem Kontakt zueinander stehen. Dies bedingt eine Zellversorgung über Diffusion. Zudem sind differenzierte Chondrozyten in einem zytobiologischen Ruhestand. Diese Umstände tragen zusammen mit der Avaskularität zum begrenzten Regenerationspotential dieses bradytrophen Gewebes bei.

Die limitierte Heilungspotenz sowie obigen Eigenschaften bilden in der Therapie von Knorpelläsionen eine große Herausforderung. Ein Ziel, um die fortschreitende Degeneration aufzuhalten, ist eine langfristige Wiederherstellung einer intakten belastbaren Gelenkoberfläche zum Schutz des darunterliegenden Knochens.

Problematisch hierbei ist jedoch, dass Gelenkknorpel aus verschiedenen Zonen besteht (s. Abb. 1). An der oberflächlichen Tangentialzone liegen dicht gepackte tangentielle Kollagenfibrillen über flachen Chondrozyten, die so vor allem Scherkräften widerstehen. Eine oberflächliche Verletzung führt zur Störung der Diffusionsbarriere und zum Verlust des Scherschutzes der darunterliegenden Zonen (Franz et al., 2001, S. 582; Hunziker, 2002, S. 433; Poole et al., 2001, S. S27). In der Intermediärschicht gruppieren radiäre Kollagenfibrillen die Chondrozyten säulenartig. Der Zell-Zellkontakt ist durch viel EZM gering. Durch den hohen Proteoglykangehalt und die radiäre Kraftverteilung wird hier die Kompression gedämpft (Salter, 1998, S. 255). In der Mineralisationszone haben die Chondrozyten einen hypertrophen Phänotyp mit abnehmendem, metabolischem Umsatz (s. Abb. 1). Die extrazelluläre Matrix kalzifiziert und bildet eine mechanische Pufferzone sowie eine Verankerung im subchondralen Knochen.

Bei oberflächlichen Knorpelverletzungen folgt zwar eine enzymatische und metabolische Reaktion, diese stört jedoch häufig die sensible Homöostase im bradytrophen Gelenkknorpel. Überwiegt daraufhin die katabole Reaktion so kann sich die initial nur oberflächliche Verletzung in die tieferen Schichten fortsetzen (Hunziker, 2002, S. 433). Kommt es zu tieferen Verletzungen, die bis in den subchondralen Knochen reichen, beginnt ein endogener Reparaturmechanismus. Es entsteht hierbei jedoch fibrocartilaginäres Gewebe, das dem hyalinen Knorpel biomechanisch unterlegen ist (Frisbie et al., 2003, S. 219). Durch Störung der Knorpel-Knochengrenze kommt es zur Freisetzung multipotenter Knochenmarkstammzellen, welche im entstehenden Blutgerinnsel zur Bildung fibrocartilaginären Regeneratgewebes beitragen (Alford & Cole, 2005b, S. 445; Gomoll et al., 2010b, S. 435). Das Regenerat ist biomechanisch ungünstig und kann vor allem bei größeren Läsionen versagen. Auch wird häufig eine Veränderung im subchondralen Knochen gesehen mit Verdickung, Zystenbildung sowie intraläsionalen Osteophyten (Kreuz et al., 2006, S. 1123).

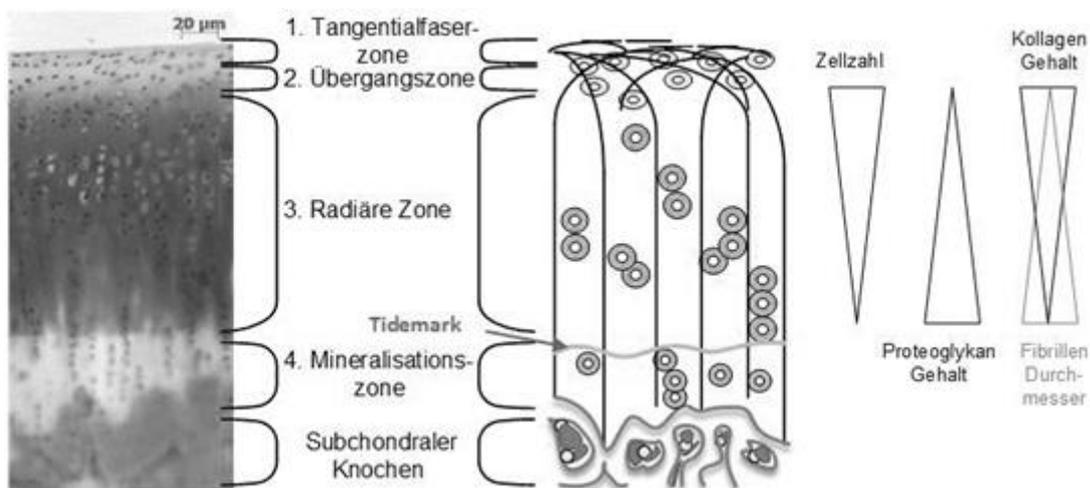


Abb. 1: Zonierung des Gelenkknorpels (angelehnt an Schünke et al., 2007, S. 16, 44f)

(links Safranin O Färbung des unbehandelten Gelenkknorpels, rechts schematische Darstellung)

In den ersten drei Zonen nimmt mit größerer Gelenkknorpeltiefe die Zellzahl und der Kollagengehalt ab, gegensätzlich verhalten sich der Proteoglykangehalt und der Fibrillendurchmesser, welche in der Tiefe zunehmen.

Die „Tidemark“ ist deutlich zwischen der blassen Mineralisations- und der stark gefärbten Radiären Zone in der Safranin O Färbung zu erkennen.

1.2. Therapieansätze bei Knorpelschäden

Der endogene Reparaturmechanismus wird bei knorpelstimulierenden Verfahren wie beispielsweise der Pridie-Bohrung (Insall, 1967, S. 213-6; Pridie & Gordon, 1959, S. 618-9), Abrasion (Isserlin, 1950, S. 302) oder Mikrofrakturierung (Steadman et al., 2010, S. 78) ausgenutzt. Dies kann zur Wiederherstellung der Gelenkoberfläche führen, wobei jedoch die biomechanischen Eigenschaften und klinischen Ergebnisse vor allem bei größeren Defekten nicht immer zufriedenstellend sind (Basad et al., 2010, S. 525; Saris et al., 2014, S. 1391-2). Daher entwickelte sich der rekonstruktive Therapieansatz (s. Tab. 1). Bei Knorpeldefekten mit subchondraler Beteiligung im Sinne von osteochondralen Defekten stellt die autologe osteochondrale Transplantation eine mögliche Behandlungsoption dar. Hierbei werden Knorpel-Knochenzylinder aus einer minderbelasteten Region des Kniegelenkes entnommen und passgenau in den Knorpeldefekt eingesetzt (Hangody & Füles, 2003, S. 27).

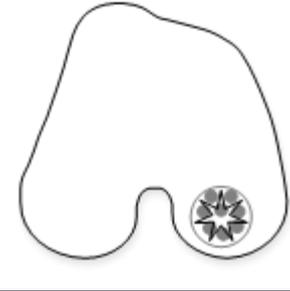
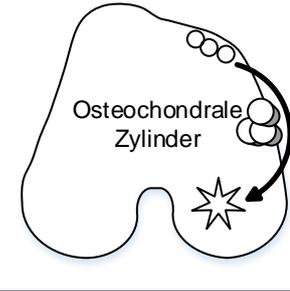
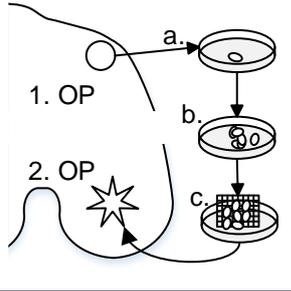
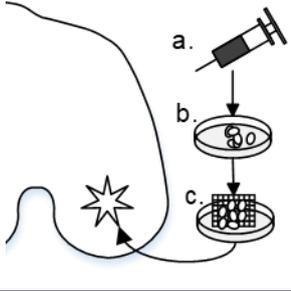
Die regenerative Knorpeltherapie hat durch das *Tissue Engineering* in den letzten Jahren eine rasante Weiterentwicklung durchlaufen. 1994 beschrieben Brittberg et al. (1994, S. 889-91) zusammen mit seiner schwedischen Arbeitsgruppe um Lars Peterson die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) für die klinische Anwendung bei vollschichtigen Knorpeldefekten im Kniegelenk. Die ACT ist ein zweizeitiges Verfahren. Zunächst werden in einem ersten, meist arthroskopischen, Eingriff Knorpelzellen entnommen, welche im Labor angezüchtet, vermehrt und dann wieder unter einen Abdeckungsflappen in den Knorpeldefekt implantiert werden. Mittlerweile hat sich die 3. Generation der ACT im klinischen Alltag etabliert, bei der die Zellen bereits *in vitro* auf einen dreidimensionalen Gewebeträger kultiviert und reimplantiert werden. Die Implantation kann dann offen erfolgen mit entsprechendem Einnähen des dreidimensionalen Gewebeträgers oder mittlerweile auch in arthroskopischer Technik (Ebert et al., 2017, S. 835; Siebold et al., 2018, S. 65-6). Nachteile, wie Hypertrophien des Regenerats und offene Operationstechnik, der früheren Periostlappentechnik (1. Generation) oder mit resorbierbaren (zweidimensionalen) Trägermaterialien wie z.B. Kollagen-Membranen (2. Generation) konnten somit deutlich reduziert werden (Brittberg, 2009, S. 1261-3; Delcogliano et al., 2014, S. 1264; Kon et al., 2012, S. 19; Peterson et al., 2010, S. 1123).

Trotz anfänglicher Skepsis zur Überlegenheit der ACT gegenüber anderer Methoden (Wasiak et al., 2006, S. 13) sind die rekonstruktiven Knorpelersatztherapien nicht aus dem klinischen Alltag wegzudenken, da Mikrofrakturierung und Knorpelknochentransplantationen durch Defektgröße limitiert sind (Vogt et al., 2007, S. 494) (s. Tab. 1).

Auch die Langzeitergebnisse der ACT sind nach 10-20 Jahren vielversprechend. Peterson et al. (2010, S. 1123), Martincic et al. (2014, S. 1281) und Beris et al. (2012, S. 566) konnten zufriedenstellende langanhaltende Ergebnisse nach ACT der ersten Generation nachweisen. Komplikationen traten meist innerhalb der ersten zwei Jahren auf, jedoch gab es keine

Kontrollgruppen. Auch die Ergebnisse der MACT erscheinen im Langzeitverlauf positiv (Basad et al., 2015, S. 3733; Behrens et al., 2006, S. 201; Ebert et al., 2017, S. 68; Siebold et al., 2018, S. 836-7). Mittlerweile sind ebenfalls Beobachtungszeiträume von bis zu 15 Jahren dokumentiert (Gille et al., 2016, S. 311-4; Kreuz et al., 2019, S. 309-11), die auf eine subjektive Besserung und stabile Befunde in der Bildgebung hinweisen.

Ein Schwachpunkt des Chondrozyten-basierten *Tissue Engineerings* ist, dass Chondrozyten in Kultur ihre spezifische Morphologie, sowie biochemische und physiologische Charakteristika verlieren. Die Kultivierung ist zu Beginn bei den meisten matrix-gestützten Verfahren weiterhin notwendig (Marlovits et al., 2006, S. 60). Mit dem Fortschritt des *Tissue Engineerings* sind daher mesenchymale Stammzellen (MSC) als viable Alternative in den Vordergrund gerückt.

Stammzell-rekrutierend	Rekonstruktiv	Rekonstruktiv Tissue Engineering	Rekonstruktiv Tissue Engineering
Mikrofrakturierung	Autologe osteochondrale Transplantation	Autologe Chondrozyten-transplantation	Autologe Stammzell-implantation
			
Debridierung + Mikrofrakturierung	Entnahme an weniger Belasteten Stellen	a. Zellentnahme b. Kultivierung c. Matrixbesiedlung	a. Zellisolierung b. Kultivierung c. Matrixbesiedlung
Faserknorpel	Hyaliner Knorpel	Hyalin-ähnlich	Hyalin-ähnlich
- biomechanisch unterlegen - Degenerierung der Umgebung - kleine Defekte + einzeitig	- Randintegration - abnorme Chondrozyten-organisation - Entnahmestellen - kleine Defekte + einzeitig + schnelle Rehabilitation	- Dedifferenzierung in Kultur - Integration - Entnahmestellen - sehr hohe Kosten + große Defekte - zweizeitig	- unzureichende Differenzierung - Integration - hohe Kosten + große Defekte + einzeitig

Tab. 1: Therapieoptionen für Knorpelschäden

1.3. Stammzellen für den Einsatz in der Knorpelregenerationstherapie

Besonders geeignet sind Stammzellen aus leicht zugänglichen Stellen wie Fettgewebe (ASC) und Knochenmark (BMSC), da dadurch ein operativer Eingriff zur Zellgewinnung vermieden wird. Ein möglicher Vorteil bei der Regeneration großer osteochondraler Defekte haben Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSC), welche neben chondrogenem Potential auch gut erforschtes osteogenes Potential aufweisen (Robey, 2011, S. 426). BMSC integrieren sich im Kaninchenmodell nach 12 Wochen komplett in die subchondrale Platte und sind im Gegensatz zu Chondrozyten besser differenziert (Yan & Yu, 2007, S. 182). Eine Überlegenheit von BMSC gegenüber ASC ist jedoch nicht abschließend bewiesen (Strioga et al., 2012, S. 2729). In der klinischen Anwendung zeigten BMSC bereits vielversprechende Ergebnisse, auch über Beobachtungszeiträume von fast 12 Jahren (Wakitani et al., 2011, S. 149). Zwischen der Verwendung von MSC und autologen Chondrozyten zeigte Nejadnik et al. (2010, S. 1115), Akgun et al. (2015, S. 261) und Buda et al. (2015, S. 898-9) vergleichbare Ergebnisse beider Therapien mit einem Beobachtungszeitraum von bis zu 2 Jahren.

Stammzellen wirken sich auch über ihre parakrine Aktivitäten positiv auf das Mikroklima des geschädigten Knorpels aus. Die sezernierten Proteine bilden das Sekretom. Es besteht aus verschiedenen Proteinen mit immunmodulierenden, antioxidativen und antiapoptischen Eigenschaften. Stammzellen nehmen zudem Einfluss auf die Angiogenese, Zellmotilität und -differenzierung (Caplan & Dennis, 2006, S. 1082; Iyer & Rojas, 2008, S. 578). Auch Zytokine sind Teil der parakrinen Sekretion, welche die Knorpelregeneration und Extrazellulärmatrixproduktion fördern (Liang et al., 2014, S. 1046-51; Park et al., 2009, S. 65-7). De Windt et al. (2017, S. 261) zeigten in einer Phase I/II-Studie inzwischen, dass allogene BMSC, welche zusammen mit autologen Chondrozyten implantiert wurden, nach einem Jahr noch gute Ergebnisse liefern. Für eine vorwiegend parakrine Rolle der MSC spricht, dass keine allogene DNA im Regenerat gefunden wurde. Es bleibt also weiterhin unklar, ob die MSC einen Teil des Regenerats oder nur des Regenerationsprozesses bilden. Der komplexe Weg der Stammzellendifferenzierung hin zu chondrogenem Gewebe ist daher ein Fokus der *in vitro* Forschung. Jedoch verhindern große Unterschiede in der Methodik, der Isolierung und Kultivierung der Stammzellen eine Vergleichbarkeit der Studien. Solange die Grundlagen und Signalwege nicht weiter erforscht sind, ist zudem eine Übertragung der *in vitro* Erkenntnisse auf *in vivo* Studien nur eingeschränkt möglich (Augello & De Bari, 2010, S. 1234; Bornes et al., 2014, S. 446-7; Schmitt et al., 2012, S. 7; Seo & Na, 2011, S. 6). Um die Sicherheit und Unbedenklichkeit einer solchen Stammzelltherapie stringent zu überwachen und der Verbleib der implantierten Zellen *in vivo* verfolgen zu können, ist ein nicht-invasives *in vivo* Monitoring wünschenswert.

1.4. Monitoring der Stammzellen *in vivo*

Aufgrund der niedrigeren Strahlenbelastung und hohen Weichteilauflösung ist MRT-Monitoring der Computertomographie und dem Röntgen vorzuziehen. Es ermöglicht potenziell eine longitudinale Beobachtung zur Retention, Regeneration und Differenzierung der BMSC zu hyalinem Knorpel. Auch eröffnet sich mit einer Markierung der implantierten Zellen die Möglichkeit zukünftig operierte Defekte besser im MRT bewerten zu können. Dies ermöglicht detailliertere Aussagen über die Vorgänge bei der Knorpelregeneration und somit auch gezieltere *in vivo* Studien. Für ein solches Monitoring müssten die Zellen jedoch vom restlichen Gewebe abgrenzbar sein, dafür dient eine Markierung mit Kontrastmittel (KM).

Resovist®, auch Ferucarbotran, ist ein superparamagnetisches Eisenoxid (kurz SPIO - *superparamagnetic iron oxid*). Es hat gegenüber herkömmlichen KM, wie z.B. Gadolinium-Chelat, mehrere Vorteile. Zum einen besitzt es pro Partikel eine größere Signaländerung, welche auch nach der Internalisation konstant bleibt. Zum anderen ist es biokompatibel (Bulte & Kraitchman, 2004, S. 485). Auch kann es lichtmikroskopisch dargestellt werden und somit kann ein histologischer Vergleich mit den MRT-Ergebnissen stattfinden.

Das Ferucarbotran wird durch Inkorporation in den Zellmetabolismus aufgenommen. Bei einer geeigneten Dosierung bleibt eine Beeinträchtigung der Zellviabilität aus (Yang et al., 2011, S. 447-8). Henning et al. (2009, S. 171) zeigten für humane MSC, welche über 4 Stunden mit 100µg Fe/ml Resovist® inkubiert wurden, keine Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials.

In dieser Arbeit wurden Resovist®-markierte implantierte Stammzellen im Kaninchenknorpelmodell nachverfolgt. Ziel war es, die Unbedenklichkeit der Zellmarkierung mit Kontrastmittel auf die *in vivo* Knorpelregeneration zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Grundstein für einen Vergleich zwischen den *in vivo* angefertigten MRT-Untersuchungen zur Stammzellverfolgung und den *ex vivo* Nachweisen gelegt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tiermodell

Nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde der Antrag eines Tierversuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen 55.2.1.43-2532-105-11 von der Regierung Oberbayern genehmigt.

Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen der Rasse *New Zealand White* (NZW) verwendet (Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, Frankreich).

Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen (DIRECTIVE 86/609/EEC; deutsches Tierschutzgesetz; FELASA Richtlinien). Der Tierhaltungsraum war gemäß konventioneller Hygienestandards mit geregelter Temperatur und einem Hell-Dunkel-Lichtprogramm mit Dämmerlichtphase ausgestattet.

Zur kontinuierlichen Beurteilung der Gesundheit der Tiere wurde ein Bewertungsbogen über Infekt- und Stresszeichen für postoperative und wöchentliche Evaluationen entwickelt (s. 7.1). Zudem wurde der Gewichtsverlauf dokumentiert. Bei Bedarf wurde der Tierarzt hinzugezogen. Es erfolgte bei Ankunft und bei jeder Intervention eine tierärztliche Untersuchung und Supervision.

2.1.2. Zellen

Für die Versuche wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark eines 4 Monate alten männlichen NZW Kaninchens isoliert. Die Methode ist bereits von Berninger et al. (2013b, S. 2-3) publiziert.

Nach Entnahme und Eröffnung der Tibia und Femur des Spendertiers, wurde das Knochenmark mit einer 18 G Kanüle und 10 ml DMEM Medium ausgeschwemmt und in Suspension gebracht. Es folgte die Zellfilterung und Zentrifugation bei 500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml DMEM und 1% Penicillin-Streptomycin resuspendiert.

Um die gewünschten mesenchymalen Stammzellen von den restlichen Knochenmarkszellen zu trennen, wurden 5 ml der Zellsuspension mit 5 ml *Biocoll Separating Solution* bei 800 rpm 20 min bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert. Der Überstand mit den gewünschten Zellen wurde abpipettiert und dreimalig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die anschließende Zellkultur wurde mit einer Aussaatdichte von ca. 5×10^6 Zellen/cm² bei 37°C und angefeuchteter Luft mit 5% CO₂ angelegt. Zum Kompletmedium *Advanced DMEM* wurde 10% fetales Kalbsserum und 1% Penicillin-Streptomycin hinzugefügt. Nach 2-3 Tagen wurden nicht-adhärenente Zellen beim Mediumwechsel entfernt. Nach 5-10 Tagen wurde die erste Passage vollzogen. Es folgte bei Passage 2-5 eine Transduktion mit dem fluoreszierenden Protein eGFP (s. 2.2.2.1).

2.1.3. Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®)

Für die *in vivo* Darstellung der implantierten MSC erfolgte die zelluläre Markierung mit dem MRT-Kontrastmittel Ferucarbotran (Handelsname: Resovist®). Resovist® besteht aus supermagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO) mit einem kristallinen nichtstöchiometrischen Fe²⁺- und Fe³⁺- Eisenoxidkern. Um hydrophile Eigenschaften zu erhalten, ist der geladene Kern von Carboxydextran umgeben, somit liegt der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser bei 62 nm (Wang et al., 2001, S. 2323). Die Methodik der Markierung wird in 2.2.2.2 beschrieben.

2.1.4. Medikamente/Antikörper/Primer

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller
Alkoholisches Antiseptikum	Cutasept® F	Bode-Chemie - Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz)
Atropinsulfat	Atropin B. Braun	B. Braun Melsungen AG
Buprenorphin	Buprenovet®	Bayer HealthCare Ag (Leverkusen)
Carprofen	Rimadyl®	Zoetis (Berlin) ehem. Pfizer Tiergesundheit
Dexpanthenol	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer HealthCare Ag (Leverkusen)
Fentanylcitrat	Fentadon®	Albrecht GmbH (Aulendorf)
Ketamin	Ketamin	CP-Pharma (Burgdorf)
Lidocain und Prilocain	Emla®	AstraZeneca (London, UK)
Metamizol	Vetalgin®	Intervet - MSD Tiergesundheit (Unterschleißheim)
Natriumchlorid (0,9%)	Natriumchlorid (0,9%)	AlleMan Pharma GmbH (Rimbach)
Natriumchlorid (0,9%)	Natriumchlorid (0,9%)	B. Braun Melsungen AG
Natriumpentobarbital	Euthadorm®	CP-Pharma (Burgdorf)
Propofol 1%	Narcofol®	CP-Pharma (Burgdorf)
Propofol 2%	Propofol	B. Braun Melsungen AG

Antikörper Immunhistochemie	Hersteller
<i>Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG BA-2000</i>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>GFP (4B10) Mouse mAb</i>	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
CIIC1 – Anti-Kollagen II, Col2a1	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)
ACAN 12/21/1-C-6 – Anti-Aggrecan	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)

Primer	Primer	Annealing Temperatur
	Sense	
	Antisense	
Aggrecan ACAN	5'- CTA CGA CGC CAT CTG CTA CA -3' 5'- TCT TCA GTC CCG TTC TCC AC -3'	62°C
β-Actin	5'- CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3' 5'- TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	58-62°C
Kollagen I <i>Col1a2</i>	5'- CTG CAA GAA CAG CAT TGC AT -3' 5'- GGC CAA CGT CCA CAT AGA AT -3'	62°C
Kollagen X <i>Col10</i>	5'- GCT TAC CCA GCG GTA G -3' 5'- CTC CCT GAA GCC TGA T -3'	58°C
Kollagen II <i>Col2a1</i>	5'- GTC CCT CTG GCA AAG ACG -3' 5'- GCC CTT CTC TCT CTG GCC TA -3'	62°C
COMP	5'- GGA ACC CAG ACC AGC GTA AC -3' 5'- GTC CGC GTT GCT CTT CTG -3'	62°C
Sox9	5'- AAG ATG ACC GAC GAG C -3' 5'- CAG CGT CCA GTC GTA G -3'	60°C
TNF-α	5'- GGC TCA GAA TCA GAC CTC AG -3' 5'- GCT CCA CAT TGC AGA GAA GA -3'	60°C
IL-1β	5'- TAC AAC AAG AGC TTC CGG CA -3' 5'- GGC CAC AGG TAT CTT GTC GT -3'	60°C

2.1.5. Geräte/Software

Gerät	Hersteller
<i>7900HT Fast Real-Time PCR System</i>	Applied Biosystems (Foster City, USA)
<i>Anaesthesia Workstation</i>	Hallowell EMC (Pittsfield, MA, USA)
<i>Digital Vortex Mixer</i>	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>Datex Ohmeda S/5 Compact Monitor</i>	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
Intensiv-Monitor	Seca (Hamburg)
Kryostat CM1950	Leica Biosystems (Nussloch)
Magnetrührer RET basic	IKA® -Werke GmbH (Staufen)
Mikroskop Eclipse 50i	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
<i>Mini-BeadBeater</i>	Biospec Products Inc. (Bartlesville, USA)
Perfusor-ED	B.Braun Melsungen AG
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
Präzisionswaage	Seca (Hamburg)
Präzisionswaage 440-45N	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Präzisionswaage A88	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Puls Oximeter	Covidien (Dublin, Ireland)
Spectrophotometer DU-640	Beckman Coulter GmbH (Brea, USA)
Wärmematte	Horn GmbH (Gottmadingen)
WTW InoLab 720 pH-Messer	Xylem Analytics GmbH (Weilheim)

Software	Hersteller
IBM SPSS® Statistics for Windows	IBM Corporation, Version 26 (Armonk, NY, USA)
Microsoft® Word® 2010/2016 for Windows	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft® Excel® 2010/2016 for Windows	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft® Visio® 2013 for Windows	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft® PowerPoint® 2010/2016 for Windows	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
EndNote®	Thomson Reuters, Version X9 (New York, USA)
AxioVision® LE für Windows	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
SDS 2.4	Thermofischer Scientific Corporation (Waltham, USA)
StepOne™ 2.3	Applied Biosystems (Foster City, USA)
DataAssist™ v.3.01	Thermofischer Scientific Corporation (Waltham, USA)

2.1.6. Verbrauchsmittel/Chemikalien

Verbrauchsmittel	Hersteller
<i>Advanced DMEM</i>	Life Technologies (Bleiswijk, Netherlands)
<i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom GmbH (Berlin)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)	Biochrom GmbH (Berlin)
Einmal Op-Mantel Sentinex® Special	Lohmann&Rauscher (Rengsdorf)
Einmalinjektionskanülen Sterican®	B.Braun Melsungen AG
Einmalspritzen	B.Braun Melsungen AG
Einweghandschuhe Sempercare®	Semperit AG (Wien)
Fetales Kalbsserum (FCS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Fixierpflaster Leukoplast®	BSN Medical (Hamburg)
Kompressen Gazin®	Lohmann&Rauscher (Rengsdorf)
Gefaltete Papierfilter 385mm	Schleicher & Schuell® (Dassel)
Infusionsbesteck	B.Braun Melsungen AG
Infusomat® Leitung	B.Braun Melsungen AG
MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems (Foster City, USA)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Mikrotom Klingen S35	Feather Safety Razor Co., LTD (Osaka, Japan)
Nahtmaterial Monocryl® 4-0	Ethicon (Somerville, NJ, USA)
Nahtmaterial Vicryl® 4-0	Ethicon (Somerville, NJ, USA)
Nitrilhandschuhe Dermatril®	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phosphatgepufferter Salzlösung (Zellkultur)	Biochrom GmbH (Berlin)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Skalpelle (22er, 15er, 11er)	Feather Safety Razor Co., LTD (Osaka, Japan)
sterile Einweghandschuhe Sempermed®	Semperit AG (Wien)
SuperFrost Plus® Objektträger	VWR International (Leuven)
Surgipath Cryo-Gel®	Leica Microsystems (Wetzlar)
TissuCol® Fibrinkleber	Baxter (Unterschleißheim)
Vasofix® Braunülen 22G 25mm	B.Braun Melsungen AG
Zirkonium Perlen (<i>Zirkonia Beads</i>)	Biospec Products Inc. (Bartlesville, USA)

Chemikalien	Hersteller
5% Aluminiumsulfatlösung	Merck KGaA (Darmstadt)
Aceton	Merck KGaA (Darmstadt)
Aqua dest.	Hausintern
Chloroform	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Chondroitinase AC	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Di-Natriumdihydrogenphosphat monohydrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Di-natriumhydrogenphosphat wasserfrei, p.a.	Merck KGaA (Darmstadt)
DL-Dithriothreitol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Echtgrün	Chroma (jetzt Waldeck GmbH) (Münster)
Eisenchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Emsure [®] Essigsäuren 100%	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol absolute	Merck KGaA (Darmstadt)
Eukitt [®]	O.Kindler GmbH (Freiburg)
Hämatoxilin Certistain [®]	Merck KGaA (Darmstadt)
Hyaluronidase	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
ImmPACT [™] NovaRED [™] Peroxidase Substrat	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Iodoacetamide	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Isopropanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumhexacyanoferrat (Gelbes Blutlaugensalz)	Merck KGaA (Darmstadt)
Kernechtrot	Chroma (jetzt Waldeck GmbH) (Münster)
Methanol Rotipuran [®]	C. Roth GmbH (Karlsruhe)
Natrium Chlorid (Emsure [®])	Merck KGaA (Darmstadt)
Natronlauge	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>Normal Horse Serum</i>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
PAP Pen ab601 (0.3% Ligroin, 0.1% Bromopropane)	Abcam [®] (Cambridge, UK)
Primer	Metabion (Martinsried)
<i>QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RNase freies Wasser	Merck KGaA (Darmstadt)
Safranin O	Chroma (jetzt Waldeck GmbH) (Münster)
Salzsäure 1M	Merck KGaA (Darmstadt)
Sucrose	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane [Tris ultrapure]	AppliChem (St.Louis, USA)
TRizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween [®] 20	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Vectastain [®] Elite ABC-Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Xylol	Merck KGaA (Darmstadt)

2.2. Methoden

2.2.1. Studiendesign

Das Studiendesign ist schematisch in chronologischer Reihenfolge in Abb. 2 zu sehen. Diese Arbeit untersucht den Einfluss des Kontrastmittels auf die Defektheilung durch *ex vivo* Histologie sowie molekularbiologischer Analysen mittels RT-PCR. Der *in vivo* MRT-Nachweis von Resovist®-markierten Stammzellen in einem standardisiertem Knorpeldefekt wird separat ausgewertet.

Den Versuchen ging eine vierwöchige Pilotgruppe mit vier Tieren zur MRT-Sequenzoptimierung und Operationsmethodenetablierung voraus.

Insgesamt wurden bei 36 Tieren am linken Knie operativ osteochondrale Defekte gesetzt. Diese wurden mit *in vitro* hergestellten Stammzell-Fibrin-Implantaten gefüllt. Die Regenerate wurden *ex vivo* histologisch und molekularbiologisch analysiert.

Alle eingesetzten Stammzellen (BMSCs, *Bone Marrow-derived Stem Cells*) wurden zunächst mit dem fluoreszierenden Protein (eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein*) transduziert, um eine *ex vivo* Darstellung zu ermöglichen (s. 2.2.2.1).

Die Hälfte der nun eGFP-positiven Zellen (n=18) wurde mit dem MRT-Kontrastmittel Resovist® markiert (s. 2.2.2.2). Diese werden im Folgenden als Resovist®-markiert (R+) bezeichnet; die andere Hälfte als unmarkiert (R-) bezeichnet.

Jeweils 12 Kaninchen, sechs mit R+ Implantaten und sechs mit R- Implantaten, bildeten eine Beobachtungsgruppe. Insgesamt drei solcher Beobachtungsgruppen mit jeweils 12 Tieren, wurden mit verschiedenen *in vivo* Standzeiten für 4 Wochen (4W), 12 Wochen (12W) und 24 Wochen (24W) nachverfolgt. Zu den genannten Zeitpunkten erfolgte die Euthanasierung der jeweiligen Tiere und die *ex vivo* Untersuchungen. Zwischen den R+ und R-Implantaten der jeweiligen Gruppen (4W, 12W, 24W) wurden makroskopische, mikroskopische und molekularbiologische Vergleiche des Knorpelregenerats durchgeführt. Hierfür wurde nach Explantation des Knies (s. 2.2.3.4) an allen (n=36) eine makroskopische Beurteilung der Defektstelle vorgenommen, um das entstandene Regeneratgewebe anhand der Kriterien des *International Cartilage Repair Society (ICRS) 1 Score* zu evaluieren (s. 2.2.4).

Es folgten nach Aufbereitung des Explantats die Färbungen mit Berliner Blau, Safranin O sowie eGFP (n=36), Kollagen II (n=36) und Aggrecan (n=36). Hierdurch konnte die mikroskopische ICRS 2 Bewertung ermittelt werden (s. 2.2.6).

Für die molekularbiologischen Analysen wurde ein Drittel des proximalen Defekts entnommen und zunächst kryokonserviert. Anhand dieser wurde das Genexpressionsmuster des entstandenen Regeneratgewebes analysiert. Hierfür wurde die Expression von Aggrecan, Kollagen Typ II und *Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)* untersucht, welche allesamt Bestandteile der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels sind. Zudem

erfolgte die Analyse der Genexpression von Sox9, das bei der Knorpelerhaltung bzw. Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielt. Auch Kollagen Typ I und Typ X wurden analysiert; diese hingegen sind vor allem in ossifizierendem Knorpel- oder Knochengewebe hoch exprimiert und als Dedifferenzierungsmarker zu werten.

Weiterhin wurde die Expression von Entzündungsmarkern IL-1 β und TNF- α untersucht.

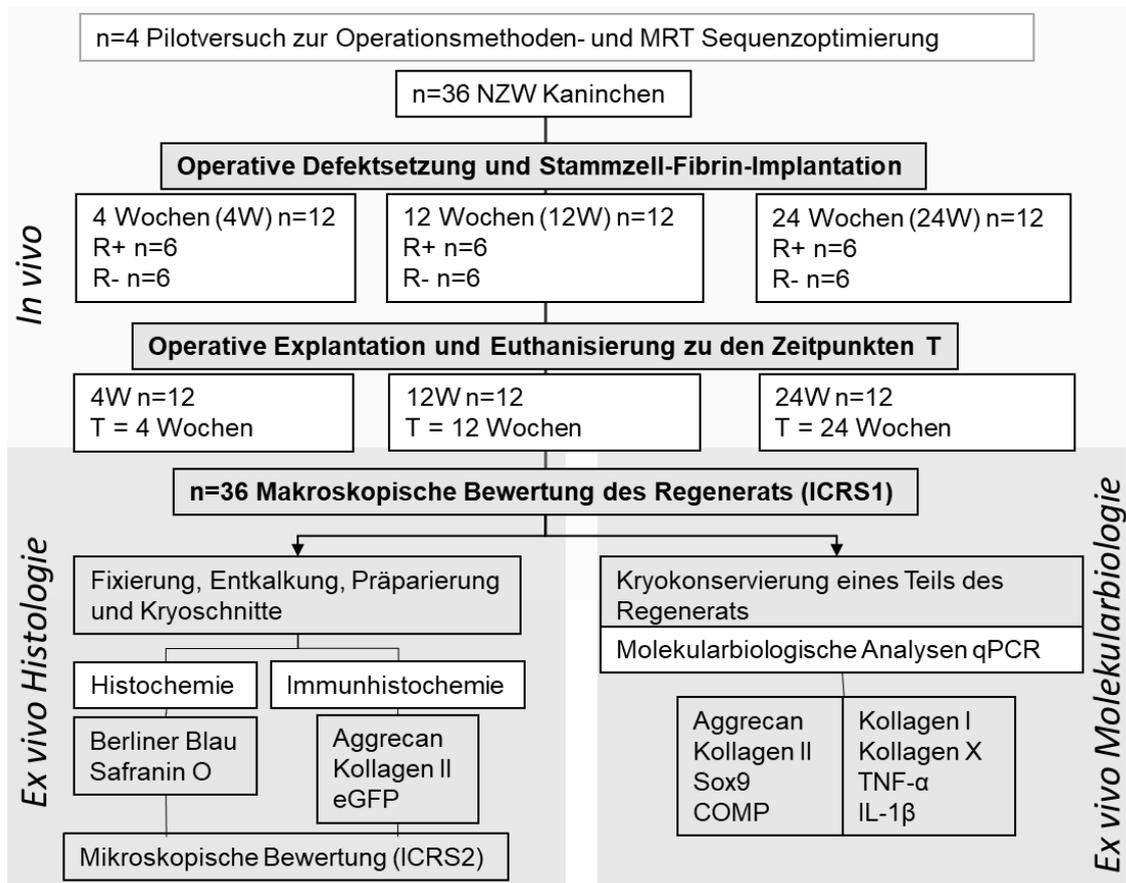


Abb. 2: Studiendesign

n= Anzahl, T= Zeitpunkte, W = Wochen, R+ = Resovist[®]-markiert, R- = unmarkiert (Resovist[®] negativ)

2.2.2. Herstellung der Stammzell-Fibrin-Implantate

Sämtliche Vorversuche zur Etablierung der Zellmarkierung und Zellkulturarbeiten waren nicht Inhalt der hier vorliegenden Arbeit und sind durch Berninger et al. (2019, S. 3-8 ESM) beschrieben. Die Stammzell-Fibrin-Implantate wurden dann durch Dr. Berninger hergestellt (Berninger et al., 2013b, S. 3) und für die vorliegende Arbeit zum Zeitpunkt der Implantation freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.2.1. eGFP Transduktion

Um einen immunhistochemischen Nachweis aller implantierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu gewährleisten und eine nachweisbare Kontrollgruppe für die Resovist[®]-markierten MSC zu schaffen, wurden alle MSC mit *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) markiert (Berninger et al., 2019, S. 4 ESM). Die eGFP-positiven MSC wurden aliquotiert und bei -135°C aufbewahrt. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen aufgetaut und noch einmal expandiert, um die Resovist[®]-Markierung durchführen zu können.

2.2.2.2. Resovist[®]-Markierung

Mit der Kontrastmittelmarkierung sind die Zellen im MRT sichtbar und dienen somit der *in vivo* Verfolgung der Zellen und dem *ex vivo* Nachweis. Es galt festzustellen, ob die Markierung Einfluss auf das Differenzierungspotential der implantierten MSC und damit auf das Regenerationspotential hatte. Anhand der Methoden von Henning et al. (2009, S. 167) wurden eGFP-positive MSC wenige Tage vor der Implantation markiert.

2.2.2.3. Stammzell-Fibrin-Implantate

Die Implantate wurden gemäß den Vorarbeiten von Berninger et al. (2013b, S. 3) hergestellt und für die Implantation in die Defekte der Kaninchenknie zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Implantate war kein Teil der vorliegenden Arbeit. Kurz zusammengefasst wurde hierfür auf einer sterilen Plastikplatte mit vorgebohrten Löchern der spätere Defekt mit einer Tiefe von 3 mm und einem Durchmesser von 3,6 mm repliziert. Als Zellkomponente wurden eGFP-transduzierte und zur Hälfte zusätzlich Resovist[®]-markierte MSC verwendet (s. 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Zusammen mit Thrombin und Fibrinogen entstand im Zuge des Gerinnungsprozesses ein festes Implantat. Pro Tier wurden zwei solcher Implantate hergestellt, um den nachher achtförmigen Defekt zu füllen.

2.2.3. Operative Eingriffe

Am Tag der Operation wurden die Tiere gewogen, um eine adäquate Medikamentendosierung zu ermöglichen, und im Anschluss anästhesiert, analgesiert und intubiert. Eine Wärmematte auf dem Operationstisch stellte eine angemessene Körpertemperatur des Tieres sicher. Die Überwachung der Vitalwerte wurde durch

Kapnograph und Pulsoximeter gewährleistet. Bei der Operation wurden zwei Defekte mit 3 mm Tiefe und 3,6 mm Durchmesser gesetzt und im Anschluss mit den Implantaten gefüllt. Nach der Operation erfolgte eine intensive Nachsorge.

2.2.3.1. Anästhesieprotokoll

Ein Tierarzt untersuchte die Kaninchen vor den Eingriffen, um Erkrankungen oder Verletzungen auszuschließen. Das Auftragen einer örtlich betäubenden Creme (Emla®) erleichterte das Legen der venösen Zugänge. Es folgte die Induktion der Narkose mit 1%igem Propofol (10 mg/kg KG). Das Operationsgebiet wurde rasiert. Nun wurde das Tier mit einem Endotrachealtubus durch den Tierarzt intubiert; dessen korrekter Sitz wurde mit dem Kapnographen kontrolliert. Die Beatmung mit 100%igem Sauerstoff erfolgte volumengesteuert entsprechend einem Atemzugvolumen von 6-8 ml/kg KG mit 8-12 cmH₂O Atemdruck und einer Frequenz von ca. 25 /min. Über Kapnograph und Pulsoximeter mit Pulsrate wurden ständig die Narkosetiefe und die Vitalwerte des Kaninchens überwacht und der Sauerstoff- und Anästhetikabedarf angepasst.

Die Narkose wurde über einen 2%igen Propofol Perfusor mit 1.5 mg/ kg KG/ min aufrechterhalten. Fentanyl-Boli (0,05 mg/kg KG i.v.) und zusätzliches Metamizol (30 mg/kg KG i.v.) stellten die intraoperative Analgesie sicher. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde isotone Kochsalzlösung (10 ml/kg KG i.v.) infundiert. Die Narkoseausleitung begann mit dem Abschalten des Propofolperfusors und Reduzierung des Atemzugvolumens bis zur Spontanatmung. Eine subkutane Gabe von Buprenorphin (0,025 mg/kg KG) deckte die postoperative Analgesie ab, diese Gabe wurde alle zwölf Stunden in der Nachsorge (s. 2.2.3.3) fortgesetzt und durch Carprofen (5 mg/kg KG) ergänzt.

2.2.3.2. OP-Methode der Implantation

Das zu operierende Knie wurde gründlich mit Cutasept® F desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Ein steriles Schlitzklebetuch sicherte eine fellfreie Wunde. Die Lage der Patella wurde palpirt. Nun folgte der etwa 2 cm lange Hautschnitt mit einem 22er Skalpell und die Präparierung bis auf die Gelenkkapsel. Mit einem 15er Skalpell wurde die Eröffnung des Kniegelenks vorgenommen, ohne darunterliegende Strukturen zu verletzen. Nun wurde vorsichtig und nach Fentanyl-Bolus Gabe (0,05 mg/kg KG i.v.) die Patella nach lateral luxiert, um die Trochlea femoris freizulegen.

Anschließend wurden mit einem Keramikbohrer zwei 3,6 mm breite und 3 mm tiefe Löcher in einer Achter-Konfiguration gebohrt, welche die zu füllenden Defekte bildeten (s. Abb. 3a und b). Der Keramikbohrer wurde verwendet, um eine mögliche Kontamination der späteren Berliner Blau Färbung durch Metallabrieb zu verhindern.

In schneller Folge wurde nun der Defekt mit Fibrinkleber TissuCol® und dem entsprechenden Stammzell-Implantat gefüllt. Um eine optimale Füllung und Wiederherstellung einer

homogenen Gelenkfläche zu garantieren, wurde die Patella repositioniert und das Knie mehrmals passiv durchbewegt. Nach erneuter lateralen Patellaluxation wurde geprüft, ob die Implantate den Defekt komplett füllten und nicht in das Gelenk hinausragten oder luxiert waren (s. Abb. 3c). Nun folgte die erneute Reposition der Patella, dann der Kapsel- und Gleitschichtverschluss mit einer 4-0 Vicryl® Naht. Die Hautnaht erfolgte fortlaufend intrakutan mit resorbierbarem Faden (4-0 Monocryl®), um Fadenknoten auf der Haut und somit mögliche Irritationsquellen für die Tiere zu verhindern und eine Nahtmaterialentfernung überflüssig zu machen. Anschließend wurde das Operationsgebiet nochmals desinfiziert. Die Narkoseausleitung erfolgte gemäß dem Anästhesieprotokoll.

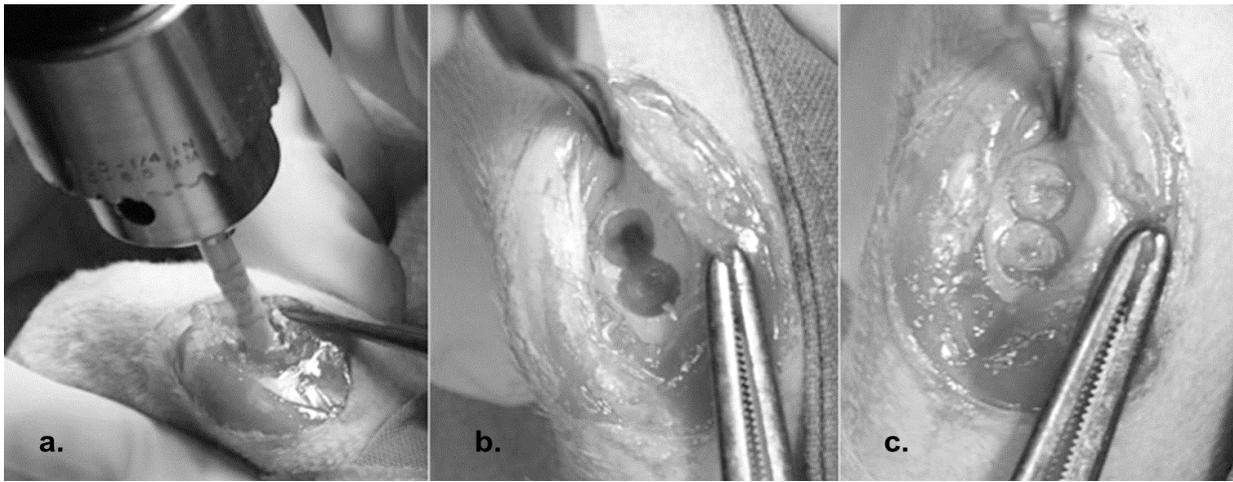


Abb. 3: Operative Setzung des Defekts

- a. Keramikbohrer
- b. Achtförmige Konfiguration der Knorpeldefekte
- c. Mit Implantaten gefüllter Defekt

2.2.3.3. Nachsorge

Die Kaninchen wurden während den ersten drei postoperativen Tagen intensiv überwacht, um mögliche Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Alle 12 Stunden wurde der Bewertungsbogen „Therapiemonitoring“ (s. 7.1) zu Infekt- oder Stresszeichen ausgefüllt und die Wunde inspiziert. Zur Analgesie wurde Buprenorphin (0,025 mg/kg KG s.c) alle 12 Stunden appliziert und alle 24 Stunden zusätzlich Carprofen (5 mg/kg KG s.c.). Nach 3 Tagen erfolgte die Gesundheitsbewertung der Kaninchen (s. 7.1) wöchentlich, um bei Auffälligkeiten sofortige tierärztliche Untersuchung veranlassen zu können.

2.2.3.4. OP-Methode der Explantation

Für die MRTs wurden die Kaninchen mit Ketanest i.m. durch den Tierarzt betäubt. Nach Vollendung des letzten MRTs (s. 2.2.1 Studiendesign) wurde eine Überdosis Natrium-Pentobarbital (100 mg/kg KG) verabreicht und mit einem Pulsoximeter und einem Stethoskop der Exitus gesichert.

Direkt im Anschluss erfolgte die Gewebeentnahme für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels PCR. Hierfür wurde das Gelenk wie bei der Implantation medial über einen Hautschnitt freigelegt, eröffnet und die Patella nach lateral luxiert (s. Abb. 4a). Ein Drittel des proximalen Teiles des Defekts wurde mit einem Skalpell entnommen (s. Abb. 4b) und direkt in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, um direkt im Anschluss bei -20°C gelagert zu werden.

Nun folgte nach der Patellareposition die Extraktion des Kniegelenks. Zuerst wurde die Haut entfernt und die Weichteile und Muskeln durchtrennt. Dann konnte das Femur 1,5 cm oberhalb der Defekte und die Tibia im proximalen Drittel abgetrennt werden (s. Abb. 4c).

Ein kontralaterales nicht-operiertes Knie wurde ebenfalls als Kontrolle entnommen (aus der 24-Wochen-Gruppe).

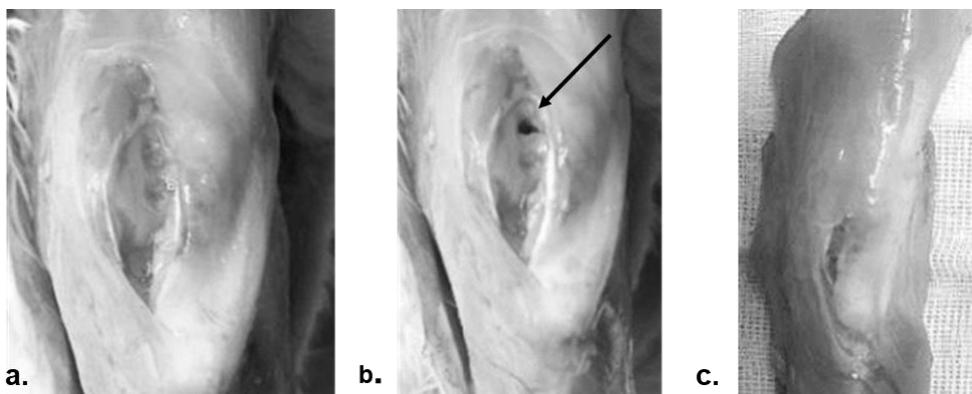


Abb. 4: Aufsicht auf ein eröffnetes Kniegelenk zum Zeitpunkt der Explantation

- a. Knie vor der Entnahme der PCR Probe
- b. Nach der Entnahme der PCR Probe (Entnahmestelle = Pfeil)
- c. Nach vollendeter Explantation

2.2.4. Makroskopische Bewertung des Defekts bei Explantation – ICRS 1

Die makroskopische Bewertung des Knorpelregenerats wurde direkt bei Explantation durchgeführt. Anhand der Kriterien der *International Cartilage Repair Society* (ICRS) wurde eine Punktzahl vergeben, die Hinweise auf die Qualität des Regenerats gibt (s. Abb. 5). Hierbei wurde der Grad der Defektheilung, Integration mit der Grenzzone sowie die makroskopische Erscheinung des Regeneratknorpels bewertet. Zur Auswertung wurden die erzielten Punkte herangezogen (jeweils 0 bis maximal 4 Punkte möglich), je höher die Punktzahl desto positiver war die Knorpelqualität des Regenerats zu bewerten. Eine Gesamtpunktzahl des Regenerats von 12 entsprach einem makroskopisch gesunden Gelenkknorpel. Wurden ≤ 7 Punkte erzielt, so galt der Knorpel als abnormal (s. Abb. 5). Die Präparate wurden aufgrund der erzielten Gesamtbeurteilung eingeordnet in die Kategorien

„stark abnormal“ (0), „abnormal“ (1), „fast normal“ (2) und „normal“ (3) und anhand dieser ausgewertet.

ICRS Makroskopische Beurteilung der Knorpelheilung

Knorpel Regeneration/Heilung	ICRS 1 Punkte
Grad der Defektheilung	
Gleiches Niveau mit umgebendem Knorpel	4
75% der Defekttiefe	3
50% der Defekttiefe	2
25% der Defekttiefe	1
0% der Defekttiefe	0
Integration mit der Grenzzone	
Komplette Integration mit dem umliegenden Knorpel	4
Trennungslinie <1 mm	3
¾ des Implantats integriert, ¼ mit sichtbarer Trennungslinie 1 mm	2
½ des Implantats integriert, ½ mit sichtbarer Trennungslinie 1 mm	1
Kein Kontakt oder bis zu ½ des Implantats integriert	0
Makroskopische Erscheinung	
Intakte glatte Oberfläche	4
Fibrilläre Oberfläche	3
Kleine, verteilte Fissuren oder Risse	2
Viele kleine oder wenige große Risse	1
Totale Degeneration der Implantatzone	0
Gesamtbeurteilung/ Kategorie	
3 = normal	12
2 = fast normal	11-8
1 = abnormal	7-4
0 = stark abnormal	3-0

Abb. 5: Makroskopische Bewertungskriterien der Knorpelregeneration nach ICRS 1

Übersetzt und angelehnt an den ICRS Knorpelverletzungs-Evaluationsbogen publiziert von Brittberg et al. (2000, S. 16)

2.2.5. Histologische Auswertung

Nach der Entnahme wurde das Gewebe fixiert und entkalkt. Es folgte die Präparierung und Anfertigung von Kryoschnitten des distalen Femurs. Die Auswertung erfolgte anhand von histochemischen und immunhistochemischen Färbungen. An den Schnitten wurde des Weiteren eine mikroskopische Bewertung des Regenerats anhand der Kriterien der *International Cartilage Repair Society* (ICRS) 2 durchgeführt (s. 2.2.6) – ähnlich der makroskopischen Bewertung anhand des ICRS 1.

2.2.5.1. Verarbeitung der Präparate

2.2.5.1.1. Fixierung und Entkalkung

Um die enzymatische Autolyse zu unterbinden und das Gewebe stabil im Explantationszustand zu behalten, wurde das entnommene Gewebe chemisch fixiert. Dies erfolgte in 70%igem Methanol bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Präparate bei 4°C aufbewahrt.

Um das Präparat schneiden zu können, mussten die Knochen des Kniegelenks entkalkt werden. Hierfür wurde die Entkalkung mit Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA) ausgewählt. Die Präparate wurden bei RT in EDTA gegeben und auf ein Schüttelbrett gestellt, um eine vollkommene Immersion des Gewebes zu gewährleisten. Das 20%ige EDTA wurde aus 200 g Na-EDTA in 800 ml Aqua dest. hergestellt, welches unter ständigem Rühren erhitzt wurde. Schließlich wurde mit ca. 50 ml NaOH (40%ig) und Aqua dest. der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten röntgenologische Kontrollen der noch vorhandenen Verkalkung in den Explantaten gemacht, welche mithilfe eines Referenzknochens beurteilt wurden. Das EDTA wurde wöchentlich gewechselt. Sobald die Entmineralisierung vollständig und keine Verkalkung mehr im Röntgenbild zu sehen waren, wurden die Präparate bei 4°C in 70%igem Methanol aufbewahrt.

2.2.5.1.2. Präparierung

Um histologische Schnitte anfertigen zu können, wurden die Femurkondylen aus dem fixierten und entkalkten Knie herausgelöst. Zur Präparierung wurde der bei der Explantation gesetzte mediale Schnitt erweitert, um die Gelenkhöhle zugänglicher zu machen (s. Abb. 6a). Die Kapsel wurde medial von der Gelenkfläche über die Kondylen abpräpariert und hierbei das mediale Seitenband durchtrennt. Die Kondyle wurde einige Millimeter über dem proximalen Defekt abgetrennt (s. Abb. 6b).

Die dorsale Fläche der Kondyle wurde freipräpariert, meist war hierfür eine weitere Öffnung der Kapsel unterhalb der Kondylen nötig. Es folgte die Lösung der Bänder und der Kapsel auf der lateralen Seite, dann der Kreuzbänder und Menisken.

Etwaige Sehnenreste und überschüssiges Kapselgewebe wurden von der herausgelösten Kondyle entfernt (s. Abb. 6c).

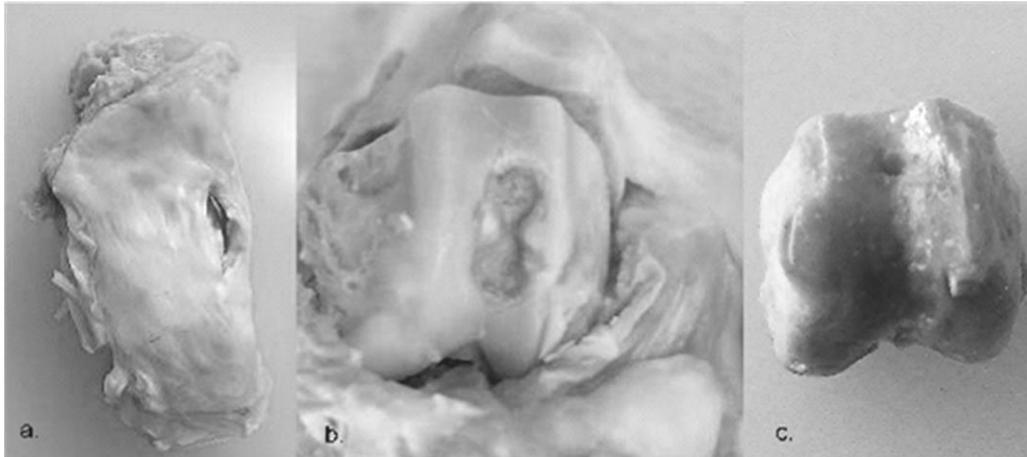


Abb. 6: Präparation

- a. Fixiertes Präparat (Kniegelenk mitsamt distalem Femur und proximaler Tibia)
- b. Komplett eröffnetes Gelenk (zur Veranschaulichung) mit durchtrenntem Femur
- c. Ausgelöstes Präparat (distales Femur)

2.2.5.1.3. Kryoschnitte

Für die histologische Auswertung wurden Kryoschnitte erstellt. Zuerst wurden die Präparate bei 4°C in 30%iger Sucrose-PBS Lösung getaucht, bis sie vollständig perfundiert und abgesunken waren, um die inhomogenen Gewebe zu erweichen und Gefrierartefakte vorzubeugen.

Den Präparaten wurde 3 mm der medialen Kondyle abgetrennt, um näher am Defekt schneiden zu können. Das gestutzte Präparat wurde dann in Gefriermedium (Cryo-Gel®) eingedeckt und auf einen Träger aufgefroren. Im Kryostat CM1950 von Leica Biosystems wurde das Präparat auf durchschnittlich -25°C gekühlt. Die Schneidekammertemperatur lag bei durchschnittlich -20°C. Durch diese Temperaturdifferenz war es möglich den Knochen, der in dieser Probe sowohl kortikale als auch trabekuläre Anteile aufweist, homogen zu schneiden. Als Schnittstärke bewährte sich 15 µm und ein Schneidewinkel von 2,5°. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Plus® Objektträger aufgezogen und beschriftet und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2. Histochemie

Bei den histochemischen Färbungen handelt es sich um klassische Färbungen mit Farbstoffen, welche bestimmte Merkmale des Präparats anfärben – z.B. die Eisenionen des Ferucarbotrans.

2.2.5.2.1. Berliner Blau

Berliner Blau weist das eisenhaltige Kontrastmittel Resovist® über eine Blaufärbung Fe³⁺-Ionen nach. Im Rahmen der gesamten Analysen wurde streng darauf geachtet nicht mit

metallischen Gegenständen zu arbeiten beispielsweise beim Küvettenwechsel, da es sonst zur Freisetzung von Eisenionen und somit einer Verfälschung der Schnitthanfärbung kommen könnte. Auch wurde bei der Operation ein Keramikbohrer eingesetzt, um Metallabrieb bei der Defektsetzung zu verhindern. Vor der Färbung wurde die Berliner Blau Lösung frisch aus 2 g Kaliumhexacyanferrat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 100 ml Aqua dest. und 100 ml 1%ige Salzsäure angesetzt. Zur Gegenfärbung wurde Kernechtrot verwendet. Die Lösung aus 0,1 g Kernechtrot (Chroma, Münster) mit 100 ml heißer 5%iger wässriger Aluminiumsulfatlösung färbte Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa. Nach dem Erkalten wurde das Kernechtrot filtriert und direkt vor der Färbung ein Tropfen Eisessig hinzugegeben.

Die Gefrierschnitte trockneten bei Raumtemperatur (RT) an und wurden anschließend zweimal in Aqua dest. gewaschen. Dann wurden die Schnitte 30 min in die Berliner Blau Lösung (s.o.) getaucht. Daraufhin wurden sie zweimalig in Aqua dest. gewaschen und eine Minute lang mit Kernechtrotlösung gegengefärbt. Nach weiteren vier Spülungen in Aqua dest. wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (s. 7.2) und schließlich in Xylol fixiert und mit Kunstharz (Eukitt®) eingedeckt.

2.2.5.2.2. Safranin O

Die Safranin O Färbung ermöglicht eine Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts der Knorpelmatrix. Das metachromatische Safranin O bindet die Polyanione der Mucopolysaccharide (Glykosaminoglykane, GAG) des Gelenkknorpels und färbt diese orthochromatisch rot. Die 0,5%ige Safranin O Lösung wurde bei 36°C hergestellt, dafür wurde 0,5 g Safranin O (Chroma GmbH) in 100 ml Aqua dest. gelöst und anschließend filtriert.

Echtgrün kontrastiert die GAG-Rotfärbung mit einer grünen Kollagenfärbung. Die 0,02%ig Lösung wurde bei RT aus 0,02 g Echtgrün *for colouring food* (FCF, Chroma GmbH) in 100 ml Aqua dest. hergestellt und ebenfalls anschließend filtriert.

Weigert's Eisenhämatoxilin färbt die Zellkerne dunkelblau. Es besteht aus zwei Lösungen, A und B. Für Lösung A wurde 10 g Hämatoxilin Certistain® (Merck GmbH) in 1000 ml 100%igem Ethanol gelöst. Lösung B bestand aus 12 g Eisenchlorid mit 990 ml Aqua dest. und 10 ml HCL (25%ig). Lösung A und B wurden für die Färbung im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt und filtriert.

Die Gefrierschnitte trockneten bei RT an und wurden anschließend zweimal in Aqua dest. gewaschen. Nun folgten 3 min in Weigert's Eisenhämatoxilin Lösung (s.o.), dann die Waschung in Aqua dest.. Die Schnitte wurden in Ethanol (100%ig) mit Salzsäure (1%ig) getaucht und anschließend, um die Reaktion zu stoppen, 10 min in Leitungswasser gewaschen. Es folgten ein Einwirken von 15 min in Echtgrün 0,02%ig, Waschen in Aqua dest. sowie 5 min in 1%ger Essigsäure und dann 3 min in Safranin O Lösung (0,5%ig).

Nach weiteren Spülungen in Aqua dest. wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (s. 7.2) entwässert und schließlich in Xylol fixiert und mit Eukitt® eingedeckt.

2.2.5.3. Immunhistochemie

Immunhistologische Färbungen dienen dem Nachweis von Antigenen auf oder in Zellen, die im Gewebeverband der Schnitte vorliegen. Je nach benutztem Antikörper können beispielsweise verschiedene Proteine und damit spezifische Zellmerkmale sichtbar gemacht werden. Dies beruht auf einer Antigen-Antikörper-Komplexbildung. Die Schritte sind in Abb.7 dargestellt.

Um eine Bindung an endogene Immunglobuline zu verhindern, die im Gewebe vorliegen können, werden die endogenen Immunglobuline durch ein Normalserum besetzt bzw. blockiert bevor die Antikörper aufgetragen werden. Dabei wird zuerst ein Primärantikörper aufgebracht, welcher an das spezifische Epitop des Ziel-Antigens bindet. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper aufgebracht, welcher den Primären bindet. Es kann aufgrund der Blockierung davon ausgegangen werden, dass der Sekundärantikörper nur die Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper kann direkt markiert sein beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff. In dieser Arbeit wurde zur Detektion ein Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex ("Vectastain® Elite ABC-Kit") in Kombination mit ImmPACT™ NovaRED™ Peroxidase Substrat verwendet

Hierfür werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, an welche Avidin (Vectastain® Lösung A) hochaffin nicht-kovalent bindet. Avidin hat insgesamt vier Biotin-Bindungsstellen und bindet daher auch die im zweiten Schritt zugegebenen biotinylierten Peroxidasen (Vectastain® Lösung B) (Vector Laboratories Inc., 2016, S. 1). Diese Peroxidasen aktivieren enzymatisch das ImmPACT™ NovaRED™ Peroxidase Substrat und es kommt zu einer Rotfärbung am Zielepitop. Eine Blockierung der endogenen Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid (30%ig) in Methanol (100%ig) ist zur Minimierung der Hintergrundfärbung daher zwingend nötig.

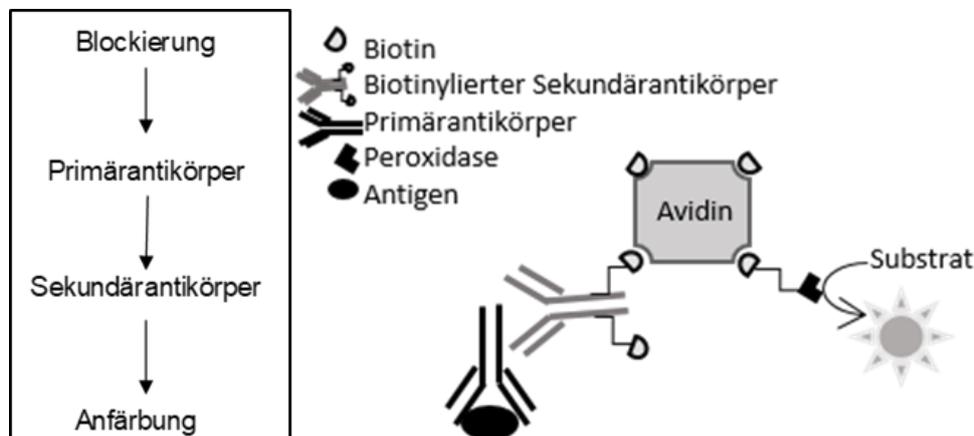


Abb. 7: Schema der Immunhistochemische Färbung

2.2.5.3.1. eGFP - enhanced green fluorescent protein

Der *GFP (4B10) Mouse* monoklonaler Antikörper bindet eGFP, das von den MSC nach Infektion mit dem lentiviralen Vektor produziert wurde. Das eGFP wurde rot angefärbt, die Zellkerne durch das Hämatoxylin blau.

1. Die zu färbenden Schnitte und ihre Kontrollen wurden sorgfältig ausgewählt, beschriftet und mit einem PAP-Pen® eingekreist.

Nach dem Antrocknen wurden die Schnitte für 5 min in PBS/Tween® 20 rehydriert.

2. **Blockierung der endogenen Peroxidasen** durch 30 min Inkubation in 100 ml Methanol (100%ig) mit 1 ml Wasserstoffperoxid (30%ig).

Es wurde dreimal je 5 min in PBS/Tween® 20 gewaschen

3. **Blockierung der endogenen Immunglobuline** durch 60 min Inkubation mit *Horse Serum* (Verdünnung 1:20 in PBS). Anschließendes Abklopfen des Serums.

4. **Markierung des Antigens** zuerst mit dem Primärantikörper *GFP (4B10) Mouse mAB* (Verdünnung 1:50) über eine Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht.

Anschließend wurde dreimal 5 min in PBS/Tween® 20 gewaschen.

5. Der Sekundärantikörper ein biotinylierter *Horse Anti-Mouse* Antikörper (Vector BA-2000) (Verdünnung 1:200 in PBS) wurde nun für 30 min aufgetragen.

6. Es wurde wieder dreimal 5 min in PBS/Tween® 20 gewaschen. Nun wurde die 30 min vorher vorbereitete Vectastain® ABC-Reagenz (1 ml PBS/Tween® 20 mit 20 µl Lösung A und 20 µl Lösung B) aufgetragen und 30 min inkubiert.

Danach wurde erneut mit PBS/Tween® 20 dreimal gewaschen.

7. **Anfärbung des Antigens:** Zur Detektion wurde mit ImmPACT™ NovaRED™ 4 min in Dunkelheit inkubiert. Die Arbeitslösung enthielt 2,5 ml Verdünnungsmittel mit 40 µl Reagenz 1, 25 µl Reagenz 2, 25 µl Reagenz 3 und 40 µl Reagenz 4.

8. **Zellkernfärbung** durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin 0,1 g in 100 ml Ethanol (96%ig).

9. Dann Bläuen in Leitungswasser (200 ml) mit Natronlauge (1 ml).

10. **Fixierung der Schnitte** in der aufsteigenden Alkoholreihe (s. 7.2) und zweimalig 10 min Entwässerung in Xylol. Anschließend wurde mit Eukitt® eingedeckt.

2.2.5.3.2. Kollagen II

Kollagen II ist das strukturgebende Protein des Gelenkknorpels, welches entscheidend für die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels ist. Es wurde über die Antikörper rötlich gefärbt, die Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung blau gefärbt.

Die Färbung erfolgte ähnlich dem GFP-Protokoll (s. 2.2.5.3.1). Schritte 1.- 4. waren gleich. Nun folgte ein Zwischenschritt mit einer Hyaluronidase (1,5 U/ml für 30 min bei 37°C), um die Kollagen II-Antigene zu demaskieren. Danach schloss sich ein dreistufiger Waschzyklus mit PBS/Tween® 20 und die Blockierung mit *Horse Serum* (Verdünnung 1:20, 60 min RT) an.

Dann wurde der Primärantikörper CIIC1 für 30 min bei RT aufgetragen (Verdünnung 1:6). Die weitere Färbung erfolgte gemäß des GFP--Protokolls (s. 2.2.5.3.1 Schritte 7.-10.).

2.2.5.3.3. Aggrecan

Aggrecan ist ein Proteoglykan, welches maßgeblich für die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels verantwortlich ist. Aggrecan wurde über die Antikörper rötlich gefärbt, die Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung blau gefärbt.

Die Färbung erfolgte ähnlich dem GFP-Protokoll (s. 2.2.5.3.1) und dem Kollagen II Protokoll. Schritte 1.- 4. waren gleich. Es folgte, wie bei Kollagen II, ein Zwischenschritt zur Demaskierung der Epitope mit dem Enzym Chondroitinase AC (0,25 U/ml für 30 min bei 37°C). Analog der anderen Protokolle folgte ein dreistufiger Waschzyklus mit PBS/Tween® 20 und die Blockierung mit *Horse Serum* (Verdünnung 1:20, 60 min RT). Danach wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper 1C6 Aggrecan (Verdünnung 1:5) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die weitere Färbung erfolgte gemäß dem GFP-Protokoll (s. 2.2.5.3.1 Schritte 7.-10.)

2.2.6. Mikroskopische Bewertung des Defekts in den Gewebeschnitten – ICRS 2

Die mikroskopische Bewertung umfasste für jedes Präparat Schnitte in Berliner Blau, Safranin O Färbung sowie den immunhistochemischen Färbungen Kollagen II und Aggrecan. Anhand eines von Mainil-Varlet et al. (2010, S. 882-5) entwickeltem Bewertungsschema, basierend auf der visuellen Analogskala, wurden insgesamt 14 Parameter bewertet (s. Abb. 8). Zuerst wurde die Gewebemorphologie (1) auf einer Skala von fibrinös bis hyalin bewertet. Bei der Matrixfärbung (2) wurde die Intensität sowie Durchdringungstiefe der Safranin O Färbung bewertet. Eine tief im Defekt vorliegende, starke Anfärbung zeugte von hohem Proteoglykangehalt und somit optimaler Belastbarkeit des Knorpels. Anhand der Zellmorphologie (3) wurde zwischen Faserknorpel und hyalinem Knorpel unterschieden. Zellansammlungen (4) von über drei Chondrozyten, sogenannte Cluster, wurden negativ bewertet, da sie unter anderem in osteoarthritischem Knorpel vorkommen (Mainil-Varlet et al., 2010, S. 884). Die Bewertung der Oberflächenarchitektur (5) reichte von delaminiert zu glatt. Bei der basalen Integration (6) wurde die komplette Länge des Defekts bewertet. War eine einzelne Verknöcherungsgrenze (7) zwischen radialem und kalzifizierendem Knorpel erkennbar, wurde volle Punktzahl vergeben. Es folgten die Bewertung auf das Vorhandensein subchondraler Knochenanomalitäten und Knochenmarksfibrose (8), der Fibrose des Regenerationsgewebe (9) sowie der Entzündungszeichen (10) und der Ossifizierung innerhalb des Knorpelregenerats (11), welche alle negativ im Hinblick auf die Regeneration zu bewerten sind. Abschließend erfolgte anhand der erhobenen Parameter sowie Betrachtung aller Färbungen eine Bewertung des oberen Regeneratdrittels, der

unteren zwei Drittel sowie einer hieraus resultierenden Gesamtbewertung (12-14). Bei der oberflächlichen Bewertung (12) sollten elongierte Chondrozyten in einer organisierten Kollagenmatrix liegen sowie eine glatte Oberfläche zeigen. In der mittleren und tiefen Zone (13) hingegen sollten Proteoglykane vorliegen, keine sichtbaren Kollagenfibrillen sowie eine intakte basale Integration und Verknöcherungszone aufweisen. Hiernach folgte die übergreifende Gesamtbeurteilung (14).

ICRS II Bewertung

Histologische Unterkategorie	Bewertung
1. Gewebemorphologie (polarisierendes Licht)	0%: Kollagenfibrillen komplette Defekttiefe 100%: Normaler Knorpel (Birefringenz)
2. Matrixfärbung	0%: Keine Färbung 100%: Volle Metachromasie
3. Zellmorphologie	0%: Keine runden/ovale Zellen 100%: Vorwiegend runden/ovale Zellen
4. Chondrozyten Cluster (Ansammlung von 4 oder mehr)	0%: Vorhanden 100%: Nicht vorhanden
5. Oberflächenarchitektur	0%: Delaminiert, massiv unregelmäßig 100%: Glatt
6. Basale Integration	0%: Keine Integration 100%: Volle Integration
7. Verknöcherungsgrenze	0%: Keine Verknöcherung sichtbar 100%: <i>Tidemark</i> , Verknöcherungsgrenze
8. Subchondrale Knochenabnormalitäten/ Knochenmarksfibrose	0%: Abnormal 100%: Normales Knochenmark
9. Entzündung	0%: Vorhanden 100%: Nicht vorhanden
10. Ossifizierung innerhalb des Regenerats	0%: Vorhanden 100%: Nicht vorhanden
11. Vaskularisierung innerhalb des Regenerats	0%: Vorhanden 100%: Nicht vorhanden
12. Oberflächliche Bewertung (Oberes Drittel)	0%: Abnormal 100%: Hyalin-ähnlich
13. Mittlere/Tiefe Bewertung (Untere 2/3)	0%: Abnormal 100%: Hyalin-ähnlich
14. Gesamtbeurteilung	0%: Abnormal 100%: Hyalin-ähnlich

Abb. 8: Mikroskopische Bewertungsskala nach ICRS 2 Kriterien

Übersetzt und angelehnt an Mainil-Varlet et al. (2010, S. 883)

2.2.7. Molekularbiologische Analysen

2.2.7.1. mRNA Isolierung aus Proben der Defektfüllung

Die Isolierung erfolgte mit der *Single-Step* Methode nach dem Protocol von Chomczynski und Sacchi (1987, S. 582-4) über Phenol-Chloroform Extraktion mit TRIzol® Reagent. TRIzol®, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, sorgt während der Homogenisierung für die Integrität der zu isolierenden mRNA. Proben für die Isolierung

wurden bei Explantation aus dem proximalen Drittel des Defekts entnommen, mit flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C aufbewahrt.

- 1. Homogenisierung:** Nach dem Auftauen wurde die Gewebeprobe zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2,5 mm Zirkonium Kügelchen und Abnahme des PBS wurde 1 ml TRIzol® zur Elution der mRNA hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe zweimal 7 s lang mit dem *Mini-Bead Beater* homogenisiert.
- 2. Phasenseparation:** Pro ml TRIzol® wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt. Die Probe wurde daraufhin 15 s mit dem *Digital Vortex Mixer* physikalisch disruptiert, dann 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Phasenseparation wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C erreicht. Die obere wässrige Phase enthielt die mRNA, die Interphase und organische Phase wurde verworfen.
- 3. Präzipitation:** Das Interface wurde abpipettiert und mit 500 µl Isopropanol (100%ig) bei RT 10 min inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation für 30 min mit 13000 rpm und 4°C fielen mRNA-Präzipitate aus.
- 4. Reinigung:** Um mögliche Reagenzreste zu entfernen wurde mit 1 ml Ethanol (80%ig) 5 min mit 7600 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet bis zur Farblosigkeit getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 20-30 µl RNase freiem Wasser, gefolgt von einer Erhitzung auf 65°C, um eine homogene Suspension zu gewährleisten. Nach dem Abkühlen wurden sie bei -80°C zwischengelagert.
- 5. Reinheit und Quantifizierung:** Die Qualität und Quantität der isolierten mRNA wurde mittels Spektrophotometrie (DU-640, Beckman Coulter GmbH, Brea, USA) im Anschluss an die RNA-Isolierung überprüft. Auf eine Messung aller Proben wurde aufgrund des geringen Ausgangsmaterials verzichtet.

Für die Messung wurde 2 µl mRNA mit 198 µl RNase-freiem Wasser in eine Küvette mit 0,2 cm Lichtweg gefüllt. Die Absorption (A) der Probe wurde anschließend bei 260 nm und 280 nm gemessen, das jeweilige Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren und Aminosäuren. Aus dem Verhältnis der Werte ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) konnte auf die Reinheit der RNA geschlossen werden, die bei proteinfreier Präparation bei 1.8-2.0 lag (Taylor et al., 2010, S. 2).

2.2.7.2. Expressionsanalyse genspezifischer mRNA-Transkripte mittels qPCR

2.2.7.2.1. Abfolge der qPCR

Es wurde eine quantitative Echtzeit (*real-time*) *reverse-transcription* Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) mithilfe eines *ABI 7900HT Cyclers* (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) eingesetzt. Nach reverser Transkription folgte gleichzeitig die Deaktivierung der reversen Transkriptase und die Aktivierung der

thermostabilen DNA-Polymerase durch Erhitzung. Dann konnte mit der Denaturierung und Vervielfältigung der entstandenen komplementären DNA (cDNA) begonnen werden. Dadurch wurde eine zeitliche Trennung der reversen Transkription und der PCR ermöglicht. Anhand der Fluoreszenzsignale der entstehenden PCR-Produkte wurde in Echtzeit (*real-time*) eine Quantifizierung der DNA vorgenommen, eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte war somit nicht nötig.

Für die *real-time* PCR wurde das *QuantiTect® SYBR® Green* RT-PCR-Reagensystem (Corbett Life Science, Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es enthielt die reverse Transkriptase (RT) mit dem dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP), sowie die DNA-Polymerase, einen Puffer und den Fluorophorfarbstoff *SYBR® Green*. Diese wurden als RT-Mix und *Master Mix* getrennt bei -20°C aufbewahrt.

Für die RT-PCR wurde zunächst für jeden Primer eine Stammlösung auf Eis angesetzt. Diese bestand aus jeweils 0,4 µl Primer *forward* und 0,4 µl Primer *reverse* mit 3,1 µl RNase-freiem Wasser, sowie 5 µl des *Master Mix* und 0,1 µl des RT-Mix. Das Reaktionsvolumen von 10 µl setzte sich aus 1 µl Probe und 9 µl Stammlösung (Qiagen, 2011, S. 11-6).

Die RT-PCR-Geräteeinstellungen werden in Tab. 2 aufgeführt. Die Detektion der Fluoreszenz fand hierbei im jeweiligen Zyklus zum Zeitpunkt der spezifischen Annealing-Temperatur (5-8°C unter dem Schmelzpunkt der Primer), bei 72°C während der Elongation und als zusätzlichen Messung bei 80°C danach statt (s. Tab. 2). Nach beendetem RT-PCR-Lauf erfolgte die Auswertung mithilfe des Computerprogramms SDS 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Es wurde mit drei technischen Replikaten und mehreren biologischen Replikaten (n=6) gearbeitet. Zur Detektion von DNA-Kontamination und Primer-Dimere wurden *No Template Controls* für jede Probe durchgeführt, bei dieser werden 1 µl Probe durch 1 µl RNase-freies Wasser ersetzt (Taylor et al., 2010, S. 4).

Ablauf	Temperatur	Dauer
Reverse Transkriptase Reaktion (<i>cDNA</i>)	50°C	30 min
Inaktivierung reverser Transkriptase / Aktivierung der Polymerase	95°C	15min
Denaturierung	94°C	15s
Annealing(+Fluoreszenzmessung)	58°C/60°C/62°C	je 30s
Elongation/Synthese (+ Fluoreszenzmessung)	72°C	30s
zusätzliche Fluoreszenzmessung	80°C	15s
Schmelzkurve	60-95°C	30s

Tab. 2: Chronologischer Ablauf der RT- PCR mit dem *7900HT Fast Real-Time PCR System*

2.2.7.2.2. CT-Wert Bestimmung

Der CT-Wert bildet die Basis zur Berechnung der relativen Expressionsrate der Gene (s. 2.2.7.2.4). CT steht für *Cycle Threshold*, dem Schwellenwert des PCR-Zyklus bei dem die Reporterfluoreszenz (SYBR® Green) der zu untersuchenden Gene die Hintergrundfluoreszenz der Probe übersteigt. Hintergrundfluoreszenzen können unter anderem durch Bestandteile des *Master Mixs* entstehen. Wird die Reporterfluoreszenz gegen die PCR-Zyklen aufgetragen, entsteht eine exponentielle Kurve. Nach einem anfänglichen Nullplateau, bei dem die Hintergrundfluoreszenz nicht überschritten wird, folgt ein exponentieller Anstieg bei dem sich die Ziel-DNA, sofern die PCR effektiv verläuft, verdoppelt. Im Verlauf lässt dieser Anstieg nach, da Enzymaktivität, Primer- und Nukleotidkonzentration abnehmen und es kommt zu einem Plateau ohne weitere Reaktionen (s. Abb. 9a). Der Fluoreszenzschwellenwert wurde automatisch festgelegt und visuell überprüft. Überschreitung des Schwellenwerts in einem frühen Zyklus (niedriger CT-Wert) geht mit einer hohen Amplifikationsrate der Ziel-DNA überein, hohe CT-Werte mit einer niedrigen Amplifikationsrate.

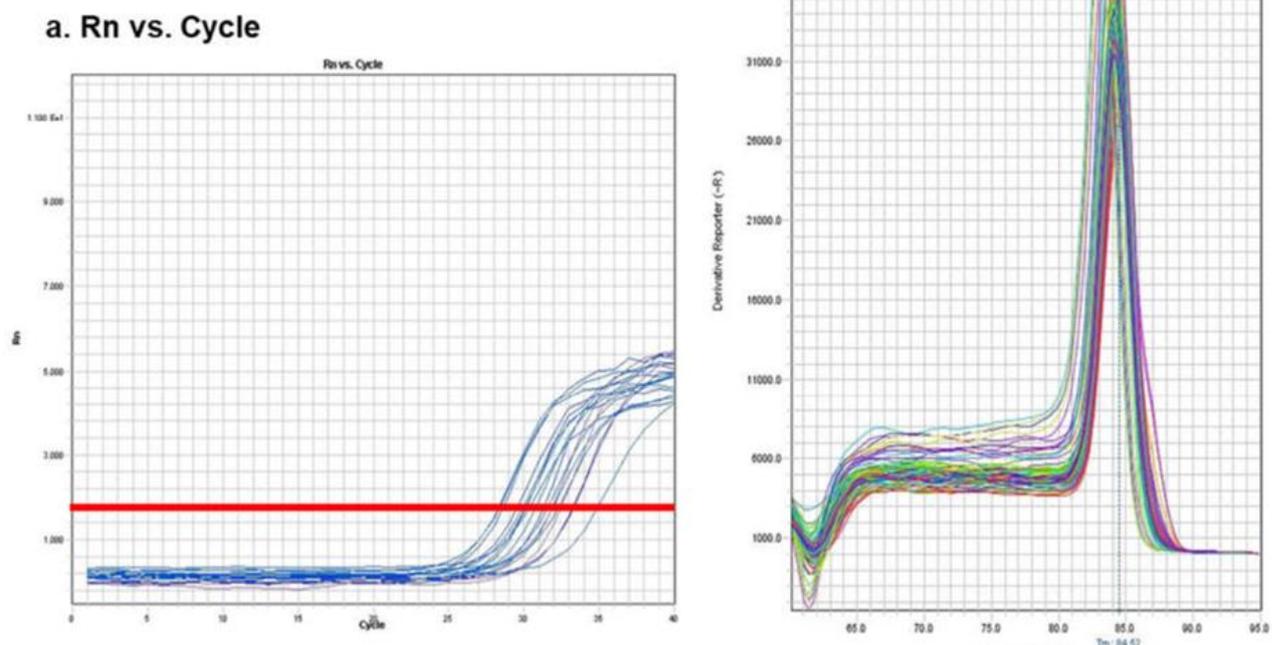


Abb. 9a: Real-Time PCR Kurve mehrerer mRNA Konzentrationen der 24-Wochen-Gruppe für Kollagen X
Threshold = rote Linie

Abb. 9b: Schmelzkurve mehrerer mRNA Konzentrationen der 24-Wochen-Gruppe für Kollagen X

2.2.7.2.3. Schmelzkurve

Zum Abschluss eines PCR-Durchlaufs erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse. Hierfür wird das Reaktionsgemisch auf 60-95°C in 30 s erhitzt. Dies hat zur Folge, dass sich die entstandenen cDNA-Doppelstränge durch Auflösung der Wasserstoffbrücken in Einzelstränge auftrennen. SYBR[®] Green, welches zwischen den Doppelsträngen einlagert ist, verliert folglich schnell an Fluoreszenz und es kommt zu einem raschen Abfall der Fluoreszenzkurve (s. Abb. 9b). Die DNA-Stränge haben spezifische Schmelzkurven, je nach Guanin- bzw. Cytosin-Gehalt, da diese Basenpaare drei statt zwei Wasserstoffbrücken ausbilden (Qiagen, 2011, S. 14; Taylor et al., 2010, S. 3-4).

2.2.7.2.4. Relative Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta CT$ Methode

Im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung, welche die genaue DNA-Kopie-Anzahl mithilfe von Standardkurven bestimmt, beschreibt die relative Quantifizierung eine Expressionsveränderungen zwischen einer Untersuchungsgruppe und einem Kalibrator (Livak & Schmittgen, 2001, S. 403-4). Voraussetzung für diese Methode, ist die Annahme, dass beide Gruppen eine ähnliche Amplifikationseffizienz haben. Es wurde hierfür unbehandelter Knorpel an einem gegenüberliegenden Knie entnommen und gemäß der Untersuchungsgruppe mRNA isoliert, im Folgenden als „unbehandelter Referenzknorpel“ bezeichnet. Zudem benötigt die Methode ein *Housekeeping Gene*, welches unabhängig der Behandlung ubiquitär und homogen exprimiert wird, zu welchem die Expressionsrate des Zielgens in Relation gesetzt wird. Hierfür wurde gemäß der bereits etablierten Methode von Salzmann et al. (2011, S. 5812) β -Actin ausgewählt (s. 2.1.4). Zunächst wird jede Probe auf das *Housekeeping* Gen normiert, um Schwankungen in der gewonnenen mRNA-Menge auszugleichen ($\Delta CT = CT_{Ziel} - CT_{\beta-actin}$). Hiernach werden die ΔCT -Werte des Kalibrators vom ΔCT der Probe abgezogen: $\Delta\Delta CT$ ist somit normalisiert und auf einen Standard bezogen.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Probe} - \Delta CT_{Kalibrator}$$

$$\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{Ziel,Probe} - \Delta CT_{\beta-actin,Probe}) - (\Delta CT_{Ziel,Kalibrator} - \Delta CT_{\beta-actin,Kalibrator})$$

Da man bei der Amplifikation in der effizienten Phase von einer Verdopplung der DNA mit jedem Zyklus ausgeht, wird, um die relative Expressionsrate (RQ) zu beschreiben, die Formel $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet (Pfaffl, 2001, S. 2004-7).

2.2.8. Statistische Auswertverfahren

Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Programms SPSS® (Version 26, IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Zunächst erfolgte die deskriptive Statistik mit Testung auf Normalverteilung. Es wurden Mittelwerte und Standardfehler bestimmt. Der Median-, Minimum-, und Maximum-Wert sowie unteres und oberes Quartil wurden zudem in Boxplots visualisiert. Schiefe und Kurtosis ergaben erste Hinweise auf eine Abweichung von der Normalverteilung. Die Normalverteilung wurde grafisch anhand von Histogramm und Quantil-Quantil-Diagramm sowie durch den Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Lagen nicht-normalverteilte Daten vor, wurde für die Ermittlung der zentralen Tendenzen der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben mit paarweisen Untervergleichen *post-hoc* nach Dunn-Bonferroni angewendet. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig zu einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt. Bei multiplen Untergruppenvergleichen wurde eine *p*-Wert Korrektur nach Bonferroni vorgenommen. *P*-Werte $p \leq 0,050$ wurden als statistisch signifikant festgelegt.

Da sich bei der Testung eine Vielzahl an Subgruppen sowie mögliche Interaktionen ergab, konnte keine globale Korrektur der *p*-Werte für multiple Testung berücksichtigt werden. Aufgrund der zudem geringen Fallzahlen wären die Ergebnisse stark konservativ und ergäben eine damit einhergehenden geringen Entdeckungswahrscheinlichkeit von Zusammenhängen und somit geringere Aussagekraft. Für solche Fälle ist der wissenschaftliche Konsensus in Anbetracht explorativer Studien ein Verzicht auf die Korrektur (Bender et al., 2007, S. 28) und Formulierung neuer Hypothesen anhand der Ergebnisse, welche dann in einem zweiten Versuch gezielt paarweise verglichen werden können (Saville, 2015, S. 734).

Zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Mann-Whitney-U-Testung, so wurden die Subgruppen explorativ mit dem gleichen Test untereinander auf statistische Signifikanz geprüft. Hierzu wurden exakte Signifikanzen p_x , welche nicht für Bindungen korrigiert waren, herangezogen. Zur Beurteilung der Größe des Effekts wurde der Korrelationskoeffizient nach der Einteilung von Cohen (1992, S. 98-9) herangezogen.

Für die einzelnen Variablen des ICRS 2 wurde zudem der Intra-Rater-Korrelationskoeffizient mittels Reliabilitätsanalyse mit zweifach gemischtem Modell und absoluter Übereinstimmung berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Molekularbiologischen Analysen

In der 4-Wochen-Gruppe (Nr. 404) sowie der 12-Wochen-Gruppe (Nr. 1204) konnte jeweils bei einer Resovist[®]-markierten Probe nur unzureichend DNA isoliert werden. Aufgrund der geringen Biomaterialverfügbarkeit sowie der nach Entnahme sofortigen Methanol-Fixierung, konnte die Isolation nicht wiederholt werden.

3.1.1. Allgemeine Verteilung der Differenzierungsmarker

Die relative Expressionsrate der Differenzierungsmarker verzeichnete mit steigender Wochenzahl in den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Gruppen einen signifikanten Anstieg (s. Tab. 3 „Verteilung Wochen“). Mit Ausnahme von Sox9 zeigte sich in mindestens einer der 24-Wochen-Gruppen im arithmetischen Mittel eine höhere Expressionsrate als der unbehandelte Referenzknorpel ($RQ > 1$), für Aggrecan und COMP in R-24W und Kollagen II in R-24W und R+24W. Für Kollagen II war bereits nach 12 Wochen in der unmarkierten Gruppe die Expressionsrate über der des unbehandelten Referenzknorpels. Für Aggrecan und Kollagen II galt dies auch für den Median ($R-24W_{\text{Med-Aggrecan}} 4,17 \pm 5,58$, $R-24W_{\text{Med-Col2a1}} 1,01 \pm 3,51$) (s. Abb. 10). Sox9 zeigte hingegen lediglich in der 24. Woche unabhängig der Markierung einen geringgradigen nicht-signifikanten Anstieg der Expressionsrate. Hierbei blieb die relative Expressionsrate unter dem Wert des unbehandelten Referenzknorpels ($RQ < 1$) (s. Abb. 10). Über alle Marker hinweg war der Unterschied zwischen den Resovist[®]-markierten (R+) und unmarkierten (R-) Proben und dem Subgruppenvergleich R+/R- bei gleicher *in vivo* Standzeit nicht signifikant (s. Tab. 3 „Variable Resovist[®]“). Es zeigte sich jedoch ein Trend, dass die Expressionsrate in den unmarkierten Proben tendenziell früher anstiegen (s. Abb. 10).

	Aggrecan	Kollagen II	COMP	Sox9
Variable Resovist®	$p_x = ,153$	$p_x = ,384$	$p_x = ,135$	$p_x = ,403$
Variable Wochen	$p = ,004$	$p = ,002$	$p = ,0004$	$p = ,002$

Tab. 3: Verteilung der Expressionsrate der Differenzierungsmarker über Resovist®- und Wochengruppen

p_x = Exakte Signifikanz, p = asymptotische Signifikanz.

Zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. „Verteilung Resovist®“). Mit steigender *in vivo* Standzeit jedoch konnte ein signifikanter Anstieg der Differenzierungsmarker verzeichnet werden (s. „Verteilung Wochen“).

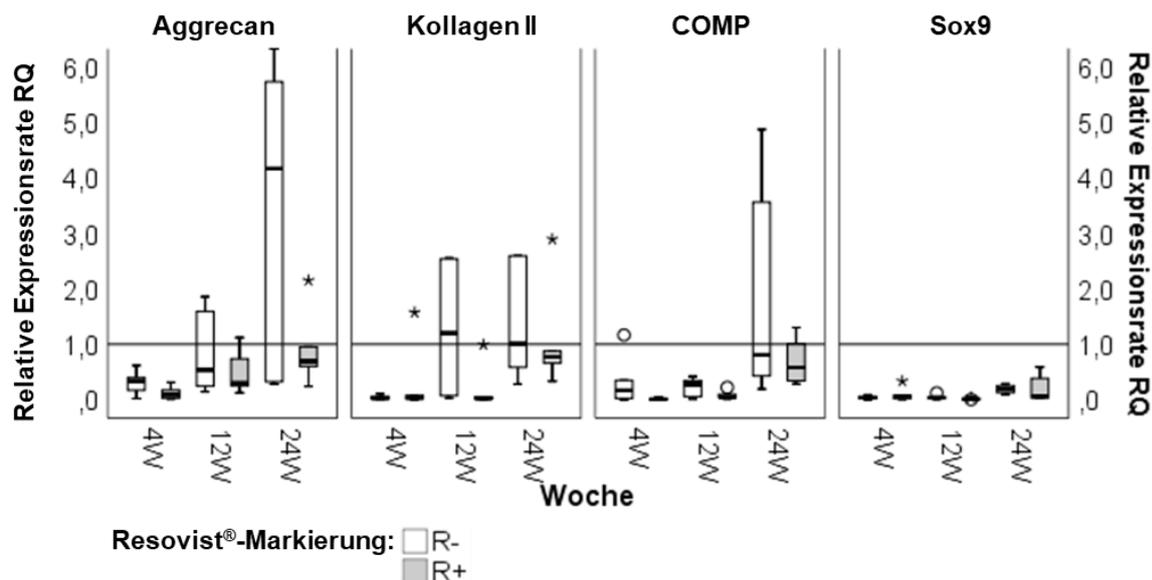


Abb. 10: Verteilung der relativen Expressionsrate der Differenzierungsmarker

Mit längerer *in vivo* Standzeit kam es zu einer Zunahme der relativen Expressionsrate. Stieg die relative Expressionsrate RQ über 1,0, so war die Expressionsrate im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel höher (siehe schwarze Referenzlinie bei RQ = 1,0). Die Resovist®-Markierung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate.

3.1.1.1. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Aggrecan

Mit zunehmender Wochenzahl zeigte sich in den unmarkierten als auch in den Resovist®-markierten Gruppen ein sukzessiver Anstieg der relativen Expression von Aggrecan ($p = ,004$), welcher bis zur 12. Woche nur sehr gering ausgeprägt war. Nach 24 Wochen kam es im Vergleich zu den Proben der 4. Woche zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate ($p_{4W-24W} = ,0009$) (s. Abb. 11B). Trotzdem konnte in der Resovist®-markierten 24W-Gruppe keine Induktion der Expressionsrate im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel nachgewiesen werden ($RQ < 1,0$), lediglich die Resovist®-markierten Proben der 24. Woche zeigten eine Induktion gegenüber dem unbehandeltem Referenzknorpel ($RQ > 1$ s. Abb. 11A).

Zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expressionsrate sowohl unabhängig der *in vivo* Standzeiten (exakte Signifikanz $p_x = ,153$), also auch innerhalb der Wochengruppen mit gleichen *in vivo* Standzeiten ($p_{x4W} = ,222$; $p_{x12W} = ,662$, $p_{x24W} = ,247$).

A. Mittelwerte und Mediane Aggrecan

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	0,31 ± 0,23	0,34 ± 0,41
R+4W	0,12 ± 0,12	0,09 ± 0,22
R-12W	0,82 ± 0,73	0,54 ± 1,44
R+12W	0,51 ± 0,41	0,30 ± 0,96
R-24W	3,51 ± 2,65	4,17 ± 5,58
R+24W	0,93 ± 0,73	0,69 ± 1,13

RQ > 1 hellgrau hinterlegt

B. Verteilung der Expressionsrate von Aggrecan

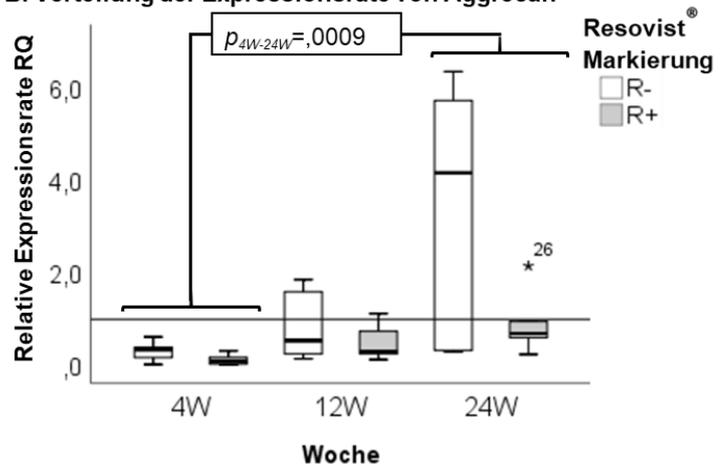


Abb. 11: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Aggrecan

Eine längere *in vivo* Standzeit führte zu einem signifikanten Expressionsanstieg ($p_{4W-24W} = ,0009$) zwischen der 4. und 24. Woche. Die unmarkierte 24-Wochen-Gruppe (R-24W) zeigte eine zum unbehandeltem Referenzknorpel erhöhte Expressionsrate (siehe schwarze Referenzlinie bei $RQ = 1,0$), welche sich jedoch nicht signifikant zu den Proben der R+24W Gruppe unterschied ($p_{x24W} = ,247$).

3.1.1.2. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für

Kollagen II

Mit zunehmender *in vivo* Standzeit nahm die relative Expression von Kollagen II in den unmarkierten als auch in den Resovist®-markierten Proben signifikant zu ($p = ,002$; Tab. 3). Nach 24 Wochen kam es im Vergleich zur 4. Woche zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate ($p_{4W-24W} \leq ,0004$ s. Abb. 12B). Der Trend der Expressionssteigerung begann für die Resovist®-unmarkierten Proben für Kollagen II früher im Vergleich mit den Resovist®-markierten Proben, bereits in den Proben der R-12W-Gruppe war eine Induktion zu beobachten ($R-12W_{Med} 1,20 \pm 2,48$). Diese Induktion im Vergleich mit unbehandeltem

Referenzknorpel fand sich auch in den Proben der R-24W-Gruppe (R-24W_{Med} 1,01±3,51). Der Expressionsanstieg schien in den Resovist®-markierten Proben verzögert einzusetzen und zeigte im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel nur im arithmetischen Mittel eine Induktion der Expressionsrate (R+24W_{Mit} 1,05±,92), der Median ergab eine Expressionsrate unterhalb des unbehandelten Referenzknorpels (R+24W_{Med} ,77±,81) (s. Abb. 12A).

Zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben war kein statistisch signifikanter Unterschied ($p_x = ,384$) zu erkennen. Im Subgruppenvergleich der Proben mit gleichen *in vivo* Standzeiten zeigten sich trotz des unterschiedlichen Zeitpunktes des Expressionsanstiegs keine signifikanten Unterschiede ($p_{x4W} \geq ,999$; $p_{x12W} = ,052$, $p_{x24W} = ,699$).

A. Mittelwerte und Mediane Kollagen II

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,06
R+4W	0,34 ± 0,69	0,03 ± 0,82
R-12W	1,27 ± 1,27	1,20 ± 2,48
R+12W	0,22 ± 0,43	0,03 ± 0,51
R-24W	2,29 ± 3,04	1,01 ± 3,51
R+24W	1,05 ± 0,92	0,78 ± 0,81

RQ > 1 hellgrau hinterlegt

B. Verteilung der Expressionsrate von Kollagen II

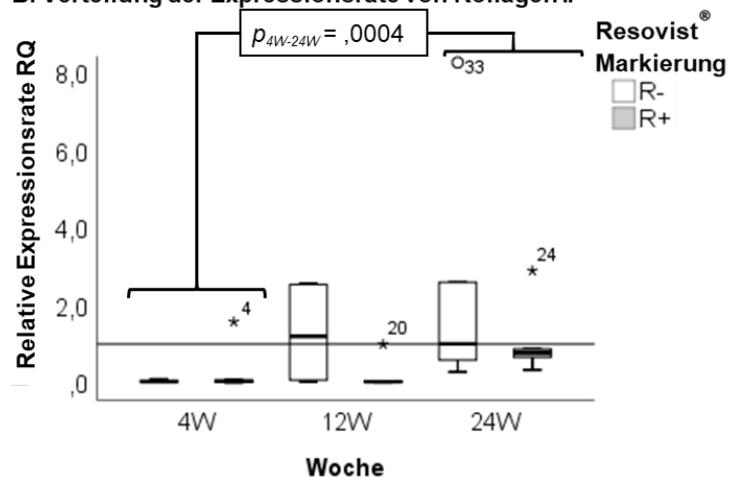


Abb. 12: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Kollagen II

Eine längere *in vivo* Standzeit führte zu einem signifikanten Anstieg der Kollagen II Expression ($p = ,002$). Diese zeigte sich im Subgruppenvergleich vor allem zwischen der 4W- und 24W-Gruppen ($p = ,0004$). R-12W und R-24W zeigten eine Induktion der Expressionsrate bereits zu einem früheren Zeitpunkt (12. Woche) im Vergleich zu den Resovist®-markierten Proben, welche lediglich im arithmetischen Mittel nach 24 Wochen eine Induktion zeigten (R+24W). Der Unterschied zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Gruppen war nicht signifikant. Stieg die relative Expressionsrate RQ über 1,0, so war die Expressionsrate im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel höher (siehe schwarze Referenzlinie bei RQ = 1,0).

3.1.1.3. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für COMP

Mit zunehmenden *in vivo* Standzeiten nahm die relative Expressionsrate von COMP in den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben signifikant zu ($p = ,0004$) (s. Abb. 13B). Post-hoc-Tests zeigten eine signifikante Steigerung der Expressionsrate nach 24 Wochen im Vergleich zur 4. Woche ($p_{4W-24W} = ,0001$) und anders als für die anderen Differenzierungsmarker auch im Vergleich zur 12. Woche ($p_{12W-24W} = ,005$). Ebenfalls zu erkennen ist der Trend, dass die Expressionssteigerung von COMP für die unmarkierten Proben früher begann als in den Resovist®-markierten Proben, jedoch erreichte keine der Gruppen eine höhere Expressionsrate im Median im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel. Lediglich der arithmetische Mittelwert der R-24W zeigte eine Induktion bei großer Streuung (R-24W_{Mit} 1,16±1,38) (s. Abb. 13A). Der Vergleich der

COMP-Expressionsrate zeigte zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben keinen signifikanten Unterschied ($p_x = ,135$), auch im Subgruppenvergleich zwischen den markierten und unmarkierten Proben mit gleichen *in vivo* Standzeiten gab es keine signifikanten Unterschiede ($p_{x4W} = ,126$; $p_{x12W} = ,177$, $p_{x24W} = ,485$).

A. Mittelwerte und Mediane COMP

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	0,31 ± 0,44	0,17 ± 0,53
R+4W	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03
R-12W	0,23 ± 0,16	0,28 ± 0,32
R+12W	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,13
R-24W	1,16 ± 1,38	0,53 ± 2,02
R+24W	0,68 ± 0,41	0,58 ± 0,76

RQ >1 hellgrau hinterlegt

B. Verteilung der Expressionsrate von COMP

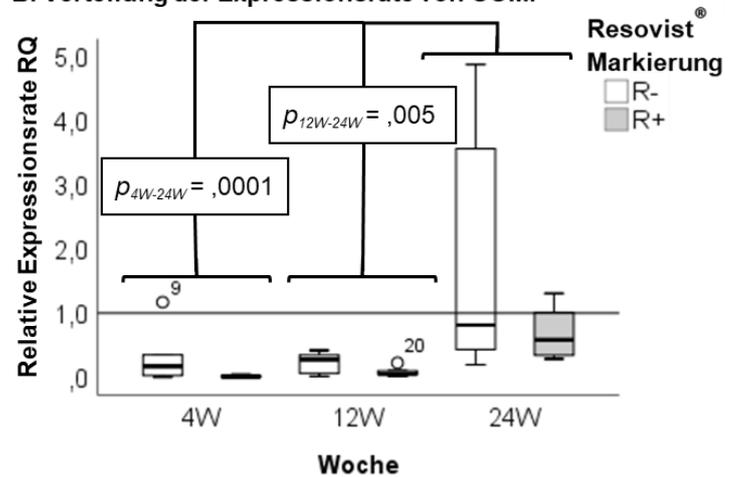


Abb. 13: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von COMP

Eine längere *in vivo* Standzeit führte zu einer signifikanten Steigerung der COMP-Expressionsrate ($p_{4W-24W} = ,0001$, $p_{12W-24W} = ,005$). Tendenziell konnte früher eine Steigerung in der unmarkierten Gruppe gesehen werden (R-, weiße Balken). Die Unterschiede zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben waren nicht signifikant. Stieg die relative Expressionsrate RQ über 1,0, so war die Expressionsrate im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel höher (siehe schwarze Referenzlinie bei RQ = 1,0).

3.1.1.4. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Sox9

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Differenzierungsmarkern ergab Sox9 in keiner der Untergruppen eine Erhöhung der Expressionsrate (s. Abb. 14A). Eine signifikante Steigerung der Expressionsrate unabhängig der Markierung bei längerer *in vivo* Standzeit war jedoch auch hier nachzuweisen ($p = ,002$). Im paarweisen Vergleich zeigte sich, ähnlich wie für COMP, sowohl zwischen den Proben der 4. und 24. Woche signifikante Unterschiede ($p_{4W-24W} = ,024$) als auch zwischen denen der 12. und 24. Woche ($p_{12W-24W} = ,002$) (s. Abb. 14B). Bei Sox9 war keine Tendenz für einen späteren Beginn der Expressionssteigerung in den Resovist[®]-markierten Proben zu sehen, signifikante Unterschiede in der Expressionsrate zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Proben bestanden nicht ($p_x = ,403$). Auch blieb die Verteilung über der Kategorie Resovist[®] mit gleichen *in vivo* Standzeiten ohne signifikanten Unterschied ($p_{x4W} = ,537$, $p_{x12W} = ,126$, $p_{x24W} = ,394$).

A. Mittelwerte und Mediane Sox9

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,05
R+4W	0,10 ± 0,13	0,06 ± 0,20
R-12W	0,05 ± 0,04	0,04 ± 0,06
R+12W	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02
R-24W	0,19 ± 0,07	0,19 ± 0,14
R+24W	0,19 ± 0,24	0,06 ± 0,41

B. Verteilung der Expressionsrate von Sox9

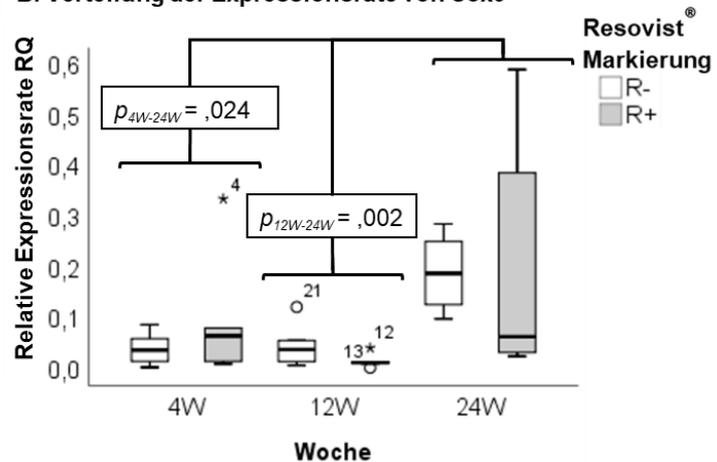


Abb. 14: Deskriptive Statistik und Boxplot der Verteilung der relative Expressionsrate von Sox9

Sox9 zeigte in allen Gruppen eine im Vergleich mit unbehandelten Referenzknorpel erniedrigte Expressionsrate, jedoch war nichtsdestotrotz eine signifikante Steigerung bei längerer *in vivo* Standzeit zu beobachten ($p_{4W-24W} = ,024$, $p_{12W-24W} = ,002$). Zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Proben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.1.2. Allgemeine Verteilung der Dedifferenzierungsmarker

Die relative Expressionsrate der Dedifferenzierungsmarker nahm mit zunehmender *in vivo* Standzeit der Implantate zu (Kollagen I $p = ,0003$, Kollagen X $p = ,003$), jedoch in unterschiedlichen Ausprägungen. Kollagen X erreichte über alle Gruppen im Mittel eine niedrigere Expressionsrate als unbehandelter Referenzknorpel (s. Abb. 15). Im Gegensatz hierzu war für Kollagen I eine deutliche Steigerung der Expressionsrate über der des unbehandelten Referenzknorpels bereits ab der 4. Woche nachweisbar ($RQ > 1$, $R-4W_{Med} 64 \pm 281$, $R+4W_{Med} 72 \pm 218$). Für die Resovist[®]-markierten Proben konnten im Gegensatz zu den Differenzierungsmarkern keine zeitliche Verzögerung bei der Steigerung beobachtet werden.

Kollagen X zeigte zudem Unterschiede zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Proben ($p_{xR+-R-} = ,017$). Der Subgruppenvergleich erbrachte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Markierungsgruppen beim Vergleich gleicher *in vivo* Standzeiten (s. 3.1.2.2).

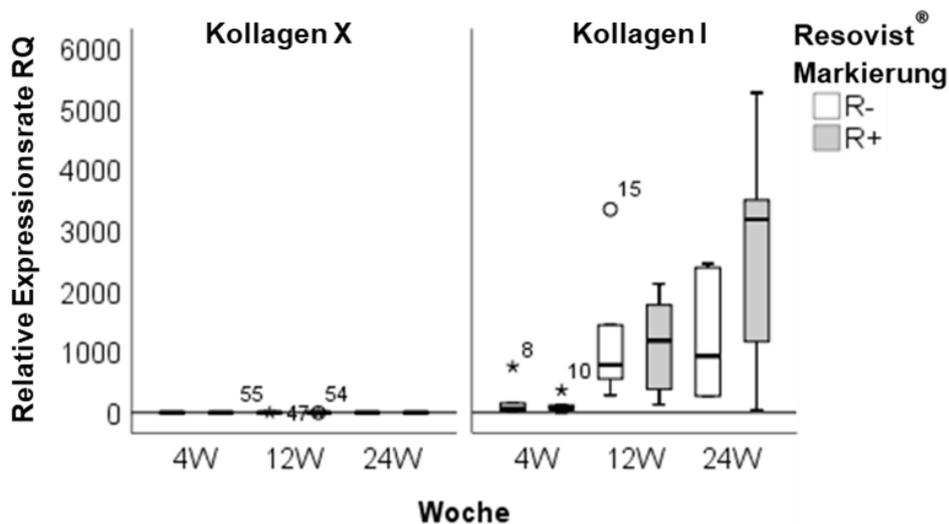


Abb. 15: Boxplot der Verteilung der relativen Expressionsrate der Dedifferenzierungsmarker

Kollagen X zeigte in allen Gruppen eine im Vergleich mit unbehandelten Referenzknorpel erniedrigte Expressionsrate (s. schwarze Referenzlinie bei $RQ = 1$), Kollagen I hingegen zeigte eine erhöhte Expressionsrate ab der 4. Woche. Beide zeigten bei längerer *in vivo* Standzeit eine signifikante Steigerung der relativen Expressionsrate (Kollagen I $p = ,0003$, Kollagen X $p = ,003$).

3.1.2.1. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Kollagen I

Kollagen I zeigte in allen Gruppen im Mittel eine Induktion der Expressionsrate gegenüber der des unbehandelten Referenzknorpels (s. Abb. 16A). Zwischen den Explantationszeitpunkten bestand auch hier ein signifikanter Unterschied in der Steigerung der Expressionsrate ($p = ,0003$). Im Post-hoc Vergleich zeigten sich die signifikanten Änderungen mit längerer *in vivo* Standzeit sowohl zwischen den Proben der 4. und 12. Woche ($p_{4W-12W} = ,002$) sowie zwischen denen der 4. und 24. Woche ($p_{4W-24W} = ,0002$) (s. Abb. 16B). Für Kollagen I erfolgte die Steigerung der Expressionsrate

unabhängig der Resovist®-Markierung bereits in der 4. Woche, die Resovist®-markierten Proben zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Unmarkierten ($p_x = ,574$). Auch zwischen den unmarkierten und markierten Proben mit gleichen *in vivo* Standzeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p_{x4W} = 1,000$; $p_{x12W} = 1,000$, $p_{x24W} = ,132$).

A. Mittelwerte und Mediane Kollagen I

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	180,64 ± 287,32	64,44 ± 281,90
R+4W	122,65 ± 144,06	72,06 ± 218,86
R-12W	1201,34 ± 1120,71	785,36 ± 1429,26
R+12W	1120,63 ± 859,28	1187,58 ± 1689,94
R-24W	1208,22 ± 986,86	934,62 ± 2134,61
R+24W	2728,59 ± 1856,19	3187,74 ± 3058,15

RQ >1 hellgrau hinterlegt

B. Verteilung der Expressionsrate von Kollagen I

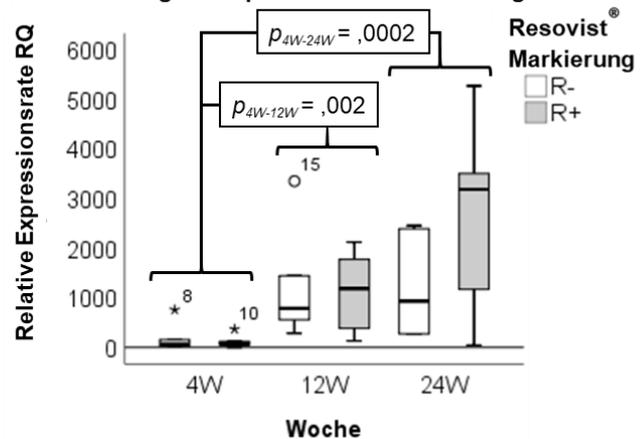


Abb. 16: Deskriptive Statistik und Verteilung der relative Expressionsrate von Kollagen I

Kollagen I zeigte in allen Gruppen eine im Vergleich mit unbehandeltem Referenzknorpel erhöhte Expressionsrate (s. schwarze Referenzlinie bei RQ = 1). Mit zunehmender *in vivo* Standzeit nahm die Expressionsrate signifikant zu ($p_{4W-12W} = ,002$, $p_{4W-24W} = ,0002$). Die Resovist®-Markierung hatte keinen Einfluss auf die Expressionsrate.

3.1.2.2. Deskriptive Statistik und zentrale Tendenz für Kollagen X

Kollagen X zeigte als einziger Marker in den Expressionsraten einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben mit Resovist®-Markierung und denen ohne Markierung ($p_x = ,017$). Während alle unmarkierten Proben im Median nur eine 22%ige Reduktion der Expressionsrate aufwiesen, war diese in den Resovist®-markierten Proben auf knapp 7% reduziert (s. Abb. 17A).

Es war somit ein Effekt der Variable „Resovist®“ zu messen, beim Post-hoc Test nach Dunn-Bonferroni konnte in der Variable *Wochengruppe* kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen, aufgeteilt nach gleichen *in vivo* Standzeiten, gemessen werden ($p_{x4W} = ,052$; $p_{x12W} = ,052$, $p_{x24W} = ,792$). Aufgrund der kleinen Subgruppen war die Entdeckungswahrscheinlichkeit zu gering einzuschätzen.

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Genen ging eine längere *in vivo* Standzeit mit einer signifikanten Steigerung der Expressionsraten einher ($p = ,003$) (s. Abb. 17B). Im Subgruppenvergleich zeigte sich zwischen den Proben der 4. und 24. Woche ($p_{4W-24W} = ,001$) als auch zwischen denen der 12. und 24. Woche ($p_{12W-24W} = ,026$) die Steigerung als signifikant verschieden.

A. Mittelwerte und Mediane Kollagen X

	MW ± SD	Median ± IQR
R-4W	0,14 ± 0,12	0,14 ± 0,26
R+4W	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,05
R-12W	0,32 ± 0,41	0,17 ± 0,35
R+12W	0,08 ± 0,07	0,07 ± 1,07
R-24W	0,76 ± 0,58	0,62 ± 1,14
R+24W	0,95 ± 1,17	0,23 ± 2,08
R-ges.	0,41 ± 0,47	0,22 ± 0,47
R+ges.	0,35 ± 0,77	0,07 ± 0,18

B. Verteilung der Expressionsrate von Kollagen X

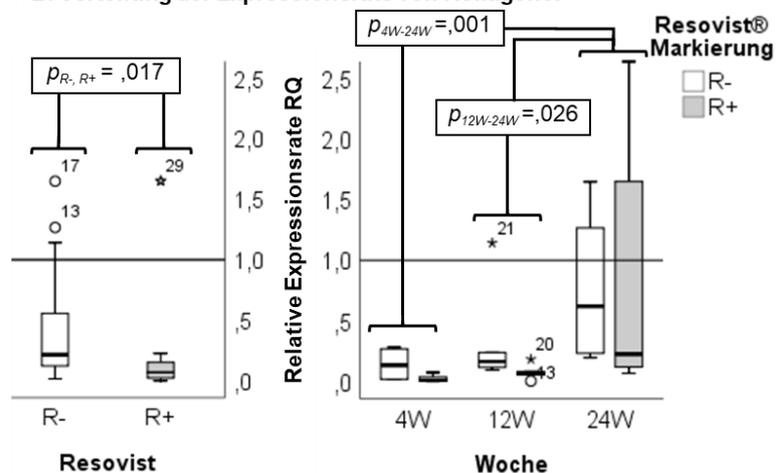


Abb. 17: Deskriptive Statistik und Verteilung der relativen Expressionsrate von Kollagen X für Resovist®- und Wochengruppen

Mit zunehmender *in vivo* Standzeit nahm bei Kollagen X die Expressionsrate signifikant zu ($p_{4W-24W} = ,001$, $p_{12W-24W} = ,026$). Jedoch zeigte keine der Gruppen im Median eine Steigerung der Expressionsrate über der des unbehandelten Referenzknorpels ($RQ < 1$, schwarze Referenzlinie). Zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Proben zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied ($p_{R-,R+} = ,017$).

3.1.1. Verteilung der Entzündungsmarker

Im Vergleich zu den Differenzierungs- sowie Dedifferenzierungsmarkern konnte bei längerer *in vivo* Standzeit keine signifikante Induktion der Expressionsraten beobachtet werden (IL-1 β $p = ,286$; TNF- α $p = ,113$). Zwischen den unmarkierten und Resovist®-markierten Proben konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erfasst werden (IL-1 β $p_x = ,198$; TNF- α $p_x = ,251$).

IL-1 β zeigte tendenziell zwischen der 12. und 24. Woche in den Resovist®-markierten Proben im Median eine Steigerung der Expressionsrate (s. Abb. 18A), jedoch erreichte die mittlere Expressionsrate in keiner Gruppe die des unbehandelten Referenzknorpels (s. Abb. 18C). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den unmarkierten Proben für IL-1 β eine Reduktion der mittleren relativen Expressionsrate je länger die *in vivo* Standzeit (R-4W_{Med} 0,22±0,95; R-24W_{Med} 0,05±0,19, s. Abb. 18A).

TNF- α zeigte lediglich in der unmarkierten Gruppe eine Tendenz zur Steigerung der Expressionsrate zwischen den Proben der 12. und 24. Woche (s. Abb. 18B).

A. Mittelwerte und Mediane IL-1 β

	MW \pm SD	Median \pm IQR
R-4W	0,62 \pm 1,11	0,22 \pm 0,95
R+4W	0,02 \pm 0,02	0,02 \pm 0,03
R-12W	0,14 \pm 0,18	0,07 \pm 0,31
R+12W	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02
R-24W	0,13 \pm 0,21	0,05 \pm 0,19
R+24W	0,26 \pm 0,23	0,20 \pm 0,35

B. Mittelwerte und Mediane TNF- α

	MW \pm SD	Median \pm IQR
R-4W	0,10 \pm 0,10	0,06 \pm 0,20
R+4W	0,59 \pm 1,19	0,04 \pm 1,42
R-12W	0,10 \pm 0,13	0,07 \pm 0,13
R+12W	0,04 \pm 0,05	0,03 \pm 0,08
R-24W	0,26 \pm 0,16	0,29 \pm 0,31
R+24W	0,63 \pm 1,01	0,07 \pm 1,44

C. Verteilung der Expressionsrate der Entzündungsmarker

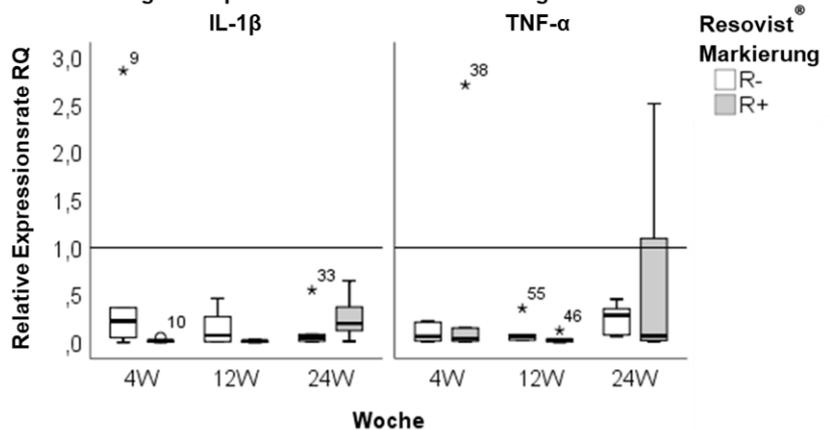


Abb. 18: Deskriptive Statistik Verteilung der relativen Expressionsrate der Entzündungsmarker IL-1 β und TNF- α

Weder IL-1 β noch TNF- α zeigten mit längerer *in vivo* Standzeit eine signifikante Steigerung der Expressionsraten. Zwischen den Proben der 12. und 24. Woche konnten für IL-1 β ein tendenzieller Anstieg in den Resovist[®]-markierten Proben (R+12W, R+24W), für TNF- α in den unmarkierten Proben (R-12W, R-24W) gesehen werden. Zudem zeigte IL-1 β ein Absinken der Expressionsrate zwischen R-4W und R-12W. In allen Gruppen zeigte sich im Median eine im Vergleich mit unbehandelten Referenzknorpel erniedrigte Expressionsrate (RQ<1, schwarze Referenzlinie).

3.1.2. Zusammenfassung molekularbiologischer Analysen

Bis auf die Entzündungsmarker zeigten alle untersuchten Gene eine signifikante Zunahme der Expressionsrate bei fortschreitenden *in vivo* Standzeiten. Bei den Entzündungsmarkern konnten lediglich eine Tendenz der Steigerung der Expressionsrate zwischen den Proben der 12. und 24. Woche in den unmarkierten (TNF- α) und den Resovist[®]-markierten Proben (IL-1 β) beobachtet werden.

Eine Induktion der Expressionsrate im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel war in einzelnen Gruppen der Differenzierungsmarker Aggrecan, COMP und Kollagen II, sowie allen Gruppen des Dedifferenzierungsmarkers Kollagen I zu sehen. Kollagen I zeigte mit Abstand die größte Induktion der Expression im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel. Die Expressionsrate des Differenzierungsmarkers Sox9, Dedifferenzierungsmarkers Kollagen X sowie der Entzündungsmarker TNF- α und IL-1 β blieben im Mittel unter der des unbehandelten Referenzknorpels.

Kollagen X zeigte als einziges Gen eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Expressionsrate zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Proben, der Effekt konnte jedoch im Post-hoc Test für eine einzelne Subgruppe (4W-24W, 4W-12W, 12W-24W) nicht signifikant nachgewiesen werden.

3.2. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung umfasste den Vergleich zwischen der eGFP Färbung und der Berliner Blau Färbung. Mit der eGFP Färbung konnten die implantierten Stammzellen in Resovist[®]-markierten und unmarkierten Präparaten nachgewiesen werden, Berliner Blau wurde für den Nachweis des Resovists[®] verwendet. Zudem wurden anhand der *International Cartilage Repair Society (ICRS)* Bewertungen die makroskopische (ICRS 1) und mikroskopische (ICRS 2) Erscheinung der Regenerate verglichen.

3.2.1. Deskriptive Darstellung: Resovist[®]- und eGFP-Nachweis

Zur Quantifizierung des mikroskopischen Präparats wurden gefärbte Objekte im Defekt auf einem Objektträger gezählt.

3.2.1.1. Nachweis Resovist[®] durch Berliner Blau Färbung

In den Präparaten der 4. Woche zeigten sich alle sechs Resovist[®]-markierten Präparate (R+) Berliner Blau positiv (BB+). Hiervon waren drei Präparate deutlich positiv, eines mit mehr als fünf, zwei mit mehr als zehn BB+ Objekten (s. Abb. 19). Die BB+ Zellen befanden sich oft in unmittelbarer Nähe zu Resten des Implantats im Defekt (s. Abb. 20a). Unmarkierte Präparate (R-) wiesen keine blau-gefärbten Zellen auf, da hier entsprechend keine Resovist[®]-Markierung vorgenommen worden war (s. Abb. 20b).

In den Präparaten der 12. Woche zeigten zwei der sechs Resovist[®]-markierten Präparate BB+ Objekte, jeweils weniger als 5 an der Zahl. Die Objekte befanden sich im Implantatbereich, jedoch deutlich randständiger als in den Präparaten der 4. Woche. Beide BB+ Präparate hatten einen schlecht gefüllten Defekt mit niedrigen ICRS Bewertungen (ICRS 1: 2; ICRS 2: 0,0). Vier der Resovist[®]-markierten Präparate (R+) wiesen wie die sechs unmarkierten Präparate (R-) keine gefärbten Bereiche auf (s. Abb. 19). In den Präparaten der 24. Woche konnten keine BB+ Objekte nachgewiesen werden.

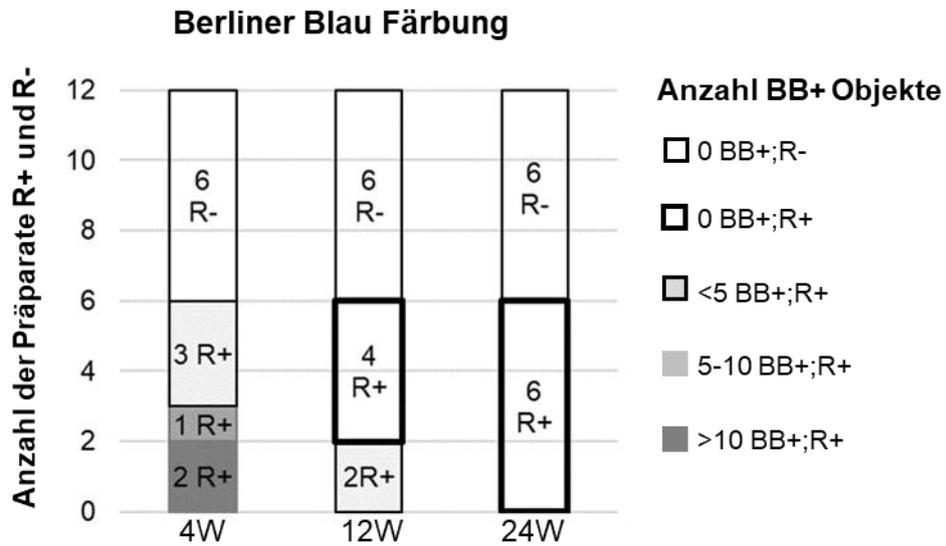


Abb. 19: Auswertung der Präparate nach Berliner Blau

BB+ Objekte sind in der 4. und 12. Woche nachweisbar, jedoch mit der längeren *in vivo* Standzeit von 12 Wochen nur in zwei Präparaten. Nach der 12. Woche wurden keine angefärbten Objekte detektiert. Alle Resovist®-negativen Präparate zeigten erwartungsgemäß keine Färbung (s. BB+; R-).

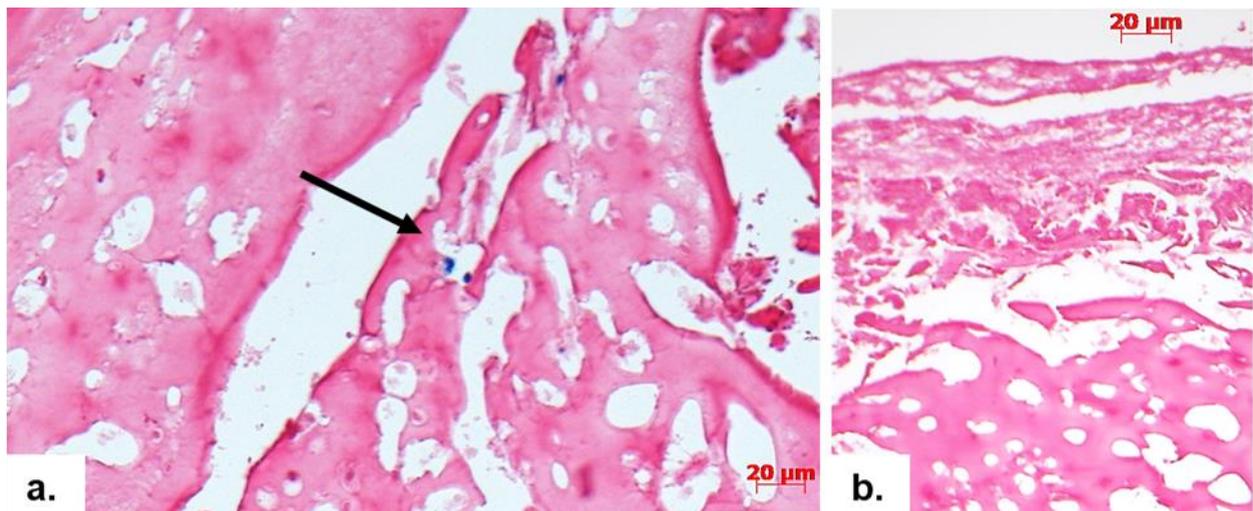


Abb. 20: Berliner Blau Färbung 4 Wochen Präparate

BB+ blau, Gegenfärbung mit Kernechtrot, Implantatreste sind an der homogenen rosa Färbung zu erkennen
a. Resovist®-markiertes Präparat (20x) der 4. Woche (R+4W Nr. 409), mit dem Pfeil sind einige BB+ Objekte gekennzeichnet
b. Unmarkiertes (R-) Präparat (5x) der 4. Woche (R-4W Nr. 407)

3.2.1.2. Nachweis eGFP durch immunhistochemische Färbung

In den Präparaten der 4. Woche waren eGFP-positive Zellen in neun Präparaten schwach (davon vier R+, fünf R-) und in zwei Präparaten deutlich nachweisbar (beide R+) (s. Abb. 22a). Ein Präparat, welches zudem nicht mit Resovist® markiert war, zeigte trotz deutlichen Implantatresten und sonst mit anderen positiven Präparaten vergleichbarer Färbemuster keine eGFP-positiven Bereiche. In den Proben der 12. Woche waren nur sehr wenige eGFP-positive Strukturen zu sehen (s. Abb. 21). Hierbei handelte es sich um Zelldetritus am Rande der ungefüllten Defekte (s. Abb. 22c). Beide eGFP-positiven Präparate hatten eine niedrige ICRS Bewertung (ICRS 1: 2; ICRS 2: 0,0) und waren mit Resovist® markiert. In den Präparaten der 24. Woche war kein eGFP mehr nachweisbar.

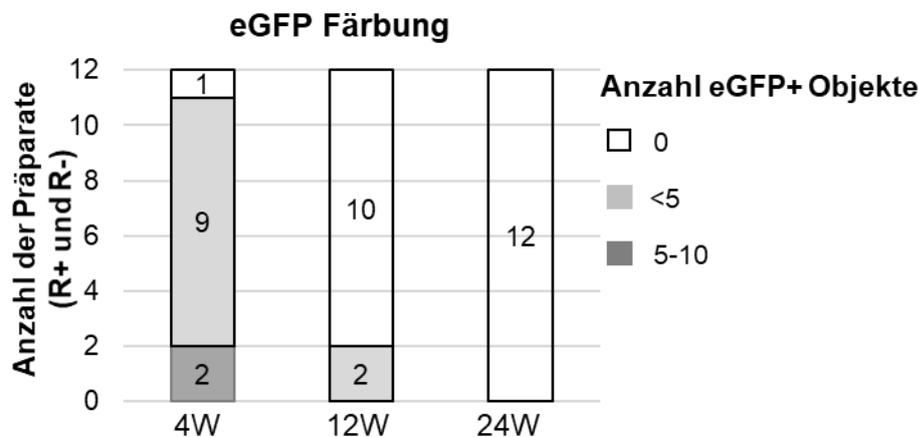


Abb. 21: Auswertung der Präparate nach eGFP

eGFP+ Objekte sind in der 4. und 12. Woche nachweisbar, in der 12. Woche jedoch nur in zwei Präparaten und nach der 24. Woche in keiner Probe.

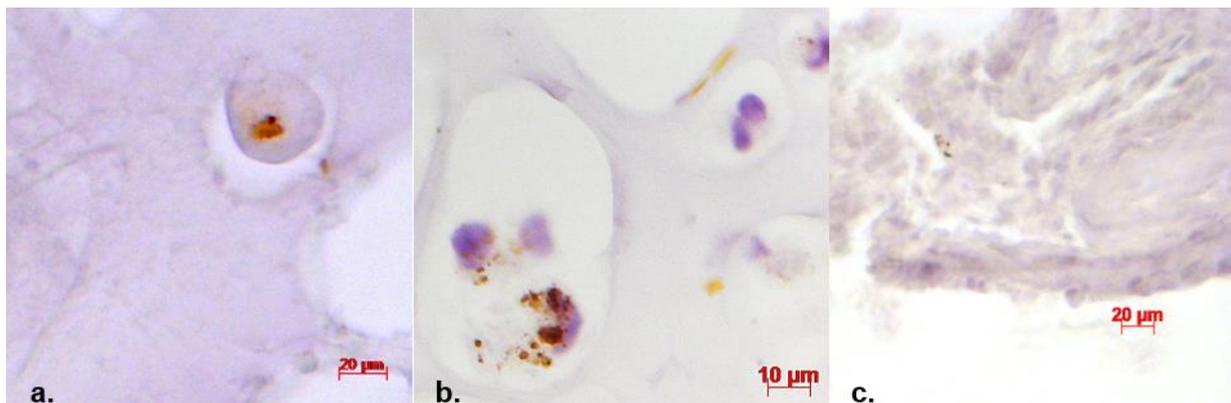


Abb. 22: eGFP Färbung der Präparate (40x)

- eGFP erscheint rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Fibringerüst des Implantats strukturarmer violette Färbung
- intrazelluläre eGFP-Ansammlung in einem Präparat der 4. Woche (R+4W Nr.409)
 - positiver Zelldetritus (Gefrierartefakt) in einem Stammzell-Fibrin-Implantat vor Implantation
 - Implantatrest mit eGFP-positiven Objekten in einem Präparat der 12. Woche (R+12W Nr. 1201)

3.2.2. Vergleich positiver Färbungsergebnisse in Resovist[®]-markierten Präparaten

In den Resovist[®]-markierten Präparaten der 4. Woche hatten drei jeweils eine vergleichbare Anzahl BB+ und eGFP+ Objekte (s. Abb. 23). Bei den anderen dreien war jeweils BB+ vermehrt nachzuweisen, zum Teil ohne eGFP+ Korrelat. Auch in den Resovist[®]-markierten Präparaten der 12. Woche (R+12W) erfolgte die Aufteilung zur Hälfte mit vergleichbarer Anzahl, zur Hälfte mit mehr BB+ als eGFP+ Objekten. Eine genaue Positionskontrolle der Objekte war nicht möglich, da die Kombination der histologischen und immunhistochemischen Färbung auch aufgrund der Farbtöne nicht gelang.

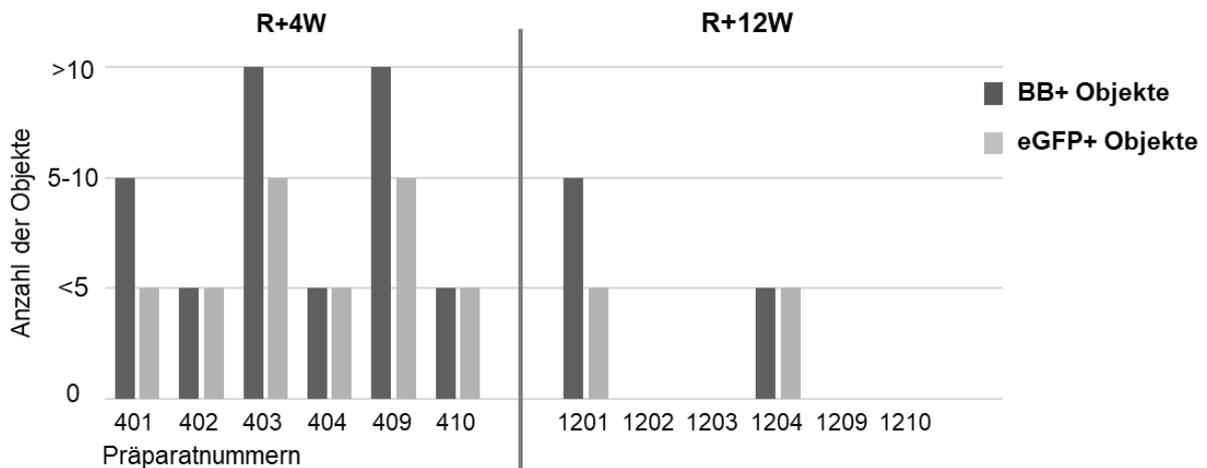


Abb. 23: Vergleich eGFP- und Berliner Blau-positiven Objekte in den Resovist[®]-markierten Präparaten der 4. Woche und 12. Woche

Präparate, die nicht Resovist[®]-markiert waren, sind nicht abgebildet. In allen Präparaten, in denen BB+ Objekte nachgewiesen wurden, konnte auch eGFP nachgewiesen werden. In jeweils vier von acht Präparaten war vermehrt BB+ nachweisbar, in der anderen Hälfte war eine vergleichbare Objektzahl Berliner Blau- und eGFP-positiv gefärbt.

3.2.3. Zusammenfassung des histologischen Resovist[®]- und eGFP-Nachweis

Resovist[®]-markierte Zellen sind in der 4. Woche *in vivo* histologisch darstellbar, nach der 12. Woche *in vivo* nur bedingt. Die eGFP Färbung gelang in allen Resovist[®]-markierten Präparaten der 4. Woche (R+4W), ein Defekt der R-4W-Gruppe war leer, somit wurde diese als eGFP negativ gewertet. Ein Nachweis nach der 12. Woche *in vivo* war nur selten möglich.

3.2.4. Auswertung der International Cartilage Repair Society Bewertungen

Es wurde eine makroskopische ICRS 1 und eine mikroskopische ICRS 2 Bewertung erhoben, um die Qualität und Quantität des Regeneratgewebes zu erfassen.

3.2.4.1. Auswertung ICRS 1 – makroskopische Bewertung

Der Median des ICRS 1 war über die Resovist[®]-markierten (R+) und unmarkierten (R-) Gruppen gleich mit R+ 1±1 und R- 1±2, die Verteilung über die Kategorien ist annähernd kongruent ($p_x = ,743$).

Mit Zunahme der *in vivo* Standzeit zeigte der Median des ICRS 1 unterschiedliche Ausprägung in der Gesamtbeurteilung des Regeneratgewebes (s. Tab. 4). Die Präparate der 4. Woche zählten im Median zur „abnormal“ Kategorie (1±0), die Präparate der 12. Woche erzielten im Median die Bewertung „stark abnormal“ (0±2) und die Präparate der 24. Woche waren der „fast normal“ Kategorie zuzuordnen (2±0). Dies war mit der mikroskopischen Beurteilung übereinstimmend. Nach der 4. Woche waren die Defekte zwar häufiger gefüllt, jedoch mit noch ungefestigtem Gewebe (11 aus 12 Präparaten), ein Defekt zeigte nur randständig wenig Füllgewebe (R+4W, Nr.403) (s. Abb. 24a). Dieses Gewebe verfestigte sich über die nächsten acht Wochen, nahm hyaline Eigenschaften an und füllte bei sechs Präparaten in der 12. Woche, jeweils zwei R+ und vier R-, den ganzen Defekt. Die andere Hälfte, vier R+ und zwei R-, zeigten in der 12. Woche jedoch auch zentrale Hohlräume in diesem Regeneratgewebe und erzielte daher niedrige ICRS 1 Werte (s. Abb. 24b). Nach der 24. Woche zeigten sich 10 der 12 Präparate mit hyalin-erscheinendem Regeneratgewebe gefüllt, lediglich zwei Präparate (R+24W, Nr. 2405 und R-24W, Nr. 2409) zeigten zentrale Hohlräume in sonst, im Vergleich zu der 12. Woche, festerem Regeneratgewebe (s. Abb. 24c und Abb. 25:).

Die Ausprägung der ICRS 1 Mediane ließ sich über jede einzelne Unterkategorie der ICRS 1 Bewertung beobachten (s. Tab. 4). Für die Unterkategorien wurden die anhand des ICRS 1 bestimmten Punkte ausgewertet, eine hohe Punktzahl war durch positive hyalin-ähnliche Eigenschaften des Regenerats zu erzielen. Die große Streuung der Werte in der 12. Woche führte zu vergleichsweise niedrigeren Medianen mit weiter gestreuten Interquartilbereichen (s. Abb. 25 und Tab. 4 Spalte „12W“). Sieben Präparate (drei R-12W, vier R+12W) zeigten Regeneratgewebe mit „stark abnormalen“ Eigenschaften und eine R-12W Probe mit „abnormalen“ Eigenschaften. Vier Präparate, jeweils zwei R+12W und zwei R-12W, zeigten Regeneratgewebe mit „fast normaler“ hyaliner Erscheinung und somit hoher ICRS 1 Bewertung.

Es zeigten sich zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der makroskopischen Knorpelbewertung. Zwischen den *in vivo*

Standzeiten, ungeachtet der Resovist®-Markierung, waren signifikante Unterschiede der ICRS 1 Kategorie zu beobachten ($p = ,003$). Diese bestätigten sich im paarweisen Vergleich zwischen der 12. und 24. Woche ($p_{12W-24W} = ,003$) und der 4. und 24. Woche ($p_{4W-24W} = ,004$). Eine positive Korrelation nach Spearman-Rho war signifikant ($r_s = ,491$, $p = ,002$), somit war für längere *in vivo* Standzeiten mit signifikant besser bewerteten Regeneraten zu rechnen. Die Unterschiede zeigten sich über die einzelnen Unterkategorien der ICRS 1 Bewertung ebenfalls signifikant, im Subgruppenvergleich zwischen der 4. und 24. Woche sowie 12. und 24. Woche (s. Tab.5) (Defektheilung: $p = ,010$; $p_{4W-24W} = ,0023$; $p_{12W-24W} = ,045$; Integration: $p = ,009$; $p_{4W-24W} = ,0014$; $p_{12W-24W} = ,045$; Makroskopische Erscheinung: $p = ,001$; $p_{4W-24W} = ,0002$; $p_{12W-24W} = ,012$). Somit hat sich über alle Bewertungen kein signifikanter Unterschied zwischen der 4. und 12. Woche gezeigt, der kürzeren Differenz zwischen den *in vivo* Standzeiten.

	Median ± Interquartilbereich		
	4W	12W	24W
ICRS1 Gesamtbeurteilung	1 ± 0	0 ± 2	2 ± 0
Fläche der Defektheilung	3 ± 0	2 ± 3	4 ± 0
Integration in gesunden Knorpel	1 ± 1	1 ± 3	3 ± 1
Makroskopische Erscheinung	1 ± 1	0 ± 2	2 ± 0

Tab. 4: Median und Interquartilbereich des ICRS 1 nach *in vivo* Standzeiten aufgeteilt

Die Kategorien der Gesamtbeurteilung des Regenerats wurden zusammengefasst in „normal“ (3), „fast normal“ (2), „abnormal“ (1) und „stark abnormal“ (0).

In den Kategorien „Fläche der Defektheilung“, „Integration in gesunden Knorpel“ und „Makroskopische Erscheinung“ waren anhand der ICRS 1 Bewertung 0-4 Punkte zu erzielen, je höher die Punktzahl desto positiver war die Knorpelqualität des Regenerats zu bewerten.

	Gesamt	4W-12W	4W-24W	12W-24W
ICRS1 Gesamtbeurteilung	**	n.s.	**	**
Fläche der Defektheilung	*	n.s.	**	*
Integration in gesunden Knorpel	*	n.s.	**	*
Makroskopische Erscheinung	**	n.s.	***	*

*** wenn $p \leq ,0005$, ** wenn $p \leq ,005$, * wenn $p \leq ,05$, n.s. wenn nicht signifikant verschieden

Tab. 5: Nichtparametrische Testung der Verteilung der ICRS 1 Unterkategorien über die Wochengruppen

Längere *in vivo* Standzeiten zeigten eine Verbesserung der ICRS 1 Bewertungen, Signifikanzen waren im Vergleich zwischen der 4. und 24. Woche sowie der 12. und 24. Woche zu beobachten.



Abb. 24: Defekte makroskopisch bei Explantation

- a. nach 4 Wochen (R+4W Nr. 404): Implantatrest unter dem Knorpelniveau
- b. nach 12 Wochen: links gefüllter Defekt (R-12W Nr.1207), rechts teilweise gefüllter Defekt mit zentraler Vakuole (R-12W Nr.1205)
- c. nach 24 Wochen: links gefüllter Defekt (R+24W Nr.2406), rechts teilweise gefüllter Defekt mit zentraler Vakuole (R+24W Nr. 2405)

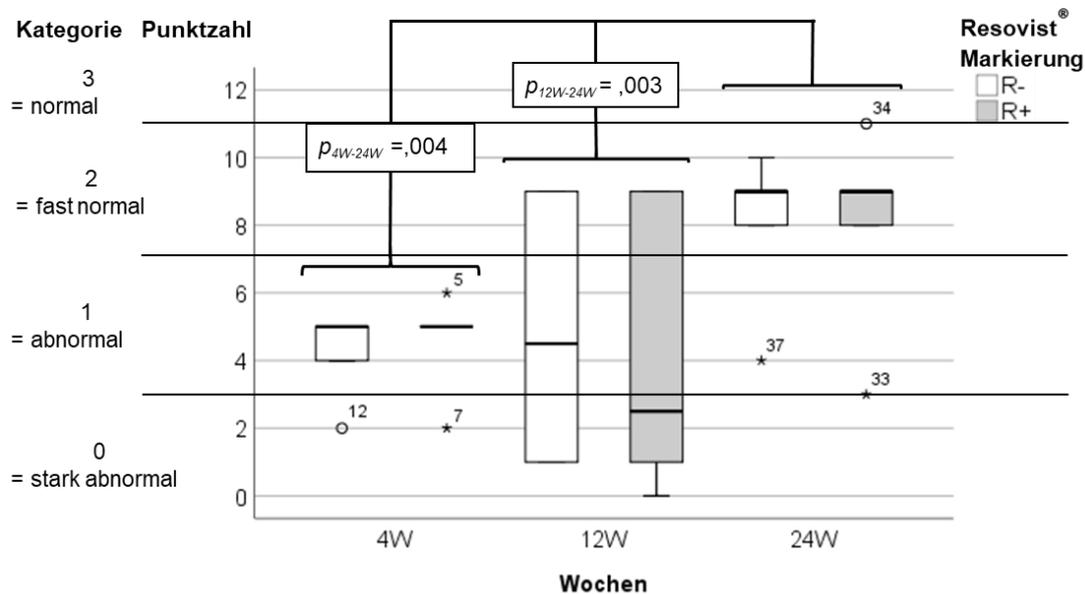


Abb. 25: Darstellung der ICRS 1 Bewertung in den verschiedenen Wochengruppen

Punktzahl 0-3 = Kategorie 0 „stark abnormal“, 4-7 Punkte = 1 „abnormal“, 8-11 Punkte = 2 „fast normal“, 12 Punkte = 3 „normal“

Zwischen den kürzeren *in vivo* Standzeiten, 4 Wochen und 12 Wochen, zeigten sich im Vergleich zur 24. Woche signifikante Unterschiede ($p_{4W-24W} = ,004$, $p_{12W-24W} = ,003$). Es wird deutlich, dass eine längere *in vivo* Standzeit eine höhere ICRS 1 Bewertung bedingte. Auffällig ist auch der große Interquartilsabstand in der 12. Woche in Resovist®-markierten und unmarkierten Proben.

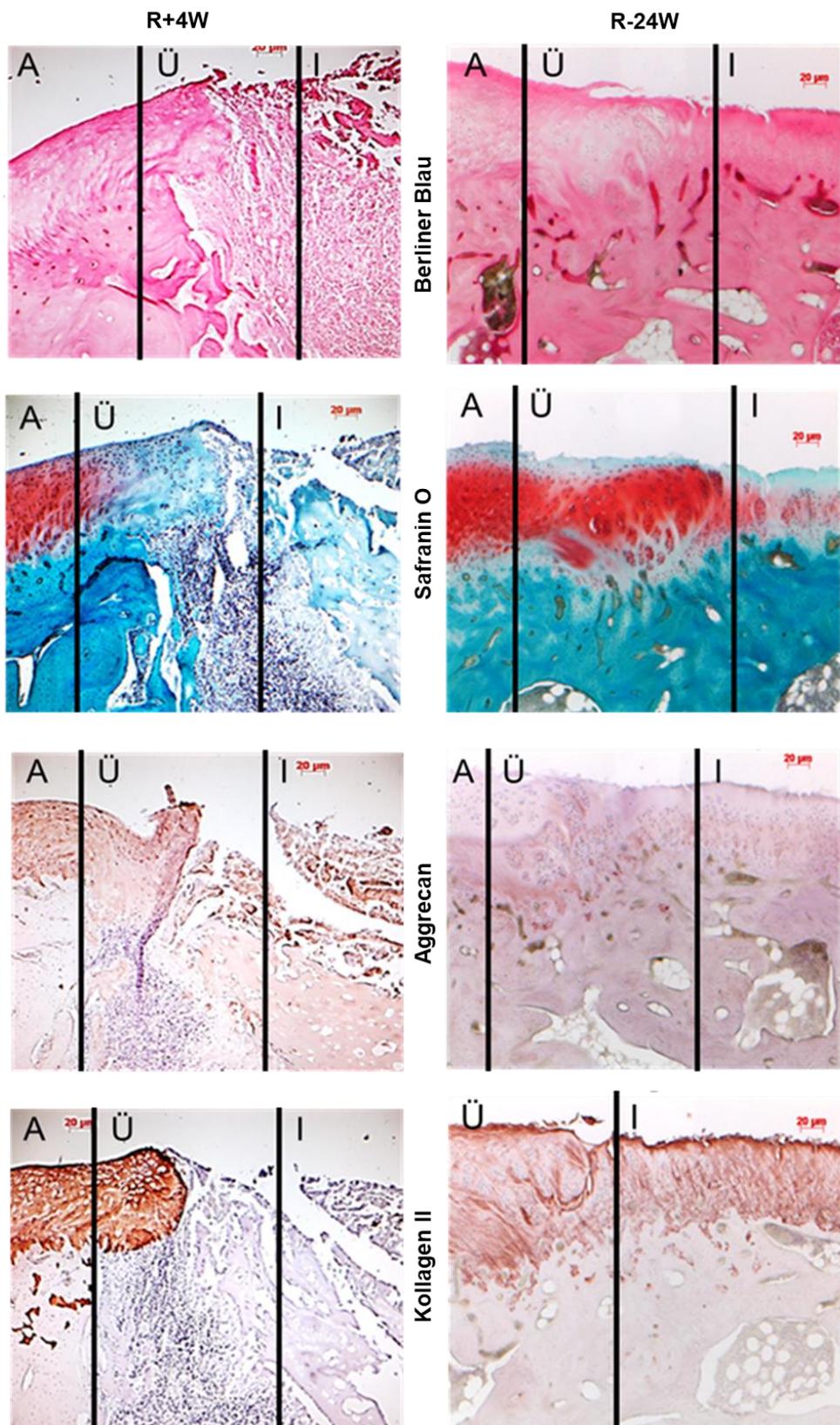


Abb. 26: Mikroskopischer Vergleich verschiedener Färbungen in R+4W (Nr. 409) und R-24W (Nr. 2408) (5x)
 Angrenzender Knorpel (A) gefolgt von Übergangszone (Ü) und Implantatzzone (I)

3.2.4.2. Auswertung ICRS 2 – mikroskopische Bewertung

Die ICRS 2 Bewertung wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten erhoben, um die Intra-Rater-Reliabilität zu kontrollieren. Hierbei wurde eine hohe Korrelation der beiden Messungen bestätigt ($r_s = ,945$, $p = ,0001$), somit wurde der arithmetische Mittelwert der beiden Messungen zur Auswertung herangezogen. Der Median der ICRS 2 Bewertung betrug für die Präparate der 4. Woche $0,00 \pm 0,90$. Dieser Wert wich deutlich von der im Median etwas besseren ICRS 1 Kategorie „abnormal“ ab, da hier zwar häufiger als in der 12. Woche ein makroskopisch gefüllter Defekt vorlag (s. Abb. 24a und b), dieser jedoch weicheres Füllgewebe mit wenig hyalinen Eigenschaften enthielt (s. R+4W in Abb. 25:). Der Median der Präparate in der 12. Woche lag bei $34,38 \pm 74,69$ und in der 24. Woche bei $78,75 \pm 15,00$, die 24-Wochen-Gruppe zeigte somit eine weniger breite Streuung der Knorpelbewertung (s. Tab. 6).

Innerhalb der Präparate der 4. Woche fiel die Kategorie „Entzündung“ auf, da hier in für die Gruppe ein auffällig hoher Interquartilbereich (IQR) von 30,0 errechnet wurde, die jedoch nicht signifikant ($p = ,601$) mit der Gesamtbeurteilung korrelierte. Vergleichbares konnte bei den „Chondrozyten Clustern“ in der 24. Woche beobachtet werden mit einem IQR von 62,0, auch hier korrelierten die Werte nicht signifikant mit der Gesamtbeurteilung ($p = ,104$). Bei der „Matrixfärbung“ mit gleichfalls hohem IQR (63,0) in der 24. Woche wurde jedoch eine signifikante positive Korrelation mit der Gesamtbeurteilung errechnet ($r = ,720$, $p = ,008$).

Zwischen Resovist[®]-markierten und unmarkierten Präparaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p_{xgesamt} = ,888$, $p_{x4W} = ,699$, $p_{x12W} = ,485$, $p_{x24W} = ,999$). Jedoch zeigten sich die ICRS 2 Werte mit verschiedenen *in vivo* Standzeiten signifikant unterschiedlich ($p = ,0001$). Im Subgruppenvergleich zeigte sich dieser signifikante Unterschied zwischen allen Wochen ($p_{4W-24W} = ,0002$, $p_{4W-12W} = ,018$, $p_{12W-24W} = ,048$) (s. Abb. 27). Beim Betrachten der Unterkategorien, welche den ICRS 2 ausmachen, war für den Vergleich der Resovist[®]-markierten und unmarkierten Gruppen übereinstimmend mit der Gesamtbeurteilung kein signifikanter Unterschied zu finden. Auch der Vergleich der Wochengruppen mit verschiedenen *in vivo* Standzeiten erbrachte im Einklang mit der Gesamtbeurteilung für alle Unterkategorien signifikante Unterschiede (s. Tab. 7).

Hierbei stachen die Unterkategorien „Basale Integration“, „Vaskularisierung innerhalb des Regenerats“ sowie die „oberflächliche“ und „tiefe“ Bewertung besonders hervor, da sie über alle Subgruppenvergleiche der Wochen und somit zunehmender *in vivo* Standzeit signifikante Unterschiede zeigten (s. Tab. 7). Die Unterkategorien „Entzündung“ und „Ossifizierung innerhalb des Regenerats“ zeigten vor allem im Vergleich mit der 4. Woche signifikante Unterschiede ($p_{Entz4W-12W} = ,002$, $p_{Oss4W-12W} = ,001$, $p_{Entz4W-24W} = ,00001$, $p_{Oss4W-24W} = ,0000002$), eine Verbesserung der Bewertung war somit früher zu sehen. Auch die Kategorien „Matrixfärbung“ und „Zellmorphologie“ zeigten einen frühen Anstieg in der

Bewertung ($p_{Matrix4W-12W} = ,009$, $p_{ZMorph4W-12W} = ,019$, $p_{Matrix4W-24W} = ,00004$, $p_{ZMorph4W-24W} = ,00003$).

Bei den Unterkategorien „Gewebemorphologie“, „Chondrozyten Cluster“, „Oberflächenarchitektur“, „Verknöcherungsgrenze“ sowie „subchondralen Knochenabnormalitäten“ hingegen zeigten sich die signifikanten Veränderungen später. Sie waren im Vergleich zur 24. Woche, jedoch nicht bereits schon im Vergleich zwischen der 4. und 12. Woche, signifikant verschieden (s. Tab. 7) ($p_{GMorph4W-24W} = ,00004$, $p_{Cluster4W-24W} = ,0005$, $p_{OArch4W-24W} = ,00003$; $p_{GMorph12W-24W} = ,023$, $p_{Cluster12W-24W} = ,002$, $p_{OArch12W-24W} = ,021$). Im Hinblick auf die hyalin-ähnlichen Eigenschaften jedoch sprach dies ebenfalls für eine zunehmende Differenzierung des Gewebes mit längerer *in vivo* Standzeit.

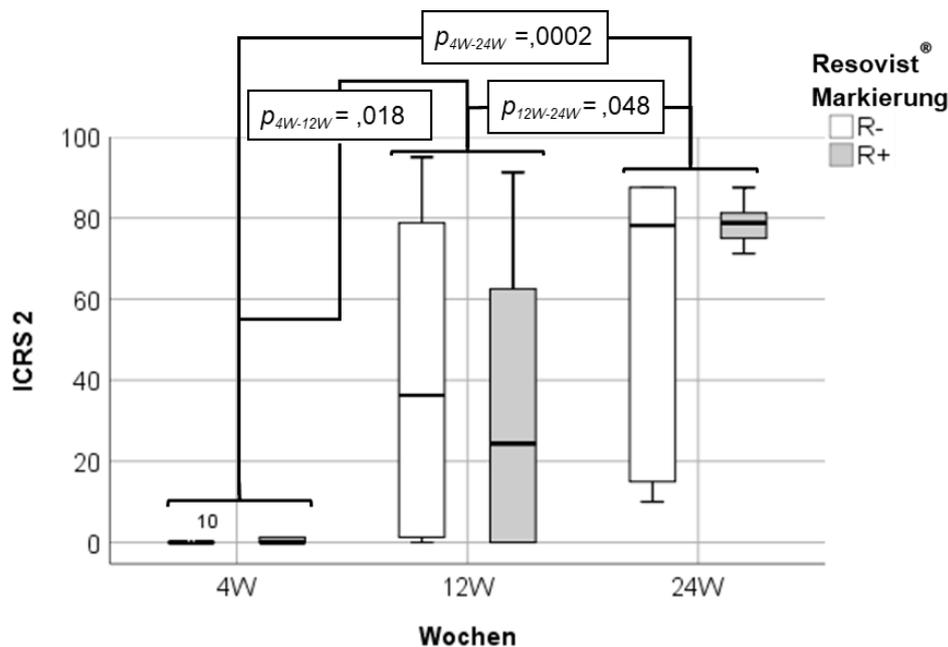


Abb. 27: Darstellung der ICRS 2 Gesamtbeurteilung in den verschiedenen Wochengruppen

Anhand einer visuellen Analogskala wurden für jede Unterkategorie eine Bewertung durchgeführt, welche zur Gesamtbeurteilung des Regenerats in Hinblick auf hyalin-ähnliche Eigenschaften und Erscheinung führte. Zwischen den verschiedenen *in vivo* Standzeiten zeigten sich signifikante Unterschiede ($p_{4W-24W} = ,0002$, $p_{4W-12W} = ,018$, $p_{12W-24W} = ,048$). Es wird deutlich, dass eine längere *in vivo* Standzeit einen höheren ICRS 2 erzielte.

	Median ± Interquartilbereich		
	4W	12W	24W
Gewebemorphologie	7,5 ± 9,0	47,5 ± 80,0	90,0 ± 21,0
Matrixfärbung	0,0 ± 0,0	11,3 ± 51,0	42,5 ± 63,0
Zellmorphologie	10,0 ± 5,0	37,5 ± 76,0	85,0 ± 10,0
Chondrozyten Cluster	100,0 ± 5,0	45,0 ± 88,0	55,0 ± 62,0
Oberflächenarchitektur	2,5 ± 5,0	22,5 ± 78,0	80,0 ± 9,0
Basale Integration	0,0 ± 0,0	65,0 ± 53,0	100,0 ± 0,0
Verknöcherungsgrenze	0,0 ± 0,0	2,5 ± 53,0	76,3 ± 26,0
Subchondrale Knochenabnormalitäten/Knochenmarksfibrose	95,0 ± 4,0	67,5 ± 25,0	70,0 ± 23,0
Entzündung	40,0 ± 30,0	83,8 ± 43,0	100,0 ± 0,0
Ossifizierung innerhalb des Regenerats	0,0 ± 0,0	80,0 ± 63,0	100,0 ± 5,0
Vaskularisierung innerhalb des Regenerats	0,0 ± 0,0	25,0 ± 46,0	62,5 ± 28,0
Oberflächliche Bewertung (Oberes Drittel)	0,0 ± 2,0	21,3 ± 61,0	77,5 ± 16,0
Mittlere/Tiefe Bewertung (Untere 2/3)	0,0 ± 0,0	22,5 ± 59,0	78,8 ± 18,0
Gesamtbeurteilung	0,0 ± 0,9	34,4 ± 75,0	78,8 ± 15,0

Tab. 6: Aufstellung der Mediane und Interquartilbereich der einzelnen ICRS 2 Unterkategorien

Mit längerer *in vivo* Standzeit war eine Verbesserung der Bewertung für hyaline Knorpel Eigenschaften zu erkennen.

Asymptotische Signifikanz in der Verteilung über die Kategorie "Wochen"	Gesamtvergleich	Subgruppenvergleich		
		4W-12W	4W-24W	12W-24W
Gewebemorphologie	***	n.s.	***	*
Matrixfärbung	***	*	***	n.s.
Zellmorphologie	***	*	***	n.s.
Chondrozyten Cluster	**	n.s.	***	**
Oberflächenarchitektur	***	n.s.	***	*
Basale Integration	**	**	***	*
Verknöcherungsgrenze	*	*	***	**
Subchondrale Knochenabnormalitäten/ Knochenmarksfibrose	*	n.s.	**	*
Entzündung	***	**	***	n.s.
Ossifizierung innerhalb des Regenerats	*	**	***	n.s.
Vaskularisierung innerhalb des Regenerats	**	**	***	*
Oberflächliche Bewertung (Oberes Drittel)	***	*	***	*
Mittlere/Tiefe Bewertung (Untere 2/3)	***	*	***	*
Gesamtbeurteilung	***	*	***	*

*** wenn $p \leq ,0005$, ** wenn $p \leq ,005$, * wenn $p \leq ,05$ n.s. wenn nicht signifikant verschieden

Tab. 7: Nichtparametrische Testung der Verteilung der ICRS 2 Unterkategorien über die Wochengruppen

Mit längerer *in vivo* Standzeit unterschieden sich alle Unterkategorien signifikant. Im Subgruppenvergleich zeigte sich dieser Unterschied in allen Kategorien zwischen den Präparaten der 4. und 24. Woche unabhängig der Markierung. Anfangs, zwischen der 4. und 12. Woche zeigten „Matrixfärbung“, „Zellmorphologie“, „Entzündung“ und „Ossifizierung“ signifikante Unterschiede. Für „Gewebemorphologie“, „Chondrozyten Cluster“, „Oberflächenarchitektur“ sowie „subchondrale Knochenabnormalitäten“ traten die signifikanten Differenzen erst mit längerer *in vivo* Standzeit auf.

3.2.5. Zusammenfassung ICRS Bewertungen

Sowohl die ICRS 1 als auch ICRS 2 Bewertung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Präparaten.

Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen den *in vivo* Standzeiten für beide Bewertungsskalen und alle Unterkategorien. Hierbei fiel bei der ICRS 1 Bewertung auf, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der 4. und 12. Woche gab, die 4. und 24. Woche sowie 12. und 24. Woche sich jedoch signifikant verschieden präsentierten. Dies spricht im Gesamten betrachtet für eine fortschreitenden Differenzierung der Regenerate mit zunehmender *in vivo* Standzeit.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Kontrastmittelmarkierung von Stammzellen nach Implantation in einen Knorpeldefekt keinen signifikanten Einfluss auf die histologischen Eigenschaften des Regeneratgewebes hatte. Unter den analysierten genetischen Expressionsraten bildete Kollagen X eine Ausnahme, indem signifikante Unterschiede zwischen den Markierungsgruppen auftraten, welche jedoch im Subgruppenvergleich nicht bestätigt werden konnten. Alle weiteren Differenzierungs-, Dedifferenzierungs- und Entzündungsmarker zeigten keinen signifikanten Einfluss der Resovist®-Markierung. Somit können markierte Zellen grundsätzlich für die Beurteilung einer Zellintegration und damit möglicherweise auch Zelllokalisierung im Rahmen einer *in vivo* MRT-Bildgebung verwendet werden. Zudem konnten die in dieser Arbeit angewendeten Markierungen *ex vivo* über einen Zeitraum von 4 Wochen zuverlässig histologisch nachgewiesen werden.

Allogene Stammzellen (MSC), die alle *in vitro* mit dem fluoreszierenden Protein (eGFP) transduziert wurden, wurden zur Hälfte mit dem Eisen-Kontrastmittel Resovist® markiert. Diese wurden in einem Kaninchenmodell, eingebettet in einem Fibringerüst als Gewebeträger, in einen chirurgisch gesetzten Knorpeldefekt implantiert. *Ex vivo* erfolgte der histologische Nachweis des Kontrastmittels sowie eine Bewertung des entstandenen Regeneratgewebes nach 4, 12 und 24 Wochen. Ergänzt wurde dies durch mikrobiologische Analysen mittels RT-PCR.

Der histologische Nachweis des Resovist® und eGFP gelang in der 4. Woche nach Implantation uneingeschränkt, in der 12. postoperativen Woche jedoch nur in Defekten mit Fibrin-Stammzell-Implantatresten. Sowohl bei der makroskopischen wie auch mikroskopischen Bewertung der Regenerate anhand der Kriterien der *International Cartilage Repair Society* (ICRS) wurde kein Einfluss der Resovist®-Markierung auf das entstehende Regeneratgewebe nachgewiesen. Nach 24 Wochen zeigten die histologischen Analysen einen im Niveau mit dem umgebenden Knorpel regenerierten Defekt mit hyalinen Gewebemustern. Weiterhin bestätigten die molekularbiologischen Analysen der Differenzierungsmarker diese Ergebnisse und zeigten zudem einen signifikanten Anstieg der relativen Expressionsraten im zeitlichen Verlauf. Dieser Anstieg trat tendenziell in den unmarkierten Proben früher und deutlicher als in den Resovist®-markierten Proben auf, war jedoch in keinem Fall signifikant unterschiedlich. Differenzierungsmarker der unmarkierten Proben erreichten häufiger im Mittel höhere Expressionsraten als der unbehandelte Referenzknorpel. Der Dedifferenzierungsmarker Kollagen I und die Entzündungsmarker zeigten gleichfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben. Lediglich der Dedifferenzierungsmarker Kollagen X zeigte eine

signifikant höhere Expressionsrate in den unmarkierten Proben, jedoch blieb die Expressionsrate unter der des unbehandelten Referenzknorpels und der signifikante Unterschied konnte im Subgruppenvergleich nicht detailliert werden. Abschließend kann von einer Bestätigung der hier vorliegenden Fragestellung ausgegangen werden. Eine Zellmarkierung mit Resovist® für experimentelle Stammzelltherapie in der Knorpelheilung war möglich und nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Regeneration des Defekts und des entstehenden Regeneratgewebes mit hyalinen Knorpel Eigenschaften.

4.1. Nachweis markierter Zellen

Um eine nicht-invasive *in vivo* Beurteilung implantierter Stammzellen zu ermöglichen, ist ein *ex vivo* Nachweis essenziell. Entscheidende Fragestellungen hierzu sind, ob und wie lange das Kontrastmittel in den implantierten Zellen verweilt. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit histologische Analysen durchgeführt. Der Nachweis des Kontrastmittels Resovist® gelang mithilfe der Berliner Blau Färbung, die sich ausschließlich in den Resovist®-markierten Präparaten positiv (BB+) zeigte. Unmarkierte Präparate ergaben erwartungsgemäß keinen Berliner Blau Nachweis. Eine zuverlässige Färbung und somit auch ein Nachweis konnte jedoch nur in der 4. Woche nach Implantation bestätigt werden. Die Färbung zeigte oft BB+ Objekte, welche sich in den mikroskopisch identifizierbaren Implantatresten befanden. In der 12. postoperativen Woche waren lediglich zwei Präparate schwach positiv, es handelte sich hierbei um wenig gefüllte Defekte mit niedrigen ICRS-Bewertungen, somit ist von einem Nachweis nur bei Implantatresten auszugehen. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen von Quintavalla et al. (2002, S. 116-8) der in boviden Gelenkknorpeldefekten einen Verlust der implantierter MSC über 14 Tage mit Marginalisierung und einen Verbleib der übrigen MSC in einem Gelatineträger gezeigt hatte. Berninger et al. (2019, S. 6-7) konnten in einer *in vitro* Studie im MRT das gleiche Muster beobachten. In den Fibrin-Zell-Clots, die in gleicher Weise für die vorliegende Arbeit hergestellt wurden, zeigten *in vitro* MRT-Analysen eine randständige Hypointensität. Diese könnte durch eine vermehrte Ansammlung der Zellen im Sinne einer verstärkten Migration der MSC im Fibrin-Clot hin zum Rand des Implantates hervorgerufen worden sein. Bei der unmittelbar nach Herstellung der Fibrin-Zell-Implantaten durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie war initial auch hier eine gleichmäßige Verteilung zu beobachten. Berninger et al. (2019, S. 8) vermuteten jedoch bei der weiteren Ausfällung des Clots und Integration in den Defekt eine Umverteilung der MSC zum Rand des Implantates hin. Die Hypothese wird durch weitere Studien gestützt, welche zum einen eine Veränderung der Steifigkeit des Fibrins durch Zellproliferation (Duong et al., 2009, S. 1875) sowie zum anderen eine Zellmigration von weichem zu hartem Substrat hin zeigten (Lo et al., 2000, S. 147), im vorliegenden Falle dem zuerst gefestigten Rand des Implantates. Hierfür sprachen auch die in der 12. Woche histologisch nachgewiesenen, deutlich randständigeren Objekte

im Vergleich zur 4. Woche postoperativ. In der 12. Woche waren in 4 von 6 Resovist®-markierten Präparaten sowie in allen Präparaten der 24. Woche keine BB+ Objekte nachweisbar. Dies könnte durch Externalisierung des Resovist® oder Migration der MSC aus dem Defekt heraus erklärt werden. Auch die Apoptose der implantierten MSC ist nicht auszuschließen. Mögliche Erklärungen werden im Folgenden weiter erörtert.

4.1.1. Verbleib der markierten Zellen

Die markierten Zellen könnten im Verlauf der Differenzierung das Resovist® externalisiert haben und die MSC Teil des sich entwickelnden Regeneratgewebes geworden sein. Henning et al. (2012, S. 206) zeigten genau diesen Ansatz im Rattenmodell, bei dem mit fortschreitender Zeit das MRT Signal des Resovist® nachließ und der Signalverlust mit der Zellproliferation korrelierte. Tatebe et al. (2005, S. 526) hatten im Kaninchenmodell einen Signalverlust eines Fluoreszenzmarkers PKH26 trotz MSC-Integration im Regenerat nachgewiesen. Jedoch stellten Li et al. (2013, S. 343) die Spezifität des benutzten Markers PKH26 in Frage, da sie im Rattenmodell *in vitro* und *in vivo* nach Injektion markierter Zellen Fluoreszenz in unmarkierten Zellen und Gewebe nachweisen konnten. Somit kann bei Tatebe et al. nicht uneingeschränkt von einer MSC-Integration ausgegangen werden.

Auch ist, wie bereits mehrfach publiziert (Delling et al., 2015, S. 2379; Jing et al., 2008, S. 436; Quintavalla et al., 2002, S. 116-8), eine Migration der implantierten und injizierten MSC in die Synovialflüssigkeit oder dem subchondralen Raum nicht auszuschließen. Eine Analyse der Synovialflüssigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, stellt aber einen interessanten Versuchsansatz dar, der zum Beispiel durch eine Punktion des Kniegelenkes für zukünftigen Studien durchaus umsetzbar erscheint. Delling et al. (2015, S. 2384) zeigten, dass MSC, die mit superparamagnetischen Eisenoxiden (SPIO) markiert und intraartikulär in ein ovines Osteoarthritismodell über Gelatineträger eingebracht wurden, über 12 Wochen im MRT nachzuverfolgen waren. Jedoch war hier nur ein Nachweis in umliegendem Gelenkgewebe, nicht aber im Knochen oder Knorpel möglich. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Jing et al. (2008, S. 436), aber auch hier war die genaue Lokalisation aufgrund einer niedrigauflösenden Bildqualität und einer Überlagerung anatomischer Details mit Artefakten nicht möglich.

Auffällig war in der vorliegenden Arbeit der gleichgerichtete Verlust des eGFP- und Resovist®-Nachweises. Obwohl Oshima et al. (2005, S. 212) GFP erfolgreich in einem Rattenmodell auch nach 24 Wochen nachweisen konnten, sahen sie histologisch einen deutlichen Signalverlust bis auf etwa 15-20%. Mak et al. (2016, S. 3-6) injizierten in ihrer Studie eGFP-markierte MSC in das Kniegelenk von Mäusen, in das sie in einem vorherigen Eingriff umschriebene Knorpeldefekte gesetzt hatten. Bereits nach 4 Wochen ließ sich histologisch kein eGFP intraartikulär nachweisen. Jedoch zeigten sich nach 2 Wochen in den Defekt integrierte MSC mit kontinuierlichem Verlust der Expression von MSC spezifischen

Markern. Dies würde die Hypothese der Minderung der eGFP-Expression bei fortschreitender Differenzierung unterstützen.

De Windt et al. (2017, S. 260) konnten in einer klinischen Studie darlegen, dass nach einem Jahr keine DNA mehr von allogenen MSC, welche zusammen mit autologen Chondronen implantiert wurden, im Regenerat nachzuweisen war. Somit stellt sich die Frage, ob eine parakrine Interaktion der Stammzellen nicht ausschlaggebend für die Knorpeldefektregeneration war und daher über einen längeren Zeitraum kein Nachweis implantierter Zellen gelang. Sofern dies der Fall wäre, könnte ein *in vivo* Nachweis mittels MRT hilfreich sein, um einen möglichen Untergang oder Migration der implantierten Zellen zu verfolgen.

Da auch unmarkierte MSC mittels eGFP transduziert und anschließend implantiert wurden und auch bei diesen Zellen das eGFP-Signal im weiteren Verlauf nicht zu verfolgen war, erscheint es wahrscheinlich, dass die Resovist[®]-Markierung keinen Unterschied im Zellverbleib und der Integrationsfähigkeit hervorrief, wie auch durch Farrell et al. (2009, S. 966) und Henning et al. (2012, S. 207-8) gezeigt wurde.

4.1.2. Methodische Limitationen des Nachweises markierter Zellen

Ein weiterer Ansatz für den Signalverlust kann in der Methodik gesucht werden. Die hier verwendete Fixierung in Methanol könnte für ein mögliches Auswaschen des zytoplasmatisch vorliegenden eGFP und Resovist[®] mitverantwortlich gewesen sein. Membranstrukturen könnten durch das Auswaschen von Lipiden gestört worden sein, welches zum Verlust beider Stoffe geführt haben könnte (Hobro & Smith, 2017, S. 38-40; Schnell et al., 2012, S. 156). Käme ein erniedrigter eGFP Gehalt im Zytoplasma durch eine abnehmende Genexpression aufgrund der Differenzierung der Zellen hinzu (Oshima et al., 2005, S. 211-2), könnte ein Auswaschen zum totalen Verlust des Signals geführt haben. Übereinstimmend mit dieser Theorie konnte bei histologischer Betrachtung der markierten Zell-Fibrin-Implantate direkt nach der Herstellung präoperativ deutlich mehr positive Objekte als in den postoperativen *in vivo* Präparaten identifiziert werden, jedoch immer noch deutlich weniger positive Objekte als die Fluoreszenzmikroskopie präoperativ zeigte.

Eine Beschädigung des GFP durch reaktive Sauerstoffspezies, welche bei Eisenüberladung entstehen können, zeigten Alnuami et al. (2008, S. 185-6), jedoch wurde bei diesem Versuch der pH Wert für Fixierung und Entkalkung innerhalb der beschriebenen Werten gehalten. Zu dem haben van Buul et al. (2011, S. 4) bereits erfolgreich SPIO und eGFP zusammen verwendet, welches eine Beschädigung durch das SPIO auszuschließen scheint.

Bezüglich der Fixierung zeigte Schnell et al. (2012, S. 152), dass eGFP in der immunhistochemischen Färbung nicht die Verteilung wiedergab, die vor Fixierung zu sehen

war. Dies bestätigt die Studie von Hoetelmans et al. (2001, S. 347), welche bei Methanolfixierung eine Schädigung intrazellulärer Strukturen beschrieb. Auf dieses Studiendesign ist jedoch der vorgeschlagene *in situ* eGFP Nachweis nicht anwendbar, da das Gewebe zur Mikroskopie geschnitten werden muss. Auch ist bekannt, dass Prozessvariablen, wie z.B. die Länge der Fixierung die Immunreaktivität beeinflusst (Hoetelmans et al., 2001, S. 347; Mainil-Varlet et al., 2010, S. 889). Ein Faktor, der bei der hier vorliegenden Studie nicht beachtet werden konnte, da die Präparate fixiert und entkalkt werden mussten. Auch wurde von der ICRS eine Entkalkung in 10%igem EDTA mit 0.1%igem Paraformaldehyd oder 0.5N Salzsäure empfohlen (Hoemann et al., 2011, S. 158). In der vorliegenden Arbeit wurde gemäß den üblichen Protokollen des Labors 20%ige EDTA Lösung verwendet. Dies minderte möglicherweise die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit weiteren Studien.

Ein stammzellenspezifischer Oberflächenmarker wie beispielsweise CD105, CD73 und CD90 wäre möglicherweise für die Lokalisation der MSC nach Integrierung des Implantats von Vorteil (Dominici et al., 2006, S. 316). Durch die Änderung des Phänotypen im Verlauf der Differenzierung würde sich die Festlegung auf einen konstanten Marker aber als schwierig gestalten (Augello & De Bari, 2010, S. 1228; Strioga et al., 2012, S. 2725). Da allogene Stammzellen verwendet wurden, könnten die Regeneratzellen mit Teilen der allogenen DNA verglichen werden, um somit das Entstehen des Regeneratgewebes aus den implantierten Zellen zu beweisen oder gegenteilig eine Integration der implantierten MSC auszuschließen wie es De Windt et al. (2017, S. 260-1) bereits in einer klinischen Studie gelang. Hierzu wurden allogene MSC mit autologen Chondronen gemeinsam in einem Fibringerüst in Knorpeldefekte des Kniegelenks eingebracht und das Regenerat im Anschluss auf allogene DNA überprüft.

In Hinblick hierauf ist der ausstehende Vergleich mit den in dieser Studie gewonnenen MRT-Bildern von großem Interesse, da ein Fortbestehen des Signals über die 12. Woche hinaus neue methodische Ansätze für den *ex vivo* Nachweis wie zusätzliche Identifikation über spezifische Marker oder DNA fordern würde.

Erwähnenswert sind Versuche zur Etablierung einer Kolo-kalisation von eGFP und Resovist® auf ein und demselben Objektträger durch Kombination der histologischen und immunhistochemischen Färbung. Dies gelang bei Adhärenz an die verwendeten Protokolle nicht. Modifikation wie beispielsweise Änderung des Fluoreszenzfarbstoffes zur Detektion für größeren Kontrast oder Erhaltung der eGFP-Autofluoreszenz könnten diese möglich machen und somit eine eindeutige Kolo-kalisation der Nachweise ermöglichen.

Im Vergleich mit einigen neueren Studien (Delling et al., 2015, S. 2382; Mak et al., 2016, S. 11) wurden beim Studiendesign keine reinen Fibrinimplantate oder Leerdefekte als Kontrollen mitverfolgt. Es wurde gesunder Knorpel eines kontralateralen Knies als Kontrolle

verwendet. Dies kann als methodische Schwäche gesehen werden, da nicht nachgewiesen werden konnte, inwieweit ein Kontrolldefekt abweichend im Sinne einer endogenen Regeneration verheilt wäre und welche Rolle MSC dabei gespielt haben könnten. Jedoch gilt zu beachten, dass der primäre Endpunkt der Studie nicht die Therapieoptimierung oder Erforschung des Einflusses der Stammzellen auf die Regeneration war, sondern es wurde experimentell observant die Plausibilität einer nicht-invasiven Stammzellmarkierung bei Knorpeldefekttherapien geprüft.

4.2. Einfluss der Resovist®-Markierung auf die Knorpeldefektheilung

Bereits in Vorversuchen war kein differenzierungshemmender Effekt der Resovist®-Markierung an Zellen *in vitro* sowie im Mausmodell *in vivo* gezeigt worden (Henning et al., 2012, S. 198-208; Henning et al., 2009, S. 8; Salzmänn et al., 2011, S. 5817-8). Dies deckte sich mit dem wissenschaftlichen Konsens (Jasmin et al., 2011, S. 6; Sun et al., 2012, S. 318-9; Yang et al., 2011, S. 448). Auch in der vorliegenden Studie konnten weder in der histologischen noch der mikrobiologischen Aufarbeitung signifikante Unterschiede des entstandenen Regeneratgewebes zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Zellimplantaten beobachtet werden.

4.2.1. Histologische Beurteilung der Knorpeldefektheilung

Zu Beginn der *ex vivo* Aufarbeitung erfolgte eine makroskopische Beurteilung des Defektareals, welches mittels der semiquantitativen ICRS 1 Bewertung objektiviert wurde. Die Präparate der 4. und 12. postoperativen Woche erzielten lediglich im Mittel Werte, die die Regenerate als „abnormalen“ (4W) bzw. „stark abnormalen“ (12W) hyalinen Knorpel klassifizierte. Dieser Befund hatte sich in der 24. Woche auf „fast normalen“ Knorpel verbessert. Zeitlich gesehen korrelierte diese Beobachtung gut mit der Induktion der Expressionsrate der Differenzierungsmarker im Vergleich mit unbehandeltem Referenzknorpel, welche meist erst in der 24. Woche beobachtet wurde. Der im Median in der 12. Woche schlechtere ICRS 1 Wert hatte möglicherweise seinen Ursprung in dem meist doppelt so großen Interquartilbereich der Ergebnisse im Vergleich zur 4. und 24. Woche.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der ICRS 1 Bewertung zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Proben festgestellt werden. Somit konnte die Hypothese, dass die Resovist®-Markierung keinen Einfluss auf die Knorpelheilung hatte, zumindest für diese makroskopische Beurteilung bestätigt werden. Auch die signifikante Verbesserung in der ICRS 1 Bewertung bis zur 24. Woche wies darauf hin, dass die Markierung keinen negativen Einfluss auf die Defektheilung und das Regenerationspotential zu nehmen schien.

Die im Median etwas bessere Beurteilung der Proben in der 4. gegenüber der 12. Woche lag in den Unterkategorien des ICRS 1 begründet. Unter „Grad der Defektheilung“ wird die Tiefe der Defektheilung, beginnend bei „0% der Defekttiefe“ bis auf „gleiches Niveau mit dem umliegenden Knorpel“, bewertet. Bei noch bestehender Füllung des Defektes mit dem Implantat wird ein höherer Wert als beispielsweise bei beginnender Regeneration mit Implantatschrumpfung erzielt. Dies stellt eine Limitation der ICRS 1 Bewertung dar. Hierbei ist zu beachten, dass die ICRS 1 Bewertung primär zur intraoperativen Beurteilung des Knorpels bei Arthroskopien klinisch eingesetzt wird, es jedoch Ansätze gibt, diesen mit MRT-Bildgebung zu korrelieren (Figuroa et al., 2007, S. 314; Goebel et al., 2012, S. 1052-3; Itsubo et al., 2014, S. 1974-5; Kohyama et al., 2018, S. 6). Dies würde eine explorative Arthroskopie ersetzen, ein Ziel, welches an das nicht-invasive Tracking, wie hier untersucht, anknüpft. Daher wurde trotz der obengenannten Limitation die ICRS 1 Bewertung für diesen Versuch selektiert. Geläufige Alternativen in Tiermodellen wie „*O'Driscoll Score*“ (O'Driscoll et al., 1988, S. 595-604) oder „*Pineda Scale*“ (Pineda et al., 1992, S. 335-9) benötigen zudem Angaben zur mikroskopischen Zellmorphologie, welche für eine Übertragung auf MRT-Bilder ungeeignet ist.

In der Literatur wird für (tier)experimentelle *in vivo* Studien im Bereich der Knorpelregeneration zudem die mikroskopische ICRS 2 Bewertung empfohlen (Hoemann et al., 2011, S. 158; Rutgers et al., 2010, S. 18-9). Diese Bewertung zeichnet sich durch höhere Reproduzierbarkeit aus (validiert in Mainil-Varlet et al., 2010, S. 889), benötigt jedoch eine invasive Probenentnahme bis zum subchondralen Knochen und mehrere histologische Färbungen, vergleichbar mit den bereits genannten „*Pineda Scale*“ und „*O'Driscoll Score*“. Sie kam in der vorliegenden Studie als Ergänzung und Überprüfung der Ergebnisse der ICRS 1 Bewertung ebenfalls zum Einsatz.

In der vorliegenden Studie zeigte die ICRS 2 Bewertung, gleichfalls wie die ICRS 1 Bewertung, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resovist[®]-markierten und unmarkierten Präparaten. Die mikroskopische ICRS 2 Bewertung fiel in der 4. postoperativen Woche deutlich niedriger aus als die ICRS 1 Werte. Ein Grund hierfür ließ sich möglicherweise in der Fehlannahme eines höheren ICRS 1 Wertes finden (s.o.), welche durch die noch vorhandenen Implantatfüllung des Defekts bedingt waren, die jedoch zu diesem Zeitpunkt bezüglich der Gewebequalität insuffizient waren. Die signifikante Verbesserung der ICRS 2 Bewertung mit zunehmender *in vivo* Standzeit, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Resovist[®]-markierten und unmarkierten Präparaten, bestätigte eine durch die Resovist[®]-Markierung unbeeinflusste Defektregeneration. Die Ergebnisse deckten sich mit ähnlichen Studien im Kaninchenmodell (Qi et al., 2014, S. 1427; Yan & Yu, 2007, S. 181), die über den Verlauf von 6 zu 12 Wochen hin eine deutliche Besserung der Knorpelqualität des Regenerats mit unmarkierten Stammzellen erzielten.

Weitere Studien wie Tay et al. (2012, S. 86) zeigten 24 Wochen nach allogener MSC Implantation im Kaninchenmodell eine Besserung der Regenerateigenschaften, jedoch ohne Vergleiche mit vorherigen Zeitpunkten.

Einzelne Unterkategorien der ICRS 2 Bewertung sind hervorzuheben. Die Unterkategorie „Entzündung“ zeigte in der ICRS 2 Bewertung einen großen Interquartilsabstand in der 4. Woche postoperativ. Das Auftreten einer Entzündung wurde bei Vorhandensein von Lymphozyten oder Plasmazellen als negativ bewertet und erzielte niedrige Werte auf der visuellen Analogskala. Ein Zusammenhang mit einer schlechten Defektfüllung, einer Korrelation mit der Gesamtbeurteilung oder der Expression von IL-1 β und TNF- α , konnte nicht bestätigt werden. Bereits bei der Erstellung des Bewertungsschemas durch Mainil-Varlet et al. (2010, S. 884) gestaltete sich die Bewertung in der Kategorie „Entzündung“ als schwierig und konnte statistisch nicht ausgewertet werden. Trotzdem wurde die Kategorie „Entzündung“ hinzugefügt, da man von einem Informationsgewinn ausging vor allem für Studien, welche *Tissue Engineering* anhand von Gerüsten und/oder allogene/xenogenen Zellen untersuchten (Mainil-Varlet et al., 2010, S. 885). Das Vorhandensein der Leukozyten ist durch die allogene Herkunft der Zellen sowie das operative Trauma nicht überraschend, möglicherweise wurden die in der 4. Woche vorhandenen Leukozyten durch den immunomodulierenden Effekt der MSC umverteilt oder gehemmt (Gao et al., 2016, S. 2; Weiss & Dahlke, 2019, S. 5). Dies könnte ihr Fehlen in der 12. und 24. Woche erklären. Auch ist eine aktive Rolle der Leukozyten an der Rekrutierung weiterer Immunzellen und Wandlung der pro-inflammatorischen zu einer pro-regenerativen Antwort denkbar (Armiento et al., 2018, S. 8). In der 12. und 24. Woche war zudem mehr Regeneratgewebe entstanden, dessen mikroskopisch dichtere Matrix eine Leukozytenmigration behindert haben könnte (Smith et al., 2015, S. 3-4).

Die Unterkategorie „Chondrozyten Cluster“ zeigte in der 24. Woche eine große Streuung, welche sich im hohen Interquartilsabstand widerspiegelte. Es ist für die isolierte Betrachtung der Knorpelregeneration ohne Entzündungsgeschehen nicht eindeutig geklärt, ob diese Zellansammlungen als negativ zu werten sind. In osteoarthritischem Knorpel sind Zellhäufungen (*Cluster*) oft auch als Zeichen erhöhter mitotischer Aktivität zu finden und können als Hinweise für Degenerationsprozesse bewertet werden (Price et al., 2002, S. 60). In der Literatur ist man sich bislang noch uneins, inwiefern ein Auftreten von „Chondrozyten Cluster“ im Regeneratgewebe als negativ zu bewerten ist, da bei einer Regeneration mitotische Aktivität im Rahmen der Zellvermehrung zu erwarten ist (Mainil-Varlet et al., 2001, S. S11). Trotzdem wurden sie als negativen Marker in die ICRS 2 Bewertung aufgenommen (Mainil-Varlet et al., 2010, S. 884).

Im Gegensatz hierzu ist bei starker „Matrixfärbung“ in der Safaranin O Färbung, einer weiteren Unterkategorie, von einer besseren Gesamtbeurteilung auszugehen. Eine stärkere

Färbung wird mit einem höheren Proteoglykangehalt assoziiert, welcher in hyalinem Knorpel vorliegt. Signifikante Unterschiede traten in der vorliegenden Arbeit nur im Vergleich der 4. Woche mit der 12. und 24. Woche auf. Im Median war jedoch trotzdem eine deutliche Zunahme der erzielten Werte zwischen den längeren *in vivo* Standzeiten von 12 und 24 Wochen zu sehen. Dies stimmte mit einer Vermehrung der proteoglykanhaltigen Matrix und somit fortschreitende Chondrogenese im Regenerat überein. Auch hier war eine große Streuung in den Präparaten der 24. Woche zu sehen. Zugrunde liegen könnte nach anfänglich schneller Steigerung eine zu diesem Zeitpunkt, noch nicht abgeschlossene Matrixproduktion durch das bradytrophe Knorpelgewebe da die Unterkategorie „Matrixfärbung“ trotzdem positiv mit der Gesamtbeurteilung korrelierte. Ein Verlust der proteoglykanhaltigen Matrix in manchen Präparaten nach längerer *in vivo* Standzeit scheint daher eher unwahrscheinlich.

Beim Betrachten der Eigenschaften, welche für eine vorangehende Differenzierung des Gewebes sprachen, fanden sich weitere Hinweise auf eine mit zunehmender *in vivo* Standzeit fortschreitende Chondrogenese. Die Unterkategorien „Gewebemorphologie“, „Oberflächenarchitektur“, „Chondrozyten Cluster“ sowie „subchondrale Knochenabnormalitäten“ verbesserten sich signifikant im Verlauf der Wochen, der signifikante Unterschied setzte erst später im Vergleich der 4. und 12. Woche zur 24. Woche ein. Dies war anhand der in der 24. Woche besser gefüllten eher differenzierten Defektregeneraten zu erwarten. Für die „Entzündung“ besserte sich die Bewertung früher signifikant, dies könnte auf abklingendes operatives Trauma zurückzuführen sein (s.o.). Auch war die frühere, signifikante Verbesserung der Bewertung für die Unterkategorien „Zellmorphologie“ eher zu Beginn des Regenerationsprozesses zu erwarten, da es zu vermehrter mitotischer Teilung kommen konnte. Dies deckte sich auch mit den molekularbiologischen Ergebnissen der Differenzierungsmarker, die ebenfalls einen signifikanten Anstieg bei längerer *in vivo* Standzeit zeigten.

4.2.2. Molekularbiologische Beurteilung der Knorpeldefektheilung

Durch das begrenzte Potential zur Eigenregeneration des Knorpeldefekts ist die Entwicklung von differenzierten und belastungsfähigen Regeneraten imperativ (Alford & Cole, 2005a, S. 295-8; Bedi et al., 2010, S. 999-1006; Gomoll et al., 2010a, S. 2487). Bestenfalls kommt es nach einer Stammzellimplantation zur chondrogenen Differenzierung der implantierten Zellen und Entwicklung eines Regeneratgewebes mit hyalin-ähnlichen Eigenschaften. Ein Endpunkt dieser Studie war die Prüfung des Einflusses der Resovist®-Markierung auf die implantierten Zellen hinsichtlich des Regenerationspotentials. Daher wurde zusätzlich zu den histologischen Analysen die Knorpelregenerierung und Zelldifferenzierung durch

Expressionsanalyse genspezifischer mRNA-Transkripte verfolgt und somit ein Effekt der Resovist®-Markierung teilweise ausgeschlossen. Betrachtet wurden neben Differenzierungsmarker auch Dedifferenzierungs- sowie Entzündungsmarker, welche in den folgenden Abschnitten detaillierter beschrieben werden (s. 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3). Für letztere konnte weder zwischen den *in vivo* Standzeiten noch im Vergleich zu Resovist®-unmarkierten Zellen ein signifikanter Anstieg der Expression von IL-1 β oder TNF- α nachgewiesen werden. Kollagen X zeigte, als einziger molekularbiologischer Marker, zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Zellen einen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Reduktion der Expressionsrate gegenüber unbehandeltem Referenzknorpel. Aufgrund der kleinen Subgruppen war die Entdeckungswahrscheinlichkeit zu gering einzuschätzen und somit konnte im Post-hoc Vergleich keine signifikante Aussage zwischen den verschiedenen *in vivo* Standzeiten gemacht werden.

Im Verlauf der 24 Wochen zeichnete sich eine signifikante Steigerung der Expressionsraten aller Differenzierungsmarker ab. Die vorliegenden Daten ergaben die Tendenz, dass für einige Genen die Expressionssteigerung in den unmarkierten Proben der 12. Woche deutlich ausgeprägter war und somit von einem früheren Anstieg ihrer genspezifischen Expression ausgegangen werden konnte. Dies zeigte sich für COMP, Kollagen II, Kollagen X und TNF- α . Die Unterschiede zu den Resovist®-markierten Proben waren jedoch nicht signifikant. Hier stiegen die Expressionsraten erst zwischen der 12. und 24. Woche merklich an, somit war der Anstieg in den Resovist®-markierten Proben tendenziell verzögert. Ein Einfluss der Markierung auf die Expressionsraten im zeitlichen Verlauf war aber nicht signifikant nachzuweisen, jedoch aufgrund der Tendenzen auch nicht komplett auszuschließen.

Die Steigerung der Expressionsrate mit zunehmender *in vivo* Standzeit deckt sich mit den histologischen Ergebnissen, die ebenfalls mit dem Zeitverlauf eine Verbesserung der Gewebemerkmale hin zu einem vorwiegend hyalin-ähnlichen Regeneratgewebe ohne hypertrophierende Zellen zeigten. Diese Erkenntnisse über die Gelenkknorpel-ähnliche Zellqualität sind zwar vielversprechend, jedoch zeigte Pestka et al. (2011, S. 784-5), dass es keinen direkten Zusammenhang der Zellqualität und des klinischen Outcomes in Patienten gab.

Die zentrale Hypothese, dass eine Markierung mit Resovist® keinen Einfluss auf die chondrogenen Differenzierung der implantierten Stammzellen hat, scheint jedoch hiermit bestätigt werden zu können.

4.2.2.1. Differenzierungsmarker

Mesenchymale Stammzellen sind nicht mehr aus dem Bereich des *Tissue Engineering* und der regenerativen Therapien wegzudenken. Ihre stärkste Eigenschaft ist hierbei ihre Multipotenz sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren (Watt & Huck, 2013, S. 467). Im Falle der Knorpelregeneration ist eine Differenzierung zu einem chondrogenen Phänotypen

gewünscht. Chondrozyten produzieren die sie umgebende Extrazellulärmatrix (EZM), welche grundlegend für die Biomechanik des Gelenkknorpels ist. Aggrecan und Kollagen Typ II bilden einen großen Anteil der EZM, daher eignen sie sich hervorragend als Marker der chondrogenen Differenzierung (Alford & Cole, 2005a, S. 296; Fox et al., 2009, S. 463; Marlovits et al., 2004, S. 285-6). Kollagen II bildet ein fibrilläres Netzwerk, typisch für hyalinen Gelenkknorpel, welches mitunter die Formhaltung bei Zug-, Scher-, Druck- und Drehbelastung bedingt (Fox et al., 2009, S. 463). Es hat zudem inhibitorische Effekte auf Chondrozyten und verhindert über Bindung an Integrin- β 1 und Hemmung von BMP-SMAD1 eine Hypertrophie und eine folgende Apoptose, wie sie beispielsweise bei Osteoarthritis beobachtet wird (Lian et al., 2019, S. 11-2; Shakibaei et al., 1997, S. 119). Aggrecan, ein strukturelles Proteoglykan, bietet für die Formhaltung und Belastbarkeit die viskoelastische Grundlage. Es bindet Wassermoleküle und verhindert bis zu einem gewissen Grad eine Umverteilung dieser, um Belastungen abzdämpfen (Kiani et al., 2002, S. 20). Zudem verhindert Aggrecan den Abbau des Kollagen-Fibrillen-Netzwerks (Li et al., 2018, S. 7). In der 4. Woche postoperativ wurde bei den implantierten MSC im Gegensatz zu unbehandeltem Referenzknorpel eine Herunterregulation von Aggrecan und Kollagen II gemessen. Eine mögliche Erklärung ist, dass zu diesem (frühen) Zeitpunkt eine ausreichende Differenzierung der Zellen noch nicht stattgefunden hatte und daher auch eine noch zu geringe Menge an EZM zu erwarten war. Dies deckte sich mit der geringen Matrixfärbung in den Präparaten der 4. Woche in der Safranin O Färbung. Die weitere Entwicklung der Aggrecan-Expressionsraten hin zur Annäherung an die Expression in unbehandeltem Referenzknorpel mit zunehmender *in vivo* Standzeit entsprach der Erwartung, wenn nach der 24. Woche hyalin-ähnlicher Knorpel vorläge. Die initiale Reduktion der Aggrecan-Expression ist bereits von Salzmann et al. (2011, S. 5814) anhand MACT im Kaninchenmodell und parallel *in vitro* beobachtet worden. Jedoch beschrieb Salzmann et al. nach 12 Wochen eine Induktion der Kollagen II-Expressionsrate in den Chondrozytenimplantaten. Diese konnte in dieser Studie im Vergleich zu unbehandeltem Referenzknorpel nur in den unmarkierten Proben der 12. Woche (R-12W) beobachtet werden. Hierbei fiel eine große Streuung der Expressionsraten des Kollagen II auf, mit einer Kongregation jeweils der Hälfte der Werte um das Maximum, sowie die Hälfte der Werte um das Minimum. Diese Verteilung war in keinem weiteren molekularen biologischen Marker wieder aufgetreten. Eine Erklärung für die nur zum Teil erhöhten Werte in der 12. Woche könnten die regulatorischen Effekte des Kollagen II auf die Chondrogenese sein. Wie oben beschrieben kann Kollagen II über Signalwege eine Hypertrophie und folgende Apoptose verhindern (Lian et al., 2019, S. 11-2; Shakibaei et al., 1997, S. 119). Möglicherweise erfolgte die Erhöhung der Kollagen II-Expression, um einen solchen Umbau zu verhindern. Eine weitere Erklärung könnte eine verstärkte mechanische Belastung des Knorpels in diesen

Versuchstieren gewesen sein, welche reaktiv zur Erhöhung der Expression des Kollagen II führten. Jedoch zeigten sie hinsichtlich des Gewichts, des Verhaltens und des wöchentlichen Monitoring keine Auffälligkeiten und auch mikroskopisch konnten für die drei extrem erhöhten Werte keine korrelierende Auffälligkeit gefunden werden.

Es bleibt festzuhalten, dass trotzdem der Unterschied in der Expressionsrate für Kollagen II zwischen den Resovist®-Gruppen R-12W und R+12W nicht signifikant verschieden war. Es kann von einer Tendenz zur früher beginnenden Steigerung der Kollagen II-Expression in den unmarkierten Proben gesprochen werden. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass die Änderung der Expressionsrate nicht signifikant durch die Resovist®-Markierung beeinflusst wird. Yang et al. (2011, S. 448) bestätigten ebenfalls diese Hypothese für Kollagen I und II *in vitro*, indem sie humane MSC mit verschiedenen Ferucabotran-Konzentrationen inkubierten und nach 3 wöchiger Kultivierung keinen Einfluss der Markierung auf die Kollagen I- oder II-Expression feststellen konnten. Auch Saha et al. (2013, S. 464-5) zeigten in ihrer *in vitro* Studie nach 7 Tagen für die Expressionsraten von Aggrecan, Kollagen II und Sox9 keine Unterschiede zwischen KM-markierten und unmarkierten Zellen. Die Studie wurde mit humanen BMSC sowie neonatalen und adulten Chondrozyten durchgeführt. Es kam in der Studie jedoch insgesamt zu einem anfänglichen Abfall der Sox9- und Kollagen II-Expression am Tag 2, weitere Messungen nach 7 und 14 Tagen waren unauffällig, eine Messung nach 4 Wochen wie in der vorliegenden Studie fand nicht statt. Daher steht die in der vorliegenden Studie beobachtete Erhöhung der Expressionsrate von Kollagen II nicht im kompletten Widerspruch zu den Ergebnissen von Saha et al. (2013, S. 465), wenn man von einer Steigerung nach den ersten 14 Tagen ausgeht oder oben genannten *in vivo* Faktoren wie die Proliferationsregulation oder mechanische Belastung bedenkt.

Es kann zudem von einer vermehrten Bildung der EZM im Rahmen der Defektheilung vor allem bei fortgeschrittener *in vivo* Standzeit ausgegangen werden, da in der vorliegenden Studie für Kollagen II und Aggrecan zwischen den Proben der 4. und der 24. Woche eine signifikante Steigerung der Expressionsrate beobachtet wurde. Vergleicht man diese molekularbiologischen Erkenntnisse mit den histologischen Ergebnissen, so bestätigten sich diese in der Safranin O sowie Kollagen II Färbung, welche insbesondere in der 24. Woche in einer deutlich intensiveren Anfärbung der EZM resultierten. In den molekularbiologischen Ergebnissen zeigten beide Marker zudem eine Induktion gegenüber unbehandeltem Referenzknorpel. Dies wäre durch die noch weiterhin ablaufende Regeneration erklärbar, da die Heilung des Defektes auch in der 24. Woche postoperativ noch nicht abgeschlossen ist. Eine weitere Erklärung für die Steigerung der Expressionsrate von Kollagen II und Aggrecan wäre eine Hypertrophie der Zellen im ehemaligen Defekt, für welche sich jedoch histologisch

keine Anhaltspunkte zeigten. Molekularbiologisch ergab sich hierzu kein schlüssiges Bild (s.4.2.2.2).

Ein weiterer Bestandteil der artikulären EZM, das *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP), wurde ebenfalls als Differenzierungsmarker herangezogen. Es ist zudem in Ligamenten, Sehnen, Blutgefäßen und weiteren Knorpeln zu finden (Haleem-Smith et al., 2012, S. 2; Müller et al., 1998, S. 233-4). COMP ist katalytisch bei der Kollagenfibrillenbildung (Halász et al., 2007, S. 3117) und somit für die biomechanischen Eigenschaften ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Auch wird eine Rolle als früher Marker bei Knorpelschäden sowie Prognosefaktor bei Knorpeldegeneration intensiv untersucht (Hoch et al., 2011, S. 1403; Tseng et al., 2009, S. 39; Verma & Dalal, 2013, S. 1005). Daneben führt eine Überexpression von COMP während der chondrogenen Differenzierung durch erhöhte Matrixorganisation zu einem vermehrten Vorhandensein von Aggrecan und Kollagen II (Haleem-Smith et al., 2012, S. 5-6).

Eine Induktion der Expression, wie auch bei Kollagen II und Aggrecan, wurde in der 24. Woche beobachtet, entsprechend dem Grad der Defektheilung mit vorwiegend hyalinem Knorpel. Jedoch kam es tendenziell später als bei Kollagen II und Aggrecan zum Anstieg der Expression, mit signifikant niedrigeren Expressionsraten in der 4. und 12. Woche im Vergleich zur 24. Woche. Dies entsprach den Ergebnissen von Sox9, einem Transkriptionsfaktor für COMP (Liu et al., 2007, S. 3908).

Sox9, durch ein *Sex determining region Y-type high mobility group box containing (Sry-type HMG box, Sox)*-Gen kodiert, ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktor in der Chondrogenese. Über die im Sox9-Protein enthaltene HMG-Box erfolgt eine Bindung von Sox9 an die DNA, welche eine Änderung der Gene hervorrufen, die der Transkription nachfolgen. Sox9 spielt in der Embryogenese und Entstehung des Skeletts eine große Rolle (Jo et al., 2014, S. 152-7; Lefebvre & Dvir-Ginzberg, 2017, S. 2; Zhao et al., 1997, S. 378-80). Eine hohe Expression wurde in der Reifung von Chondroprogenitorzellen zu Chondroblasten sowie in proliferierenden Chondrozyten nachgewiesen (Bi et al., 1999, S. 87-8; Lefebvre & Dvir-Ginzberg, 2017, S. 4-6). Eine Inhibition der Expression wurde in hypertrophierenden Chondrozyten vor der Inhibition der Kollagen II-Expression beobachtet, jedoch im Rahmen der embryonalen Chondrogenese und nicht wie vorliegend bei der Differenzierung von MSC (Zhao et al., 1997, S. 382).

Entgegen der Erwartung, dass Sox9 ähnliche Annäherung der Expressionsrate an unbehandelten Referenzknorpel zeigen würde, erreichte in der vorliegenden Arbeit die Sox9-Expression im Gegensatz zu den anderen Differenzierungsmarkern im Mittel in der 24. Woche nur knapp 20% der Expression des unbehandelten Referenzknorpels. Dies entsprach auch nicht den Ergebnissen von Cao et al. (2011, S. 3913-9), die ergaben, dass Sox9-transduzierte MSC im Kaninchenmodell bessere Defektheilung erbringen. In der Studie

von Salzmann et al. (2011, S. 5815) wurden im Vergleich zu *in vitro* autologen-Chondrozyten-Implantaten in *in vivo*-Knorpelregeneraten im Kaninchenmodell ebenfalls niedrigere Expressionsraten von Sox9 gemessen, übereinstimmend mit den hier vorliegenden *in vivo* Ergebnissen der Stammzellimplantate. Wie Lefebvre und Dvir-Ginzberg (2017, S. 5,12-3) aufzeigen, ist die genaue Rolle in postnatalen *in vivo* Modellen nicht eindeutig geklärt, unter anderem auch nicht, ob Sox9 wirklich essentiell in der Knorpelregenerierung ist. Somit war eine Schlussfolgerung aus den Ergebnissen unter Berücksichtigung des aktuellen Wissensstands nicht eindeutig zu ziehen.

Bei den Differenzierungsmarkern konnte für COMP und Kollagen II tendenziell ein früherer und intensiverer Anstieg der Expressionsrate in den unmarkierten Proben bereits in der 12. Woche gesehen werden. In den Resovist[®]-markierten Gruppe war jedoch auch bereits in der 12. Woche ein geringerer Anstieg gesehen worden. Weniger stark ausgeprägt war dies auch für die Aggrecan-Expressionsraten der Fall, die *in vivo* Standzeit fiel hier weniger ins Gewicht als die intensivere Steigerung der unmarkierten Proben, die sich jedoch nur tendenziell und nicht signifikant zu den Resovist[®]-markierten Proben unterschied. Sox9 zeigte den Anstieg unabhängig der Markierung erst in der 24. Woche. Es bleibt festzuhalten, dass für keinen der Differenzierungsmarker ein signifikanter Unterschied zwischen Resovist[®]-markierten und unmarkierten Proben nachgewiesen wurde.

Beide zeigten eine Steigerung in der Expressionsrate für alle Differenzierungsmarker mit zunehmender *in vivo* Standzeit. Dies steht in Übereinstimmung mit den histologischen Ergebnissen, welche eine positive Entwicklung der Gewebemerkmale im Zeitverlauf hin zu einem hyalin-ähnlichen Regenerat unabhängig der Resovist[®]-Markierung zeigten.

4.2.2.2. Dedifferenzierungsmarker

Ziel des *Tissue Engineerings* bei Knorpeldefekten ist nicht nur die Induktion einer Chondrogenese, sondern auch der Erhalt eines stabilen Zellphänotypen, der dem des Gelenkknorpels gleicht. Die zweidimensionale Kultur der MSC führt häufig zu Dedifferenzierungsprozessen, welche die Zellqualität und das chondrogene Potential deutlich mindern (Farrell et al., 2014, S. 2179; Peltari et al., 2006, S. 3263). Farrell et al. (2014, S. 2179-82) zeigte dies anhand eines *in vitro* Versuchs, bei dem über 112 Tage ein Agarosekonstrukt mit humanen Chondrozyten und bovinen MSC kultiviert wurden. Bereits nach 56 Tagen wurde ein verändertes Wachstum des MSC-Chondrozyten-Konstrukts mit deutlicher Reduzierung des Glykosaminoglykangehalts sowie der mechanischen Eigenschaften beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Peltari et al. (2006, S. 3259-63) ging einen Schritt weiter und implantierte für 3-7 Wochen kultivierte und zu Chondrozyten-induzierte humane MSC (hMSC) im Mausmodell, als Kontrolle dienten implantierte humane Chondrozyten. Es wurden bereits nach 1-2 Tagen erhöhte Marker für Zellhypertrophie

nachgewiesen. Nach 6 Wochen wurde eine Dedifferenzierung der hMSC mit Auftreten von fibrösen, hyalinen und hypertrophen Knorpelmarkern beobachtet.

Das Expressionsmuster verändert sich bei der Dedifferenzierung zu dem von hypertrophen Chondrozyten hin, wie bei der enchondralen Ossifikation zu beobachten (Gelse et al., 2012, S. 165; Lian et al., 2019, S. 1; Marquass et al., 2011, S. 1409; Nejadnik et al., 2010, S. 1115; Niemeyer et al., 2008, S. 2096). Bereits 1977 konnte Von Der Mark et al. (1977, S. 531) zeigen, dass der Verlust des hyalinen Phänotypen in Chondrozyten einen Wechsel von Kollagen II-Produktion zu Kollagen Typ I bewirkt. Kollagen I ist ein ubiquitäres Strukturprotein des straffen Bindegewebes, mit großen Anteilen in Knochen, fibrösem Knorpel, Sehnen, Hornhaut und der Haut. Es zählt zu den fibrillären Kollagenen, die zu 96% in einer Tripel-Helix-Struktur vorliegen (Ricard-Blum, 2011, S. 1). Neben strukturellen Aufgaben nimmt Kollagen I, ebenso wie Kollagen II, Einfluss auf vorhandene Chondrozyten und kann eine Veränderung der EZM bewirken, hin zu einem fibrocartilaginären Phänotypen mit hypertrophierenden Zellen (Armiento et al., 2018, S. 3; Chen et al., 2005, S. 450-2; Schneevoigt et al., 2017, S. 49). Induzierte Stammzellen, welche zu Chondrozyten differenzieren, zeigen ein biphasisches Muster der EZM-Produktion. Es beginnt mit einem hohen Kollagen I-Gehalt, gefolgt von einem Reifeprozess, in der die EZM knorpelähnlicher wird und einen ansteigenden Kollagen II- und Aggrecangehalt aufweist (Sorrell et al., 2018, S. 1765). Dies ähnelt dem Grundprinzip der Wundheilung, bei dem zuerst Narbengewebe entsteht, welches sich mit der Zeit durch Reifung an das Ursprungsgewebe anpasst und bestenfalls remodelliert.

Entsprechend kann möglicherweise die von Beginn an zu beobachtende Induktion der Kollagen I-Expressionsrate, welche sich im Verlauf bis zur 24. Woche signifikant steigerte, gewertet werden. Trotz der hohen Kollagen I-Expressionsrate in der 24. Woche wurde hier weiterhin eine Induktion des Kollagen II beobachtet. Daher kann von einem Verlust des hyalinen Phänotypen, der durch einen Verlust der Kollagen II-Expression zu Gunsten von Kollagen I gekennzeichnet ist, nicht ausgegangen werden. Die parallele Induktion könnte zum einen den beginnenden Reifeprozess der EZM widerspiegeln, wie von Sorrell et al. (2018, S. 1765) beschrieben. Jedoch ist auch mit der zunehmenden Defektfüllung und Verbesserung in den histologischen Ergebnissen mit einer generellen Zunahme von Chondrozyten im Defektbereich in der 24. Woche zu rechnen. Zudem könnte der langsame Katabolismus der Chondrozyten eine Rolle spielen und der Zeitpunkt der Phänotypenveränderung mit Verlust der Kollagen II-Expression zu Gunsten von Kollagen I in der 24. Woche noch nicht erreicht sein (Gelse et al., 2012, S. 168-9). Histologisch und makroskopisch konnte keine Zell-Hypertrophie nachgewiesen werden, somit ist nicht davon auszugehen, dass die massiv induzierte Kollagen I-Expression allein der Dedifferenzierung im Regenerat zuzuschreiben ist. Eine mögliche Erklärung ist die Induktion der

Kollagen I-Expression bereits bei der *in vitro* Stammzellerexpansion aufgrund des Plastiks der Zellkulturgefäße wie durch Armiento et al. (2018, S. 5) beschrieben und die Persistenz dieser *in vivo* ohne pathologischem Korrelat.

Gelse et al. (2012, S. 165-9) hat die Hypothese aufgestellt, dass bei der Knorpelregeneration ein transients Chondrozyten-Phänotyp entsteht, der weder dem hyalinen noch fibrösen Typ zuzuordnen ist. Dieser Phänotyp exprimiert hyalin-ähnliche Matrix und zeigt nur einen geringen Anstieg von Kollagen Typ X. Kollagen X kommt in gesundem Knorpel nur in der territorialen Matrix der kalzifizierenden Knorpelzone oder hypertrophem Knorpel typisch bei osteoarthritischer Veränderung vor (Armiento et al., 2018, S. 2; Gelse et al., 2012, S. 169; Lian et al., 2019, S. 1). In der vorliegenden Studie wurde eine Herunterregulation von Kollagen X beobachtet, entgegen des zu erwartenden Anstieges, wenn eine Dedifferenzierung mit Hypertrophie vorgelegen hätte.

Tendenziell stieg in den unmarkierten Proben der 12. Woche die Expressionsrate von Kollagen X früher als in den Resovist[®]-markierten Proben an, der Unterschied in den Expressionsrate war jedoch nicht signifikant. Dies gleicht den Ergebnissen der Differenzierungsmarker Kollagen II, COMP und Aggrecan, die eine tendenzielle Verzögerung der Expressionssteigerung in den Resovist[®]-markierten Proben zeigten. Betrachtete man jedoch für Kollagen X alle *in vivo* Standzeiten nur nach der Variablen „Resovist[®]-Markierung“ aufgeteilt, so zeigte sich hier als einziger molekularbiologischer Marker, ein signifikanter Unterschied zwischen den Markierungsgruppen. Der signifikante Unterschied ließ sich nicht im Subgruppenvergleich wiederfinden. Die Entdeckungswahrscheinlichkeit war aufgrund der Probenzahl zu gering, eine größerer Probenanzahl wäre zur weiteren Klärung hierfür notwendig gewesen. Auch stieg die Expressionsrate in der Resovist[®]-markierten Gruppe an, deutlicher jedoch erst zwischen der 12. und 24. Woche. Ein Trend zur verzögerten Steigerung durch die Markierung ist also sichtbar, im Hinblick auf den Dedifferenzierungsmarker jedoch nicht negativ zu bewerten.

Zu beachten ist auch, dass die Resovist[®]-markierten sowie unmarkierten Proben eine geringere Expressionsrate im Vergleich mit unbehandelten Referenzknorpel zeigten. Damit könnte von einer günstigeren Umgebung für die Knorpelregeneration unabhängig der Markierung ausgegangen werden, beispielsweise durch Modifikation des Zellmilieus oder anti-inflammatorische Wirkung durch die implantierten Stammzellen.

4.2.2.3. Entzündungsmarker

Beim vorliegenden Studiendesign war aufgrund der invasiven Knorpeldefektsetzung mit einer intraartikulären Entzündungsreaktion zu rechnen und somit die Evaluierung geeigneter Entzündungsmarker erfolgt.

TNF- α und IL-1 β , die im Gelenk vorherrschende Entzündungsmediatoren, sind für Chondrozyten katabole Stimuli (Ousema et al., 2012, S. 8; Wehling et al., 2009, S. 802).

Zwar sind das Gleichgewicht aus Neusynthese und Katabolismus essenziell für den Erhalt einer gesunden Knorpelmatrix, jedoch wird bei degenerativen Gelenkerkrankungen ein Anstieg der Entzündungsmediatoren mit einhergehender Induktion des katabolen Abbaus beobachtet (Ousema et al., 2012, S. 2; Umlauf et al., 2010, S. 4199; Van Buul et al., 2012, S. 1186-7).

IL-1 β und TNF- α regen zum einen die EZM-abbauende Enzyymbildung an (Dai et al., 2012, S. 9), zum anderen induzieren sie den Transkriptionsfaktor NF- κ B und hemmen so die Sox9- und in Folge auch die Aggrecan- und Kollagen II-Expression (Wehling et al., 2009, S. 802). Des Weiteren zeigte Wehling et al. (2009, S. 809) in Aggregatkulturen eine Hemmung chondrogener Differenzierung humaner MSC durch die Entzündungsmediatoren. Die Entzündungsmediatoren sind nicht nur synergistisch in ihrer Wirkungsweise, auch ihre Expression ist gekoppelt. Kobayashi et al. (2005, S. 134) zeigte an humanen Chondrozyten *in vitro*, dass IL-1 β Blockade auch zu TNF- α Suppression und umgekehrt führt.

Sauerschnig et al. (2019, S. 1550-2) untersuchten autologe Chondrozytenimplantate mit verschiedenen Passagezahlen, Aussaatdichten und Membranstandzeiten *in vitro* und *in vivo* im Kaninchenmodell hinsichtlich kataboler und inflammatorischer Marker. Sie sahen *in vivo* bereits während des 12-wöchigen Verlaufs eine statistisch signifikante Reduktion der IL-1 β -Expression, welche sich im vorliegenden Versuch mit einer Reduktion der Expressionsrate in allen Gruppen im Vergleich mit unbehandeltem Referenzknorpel bestätigte. Jedoch zeigte sich auch tendenziell in den Resovist[®]-markierten Proben zwischen der 12. und 24. Woche eine Steigerung der Expressionsrate, die trotzdem weiterhin unter der des unbehandelten Referenzknorpels lag. Auffallend war, dass die unmarkierten Proben eher eine weitere Reduktion zwischen der 4. und 24. Woche zeigten, bei einer großen Streuung in den unmarkierten Proben der 4. Woche ist dies möglicherweise auf die zum Teil leeren Defekte zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen. Eine Veränderung in den immunmodulatorischen Eigenschaften oder dem Entzündungsgeschehen durch die markierten MSC ist nicht auszuschließen. Auch hier wären eine Entnahme und Untersuchung der Synovialflüssigkeit vor Explantation, wie bereits in 4.1.1 erwähnt, ergänzend interessant.

Auch ein Anstieg des TNF- α im Vergleich zu unbehandeltem Knorpel konnte nicht beobachtet werden; zu erkennen war jedoch eine andauernde Reduktion der TNF- α -Expressionsrate. Lediglich zwischen der 12. und 24. Woche stieg in den unmarkierten Proben die Expressionsrate tendenziell an, blieb aber weiterhin weit unter der des unbehandelten Referenzknorpels. Dies ist überraschend, da gemäß den Ergebnissen von IL-1 β eher eine Reduktion im unmarkierten Knorpel zu erwarten war. Hier wäre eine erneute Untersuchung der Proben hilfreich, um die Unterschiede zu bestätigen und die Streuung der Ergebnisse zu minimieren. Festzuhalten ist jedoch, dass es tendenziell Unterschiede

zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Proben gab, übergreifend jedoch die Expressionsrate der Entzündungsmarker in den Proben immer weit unter der des unbehandelten Referenzknorpels blieb und somit von einem für die Knorpelregeneration günstigen Milieu ausgegangen werden konnte.

Die genauen Mechanismen hinter dieser bei allen Proben vorliegenden Reduktion der Expressionsraten sind noch nicht vollständig geklärt. Da bei der Mikroskopie für die ICRS 2 Bewertung ebenfalls wenig Entzündungsgeschehen berichtet wurde, könnte die entnommene Probe wenig Entzündungszellen enthalten. Möglich wäre eine lokale Immunmodulation durch MSC, welche schon mehrfach Gegenstand von Studien gewesen ist (Gao et al., 2016, S. 2-3; Weiss & Dahlke, 2019, S. 2-3). Beispielsweise berichten Iyer und Rojas (2008, S. 574-5) in ihrer Übersichtsarbeit von einer Reduktion des TNF- α in dendritischen Zellen durch BMSC nebst weiteren immunmodulatorischen Effekte vor allem auf Lymphozyten durch lösliche Effektormoleküle. Van Buul et al. (2012, S. 1191) zeigten durch Kultivierung humaner Knorpelimplantate in MSC-konditioniertem Medium vorteilhafte Wirkung der exprimierten MSC-Faktoren auf die antiinflammatorische Genexpression einschließlich einer Reduktion der IL-1 β -Expression. Ein früher Anstieg durch das operative Trauma ist denkbar, jedoch wäre eine Zuordnung des Anstiegs auf das Trauma, einer beginnenden Degeneration oder einer Inflammation im Regenerat nicht eindeutig möglich.

Für die Entzündungsmarker zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Resovist®-Markierung, jedoch war anhand der konträren Ergebnisse von TNF- α und IL-1 β ein tendenzieller Einfluss nicht auszuschließen. Die Vergleichsweise höhere Expressionsrate beider Entzündungsmediatoren im unbehandelten Referenzknorpel sind mit dem zur Homöostase nötigen Katabolismus vereinbar (Fan et al., 2007, S. 945). Bei der Regeneration hingegen führt der anabole Knorpelaufbau, dies ist mit einer Reduktion beider Marker, wie vorliegend, übereinstimmend.

4.3. Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte *in vivo* weitestgehend kein signifikanter Einfluss einer Resovist®-Markierung auf die Differenzierung implantierter Stammzellen gezeigt werden. Gemeinsam mit den entsprechenden Vorversuchen betrachtet, ist Resovist® zum *in vivo-Tracking* implantierter Zellen für wenige Wochen geeignet (Berninger et al., 2019, S. 2-8; Berninger et al., 2013a, S. 1-8; Berninger et al., 2013b, S. 1-6; Boddington et al., 2011, S. 3-9; Henning et al., 2008, S. 1-2; Henning et al., 2012, S. 197-209; Henning et al., 2009, S. 165-73; Sauerschnig et al., 2019, S. 1545-61). Der sichere Nachweis mit den hier angewendeten Methoden gelingt 4 Wochen nach Implantation uneingeschränkt und ist somit für die kritische Phase der Implantatintegration und somit der frühen Knorpelregeneration bedeutend. Für die weitere Verfolgung jedoch sind möglicherweise weitere Marker, andere Detektionsmethoden oder andere Kontrastmittel besser geeignet. Wie bereits in 4.1.2

beschrieben kämen hierfür ein stammzellenspezifischer Oberflächenmarker oder Detektion allogener DNA im Regenerat in Frage. Die noch ausstehende Bewertung des MRT-Nachweises und der anschließende Vergleich mit den hier präsentierten Ergebnissen könnten diesen Ansatz des *Cell Trackings* weiter bestätigen. Für weitere Fragestellungen im Bereich des *Tissue Engineering* mit MSC, bedeuten die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass es möglich ist, ohne Verlust ihres Regenerationspotentials, implantierte mit KM-markierte Stammzellen über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen nachzuverfolgen und so mögliche Faktoren zur Verbesserung der Integration und des Regenerationspotentials im Hinblick auf optimierte Therapiestrategien zu finden.

5. Zusammenfassung

Die Implantation von MSC zur Geweberegeneration ist bereits ein etablierter Bestandteil des *Tissue Engineerings* und der regenerativen Knorpeltherapie (De Windt et al., 2017, S. 261; Lee & Wang, 2017, S. 76-88; Robey, 2011, S. 426; Strioga et al., 2012, S. 2729). Welche unmittelbare Rolle die implantierten Zellen beim Regenerationsprozess *in vivo* einnehmen, ist nicht abschließend geklärt. Aus diesem Grund ist eine direkte Verfolgung der implantierten Zellen *in vivo* ohne den Regenerationsprozess dabei negativ zu beeinflussen von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Stammzellmarkierung mit dem MRT-Eisenkontrastmittel Resovist® auf die Knorpeldefektregeneration untersucht sowie der histologische Nachweis der Markierung erbracht. In 36 Kaninchenfemora wurden allogene mesenchymale Stammzellen in Fibrin-Zell-Implantaten in standardisierte Knorpeldefekte eingebracht. Die Stammzellen waren mit eGFP für den histologischen Nachweis (n=36) sowie in der Hälfte der Fälle mit Resovist® markiert (n=18). Nach jeweils der 4., 12. und 24. Woche wurden die Kaninchen sakrifiziert (jeweils n=12) und Gewebeproben aus den Knorpeldefektbereichen histologisch sowie molekularbiologisch untersucht.

Der direkte histologische Nachweis des eGFPs und des Resovist® mittels immunhistochemischer bzw. Berliner Blau Färbung gelang nach der 4. Woche uneingeschränkt, nach der 12. Woche nur in langsam heilenden Defekten. Es konnte makroskopisch und mikroskopisch bei der Bewertung nach ICRS Kriterien kein signifikanter Einfluss der Kontrastmittel-Markierung auf die Knorpelregeneration im Defekt nachgewiesen werden. Dies bestätigten auch die molekularbiologischen Analysen verschiedener Genexpressionsraten von typischen Differenzierungs-, Dedifferenzierungs-, sowie Entzündungsmarkern mittels PCR. Somit konnte kein nachteiliger Effekt der Markierung auf die Knorpelregeneration mithilfe implantierter Stammzellen nachgewiesen werden.

Anhand dieser kumulativen Ergebnisse kann in Zukunft die Resovist®-Markierung als *in vivo* Stammzellenmonitoring angewendet werden. Dies erweitert die Möglichkeiten des nicht-invasiven Therapiemonitoring nach Stammzellimplantation.

Eine Schwäche der Studie ist die fehlende Leerkontrolle ohne Implantat sowie geringe Entdeckungswahrscheinlichkeit vor allem in den Subgruppen aufgrund kleiner Stichprobenzahlen.

6. Literaturverzeichnis

- Akgun, I., Unlu, M. C., Erdal, O. A., Ogut, T., Erturk, M., Ovali, E., Kantarci, F., Caliskan, G., & Akgun, Y. (2015). Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 135(2), 251-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s00402-014-2136-z>
- Alford, J. W., & Cole, B. J. (2005a). Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *Am J Sports Med*, 33(2), 295-306. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546504273510>
- Alford, J. W., & Cole, B. J. (2005b). Cartilage Restoration, Part 2: Techniques, Outcomes, and Future Directions. *Am J Sports Med*, 33(3), 443-60. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546505274578>
- Alnuami, A. A., Zeedi, B., Qadri, S. M., & Ashraf, S. S. (2008). Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 182-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.05.002>
- Armiento, A. R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2018). Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Advanced Drug Delivery Reviews*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015>
- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human gene therapy*, 21(10), 1226-38. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2010.173>
- Bartlett, W., Skinner, J. A., Gooding, C. R., Carrington, R. W., Flanagan, A. M., Briggs, T. W., & Bentley, G. (2005). Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*, 87(5), 640-5. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620x.87b5.15905>
- Basad, E., Ishaque, B., Bachmann, G., Sturz, H., & Steinmeyer, J. (2010). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(4), 519-27. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-009-1028-1>
- Basad, E., Wissing, F. R., Fehrenbach, P., Rickert, M., Steinmeyer, J., & Ishaque, B. (2015). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 23(12), 3729-35. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-014-3295-8>
- Bedi, A., Feeley, B. T., & Williams, R. J., 3rd. (2010). Management of articular cartilage defects of the knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Am)*, 92(4), 994-1009. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.I.00895>
- Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B., & Russlies, M. (2006). Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)—5-year follow-up. *The Knee*, 13(3), 194-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.knee.2006.02.012>
- Bender, R., Lange, S., & Ziegler, A. (2007). Multiples Testen. [Multiple testing]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132(S 01), e26-e9. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-959035>
- Beris, A. E., Lykissas, M. G., Kostas-Agnantis, I., & Manoudis, G. N. (2012). Treatment of full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation: a functional evaluation with long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 40(3), 562-7. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546511428778>
- Berninger, M. T., Rodriguez-Gonzalez, P., Schilling, F., Haller, B., Lichtenstein, T., Imhoff, A. B., Rummeny, E. J., Anton, M., Vogt, S., & Henning, T. D. (2019). Bifunctional Labeling of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for MR Imaging and Fluorescence Microscopy. *Molecular Imaging and Biology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-019-01385-8>
- Berninger, M. T., Wexel, G., Rummeny, E. J., Imhoff, A. B., Anton, M., Henning, T. D., & Vogt, S. (2013a). Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling

- and repair of chondral defects in a rabbit model. *J Vis Exp*(75), e4422. <http://dx.doi.org/10.3791/4422>
- Berninger, M. T., Wexel, G., Rummeny, E. J., Imhoff, A. B., Anton, M., Henning, T. D., & Vogt, S. (2013b). Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp*(75), e4423. <http://dx.doi.org/10.3791/4423>
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22(1), 85-9. <http://dx.doi.org/10.1038/8792>
- Boddington, S. E., Sutton, E. J., Henning, T. D., Nedopil, A. J., Sennino, B., Kim, A., & Daldrup-Link, H. E. (2011). Labeling human mesenchymal stem cells with fluorescent contrast agents: the biological impact. *Molecular Imaging and Biology*, 13(1), 3-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-010-0322-0>
- Bornes, T. D., Adesida, A. B., & Jomha, N. M. (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Research & Therapy*, 16(5), 432. <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-014-0432-1>
- Brittberg, M. (2009). 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*, 38(6), 1259-71. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546509346395>
- Brittberg, M., Aglietti, P., Gambardella, R., Hangody, L., Hauselmann, H. J., Jakob, R. P., Levine, D., Lohmander, S., Mandelbaum, B. R., Peterson, L., & Staubli, H.-U. (2000). *ICRS Cartilage Injury Evaluation Package*. Artikel vorgestellt beim ICRS 2000 Standards Workshop/3rd ICRS Meeting, Switzerland/Sweden. <https://cartilage.org/society/publications/icrs-score/am30.05.2020>
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New england journal of medicine*, 331(14), 889-95. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>
- Buda, R., Vannini, F., Castagnini, F., Cavallo, M., Ruffilli, A., Ramponi, L., Pagliuzzi, G., & Giannini, S. (2015). Regenerative treatment in osteochondral lesions of the talus: autologous chondrocyte implantation versus one-step bone marrow derived cells transplantation. *International Orthopaedics*, 39(5), 893-900. <http://dx.doi.org/10.1007/s00264-015-2685-y>
- Bulte, J. W., & Kraitchman, D. L. (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*, 17(7), 484-99. <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.924>
- Cao, L., Yang, F., Liu, G., Yu, D., Li, H., Fan, Q., Gan, Y., Tang, T., & Dai, K. (2011). The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 32(16), 3910-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.014>
- Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076-84. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20886>
- Chen, C. W., Tsai, Y. H., Deng, W. P., Shih, S. N., Fang, C. L., Burch, J. G., Chen, W. H., & Lai, W. F. (2005). Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(2), 446-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.orthres.2004.09.002>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-9. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Cohen, J. (1992). Statistical Power Analysis. *Current Directions in Psychological Science*, 1(3), 98-101. <http://dx.doi.org/10.1111/1467-8721.ep10768783>
- Dai, L., Zhang, X., Hu, X., Zhou, C., & Ao, Y. (2012). Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 14(6), R268-R. <http://dx.doi.org/10.1186/ar4114>
- De Windt, T. S., Vonk, L. A., Slaper-Cortenbach, I. C. M., van den Broek, M. P. H., Nizak, R., van Rijen, M. H. P., de Weger, R. A., Dhert, W. J. A., & Saris, D. B. F. (2017).

- Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons. *Stem Cells*, 35(1), 256-64. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2475>
- Delcogliano, M., de Caro, F., Scaravella, E., Ziveri, G., De Biase, C. F., Marotta, D., Marengi, P., & Delcogliano, A. (2014). Use of innovative biomimetic scaffold in the treatment for large osteochondral lesions of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 22(6), 1260-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-013-2717-3>
- Delling, U., Brehm, W., Metzger, M., Ludewig, E., Winter, K., & Julke, H. (2015). In vivo tracking and fate of intra-articularly injected superparamagnetic iron oxide particle-labeled multipotent stromal cells in an ovine model of osteoarthritis. *Cell Transplantation*, 24(11), 2379-90. <http://dx.doi.org/10.3727/096368914X685654>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-7. <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Duong, H., Wu, B., & Tawil, B. (2009). Modulation of 3D fibrin matrix stiffness by intrinsic fibrinogen-thrombin compositions and by extrinsic cellular activity. *Tissue Engineering, Part A*, 15(7), 1865-76. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0319>
- Ebert, J. R., Fallon, M., Wood, D. J., & Janes, G. C. (2017). A Prospective Clinical and Radiological Evaluation at 5 Years After Arthroscopic Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation. *Am J Sports Med*, 45(1), 59-69. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546516663493>
- Fan, Z., Söder, S., Oehler, S., Fundel, K., & Aigner, T. (2007). Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *The American journal of pathology*, 171(3), 938-46. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.061083>
- Farrell, E., Wielopolski, P., Pavljasevic, P., Kops, N., Weinans, H., Bernsen, M. R., & van Osch, G. J. V. M. (2009). Cell labelling with superparamagnetic iron oxide has no effect on chondrocyte behaviour. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(7), 961-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.016>
- Farrell, M. J., Fisher, M. B., Huang, A. H., Shin, J. I., Farrell, K. M., & Mauck, R. L. (2014). Functional properties of bone marrow-derived MSC-based engineered cartilage are unstable with very long-term in vitro culture. *Journal of Biomechanics*, 47(9), 2173-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.10.030>
- Figueroa, D., Calvo, R., Vaisman, A., Carrasco, M. A., Moraga, C., & Delgado, I. (2007). Knee Chondral Lesions: Incidence and Correlation Between Arthroscopic and Magnetic Resonance Findings. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 23(3), 312-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2006.11.015>
- Fox, A. J. S., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*, 1(6), 461-8. <http://dx.doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Franz, T., Hasler, E. M., Hagg, R., Weiler, C., Jakob, R. P., & Mainil-Varlet, P. (2001). In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(6), 582-92. <http://dx.doi.org/10.1053/joca.2001.0418>
- Frisbie, D. D., Oxford, J. T., Southwood, L., Trotter, G. W., Rodkey, W. G., Steadman, J. R., Goodnight, J. L., & McIlwraith, C. W. (2003). Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(407), 215-27. <http://dx.doi.org/10.1097/01.blo.0000030514.43495.f3>
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L., & Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, 7, e2062. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- Gelse, K., Ekici, A. B., Cipa, F., Swoboda, B., Carl, H. D., Olk, A., Hennig, F. F., & Klingner, P. (2012). Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage – clues

- for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(2), 162-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.004>
- Gille, J., Behrens, P., Schulz, A. P., Oheim, R., & Kienast, B. (2016). Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation: A Clinical Follow-Up at 15 Years. *Cartilage*, 7(4), 309-15. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603516638901>
- Goebel, L., Orth, P., Müller, A., Zurakowski, D., Bückner, A., Cucchiari, M., Pape, D., & Madry, H. (2012). Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T – comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(9), 1046-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.05.010>
- Gomoll, A. H., Farr, J., Gillogly, S. D., Kercher, J., & Minas, T. (2010a). Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Am)*, 92(14), 2470-90. <http://dx.doi.org/10.2106/00004623-195638020-00022>
- Gomoll, A. H., Madry, H., Knutsen, G., van Dijk, N., Seil, R., Brittberg, M., & Kon, E. (2010b). The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(4), 434-47. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-010-1072-x>
- Halász, K., Kassner, A., Mörgelin, M., & Heinegård, D. (2007). COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *Journal of biological chemistry*, 282(43), 31166-73. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705735200>
- Haleem-Smith, H., Calderon, R., Song, Y., Tuan, R. S., & Chen, F. H. (2012). Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(4), 1245-52. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23455>
- Hangody, L., & Füles, P. (2003). Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Am)*, 85(suppl_2), 25-32. <http://dx.doi.org/10.2106/00004623-200300002-00004>
- Henning, T. D., Boddington, S., & Daldrup-Link, H. E. (2008). Labeling hESCs and hMSCs with iron oxide nanoparticles for non-invasive in vivo tracking with MR imaging. *J Vis Exp*(13). <http://dx.doi.org/10.3791/685>
- Henning, T. D., Gawande, R., Khurana, A., Tavri, S., Mandrussow, L., Golovko, D., Horvai, A., Sennino, B., McDonald, D., Meier, R., Wendland, M., Derugin, N., Link, T. M., & Daldrup-Link, H. E. (2012). Magnetic Resonance Imaging of Ferumoxide-Labeled Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Defects: In Vitro and in Vivo Investigations. *Molecular Imaging*, 11(3). <http://dx.doi.org/10.2310/7290.2011.00040>
- Henning, T. D., Sutton, E. J., Kim, A., Golovko, D., Horvai, A., Ackerman, L., Sennino, B., McDonald, D., Lotz, J., & Daldrup-Link, H. E. (2009). The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Contrast Media Mol Imaging*, 4(4), 165-73. <http://dx.doi.org/10.1002/cmimi.276>
- Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R., & Brittberg, M. (2002). Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 18(7), 730-4. <http://dx.doi.org/10.1053/jars.2002.32839>
- Hobro, A. J., & Smith, N. I. (2017). An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*, 91, 31-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.10.012>
- Hoch, J. M., Mattacola, C., McKeon, J. M., Howard, J., & Lattermann, C. (2011). Serum cartilage oligomeric matrix protein (sCOMP) is elevated in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(12), 1396-404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.09.005>
- Hoemann, C., Kandel, R., Roberts, S., Saris, D. B., Creemers, L., Mainil-Varlet, P., Methot, S., Hollander, A. P., & Buschmann, M. D. (2011). International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage*, 2(2), 153-72. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603510397535>

- Hoetelmans, R. W. M., Prins, F. A., Velde, I. C.-t., van der Meer, J., van de Velde, C. J. H., & van Dierendonck, J. H. (2001). Effects of Acetone, Methanol, or Paraformaldehyde on Cellular Structure, Visualized by Reflection Contrast Microscopy and Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9(4), 346-51. <http://dx.doi.org/10.1097/00129039-200112000-00010>
- Hunziker, E. B. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(6), 432-63. <http://dx.doi.org/10.1053/joca.2002.0801>
- Insall, J. N. (1967). Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*, 49(2), 211-28. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620x.49b2.211>
- Isserlin, B. (1950). Joint Debridement For Osteoarthritis Of The Knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*, 32-B(3), 302-6. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620x.32b3.302>
- Itsubo, T., Murakami, N., Uemura, K., Nakamura, K., Hayashi, M., Uchiyama, S., & Kato, H. (2014). Magnetic Resonance Imaging Staging to Evaluate the Stability of Capitellar Osteochondritis Dissecans Lesions. *Am J Sports Med*, 42(8), 1972-7. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546514532604>
- Iyer, S. S., & Rojas, M. (2008). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(5), 569-81. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.8.5.569>
- Jasmin, Torres, A. L., Nunes, H. M., Passipieri, J. A., Jelicks, L. A., Gasparetto, E. L., Spray, D. C., Campos de Carvalho, A. C., & Mendez-Otero, R. (2011). Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. *J Nanobiotechnology*, 9, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-9-4>
- Jing, X. H., Yang, L., Duan, X. J., Xie, B., Chen, W., Li, Z., & Tan, H. B. (2008). In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine*, 75(4), 432-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.09.013>
- Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Kang, R., Shi, L. L., Mok, J., Lee, M. J., & Haydon, R. C. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes & Diseases*, 1(2), 149-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.004>
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Research*, 12(1), 19-32. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cr.7290106>
- Kobayashi, M., Squires, G. R., Mousa, A., Tanzer, M., Zukor, D. J., Antoniou, J., Feige, U., & Poole, A. R. (2005). Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 52(1), 128-35. <http://dx.doi.org/10.1002/art.20776>
- Kohyama, S., Ogawa, T., Mamizuka, N., Hara, Y., & Yamazaki, M. (2018). A Magnetic Resonance Imaging-Based Staging System for Osteochondritis Dissecans of the Elbow: A Validation Study Against the International Cartilage Repair Society Classification. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 6(9), 2325967118794620. <http://dx.doi.org/10.1177/2325967118794620>
- Kon, E., Filardo, G., Di Martino, A., & Marcacci, M. (2012). ACI and MACI. *Journal of Knee Surgery*, 25(01), 017-22. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1299651>
- Kreuz, P. C., Kalkreuth, R. H., Niemeyer, P., Uhl, M., & Erggelet, C. (2019). Long-Term Clinical and MRI Results of Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Implantation for Articular Cartilage Defects of the Knee. *Cartilage*, 10(3), 305-13. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603518756463>
- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M., & Südkamp, N. (2006). Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(11), 1119-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>

- Lee, W. Y.-w., & Wang, B. (2017). Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 76-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.005>
- Lefebvre, V., & Dvir-Ginzberg, M. (2017). SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connective Tissue Research*, 58(1), 2-14. <http://dx.doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>
- Li, I. M. H., Liu, K., Neal, A., Clegg, P. D., De Val, S., & Bou-Gharios, G. (2018). Differential tissue specific, temporal and spatial expression patterns of the Aggrecan gene is modulated by independent enhancer elements. *Scientific Reports*, 8(1), 950. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19186-4>
- Li, P., Zhang, R., Sun, H., Chen, L., Liu, F., Yao, C., Du, M., & Jiang, X. (2013). PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. *Stem cells and development*, 22(2), 340-4. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2012.0357>
- Lian, C., Wang, X., Qiu, X., Wu, Z., Gao, B., Liu, L., Liang, G., Zhou, H., Yang, X., Peng, Y., Liang, A., Xu, C., Huang, D., & Su, P. (2019). Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin $\beta 1$ -SMAD1 interaction. *Bone Research*, 7(1), 8. <http://dx.doi.org/10.1038/s41413-019-0046-y>
- Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F., & Lian, Q. (2014). Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplantation*, 23(9), 1045-59. <http://dx.doi.org/10.3727/096368913X667709>
- Liu, C. J., Zhang, Y., Xu, K., Parsons, D., Alfonso, D., & Di Cesare, P. E. (2007). Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Frontiers in Bioscience*, 12, 3899-910. <http://dx.doi.org/10.2741/2359>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1), 144-52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5)
- Mainil-Varlet, P., Rieser, F., Grogan, S., Mueller, W., Saager, C., & Jakob, R. P. (2001). Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, S6-S15. <http://dx.doi.org/10.1053/joca.2001.0438>
- Mainil-Varlet, P., Van Damme, B., Nesic, D., Knutsen, G., Kandel, R., & Roberts, S. (2010). A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am J Sports Med*, 38(5), 880-90. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546509359068>
- Mak, J., Jablonski, C. L., Leonard, C. A., Dunn, J. F., Raharjo, E., Matyas, J. R., Biernaskie, J., & Krawetz, R. J. (2016). Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. *Scientific Reports*, 6, 23076. <http://dx.doi.org/10.1038/srep23076>
- Marlovits, S., Hombauer, M., Tamandl, D., Vecsei, V., & Schlegel, W. (2004). Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture. *International Journal of Molecular Medicine*, 13(2), 281-7. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.13.2.281>
- Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., & Vecsei, V. (2006). Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*, 57(1), 24-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2005.08.009>
- Marquass, B., Schulz, R., Hepp, P., Zscharnack, M., Aigner, T., Schmidt, S., Stein, F., Richter, R., Osterhoff, G., Aust, G., Josten, C., & Bader, A. (2011). Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med*, 39(7), 1401-12. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546511398646>

- Martincic, D., Radosavljevic, D., & Drobic, M. (2014). Ten-year clinical and radiographic outcomes after autologous chondrocyte implantation of femoral condyles. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 22(6), 1277-83. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-013-2778-3>
- Müller, G., Michel, A., & Altenburg, E. (1998). COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) is Synthesized in Ligament, Tendon, Meniscus, and Articular Cartilage. *Connective Tissue Research*, 39(4), 233-44. <http://dx.doi.org/10.3109/03008209809021499>
- Murray, C. J. L., Barber, R. M., Foreman, K. J., & Ozgoren, A. A. (2015). Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. *The Lancet*, 386(10009), 2145-91. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61340-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61340-X)
- Nejadnik, H., Hui, J. H., Feng Choong, E. P., Tai, B. C., & Lee, E. H. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med*, 38(6), 1110-6. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546509359067>
- Niemeyer, P., Pestka, J. M., Kreuz, P. C., Erggelet, C., Schmal, H., Suedkamp, N. P., & Steinwachs, M. (2008). Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med*, 36(11), 2091-9. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546508322131>
- O'Driscoll, S. W., Keeley, F. W., & Salter, R. B. (1988). Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Am)*, 70(4), 595-606. <http://dx.doi.org/10.2106/00004623-198870040-00017>
- Oshima, Y., Watanabe, N., Matsuda, K.-i., Takai, S., Kawata, M., & Kubo, T. (2005). Behavior of Transplanted Bone Marrow-derived GFP Mesenchymal Cells in Osteochondral Defect as a Simulation of Autologous Transplantation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(2), 207-16. <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.4A6280.2005>
- Ousema, P. H., Moutos, F. T., Estes, B. T., Caplan, A. I., Lennon, D. P., Guilak, F., & Weinberg, J. B. (2012). The inhibition by interleukin 1 of MSC chondrogenesis and the development of biomechanical properties in biomimetic 3D woven PCL scaffolds. *Biomaterials*, 33(35), 8967-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.045>
- Park, C. W., Kim, K.-S., Bae, S., Son, H. K., Myung, P.-K., Hong, H. J., & Kim, H. (2009). Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International journal of stem cells*, 2(1), 59. <http://dx.doi.org/10.15283/ijsc.2009.2.1.59>
- Peltari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T., & Richter, W. (2006). Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis & Rheumatism*, 54(10), 3254-66. <http://dx.doi.org/10.1002/art.22136>
- Pestka, J. M., Schmal, H., Salzmann, G., Hecky, J., Südkamp, N. P., & Niemeyer, P. (2011). In vitro cell quality of articular chondrocytes assigned for autologous implantation in dependence of specific patient characteristics. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131(6), 779-89. <http://dx.doi.org/10.1007/s00402-010-1219-8>
- Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M., & Lindahl, A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 38(6), 1117-24. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546509357915>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pineda, S., Pollack, A., Stevenson, S., Goldberg, V., & Caplan, A. (1992). A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anatomica (Basel)*, 143(4), 335-40. <http://dx.doi.org/10.1159/000147272>
- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Laverty, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical*

- Orthopaedics and Related Research*(391 Suppl), S26-33.
<http://dx.doi.org/10.1097/00003086-200110001-00004>
- Price, J. S., Waters, J. G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D. R., Donell, S. T., & Clark, I. M. (2002). The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*, 1(1), 57-65. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x>
- Pridie, K., & Gordon, G. (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*, 41-B(3), 618-9. Abgerufen von <https://online.boneandjoint.org.uk/toc/bjx/41-B/3> am 30.05.2020
- Qi, Y., Du, Y., Li, W., Dai, X., Zhao, T., & Yan, W. (2014). Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 22(6), 1424-33. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-012-2256-3>
- Qiagen, N. V. (2011). QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Handbook. Abgerufen von <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=38083588-73db-4d2e-9ed2-9f66b154ab3e&lang=en> am 30.05.2020
- Quintavalla, J., Uziel-Fusi, S., Yin, J., Boehnlein, E., Pastor, G., Blancuzzi, V., Singh, H. N., Kraus, K. H., O'Byrne, E., & Pellas, T. C. (2002). Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials*, 23(1), 109-19. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00086-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00086-2)
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Robert Koch-Institut, H. (2013). *Arthrose (Heft 54)*. (978-3-89606-219-2). RKI, Berlin. Abgerufen von <https://edoc.rki.de/handle/176904/3241> am 30.05.2020
- Robey, P. G. (2011). Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Engineering, Part B: Reviews* 17(6), 423-30. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0199>
- Rutgers, M., van Pelt, M. J. P., Dhert, W. J. A., Creemers, L. B., & Saris, D. B. F. (2010). Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 12-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.009>
- Saha, S., Yang, X. B., Tanner, S., Curran, S., Wood, D., & Kirkham, J. (2013). The effects of iron oxide incorporation on the chondrogenic potential of three human cell types. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(6), 461-9. <http://dx.doi.org/10.1002/term.544>
- Salter, D. M. (1998). The tissues we deal with: (II) Cartilage. *Current Orthopaedics*, 12(4), 251-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-0890\(98\)90044-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-0890(98)90044-5)
- Salzmann, G. M., Sauerschnig, M., Berninger, M. T., Kaltenhauser, T., Schönfelder, M., Vogt, S., Wexel, G., Tischer, T., Sudkamp, N., Niemeyer, P., Imhoff, A. B., & Schöttle, P. B. (2011). The dependence of autologous chondrocyte transplantation on varying cellular passage, yield and culture duration. *Biomaterials*, 32(25), 5810-8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.073>
- Saris, D., Price, A., Widuchowski, W., Bertrand-Marchand, M., Caron, J., Drogset, J. O., Emans, P., Podskubka, A., Tsuchida, A., & Kili, S. (2014). Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture Two-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am J Sports Med*, 0363546514528093. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546514528093>
- Sauerschnig, M., Berninger, M. T., Kaltenhauser, T., Plecko, M., Wexel, G., Schönfelder, M., Wienerroither, V., Imhoff, A. B., Schöttle, P. B., Rosado Balmayor, E., & Salzmann, G. M. (2019). Chondrocyte Culture Parameters for Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Implantation Affect Catabolism and Inflammation in a Rabbit Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1545. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20071545>
- Saville, D. J. (2015). Multiple comparison procedures—Cutting the Gordian knot. *Agronomy Journal*, 107(2), 730-5. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2012.0394>

- Schmitt, A., van Griensven, M., Imhoff, A. B., & Buchmann, S. (2012). Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells International*, 2012, 394962. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/394962>
- Schneevoigt, J., Fabian, C., Leovsky, C., Seeger, J., & Bahramsoltani, M. (2017). In Vitro Expression of the Extracellular Matrix Components Aggrecan, Collagen Types I and II by Articular Cartilage-Derived Chondrocytes. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 46(1), 43-50. <http://dx.doi.org/10.1111/ahe.12230>
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A., & Giepmans, B. N. G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods*, 9, 152+. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1855>
- Schünke, M., Schulte, E., & Schumacher, U. (2007). *Prometheus—LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssysteme: Illustrationen von M. Voll und K. Wesker* (2. Auflage ed.): George Thieme Verlag.
- Seo, S., & Na, K. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 806891. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/806891>
- Shakibaei, M., De Souza, P., & Merker, H. J. (1997). Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biology International*, 21(2), 115-25. <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.1996.0118>
- Siebold, R., Suezzer, F., Schmitt, B., Trattnig, S., & Essig, M. (2018). Good clinical and MRI outcome after arthroscopic autologous chondrocyte implantation for cartilage repair in the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 26(3), 831-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-017-4491-0>
- Smith, B., Sigal, I. R., & Grande, D. A. (2015). Immunology and cartilage regeneration. *Immunologic Research*, 63(1), 181-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-015-8720-7>
- Sorrell, J. M., Somoza, R. A., & Caplan, A. I. (2018). Human mesenchymal stem cells induced to differentiate as chondrocytes follow a biphasic pattern of extracellular matrix production. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(6), 1757-66. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.23820>
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., & Briggs, K. K. (2010). Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon. *Cartilage*, 1(2), 78-86. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603510365533>
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem cells and development*, 21(14), 2724-52. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2011.0722>
- Sun, J. H., Zhang, Y. L., Qian, S. P., Yu, X. B., Xie, H. Y., Zhou, L., & Zheng, S. S. (2012). Assessment of biological characteristics of mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 5(2), 317-20. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2011.637>
- Tatebe, M., Nakamura, R., Kagami, H., Okada, K., & Ueda, M. (2005). Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytotherapy*, 7(6), 520-30. <http://dx.doi.org/10.1080/14653240500361350>
- Tay, L. X., Ahmad, R. E., Dashtdar, H., Tay, K. W., Masjuddin, T., Ab-Rahim, S., Chong, P. P., Selvaratnam, L., & Kamarul, T. (2012). Treatment outcomes of alginate-embedded allogenic mesenchymal stem cells versus autologous chondrocytes for the repair of focal articular cartilage defects in a rabbit model. *Am J Sports Med*, 40(1), 83-90. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546511420819>
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Tseng, S., Reddi, A. H., & Di Cesare, P. E. (2009). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): a biomarker of arthritis. *Biomarker insights*, 4, BMI. S645. <http://dx.doi.org/10.4137/bmi.s645>

- Umlauf, D., Frank, S., Pap, T., & Bertrand, J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(24), 4197-211. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0498-0>
- van Buul, G. M., Kotek, G., Wielopolski, P. A., Farrell, E., Bos, P. K., Weinans, H., Grohnert, A. U., Jahr, H., Verhaar, J. A., Krestin, G. P., van Osch, G. J., & Bernsen, M. R. (2011). Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One*, 6(2), e17001. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017001>
- Van Buul, G. M., Villafuertes, E., Bos, P. K., Waarsing, J. H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., Bernsen, M. R., & Van Osch, G. J. V. M. (2012). Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(10), 1186-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.003>
- Vector Laboratories Inc. (2016). Vectastain Elite ABC Kit - Instructions for immunohistochemical staining. Abgerufen von https://vectorlabs.com/amfile/file/download/file_id/3699/product_id/408/ am 04.07.2019
- Verma, P., & Dalal, K. (2013). Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: A novel diagnostic and prognostic biomarker. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(7), 999-1006. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22324>
- Vogt, S., Braun, S., & Imhoff, A. B. (2007). Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66(6), 493-504. <http://dx.doi.org/10.1007/s00393-007-0213-1>
- Von Der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., & Muller, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267(5611), 531-2. <http://dx.doi.org/10.1038/267531a0>
- Wakitani, S., Okabe, T., Horibe, S., Mitsuoka, T., Saito, M., Koyama, T., Nawata, M., Tensho, K., Kato, H., Uematsu, K., Kuroda, R., Kurosaka, M., Yoshiya, S., Hattori, K., & Ohgushi, H. (2011). Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(2), 146-50. <http://dx.doi.org/10.1002/term.299>
- Wang, Y. X., Hussain, S. M., & Krestin, G. P. (2001). Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur J Radiol*, 11(11), 2319-31. <http://dx.doi.org/10.1007/s003300100908>
- Wasiak, J., Clar, C., & Villanueva, E. (2006). Autologous cartilage implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*(3), CD003323. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD003323.pub2>
- Watt, F. M., & Huck, W. T. S. (2013). Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 467. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3620>
- Wehling, N., Palmer, G. D., Pilapil, C., Liu, F., Wells, J. W., Müller, P. E., Evans, C. H., & Porter, R. M. (2009). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways. *Arthritis & Rheumatism*, 60(3), 801-12. <http://dx.doi.org/10.1002/art.24352>
- Weiss, A. R. R., & Dahlke, M. H. (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, 10(1191). <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
- Yan, H., & Yu, C. (2007). Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 23(2), 178-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2006.09.005>
- Yang, C. Y., Hsiao, J. K., Tai, M. F., Chen, S. T., Cheng, H. Y., Wang, J. L., & Liu, H. M. (2011). Direct labeling of hMSC with SPIO: the long-term influence on toxicity, chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution. *Molecular Imaging and Biology*, 13(3), 443-51. <http://dx.doi.org/10.1007/s11307-010-0360-7>

Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., & De Crombrughe, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics*, 209(4), 377-86. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0177\(199708\)209:4<377::Aid-aja5>3.0.Co;2-f](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0177(199708)209:4<377::Aid-aja5>3.0.Co;2-f)

7. Anhang

7.1. Therapiemonitoring

Titel: "Kontrastmittelgestützte zelluläre Magnetresonanztomographie (MRT) zum Therapiemonitoring bei Knorpelersatztherapien am Kaninchenmodell, Az. 55.2.1.43-2532-105-11

Projektleiter: OA Dr. med. Stephan Vogt

Datum:

Untersucher:

Gewicht (g)	Punkte		Tiernummer
Allgemeinbefinden	Wach/aufmerksam	0	
	Ängstlich/nervös	1	
	Reduziert	2	
	Apathisch	3	
Futteraufnahme	Ja	0	
	Verändert	1	
	Nein	2	
Wasseraufnahme	Ja	0	
	Verändert	1	
	Nein	2	
Kotabsatz	Ja	0	
	Verändert	1	
	Nein	2	
Harnabsatz	Ja	0	
	Verändert	1	
	Nein	2	
Haarkleid	Gepflegt/sauber	0	
	Fellpflege, aber unsauber	1	
	Keine Fellpflege/unsauber	2	
Schleimhaut	Rosa	0	
	Blassrosa	1	
	Weiß	2	
Ausfluss (Nase/Auge)	Nein	0	
	Mittel	1	
	Hochgradig	2	
Atemgeräusch	Nein	0	
	Ja (leicht)	1	
	Ja (mittel)	2	
Atemtyp	Normal	0	
	Abnormal	1	
Lahmheit	Nein	0	
	Ja (leicht)	1	
	Ja (mittel)	2	
	Ja (schwer)	3	

Spezielle Abbruchkriterien (jeweils 20 Punkte)

Gelenksinfektion
Tiefe Nahtdehiszenz
Fraktur
Körpergewicht -15 %

0 Punkte ohne besonderen Befund, o.b.B

1-10 Punkte weiter beobachten, Ursachen abklären und beheben

11-19 Punkte weiter beobachten, Ursachen abklären und beheben, **je nach Diagnose Euthanasie**

20 Punkte **Euthanasie**

99 Punkte **Gesamtpunktezahl**

7.2. Aufsteigende Alkoholreihe

	Histologische Färbungen	Immunhistochemische Färbungen
destilliertes Wasser	spülen	spülen
Ethanol 60%	1x 5 min	1x 1,5 min
Ethanol 80%	1x 5 min	1x 1,5 min
Ethanol 90%	1x 5 min	1x 1,5 min
Ethanol 96%	1x 5 min	1x 1,5 min
Ethanol 100%	2x 5 min	2x 5 min

8. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Stephan Vogt danke ich für die Überlassung des Themas und der Beratung und Unterstützung vor allem auch im Doktorandenseminar.

Herrn Dr. med. Markus Berninger danke ich für seine langjährige Betreuung, Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Ohne seine Unterstützung und wertvollen Hinweise, auch über weite Distanzen, wäre die schriftliche Ausführung in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Danke für deine Hilfe und deine Zeit!

Auch bei Stephan Masius möchte ich mich für die Hilfe und Mitarbeit in der experimentellen Phase bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Milz danke ich für die Beratung sowie Bereitstellung der technischen Einrichtungen in Sachen Histologie. Dasselbe gilt für Frau PD Dr. rer. nat. Martina Anton für die Bereitstellung der technischen Einrichtungen am Institut für molekulare Immunologie.

Besonderen Dank geht an Gitta Ziegleder, die mit Rat und Tat bei der Präparatverarbeitung und Färbungen zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Gabriele Wexel und Herrn Dr. Peter Sommer für die tierärztliche Unterstützung sowie allen Mitarbeitern des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar danken.

Auch bei Alexander Burdach möchte ich mich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden bedanken.

Dr. Bernhard Haller und dem Team des medizinischen Statistikkolloquiums möchte ich für ihre Geduld und Erklärungen bezüglich der Auswertung danken.

Claudia, Denise, Carolin, Nadine, Anna, Susanne und Ali möchte ich für die vielen hilfreichen Hinweise und Bemerkungen auch bezüglich der Abläufe danken.

Nicht weniger möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Philipp Fleming für die Motivation, Lösungshilfen bei Soft- und Hardwareproblemen, Kinderbetreuung, Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit bedanken, ohne dich wäre die Arbeit in dieser Form nicht vollendet worden und mehrfach im Ether verschwunden. Wie gut, dass ich dich habe.

Jonathan und Lilian, euch verdanke ich noch einmal etwas Zeit, um die Arbeit zu vollenden. Und schlaflose Nächte mit der ein oder anderen Eingebung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Judith und Klemens Fleming danken, die mit ihrer Unterstützung und Ermutigung mein Studium und dieses Unterfangen erst ermöglicht haben.