

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

**Gentransfer des transformierenden
Wachstumsfaktors β verbessert die
osteochondrale Defektreparatur und
vermindert perifokale Arthrose – eine
translationale Einjahresstudie im
Großtiermodell**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von: Steffen Johannes Schrenker
geboren am: 31.10.1995 in Bielefeld

Tag der Promotion:

08.03.2023

Dekan:

Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Henning Madry

Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke

Prof. Dr. med. Britt Wildemann

Inhalt

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. Problematik (Überblick).....	3
2.2. Grundlagen der osteochondralen Einheit und Einteilung osteochondraler Defekte	4
2.3. Biologie der osteochondralen Reparatur.....	7
2.4. Sekundärarthrose.....	9
2.5. Aktuelle klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	10
2.6. Aktuelle experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	11
2.6.1. Wachstumsfaktoren als therapeutische Optionen	11
2.6.2. Transformierender Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1).....	12
2.7. Studienaufbau	14
3. HYPOTHESEN	16
4. MATERIAL	17
4.1. Lösungen, Puffer und Medien.....	17
4.2. Chemikalien	18
4.3. Biologische Materialien	19
4.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
4.5. Operationsinstrumente.....	21
4.6. Software	22
5. METHODEN	23
5.1. Großtiermodell.....	23
5.2. Studiendesign / Qualitätskriterien	23
5.3. Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren	24
5.4. Operation und postoperative Behandlung	24
5.5. Makroskopische Bewertung.....	25

5.6. Mikro-computertomographische Auswertung	27
5.6.1. Bildakquisition	27
5.6.2. Definition der untersuchten 3-dimensionalen Strukturen	28
5.6.3. Strukturelle Parameter zur Analyse der Defektarchitektur	29
5.7. Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie.....	31
5.7.1. Darstellung der Kondylen.....	31
5.7.2. Bewertung der Defektreparatur.....	32
5.8. Histologische Gewebsanalyse.....	34
5.8.1. Histologische Aufarbeitung	34
5.8.2. Histologische Bewertung	36
5.8.3. Immundetektion extra- und intrazellulärer Bestandteile des Reparaturgewebes.....	42
5.8.4. Quantitative Analyse extra- und intrazellulärer Bestandteile des Reparaturgewebes	44
5.8.5. Bestimmung der Zellularität im knorpeligen Reparaturgewebe	45
5.9. Statistische Analyse	46
6. ERGEBNISSE	47
6.1. Makroskopische Defektauswertung	47
6.2. Mikro-computertomographische Defektauswertung	49
6.2.1. Mikro-computertomographische Evaluation des Knorpelniveaus	50
6.2.2. Mikro-computertomographische Evaluation der subchondralen Knochenplatte	53
6.2.3. Mikro-computertomographische Evaluation der subartikulären Spongiosa	55
6.3. Ultrahochfeld-magnetresonanztomographische Defektbewertung	56
6.4. Histopathologische Defektbewertung	58
6.4.1. Semiquantitative Bewertungen des knorpeligen Reparaturgewebes	58
6.4.2. Immunhistochemische Bewertung des knorpeligen Reparaturgewebes	63
6.4.3. Auswertung der Zellularität im knorpeligen Reparaturgewebe	67
6.5. Analyse der perifokalen arthrotischen Degenerationsprozesse	70
6.5.1. Mikro-computertomographische Evaluation des perifokalen Knorpels	70
6.5.2. Mikro-computertomographische Evaluation der perifokalen Knochenplatte	71
6.5.3. Mikro-computertomographische Evaluation der perifokalen subartikulären Spongiosa	72
6.5.4. Histopathologische Bewertung der perifokalen Arthrose	74

7. DISKUSSION	77
7.1. Studienziele	77
7.2. Effekte der rAAV-TGF-β1-Behandlung auf das Reparaturgewebe	78
7.2.1. Nachhaltiger Einfluss auf mikrostrukturelle Defektparameter und die Defektarchitektur	78
7.2.2. TGF-β1-Expression im Reparaturgewebe	80
7.2.3. Kollagenzusammensetzung des Reparaturgewebes.....	80
7.3. Effekte der rAAV-TGF-β1-Behandlung auf den subchondralen Knochen	81
7.4. Effekte der rAAV-TGF-β1-Behandlung auf die Defektzellularität.....	83
7.5. Effekte der rAAV-TGF-β1-Behandlung auf perifokale degenerative Prozesse.....	84
7.6. Limitationen und Stärken	86
7.7. Zusammenfassung.....	87
7.8. Ausblick und klinische Perspektiven	88
8. LITERATURVERZEICHNIS	90
9. PUBLIKATIONEN	104
10. DANKSAGUNG.....	105
11. LEBENSLAUF.....	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der osteochondralen Einheit	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der operativen Vektorapplikation.	14
Abbildung 3: Übersicht der durchgeführten Defektevaluationen und Methoden.	15
Abbildung 4: Exemplarische makroskopische Darstellung der Defektreparatur.	25
Abbildung 5: Osteochondrale Einheit und korrespondierende Mikro-CT-Darstellung.	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der manuellen Mikro-CT-Analyse.	31
Abbildung 7: Exemplarische magnetresonanztomographische Kondylendarstellung.	32
Abbildung 8: Übersichtsdarstellung der angefertigten histologischen Färbungen.	43
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zellularitätsbestimmung.	45
Abbildung 10: Semiquantitative makroskopische Defektanalysen.	48
Abbildung 11: Mikro-CT-Datensätze in 2D- und 3D-Darstellung.	49
Abbildung 12: 3D-Mikro-CT-Defektdarstellung und Knochenmineraldichteverteilung.	51
Abbildung 13: Kolorierte 3D-Mikro-CT-Darstellung der Knorpeldicke.	51
Abbildung 14: Kolorierte 3D-Mikro-CT-Darstellung der subchondralen Knochenplatte.	54
Abbildung 15: Magnetresonanztomographische Defektbewertung.	57
Abbildung 16: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Sellers.	60
Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse von Typ-I-Kollagen.	63
Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse von Typ-II-Kollagen.	64
Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse von Typ-X-Kollagen.	65
Abbildung 20: Immunhistochemische Analyse von TGF- β 1.	66
Abbildung 21: Defektzellularität im knorpeligen Reparaturgewebe.	68
Abbildung 22: Korrelationsanalyse der Zellularität und Gewebsqualität.	69
Abbildung 23. Perifokale CT-Datensätze in 2D- und 3D-Darstellung.	73
Abbildung 24: Semiquantitative histologische Analyse des perifokalen Gewebes.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Lösungen und Suspensionen.....	17
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 3: Antikörper und Enzyme.....	19
Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 5: Operationsinstrumentarium.....	21
Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme.....	22
Tabelle 7: Kriterien des modifizierten Bewertungssystems aus Oswestry.....	26
Tabelle 8: Makroskopisches inverses Bewertungssystem aus Homburg.....	26
Tabelle 9: Mikro-CT analysierte Bestandteile der osteochondralen Einheit.....	28
Tabelle 10: Magnetresonanztomographische Bewertungskriterien.....	32
Tabelle 11: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i>	37
Tabelle 12: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Fortier <i>et al.</i>	39
Tabelle 13: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Wakitani <i>et al.</i>	40
Tabelle 14: Histopathologische Kriterien des OARSI-Bewertungssystems.....	41
Tabelle 15: Semiquantitatives Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreakтивität.....	44
Tabelle 16: Makroskopische Defektanalyse (Bewertungssystem aus Oswestry).....	47
Tabelle 17: Makroskopische Defektanalyse (inverses Bewertungssystem).....	48
Tabelle 18: Mikro-CT-Analyse des Defektknorpels.....	48
Tabelle 19: Modifizierte Mikro-CT-Analyse des Defektknorpels.....	52
Tabelle 20: Manuelle Mikro-CT-Analyse des knorpeligen Defektgewebes.....	52
Tabelle 21: Mikro-CT-Analyse der subchondralen Knochenplatte.....	53
Tabelle 22: Manuelle Mikro-CT-Analyse der subchondralen Knochenplatte.....	54
Tabelle 23: Mikro-CT-Analyse der subartikulären Spongiosa.....	55
Tabelle 24: Defektbewertung anhand des adaptierten MOCART-Bewertungssystems.....	56
Tabelle 25: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Sellers.....	58
Tabelle 26: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Fortier.....	61
Tabelle 27: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Wakitani.....	62
Tabelle 28: Immunhistochemische Analyse von Typ-I-Kollagen.....	63
Tabelle 29: Immunhistochemische Analyse von Typ-II-Kollagen.....	64
Tabelle 30: Immunhistochemische Analyse von Typ-X-Kollagen.....	65
Tabelle 31: Immunhistochemische Analyse von TGF- β 1 im Reparaturgewebe.....	66
Tabelle 32: Defektzellularität nach zonaler Aufteilung.....	67
Tabelle 33: Mikro-CT-Analyse des perifokalen Knorpels.....	70
Tabelle 34: Modifizierte Mikro-CT-Analyse des perifokalen Knorpels.....	70
Tabelle 35: Mikro-CT-Analyse der perifokalen subchondralen Knochenplatte.....	71
Tabelle 36: Mikro-CT-Analyse der perifokalen subartikulären Spongiosa.....	72
Tabelle 37: Semiquantitative histologische Analyse des perifokalen Gewebes.....	74

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
% vol	Volumenprozent
(r)AAV	(rekombinantes) adeno-assoziertes Virus
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
bit	Binärziffer (<i>binary digit</i>)
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BS/BV	Knochenoberfläche/Volumen (<i>bone surface/volume</i>)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)
BV/TV	Knochenvolumenanteil (<i>bone volume fraction</i>)
bzw.	beziehungsweise
CaHA	Calcium-Hydroxylapatit
cm	Zentimeter
Ct.Th	kortikale Dicke (<i>cortical thickness</i>)
cDNS	komplementär-Desoxyribonukleinsäure
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DA	Grad der Anisotropie (<i>degree of anisotropy</i>)
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>et alii/et aliae</i> - und andere
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
GEE	<i>Generalized estimating equation</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IKDC	<i>International Knee Documentation Committee</i>
IL	Interleukin
lacZ	β-Galactosidase-Gen

Mikro-CT	Mikrofokus-Computertomographie
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOCART	<i>Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
ROI	Region von Interesse (<i>region of interest</i>)
s	Sekunde
Safranin-Orange	Safranin-O
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDF	<i>stromal-derived factor</i>
SMI	<i>Struktur-Model-Index (structure model index)</i>
SOX9	<i>sex determining region Y (Sry)-related HMG box 9</i>
Tb.Sp	Trabekelabstand (trabecular separation)
Tb.Th	Trabekeldicke (trabecular thickness)
Tb.N	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)
Tb.Pf	trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (<i>trabecular pattern factor</i>)
TE	Echozeit (<i>echo time</i>)
TR	Repetitionszeit (<i>time of repetition</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
VOI	Volumen von Interesse (<i>volume of interest</i>)

1. Zusammenfassung

Fragestellung: Osteochondrale Defekte sind in ihrer intrinsischen Regenerationsfähigkeit limitiert und werden durch ein Reparaturgewebe substituiert, welches langfristig die optimale strukturelle und biochemische Konstellation einer normalen osteochondralen Einheit nicht suffizient reproduziert. Perifokale Gewebedestruktion und konsekutive Arthroseinduktion sind häufig die Folge. Die Regulation der initialen osteochondralen Defektheilung bietet dabei einen essentiellen Ansatzpunkt zur langfristigen Optimierung des Reparaturgewebes. Diesbezüglich zeigte sich die lokale und prolongierte Überexpression des transformierenden Wachstumsfaktors β 1 (TGF- β 1) bereits in zuvor durchgeführten Studien als eine potente Therapieoption, welche die frühe Defektheilung *in vivo* positiv beeinflusst. Insbesondere direkte Langzeit-Effekte des Gentransfers auf das Reparaturgewebe und die perifokalen Verhältnisse wurden allerdings bislang nicht untersucht.

Methoden: Die vorliegende translationale Großtierstudie umfasst acht Minischweine, welche jeweils bilateral an beiden medialen Femurkondylen operativ fokale osteochondrale Defekte erhielten. Therapiert wurden die osteochondralen Läsionen mit rekombinannten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektoren, die eine alternierende Überexpression des TGF- β 1- (n = 8, Behandlungsgruppe) oder des β -Galactosidase-Gens (*lacZ*, n = 8, Kontrollgruppe) bedingten. Nach einem Jahr erfolgte die Analyse des Reparaturgewebes und des perifokalen Gewebes mittels etablierter makroskopischer und histologischer Bewertungssysteme. Ergänzend wurde das Reparaturgewebe und dessen Mikroarchitektur durch Mikrocomputertomographische sowie Ultrahochfeld-magnetresonanztomographische Bildgebung dargestellt und analysiert. Feingewebliche Untersuchungen mit immunhistochemischen Nachweisen und Zellularitätsmessungen komplettierten die Defektanalysen.

Ergebnisse: Direkter rAAV-vermittelter Gentransfer von TGF- β 1 führte zur signifikanten Verbesserung der Defektfüllung, Matrixanfärbung und gesamten Knorpelreparatur nach einem Jahr *in vivo* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem bewirkte die rAAV-TGF- β 1-Behandlung signifikant höhere Zelldichten in den tiefen und mittleren Schichten des knorpeligen Reparaturgewebes, ohne dabei eine Chondrozytenhypertrophie zu induzieren. Des Weiteren minimierte rAAV-TGF- β 1 die subartikuläre trabekuläre Separation im knöchernen Regeneratbereich. Bemerkenswert ist, dass rAAV-TGF- β 1 auch die perifokale Arthrose nach einem Jahr signifikant reduzierte und hierbei insbesonders die Knorpelstruktur und die Chondrozytendichte signifikant verbesserte.

Schlussfolgerungen: Die Behandlung osteochondraler Defekte mit rAAV-TGF- β 1 verbessert das knorpelige Reparaturgewebe nachhaltig und führt zur signifikanten Reduktion der perifokalen Arthrose im translationalen Großtiermodell.

Abstract

Gene transfer of TGF- β improves osteochondral repair and reduces perifocal osteoarthritis in a large animal model at one year

Introduction: Osteochondral defects are limited in their intrinsic regenerative capacity and were regularly substituted by a repair tissue that is not able to sufficiently reproduce the physiological structure and biochemical constellation of the native osteochondral unit. Perifocal degeneration and osteoarthritis can be the long-term consequence. Thus, the regulation and therapeutic improvement of osteochondral repair is of particular importance in order to optimize the repair tissue. Gene transfer of transforming growth factor beta (TGF- β) with recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors offers a novel potent strategy to improve osteochondral repair. However, the long-term *in vivo* effects of such rAAV-mediated TGF- β 1 overexpression on the repair tissue and the perifocal tissue remain unknown.

Methods: Focal osteochondral defects in minipig knees were treated with either rAAV-*lacZ* (β -galactosidase, n = 8, control group) or rAAV-TGF- β 1 (n = 8, treatment group). After one year, the repair tissue and perifocal osteoarthritis were visualized using macroscopic scoring, ultra-high-field MRI at 9.4 Tesla, and micro-CT. A quantitative estimation of the cellular densities and a validated semi-quantitative scoring of histological and immunohistological parameters completed the microarchitectural analysis of the repair tissue.

Results: Direct rAAV-mediated gene transfer of TGF- β 1 induced significantly improved defect filling, matrix staining and overall cartilage repair after one year *in vivo*. In addition, rAAV-TGF- β 1 application led to significantly higher cell densities in the deep and middle layers of cartilaginous repair tissue without affecting chondrocyte hypertrophy. Moreover, rAAV-TGF- β 1 minimized subarticular trabecular separation within the regenerated subchondral bone. Remarkably, rAAV-TGF- β 1 significantly reduced perifocal osteoarthritis after one year, improving in particular the adjacent cartilage structure and chondrocyte density.

Conclusions: The study highlights considerable long-term effects of locoregional rAAV-TGF- β 1-treatment after one year as a targeted molecular approach to treat focal osteochondral defects. These data suggest a mechanism of defect repair modification *in vivo* that may improve long-term human osteochondral repair and diminish perifocal osteoarthritis.

2. Einleitung

2.1. Problematik (Überblick)

Synovialgelenke sind wesentliche Bestandteile des menschlichen Bewegungsapparats. Das reibungslose Gleiten der verbundenen Knochen wird durch die osteochondrale Einheit gewährleistet, die aus dem Gelenkknorpel und dem subchondralen Knochen besteht (GOLDRING, 2012). Unterschiedliche pathophysiologische Prozesse nehmen dabei auf diese komplexe Einheit Einfluss. So bedingen traumatische Knorpelschäden und Erkrankungen wie Osteochondrosis dissecans, Osteonekrosen oder Arthrose eine strukturelle sowie funktionelle Störung dieser osteochondralen Einheit (GOMOLL *et al.*, 2010; ORTH *et al.*, 2014). Letztlich führen unbehandelte lokale, umschriebene (osteo-)chondrale Defekte im Kontinuum der Belastung angrenzend zur progressiven Knorpeldestruktion, die sich schließlich in einer unikompartimentellen Arthrose manifestieren kann, und verursachen letztlich Schmerzen sowie Bewegungseinschränkungen (ANGELE *et al.*, 2016; JOSEPH *et al.*, 2012; RANDSBORG *et al.*, 2016; SANDERS *et al.*, 2017). Das intrinsische Heilungspotential des adulten hyalinen Knorpels ist dabei äußerst limitiert und stellt somit eine besondere therapeutische Herausforderung dar (O'DRISCOLL, 1998). Osteochondrale Defekte regenerieren nicht, sondern werden durch ein Reparaturgewebe substituiert, welches auf migrierenden pluripotenten Knochenmarkstammzellen basiert (LEE *et al.*, 2012; ORTH *et al.*, 2012; SHAPIRO *et al.*, 1993). Dieses reproduziert oft die optimale strukturelle und biochemische Konstellation des physiologischen Gelenkknorpels nicht suffizient. Es erfolgt somit keine *Restitutio ad integrum*, was der Ausbildung eines Regeneratgewebes entsprechen würde (HUEY *et al.*, 2012). Ein solches vollständiges Regeneratgewebe lässt sich lediglich in der Embryonalzeit beobachten, nicht aber im Erwachsenenalter (CPLAN, GOLDBERG, 1999). In Folge dessen und zur Prävention von sekundärer Arthrose ist die Optimierung der Knorpeldefektreparatur zentraler Bestandteil aktueller laborexperimenteller und translationaler Forschung, mit dem potentiellen Ziel zukünftig ein Regeneratgewebe konstruieren zu können. Da die Knorpelreparatur ähnlich der embryonalen Chondrogenese durch Zytokine reguliert wird liegt es nah diese Mediatoren auch therapeutisch zu nutzen. Sie tragen unter anderem zur Zellproliferation bei (FUJIMOTO *et al.*, 1999), induzieren die Chondrogenese und steigern die Produktion der extrazellulären Matrix (BOBACZ *et al.*, 2002). Da Zytokine Polypeptide sind, ist bei alleiniger intraartikulärer Applikation deren pharmakologisch relevante Halbwertszeit bedeutend limitiert, wie beispielsweise bei dem Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) mit ca. 30 min (CHUMA *et al.*, 2004). Eine Überexpression von Wachstumsfaktoren mittels viralem Gentransfer kann die therapeutische Anwesenheit von Signalproteinen in Form von z.B. Wachstumsfaktoren im Defektareal, prolongieren. Sowohl *ex vivo*, als auch im Großtiermodell ist die

Einleitung

Transduktion mittels rekombinanter adeno-assozierter viraler (rAAV-)Vektoren aus der Familie der Parvoviridae eine etablierte Gentransfermethode. So wurden bereits mehrfach Signalproteine, welche potentiellen Einfluss auf die osteochondrale Defektheilung haben, mittels viraler Transduktion *in vivo* überexprimiert. Es zeigten sich chondrogene Effekte für den insulinartigen Wachstumsfaktor I (IGF-I) (FRISCH *et al.*, 2014a), die knochenmorphogenetischen Proteine (BMP-2,-6) (MENENDEZ *et al.*, 2011) und den Transkriptionsfaktor *sex determining region Y-HMG box 9* (SOX9) (VENKATESAN *et al.*, 2012). Auch das Potenzial des transformierenden Wachstumsfaktors β 1 (TGF- β 1) zur Modifikation der Frühphase der osteochondralen Defektheilung ist mit dieser und ähnlicher Methodik für *in vitro* (ULRICH-VINTHER *et al.*, 2005; VENKATESAN *et al.*, 2013) und *in vivo* Modelle bereits gezeigt worden (ASEN, 2018; PAGNOTTO *et al.*, 2007). Differenzierte Gewebeanalysen in Langzeitmodellen fehlen allerdings, insbesondere zur Evaluation perifokaler Prozesse, welche sich erst im Kontinuum der Zeit demaskieren.

2.2. Grundlagen der osteochondralen Einheit und Einteilung

osteochondraler Defekte

Die Gelenkfunktion wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Gelenkbestandteile gewährleistet. Teil des passiven Bewegungsapparates sind neben Kapsel- und Bandapparat die Gelenkflächen, welche von hyalinem Knorpelgewebe überzogen sind. Die Gelenkflächen der großen Gelenke zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Druck- und Zugbelastungen während der Gelenkbewegung zu übertragen und zu kompensieren. Ermöglicht wird dies durch die funktionelle Einheit aus Knorpelgewebe und unterliegendem Knochengewebe, welche als osteochondrale Einheit bezeichnet wird (schematische und histologische Darstellung siehe Abbildung 1). Die Komponenten der osteochondralen Einheit sind nicht nur mechanisch eng gekoppelt, sondern weisen auch tiefergehende metabolische Verbundenheit auf (MADRY *et al.*, 2016b). Dysbalance innerhalb der empfindlichen Einheit kann Pathologien induzieren oder aus diesen resultieren sowie folglich zur Degeneration des Gelenks beitragen (LEPAGE *et al.*, 2019). Pathologische Veränderungen der osteochondralen Einheit bedingen aufgrund der engen Verknüpfung auch sekundär die weiteren osteochondralen Komponenten. So betreffen frühe degenerative Prozesse nicht allein den Knorpel, sondern führen auch zu einer Verdickung der subchondralen Knochenplatte und diffusen reaktiven Veränderungen in der subartikulären Spongiosa (GOLDRING, GOLDRING, 2016; MADRY *et al.*, 2012).

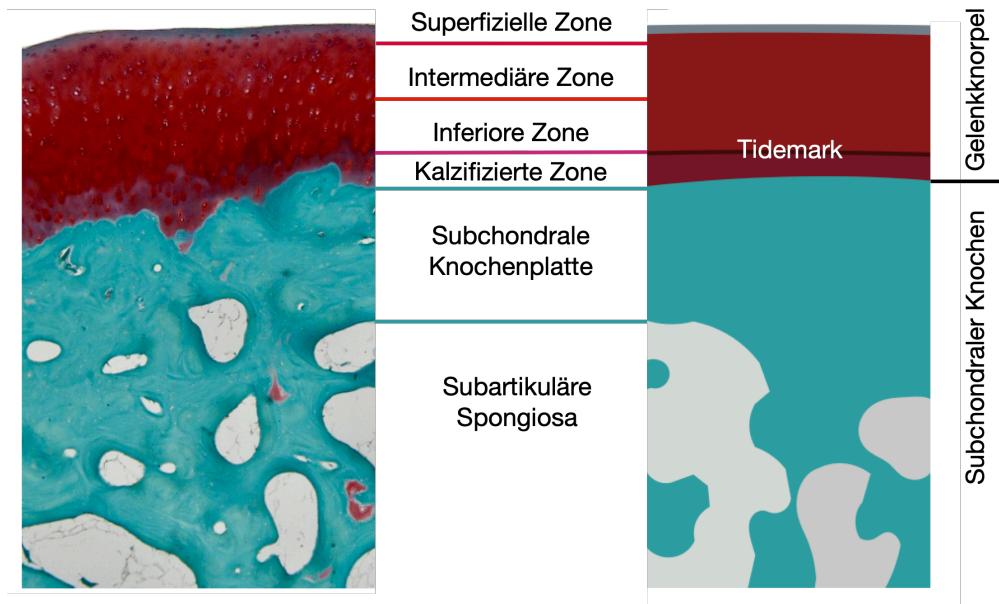


Abbildung 1: Schematische Darstellung der osteochondralen Einheit eines Aachener Minischweins.

Der hyaline Gelenkknorpel wird seinen funktionellen Ansprüchen mit Hilfe einer komplexen extrazellulären Matrix gerecht. Sie besteht vorwiegend aus Wasser, Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen (BUCKWALTER, MANKIN, 1998). Wasserbindende Eigenschaften der Matrix begünstigen letztlich die Druckelastizität des Gewebes, was einer seiner Hauptfunktionen entspricht (HALL *et al.*, 1996; ORTH, 2009). Die Produktion und Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix gewährleisten eingebettete Chondrozyten. Der zelluläre Anteil macht insgesamt nur ca. 2 % des anervalen alymphatischen Gewebes aus und wird über die Synovialflüssigkeit und Gefäße des subchondralen Raums versorgt (BUCKWALTER, MANKIN, 1998; CUCCHIARINI, MADRY, 2005; MILZ, PUTZ, 1994).

Im Gelenkknorpel besteht eine besondere Kollagenkomposition vorwiegend bestehend aus Typ-III,-V,-VI,-X,-XI,-XIV und dem Hauptkollagen Typ-II mit einem Gesamtanteil von 90-95% (WACHSMUTH *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2000). Besonders Typ-II-Kollagen ist aufgrund seines hohen Anteils im Gelenkknorpel für viele mechanische Eigenschaften verantwortlich (BORA, MILLER, 1987). Dieses verläuft bogenförmig apikal aufsteigend von der Zementlinie, um nach kurzem parallelem Verlauf an der Gelenkoberfläche deszendierend in jener zu enden. Typ-X-Kollagen hingegen lässt sich vorwiegend in den metabolisch aktiveren Zonen des Knorpels nachweisen und umgibt vorwiegend hypertrophe Chondrozyten (MUELLER *et al.*, 2010; PACIFICI *et al.*, 1990). Die Struktur der Kollagenfibrillen in Kombination mit der Anordnung der Chondrozyten lässt Rückschlüsse auf eine zonale Aufteilung des Gelenkknorpels zu. Dieser teilt sich auf in die Tangentialzone, Übergangszone, Radiärzone und Mineralisationszone (kalzifizierter Knorpel). Die oberflächliche Tangentialzone ist durch

Einleitung

einen hohen Kollagengehalt gekennzeichnet und beinhaltet spindelförmige Chondrozyten. Dabei ist eine parallele Anordnung der Knorpelbestandteile zur Gelenkoberfläche auf eine optimale Kraftabsorption ausgelegt (MINNS, STEVEN, 1977). Verlust oder degenerative Schäden dieser Knorpelschicht vermindern die Gleitfähigkeit der Gelenkpartner und führen zu schlechterer Toleranz hinsichtlich einwirkender Scherkräfte. In der Übergangszone sind abgerundete Chondrozyten vorzufinden, ihr schließt sich inferior die Radiärzone an. Diese fungiert als Dämpfer von axialen Kompressionskräften. Gewährleistet wird dies durch einen hohen Proteoglykangehalt und durch Chondrozyten, welche in charakteristischen Säulen angeordnet sind (HUBER *et al.*, 2000). Als Grenzlinie zwischen Radiärzone und dem radiologisch dichteren mineralisierten Knorpel ist die sog. *Tidemark* beschrieben (BROOM, POOLE, 1982). Sie ist ein dreidimensionales Gebilde und lässt sich besonders in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) darstellen. Die Kollagenfibrillen des nicht-kalzifizierten Knorpels durchstoßen die *Tidemark* und setzen sich im mineralisierten Knorpel fort. Mineralisation ist ein physiologischer Prozess und an die Belastung der Gelenkoberfläche adaptiert. Der kalzifizierte Knorpel verbindet letztlich den Gelenkknorpel mit dem basal gelegenen Knochen (LYONS *et al.*, 2005). Dieser ist funktionell sowie morphologisch eng mit dem überliegenden Knorpel verbunden. Den Übergang zwischen mineralisiertem Knorpel und unterliegendem Knochen bildet die Zementlinie. Kollagenfibrillen durchdringen diese Linie nicht, allerdings perforieren Blutgefäße noch diese Grenzschicht.

Der subchondrale Knochen gliedert sich in die subchondrale Knochenplatte und die subartikuläre Spongiosa. Die Morphologie dieser Komponenten variiert zwischen den Gelenken des menschlichen Körpers erheblich, da sie an jeweilige mechanische Belastungen angepasst ist. Auch die Definitionen der subchondralen Komponenten variieren in der Literatur. Für die vorliegende Arbeit ist die subchondrale Knochenplatte als Knochenlamelle direkt unter der Zementlinie definiert (MADRY *et al.*, 2010). Gebildet wird die subchondrale Knochenplatte aus parallel angeordneten Kollagenlamellen. Kollagenfibrillen penetrieren diese und setzen sich weiter bis in die Knochentrabekel fort. Sie verbinden somit den Gelenkknorpel fest mit dem unterliegendem trabekulärem Knochen (INOUE, 1981).

Defekte der osteochondralen Einheit werden anhand morphologischer Kriterien eingeordnet. So kann die Betrachtung von fokalen Gelenkknorpeldefekten anhand der Ausdehnungstiefe erfolgen. Unterschieden werden dabei isoliert chondrale von osteochondralen Defekten. Chondrale Läsionen können teilschichtig oder vollschichtig imponieren und sind begrenzt auf das Knorpelgewebe. Osteochondrale Defekte hingegen sind definiert als eine tiefgreifendere Schädigung, welche die subchondrale Knochenplatte perforiert und bis in die subartikuläre Spongiosa reicht. Osteochondrale Defekte stehen somit per Definition formal mit dem

unterliegenden Knochenmark in Verbindung. Im Prozess der Defektheilung spielt dies eine zentrale Rolle. Zur weiteren Differenzierung und klinischen Strukturierung der osteochondralen Defekte ist eine Einteilung erforderlich. Etabliert hat sich die *ICRS-Klassifikation (International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society, Grad 0 bis 4b)* auf Basis der klinischen Einteilung von Knorpeldefekten, welche Noyes und Stabler initiierten (NOYES, STABLER, 1989). Unterschieden werden dabei Grad 0, wenn keine Pathologie vorliegt, Grad 1a bei intakter Oberfläche mit Fibrillationen und/oder Knorpelerweichungen sowie Grad 1b, wenn zusätzlich eine oberflächliche Rissbildung vorliegt. Der *ICRS-Grad 2* ist erreicht, wenn ein teilschichtiger Knorpeldefekt vorliegt, welcher weniger als 50% der gesamten Knorpeldicke misst. Entsprechend repräsentiert Grad 3 Defekte über mehr als 50% der normalen Knorpeldicke. Hierbei wird unterschieden, ob keine (3a) oder eine Affektion der kalzifizierten Zone (3b) besteht, der Defekt bis zum subchondralen Knochen reicht (3c) oder dass eine zusätzliche Blasenbildung auftritt (3d). Die schwersten Defekte werden mit Grad 4 bewertet und stellen osteochondrale Defekte ohne (4a) oder mit direktem begleitendem Knochendefekt (4b) dar. Die in dieser Studie operativ induzierten Defekte sind den osteochondralen Defekten mit begleitendem Knochendefekt zuzuordnen (4b), die eine Affektion der subartikulären Spongiosa aufweisen.

2.3. Biologie der osteochondralen Reparatur

Wie oben beschrieben hat die Tiefenausdehnung der Gelenkknorpeldefekte bedeutenden Einfluss auf das Potential und die Ausgangspunkte für spontane Heilungsmechanismen. So zeigen isoliert chondrale Defekte oft insuffiziente Reparaturmuster oder persistieren als Defekt (FULLER, GHADALLY, 1972). Grundlage der Defektheilung bildet eine zelluläre Basis, die wichtige anabole Funktionen übernimmt. Eine Migration oder regenerative Proliferation von adulten lokoregionären Chondrozyten selbst ist stark limitiert und nicht suffizient, insbesondere in degenerativ veränderten Gewebemilieus (DOZIN *et al.*, 2002; TALLHEDEN *et al.*, 2005). Mesenchymale Stromazellen aus der Synovialmembran könnten in die Defektregion einwandern, allerdings produziert der Knorpel antiadhäsive Proteoglykane, welche ein Anhaften der Zellen an die extrazelluläre Matrix verhindern (HUNZIKER, ROSENBERG, 1996). Bei osteochondralen Defekten hingegen wird der entstehende Defekt sofort durch ein Gerinnung aus aszendierendem Knochenmarksblut gefüllt. Die enthaltenen Stammzellen aus dem Knochenmark übernehmen dann eine zentrale Rolle im Heilungsprozess. Chirurgische markraumeröffnende Verfahren versuchen den Effekt der Defektfüllung durch ein Blutgerinnung operativ herbeizuführen und somit eine Grundlage für die Entstehung von Reparaturgewebe zu initiieren (ERGGELET, VAVKEN, 2016; STEADMAN *et al.*, 2002). Basis des Reparaturgewebes bildet dann zunächst ein Komplex aus Thrombozyten, Erythrozyten und Stammzellen, welche in einer Fibrinmatrix

Einleitung

eingedeckt sind (HUNZIKER, 1999; JOHNSON, 1986). Dieses Gerinnsel, auch „super clot“ genannt, haftet im Defekt und füllt diesen aus (JOHNSON, SPECTOR, 2015). Letztlich differenziert dieses auch aufgrund der mesenchymalen Zellkomposition innerhalb von ca. 6 Wochen zu einem vorwiegend faserknorpeligen Reparaturgewebe aus (SHAPIRO *et al.*, 1993; STEADMAN *et al.*, 2001). Auf subchondraler Ebene wird meist eine solide knöcherne Konsolidierung des Defektes erreicht, die knorpeligen Anteile integrieren dabei eher insuffizient zum angrenzenden Gewebe (TRENGOVE *et al.*, 2021). Der perifokale Knorpel leidet unter den mechanischen und biochemischen Alterationen, sodass Chondrozyten im Übergangsbereich absterben (REDMAN *et al.*, 2005; SHAPIRO *et al.*, 1993). Auch die komplexe Mikrostruktur in Bezug auf die vertikale Organisation der Chondrozyten kann im Heilungsprozess ausbleiben (BOTHE *et al.*, 2019). Ein Kaninchenmodell zeigte bereits nach 4 Wochen ein Typ-II-Kollagen-reiches Gewebe, welches durch chondrozytenähnliche Zellen unterhalten wird (FURUKAWA *et al.*, 1980). Diese Zellen sind jedoch nicht typischerweise palisadenartig angeordnet und die Knorpelmatrix strukturell kaum organisiert. Bereits nach 10-20 Wochen beginnen degenerative Prozesse das Reparaturgewebe zu strapazieren und offenbaren eine mechanische sowie biochemische Unterlegenheit im Vergleich zu nativem hyalinem Knorpel (SHAPIRO *et al.*, 1993). Die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen osteochondralen Verhältnisse ist nur eingeschränkt möglich. Dennoch zeigten Frisbie *et al.* nach Débridement des kalzifizierten Knorpels in einer Tierstudie an Pferden nach einem Jahr die Möglichkeit einer vollständigen Rekonstruktion der *Tidemark* (FRISBIE *et al.*, 2006). Auch im Kaninchenmodell beschrieben Marchand *et al.* bereits nach 6 Monaten die vollständige Formation einer *Tidemark* im Reparaturgewebe (MARCHAND *et al.*, 2012).

Da bei osteochondralen Defekten auch eine Affektion des unterliegenden Knochens vorliegt, sind Prozesse der Defektreparatur nicht nur auf das Knorpelniveau begrenzt. Heilungsprozesse inkludieren und basieren auch auf der Rekonstruktion des subchondralen Knochens (LYDON *et al.*, 2019). Für die medialen Femurkondylen von Göttinger Minischweinen zeigten Jung *et al.*, dass die Defektorganisation auch auf Prozessen wie der enchondralen Ossifikation beruhen (JUNG *et al.*, 2009). So ist nach 3 Monaten eine knöcherne Defektkonsolidierung nachgewiesen, auf der dann die Bildung von neuem Knorpelgewebe basiert. Die ossären Heilungsprozesse in osteochondralen Defekten haben somit deutliche Parallelen zu den Prozessen der Frakturheilung (EINHORN, 1998; LYDON *et al.*, 2019). Auch biomechanische Stimuli beeinflussen die zellulären Prozesse und fördern so beispielsweise die Differenzierung zu knochenbildenden Osteoblasten (CHEN *et al.*, 2017).

2.4. Sekundärarthrose

Arthrose ist die chronisch progrediente degenerative Destruktion eines Gelenks unter Miteinbeziehung der peri- sowie intraartikulären Strukturen (KRISHNASAMY *et al.*, 2018; URBAN, LITTLE, 2018). Die Sekundärarthrose beschreibt den durch artikuläre Form- und Funktionsstörungen induzierten destruktiven Gelenkprozess variabler Genese. Aus anlagebedingten Fehlstellungen oder Traumafolgen kann sich somit sekundär eine Arthrose entwickeln (SABERI HOSNIJEH *et al.*, 2017). Besonders auch fokale Defekte der osteochondralen Einheit können im Verlauf Einfluss nehmen auf die Destruktion des Gelenks (GUERMAZI *et al.*, 2017a; MANKIN, 1982; SCHINHAN *et al.*, 2020). Im Fokus steht dabei das Reparaturgewebe, welches progradient degenerativen Veränderungen unterliegt (JACKSON *et al.*, 2001). Eine Affektion des perifokalen Gewebes ist dann aufgrund der veränderten biomechanischen Verhältnisse wahrscheinlich (KATAGIRI *et al.*, 2017). Klinisch stehen bei fortgeschrittener Arthrose primär Gelenkschmerzen und der Funktionsverlust im Vordergrund, während die initiale Gelenksdestruktion oft symptomarm voranschreitet (MADRY, 2022).

Das therapeutische Spektrum bei degenerativen Gelenkerkrankungen erstreckt sich von einer konservativen Therapie mit Bewegungstherapie und orthopädischen Hilfsmitteln über die strukturierte Schmerztherapie bis hin zu operativen Strategien. Diese beinhalten neben dem vollständigen und partiellen Gelenkersatz allerdings auch gelenkerhaltende und rekonstruktive Methoden. Gelenkerhaltende Vorgehen sind besonders in frühen Stadien der Erkrankung mit isoliert fokaler Manifestation sinnvoll. Der therapeutische Fokus invasiver Maßnahmen liegt dabei auf der langfristigen Vermeidung von sekundärer Arthrose. Zum Beispiel ermöglichen Umstellungsosteotomien wie die valgisierende Tibiakopfosteotomie eine Korrektur der Achsfehlstellung und eine signifikante Verbesserung biomechanischer Risikofaktoren aufgrund der postoperativ optimierten Lastverteilung (BIRMINGHAM *et al.*, 2017). Bei symptomatischen, umschriebenen, nicht arthrotischen Knorpeldefekten sind operative Maßnahmen von besonderer Bedeutung, da sich eine periläsionale Früharthrose ausweiten kann (ANGELE *et al.*, 2016; MADRY *et al.*, 2016a; SCHINHAN *et al.*, 2012). Insgesamt kann im Verlauf durch knorpelrekonstruktive Verfahren die kumulative Inzidenz für Endoprothetik signifikant gesenkt werden (SANDERS *et al.*, 2017). Eine adäquate Versorgung von fokalen intraartikulären Läsionen trägt somit bedeutend zur langfristigen Sekundärprophylaxe der Arthrose bei (SCHINHAN *et al.*, 2020).

2.5. Aktuelle klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Die Therapie fokaler Knorpeldefekte hängt neben der Tiefen- und Flächenausdehnung des Defektes vor allem vom symptomatisch funktionellen Anspruch des Patienten ab. Gelenkschmerz und Funktionseinschränkungen führen im Verlauf der Erkrankung zu einer erheblichen Beeinflussung der Lebensqualität. Deshalb rückt zunächst die adäquate medikamentöse Schmerztherapie durch nichtsteroidale Antirheumatika und Opioide auch bei Knorpeldefekten in den Vordergrund. Rekonstruktiv-chirurgische Verfahren kommen bei unzureichenden Therapieergebnissen der konservativen Behandlung zum Einsatz. Insgesamt besteht die Indikation zur chirurgischen Knorpeltherapie bei der symptomatischen fokalen Früharthrose, welche um lokale Knorpelläsionen auftritt (FEUCHT *et al.*, 2021). Primär ist aus therapeutischer Sicht die Füllung des Defektes mit einem adäquaten Reparaturgewebe anzustreben, um die Oberflächenkongruenz wiederherzustellen. Dies reduziert nicht nur die Symptomatik, sondern soll frühzeitig die Entstehung oder Ausweitung perifokaler Degenerationen verhindern. Das langfristige Therapieziel ist, eine Expansion der perifokalen Gewebsschädigung zu limitieren und somit globale Gelenkdestruktionen zu vermeiden (ANGELE *et al.*, 2016). Die operativ therapeutischen Ansätze für knorpelrekonstruktive Verfahren erstrecken sich von der Eröffnung des Markraums mittels Pridie-Bohrung (PRIDIE, 1959) oder Mikrofrakturierung (STEADMAN *et al.*, 1999) bis hin zur Transplantation von autologen Chondrozyten (GRANDE *et al.*, 1989; NIEMEYER *et al.*, 2007). Doch keines der Behandlungsverfahren erzielt bislang ein Reparaturgewebe, welches dem nativen hyalinen Gelenkknorpel äquivalent ist (HINCKEL *et al.*, 2021). Ein weiterer Ansatz ist die Transplantation von einem oder mehreren vollständigen autologen osteochondralen Zylindern (ASSENMACHER *et al.*, 2016; GRANDE *et al.*, 1989). Dieses einzeitige Transferverfahren wird dem biologischen Anspruch gerecht, das Defektgewebe mit einer vollständigen hyalinen osteochondralen Einheit auszustatten (PEARSALL *et al.*, 2004). Doch auch die Zylindertransplantation unterliegt mehreren möglichen Versagensmechanismen. Unter anderem sind eine insuffiziente Integration der knorpeligen Struktur in die Umgebung (WELTON *et al.*, 2018), zystische Formationen (GUDAS *et al.*, 2005) oder Transplantatinkongruenz möglich. Tierstudien zeigten, dass sich der transplantierte Zylinder bezüglich seiner osteochondralen Komponenten deutlich verändern kann. So kommt es zu Veränderungen im Bereich des Knorpels (HUANG *et al.*, 2004; TIBESKU *et al.*, 2004) und des Knochens (KOCK *et al.*, 2011; SIEBERT *et al.*, 2001) bis hin zu Transplantatfrakturen (BURKS *et al.*, 2006). Ein einfacher Ersatz des nativen physiologischen Zustands ist somit bislang nicht möglich.

2.6. Aktuelle experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Klinische, labor- und tierexperimentelle Forschung versucht etablierte Therapieansätze zu verbessern und die Langzeitergebnisse der Defektheilung zu optimieren. Zunehmende Kenntnisse über Pathophysiologie und Pathologie der Knorpeldefekte ermöglichen neue potentielle Therapieansätze, welche die intrinsische Heilungsfähigkeit des Gewebes unterstützen. Besonders Zell-, Gen- und (zellfreie) gerüstbasierte Verfahren könnten synergistisch mit den Heilungsprozessen des hochspezialisierten Knorpelgewebes interagieren (CUCCHIARINI *et al.*, 2015; CUCCHIARINI, MADRY, 2010).

2.6.1. Wachstumsfaktoren als therapeutische Optionen

Die intraartikuläre Injektion von chondroprotektiven oder stimulierenden Substanzen zur Vermeidung progressiver destruierender arthrotischer Prozesse oder zur Stimulation der Defektheilung ist eine wenig invasive, früh einsetzbare Interventionsmöglichkeit. Auf Basis dieses Ansatzes haben sich bereits klinische Anwendungen etabliert, welche vor allem in der Arthrosetherapie als regenerative Ansätze propagiert werden. Konkret kann plättchenreiches Plasma (PRP) als autologes Blutprodukt intraartikulär appliziert werden (SANCHEZ *et al.*, 2009; SMELTER, HOCHBERG, 2013). Die in den Thrombozyten enthaltenen multiplen Wachstumsfaktoren sollen chondroprotektive Stoffwechselprozesse regulieren (KON *et al.*, 2010; LEITNER *et al.*, 2006). Die Rolle und therapeutische Verwendung einzelner Zytokine bei Gelenkserkrankungen ist bereits seit Jahrzehnten Forschungsgegenstand (GOLDRING, 2000). So zeigen Studien zum chondrogen wirkenden Fibroblastenwachstumsfaktor-18 (FGF-18), dass durch die intraartikuläre Injektion der Knorpelverlust bei Gonarthrose eingedämmt und eine Beschwerdelinderung erreicht werden kann (ECKSTEIN *et al.*, 2015; LOHMANDER *et al.*, 2014). Die biologischen Effekte verteilen sich dabei diffus über das gesamte Gelenk und scheinen somit kaum effektiv für die lokoregionale Anwendung bei fokalen Knorpelschäden. Andere molekulare Therapieansätze versuchen die Problematik der kurzen Halbwertszeit der intraartikulär applizierten Wachstumsfaktoren und unerwünschte Wirkungen an gesunden Gelenkarealen zu umgehen. Erreicht werden kann dies durch lokale prolongierte Expression der therapeutischen Polypeptide mittels z.B. Gentransfersystemen, welche eine Überexpression therapeutischer Faktoren durch die migrierten mesenchymalen Stromazellen im Reparaturgewebe erzeugen (CUCCHIARINI, MADRY, 2005). Dabei bietet der Gentransfer mittels rekombinanter adeno-assozierter viraler Vektoren eine hohe Effizienz bei ebenfalls hoher Anwendungssicherheit (ARAI *et al.*, 2000; ULRICH-VINTHER *et al.*, 2004). Sie basieren auf einem nicht pathogenen, replikationsinkompetenten adeno-assoziierten Virus, dessen AAV-codierende Sequenzen eliminiert und durch „*Transgene cassette*“ ersetzt wurden (CUCCHIARINI *et al.*, 2015). Entsprechend ist eine weitere

Einleitung

Replikation in der Wirtszelle unmöglich. Die transduzierte Desoxyribonukleinsäure (DNS) beinhaltet somit einen integrierten, codierenden Anteil für z.B. einen Wachstumsfaktor. Diese DNS liegt dann als Episom extrachromosomal in der Wirtszelle vor und wird exprimiert (KAY *et al.*, 2001). So kann eine prolongierte Präsenz des Wachstumsfaktors um oder in der Wirtszelle erzeugt werden. Effekte auf das umliegende Gewebe zeigten sich bereits nach der lokoregionären isolierten Überexpression des Wachstumsfaktors FGF-2 in humanen Knochenmarksaspiraten mit proliferativen und prochondrogenen Effekten (FRISCH *et al.*, 2016). Auch SOX9 förderte in einer ähnlichen Konstellation die Proteoglykan- und Typ-II-Kollagenbiosynthese (VENKATESAN *et al.*, 2018).

2.6.2. Transformierender Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1)

Der transformierende Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1) ist ein Zytokin der TGF-Superfamilie, welche mehr als 30 Wachstumsfaktoren mit pleiotropen Wirkungen auf nahezu jedes menschliche Gewebe beinhaltet (GORDON, BLOBE, 2008). TGF- β wirkt dabei über membranständige Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und aktiviert außerdem den Smad-Signalweg (HUANG, CHEN, 2012; TANG, ZHANG, 2011). Die Bindung von TGF- β aktiviert die Rezeptoren über Komplexbildung (FENG, DERYNCK, 2005). Dieser Komplex phosphoryliert dann sog. *receptor-Smads* (*Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8*), die im Komplex mit einem *common-Smad* (*Smad-4*) zur Modulation der Genexpression fähig sind. Die rezeptorvermittelten Wirkungen auf Signaltransduktionsprozesse sind dabei u.a. abhängig vom Zelltyp, der Konzentration der Signalwegkomponenten und der Aktivität anderer Signalwege (TEN DIJKE, HILL, 2004).

In mesenchymalen Stromazellen wirkt TGF- β 1 als Schlüsselinitiator der Chondrogenese und unterhält diese mittels verschiedener chondro-stimulierender Aktivitäten über z.B. *extracellular signal-regulated kinases* (GRAFE *et al.*, 2018). Die Regulation der chondrogenen Differenzierung wird über den Kinase-modulierten N-Cadherin-Spiegel erreicht, welche auch Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben (TULI *et al.*, 2003). Weiterhin zeigt TGF- β 1 proliferative Effekte und stimuliert die Produktion von knorpelspezifischen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (HU *et al.*, 2021). So wird die Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen wie Typ-II-Kollagen unter Anwesenheit von TGF- β 1 gesteigert (FURUMATSU *et al.*, 2009; REDINI *et al.*, 1988; WORSTER *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2015). Proliferative und anabole Effekte erzielten bereits *in vitro* rAAV-hTGF- β 1 behandelte mesenchymalen Stromazellen, die so zu einer prolongierten Überexpression des Wachstumsfaktors befähigt waren (FRISCH *et al.*, 2014b, a). Eine *ex vivo* Modifikation von mesenchymalen Stromazellen mit anschließender Implantation in osteochondrale Defekte hatte im Kleintiermodell eine strukturelle Verbesserung des Reparaturgewebes zur Folge

(PAGNOTTO *et al.*, 2007). Im Großtiermodell zeigten dann Knorpeldefekte, welche direkt mit rAAV-hTGF- β 1 behandelt wurden auch signifikante Verbesserungen der Frühheilungsphase, welche auf die genannten Effekte des TGF- β 1 zurückzuführen sind (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Weiter zeigte sich das Potential der prolongierten Freisetzung von TGF- β 1 bereits in der Behandlung der fortgeschrittenen Gonarthrose. Intraartikuläre Injektionen von retroviral modifizierten und bestrahlten juvenilen allogenen Chondrozyten, die eine komplementär-Desoxyribonukleinsäure (cDNS) des TGF- β 1 überexprimieren (TissueGene-C, Invossa®) befinden sich bereits in klinischen Studienphasen (LEE *et al.*, 2015). Dabei hat die zellbasierte Therapie laut einer Phase-III-Studie signifikanten Einfluss auf klinische Parameter, welche u.a. mittels des IKDC-Bewertungssystem [IKDC: *International Knee Documentation Committee subjective Knee Form*] und der visuellen Analogskala (VAS) für Schmerz gemessen wurden (CHO *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2018). Auch strukturelle Effekte auf den Knorpel nach intraartikulärer Anwendung sind denkbar (GUERMAZI *et al.*, 2017b).

Neben stimulierenden Effekten sind regulativ inhibitorische Wirkungen von TGF- β 1 auf andere Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) bekannt. So antagonisiert TGF- β 1 die Effekte von IL-1 auf Matrix-Metalloproteininasen in Chondrozyten (ANDREWS *et al.*, 1989; LUM *et al.*, 1996; ULRICH-VINTHER *et al.*, 2005). In der Knorpelhomöostase nimmt TGF- β 1 somit eine zentrale anabole Rolle ein, denn im gesunden Knorpel hält sich sowohl ein ständiger Abbau, als auch die Synthese von Knorpelmatrixmolekülen die Waage (KIM *et al.*, 2022). Signalproteine regulieren die Syntheseraten in der extrazellulären Matrix und sind vermutlich fähig, kompensatorisch in der Frühphase der Arthrose mit anabolen Stimuli entgegenzuwirken (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2007). Erschöpfen sich diese Prozesse, überwiegen die katabolen Stimuli und führen somit zur Degeneration der extrazellulären Matrix. Die Anwendung von TGF- β 1 wird durch die Induktion von Hypertrophie-Proteinen wie Typ-X-Kollagen, Matrix-Metalloproteinase-13 und alkalischer Phosphatase, welche zur Knorpelmineralisation beitragen können, limitiert (DAVIS *et al.*, 2021).

2.7. Studienaufbau

Die vorliegende Arbeit untersucht mittels eines Großtiermodells am Aachener Minischwein die direkten Langzeiteffekte der rAAV-vermittelten Expression des Wachstumsfaktors TGF- β 1 auf die osteochondrale Defektheilung. Analysiert wurden die Auswirkungen auf das Reparaturgewebe und die perifokalen Strukturen nach operativer Defektsetzung (Abbildung 2).

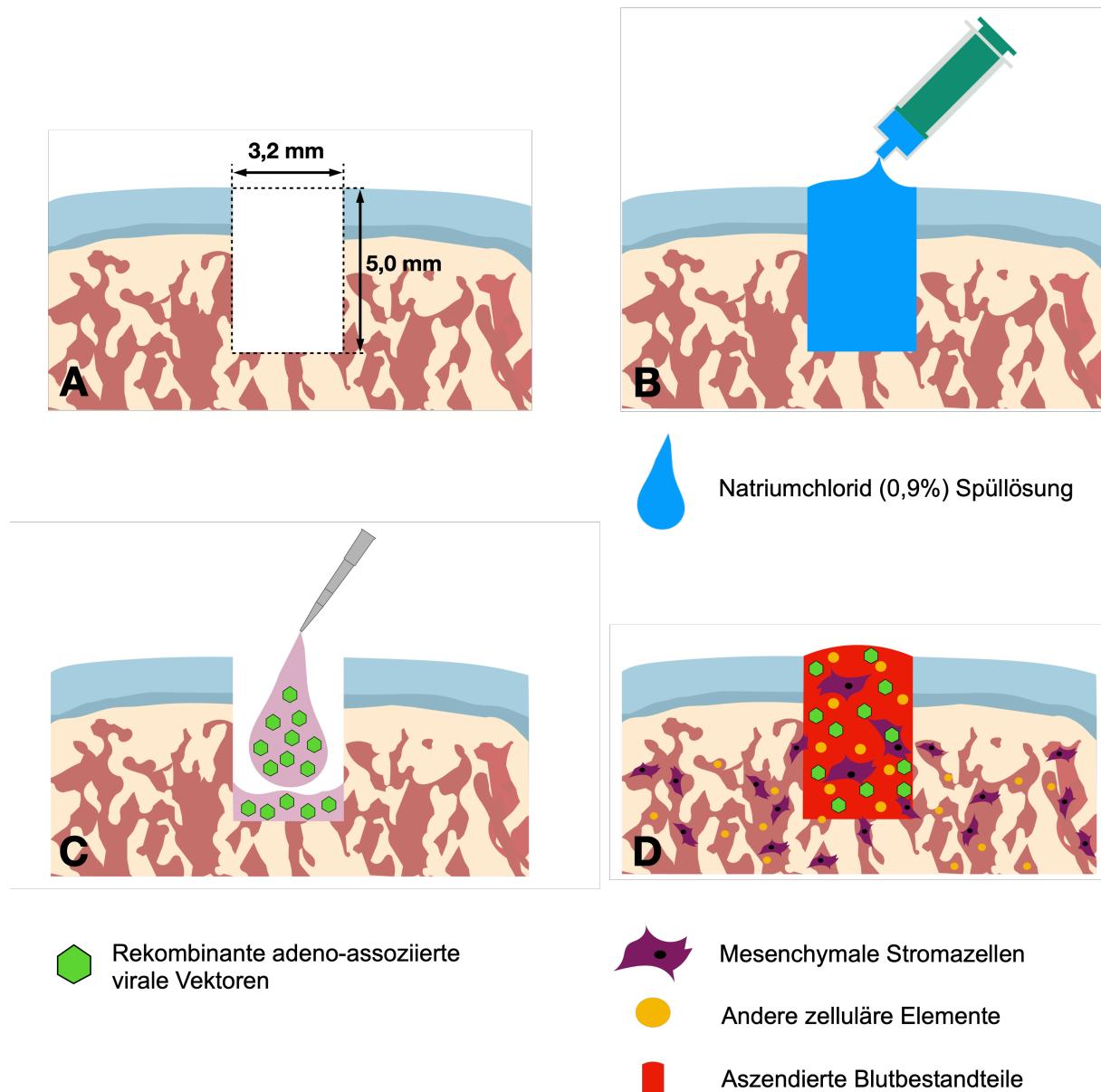


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vektorapplikation. Nach Miniarthrotomie wurden standardisierte osteochondrale Defekte erzeugt (A) und mit isotoner Kochsalzlösung gespült (B). Anschließend erfolgte die Applikation (C) der rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren (hTGF- β 1 oder lacZ beladen). Letztlich bildete sich ein Blutkoagel aus aszendierenden Blutkomponenten des unterliegenden Knochenmarks. Dieser beinhaltet Zellkomponenten darunter u.a. mesenchymale Stromazellen (D). lacZ: β -Galactosidase-Gen; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Im Fokus des Studienaufbaus steht somit die langfristige Optimierung des Reparaturgewebes im Kontext einer prolongierten Zytokinüberexpression nach viralem Gentransfer. Die osteochondrale Defektsetzung erfolgte dabei chirurgisch an den medialen Femurkondylen beider Hinterläufe mit einem horizontalen Durchmesser von 3,2 mm bei einer Defekttiefe von 5 mm. Alternierend wurde an jedem Tier jeweils ein Defekt mit rAAV-hTGF- β 1 (Behandlungsgruppe) oder mit Kontrollvektoren („rAAV-*lacZ*“) therapiert. Es ergeben sich somit zwei Behandlungsgruppen. Die rAAV-*lacZ*-Gruppe dient als Kontrollgruppe, zu der ein direkter Vergleich sämtlicher erhobener Parameter erfolgte. Die Gewebsanalysen erfolgten ein Jahr nach der chirurgischen Intervention anhand vieler etablierter Bewertungsmethoden (ASEN, 2018; ASEN *et al.*, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018; MÜLLER-BRANDT, 2017), wie zeitlich in Abbildung 3 dargestellt.

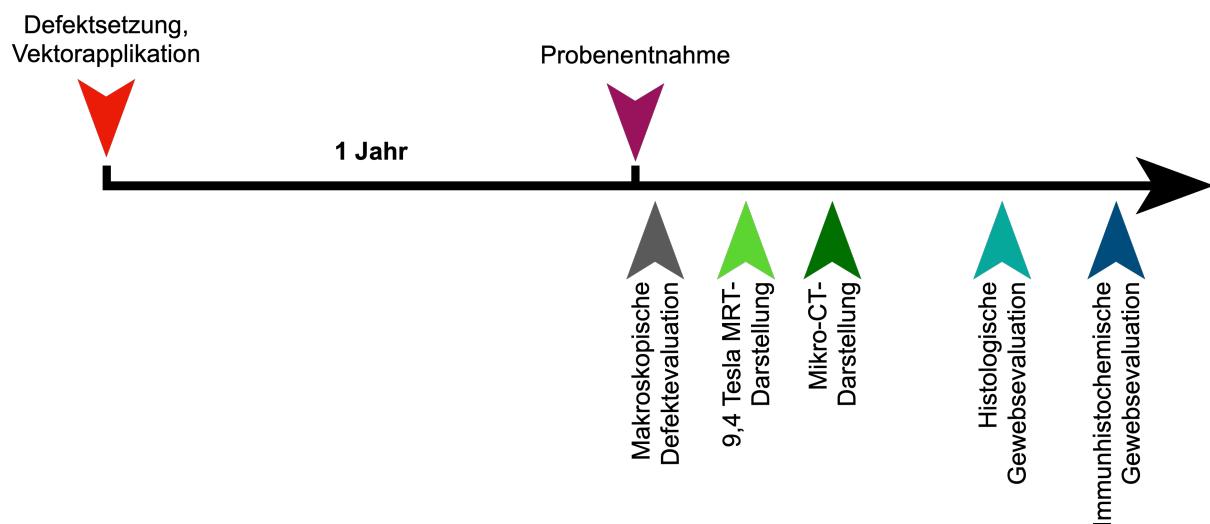


Abbildung 3: Übersicht der angewendeten Methoden im zeitlichen Verlauf.

3. Hypothesen

In einem Langzeit-Großtiermodell mit adulten Minischweinen wurden an chirurgisch induzierten standardisierten fokalen osteochondralen Defekten folgende Hypothesen untersucht:

- (1) *Therapie mit rekombinanten adeno-assozierten viralen Vektoren, die TGF- β 1-cDNS tragen, verbessert nachhaltig die chondrale Defektheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe.*
- (2) *Therapie mit rekombinanten adeno-assozierten viralen Vektoren, die TGF- β 1-cDNS tragen, verbessert nachhaltig die subchondrale knöcherne Defektheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe.*
- (3) *Therapie mit rekombinanten adeno-assozierten viralen Vektoren, die TGF- β 1-cDNS tragen, erhöht die Zellzahl im Defektgewebe nachhaltig.*
- (4) *Therapie mit rekombinanten adeno-assozierten viralen Vektoren, die TGF- β 1-cDNS tragen, reduziert den Progress einer perifokalen Arthrose.*

4. Material

4.1. Lösungen, Puffer und Medien

Alle hergestellten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (H_2O) angesetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Lösungen und Suspensionen.

Lösung, Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration / Menge / Volumen
Blockierungspuffer (3'3 Diaminobenzidin)	Bovines Serumalbumin	6 ml
	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	200 ml
DAB-Lösung (3'3 Diaminobenzidin)	H_2O	5 ml
	Puffer (pH=7,5)	2 Tropfen
	DAB-Substratreagenz	4 Tropfen
	H_2O_2	2 Tropfen
Echtgrün-Lösung	Echtgrün	200 mg
	H_2O	ad 1000 ml
Entkalkungs-Lösung	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90 %)	250 ml
	H_2O	ad 750 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H_2O	ad 2000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	Kaliumdihydrogenphosphat	9,07 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H_2O	ad 1000 ml
Hämatoxylin-Lösung (nach Harris)	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100 %)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
HCl-Lösung (Salzsäure)	H_2O	ad 2000 ml
	HCl (40 %)	5,4 ml
PBS	H_2O	ad 200 ml
	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM

Material

	Dinatriumhydrogenphosphat	10 mM
Safranin-O-Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25 %)	800 ml
	PBS	25% vol
Trypsin-Stammlösung	Trypsin	25% vol
	PBS	75% vol
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3 %)	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	200 ml

4.2. Chemikalien

Die verwendeten Medien und Bestandteile von Puffern und Lösungen wurden primär von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Tabelle 2 zeigt Reagenzien, Lösungen und Chemikalien mit den entsprechenden Bezugsquellen.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Produkt	Hersteller
Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Bovines Serumalbumin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
3,3'-Diaminobenzidin-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Echtgrün	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (100 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin (4 %)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert (A & B)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Harris	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Paraplast X-TRA	Leica (Nussloch, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Salzsäure (1 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylol	Fischer (Saarbrücken, Deutschland)

4.3. Biologische Materialien

In Tabelle 3 aufgeführte monoklonale Antikörper und Enzyme fanden für die immunhistochemischen Aufarbeitungen des Reparaturgewebes Verwendung.

Tabelle 3: Antikörper und Enzyme.

Antikörper und Enzym	Donor	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Anti-TGF- β 1	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Typ-X-Kollagen	Maus	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Trypsin		Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

IgG: Immunglobulin G; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

4.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Neben allgemeinem Instrumentarium kamen die in Tabelle 4 aufgeführten Geräte und Materialien zur Anwendung.

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Deckgläser	Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Fettstift	Sigma (Taufkirch, Deutschland)
Gefrierschrank	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana, Italien)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlplatte EG1140C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Mikrofokus-Computertomograph (Skyscan 1176)	Bruker (Kontich, Belgien)
Mikrofokus-Computertomographie-Röntgenröhre	Hamamatsu (Hamamatso City, Japan)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
SuperFrost Plus Objektträger	Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62 °C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI 1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

4.5. Operationsinstrumente

Verwendung für die Präparation und operative Defektsetzung fanden die in Tabelle 5 aufgeführten Operationsinstrumente und Materialien.

Tabelle 5: Operationsinstrumentarium.

Instrument	Hersteller
Abdecktuch, Foliodrape	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Aluminiumhaltiges Desinfektionsspray	Albrecht (Aulendorf, Deutschland)
Biopsiestanze	Kai Europe (Solingen, Deutschland)
Braunoderm	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Durogesic, Fentanylpflaster	Janssen-Cilag (Neuss, Deutschland)
Erbotom ICC 350, Hochfrequenzchirurgie-Gerät	Erbe (Tübingen, Deutschland)
Hohmann-Hebel	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Mayo-Schere	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Metzenbaumschere	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Mixter-Zange	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Monopolarer Elektrodengriff	Erbe (Tübingen, Deutschland)
Nadelhalter nach Mayo-Hegar	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Pipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Prolene-Nahtmaterial	Ethicon (Somerville, NJ, USA)
Ringkürette	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Skalpell	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Spritze (20ml und 10ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Wundhaken	

4.6. Software

Für die computerbasierte Defektevaluation, statistische Auswertung und graphische Aufarbeitung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Computerprogramme genutzt.

Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme.

Programm	Hersteller/Entwickler
Cellsense	Olympus (Hamburg, Deutschland)
CTAn (CT-Analyzer)	Bruker (Kontich, Belgien)
Dataviewer	Bruker (Kontich, Belgien)
Keynote	Apple (Cupertino, CA, USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
NRecon	Bruker (Kontich, Belgien)
Paravision 5.1 JIVE Tool	Bruker Biospin (Ettlingen, Deutschland)
RadiAnt	Medixant (Poznan, Polen)
Stata software, Version 15	StataCorp LLC (College Station, TX, USA)

5. Methoden

5.1. Großtiermodell

Für die Planung der Tierversuche wurden die PREPARE-Leitlinien (SMITH *et al.*, 2018) berücksichtigt. Die Berichterstattung des *in vivo*-Modells erfolgte auf Basis der ARRIVE-Leitlinien 2.0 (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020). Die chirurgischen Eingriffe wurden zuvor von der saarländischen Tierschutz-Kommission (gemäß §8 des Tierschutzgesetzes; Genehmigungsnummer: 70/2013) genehmigt und standen im Einklang mit der EU-Richtlinie 2010/63/EU für Tierversuche. Die Anzahl der verwendeten Tiere, welche die bilaterale Operation erhielten, wurde auf Grundlage von Daten aus vorangegangen Tierstudien für Knorpeldefektmodelle festgelegt (CUCCHIARINI *et al.*, 2018; ORTH *et al.*, 2013). Bei Berechnung für ein α -Fehlerniveau von 0,05 würden bei bilateraler Behandlung insgesamt 7 Tiere benötigt. Um den potentiellen Verlust eines Tieres zu kompensieren wurden insgesamt 8 ausgewachsene weibliche Aachener Minischweine (Gerd Heinrichs, Heinsberg, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $42,75 \pm 6,12$ kg operiert. Unter permanenter tiermedizinischer Überwachung wurden die Tiere im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes operiert und nach hochethischen Aspekten den deutschen Tierschutzrichtlinien entsprechend behandelt. Letztlich wurden die Tiere postoperativ ohne eine spezielle Anschlussbehandlung bei standardisierter Diät für ein Jahr im Freiland gehalten.

5.2. Studiendesign / Qualitätskriterien

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine translationale Tierstudie zur Langzeit-Wirkungsanalyse der rAAV-TGF- β 1-Therapie im osteochondralen Defektareal und zur Evaluation der Auswirkungen auf das perifokale Gewebe. Die Kontrollgruppe ($n = 8$) wird durch Defekte gebildet, welche im kontralateralen Knie des gleichen Tiers mit rAAV-*lacZ* behandelt wurden. Phänotypisch entspricht die Kontrollgruppe bei gleichen Individuen direkt der Behandlungsgruppe. Eine paarweise Zuordnung wurde nicht durchgeführt, um eine Stichprobenverzerrung zwischen den behandelten Defekten zu verhindern. Zudem wurden Operateure sowie Auswertende verblindet. Alle angewandten Analysen und Bewertungen dienen zur Identifizierung und Quantifizierung der Therapieeffekte im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe.

5.3. Rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren

Eine langanhaltende und stabile lokoregionäre Expression des Wachstumsfaktors TGF-β1 wurde durch virale Transduktion erreicht. Professorin Dr. rer. nat. Magali Cuccharini stellte unter Verwendung eines Biplasmidtransduktionssystems die Vektoren rAAV-*lacZ* und rAAV-TGF-β1 auf Basis des AAV-2 Klons pSSV9 her. Die Vektor-DNS bestand neben dem codierenden Anteil für *lacZ* oder hTGF-β1 aus dem Verpackungsplasmid pXX2 und dem Adenovirus-Helferplasmid pXX6. So trägt rAAV-*lacZ* das Gen für die β-Galactosidase und rAAV-hTGF-β1 das 1,2 kB lange Komplementär-cDNS-Fragment „PFF-hTGFB1“ (Invivogen, Toulouse, Frankreich) codierend für den menschlichen transformierenden Wachstumsfaktor TGF-β1. Beide Konstrukte wurden reguliert durch den *Cytomegalovirus immediate-early Promoter*. Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurden die Konstrukte aufgereinigt und titriert. Es standen letztlich 10^{10} transgene Kopien pro ml mit ca. 1/500 funktionalen Vektoren zur Verfügung.

5.4. Operation und postoperative Behandlung

Die Eingriffe erfolgten unter balancierter Anästhesie und sterilen Bedingungen im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes. Dazu wurden die Tiere präoperativ durch Ketamin (30mg/kg Ketanest S, Pfizer, Berlin, Deutschland), Xylazin (2mg/kg Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Atropin (0,02 mg/kg Atropinsulfat, B. Braun, Melsungen, Deutschland) sediert. Propofol (20 ml 2% Disoprivan, AstraZeneca, Hamburg, Deutschland) und Isofluran (1,5%, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) hielten nach endotrachealer Intubation die Allgemeinanästhesie aufrecht. In Rückenlagerung mit freiliegenden Hinterläufen wurden die Tiere rasiert und mit 10%iger Jodlösung desinfiziert. Nach dem sterilen Abdecken des Operationsgebietes wurde das distale Drittel der Hinterläufe mit Raucodrape steril und mobilisationsfähig umwickelt. Professor Dr. med. Henning Madry führte die Operationen durch und begann mit einem mediopatellaren ca. 5 cm messenden Hautschnitt. Zunächst erfolgte dann eine subtile Präparation des subkutanen Gewebes bis zur Darstellung des Ligamentum patellae. Zugang zum Kniegelenk erhielt der Operateur mittels einer Miniarthrotomie in 60° Flexion im Sinne eines medialen parapatellaren Zugangs. In stärkerer Flexion war somit eine suffiziente Darstellung der medialen Femurkondyle erreicht. Zunächst markierte der Operateur das Areal für die zirkuläre chondrale Defektsetzung (Durchmesser 3,2 mm) direkt zentral im gewichtstragenden Anteil der medialen Femurkondyle durch eine Hautstanze (Kai Europe, Solingen, Deutschland). Die Läsion wurde anschließend mit einer Ringkürette (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) vollständig von Knorpel befreit, sodass die subchondrale Knochenplatte in Gänze dargestellt war. Mit einem kanülierten Bohrer (Durchmesser 3,2 mm) wurden dann die 5 mm tiefen osteochondralen Läsionen erzeugt. Anschließend wurden

die Defekte mit physiologischer Kochsalzlösung gespült (siehe A und B in Abbildung 2). Darauf konnten die Genvektoren in Form von 12 µl Vektorenlösung in die Läsionen eingebracht werden (siehe C in Abbildung 2). Dabei erfolgte die Behandlung jeweils für ein Knie des Tieres mit rAAV-*lacZ* oder rAAV-TGF- β 1. Die Tiere (n = 8) wurden bilateral operiert und beide Therapien alternierend verblindet appliziert. Es resultierte für jedes Tier je ein osteochondraler Defekt in der medialen Femurkondyle, der mit rAAV-*lacZ*- beziehungsweise kontralateral mit rAAV-TGF- β 1-Therapie behandelt wurde. Nach Spülung und passiver Mobilisation des Gelenks wurde die Gelenkkapsel schichtweise verschlossen. Abschließend erfolgte der Wundverschluss mit Subkutannaht und Hautnaht. Postoperativ wurde den Tieren eine Schmerztherapie in Form von transdermaler Applikation von Fentanyl für 72 h (100 µg/h; Durogesic, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) und bedarfsweise orales Carprofen (4mg/kg Rimadyl, Pfizer, Berlin, Deutschland) zugeführt. Eine Entlastung oder Ruhigstellung der operierten Gelenke war nicht erforderlich, da keine Mobilitätseinschränkungen bestanden. Ein Jahr postoperativ wurden die Tiere in Allgemeinanästhesie durch eine Überdosis Pentobarbital euthanasiert und daraufhin die Knie chirurgisch explantiert. Die parallel durchgeführte detaillierte Fotodokumentation unter standardisierten Lichtverhältnissen der einzelnen Defekte ermöglichte die anschließende makroskopische Auswertung. Nach der Entnahme wurden die Präparate vollständig erhalten tiefgefroren, sodass diese für weitergehende Analysen aufbereitet werden konnten.

5.5. Makroskopische Bewertung

Auf Grundlage der Fotodokumentation (Abbildung 4) führten drei verblindete Beobachter die makroskopische Evaluation der Defekte durch.

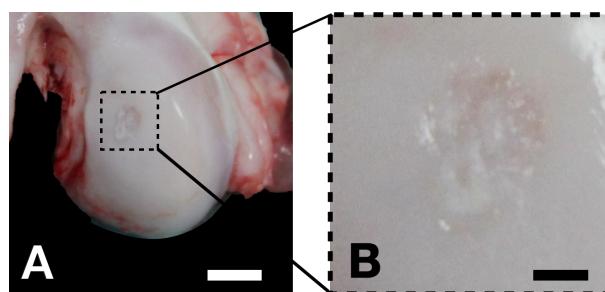


Abbildung 4: Exemplarische makroskopische Darstellung der Defektreparatur. Anhand der Fotodokumentation erfolgte die makroskopische Defektevaluation. Hier gezeigt ist ein Übersichtsbild der medialen Femurkondyle (A) und eine Vergrößerung (B); Maßstabsbalken: A 1,5 mm; B 1,0 cm.

Methoden

Zur Anwendung kam der modifizierte *Oswestry Arthroscopy Score* nach Smith *et al.* (SMITH *et al.*, 2005) zur Einschätzung der Knorpelreparatur sowie ein inverses makroskopisches Bewertungssystem (GOEBEL *et al.*, 2012), welches dargestellt ist in Tabelle 7. Da das Bewertungssystem aus Oswestry ursprünglich für Arthroskopien entwickelt wurde entfällt in der hier verwendeten modifizierten Version der Parameter „Steifheit beim Sondieren“.

Tabelle 7: Kriterien des modifizierten makroskopischen Bewertungssystems aus Oswestry.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	Im Niveau	2
	Oberhalb des Niveaus	1
	Unterhalb des Niveaus	0
2. Integration	Vollständig	2
	Kleine Unterbrechungen (< 25 % der Fläche)	1
	Große Unterbrechungen (> 25 % der Fläche)	0
3. Oberflächenbeschaffenheit	Glatt	2
	Feine Unregelmäßigkeiten	1
	Viele Unregelmäßigkeiten oder Fibrillationen	0
4. Farbe des Reparaturgewebes	Perlmutter, hyalin	2
	Weiß	1
	Gelber Knochen	0

Beim inversen makroskopischen Bewertungssystem aus Homburg (GOEBEL *et al.*, 2012) zeigt eine niedrige Bewertungspunktzahl die makroskopisch höherwertig imponierende Knorpelreparatur an (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Makroskopisches inverses Bewertungssystem aus Homburg.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	Hyalin oder weiß	0
	Vorwiegend weiß (> 50 %)	1
	Vorwiegend transparent (> 50 %)	2
	Transparent	3
	Kein Reparaturgewebe vorhanden	4

2. sichtbare Blutgefäße	Keine	0
	< 25 % des Reparaturgewebes	1
	25-50 % des Reparaturgewebes	2
	50-75 % des Reparaturgewebes	3
	> 75 % des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächenbeschaffenheit	Glatt, homogen	0
	Glatt, inhomogen	1
	Fibrillationen	2
	Inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	Kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung	Im Niveau	0
	> 50 % der Defekttiefe ausgefüllt oder hervorstehend	1
	< 50 % der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0 % der Defekttiefe ausgefüllt	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4
5. Perifokale Degeneration	Physiologische Verhältnisse	0
	Risse und / oder Fibrillationen in der Integrationszone	1
	Diffuse arthrotische Veränderungen	2
	Ausbreitung des Defekts in den angrenzenden Knorpel	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4

5.6. Mikro-computertomographische Auswertung

5.6.1. Bildakquisition

Die Aufnahmen von 16-Bit-Röntgenbildern wurden in 0,4° Intervallen mit einer Belichtungszeit von 270 ms mit dem Gerät Skyscan 1176 (Bruker, Kontich, Belgien) erstellt, dabei betrug die Auflösung pro Pixel 17,64 µm. Sekundäre Rekonstruktionsmodifikationen wie Glättung, Korrektur von Ausrichtungsfehlern, Ringartefaktreduktion und Korrektur der Strahlenhärte (2, 1, 10, 30% ohne Einheit) wurden nach Voruntersuchungen und Erfahrungswerten entsprechend durchgeführt (ASEN, 2018; OLÁH *et al.*, 2018).

Ein modifizierter *Feldkamp Cone-Beam* Algorithmus (NRecon software, Bruker) ermöglichte dann aus den Rohbildern einen verwendbaren Datensatz zu rekonstruieren (FELDKAMP *et*

Methoden

al., 1989). Die Ausrichtung der Schnittbilder erfolgte in der Koronarebene, um eine einheitlich reproduzierbare Analyse der Datensätze zu ermöglichen. Jegliche Messungen und Auswertungen wurden mithilfe des Programms CT-Analyzer (Bruker) durchgeführt. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density; BMD*) ließ sich aus den Abschwächungskoeffizienten (Grauwerten) errechnen. Für die Kalibrierung der BMD-Berechnung wurden standardisierte Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome (250 und 750 mg CaHA/cm³) verwendet (ASEN, 2018; FELDKAMP *et al.*, 1989).

5.6.2. Definition der untersuchten 3-dimensionalen Strukturen

Zur Beurteilung der osteochondralen Einheit wurden sechs Areale als *regions of interest* (ROIs) definiert und eingezeichnet (siehe Abbildung 5). Diese sind zweidimensional (2D) und ergeben in Addition der einzelnen Schnittbilder die dreidimensionalen (3D) *volumes of interest* (VOIs). Eine Übersicht über alle angefertigten VOIs bietet Tabelle 9.

Tabelle 9: Mikro-computertomographisch analysierte Bestandteile der osteochondralen Einheit.

Areal	Struktur	Graustufen
Defektgewebe	Knorpelniveau	10-89, 89-255
	Subchondrale Knochenplatte	89-255
	Subartikuläre Spongiosa	89-255
Perifokales Gewebe	Knorpel	10-89, 89-255
	Subchondrale Knochenplatte	89-255
	Subartikuläre Spongiosa	89-255

Die aufgeführten Graustufen repräsentieren die computertomographische Fensterung und sind jeweils angepasst für die zu analysierende Struktur. So war es möglich die Analyse auch auf das Knorpelniveau auszuweiten, da dort ausgebliebene Defektheilungen, respektive fehlendes Reparaturgewebe, demaskiert werden konnte.

Die ROIs/VOIs erfassten jeweils das Defektgewebe und perifokal den Knorpel, die subchondrale Knochenplatte und die subartikuläre Spongiosa (CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Breite und Länge der Defekt-ROIs orientierten sich an den operativen Defektausmessungen mit 3,2 mm. Die Tiefenausdehnung der ROI „subartikuläre Spongiosa“ wurde auf 5 mm festgelegt. Korrespondierend dazu erfolgte die Einzeichnung der ROIs, welche das native Gewebe markieren. Dabei verwendet wurde eine standardisierte Breite von 2 mm und die Einzeichnung erfolgte primär medialseitig des Defektgewebes. Dies verhinderte direkte Überschneidungen zu den Defekt-ROIs.

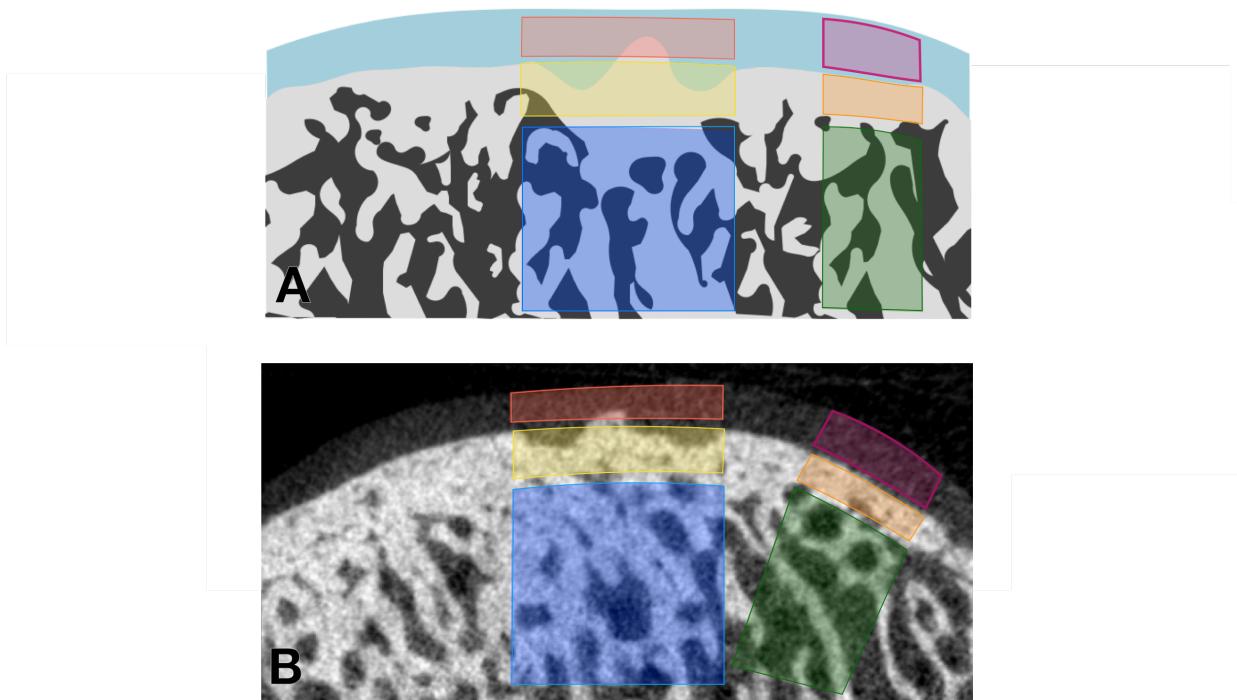


Abbildung 5: Repräsentative osteochondrale Einheit und korrespondierende Mikro-computertomographische Darstellung. Schematische Darstellung (A) und computertomographische Aufnahme (B) der osteochondralen Einheit: Eingezeichnet sind exemplarisch die analysierten Zonen (regions of interest, ROI) im Defektbereich sowie die entsprechende korrespondierende Lokalisation im angrenzenden Gewebe. Eingezeichnet ist somit der Bereich der subchondralen Knochenplatte (gelb respektive perifokal orange), der subartikulären Spongiosa (blau respektive grün) sowie das Gewebe im Niveau des hyalinen Gelenkknorpels (rot respektive violett).

5.6.3. Strukturelle Parameter zur Analyse der Defektarchitektur

Es erfolgte eine computerbasierte Kalkulation für jedes VOI mit folgenden Parametern:

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

Dazu wurden folgende Werte im Knorpelniveau bestimmt:

- Kortikale Dicke (Ct.Th)
- Geschlossene Porosität (*closed porosity*)
- Offene Porosität (*open porosity*)
- Totale Porosität (*total porosity*)
- Knochenvolumenanteil (*bone volume fraction*, BV/TV) mit modifizierter Darstellung. Der dargestellte Knorpel wurde mittels Fensterung der Graustufen hyperdens dargestellt und war scharf gegenüber des Gesamt-VOIs abzugrenzen. Der Parameter kann formal als Defektfüllung interpretiert werden (BV/TV).

Methoden

Im Bereich der subchondralen Knochenplatte wurden die folgenden Parameter bestimmt:

- Kortikale Dicke (Ct.Th)
- Geschlossene Porosität (*closed porosity*)
- Offene Porosität (*open porosity*)
- Totale Porosität (*total porosity*)

zusätzlich in der subartikulären Spongiosa:

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

Außerdem wurden folgende strukturellen Parameter manuell ausgemessen und miteinander verglichen. Eine schematische Aufarbeitung zeigt Abbildung 6:

- Knorpeldicke des Reparaturgewebes
- Perifokale Knorpeldicke
- Dicke der subchondralen Knochenplatte im Reparaturgewebe
- Dicke der subchondralen Knochenplatte perifokal
- Weite des Defektes auf Höhe des Knorpels
- Weite des Defektes auf Höhe der subchondralen Knochenplatte
- Vertiefung des Knorpelniveaus
- Vertiefung der subchondralen Knochenplatte
- Erhebung des Knorpelniveaus
- Erhebung der subchondralen Knochenplatte

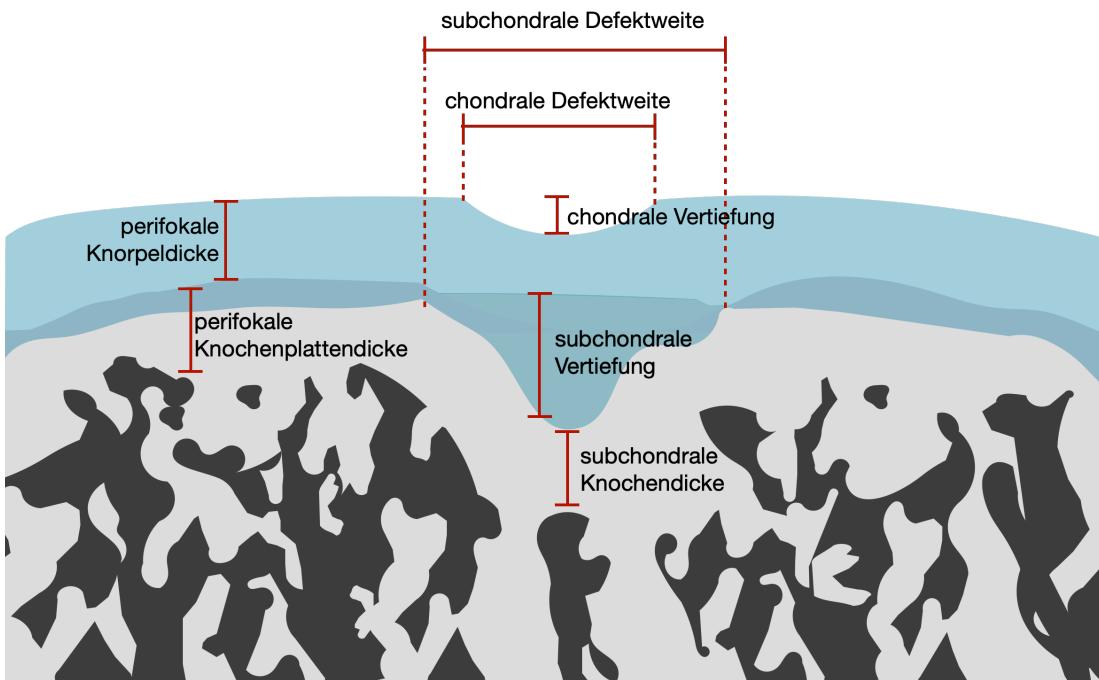


Abbildung 6: Schematische Darstellung der manuellen Mikro-computertomographischen Analyse. Es fehlt die Darstellung der Anhebung der subchondralen Knochenplatte im Defektbereich und die Elevation des Reparaturgewebes (überschießendes Reparaturgewebe) im Defektbereich. Diese Parameter wurden analog zu der hier dargestellten Verfahrensweise der Vertiefung erhoben und bewertet.

Für die Analyse herangezogen wurden pro Defekt 5 computertomographische Schnittbilder in definiertem Abstand und pro Schnittbild wurden jeweils 3 Messungen für jeden erhobenen Parameter angefertigt. Dabei wurde je eine Messung in der medialen, zentralen und lateralen bzw. der oberen, mittleren und unteren Zone des Defektes durchgeführt.

5.7. Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie

5.7.1. Darstellung der Kondylen

Die magnetresonanztomographische Darstellung der medialen Femurkondylen wurde mit einem 9,4 Tesla Ultrahochfeld-Magnetresonanztomografen (MRT; Biospec Avance III 9,4/20, Bruker Biospin, Ettlingen Deutschland) durchgeführt. In diesem wurden die tiefgefrorenen Kondylen mit dem distalen Ende vorangehend in der MRT-Röhre (*circular polarized volume coil*) positioniert. Einstellung und Optimierung der Bildakquisition sind an empirische Vorversuche von Goebel *et al.* angelehnt (GOEBEL *et al.*, 2012; GOEBEL *et al.*, 2014). Eine 3D-gespoilte Gradientenecho-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 10 ms bei einer Echozeit (TE) von 3 ms realisierte die Bildgebung. So resultierte bei einem Pulswinkel von 10° eine Voxelgröße von 120 x 120 x 120 µm. Bildrekonstruktion und Verarbeitung erfolgte mit Paravision 5.1 JIVE Tool (Bruker Biospin). Erstellt wurden 5 Untersequenzen in 3 Ebenen. Eine exemplarische Darstellung in Sagittalebene zeigt Abbildung 7. Die Darstellungen der Kondylen wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. rer. med. Andreas Müller aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie verwirklicht.

Methoden

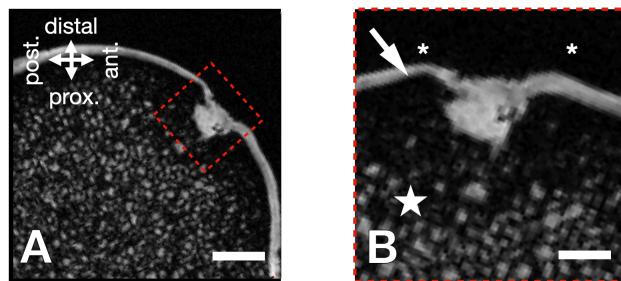


Abbildung 7: Exemplarische magnetresonanztomographische Darstellung. Gezeigt wird die sagittale Schnittführung mit Querschnitt eines osteochondralen Defektes in Vergrößerung (A) und Übersichtsdarstellung der Kondyle (B). Der Stern (*) markiert die Defektgrenzen, der Pfeil zeigt den Übergang von Knorpel- zu Knochengewebe. Der große Stern zeigt die subartikuläre Spongiosa. Auf Basis der Bildgebung wurde das MOCART-Bewertungssystem angewendet. Maßstabsbalken: A 4,0 mm; B 2,5 mm. MOCART: magnetic resonance observation of cartilage repair tissue.

5.7.2. Bewertung der Defektreparatur

Die Betrachtung der Ultrahochfeld-MRT-Datensätze erfolgte mit dem RadiANT DICOM Viewer (Medixant, Poznan, Polen). Drei verblindete Beobachter bewerteten die Defekte jeweils in sagittaler und koronarer Schnittbildgebung. Für die Beurteilung des osteochondralen Status der Defekte kam das 3D-MOCART (*magnetic resonance observation of cartilage repair tissue*)-Bewertungssystem (GOEBEL *et al.*, 2014; MARLOVITS *et al.*, 2006) zum Einsatz. Es ist ursprünglich für autologe Chondrozytentransplantationen *in vivo* entwickelt worden und wird hier in Tabelle 10 aufgeführt. Durch die außerordentlich hohe Auflösung der einzelnen knöchernen und knorpeligen Gelenksstrukturen konnten die *ex vivo* Proben genauestens bewertet werden. Dafür wurde das Bewertungssystem hinsichtlich der Parameter „Adhäsion“, „Erguss“ und „Knochenschnittstelle“ modifiziert. Diese Parameter konnten nicht weiter berücksichtigt werden, da sie entweder nicht bestimmbar waren (durch *ex vivo* Bedingungen) oder in allen Proben identische Punktzahlen erzielten.

Tabelle 10: Magnetresonanztomographische Kriterien des MOCART 3D-Bewertungssystem.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	0%	0
	0-25%	3
	25-50%	5
	50-75%	10
	75-100%	15
	100%	20
	100-125%	15
	125-150%	7
	150-200%	3
	>200%	0

2. Knorpelgrenzschicht	Nicht zu erkennen	10
	Demarkierung der Grenzschicht	8
	Defekt < 50% sichtbar	3
	Defekt > 50% sichtbar	0
3. Oberflächenbeschaffenheit	Intakt	10
	Schädigung von < 50% der Tiefe	5
	Schädigung von > 50% der Tiefe	0
4. Defektstruktur	Homogen	10
	Inhomogen	5
	Spaltbildung	2
	Fehlen des Reparaturgewebes	0
5. Signalintensität in Abgrenzung zum nativen Gewebe	Normal	10
	Ähnlich	5
	Anormal	0
6. Knorpelige Osteophyten	Nicht vorhanden	5
	< 50% der Knorpeldicke	3
	> 50% der Knorpeldicke	0
7. Integrität der subchondralen Knochenplatte	> 75%	10
	50-75%	8
	25-50%	5
	0-25%	3
	0%	0
8. Subartikuläre Spongiosa	Intakt	10
	Granulationsgewebe	8
	Sklerose	8
	Zyste	5
	Granulationsgewebe und Sklerose	5
	Granulationsgewebe und Zyste	2
	Sklerose und Zyste	2
	Granulationsgewebe, Sklerose und Zyste	0

MOCART: magnetic resonance observation of cartilage repair tissue.

5.8. Histologische Gewebsanalyse

5.8.1. Histologische Aufarbeitung

Lagerung

Nach Entnahme der Knie wurden diese fotodokumentiert und bei -80 °C tiefgekühlt gelagert. Im gefrorenen Zustand wurden die computertomographische und magnetresonanztomographische Bildakquisition durchgeführt. Anschließend wurden die Kondylen für 24 h in 4%igem Formalin und dann in einer Lösung aus 70%igem Ethanol und 100%iger Essigsäure (Mischungsverhältnis 2,5 ml/l) konserviert. Um die Proben der weiteren feingeweblichen Aufarbeitung zuzuführen wurden diese, angepasst auf die Defektareale, zugeschnitten und dann suffizient entkalkt. Dies gelang durch Lagerung in einer Entkalker-Lösung aus Natriumcitrat, 90%iger Methansäure und destilliertem Wasser. In dieser Lösung verblieben die Proben für 3 Wochen mit intermittierendem Wechsel der Entkakerlösung.

Entwässern und Einbetten der histologischen Präparate

Vor dem Einbetten der Proben in Paraffin wurden diese zentral im Defektareal halbiert. Eine sukzessiv aufsteigende Ethanolreihe mit jeweils 60 min in 70%igem, 80%igem und je zweimal 60 min in 95%igem und 99%igem Ethanol entwässerte die Proben ausreichend, bevor sie erst zweimal 30 min in Xylol und anschließend 60 min in einem Xylol-Paraffin-Gemisch (1:1) in einem Wärmeschränk bei 60 °C lagerten. Anschließend wurden sie dann über 10 h in reinem verflüssigtem Paraffin gelagert, welches zweifach gewechselt wurde. Dies gewährleistete eine vollständige Infiltration des Gewebes mit Paraffin. Die Proben wurden dann mit Paraffin in Metallkassetten eingebettet. Diese härteten letztlich im Gefrierschrank zu schneidbaren Paraffinwachsblöcken aus.

Schneiden

Nach Lagerung auf einer Kühlplatte wurden pro Probe mit einem Mikrotom jeweils 40 Schnitte mit einer Schnittdicke von 3-5 µm angefertigt. Diese wurden in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf Glasobjektträger übertragen, die mit 2,5%igem Albumin (Sigma) beschichtet waren. Es wurden pro Defekt zusätzlich 10 SuperFrost® Plus Objektträger für Immunfärbungen verwendet. Die Lagerung im Wärmeschränk bei 60 °C ermöglichte die Aushärtung der Proben über Nacht.

Färbeverfahren

Safranin-O/Echtgrün-Färbung

Zur Färbevorbereitung wurden die Objektträger für 10 min in Xylol deparaffiniert und jeweils 5 min in einer absteigenden Ethanolreihe mit 100%, 95% und 80%igem Ethanol in ein wässriges Milieu überführt. Nach 10-minütiger Gegenfärbung durch Weigerts-Hämatoxylinlösung und dreifachem Reinigen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 5 min in einer 0,02%igen Echtgrün-Lösung gefärbt. Durch dreimaliges Eintauchen der Schnitte in 1%iger Essigsäure wurden die Oberflächen der Proben angeraut, um anschließend für 10 min in Safranin-O-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt zu werden. Abschließend erfolgte nach Spülen mit Leitungswasser eine Dehydrierung und Konservierung mittels aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 1 min in 80%, 95% und 100%igem Ethanol und Lagerung in Xylol für 10 min. Letztlich wurden die Schnitte mit dem Roti-Histokitt eingedeckt und härteten über Nacht aus. Das Ergebnis der Safranin-Orange-Färbung (Safranin-O) ist eine Grünfärbung azidophiler Strukturen. Basophile Strukturen stellen sich dunkelrot-violett dar. Die Intensität der roten Safranin-Färbung im Knorpel korreliert direkt mit dem Proteoglykangehalt des Gewebes. Entsprechend differenziert kann dieser begutachtet werden.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der oben beschriebenen Hydrierung und Deparaffinierung erfolgte eine Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Lösung nach Harris für 10 min und eine anschließende Aufreinigung durch kurzes Eintauchen in Leitungswasser. Nach ca. 10-sekündiger Aufbereitung in 1%iger Salzsäure wurde der pH-Wert in einem 60 °C warmen Leitungswasserbad wieder erhöht und somit ein Farbumschlag erzeugt. Darauf folgte eine weitere 2,5-minütige Hämatoxylinfärbung nach Harris und eine erneute Reinigung der Proben mit Leitungswasser. Kontakt mit der Eosinlösung für 30 Sekunden und ein abermaliger Waschgang vollendeten den Färbeprozess, sodass die Schnitte dehydriert und letztlich eingedeckt wurden.

Methoden

Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Auch die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung wurde nach Hydrierung und Deparaffinierung der Proben durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Färbung der Schnitte durch Hämatoxylin-Lösung nach Weigert für 10 min, welche dann durch destilliertes Wasser gewaschen wurden. Anschließend färbte Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin nach 10 min das Zellplasma rot an. Danach raute 0,5%ige Essigsäure nach 1 min die Oberfläche der Schnitte an und entfärbte die Proben gleichzeitig. Darauf folgte für 5 min ein Färbeschritt in Orange-G-Lösung sowie nach abermaliger Essigsäurebehandlung eine 8-minütige Färbung in Lichtgrün. Schließlich wurden die Schnitte wieder durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und zuletzt eingedeckt.

5.8.2. Histologische Bewertung

Bewertung der osteochondralen Defektreparatur

Eine differenzierte Beurteilung der Qualität des osteochondralen Reparaturgewebes wurde durch unterschiedliche Bewertungssysteme auf Basis der verschiedenen histologischen Färberverfahren ermöglicht (Übersicht in Abbildung 8). Zur Anwendung kam in dieser Arbeit das semiquantitative Bewertungssystem nach Sellers (Tabelle 11) (SELLERS *et al.*, 1997). Die Bewertung des Reparaturgewebes wurde durch einen verblindeten Betrachter an jeweils 10 Safranin-O-gefärbten Schnitten für jeden Defekt vorgenommen. Das Bewertungssystem nach Sellers *et al.* (SELLERS *et al.*, 1997) wurde im Parameter „*Neubildung des subchondralen Knochens unterhalb des Knorpelreparaturgewebes*“ modifiziert, da in Defekten auch überschießende subchondrale Reaktionen beobachtet wurden. Bei Elevation der subchondralen Knochenplatte in das Knorpelniveau des Defektes wurde die Bewertung invers angepasst. Wenn 0-10% des Knorpelareals durch Knochengewebe eingenommen wurden resultieren 0 Punkte. Folglich gilt für 11-25% knöchernen Anteil = 1 Punkt, für 26-50% = 2 Punkte, für 51-75% = 3 Punkte, für 76-100% = 4 Punkte. Die Gesamtpunktzahl reicht von 0 Punkten (vollständige Regeneration) bis zu maximal 31 Punkten (fehlgeschlagene Defektheilung, Defekt ohne Reparaturgewebe).

Tabelle 11: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Sellers et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel	91 – 110 %	0
	76 – 90 % oder > 110 %	1
	51 – 75 %	2
	26 – 50 %	3
	< 25 %	4
2. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	Normale Kontinuität	0
	Verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbarkeit mit Safranin O	Normal	0
	Leicht vermindert	1
	Mittelstark vermindert	2
	Stark vermindert	3
	Keine Anfärbarkeit	4
4. Zellmorphologie	4.1 Normale Zellkonfiguration	0
	4.2 Überwiegend runde Zellen mit:	
	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	4.3 Ca. 50 % runde Zellen mit:	
	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
	4.4 Vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	Normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4

Methoden

6. Oberflächenarchitektur (Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche)	Normal	0
	Leichte Fibrillationen	1
	Mittelstarke Fibrillationen	2
	Starke Fibrillationen	3
7. Neubildung des subchondralen Knochens unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	90 – 100 %	0
	75 – 89 % oder > 100 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4
8. <i>Tidemark</i>	Vollständig	0
	75 – 89 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4

Darüber hinaus wurde zusätzlich das inverse Bewertungssystem nach Fortier *et al.* zur Evaluation der histologischen Schnitte verwendet (Tabelle 12). Die maximale Punktzahl von 20 Punkten entspricht einem Defekt ohne jeglichem Reparaturgewebe und 0 Punkte zeigen hingegen die vollständige Reparatur des Defekts mit hyalinem Knorpel an (FORTIER *et al.*, 2002).

Tabelle 12: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Fortier et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	91 – 110 %	0
	76 – 90 % oder 111 – 125 %	1
	51 – 75 %	2
	26 – 50 %	3
	< 25 %	4
2. Integration des Reparaturgewebes	Normale Kontinuität	0
	Spalte auf einer Seite	1
	Spalte auf beiden Seiten	2
3. Oberflächenarchitektur	Normal, glatt	0
	Leichte Fibrillationen	1
	Mittelstarke Fibrillationen	2
	Starke Fibrillationen	3
4. Zellmorphologie und Organisation	100 % normal	0
	> 75 % normal	1
	25 - 75 % normal	2
	< 25 % normal	3
5. Zellularität im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Normal	0
	< 10 % vermindert oder erhöht	1
	> 10 % vermindert oder erhöht	2
6. <i>Tidemark</i>	Vollständig rekonstruiert (> 90 %)	0
	75 – 90 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4
7. Matrixanfärbarkeit mit Safranin-O im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Normal	0
	< 25 % vermindert	1
	> 25 % vermindert	2

Zusätzlich wurde das Wakitani-Bewertungssystem angewendet (Tabelle 13). Dieses ist eine häufig verwendete Modifikation der Pineda-Skala und wurde initial zur Bewertung von vollschichtigen Knorpeldefekten bei Kaninchen entworfen (PINEDA et al., 1992; RUTGERS et al., 2010; WAKITANI et al., 1994).

Methoden

Tabelle 13: Histologische Kriterien des Bewertungssystems nach Wakitani et al.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Zellmorphologie	Hyaliner Knorpel	0
	Vorwiegend hyaliner Knorpel	1
	Vorwiegend Faserknorpel	2
	Vorwiegend kein Knorpelgewebe	3
	Kein Reparaturgewebe	4
2. Matrixanfärbarkeit	Normal	0
	Leicht reduziert	1
	Deutlich reduziert	2
	Keine Anfärbung	3
3. Oberflächenbeschaffenheit (glatte Anteile in Relation zum Gesamtdefekt)	Glatt (>3/4)	0
	Moderat (1/2 bis 3/4)	1
	Ungleichmäßig (1/4 bis 1/2)	2
	Sehr ungleichmäßig (< 1/4)	3
4. Knorpeldicke (verglichen zum angrenzenden Knorpel)	> 2/3	0
	1/3 bis 2/3	1
	< 1/3	2
5. Integration	Beide Seiten integriert	0
	Nur eine Seite integriert	1
	Keine Seite integriert	2

Bewertung der perifokalen degenerativen Knorpelveränderungen

Eine genaue Identifikation früher perifokaler degenerativer Gewebsveränderungen erfolgte u.a. histologisch. Untersucht wurden die degenerativen Prozesse der direkt an das Reparaturgewebe angrenzenden Region mittels des komplexen, inversen OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*)-Bewertungssystems nach Little et al. (LITTLE et al., 2010), welches in Tabelle 14 aufgeführt ist. Als perifokal definiert ist dabei das Gewebe, welches direkt an die Integrationszone des Defektes angrenzt und bis zu 2 mm in die Peripherie reicht. Eine Bewertung wurde jeweils neben dem medialen und lateralen Defektrand durch einen verblindeten Beobachter an je 3 Safranin-O-gefärbten Schnitten pro Defekt vorgenommen. Eine hohe Punktzahl im Bewertungssystem zeigt dabei ein hohes Ausmaß der perifokalen destruktiven Prozesse an.

Tabelle 14: Histopathologische Kriterien des OARSI-Bewertungssystems für degenerative Knorpelveränderungen.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Knorpelstruktur	Normal	0
	Leichte Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Mäßige Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Deutliche Oberflächenunregelmäßigkeiten	3
	Fissuren bis zur Übergangszone	4
	Fissuren bis zur Radiärzone	5
	Fissuren bis zum kalzifizierten Knorpel	6
	Erosionen bis zur mittleren Zone	7
	Erosionen bis zur tiefen Zone	8
	Erosionen bis zum kalzifizierten Knorpel	9
	Erosionen bis auf die subchondrale Knochenplatte	10
2. Chondrozytendichte	Normal	0
	Leicht reduziert oder erhöht	1
	Mäßig reduziert	2
	Deutlich reduziert	3
	Azellulär	4
3. Zellklone	Normal	0
	Einige Duplets	1
	Viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	Zellnest oder azellulär	4
4. Safranin-O-Anfärbung	Normal	0
	Reduziert bis zur mittleren Zone	1
	Reduziert bis zur tiefen Zone	2
	Reduziert bis zum kalzifizierten Knorpel	3
	Keine Anfärbung	4
5. <i>Tidemark</i>	Intakte subchondrale Knochenplatte und einzelne <i>Tidemark</i>	0
	Intakte subchondrale Knochenplatte und verdoppelte <i>Tidemark</i>	1
	Gefäßpenetration bis zum kalzifizierten Knorpel	2
	Gefäßpenetration der <i>Tidemark</i>	3

OARSI: Osteoarthritis Research Society International.

5.8.3. Immundetektion extra- und intrazellulärer Bestandteile des knorpeligen Reparaturgewebes

Die histologischen Präparate wurden auf SuperFrost® Plus Objektträgern fixiert und dann nach standardisierter Aufbereitung, wie unter 5.8.1 beschrieben, mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) versetzt. Nach zwei 5-minütigen Waschvorgängen in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) wurde 0,1%ige Trypsin-Lösung auf die Objektträger aufgetragen. Nach 10 min Inkubation in einem Wärmeschrank bei 37 °C wurden anschließend die Präparate zweimal 5-minütig mit PBS-Lösungen gewaschen. Dann wurde mit Blockierungspuffer (200 ml PBS und 6 ml Bovines Serum Albumin) die Applikation der Antikörper vorbereitet und anschließend der jeweils entsprechend verdünnte primäre monoklonale Antikörper direkt auf die Präparate aufgetragen. Der enthaltene spezifische Antikörper unterschied sich jeweils entsprechend der immunhistochemischen Färbung.

Die Inkubationszeit des Primärantikörpers betrug 8 h in einer Nasskammer bei 8 °C. Der Sekundärantikörper wurde jeweils nach zwei 5-minütigen reinigenden Anwendungen von PBS aufgetragen. Dieser richtet sich gegen den Primärantikörper und ist biotinyliert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Spülung in PBS wurde das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat (ABC-Reagenz) auf die Präparate aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und nachfolgend mit PBS gewaschen. Letztlich rief die Verwendung einer 3'3-Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung) als Substrat eine gelb-bräunliche Farbreaktion im Bereich der Antigenpräsenz hervor. Die DAB-Lösung wirkte für 7 min auf die Schnitte ein und wurde dann mit PBS und Leitungswasser abgewaschen. Abschließend sind die Präparate wie oben beschrieben wieder dehydriert und eingedeckt worden.

Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie

Für die Anfärbung des Typ-I-Kollagens kam ein 1:90 verdünnter muriner Antikörper von Abcam (Cambridge, Großbritannien) zur Anwendung. Als Sekundärantikörper fungierte ein biotinmarkierter Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG)-Antikörper (Ziege; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer 1:200 Verdünnung in PBS.

Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Die Typ-II-Kollagen-Immunmarkierung wurde durch einen murinen Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörper von Acris Antibodies (Herford, Deutschland) durchgeführt. Der Sekundärantikörper war ein biotinylierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Ziege; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer 1:200 Verdünnung in PBS.

Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie

Die Darstellung von Typ-X-Kollagen gelang durch den 1:200 verdünnten Typ-X-Kollagen-Antikörper (Maus; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Als Sekundärantikörper fungierte ebenfalls ein biotinylierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Ziege; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer 1:200 Verdünnung in PBS. Kollagen-Typ-X ist ein Marker für die Spätphase der Chondrozytenhypertrophie (MUELLER *et al.*, 2010; MWALE *et al.*, 2006) und repräsentiert so den Differenzierungsgrad der vorliegenden Zellen (PACIFICI *et al.*, 1990).

TGF- β 1-Immunhistochemie

Der direkte TGF- β 1-Nachweis gelang mittels eines 1:50 verdünnten Anti-TGF- β 1-Antikörpers (Kaninchen) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) und einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten Sekundärantikörper (Ziege; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

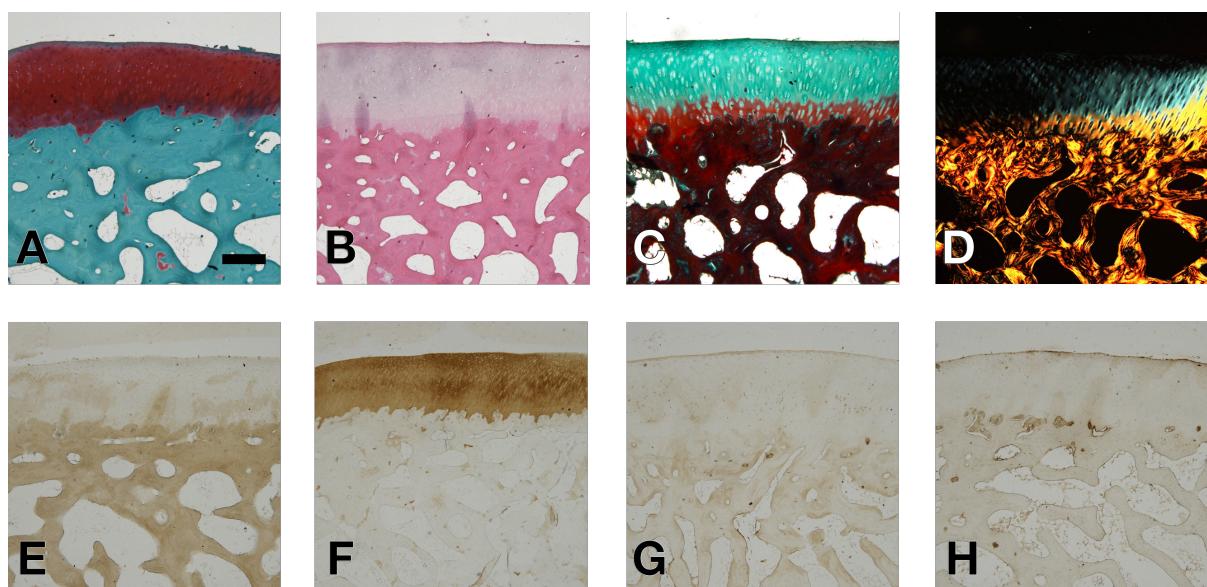


Abbildung 8: Übersichtsdarstellung der angefertigten Färbungen einer nativen osteochondralen Einheit. Safranin-O-Lichtgrün Färbung (A), Hämatoxylin-Eosin-Färbung (B), Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (C), polarisierte Aufnahme einer Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (D), Typ-I-Kollagen-Immunmarkierung (E), Typ-II-Kollagen-Immunmarkierung (F), Typ-X-Kollagen-Immunmarkierung (G), TGF- β 1-Immunmarkierung (H), Maßstabsbalken: 750 µm. TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Methoden

5.8.4. Quantitative Analyse extra- und intrazellulärer Bestandteile des knorpeligen Reparaturgewebes

Ausgewertet wurden die immunhistochemischen Präparate mithilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems (Tabelle 15). Die Färbeintensität repräsentiert hierbei direkt die Immunmarkierung und somit den Substanzgehalt des untersuchten Antigens im betrachteten Gewebeabschnitt. Für Typ-I-Kollagen wurde die Färbeintensität des knorpeligen Reparaturgewebes mit der nativen subchondralen Knochenplatte als Positivkontrolle verglichen. Als Positivkontrolle für Typ-II-Kollagen wurde nativer Knorpel derselben Probe herangezogen. Jeweils ein repräsentativer Defekt (für Typ-II-Kollagen zwei Schnitte) wurde pro Defekt ausgewertet (ASEN, 2018; ORTH, 2009).

Tabelle 15: Semiquantitatives Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreakтивität des Reparaturgewebes.

Intensität der Immunfärbung entsprechend der Immunreakтивität	Punkte
Keine stattgefundene Immunreaktion	0
Evident reduzierte Immunreaktion	1
Moderat reduzierte Immunreaktion	2
Äquivalente Immunreaktion (gleich der Positivkontrolle)	3
Stärkere Immunreaktion	4

Da Typ-X-Kollagen und TGF- β 1 vorwiegend intrazellulär und perizellulär nachweisbar sind, wurde im knorpeligen Anteil des Reparaturgewebes zusätzlich die individuelle Anfärbbarkeit der Zellen ausgewertet. In je 3 gleichgroßen Arealen (0,2 mm x 0,2 mm) wurden pro Defekt die positiv immunmarkierten Zellen gezählt sowie die Gesamtzellularität in diesen Arealen bestimmt. Anschließend ist ein Quotient aus immunpositiven Zellen und der Gesamtzellzahl für jedes Areal gebildet worden.

$$\text{Immunreakтивität} = \frac{\text{Immunpositive Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Dieser Quotient spiegelt die Immunreakтивität im Defektgewebe wider. Betrachtet wurden somit insgesamt 3 Zonen in einem Anschnitt des Reparaturgewebes.

5.8.5. Bestimmung der Zellularität im knorpeligen Reparaturgewebe

Für eine objektiv vergleichbare Bestimmung der Zellzahlen wurde jeder Defekt in 3 Regionen (medial, zentral, lateral) mit jeweils 3 Subregionen (Superfizialzone, Intermediärzone, Inferiorzone) unterteilt. Die resultierenden 9 Zonen sind durch feste Abmessungen mit einer Höhe von 100 µm und einer Breite von 400 µm (Fläche = 0,04 mm²) definiert worden. Die Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Zonen erfolgte durch computerbasierte Betrachtung eines mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittes in 40-facher Vergrößerung mit dem Programm *Olympus cell sens*, wie dargestellt in Abbildung 9. Angegeben ist die Zellularität als Zellzahl pro Fläche (Zellen/mm²).

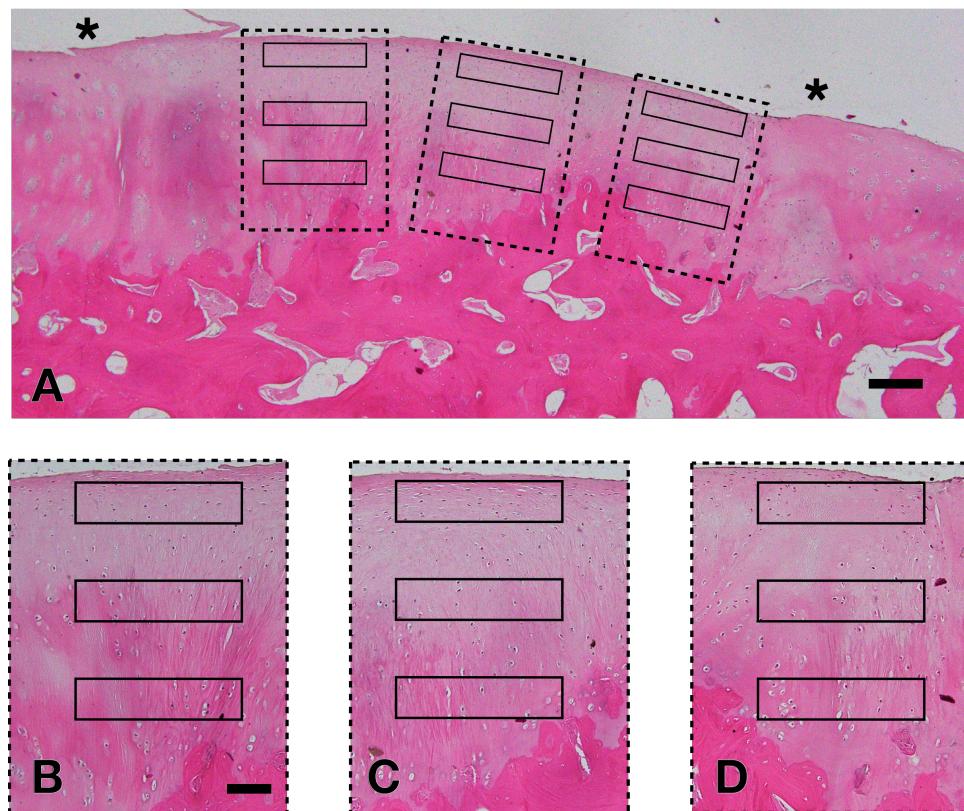


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zellularitätsbestimmung. Die ausgezählten Felder hatten eine Höhe von 100 µm und eine Breite von 400 µm. Der Übergang vom Defektgewebe zu der Integrationszone wurde beidseits mit * markiert. Gezeigt wird eine Übersichtsaufnahme (A) mit Darstellung der 9 Areale zur Zellularitätsbestimmung sowie das mediale (B), zentrale (C) und laterale (D) Defektareal mit jeweils superfizialer, intermediärer und inferiorer Zone. Maßstabsbalken: A 400 µm, für B, C, D 200 µm.

5.9. Statistische Analyse

Die statistischen Vergleiche und Rechenoperationen wurden mithilfe von *Stata software*, Version 15 (StataCorp LLC, College Station, Texas) und *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, WA) durchgeführt. In Bezug gesetzt und direkt verglichen wurde jeweils die rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe mit der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe. Die Stichproben sind als unverbundene Stichproben zu betrachten. Zur Anwendung kamen multiple mathematische Hypothesentests. Unter anderem erfolgte die statistische Auswertung unter Verwendung eines *Mixed-Model*-Ansatzes mit generalisierten Schätzgleichungen (*Generalized Estimating Equations*, GEEs), um mehrere Messungen (mehrere Objektträger / Anschnitte) pro Defekt zu berücksichtigen. Auch bei Vergleichen zwischen lateralen und medialen Anteilen innerhalb der Behandlungsgruppen kam der GEE zur Anwendung. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde auf $< 0,05$ (= 5%) festgelegt. P-Werte $< 0,05$ werden somit als statistisch signifikant betrachtet und hervorgehoben.

Alle dargestellten Daten werden mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die entsprechenden Kastengrafiken zeigen immer die 75. und 25. Perzentile (oberer und unterer Rand des Kastens), das Minimum und Maximum (Antennen), den Mittelwert (+), den Median (mittlere Linie) und die einzelnen Datenpunkte.

6. Ergebnisse

Die osteochondrale Defektreparatur ist ein komplexer, multifaktorieller Prozess. Morphologisch stehen die Neubildung des subchondralen Knochens, dessen Integrität und die Qualität des Reparaturgewebes auf dem Knorpelniveau im Vordergrund. Für die Quantifizierung der Qualität des Reparaturgewebes wurden in der vorliegenden Studie verschiedene Betrachtungsmodi und Bewertungssysteme herangezogen. Das perifokale Gewebe wurde ebenfalls mit den oben genannten Untersuchungsmethoden in die Analyse miteinbezogen. Statistisch verglichen wurde jeweils die rAAV-*lacZ*- (n = 8) direkt mit der rAAV-TGF- β 1-Therapiegruppe (n = 8).

6.1. Makroskopische Defektauswertung

Die makroskopische Bewertung der Defektheilung erfolgte, wie unter 5.5 beschrieben und in Abbildung 10 repräsentativ dargestellt, durch drei verblindete Beobachter anhand zweier verschiedener semiquantitativer Bewertungssysteme ein Jahr postoperativ.

Die Integration der Defekte in den angrenzenden Knorpel war in beiden Gruppen nur durch geringe Unterbrechungen geprägt. Die Defektoberfläche imponierte vorwiegend glatt bzw. wies lediglich feine Risse auf. Dabei erschien das Reparaturgewebe in beiden Gruppen primär weißlich bis hyalin koloriert. Auch die Defektfüllung erreichte makroskopisch durchschnittlich über 50% der initialen Defekttiefe (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Makroskopische Defektauswertung (Bewertungssystem aus Oswestry).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Defektfüllung	1,08 \pm 0,39	1,25 \pm 0,66	0,417
Integration in angrenzenden Knorpel	0,79 \pm 0,5	0,88 \pm 0,4	0,826
Oberflächenbeschaffenheit	1,46 \pm 0,35	1,08 \pm 0,71	0,286
Farbe des Reparaturgewebes	1,33 \pm 0,31	1,29 \pm 0,42	0,827
Total	4,67 \pm 0,76	4,5 \pm 1,69	1,000

Bei der Defektbeurteilung repräsentieren 8 Punkte eine vollständige Knorpelreparatur und 0 Punkte eine fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD, *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Es ergibt sich nach Evaluation mittels des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($P \geq 0,286$).

Ergebnisse

Tabelle 17: Makroskopische Defektanalyse (inverses Bewertungssystem aus Homburg).

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Farbe	0,88 \pm 0,35	0,96 \pm 0,52	0,821
Blutgefäße	0,50 \pm 0,47	0,58 \pm 0,61	0,913
Oberflächenbeschaffenheit	0,96 \pm 0,21	1,17 \pm 0,53	0,348
Defektfüllung	1,00 \pm 0,18	0,75 \pm 0,3	0,079
Degeneration des angrenzenden Knorpels	1,46 \pm 0,69	1,00 \pm 0,64	0,217
Total	4,79 \pm 1,25	4,46 \pm 2,14	0,337

Bei der Defektbeurteilung repräsentieren 0 Punkte ein optimales Reparaturgewebe, 20 Punkte stellen eine fehlgeschlagene Defektreparatur dar; MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Auch das inverse makroskopische Bewertungssystem aus Homburg identifizierte zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede ($P \geq 0,079$, Tabelle 17).

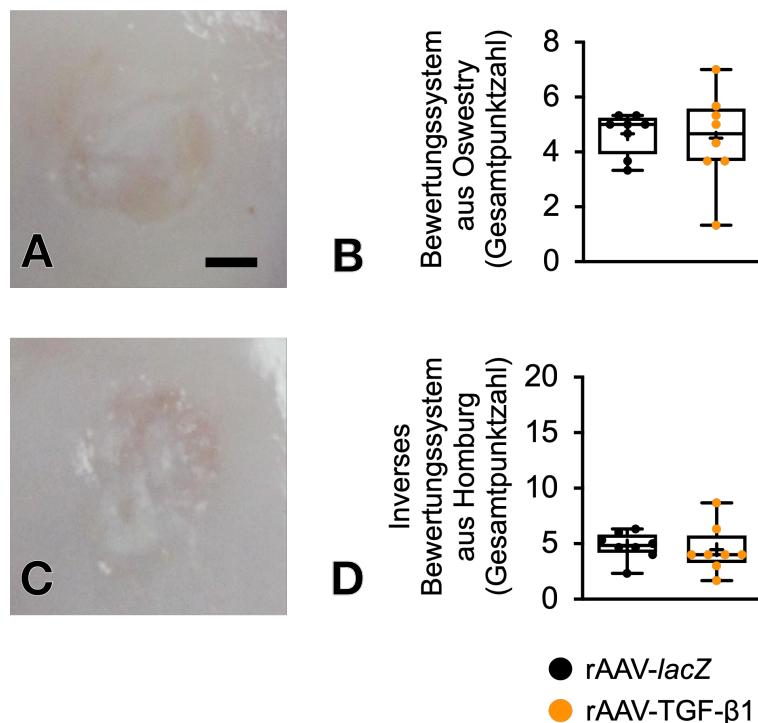


Abbildung 10: Semiquantitative makroskopische Defektanalysen. Gezeigt ist eine Nahaufnahme der Fotodokumentation eines rAAV-lacZ- (A) sowie eines rAAV-TGF- β 1-behandelten Defekts (C); Auch ist die statistische Aufarbeitung zusammengefasst dargestellt in Form von Totalpunktzahlen der Behandlungsgruppen im makroskopischen Bewertungssystem aus Oswestry (B) und dem inversen makroskopischen Bewertungssystem aus Homburg (D); Maßstabsbalken: A, B 1,5 mm. lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.2. Mikro-computertomographische Defektauswertung

Die nähere mikrostrukturelle Analyse der knöchernen und knorpeligen Anteile des Defektgewebes erfolgte wie unter 5.6 beschrieben und wird in Abbildung 5 detailliert dargestellt. Einen Auszug aus der Defektauswertung zeigt Abbildung 11.

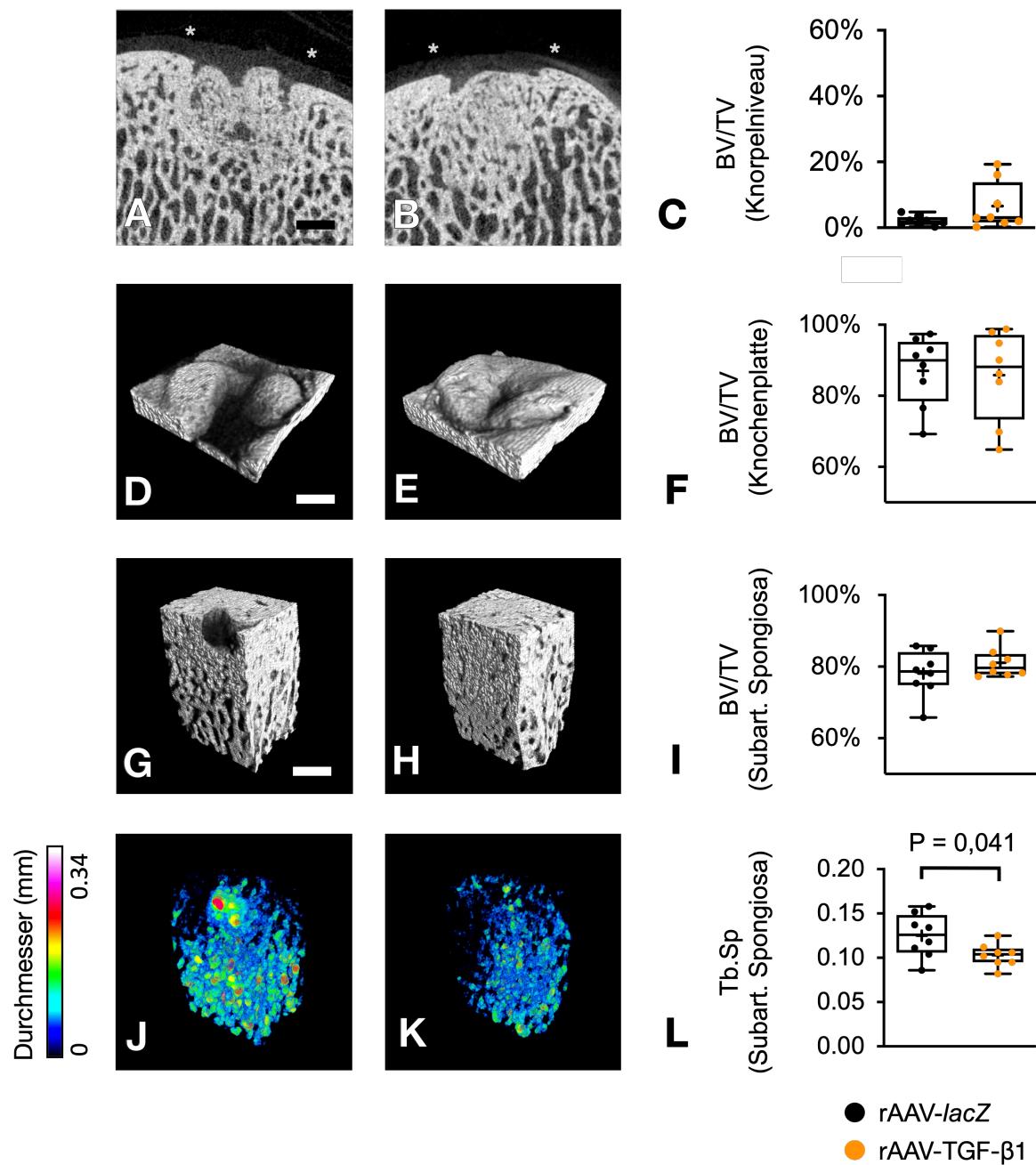


Abbildung 11: Computertomographische Datensätze in 2D- und 3D-Darstellung. Dargestellt ist jeweils die osteochondrale Einheit des Defektgewebes. Die erste Zeile (A-C) zeigt die 2D-Rekonstruktion mit Markierung der Defektgrenzen (*); die zweite Reihe (D-F) zeigt hingegen die 3D-Rekonstruktion der VOIs auf dem Niveau der subchondralen Knochenplatte; die dritte Reihe (G-I) zeigt die 3D-Rekonstruktion der VOIs auf dem Niveau der subartikulären Spongiosa; die vierte Reihe (J-L) ist eine farbbasierte 3D-Rekonstruktion der Trabekelabstände (Tb.Sp) in der subartikulären Spongiosa. Die erste Spalte (A, D, G, J) zeigt rAAV-lacZ-behandelte Defekte; die zweite Spalte (B, E, H, K) rAAV-TGF- β 1-behandelte Defekte, die dritte Spalte (C, F, M, R) die korrespondierende Statistik. Maßstabsbalken: A, B, G, J, K 1 mm; D, E 500 μ m. BV/TV: Knochenvolumenanteil; lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; Tb.Sp: trabekuläre Separation; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

6.2.1. Mikro-computertomographische Evaluation des Knorpelniveaus

Tabelle 18 zeigt, dass computertomographisch keine signifikanten Unterschiede im Reparaturgewebe auf dem Knorpelniveau zwischen den beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen wurden.

Tabelle 18: Mikro-computertomographische Analyse des Defektknorpels.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	448,04 \pm 126,36	447,44 \pm 117,62	0,992
BV/TV, %	2,02 \pm 1,52	6,55 \pm 7,2	0,104
BS/BV, mm ⁻¹	89,66 \pm 51,83	82,44 \pm 45,19	0,771
BS/TV, mm ⁻¹	1,26 \pm 0,6	3,75 \pm 3,37	0,058
Ct.Th, mm	0,08 \pm 0,05	0,08 \pm 0,04	0,835
Po(cl), %	0 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,806
Po(op), %	97,98 \pm 1,52	93,44 \pm 7,2	0,104
Po(to), %	97,98 \pm 1,52	93,45 \pm 7,2	0,104

Daten mit MW \pm SD. BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; Ct.Th: Kortikale Dicke; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; Po(cl): geschlossene Porosität; Po(op): offene Porosität; Po(to): totale Porosität; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Auch das Knochenvolumen in Bezug zum Totalvolumen (BV/TV), welches eine überschießende knöcherne Konsolidierung im Knorpelniveau indizieren kann, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($P \geq 0,104$). Die Knochenmineraldichte (BMD) in mg/cm³ ist in Abbildung 12 dargestellt.

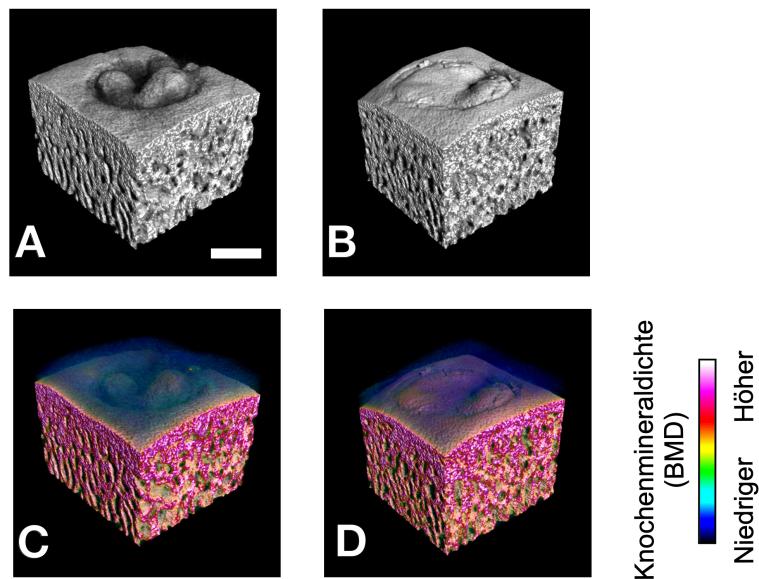


Abbildung 12: Mikro-computertomographische Defektdarstellung und kolorierte Knochenmineraldichteverteilung. Die dreidimensionale Defektdarstellung (A, B) erzeugte eine verbesserte Orientierung während der Auswertung. Weiter ist eine kolorierte Darstellung der Knochenmineraldichte aufgeführt (C, D). In der Abbildung dargestellt ist jeweils ein Defekt aus der rAAV-lacZ-Behandlungsgruppe (A, C) und ein Defekt aus der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe (B, D). Gezeigt wird die Verteilung der Knochenmineraldichte im Reparaturgewebe. Maßstabsbalken: A, B, C, D 1 mm. BMD: Knochenmineraldichte; lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Eine computertomographische Auswertung der Knorpeldicke, beschrieben als Parameter Ct.Th, wies ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ($P = 0,835$). Die korrespondierende kolorierte Aufarbeitung ist in Abbildung 13 dargestellt.

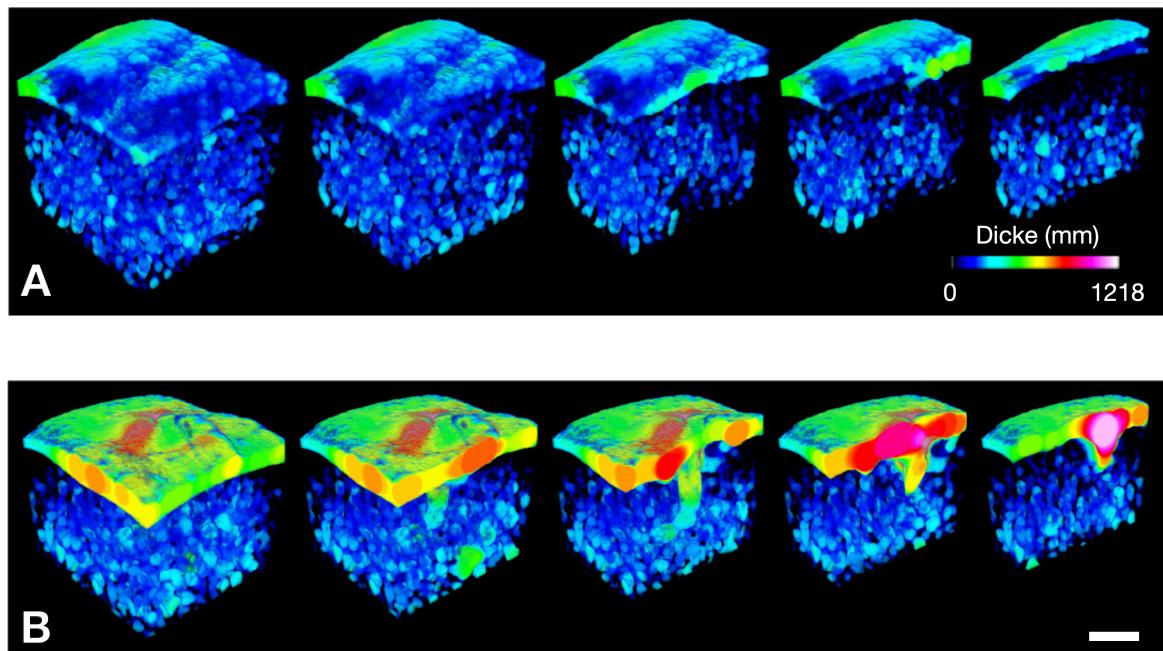


Abbildung 13: Kolorierte dreidimensionale Mikro-computertomographische Darstellung der Knorpeldicke. Darstellung mithilfe farblicher Hervorhebungen der Knorpeldicke (bzw. des Reparaturgewebes) der rAAV-TGF- β 1- (A) und rAAV-lacZ (B)-Behandlungsgruppe. Die Farbskala entspricht der Ausprägung des Parameters Ct.Th (mm) in der computerbasierten Defektevaluation. Maßstabsbalken: A, B 2 mm. Ct.Th: kortikale Dicke; lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

Vergleiche der Knorpelgewebe auf Basis von modifizierten Schwellenwerten ergaben keine signifikanten Unterschiede. Untersucht wurde dabei der morphologische Knorpel nach Veränderung der abgebildeten Graustufen (Knorpelfensterung), welcher diesen als hyperdense Areal darstellte und eine scharfe Abgrenzung zu fehlendem Reparaturgewebe (hypodens) ermöglichte. Der Parameter BV/TV repräsentiert dabei die Füllung des Defektareals mit Knorpelgewebe (Tabelle 19).

Tabelle 19: Modifizierte Mikro-computertomographische Analyse des Defektknorpels.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BV/TV, %	85,52 \pm 9,77	87,96 \pm 7,01	0,575

Dabei erfolgte die Knorpeldarstellung mit veränderter Fensterung. Knorpelige Gewebsanteile wurden hyperdens dargestellt und scharf gegen fehlendes Reparaturgewebe abgegrenzt (hypodens); MW \pm SD. BV/TV: Knochenvolumenanteil; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Eine manuelle Messung der computertomographisch erzeugten Bilder zur tiefergehenden Analyse der Defektarchitektur ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Manuelle Mikro-computertomographische Analyse des knorpeligen Defektgewebes.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Knorpeldicke (Defekt), mm	0,58 \pm 0,14	0,51 \pm 0,16	0,637
Defektweite (chondral), mm	0,73 \pm 0,45	0,84 \pm 0,42	0,793
Vertiefung (chondral), mm	0,07 \pm 0,05	0,08 \pm 0,03	0,431
Anhebung (chondral), mm	0,03 \pm 0,06	0,02 \pm 0,03	0,784

Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.2.2. Mikro-computertomographische Evaluation der subchondralen Knochenplatte

Auf dem Niveau der subchondralen Knochenplatte ergaben sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 21).

Tabelle 21: Mikro-computertomographische Analyse der subchondralen Knochenplatte im Defektareal.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	763,56 \pm 59,78	761,9 \pm 59,99	0,958
BV/TV, %	87,02 \pm 9,84	85,80 \pm 12,61	0,832
BS/BV, mm ⁻¹	8,18 \pm 3,12	9,63 \pm 6,10	0,558
BS/TV, mm ⁻¹	6,86 \pm 1,61	7,70 \pm 3,30	0,529
Ct.Th, mm	0,47 \pm 0,10	0,45 \pm 0,10	0,651
Po(cl), %	0,21 \pm 0,27	0,16 \pm 0,13	0,670
Po(op), %	12,8 \pm 9,78	14,05 \pm 12,70	0,829
Po(to) %	12,9 \pm 9,84	14,20 \pm 12,61	0,832

Dargestellt sind die Ergebnisse der computerbasierten Analyse der subchondralen Knochenplatte. Gemessen wurden die Werte auf dem Niveau der subchondralen Knochenplatte im Reparaturgewebe; MW \pm SD. BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; Ct.Th: Kortikale Dicke; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; Po(cl): geschlossene Porosität; Po(op): offene Porosität; Po(to): totale Porosität; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt in 3D-Rekonstruktion koloriert die Dickenverteilung der subchondralen Knochenplatte und ihre Morphologie im Reparaturgewebe.

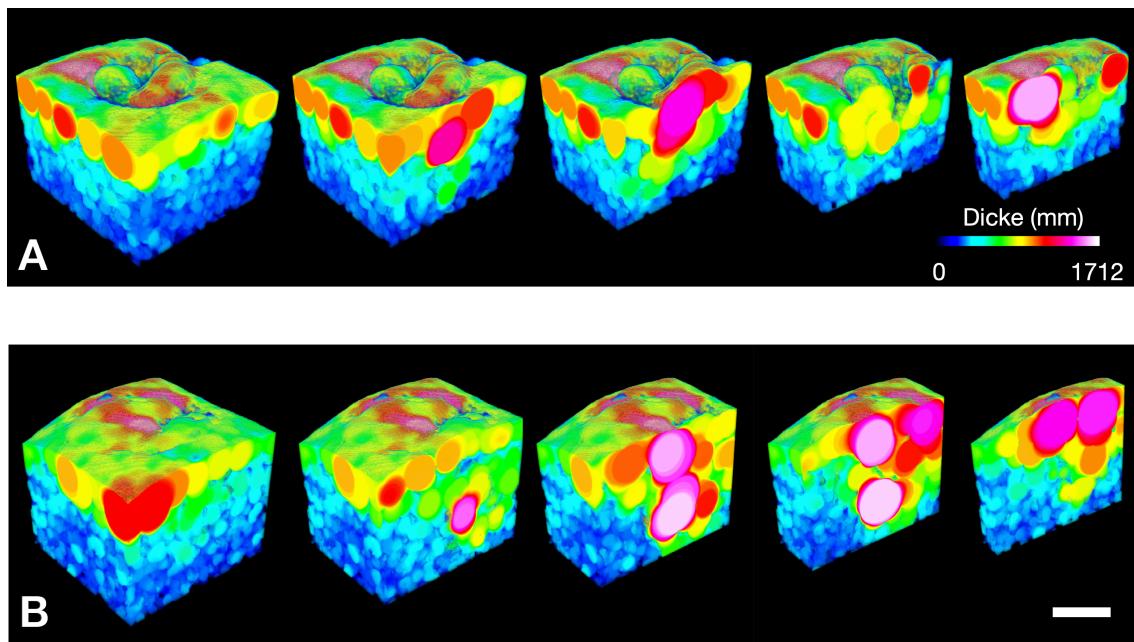


Abbildung 14: Kolorierte dreidimensionale Mikro-computertomographische Darstellung der subchondralen Knochenplattenausprägung. Koloriert dargestellt ist die subchondrale Knochenplattendicke der rAAV-TGF- β 1- (A) und rAAV-lacZ- (B) Behandlungsgruppe. Die Farbskala entspricht der Ausprägung des Parameters Tb.Th. (mm) in der computerbasierten Defektevaluation. Es sind in Reihe mehrere Anschnitte derselben Defekte gezeigt. Maßstabsbalken 2 mm. lacZ: β -Galactosidase; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; Tb.Th: Trabekeldicke; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Für die manuell erhobenen Daten ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die subchondrale Knochenplatte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Manuelle Mikro-computertomographische Analyse der subchondralen Knochenplatte im Defektgewebe.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Subchondrale Knochendicke, Defekt, mm	$1,10 \pm 0,30$	$1,32 \pm 0,60$	0,713
Defektweite (subchondral), mm	$1,22 \pm 0,47$	$1,39 \pm 0,60$	0,564
Vertiefung, subchondrale Knochenplatte, mm	$0,29 \pm 0,16$	$0,27 \pm 0,22$	0,713
Elevation, subchondrale Knochenplatte, mm	$0,02 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,05$	0,101

Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.2.3. Mikro-computertomographische Evaluation der subartikulären Spongiosa

Zwischen den Behandlungsgruppen unterschied sich die trabekuläre Separation im Defektbereich signifikant mit einer reduzierten Separation nach rAAV-TGF- β 1-Anwendung ($P = 0,041$), siehe Tabelle 23.

Tabelle 23: Mikro-computertomographische Analyse der subartikulären Spongiosa im Defektgewebe.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	673,91 ± 30,55	686,53 ± 30,94	0,426
BV/TV, %	78,04 ± 6,41	81,05 ± 4,27	0,287
BS/BV, mm ⁻¹	10,53 ± 2,01	10,53 ± 1,83	0,995
BS/TV, mm ⁻¹	8,12 ± 0,90	8,47 ± 1,14	0,500
Tb.Pf, mm ⁻¹	-14,22 ± 5,45	-18,72 ± 4,88	0,104
SMI, -	-0,91 ± 1,63	-1,82 ± 2,70	0,425
Tb.Th, mm	0,33 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,982
Tb.N., mm ⁻¹	2,39 ± 0,24	2,47 ± 0,18	0,491
Tb.Sp, mm	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,041
DA, -	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,08	0,680
FD, -	2,52 ± 0,03	2,53 ± 0,03	0,521
CD, mm ⁻³	102,80 ± 26,75	139,84 ± 47,75	0,076

Daten mit MW ± SD. BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; CD: Konnektivitätsdichte; DA: Grad der Anisotropie; FD: fraktale Dimension; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; SMI: Struktur-Model-Index; Tb.N: Trabekelanzahl; Tb.Pf: trabekulärer Anordnungsfaktor; Tb.Th: Trabekeldicke; Tb.Sp: Trabekelabstand; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.3. Ultrahochfeld-magnetresonanztomographische Defektbewertung

Mittels 9,4 Tesla Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie wurden die Kondylen in Gänze mit hoher Auflösung dargestellt und anschließend anhand des MOCART-Bewertungssystems bewertet (MARLOVITS *et al.*, 2006). Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($P \geq 0,342$), wie in Tabelle 24 und Abbildung 15 dargestellt. Die Knochenintegration war bei jedem Defekt suffizient und folglich mit der gleichen Punktzahl zu bewerten. Entsprechend wurde dieser Parameter aus der statistischen Analyse entfernt.

Tabelle 24: Defektbewertung anhand des adaptierten MOCART-Bewertungssystems.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Defektfüllung	$11,27 \pm 3,46$	$11,15 \pm 5,10$	1,000
Knorpelgrenzschicht	$3,56 \pm 1,00$	$5,04 \pm 3,09$	0,342
Oberflächenbeschaffenheit	$2,17 \pm 1,72$	$2,92 \pm 2,67$	0,749
Defektstruktur	$3,50 \pm 0,89$	$3,92 \pm 2,71$	0,708
Signalintensität	$5,42 \pm 1,09$	$5,73 \pm 1,75$	1,000
Vollständigkeit der subchondralen Lamelle	$4,00 \pm 1,15$	$3,40 \pm 2,02$	0,789
Integrität der subchondralen Knochenplatte	$9,04 \pm 1,15$	$8,52 \pm 2,27$	0,866
Subartikuläre Spongiosa	$7,02 \pm 1,80$	$6,54 \pm 1,59$	0,556
Total	$48,27 \pm 7,89$	$49,71 \pm 16,69$	0,564

85 Punkte nativer gesunder Knorpel, 0 Punkte fehlgeschlagene Defektreparatur, MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MOCART: magnetic resonance observation of cartilage repair tissue; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

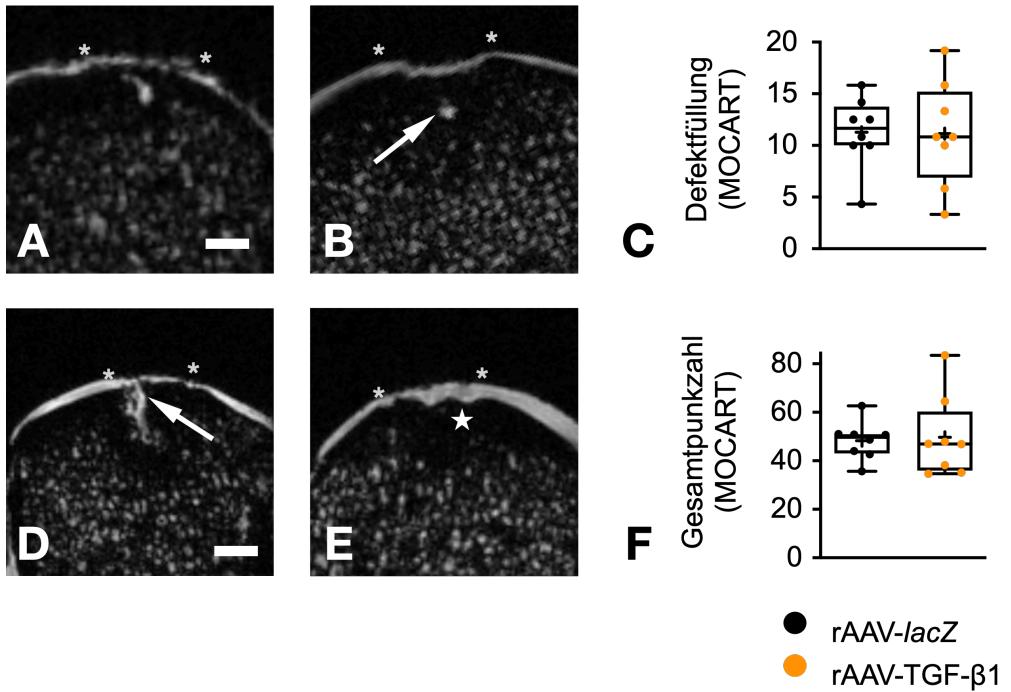


Abbildung 15: Magnetresonanztomographische Defektbewertung. Ultrahochfeld-magnetresonanztomographisch dargestellt ist jeweils die mediale Femurkondyle mit Anschnitt des Defektgewebes, hier gezeigt exemplarisch ein Defekt der rAAV-lacZ-Kontrollgruppe (A, F) sowie der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe (B, G); Mit * markiert sind die Defektgrenzen im Übergang zur Integrationszone. Der Stern in G kennzeichnet den subchondralen Knochen als hypointenses Areal, während die Knorpelschicht und Teile des Reparaturgewebes (mit Pfeil in B und F markiert) hyperintens dargestellt sind. Maßstabsbalken in A, B 1mm; F, G 1,5mm. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MOCART: magnetic resonance observation of cartilage repair tissue; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.4. Histopathologische Defektbewertung

6.4.1. Semiquantitative Bewertungen des knorpeligen Reparaturgewebes

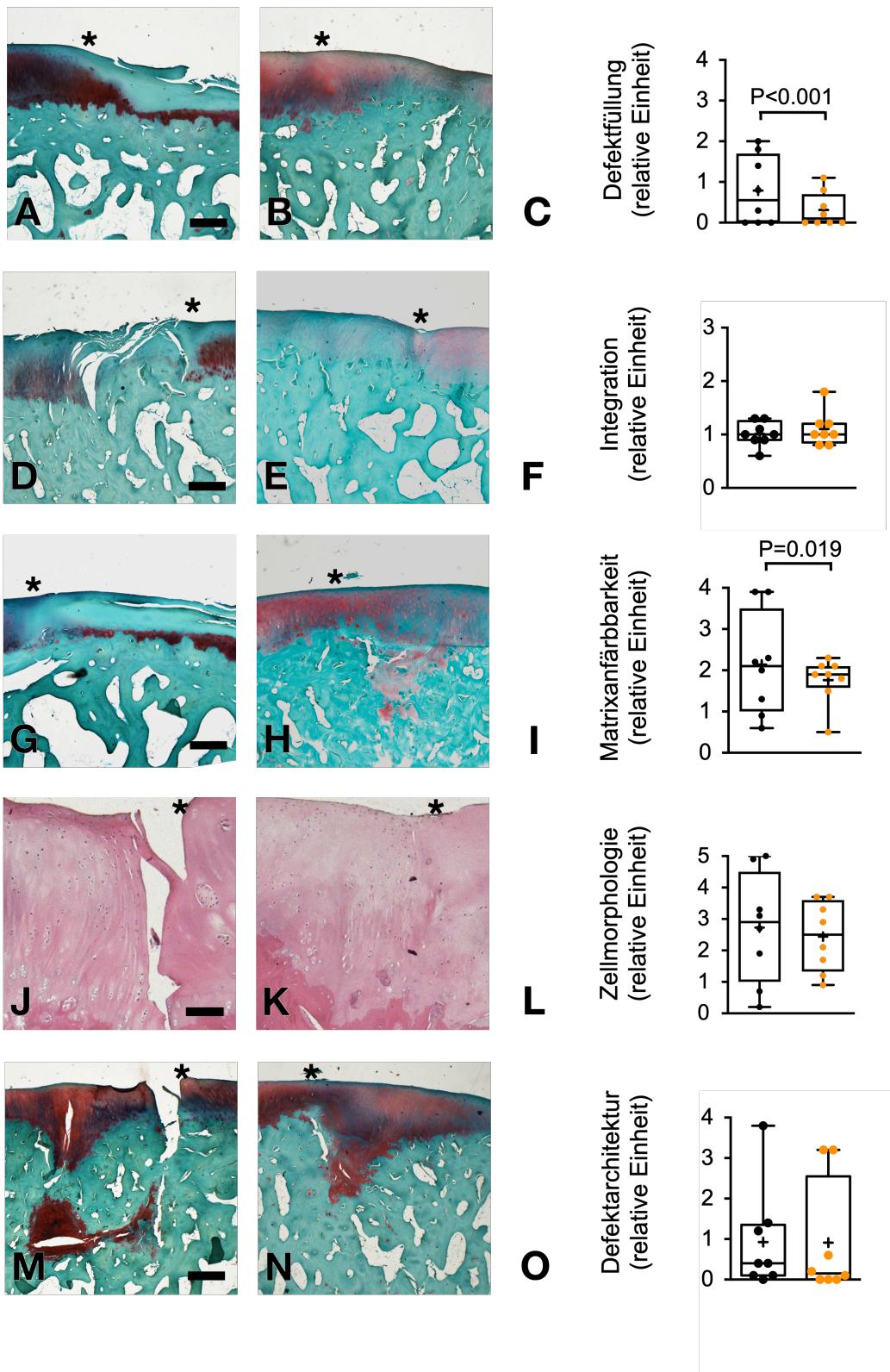
Semiquantitative Defektbewertung nach Sellers

Die histologische Aufarbeitung der Defekte erfolgte wie unter 5.8.1 beschrieben und zeigte nach der defektmorphologischen Bewertung signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen (siehe Tabelle 25 und Abbildung 16). So erreichten rAAV-TGF- β 1-behandelte Defekte eine durchschnittliche Defektfüllung von 90-110%, während die Daten der Kontrollgruppe eher eine Füllung der Defekte zu 75-90% in Relation zum perifokalen Gewebe zeigten ($P < 0,001$). Weiter war das Anfärbeverhalten der Knorpelmatrix in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe signifikant verstärkt ($P = 0,019$). Es zeigte sich insgesamt eine Verbesserung der Defektreparatur, angezeigt durch eine signifikant geringere Gesamtpunktzahl des semiquantitativen histologischen Bewertungssystems ($P = 0,049$).

Tabelle 25: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Sellers.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Defektfüllung	0,79 ± 0,91	0,31 ± 0,59	<0,001
Integration	1,01 ± 0,44	1,1 ± 0,47	0,181
Matrixanfärbung	2,14 ± 1,33	1,76 ± 0,86	0,019
Zellmorphologie	2,73 ± 1,88	2,44 ± 1,53	0,213
Defektarchitektur	0,93 ± 1,34	0,91 ± 1,50	0,931
Oberflächenarchitektur	0,86 ± 0,94	0,93 ± 1,23	0,632
Neubildung des subchondralen Knochens	1,35 ± 0,84	1,50 ± 0,73	0,165
<i>Tidemark</i>	1,88 ± 1,16	1,69 ± 0,88	0,166
Total	11,68 ± 5,13	10,64 ± 4,55	0,049

Eine Bewertung mit 0 Punkten zeigt die vollständige Defektreparatur, die Maximalpunktzahl von 31 Punkten eine fehlende oder fehlgeschlagene Knorpelreparatur; MW ± SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .



Ergebnisse

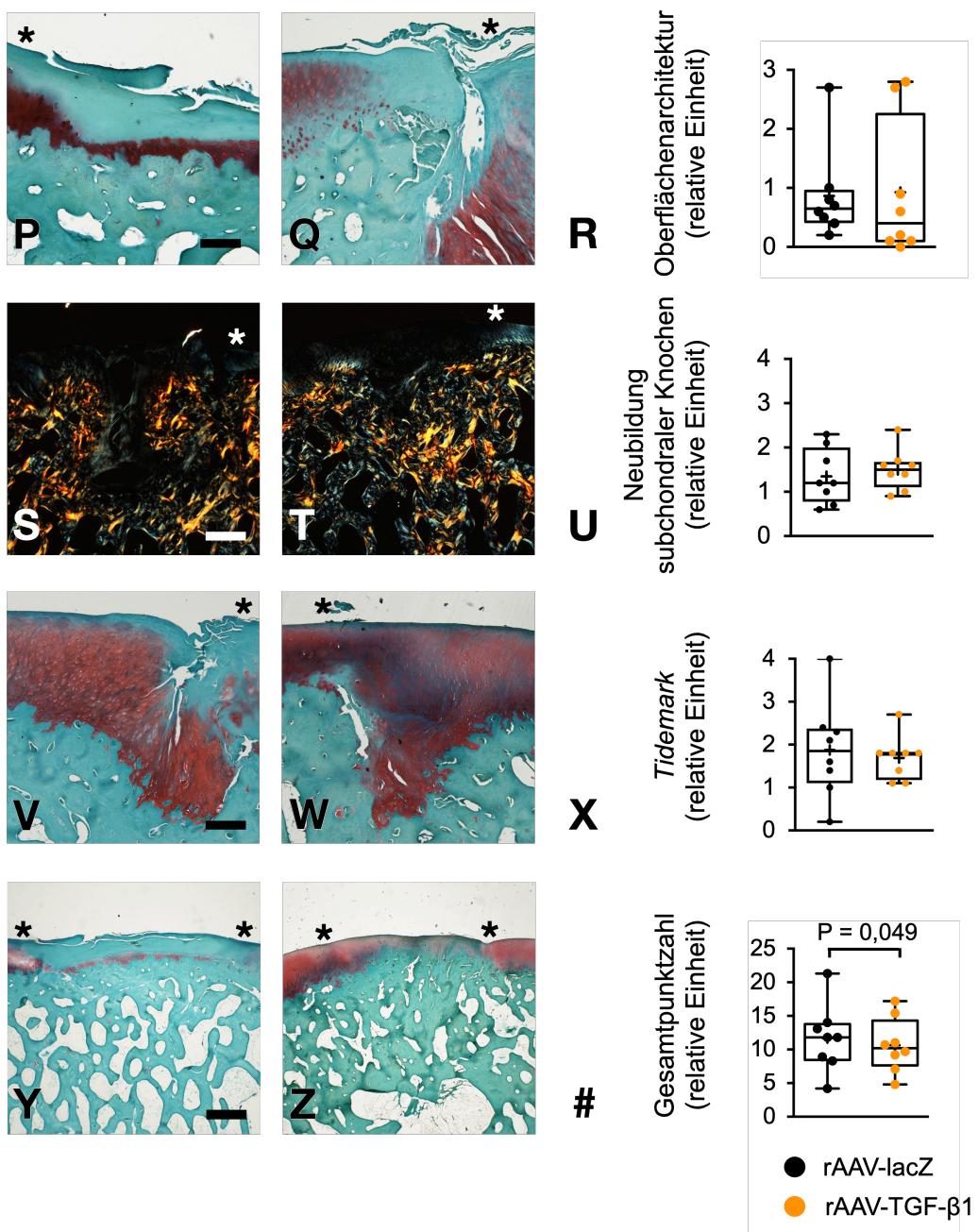


Abbildung 16: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur (Bewertungssystem nach Sellers). Für die Analyse fanden hauptsächlich Safranin-O-gefärbte Schnitte Verwendung. Zelluläre Parameter wurden aufgrund des Anfärbeverhaltens an HE-gefärbten (J, K) Schnitten ausgewertet. Der subchondrale Knochen war in der polarisierten Lichtmikroskopie diffiziler abgrenzbar (S, T). Repräsentative Schnitte von osteochondralen Defekten nach Behandlung mit rAAV-lacZ (A, D, G, J, M, P, S, V, Y) oder rAAV-TGF- β 1 (B, E, H, K, N, Q, T, W, Z) sind jeweils in einer Spalte dargestellt. Die Defektgrenzen wurden mit * markiert. Maßstabsbalken in A, B, D, E, G, H 400 μ m; M, N, P, Q, S, T, V, W 200 μ m; J, K 100 μ m. lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Semiquantitative Defektbewertung nach Fortier

Die Auswertung der Defektgewebe mittels des Bewertungssystems nach Fortier *et al.* (FORTIER *et al.*, 2002) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungssystemen ($P \geq 0,074$), wie in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Fortier.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Defektfüllung	$0,53 \pm 0,49$	$0,33 \pm 0,42$	0,395
Integration	$0,2 \pm 0,31$	$0,31 \pm 0,41$	0,547
Oberflächenarchitektur	$0,91 \pm 0,66$	$1,19 \pm 1,16$	0,571
Zellmorphologie und Organisation	$2,2 \pm 0,69$	$1,78 \pm 0,6$	0,210
Zellularität	$1,71 \pm 0,26$	$1,44 \pm 0,31$	0,074
Tidemark	$1,89 \pm 1,01$	$1,48 \pm 0,62$	0,345
Matrixanfärbbarkeit	$1,36 \pm 0,55$	$1,16 \pm 0,41$	0,423
Total	$8,8 \pm 2,63$	$7,68 \pm 2,83$	0,424

Die Punktzahl 0 repräsentiert eine vollständige Defektreparatur, die Maximalpunktzahl mit 20 Punkten eine fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SD; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

Semiquantitative Defektbewertung nach Wakitani

Auch die histologische Evaluation auf Basis des Wakitani-Bewertungssystem (WAKITANI et al., 1994) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (siehe Tabelle 27). In den Kategorien Zellmorphologie ($P < 0,001$), Knorpeldicke ($P < 0,001$) und Gesamtpunktzahl ($P = 0,002$) erzielten mit rAAV-TGF- β 1 behandelte Defekte signifikant geringere Punktzahlen, welche Indikatoren für eine verbessertes Reparaturgewebe sind.

Tabelle 27: Semiquantitative histologische Analyse der Defektreparatur nach Waktiani.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Zellmorphologie	$2,19 \pm 0,90$	$1,71 \pm 0,58$	<0,001
Matrixanfärbbarkeit	$1,65 \pm 0,98$	$1,43 \pm 0,76$	0,071
Oberflächenbeschaffenheit	$0,95 \pm 0,84$	$1,00 \pm 1,20$	0,669
Knorpeldicke	$0,46 \pm 0,62$	$0,21 \pm 0,44$	<0,001
Integration	$0,60 \pm 0,56$	$0,50 \pm 0,61$	0,280
Total	$5,85 \pm 2,59$	$4,85 \pm 2,52$	0,002

Die Punktzahl 0 zeigt die vollständige Defektreparatur, die Maximalpunktzahl von 14 Punkten die fehlende Knorpelreparatur an; MW \pm SD; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Die Zellmorphologie imponierte in der rAAV-lacZ-Behandlungsgruppe als vorwiegend fasernknorpelig und in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe teilweise hyalin-artig. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($P < 0,001$). In beiden Behandlungsgruppen wurden insgesamt suffiziente Rekonstruktionen des Knorpelniveaus und damit der Knorpeldicke im Defekt festgestellt. Durchschnittlich erfolgte diese zu mehr als 66% in Relation zum direkt angrenzenden Knorpelgewebe. Die rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe zeigte dazu den signifikant verbesserten Parameter „Knorpeldicke“ ($P < 0,001$). Auch die Gesamtpunktzahl war signifikant geringer nach rAAV-TGF- β 1-Anwendung ($P = 0,002$).

6.4.2. Immunhistochemische Bewertung des knorpeligen Reparaturgewebes

Immunhistochemische Bewertung von Typ-I-Kollagen

Zur tiefergehenden Gewebsanalyse wurde der Gehalt von Typ-I-Kollagen im knorpeligen Reparaturgewebe gemessen. In Abgrenzung zum hyalinen Knorpel enthält Faserknorpel hohe Anteile an Typ-I-Kollagen (ARMIENTO *et al.*, 2019). Die Immunreaktivität von Typ-I-Kollagen wurde mittels eines semiquantitativen Bewertungssystems ausgewertet (siehe Tabelle 28). Dabei spiegelt die Intensität der Immunmarkierung den Kollagengehalt im Gewebe wider.

Tabelle 28: Immunhistochemische Analyse von Typ-I-Kollagen.

Typ-I-Kollagen	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Semiquantitative Immunreaktivität	1,06 \pm 0,73	0,81 \pm 0,61	0,497

Analyse anhand des semiquantitativen Bewertungssystems zur Bestimmung der Immunreaktivität. Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Die semiquantitativ ausgewertete Immunreaktivität des Typ-I-Kollagens unterschieden sich zwischen beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant ($P = 0,497$), siehe Abbildung 17.

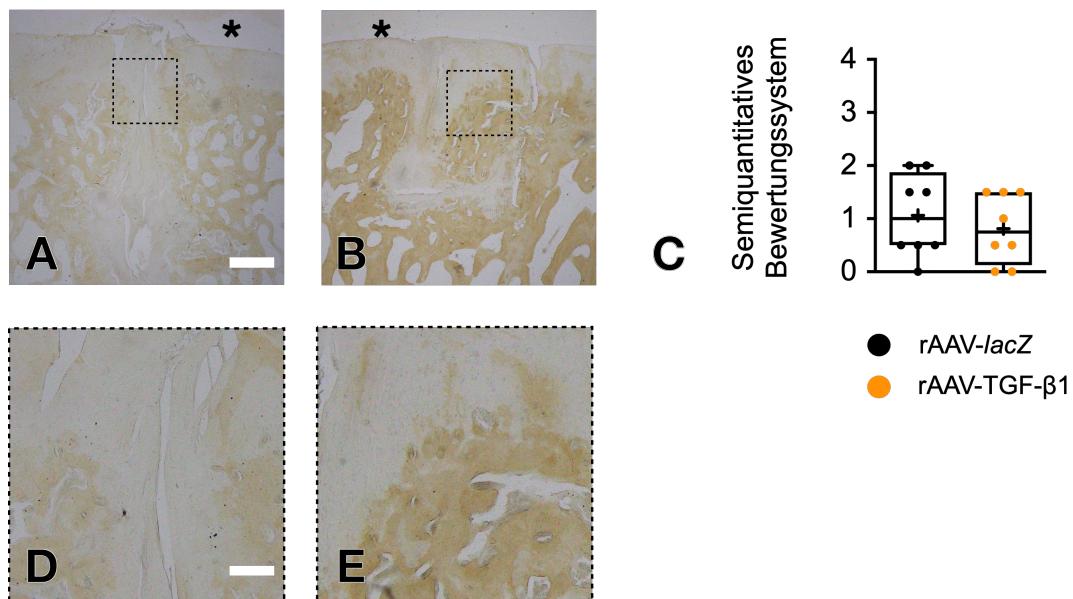


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse von Typ-I-Kollagen. Evaluiert wurden die immunhistochemisch zuvor aufgearbeiteten feingeweblichen Präparate mit Hilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems. Angefärbt wurde Typ-I-Kollagen in den oben gezeigten Gewebsanschnitten. Mit * sind die Defektgrenzen markiert; rAAV-TGF- β 1-Gruppe (A, C); rAAV-lacZ-Gruppe (D, E); Maßstabsbalken A, D 750 µm; B, E 200 µm. lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

Immunhistochemische Bewertung von Typ-II-Kollagen

Das Typ-II-Kollagen ist ein strukturelles Merkmal des hyalinen Gelenkknorpels (BORA, MILLER, 1987). Der Nachweis im Reparaturgewebe gelang durch Immunmarkierung mittels Antikörperfärbung. Im Vergleich zum angrenzenden Gelenkknorpel war eine deutliche Immunreaktivität in allen Defektgeweben beider Behandlungsgruppen auf dem Knorpelniveau nachzuweisen (siehe Tabelle 29). Dies zeigt, dass sich langfristig ein knorpeliges Reparaturgewebe bildet, welches hinsichtlich des Typ-II-Kollagengehalts deutliche Merkmale des physiologischen Gelenkknorpels trägt.

Tabelle 29: Immunhistochemische Analyse von Typ-II-Kollagen.

Typ-II-Kollagen	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Semiquantitative Immunreaktivität	2,81 \pm 0,788	3,19 \pm 0,43	0,287

Analyse anhand des semiquantitativen Bewertungssystems zur Bestimmung der Immunreaktivität. Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Im subchondralen Niveau konnten vereinzelt subchondrale, Typ-II-Kollagen-reiche Areale nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Die semiquantitativ ausgewertete Immunreaktivität des Typ-II-Kollagens im Reparaturgewebe unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant ($P = 0,287$).

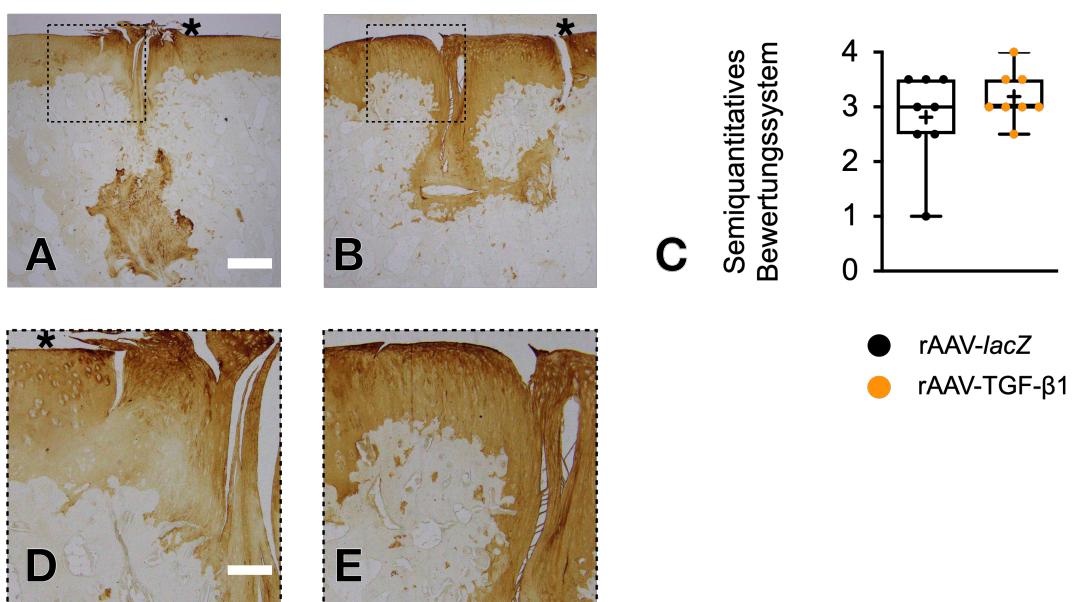


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse von Typ-II-Kollagen. Evaluiert wurden die immunhistochemisch aufgearbeiteten Färbungen mit Hilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems. Mit * sind die Defektgrenzen markiert. In A und B sind jeweils positiv angefärbte Areale im subchondralen Knochen sichtbar. Diese könnten Residuen der enchondralen Ossifikation darstellen; rAAV-TGF- β 1 behandelt (A, C); rAAV-lacZ-Gruppe (D, E); Maßstabsbalken A, B 1 mm, D, E 200 μ m. lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Immunhistochemische Bewertung von Typ-X-Kollagen

Die Immunreaktivität des Typ-X-Kollagens wurde als Immunaktivitätsquotient auf zellulärer Ebene bestimmt. Dabei impliziert eine vermehrte Typ-X-Kollagenexpression einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp, wie unter 2.2 beschrieben. Die Bewertung ist in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Immunhistochemische Analyse von Typ-X-Kollagen.

Typ-X-Kollagen	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivitätsquotient (zellulär)	0,25 \pm 0,11	0,37 \pm 0,17	0,147

Vergleich der Defekte anhand der direkten zellulären Immundetektion mit dem Quotienten aus positiv angefärbten Zellen und der Gesamtzellzahl. Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Basierend auf der zellulären Identifikation angefärbter Zellen ergab die Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($P = 0,147$). Abbildung 19 zeigt die repräsentative Immunmarkierung des Typ-X-Kollagens.

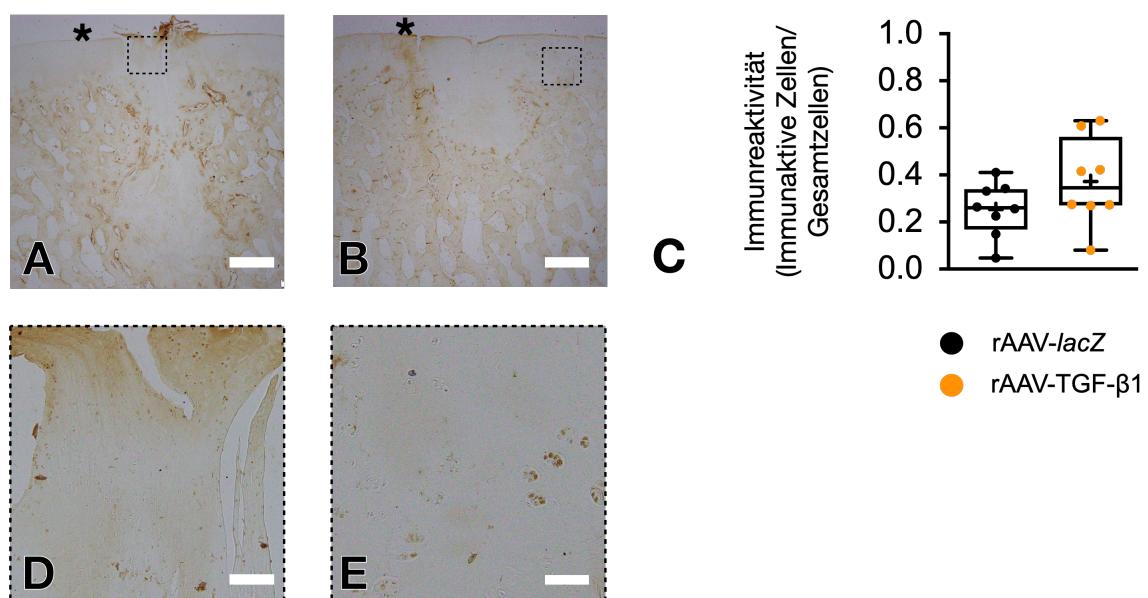


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse von Typ-X-Kollagen. Die nähergehende Gewebsanalyse erfolgte durch Bestimmung der zellulären Immunaktivität. Mit * sind die Defektgrenzen markiert; rAAV-TGF- β 1-Gruppe (A, D); rAAV-lacZ-Gruppe (B, E); Maßstabsbalken A, B 1 mm, D, E 100 μ m. lacZ: β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

Immunhistochemische Bewertung des transformierenden Wachstumsfaktors β 1

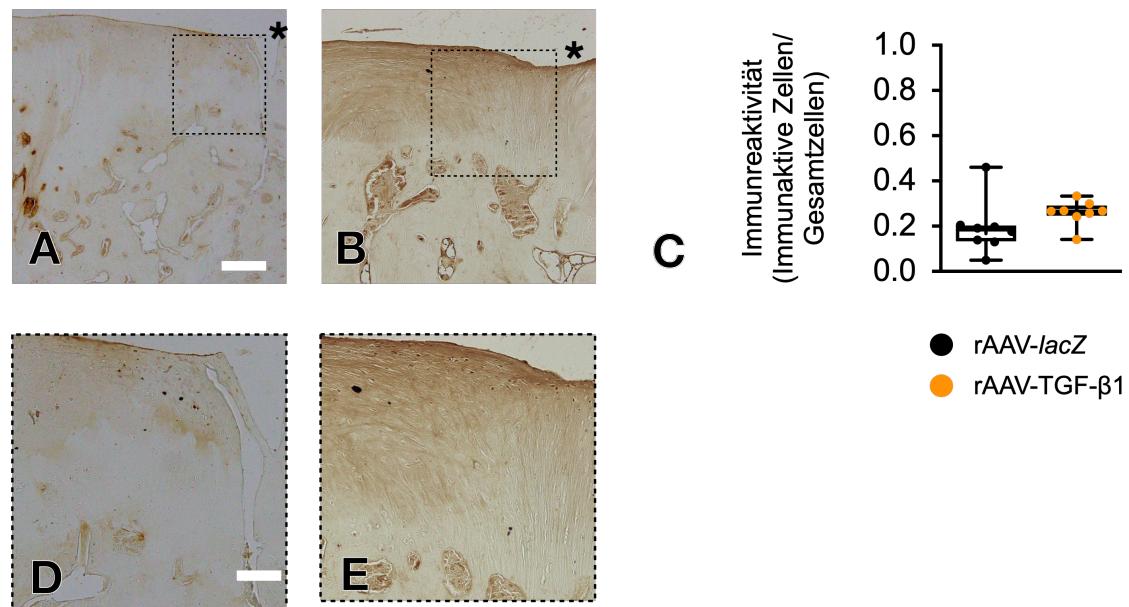
Der Gehalt von TGF- β 1 im Defektgewebe wurde mittels einer Antikörperfärbung bestimmt. Ein Jahr postoperativ wurden im Reparaturgewebe keine signifikant erhöhten Proteinkonzentrationen des Wachstumsfaktors TGF- β 1 detektiert (Tabelle 31).

Tabelle 31: Immunhistochemische Analyse von TGF- β 1 im Reparaturgewebe.

TGF- β 1-Immunanfärbung	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Immunaktivitätsquotient (zellulär)	0,19 \pm 0,11	0,26 \pm 0,05	0,187

Vergleich der Defekte anhand der direkten zellulären Immundetektion mit dem Quotienten aus positiv angefärbten Zellen und der Gesamtzellzahl. Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Durchgeführt wurde der Vergleich von Färbeintensitäten der Immunmarkierung auf Basis der zellulären Identifikation mit einer quantitativen Auswertung ($P = 0,187$), siehe Abbildung 20.



6.4.3. Auswertung der Zellularität im knorpeligen Reparaturgewebe

Die Zellzahl wurde in drei fest definierten Defektarealen bestimmt und statistisch verglichen (Tabelle 32). Die Angabe der Zellularität repräsentiert die Zellzahl pro Flächeneinheit in *Zellen pro mm²*.

Tabelle 32: Defektzellularität nach zonaler Aufteilung.

Zonale Unterteilung	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Superfizielle Zone, 1/mm ²	1157,29 \pm 586,92	1518,75 \pm 516,60	0,241
Intermediäre Zone, 1/mm ²	692,71 \pm 269,05	1123,96 \pm 416,32	0,037
Inferiore Zone, 1/mm ²	786,46 \pm 271,82	1102,08 \pm 251,51	0,041
Total, 1/mm ²	878,82 \pm 351,77	1248,26 \pm 377,89	0,079

Die Daten geben die mittlere Zellzahl pro mm² an; MW \pm SD; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der inferioren, knochennahen Zone ($P = 0,041$) und in der intermediären Zone ($P = 0,037$). Die durchschnittliche Zellzahl pro Flächeneinheit war somit für zwei Zonen in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe signifikant erhöht. Eine gemittelte Analyse über alle 3 definierten Zonen pro Defekt ergab keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,079$), wie in Abbildung 21 dargestellt.

Ergebnisse

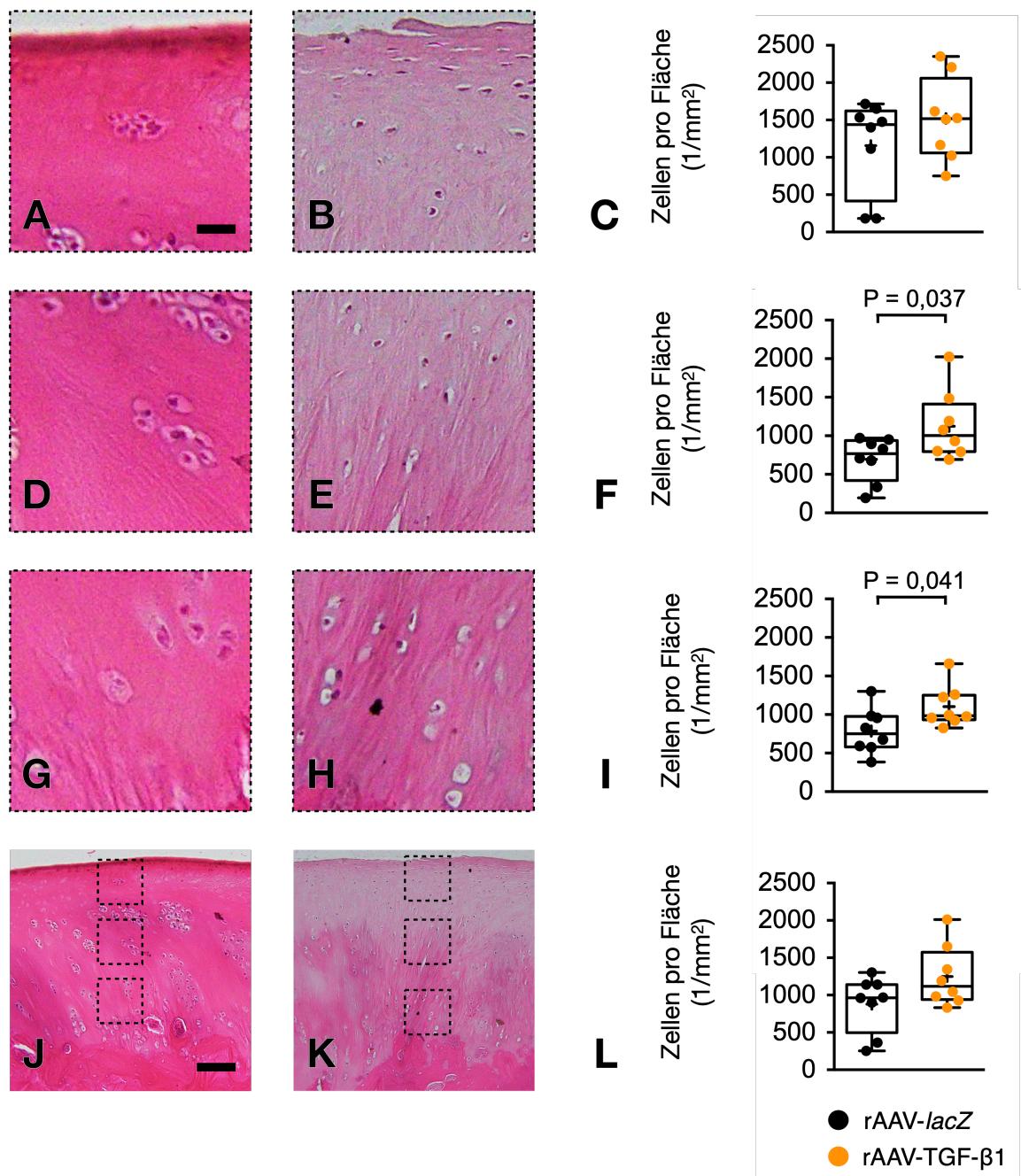


Abbildung 21: Defekztzellularität im knorpeligen Reparaturgewebe. Die Bestimmung der Zellularität ist durch die Messung der Zellzahl in fest definierten Arealen erfolgt; rAAV-TGF- β 1-Gruppe (A, D, G, J); rAAV-lacZ-Gruppe (B, E, H, K); Maßstabsbalken A-H 100 μ m, J, K 200 μ m. lacZ β -Galactosidase-Gen; rAAV: rekombinantes adeno-assoziertes Virus; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Eine durchgeführte Korrelationsanalyse (Abbildung 22), welche die Zellularität des Gesamtdefekts in Relation setzt zur Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* derselben Defekte, zeigte einen negativen signifikanten Zusammenhang. Der angegebene Korrelationskoeffizient ($\rho = -0.5059$) zeigt an, dass eine hohe Gesamtzellularität des Defektgewebes mit einer niedrigen Punktzahl im histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* korreliert. Niedrige Punktzahlen im histologischen Bewertungssystem repräsentieren dabei eine hohe Qualität des Reparaturgewebes. Somit korreliert die hohe Zellularität der Defekte mit einer verbesserten Defektheilung. Dieser Zusammenhang ist signifikant ($P = 0,036$).

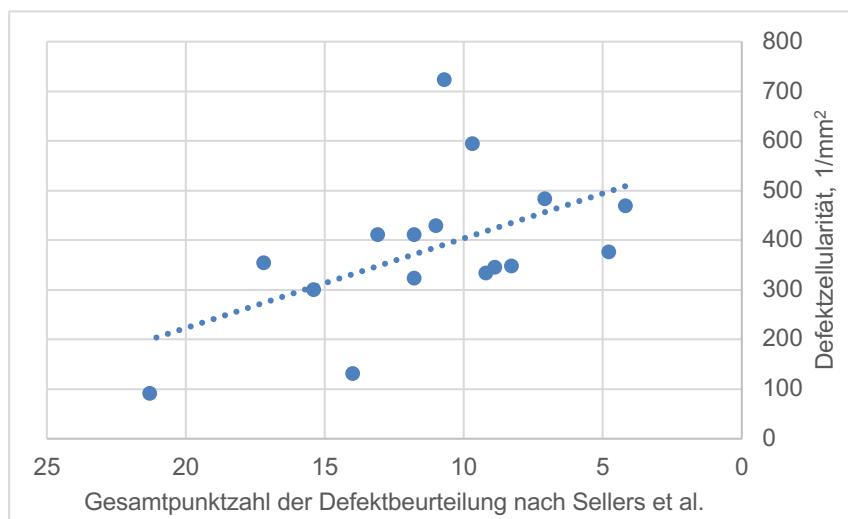


Abbildung 22: Korrelationsanalyse nach Spearman. In Bezug gesetzt ist die Gesamtpunktzahl im Bewertungssystem nach Sellers (auf der x-Achse aufgetragen) zur Gesamtzellularität der Defektgewebe (auf der y-Achse). Der Korrelationskoeffizient beträgt -0.506 und ist signifikant bei 2-seitigem Test ($P = 0,036$). Der Zusammenhang ist negativ, eine niedrige Punktzahl im inversen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* zeigt eine höhere Defektgewebsqualität an und korreliert mit hoher Defektzellularität.

Ergebnisse

6.5. Analyse der perifokalen arthrotischen Degenerationsprozesse

An den osteochondralen Defekt angrenzend wurde das perifokale Gewebe mittels Mikro-CT-Darstellung computerbasiert ausgewertet und anschließend der feingeweblichen Evaluation zugeführt.

6.5.1. Mikro-computertomographische Evaluation des perifokalen Knorpels

In den perifokalen Regionen wurden auf dem Knorpelniveau nach Mikro-CT-Darstellung keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt (Tabelle 33).

Tabelle 33: Mikro-computertomographische Analyse des perifokalen Knorpels.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	299,79 \pm 55,08	298,09 \pm 24,39	0,938
BV/TV, %	1,71 \pm 1,37	5,60 \pm 6,34	0,113
BS/BV, mm ⁻¹	137,467 \pm 5,07	123,11 \pm 33,22	0,346
BS/TV, mm ⁻¹	2,07 \pm 1,09	5,79 \pm 6,07	0,110
Ct.Th, mm	0,04 \pm 0,01	0,040 \pm 0,01	0,170
Knorpeldicke, mm	0,56 \pm 0,13	0,53 \pm 0,12	0,495
Po(op), %	98,28 \pm 1,37	94,40 \pm 6,34	0,113
Po(to), %	94,40 \pm 6,34	98,28 \pm 1,37	0,113

Reguläre Darstellung der osteochondralen Komponenten mit hypodenser Knorpeldarstellung. Daten mit MW \pm SD. lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Die Füllung des Knorpelareals im angrenzenden Gewebe wurde mittels der Modifikation von Graustufen (Fensterung) objektiviert (Tabelle 34). Die Knorpelfensterung erzeugte dabei eine hyperdense computertomographische Darstellung von Knorpelgewebe. Dies ermöglichte der Software die Abgrenzung zu fehlendem Gewebe im VOI (hypodens). Ein prozentual verminderter Knochenvolumenanteil repräsentiert dabei fehlendes perifokales Gewebe, z.B. durch Erosion. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Tabelle 34: Modifizierte Mikro-computertomographische Analyse des perifokalen Knorpels.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BV/TV, %	96,58 \pm 2,69	93,62 \pm 5,86	0,216

Dabei erfolgte die Knorpeldarstellung mit modifizierter Fensterung. Knorpelige Gewebsanteile wurden hyperdens dargestellt und gegen fehlendes Gewebe im Knorpelniveau abgegrenzt (hypodens). Daten mit MW \pm SD. BV/TV: Knochenvolumenanteil; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

6.5.2. Mikro-computertomographische Evaluation der perifokalen subchondralen Knochenplatte

Ebenso zeigte die Mikro-CT-Analyse der perifokalen subchondralen Knochenplatten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Tabelle 35).

Tabelle 35: Mikro-computertomographische Analyse der perifokalen subchondralen Knochenplatte.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	804,39 \pm 48,87	833,55 \pm 52,20	0,268
BV/TV, %	98,86 \pm 1,09	98,48 \pm 2,88	0,730
BS/BV, mm ⁻¹	6,24 \pm 0,73	6,57 \pm 2,23	0,695
BS/TV, mm ⁻¹	6,17 \pm 0,68	6,42 \pm 1,92	0,726
Tb.Th, mm	0,51 \pm 0,08	0,53 \pm 0,13	0,831
Po(cl), %	0,12 \pm 0,12	0,07 \pm 0,04	0,273
Po(op), %	1,02 \pm 0,99	1,45 \pm 2,88	0,695
Po(to), %	1,14 \pm 1,09	1,52 \pm 2,88	0,730
Knochenplattendicke, mm	0,65 \pm 0,15	0,69 \pm 0,07	0,270

Daten mit MW \pm SD. BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; Ct.Th: Kortikale Dicke; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; Po(cl): geschlossene Porosität; Po(op): offene Porosität; Po(to): totale Porosität; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

6.5.3. Mikro-computertomographische Evaluation der perifokalen subartikulären Spongiosa

Bei der computergestützten Analyse der perifokal gelegenen subartikulären Spongiosa wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen eruiert ($P \geq 0,093$). Die Daten sind in Tabelle 36 und Abbildung 23 dargestellt.

Tabelle 36: Mikro-computertomographische Analyse der perifokalen subartikulären Spongiosa.

Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
BMD, mg/cm ³	636,48 \pm 29,01	654,51 \pm 23,28	0,192
BV/TV, %	72,90 \pm 6,32	74,18 \pm 5,05	0,660
BS/BV, mm ⁻¹	14,14 \pm 2,07	14,40 \pm 2,27	0,814
BS/TV, mm ⁻¹	10,20 \pm 0,82	10,60 \pm 1,20	0,451
Tb.Pf, mm ⁻¹	-13,12 \pm 6,06	-14,65 \pm 5,02	0,591
SMI, -	-0,56 \pm 1,79	-0,36 \pm 1,27	0,796
Tb.Th, mm	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,565
Tb.N., mm ⁻¹	3,07 \pm 0,21	3,04 \pm 0,18	0,796
Tb.Sp, mm	0,12 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,266
DA, -	0,27 \pm 0,05	0,29 \pm 0,09	0,589
FD, -	2,47 \pm 0,04	2,48 \pm 0,03	0,739
CD, mm ⁻³	124,64 \pm 28,14	170,66 \pm 66,56	0,093

Daten mit MW \pm SD. BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; CD: Konnektivitätsdichte; DA: Grad der Anisotropie; FD: fraktale Dimension; SMI: Struktur-Model-Index; Tb.N: Trabekelanzahl; Tb.Pf: trabekulärer Anordnungsfaktor; Tb.Th: Trabekeldicke; Tb.Sp: Trabekelabstand; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

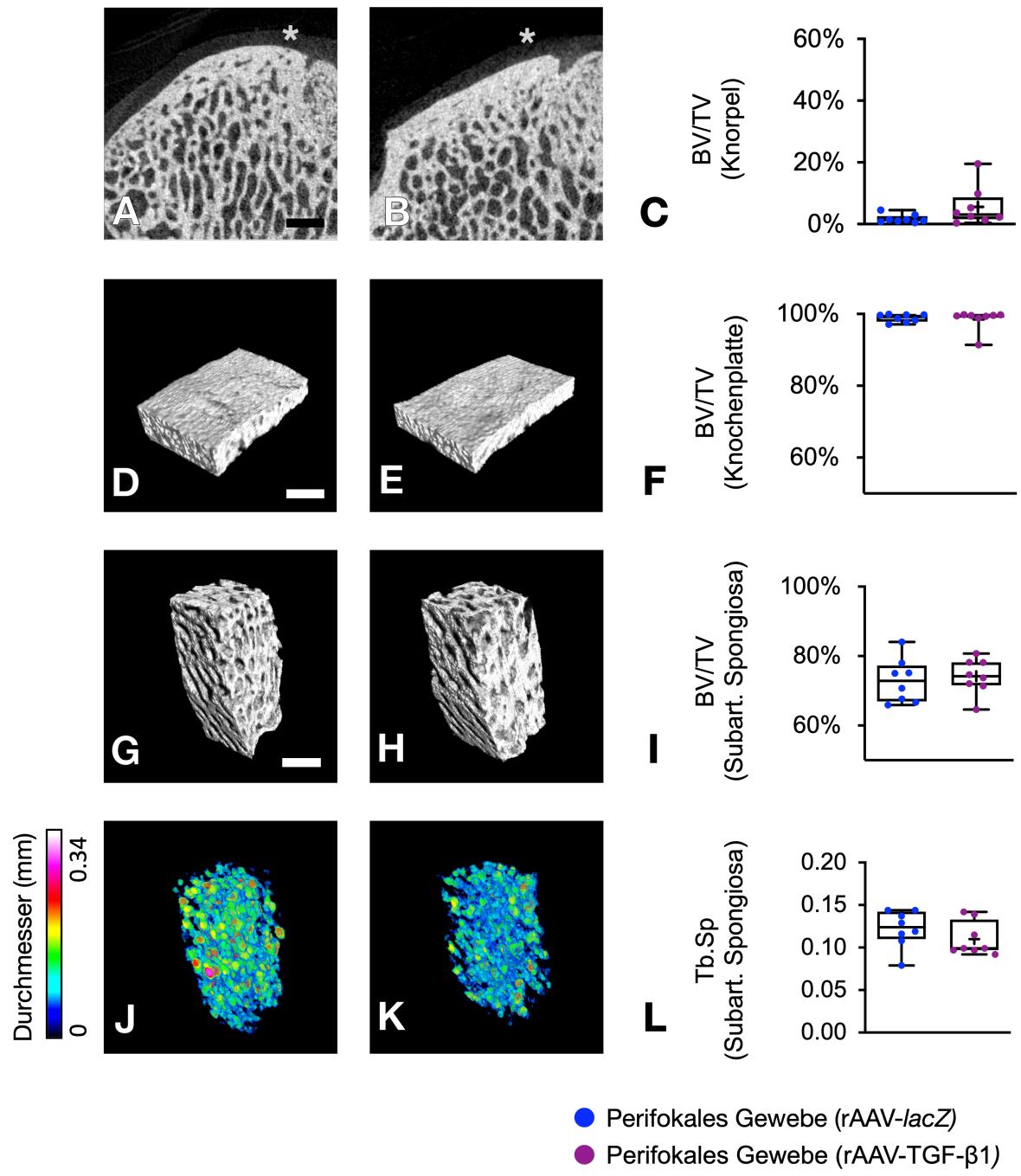


Abbildung 23. Perifokale computertomographische Datensätze in 2D- und 3D-Darstellung. Dargestellt ist jeweils die osteochondrale Einheit des perifokalen Gewebes. Die erste Zeile (A-C) zeigt die 2D-Rekonstruktion mit Markierung der Defektgrenzen (*), die zweite Zeile (D-F) zeigt hingegen die 3D-Rekonstruktion der VOIs auf dem Niveau der subchondralen Knochenplatte, die dritte Zeile (G-I) zeigt die 3D-Rekonstruktion der VOIs auf dem Niveau der subartikulären Spongiosa, die vierte Zeile (J-L) ist eine farbbasierte 3D-Rekonstruktion der Trabekelabstände (Tb.Sp) in der subartikulären Spongiosa. Die erste Spalte (A, D, G, J) zeigt rAAV-lacZ-behandelte Defekte, die zweite Spalte (B, E, H, K) rAAV-TGF- β 1-behandelte Defekte, die dritte Spalte (C, F, I, L) die korrespondierende Statistik. Maßstabsbalken: A, B, G, J, K 1 mm; D, E 500 μ m. BV/TV: Knochenvolumenanteil; lacZ: β -Galactosidase-Gen; Tb.Sp: Trabekelabstand; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

Ergebnisse

6.5.4. Histopathologische Bewertung der perifokalen Arthrose

An den osteochondralen Defekt angrenzend wurde das perifokale Gewebe histologisch untersucht und mit dem OARSI-Bewertungssystem nach Little *et al.* (LITTLE *et al.*, 2010) tiefergehend analysiert (siehe Tabelle 37 und Abbildung 24). Die kombinierte Auswertung des medial und lateral angrenzenden Gewebes ergab signifikante Unterschiede in den Parametern Knorpelstruktur ($P = 0,032$), Chondrozytendichte ($P < 0,001$), *Tidemark* ($P = 0,049$) und für die Gesamtpunktzahl ($P = 0,003$). So imponierte die Knorpelstruktur in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe primär dem nativen Gewebe entsprechend, die rAAV-*lacZ*-Behandlungsgruppe wies ebenfalls eher native Gewebsanteile auf, zeigte aber häufiger leichte Oberflächenunregelmäßigkeiten. Tiefe Fissuren oder Erosionen waren in keiner Behandlungsgruppe präsent. Bezuglich der perifokalen Chondrozytendichte zeigte die rAAV-*lacZ* Kontrollgruppe im Vergleich eher reduzierte Zellzahlen. Die statistische Signifikanz im Parameter *Tidemark* wurde durch das singuläre Vorkommen einer verdoppelten *Tidemark* in der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe hervorgerufen.

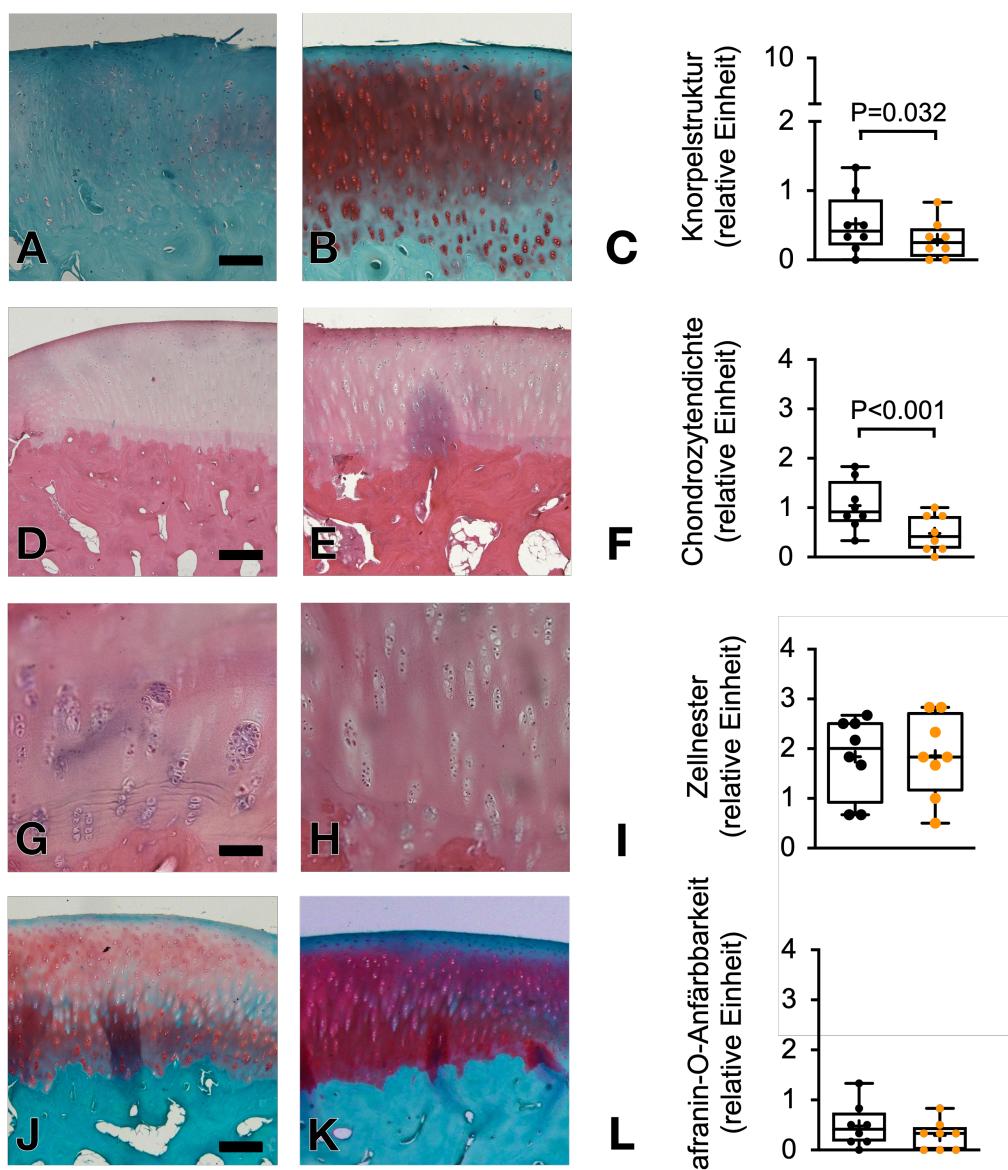
Tabelle 37: Semiquantitative histologische Analyse des perifokalen Gewebes (OARSI-Bewertungssystem).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-TGF- β 1	P-Wert
Lateral angrenzendes Gewebe			
Knorpelstruktur	$0,54 \pm 0,51$	$0,38 \pm 0,49$	0,178
Chondrozytendichte	$1,21 \pm 0,93$	$0,33 \pm 0,56$	<0,001
Zellklone	$2,29 \pm 1,46$	$1,83 \pm 1,31$	0,146
Safranin-O-Anfärbarkeit	$0,58 \pm 0,65$	$0,21 \pm 0,41$	0,017
<i>Tidemark</i>	0 ± 0	0 ± 0	0,999
Total	$4,63 \pm 2,50$	$2,75 \pm 1,54$	<0,001
Medial angrenzendes Gewebe			
Knorpelstruktur	$0,50 \pm 0,78$	$0,21 \pm 0,41$	0,048
Chondrozytendichte	$0,88 \pm 0,85$	$0,63 \pm 0,58$	0,183
Zellklone	$1,44 \pm 1,01$	$1,88 \pm 1,45$	0,104
Safranin-O-Anfärbarkeit	$0,38 \pm 0,58$	$0,38 \pm 0,49$	0,999
<i>Tidemark</i>	$0,33 \pm 0,82$	0 ± 0	0,038
Total	$3,46 \pm 1,96$	$3,08 \pm 2,08$	0,363

Medial und lateral kombiniert

Knorpelstruktur	$0,52 \pm 0,65$	$0,29 \pm 0,46$	0,032
Chondrozytendichte	$1,04 \pm 0,90$	$0,48 \pm 0,58$	<0,001
Zellklone	$1,83 \pm 1,33$	$1,85 \pm 1,37$	0,937
Safranin-O-Anfärbarkeit	$0,48 \pm 0,62$	$0,29 \pm 0,46$	0,067
<i>Tidemark</i>	$0,17 \pm 0,59$	0 ± 0	0,049
Total	$4,04 \pm 2,30$	$2,92 \pm 1,82$	0,003

Durch 0 Punkte sind physiologische osteochondrale Verhältnisse angezeigt, 25 Punkte repräsentieren die vollständige degenerative Destruktion der osteochondralen Einheit; MW \pm SD; OARSI: Osteoarthritis Research Society International; lacZ: β -Galactosidase-Gen; MW: Mittelwert; rAAV: rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; SD: Standardabweichung; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .



Ergebnisse

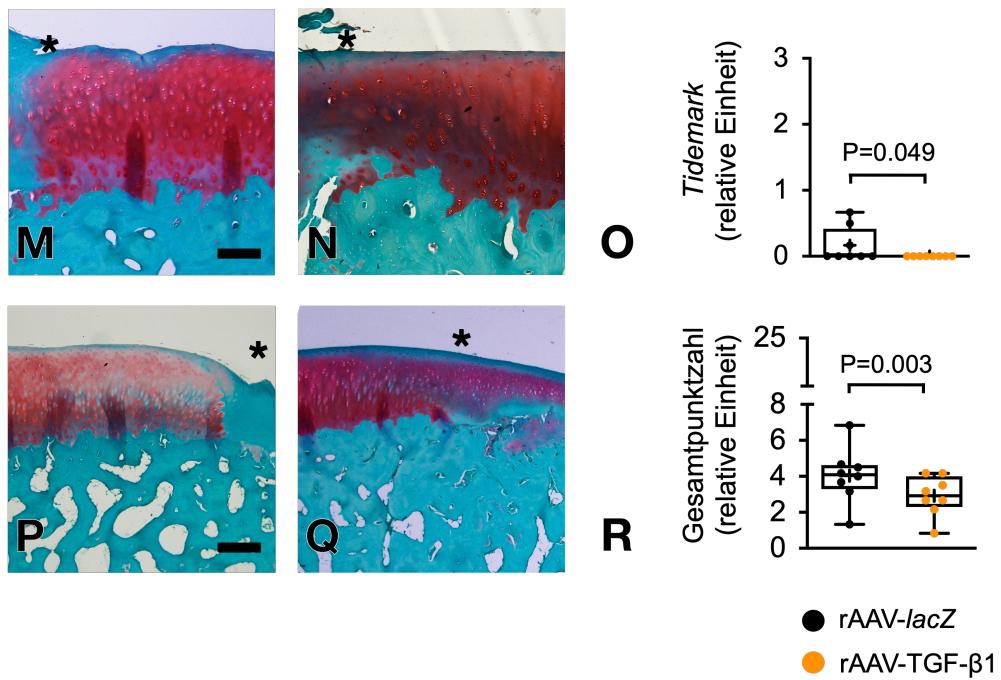


Abbildung 24: Semiquantitative histologische Analyse des perifokalen Gewebes. Übersichtsdarstellung der perifokalen osteochondralen Gewebe und Auswertung der Parameter des komplexen inversen OARSI-Bewertungssystems nach Little et al. zur Evaluation degenerativer arthrotischer Veränderungen; rAAV-lacZ-Kontrollgruppe (A, D, G, J, M, P); rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe (B, E, H, K, N, Q). Mit * markiert sind die Defektgrenzen im Bereich der Integrationszone. Maßstabsbalken in A, B, P, Q 400 μ m; D, E 200 μ m; G, H 75 μ m; J, K 100 μ m; M, N 150 μ m. OARSI: Osteoarthritis Research Society International; lacZ: β -Galactosidase-Gen; TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor β .

7. Diskussion

Weltweit leiden mehr als 500 Millionen Menschen an den klinischen Symptomen einer degenerativen Gelenkerkrankung und ihre Häufigkeit nimmt aufgrund der alternden Bevölkerung, von der etwa 80 % radiologische Anzeichen einer Arthrose aufweisen, weiter zu (MURRAY *et al.*, 2020). Daher besteht ein entscheidender Bedarf an Prävention, Früherkennung und Therapie von präarthrotischen Gelenkerkrankungen. In der vorliegenden Langzeitstudie wurde diesbezüglich eine molekulare Therapie mit klinisch relevanter Bildgebung und histologischer Analyse kombiniert, um die osteochondrale Defektheilung zu bewerten sowie (prä-)arthrotische Prozesse sukzessive zu identifizieren und zu behandeln. Dabei wurden die direkten Effekte der rAAV-vermittelten Überexpression des Wachstumsfaktors TGF- β 1 auf das Reparaturgewebe und auf das perifokale Gewebe im Großtiermodell untersucht. Die Daten zeigten erstens, dass durch prolongierte lokale Expression von TGF- β 1 mikrostrukturelle Aspekte des Defektgewebes signifikant verbessert wurden. Zweitens wurde dabei keine klinisch relevante Änderung der subchondralen knöchernen Situation induziert. Drittens liegt nach Gentransfer von TGF- β 1 eine signifikant erhöhte Zellularität in definierten knorpeligen Defektarealen auf. Viertens zeigen die Daten, dass eine signifikante Reduktion der defektassoziierten perifokalen Arthrose in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe vorliegt.

7.1. Studienziele

Ziel der vorliegenden translationalen Langzeit-Studie war es Effekte der TGF- β 1-Überexpression auf das osteochondrale Defektgewebe nach einem Jahr zu identifizieren und mögliche Einflüsse auf (prä-)arthrotische Prozesse im angrenzenden Gewebe zu evaluieren. Dies ist essentiell, da fokale osteochondrale Defekte im Kontinuum der Zeit eine perifokale Destruktion mit Affektion des gesamten Gelenks bedingen können (GUERMAZI *et al.*, 2017a; MANKIN, 1982; SCHINHAN *et al.*, 2020). Dabei ist das Großtiermodell mit Aachener Minischweinen für die durchgeführten Untersuchungen ein etabliertes Forschungsmodell (GOTTERBARM *et al.*, 2008). Die Transduktion durch rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren ermöglichte die prolongierte lokale Expression des Wachstumsfaktors. Somit schließt sich die vorliegende Studie an eine frühere Großtierstudie an, welche die frühen Auswirkungen der TGF- β 1-Überexpression auf die Defektreparatur nach vier Wochen untersuchte und eine signifikant verbesserte Defektorganisation nachwies (ASEN, 2018; ASEN *et al.*, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018).

Diskussion

Die Einordnung und Bewertung der Gewebsanalysen erfolgten anhand der 4 übergeordneten Hypothesen (siehe 3.). Dies erforderte insbesondere bildgebende, histologische und statistische Analysen der

- (1) *chondralen Defektheilung,*
- (2) *subchondralen (knöchernen) Defektheilung,*
- (3) *Zellularität im knorpeligen Reparaturgewebe,*
- (4) *perifokalen Gewebekonstitution.*

7.2. Effekte der rAAV-TGF- β 1-Behandlung auf das Reparaturgewebe

7.2.1. Nachhaltiger Einfluss auf mikrostrukturelle Defektparameter und die Defektarchitektur

Tiefergehende strukturelle Analysen bestätigten die 1. Hypothese wie unter 5.8. beschrieben und wiesen signifikante Alterationen zwischen den Behandlungsgruppen auf mikrostruktureller Ebene im Defektgewebe nach. So ergab die Untersuchung durch das inverse Bewertungssystem nach Sellers *et al.* (SELLERS *et al.*, 1997) eine signifikante Verbesserung der Defektfüllung, Färbeintensität und Gesamtpunktzahl nach rAAV-TGF- β 1-Behandlung (Tabelle 25). Auch eine weitere Auswertung mittels des Wakitani-Bewertungssystems bestätigte die Ergebnisse mit einer signifikanten Verbesserung der Knorpeldicke, der Zellmorphologie sowie der Gesamtpunktzahl (Tabelle 27). Diese Ergebnisse sind konkordant zu den Daten eines Minischwein-Modells mit einer kürzeren Nachuntersuchungszeit von 4 Wochen (ASEN, 2018; ASEN *et al.*, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Eine dort vorbeschriebene Tendenz zur verbesserten zellulären Defektmorphologie (CUCCHIARINI *et al.*, 2018) konnte in diesem Langzeitmodell im Wakitani-Bewertungssystem nachgewiesen werden. Dieser Effekt basiert vermutlich auf der primär chondrogenen Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen, welche durch die Überexpression von TGF- β 1 unterstützt wurde. So beschrieben bereits frühere Studien das induktive Potenzial von TGF- β 1 auf die chondogene Differenzierung und ordneten dieses als positiven Einflussfaktor für chondrale Reparaturmechanismen ein (DIAO *et al.*, 2009; FREYRIA, MALLEIN-GERIN, 2012; KIM *et al.*, 2014; PALMER *et al.*, 2005; PEI *et al.*, 2009). In Tiermodellen mit viraler Transduktion von TGF- β 1-cDNS konnte dieser direkte Effekt auf das Reparaturgewebe mit primär chondriger Differenzierung der Zellen bereits nachgewiesen werden (CUCCHIARINI *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2013). Verstärkend auf diesen Effekt wirkt eine Erweiterung der transduzierten Gene. So ist bei AAV-vermittelter Expression von Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) der Wachstumsfaktor TGF- β 1 zur Beschleunigung der Chondrogenese befähigt und reguliert dabei die Expression von Typ-X-Kollagen herunter

(PEI *et al.*, 2009). Neben TGF- β 1 sind in die Induktion und Regulation der chondrogenen Differenzierung noch multiple weitere Wachstumsfaktoren involviert, darunter das knochenmorphogenetische Protein-2 (BMP-2) (TOH *et al.*, 2005), FGF-2 (STEVENS *et al.*, 2004), IGF-I (LONGOBARDI *et al.*, 2006) und Knorpelmatrixproteine (PEI *et al.*, 2008). Jedoch basieren zelluläre Differenzierungen im Reparaturgewebe auf multiplen komplexen Zusammenhängen und unterliegen, neben dem Zusammenspiel verschiedener Zytokine, auch weiteren bedeutenden Einflussfaktoren. So steuert das (bio-) mechanische Milieu ebenfalls entscheidenden die Differenzierungsfähigkeiten von Stammzellen (DAVIS *et al.*, 2021).

Neben direkten zellulären Effekten ließen sich weitere indirekte Effekte auf das Defektgewebe nachweisen, welche partiell mit der primär chondrogenen Differenzierung der Stammzellen zusammenhängen. Entsprechend war die Safranin-O-Anfärbung der Defekte nach rAAV-TGF- β 1-Behandlung signifikant verstärkt, dies weist auf eine veränderte Proteoglykankomposition der Reparaturgewebe hin. Weiter wurde eine signifikante Verbesserung der Defektauffüllung im Sellers-Bewertungssystem sowie eine signifikant verbesserte Knorpeldicke im Wakitani-Bewertungssystem nach einem Jahr beobachtet. Durch manuelle Mikro-CT-Messungen und Ultrahochfeld-MRT-Auswertungen ließen sich die histologisch nachgewiesenen Unterschiede der Defektfüllung jedoch nicht weiter objektivieren (Tabelle 18, Tabelle 20, Tabelle 24). Dies beruht am ehesten auf der Auswertungsmethodik. Bei der histologischen Evaluation wird das Defektgewebe in direkte Relation zum angrenzenden nativen Gewebe bewertet. Die Mikro-computertomographische Auswertung misst jedoch die Höhe des Reparaturgewebes und vergleicht die Behandlungsgruppen in absoluten Zahlen miteinander, allerdings ohne einen direkten individuellen Vergleich mit dem angrenzenden Gewebe zu berücksichtigen. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass rAAV-TGF- β 1-behandelte Defekte eine signifikant bessere Defektfüllung in Relation zum angrenzenden Gewebe erreichen, allerdings insgesamt kein absolut messbares Knorpeldickenwachstum induziert wird, weder im Defektgewebe, noch im perifokalen Gewebe. Interessanterweise wurden im gesamten Bewertungssystem nach Fortier *et al.* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt. In Abgrenzung zu den vorausgegangenen Arbeiten von Asen und Cucchiarini *et al.* (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018) lässt sich das Bewertungssystem nach Fortier *et al.* somit eher zur Bewertung der frühen Defektheilungsphasen heranziehen. Langfristige und teils subtilere Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen deckte dieses Bewertungssystem in der vorliegenden Arbeit nicht auf.

7.2.2. TGF-β1-Expression im Reparaturgewebe

Grundlage des molekularen Therapieansatzes war die prolongierte Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF-β1 lokalisiert im Defektareal durch virale Transduktion. Eine langfristige suffiziente Transgenexpression ist mit rAAV-Transduktion möglich und bereits in diversen Gewebetypen erprobt. Venkatesan *et al.* untersuchten so zuvor *in situ* Effekte einer verlängerten TGF-β1-Überexpression auf Proliferation, Überleben und anabole Aktivität von transduzierten Chondrozyten nach bis zu 90 Tagen (VENKATESAN *et al.*, 2013). Herzmuskelzellen oder Skelettmuskelzellen hingegen erreichen sogar eine Transgenexpression von bis zu 5 Monaten (CLARK *et al.*, 1997; KUSANO *et al.*, 2007). In einer vorausgegangenen Studie waren 4 Wochen postoperativ nach intraläsionaler rAAV-TGF-β1-Behandlung noch erhöhte Proteinspiegel von TGF-β1 im Reparaturgewebe nachweisbar (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Pagnotto *et al.* berichteten zudem in einem ähnlichen Studienaufbau von einer bis zu 12 Wochen andauernden AAV-induzierten Proteinexpression *in situ* mit zeitabhängigem Rückgang (PAGNOTTO *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie war nach einem Jahr kein signifikanter Unterschied in den TGF-β1-Proteinkonzentrationen im Defektgewebe zwischen den Behandlungsgruppen zu beobachten (siehe Tabelle 31, Abbildung 20). Aufgrund der soliden Datenlage und entsprechenden methodischen Bestätigungen in den vorausgegangenen Studien kann allerdings eine langanhaltende Expression von TGF-β1 angenommen werden. Diese äußert sich im Langzeitmodell somit indirekt über veränderte Gewebeparameter, konnte aber nicht direkt immunhistochemisch objektiviert werden.

7.2.3. Kollagenzusammensetzung des Reparaturgewebes

Nach einem Jahr zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Typ-I oder Typ-II-Kollagenkomposition der Reparaturgewebe (siehe Tabelle 28, Tabelle 29, Abbildung 17 und Abbildung 18). Vereinzelte Typ-II-Kollagen-haltige und somit primär knorpelig imponierende residuale Gewebe im subchondralen Areal (siehe Abbildung 18) konnten identifiziert werden, diese traten am ehesten Rahmen der enchondralen Ossifikation auf (ERLEBACHER *et al.*, 1995). Diese vereinzelten residualen Gewebe präsentierten sich aber gleich häufig in beiden Behandlungsgruppen.

Eine vorangegangene Studie zeigte während der frühen Defektheilungsphase signifikant vermehrte Typ-X-Kollagenexpressionen im Reparaturgewebe nach rAAV-TGF-β1-Anwendung (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Dieser Effekt war nach einem Jahr im vorliegenden Tiermodell aber nicht nachzuweisen (siehe Tabelle 30, Abbildung 19). Eine prolongierte TGF-β1-Expression kann initial proliferative Chondrozyten zum hypertrophen Phänotyp ausreifen lassen und eine anschließende Transdifferenzierung zu Osteoblasten ist

potentiell möglich (AGHAJANIAN, MOHAN, 2018; ROACH, 1992). Die Überexpression von Typ-X-Kollagen weist dabei auf Chondrozyten in der hypertrophen Phase hin (GOLDRING *et al.*, 2006; LUVALLE *et al.*, 1992; VON DER MARK *et al.*, 1992). Folge einer Transdifferenzierung zum hypertrophen Phänotyp wäre dann die Begünstigung der knöchernen Konsolidierung, welche sich als überschießende Elevation der subchondralen Knochenplatte oder als Formation eines intraläsionalen Osteophyten präsentiert. Entsprechende Präformationen und auch zystische Formationen traten in der vorliegenden Studie allerdings gleichermaßen in beiden Behandlungsgruppen auf. Die vorliegenden Daten schließen aber nicht aus, dass während der Heilungsphasen über ein Jahr der hypertrophe Phänotyp transient präsent war. Ein potentieller Ansatz zur Vermeidung des hypertrophen Phänotyps während der Heilungsphasen ist die simultane Ko-Expression mit IGF-I, wie durch Morscheid *et al.* im *in vitro*-Modell beschrieben (MORSCHEID *et al.*, 2019).

Nicht nur die quantitative Kollagenkomposition gibt Aufschluss über die Qualität des Reparaturgewebes, sondern auch die Organisation der Kollagenfibrillen. So sind unter physiologischen Verhältnissen die Kollagenfibrillen streng organisiert, wie unter 2.2 erläutert. Shapiro *et al.* wiesen allerdings bereits darauf hin, dass im osteochondralen Reparaturgewebe nur eine geringe Organisation der Kollagenfibrillen zu finden ist und diese nur schlecht ins angrenzende Gewebe integriert sind (SHAPIRO *et al.*, 1993). Eine veränderte Kollagenorganisation könnte insbesondere langfristig zu erhöhter biomechanischer Beanspruchung des perifokalen Gewebes beitragen. Effekte der rAAV-Behandlung auf die Kollagenstruktur des Defektes sind in der hier vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

7.3. Effekte der rAAV-TGF- β 1-Behandlung auf den subchondralen

Knochen

Die Untersuchungen des subchondralen Knochens im Reparaturgewebe konnten die 2. Hypothese nicht bestätigen. Eine Alteration zwischen den Behandlungsgruppen wurde zwar isoliert detektiert, allerdings ist die Auswirkung auf die Gesamtstruktur des subchondralen Knochens eher als gering einzuordnen. Dabei implizieren die bedeutenden Rollen von TGF- β 1 und - β 3 bei der Frakturheilung zunächst, dass sich eine Therapie mit rAAV-TGF- β 1 auch auf die Restrukturierung der knöchernen Strukturen im Defektgewebe auswirken kann (CHO *et al.*, 2002). TGF- β 1 ist als Zytokin zudem essenziell für die Knochenhomöostase. Es wird bei der osteoklastischen Knochenresorption freigesetzt und lenkt die Migration von mesenchymalen Stromazellen zur Bildung neuen Knochens an den Resorptionsstellen (TANG *et al.*, 2009). Zhen *et al.* beschrieben, dass hohe Konzentrationen von aktivem TGF- β 1 die Clusterbildung von mesenchymalen Stromazellen im subchondralen Knochenmark

Diskussion

und die Bildung von Knochenmarkosteoidinseln induziert (ZHEN, CAO, 2014). Die vorliegende Studie zeigte vorerst im Niveau der subchondralen Knochenplatte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Mikro-CT- und Ultrahochfeld-MRT-Untersuchungen (siehe Tabelle 21, Tabelle 24, Abbildung 14 und Abbildung 15). Auf histologischer Ebene erbrachte die Untersuchung mittels Sellers-Bewertungssystem ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Neubildung des subchondralen Knochens bei der Behandlung mit rAAV-TGF- β 1 im Vergleich zu rAAV-lacZ. Die zunächst in der Frühphase von Asen und Cucchiarini *et al.* beobachtete signifikant verbesserte subchondrale Defektorganisation bestätigte sich in dieser Studie, respektive im Langzeitmodell, somit nicht oder relativierte sich über die Zeit (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Im Niveau der subartikulären Spongiosa allerdings zeigte sich eine Alteration zwischen den Behandlungsgruppen. Für die rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe detektierte die Mikro-CT-Untersuchung einen signifikant geminderten Trabekelabstand ($P = 0,041$, Tabelle 23, Abbildung 11). Bezuglich anderer trabekulärer Parameter ließen sich nur Tendenzen, aber keine Signifikanzen feststellen, so für die Trabekelanzahl und den Knochenvolumenanteil (siehe Tabelle 23). Eine sehr ähnliche knöcherne Konstellation beschrieb Gao nach Anwendung von Mikrofrakturierungen in Verbindung mit dem Einsatz von Knochenmarkaspiraten in einem Minischweinmodell (GAO, 2017). Im Gegensatz zum hier vorliegenden Studienkonzept untersuchte Gao chondrale Defekte und bereits 4 Wochen postoperativ. Gao interpretierte die veränderten subchondralen Verhältnisse durch die osteogen wirkenden autologen Knochenmarkaspirate im Kontext einer Hemmung der Osteoklasten (GAO, 2017; GIANAKOS *et al.*, 2016). Ähnliche Auswirkungen lassen sich in der vorliegenden Studie durch TGF- β 1 beobachten. Die pleiotropen Effekte des Wachstumsfaktors wirken auf zellulärer Ebene allerdings komplex. So hemmt TGF- β 1 die Osteoklastogenese nur, wenn es in frühen Stadien der Differenzierung zugegeben wird (JANN *et al.*, 2020). Weiter begünstigt TGF- β 1 durch Smad3-Stimulation die RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*)-Expression in humanen Osteoklasten-Vorläuferzellen, während es *via* Smad1 diese wiederum unterdrücken kann (LEE *et al.*, 2019). Der geminderte Trabekelabstand kann als morphologische Reaktion der subartikulären Spongiosa auf die geänderten biomechanischen Verhältnisse des überliegenden Reparaturgewebes postinterventionell gewertet werden. Dieser Mechanismus und die möglichen direkten Effekte des Wachstumsfaktors auf das subartikuläre Knochengewebe können Auswirkung auf die trabekulären Parameter und Knochenvolumenanteile haben. Zwischen den Behandlungsgruppen divergierte somit in dieser Langzeitstudie lediglich der Trabekelabstand signifikant, dessen Relevanz für die komplexe Gesamtstruktur des subchondralen Knochens allerdings eher gering einzuschätzen ist.

7.4. Effekte der rAAV-TGF- β 1-Behandlung auf die Defektzellularität

Die vorliegenden Daten bestätigen die 3. Hypothese. TGF- β 1 moduliert langfristig die zellulären Eigenschaften im Defektgewebe. So zeigten die Defekte nach rAAV-TGF- β 1-Anwendung signifikant erhöhte Zellzahlen in den intermediären und inferioren Zonen. Diese Befunde stehen im Einklang mit Beschreibungen aus der vorausgegangenen Studie, welche erhöhte Zellzahlen im Defektgewebe nachwies, die vermutlich aus dem subchondralen Knochenmarkkompartiment über den SDF-1/CXCR4-Signalweg migrierten (ASEN *et al.*, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Potentiellen Einfluss auf die Defektzellularität hat z.B. die unmittelbare proliferative Wirkung von TGF- β 1 auf Knochenmarksstammzellen über den Smad3-Signalweg mittels schnellerer nukleärer Translokation von β -Catenin (JIAN *et al.*, 2006). Weiter sind proliferative Effekte von TGF- β 1 auf synoviale mesenchymale Stromazellen sowie Chondrozyten beschrieben (KIM *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018), jeweils ohne dabei eine Zellseneszenz herbeizuführen (WALENDÄ *et al.*, 2013). Auch verhindert der Wachstumsfaktor unter bestimmten Umständen die Apoptose (ZHANG *et al.*, 2017) und wirkt direkt chemotaktisch auf die Zellmigration (BAEK *et al.*, 2011).

Im vorliegenden Modell sind die Langzeiteffekte auf die Zellularität im Reparaturgewebe somit am ehesten multifaktoriell. Interessanterweise hat auch die Zellmorphologie, gemessen durch das Wakitani-Bewertungssystem, signifikant profitiert ($P < 0,001$, Tabelle 27). Es scheint somit auch zu einer verbesserten Anordnung, Differenzierung und Restrukturierung der proliferierten Zellen im Defektgewebe gekommen zu sein. Dies ist konkordant zu vorherigen Studien, die ebenfalls von positiven Effekten auf u.a. die Zellanordnung berichteten (GUGJOO *et al.*, 2017). Weiter besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Gesamtpunktzahl des histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* mit der Defektzellularität. Es zeigte sich, dass höhere Zellzahlen im Reparaturgewebe mit einer Verbesserung der feingeweblich untersuchten semiquantitativen Parameter im Sellers-Bewertungssystem einhergehen (siehe Abbildung 22). Potentiell erscheint eine erhöhte Zellularität des knorpeligen Reparaturgewebes somit vorteilhaft auf die Mikrostruktur des Defektgewebes zu wirken, da z.B. die Anzahl der Zellen, welche an Umbau- und Reparaturprozessen partizipieren können, erhöht ist. Auch bei osteochondralen Transplantationen korreliert die Zellularität im Knorpelgewebe direkt mit der Knorpelqualität hinsichtlich histologischer struktureller und biomechanischer Merkmale (PALLANTE *et al.*, 2012).

7.5. Effekte der rAAV-TGF- β 1-Behandlung auf perifokale degenerative Prozesse

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Studie mit potentiell hoher translationaler Tragweite ist die Bestätigung der 4. Hypothese, da osteochondrale Defekte über perifokale destruktive Gelenkprozesse zu einer Arthrose führen können (GUERMAZI *et al.*, 2017a; SCHINHAN *et al.*, 2020). Dabei unterliegt die Schwere der perifokalen Veränderungen auch der initialen tangentialen Defektgröße und weniger der Tiefenausdehnung der (osteo-)chondralen Defekte (GUERMAZI *et al.*, 2017a; SCHINHAN *et al.*, 2012). Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass eine rAAV-TGF- β 1-Behandlung von osteochondralen Defekten im Tiermodell auch nachhaltigen Einfluss auf das perifokale Gewebe hat. Histologisch führte die TGF- β 1-Expression zu einer messbaren Abschwächung der knorpeldestruktiven Prozesse gemessen im komplexen OARSI-Bewertungssystem (LITTLE *et al.*, 2010). Dort ließen sich nach einem Jahr verbesserte Knorpelstrukturen im angrenzenden Gewebe nachweisen, welche potentiell auf veränderten biomechanischen Konditionen im Reparaturgewebe basieren. Ebenfalls manifestierte sich eine signifikant glattere Oberflächenstruktur des perifokalen Knorpels in der rAAV-TGF- β 1-Behandlungsgruppe. Interessanterweise zeigte sich eine singulär in der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe aufgetretene verdoppelte *Tidemark*, welche einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen im Parameter „*Tidemark*“ hervorrief. Ergänzend ist zu erwähnen, dass insgesamt in beiden Behandlungsgruppen kaum schwerwiegendere Knorpeldestruktionen oder Erosionen auftraten. Dies bestätigten auch die Mikro-CT- und Ultrahochfeld-MRT-Untersuchungen. Weitere signifikante Verbesserungen des perifokalen Gewebes nach TGF- β 1-Expression zeigten sich ebenfalls in einer geringeren Chondrozytentichte, was voraussichtlich auf eine biomechanisch optimierte Belastungsverteilung durch eine verbesserte Defektarchitektur, welche z.B. Scherkräfte besser kompensiert, zurückzuführen ist. So postulierten SHAPIRO *et al.*, dass Scherkräfte in Form von Mikrobewegungen auf das schlechter organisierte Reparaturgewebe einwirken und degenerative Prozesse auslösen können (SHAPIRO *et al.*, 1993).

Wegweisend für die Untersuchung der langfristigen Effekte nach rAAV-TGF- β 1-Behandlung auf die perifokalen Verhältnisse war der bereits in klinischer Erprobung befindliche Einsatz von TGF- β 1 zur Arthrosebehandlung. Basierend auf einer Überexpression durch intraartikuläre Injektion von retroviral modifizierten und bestrahlten juvenilen allogenen humanen Chondrozyten ist die Anwendung von TissueGene-C (INVOSSA™) unserem Versuchsaufbau sehr ähnlich und führt ebenfalls zu einer Überexpression von TGF- β 1-cDNS (LEE *et al.*, 2015). Hauptunterschiede zur untersuchten Anwendung in der hier vorliegenden Arbeit sind die Herkunft der Zellen und die Anwendungsmodalität. So divergiert die Methodik

hinsichtlich der Transduktion, welche im vorliegenden Modell *in vivo* an den mesenchymalen Stromazellen aus dem aufsteigenden Knochenmarksblut erfolgte. Währenddessen ist TissueGene-C eine Suspension von zuvor transduzierten und bestrahlten allogenen juvenilen humanen Chondrozyten, die nach intraartikulärer Injektion in der Synovialflüssigkeit diffundiert. Die Anwendung von TissueGene-C bei Arthrose wird als potentiell krankheitsmodifizierende Therapie beschrieben, zeigte aber in einer MRT-Analyse nach einem Jahr bezüglich des Fortschreitens des Knorpelschadens im Vergleich zur Placebogruppe keine signifikanten Unterschiede (GUERMAZI *et al.*, 2017b). Eine klinische Phase-I-Studie konnte auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Knorpeldicke feststellen (KIM *et al.*, 2018). Die Effekte auf subjektive Parameter wie Symptomatik, Funktion und Aktivität postulierten Lee *et al.* anhand des Fragebogens des *International Knee Documentation Committee* als signifikant verbessert nach 24 Wochen im Vergleich zu der Placebogruppe (LEE *et al.*, 2015). Nachdem INVOSSA™ die Lizenz 2019 auf dem koreanischen Markt aufgrund von fehlerhaften Produktinformationen verloren hatte, genehmigte die *Food and Drug Administration* (FDA) der USA im April 2020 die Wiederaufnahme einer Phase-III-Studie. Diese aktuell laufende Phase-III-Studie untersucht die Wirkung einer singulären intraartikulären TissueGene-C-Applikation bei 510 Patienten mit einer Nachbeobachtungszeit von 2 Jahren.

Die genaue Rolle von TGF- β bei der Pathogenese sowie der Verhinderung von Gelenksdegenerationen bis hin zur Arthrose ist derzeit nicht abschließend geklärt (VAN DER KRAAN, 2022). Mehrere Studien untersuchten die TGF- β -Zytokinspiegel bei fortgeschrittener Arthrose (FINNSON, 2012). Dabei alterieren die Zytokinspiegel im Vergleich zu gesundem Knorpel teils inkongruent und zeigen eine Abnahme (VERDIER *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007) oder Zunahme der Expressionsmuster (POMBO-SUAREZ *et al.*, 2009). Hinlänglich bekannt ist jedoch, dass ein vollständiger Verlust von TGF- β -Isoformen in Tiermodellen einen arthrotischen Knorpelphänotyp auslöst, beschleunigt zum Tod führt und ein inflammatorisches Niveau induziert (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 1993; SHULL *et al.*, 1992). Wahrscheinlich hängt die pathophysiologische Bedeutung und Rolle von TGF- β bei der Entstehung bzw. dem Einfluss auf den Verlauf der Arthrose maßgeblich vom Phänotyp der Arthrose ab. Es scheint möglich, dass in den frühen Stadien der Arthrose die TGF- β -Spiegel im Gewebe ansteigen, um den direkt katabolen Effekten von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) entgegenzuwirken (VAN BEUNINGEN *et al.*, 1993, 1994). Bei fortgeschrittener Erkrankung sind anabole Wachstumsfaktoren wie TGF- β supprimiert und es entsteht eine Dysbalance zugunsten kataboler Stimuli in der extrazellulären Matrix (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2007). Insbesondere IL-1 hat das Potential dann regulativ die Expression von Metalloproteinasen im

Diskussion

Knorpel zu erhöhen sowie den Proteoglykan- und Kollagenabbau zu fördern (DINGLE, 1981; PUJOL, LOYAU, 1987). Im Gegensatz zum hier vorliegenden fokalen Defektmodell bezeichnet die Arthrose allerdings die fortgeschrittene inflammatorische Affektion von mehreren oder allen Gelenkstrukturen und ist eine multifaktorielle Erkrankung. Die therapeutische Anwendung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der großflächigen Gelenksdestruktion muss dann die gesamte betroffene Gelenkfläche erreichen können. Die hier vorliegenden Daten reduzieren sich lokal auf das Reparaturgewebe eines fokalen osteochondralen Defektes sowie das direkt angrenzende, perifokale Gewebe. Eine lokoregionale Therapie mit Wachstumsfaktoren bei isolierten osteochondralen Defekten mittels viraler Transduktion erscheint im Gegensatz zur intraartikulären Hochdosisapplikation nebenwirkungsärmer, was Begleitreaktionen wie beispielsweise Fibrose der Synovialmembran und Osteophytenbildung betrifft (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2007). Insgesamt ist der hier vorliegende molekulare Therapieansatz einzuordnen als frühe invasive Präventionsoption zur Verhinderung oder Abschwächung der drohenden perifokalen Gelenksdestruktion bei osteochondralen Defekten (MADRY, 2022).

7.6. Limitationen und Stärken

In der vorliegenden Großtierstudie erzielten die beiden Behandlungsgruppen eine hohe intrinsische Vergleichbarkeit, da jedes Individuum ($n = 8$) Teil der Kontrollgruppe sowie der Therapiegruppe war. Eine paarweise Zuordnung der Defekte ist nicht durchgeführt worden, um Selektionsverzerrungen zu vermeiden. Es erfolgte weiter eine umfassende Verblindung der Operateure sowie der Auswertenden. Dies vermeidet eine Verzerrung durch Behandler oder Auswertende. Der gewählte Zeitraum von einem Jahr ermöglichte die Evaluation von osteochondralen Heilungsprozessen, welche nach der Frühphase der Defektheilung auftraten oder sich nach dieser fortsetzten. Durch die verlängerte Untersuchungsperiode wurde die Bewertung von degenerativen Veränderungen ermöglicht, da diese erst im Kontinuum der biomechanischen Belastung auftreten und somit nach früheren postinterventionellen Zeitpunkten kaum präsent sind. Letztlich ist translationale Forschung eine Verbindung der laborexperimentellen Entwicklungen zur klinischen Anwendung. Tiermodelle nehmen dabei eine Schlüsselfunktion ein. Der direkte Transfer von Studienergebnissen in das humane Modell ist dabei nicht möglich oder zielführend. So nähert sich das hier vorliegende Tiermodell an humane biomechanische Bedingungen an, inkludiert aber u.a. nicht das postoperative Belastungs- und Nachsorgeprozedere. Außerdem ist in dieser Studie ein fundamentales Kriterium der Knorpeldefekte, wie die postoperative Schmerzintensität und langfristige Schmerzentwicklung, nicht berücksichtigt. Beim hier verwendeten Therapiemodell als Behandlungsverfahren bei posttraumatischen Gelenkknorpeldefekten ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass ein einzeitiger operativer

Eingriff stattgefunden hat. Die Defektentstehung fiel somit zeitlich direkt mit der chirurgischen Applikation von rAAV-TGF- β 1 zusammen. Die klinische Anwendung kann sich deutlich vom hier konstruierten Modell unterscheiden. Zum Beispiel sind osteochondrale Defekte mit traumatischer Genese oftmals bereits einer degenerativen Affektion und Erosion des Umgebungsgewebes ausgesetzt und Umbauprozesse können bereits stattgefunden haben oder deutlich fortgeschritten sein. Besonders die Defektränder, welche das Defektgewebe initial stabilisieren, können somit bei einer potentiellen klinischen Anwendung bereits in ihrer Struktur verändert sein.

7.7. Zusammenfassung

Gentherapie erschließt ein bedeutendes neues Feld zur Therapieoptimierung bei fortgeschrittener Gonarthrose oder bei fokalen Knorpeldefekten. Entsprechende Anwendungen sind Gegenstand aktueller experimenteller und klinischer Forschung (ASEN *et al.*, 2018; MAIHÖFER *et al.*, 2021; ZHEN, CAO, 2014). Hierzu gehören TissueGene-C-Injektionen bei Arthrose, nichtvirale und virale Gentransfermethoden wie beispielsweise die rAAV-vermittelte Überexpression bei fokalen Knorpeldefekten. Vorteile des rAAV-vermittelten Gentransfers sind die Vermeidung von Fremdmaterial und die klinisch erwiesene Anwendungssicherheit. Als pleiotroper Wachstumsfaktor imponiert TGF- β 1 als ein herausragendes Zytokin, welches positive Einflüsse auf unterschiedliche pathophysiologische Prozesse in Gelenkserkrankungen hat. Dies zeigt sich unter anderem in Effekten auf die terminale Chondrozytendifferenzierung (GRAFE *et al.*, 2018), der Fähigkeit zur chondrogenen Induktion von aufsteigenden Knochenmarksstammzellen (WORSTER *et al.*, 2000), der Steigerung der Chondrozytenproliferation (GRIMAUD *et al.*, 2002), der Modulation entzündlicher Prozesse (VAN DER KRAAN, 2018) und der Fähigkeit zur Beeinflussung der extrazellulären Matrix (ZHU *et al.*, 2015).

Die vorausgegangenen Studien von Asen und Cucchiarini *et al.* identifizierten bereits zuvor einen Mechanismus, der TGF- β 1 als Schlüsselmodulator in der Frühphase der Defektheilung beschreibt, indem er die Anzahl an Vorläuferzellen im Defektgewebe erhöht sowie die Zelldifferenzierung und Matrixproduktion verstärkt (ASEN, 2018; CUCCHIARINI *et al.*, 2018). Die nun im Langzeitmodell erhobenen Daten bestätigen diese positiven Effekte auf das Reparaturgewebe. So profitierte die feingeweblich untersuchte Defektstruktur signifikant von der rAAV-TGF- β 1-Anwendung. Die gesteigerte Defektzellularität unterstützte dabei Umbau- und Reparaturprozesse und korrelierte entsprechend positiv mit der histologischen Defektbewertung. Auch hatte das modulierte Reparaturgewebe signifikante langfristige Auswirkungen auf die perifokalen degenerativen Prozesse, welche durch die verbesserte biomechanische Komposition des Defektgewebes reduziert werden konnten. Wichtige

Diskussion

klinische Aspekte wie Schmerzlinderung, Funktion und Lebensqualität sind dabei im Tierversuch nicht genauer zu beleuchten. Um allerdings zukünftig eine probate klinische Anwendung mit dieser Methodik zu bahnen sind zunächst weitere *in vitro- und in vivo*-Studien nötig. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Sicherheit der viralen Vektoren und die Effekte durch die Zytokin-Überexpression gerichtet werden. In der vorliegenden Studie sind über ein Jahr durch die prolongierte Überexpression von TGF- β 1 keine Nebeneffekte bzw. unerwünschte Wirkungen außerhalb des Defektbereichs aufgetreten.

7.8. Ausblick und klinische Perspektiven

Die Sicherheit und langfristigen Effekte bei Anwendungen von viralen und nicht-viralen Gentransfermethoden gerieten zuletzt im Rahmen der SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*)-Pandemie in den Fokus der Öffentlichkeit. So kamen neben Ribonukleinsäuren auch virale Vektoren (ChAdOx1 und Ad26.COV2.S) zur Anwendung, um eine Antigenexpression zu erzielen (SADOFF *et al.*, 2021; VOYSEY *et al.*, 2021). Langzeitstudien zur Evaluation der Anwendungssicherheit der oben genannten Gentransfermethoden werden in Zukunft somit retrospektiv zu verwirklichen sein. Vorbeschriebene unerwünschte Wirkungen einer TGF- β 1-Überexpression auf die Formation von osteophytären Anbauten (BAKKER *et al.*, 2001; SCHARSTUHL *et al.*, 2002) zeigten sich im vorliegenden Langzeitmodell mit den Aachener Minischweinen nicht.

Die hier erhobenen translationalen Daten implizieren, dass der virale Gentransfer des Wachstumsfaktors TGF- β 1 die osteochondrale Defektreparatur verbessert und nachhaltig perifokale degenerative Prozesse abschwächt. In Kombination und sinnvoller Abstimmung mit bereits etablierten Therapieoptionen erscheint eine klinische Anwendung des hier vorgestellten *in vivo*-Gentransfers zur Optimierung der osteochondralen Defektreparatur realisierbar. Um die Wirksamkeit der verwendeten Anwendung weiter zu erhöhen und den klinischen Nutzen zu vervielfachen bietet sich die simultane Ko-Expression mehrerer synergistischer (osteo-) chondromodulativer Zytokine an (TRIPPEL *et al.*, 2004). Laborexperimentell zeigte sich dieser Ansatz aussichtsreich zur weiteren Optimierung der Defektheilung, denn die simultane rAAV-vermittelte Ko-Expression von TGF- β 1 mit IGF-I hat bereits nachweislich positive Auswirkungen auf die proliferativen, anabolen und chondrogenen Aktivitäten von humanen mesenchymalen Stromazellen (MORSCHEID *et al.*, 2019). Jedoch erhöht die Ko-Expression nicht nur das Modulationspotenzial auf die Defektheilung, sondern könnte auch dosisabhängig das Risiko für unerwünschte Wirkungen steigern. Die Anwendung eines einzelnen Wachstumsfaktors war in der vorliegenden Studie notwendig, um dessen Auswirkungen und Effekte ohne Interferenzen präzise zu analysieren.

Es ist vorstellbar, dass in Zukunft ein Genvektor mit humaner TGF- β -cDNS unter Kontrolle eines regulierbaren Promoters mit *Enhancer*-Funktion eingesetzt werden kann. Geleitet von einer individualisierten Diagnostik und Verlaufskontrollen mit z.B. *in vivo*-MRT kann das therapeutische Transgen bei Bedarf räumlich und zeitlich aktiviert werden. So könnte potentiell die Expression des Transgens (wieder) hochreguliert werden, wenn eine unzureichende Defektfüllung oder insuffiziente Integration diagnostiziert wurde. Optional würde dann die Stimulation von Gewebewachstum oder die Zelldifferenzierung fortgesetzt werden. Auch könnte es in ähnlicher Weise ausgeschaltet werden, wenn bereits eine ausreichende Reparatur erreicht wurde (AU *et al.*, 2021). Eine solche kontrollierte Genaktivierung durch Antizytokine oder synthetische Transkriptionsfaktoren wurden bereits *in vitro* untersucht und stellen somit plausibel zukünftige Modelle für *ex vivo*, direkt-virale oder gerüstbasierte *in vivo*-Therapieansätze dar (CUCCHIARINI *et al.*, 2018; CUCCHIARINI, MADRY, 2019; MAIHÖFER *et al.*, 2021; MOUTOS *et al.*, 2016; PEREZ-PINERA *et al.*, 2013; VENKATESAN *et al.*, 2013; ZYLBERBERG *et al.*, 2017).

In Zusammenschau legen die erhobenen Daten der vorliegenden translationalen Großtierstudie einen Mechanismus nahe, der potentiell langfristig die Defektreparatur *in vivo* verbessern und simultan die perifokale Arthrose verringern kann. Auf dieser Basis ergeben sich vielversprechende zukünftige Therapieansätze zur therapeutischen Modifikation der humanen osteochondralen Defektreparatur.

8. Literaturverzeichnis

1. Aghajanian P, Mohan S (2018) The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Research* 6:1-9
2. Andrews HJ, Edwards TA, Cawston TE, Hazleman BL (1989) Transforming growth factor- β causes partial inhibition of interleukin 1-stimulated cartilage degradation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 162:144-150
3. Angele P, Madry H, Kon E (2016) Early OA: point of no return or a chance for regenerative approaches. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:1741-1742
4. Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, et al. (2000) Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector. *J Rheumatol* 27:979-982
5. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ (2019) Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev* 146:289-305
6. Asen AK (2018) Mechanismen der frühen Chondrogenese im Knorpeldefekt in vivo – Untersuchungen des Einflusses von TGF- β 1 im translationalen Großtiermodell durch solide Trägermaterialien und Überexpression mittels rekombinanter adeno-assozierter viraler Vektoren, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
7. Asen AK, Goebel L, Rey-Rico A, Sohier J, Zurakowski D, et al. (2018) Sustained spatiotemporal release of TGF- β 1 confers enhanced very early chondrogenic differentiation during osteochondral repair in specific topographic patterns. *FASEB J*:5298-5311
8. Assemacher AT, Pareek A, Reardon PJ, Macalena JA, Stuart MJ, et al. (2016) Long-term Outcomes After Osteochondral Allograft: A Systematic Review at Long-term Follow-up of 12.3 Years. *Arthroscopy* 32:2160-2168
9. Au MT, Shi J, Fan Y, Ni J, Wen C, et al. (2021) Nerve Growth Factor-Targeted Molecular Theranostics Based on Molybdenum Disulfide Nanosheet-Coated Gold Nanorods (MoS₂-AuNR) for Osteoarthritis Pain. *ACS Nano* 15:11711–11723
10. Baek SJ, Kang SK, Ra JC (2011) In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med* 43:596-603
11. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, et al. (2001) Overexpression of active TGF- β 1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 9:128-136
12. Birmingham TB, Moyer R, Leitch K, Chesworth B, Bryant D, et al. (2017) Changes in biomechanical risk factors for knee osteoarthritis and their association with 5-year clinically important improvement after limb realignment surgery. *Osteoarthritis Cartilage* 25:1999-2006
13. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB (2007) TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15:597-604

14. Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Graninger WB, Luyten FP, *et al.* (2002) Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 10:394-401
15. Bora FW, Jr., Miller G (1987) Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin* 3:325-336
16. Bothe F, Deubel AK, Hesse E, Lotz B, Groll J, *et al.* (2019) Treatment of Focal Cartilage Defects in Minipigs with Zonal Chondrocyte/Mesenchymal Progenitor Cell Constructs. *Int J Mol Sci* 17:79-90
17. Broom ND, Poole CA (1982) A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat* 135:65-82
18. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47:487-504
19. Burks RT, Greis PE, Arnoczky SP, Scher C (2006) The use of a single osteochondral autograft plug in the treatment of a large osteochondral lesion in the femoral condyle: an experimental study in sheep. *Am J Sports Med* 34:247-255
20. Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res* 367(S):12-16
21. Chen X, Guo J, Yuan Y, Sun Z, Chen B, *et al.* (2017) Cyclic compression stimulates osteoblast differentiation via activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Mol Med Rep* 15:2890-2896
22. Cho J, Kim T, Park Y, Shin J, Kang S, *et al.* (2016) Invossa™(Tissuegene-C) in patients with osteoarthritis: A phase III trial. *Osteoarthritis Cartilage* 24:63-534
23. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-520
24. Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y (2004) One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 12:834-842
25. Clark KR, Sferra TJ, Johnson PR (1997) Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther* 8:659-669
26. Cucchiari M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7:1495-1509
27. Cucchiari M, Madry H (2010) Genetic modification of mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Biomed Mater Eng* 20:135-143
28. Cucchiari M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H (2015) New trends in articular cartilage repair. *J Exp Orthop* 2:1-8
29. Cucchiari M, Asen AK, Goebel L, Venkatesan JK, Schmitt G, *et al.* (2018) Effects of TGF-β Overexpression via rAAV Gene Transfer on the Early Repair Processes in an Osteochondral Defect Model in Minipigs. *Am J Sports Med* 46:1987-1996

Literaturverzeichnis

30. Cuccharini M, Madry H (2019) Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nat Rev Rheumatol* 15:18-29
31. Davis S, Roldo M, Blunn G, Tozzi G, Roncada T (2021) Influence of the Mechanical Environment on the Regeneration of Osteochondral Defects. *Front Bioeng Biotechnol* 9:1-23
32. Diao H, Wang J, Shen C, Xia S, Guo T, et al. (2009) Improved cartilage regeneration utilizing mesenchymal stem cells in TGF- β 1 gene-activated scaffolds. *Tissue Eng Part A* 15:2687-2698
33. Dingle JT (1981) Catabolin--a cartilage catabolic factor from synovium. *Clin Orthop Relat Res* 156:219-231
34. Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A (2002) Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol* 21:449-459
35. Eckstein F, Wirth W, Guermazi A, Maschek S, Aydemir A (2015) Brief report: intraarticular sprifermin not only increases cartilage thickness, but also reduces cartilage loss: location-independent post hoc analysis using magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheumatol* 67:2916-2922
36. Einhorn TA (1998) The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin Orthop Relat Res* 355:7-21
37. Erggelet C, Vavken P (2016) Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint - A golden standard? *J Clin Orthop Trauma* 7:145-152
38. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378
39. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M (1989) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4:3-11
40. Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in tgf- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693
41. Feucht MJ, Izadpanah K, Vogt S, Mehl J (2021) Stellenwert der chirurgischen Knorpeltherapie bei Früharthrose. *Orthopäde* 5:356-365
42. Finnson K (2012) TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience* 4:251-268
43. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ (2002) Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 84:276-288
44. Freyria AM, Mallein-Gerin F (2012) Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 43:259-265
45. Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, et al. (2006) Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med* 34:1824-1831
46. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, et al. (2014a) Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector

- gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 5:1-12
47. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, et al. (2014b) Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor- β via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 25:1050-1060
48. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Zawada AM, Schmitt G, et al. (2016) Effects of rAAV-mediated FGF-2 gene transfer and overexpression upon the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates. *J Exp Orthop* 3:1-10
49. Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Mochizuki Y, Sumen Y, et al. (1999) Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg* 119:139-145
50. Fuller JA, Ghadially FN (1972) Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 86:193-205
51. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62:79-89
52. Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H (2009) Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1198-1204
53. Gao L (2017) Präzise mikrostrukturelle Analyse der frühen osteochondralen Reparatur im Kontext markstimulierender Verfahren in translationalen Tiermodellen, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
54. Gianakos A, Ni A, Zambrana L, Kennedy JG, Lane JM (2016) Bone Marrow Aspirate Concentrate in Animal Long Bone Healing: An Analysis of Basic Science Evidence. *J Orthop Trauma* 30:1-9
55. Goebel L, Orth P, Muller A, Zurakowski D, Bucker A, et al. (2012) Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T--comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1046-1055
56. Goebel L, Zurakowski D, Muller A, Pape D, Cucchiari M, et al. (2014) 2D and 3D MOCART scoring systems assessed by 9.4 T high-field MRI correlate with elementary and complex histological scoring systems in a translational model of osteochondral repair. *Osteoarthritis Cartilage* 22:1386-1395
57. Goldring MB (2000) Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2:459-465
58. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33-44
59. Goldring MB (2012) Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS J* 8:7-9
60. Goldring SR, Goldring MB (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 12:632-644

Literaturverzeichnis

61. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, et al. (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18:434-447
62. Gordon KJ, Blobel GC (2008) Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:197-228
63. Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M (2008) The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* 42:71-82
64. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, et al. (2018) TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10:a022202
65. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7:208-218
66. Grimaud E, Heymann D, Redini F (2002) Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF- β in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:241-257
67. Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliusis V, et al. (2005) A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy* 21:1066-1075
68. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Niu J, Quinn EK, et al. (2017a) Brief Report: Partial- and Full-Thickness Focal Cartilage Defects Contribute Equally to Development of New Cartilage Damage in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol* 69:560-564
69. Guermazi A, Kalsi G, Niu J, Crema MD, Copeland RO, et al. (2017b) Structural effects of intra-articular TGF- β 1 in moderate to advanced knee osteoarthritis: MRI-based assessment in a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 18 (461):1-7
70. Gugjoo MB, Amarpal, Abdelbaset-Ismail A, Aithal HP, Kinjavdekar P, et al. (2017) Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- β 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Biomed Pharmacother* 93:1165-1174
71. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ (1996) The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 81:535-545
72. Hinckel BB, Thomas D, Vellios EE, Hancock KJ, Calcei JG, et al. (2021) Algorithm for Treatment of Focal Cartilage Defects of the Knee: Classic and New Procedures. *Cartilage* 13:473-495
73. Hu Y, Chen X, Wang S, Jing Y, Su J (2021) Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res* 9:1-13
74. Huang F, Chen YG (2012) Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci* 2:1-10
75. Huang FS, Simonian PT, Norman AG, Clark JM (2004) Effects of small incongruities in a sheep model of osteochondral autografting. *Am J Sports Med* 32:1842-1848

76. Huber M, Trattnig S, Lintner F (2000) Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35:573-580
77. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA (2012) Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 338:917-921
78. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78:721-733
79. Hunziker EB (1999) Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 7:15-28
80. Inoue H (1981) Alterations in the collagen framework of osteoarthritic cartilage and subchondral bone. *International Orthopaedics* 5:47-52
81. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 83:53-64
82. Jann J, Gascon S, Roux S, Faucheu N (2020) Influence of the TGF- β Superfamily on Osteoclasts/Osteoblasts Balance in Physiological and Pathological Bone Conditions. *Int J Mol Sci* 21:7597
83. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, et al. (2006) Smad3-dependent nuclear translocation of β -catenin is required for TGF- β 1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 20:666-674
84. Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54-69
85. Johnson LL, Spector M (2015) The New Microfracture: All Things Considered. *Arthroscopy* 31:1028-1031
86. Joseph GB, Baum T, Alizai H, Carballido-Gamio J, Nardo L, et al. (2012) Baseline mean and heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years--data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage* 20:727-735
87. Jung M, Breusch S, Daecke W, Gotterbarm T (2009) The effect of defect localization on spontaneous repair of osteochondral defects in a Gottingen minipig model: a retrospective analysis of the medial patellar groove versus the medial femoral condyle. *Lab Anim* 43:191-197
88. Katagiri H, Mendes LF, Luyten FP (2017) Definition of a Critical Size Osteochondral Knee Defect and its Negative Effect on the Surrounding Articular Cartilage in the Rat. *Osteoarthritis Cartilage* 25:1531-1540
89. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33-40
90. Kim JG, Rim YA, Ju JH (2022) The Role of Transforming Growth Factor β in Joint Homeostasis and Cartilage Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*: Epub ahead of print. doi: 10.1089/ten.TEC.2022.0016.

Literaturverzeichnis

91. Kim MK, Ha CW, In Y, Cho SD, Choi ES, *et al.* (2018) A Multicenter, Double-Blind, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell and Gene Therapy in Knee Osteoarthritis Patients. *Hum Gene Ther Clin Dev* 29:48-59
92. Kim YI, Ryu JS, Yeo JE, Choi YJ, Kim YS, *et al.* (2014) Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 450:1593-1599
93. Kock NB, Hannink G, van Kampen A, Verdonschot N, van Susante JL, *et al.* (2011) Evaluation of subsidence, chondrocyte survival and graft incorporation following autologous osteochondral transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:1962-1970
94. Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, *et al.* (2010) Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:472-479
95. Krishnasamy P, Hall M, Robbins SR (2018) The role of skeletal muscle in the pathophysiology and management of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 57:iv22-iv33
96. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, *et al.* (1993) Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774
97. Kusano K, Tsutsumi Y, Dean J, Gavin M, Ma H, *et al.* (2007) Long-term stable expression of human growth hormone by rAAV promotes myocardial protection post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 42:390-399
98. Lee B, Oh Y, Jo S, Kim TH, Ji JD (2019) A dual role of TGF- β in human osteoclast differentiation mediated by Smad1 versus Smad3 signaling. *Immunol Lett* 206:33-40
99. Lee JM, Kim BS, Lee H, Im GI (2012) In vivo tracking of mesenchymal stem cells using fluorescent nanoparticles in an osteochondral repair model. *Mol Ther* 20:1434-1442
100. Lee MC, Ha CW, Elmallah RK, Cherian JJ, Cho JJ, *et al.* (2015) A placebo-controlled randomised trial to assess the effect of TGF- β 1-expressing chondrocytes in patients with arthritis of the knee. *Bone Joint J* 97-B:924-932
101. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, *et al.* (2006) Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang* 91:135-139
102. Lepage SIM, Robson N, Gilmore H, Davis O, Hooper A, *et al.* (2019) Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. *Tissue Eng Part B Rev* 25:114-125
103. Little CB, Smith MM, Cake MA, Read RA, Murphy MJ, *et al.* (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3:80-92
104. Lohmander LS, Hellot S, Dreher D, Krantz EF, Kruger DS, *et al.* (2014) Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheumatol* 66:1820-1831

105. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, *et al.* (2006) Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. *J Bone Miner Res* 21:626-636
106. Lum ZP, Hakala BE, Mort JS, Recklies AD (1996) Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 β on human articular chondrocytes by transforming growth factor- β . *J Cell Physiol* 166:351-359
107. LuValle P, Daniels K, Hay ED, Olsen BR (1992) Type X collagen is transcriptionally activated and specifically localized during sternal cartilage maturation. *Matrix* 12:404-413
108. Lydon H, Getgood A, Henson FMD (2019) Healing of Osteochondral Defects via Endochondral Ossification in an Ovine Model. *Cartilage* 10:94-101
109. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J (2005) The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36:207-215
110. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:419-433
111. Madry H, Luyten FP, Facchini A (2012) Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:407-422
112. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, *et al.* (2016a) Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:1753-1762
113. Madry H, Orth P, Cucchiari M (2016b) Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg* 24:45-46
114. Madry H (2022) Surgical therapy in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage: Epub ahead of print*; doi: 10.1016/j.joca.2022.1001.1012.
115. Maihöfer J, Madry H, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Goebel L, *et al.* (2021) Hydrogel-Guided, rAAV-Mediated IGF-I Overexpression Enables Long-Term Cartilage Repair and Protection against Perifocal Osteoarthritis in a Large-Animal Full-Thickness Chondral Defect Model at One Year In Vivo. *Adv Mater* 33:e2008451
116. Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64:460-466
117. Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, Sun J, Chen H, *et al.* (2012) Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue Eng Part A* 18:508-519
118. Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, *et al.* (2006) Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol* 57:16-23
119. Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, Flanigan DC, Jia G, *et al.* (2011) Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthritis Cartilage* 19:1066-1075
120. Milz S, Putz R (1994) Lückenbildungen der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus. *Osteologie* 3:110-118

Literaturverzeichnis

121. Minns RJ, Steven FS (1977) The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J Anat* 123:437-457
122. Morscheid S, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiarini M, et al. (2019) Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomitant Gene Transfer and Overexpression of TGF- β and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 20:E2591
123. Moutos FT, Glass KA, Compton SA, Ross AK, Gersbach CA, et al. (2016) Anatomically shaped tissue-engineered cartilage with tunable and inducible anticytokine delivery for biological joint resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E4513-4522
124. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, et al. (2010) Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF- β isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs* 192:158-166
125. Müller-Brandt K (2017) Effekt der Überexpression des chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX9 durch rekombinante adenoassoziierte virale (rAAV) Vektoren in Kombination mit Trägermaterialien auf die frühe Knorpelreparatur im translationalen Großtiermodell, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
126. Murray CJ, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, et al. (2020) Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 396:1223-1249
127. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J (2006) Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* 24:1791-1798
128. Niemeyer P, Kreuz PC, Steinwachs M, Sudkamp NP (2007) Chirurgische Therapieverfahren zur Behandlung umschriebener Knorpelschäden am Kniegelenk. *Sportverletz Sportschaden* 21:41-50
129. Noyes FR, Stabler CL (1989) A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 17:505-513
130. O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80:1795-1812
131. Oláh T, Reinhard J, Gao L, Goebel LKH, Madry H (2018) Reliable landmarks for precise topographical analyses of pathological structural changes of the ovine tibial plateau in 2-D and 3-D subspaces. *Sci Rep* 8:1-16
132. Orth P (2009) Gentransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
133. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, Ong MF, Gruber S, et al. (2012) Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1161-1169
134. Orth P, Zurakowski D, Alini M, Cucchiarini M, Madry H (2013) Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 19:885-891

135. Orth P, Cucchiari M, Wagenpfeil S, Menger MD, Madry H (2014) PTH [1-34]-induced alterations of the subchondral bone provoke early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 22:813-821
136. Pacifici M, Golden EB, Oshima O, Shapiro IM, Leboy PS, et al. (1990) Hypertrophic chondrocytes. The terminal stage of differentiation in the chondrogenic cell lineage? *Ann N Y Acad Sci* 599:45-57
137. Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, et al. (2007) Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- β 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14:804-813
138. Pallante AL, Chen AC, Ball ST, Amiel D, Masuda K, et al. (2012) The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. *Am J Sports Med* 40:1814-1823
139. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, et al. (2005) Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12:219-228
140. Pearsall AWt, Tucker JA, Hester RB, Heitman RJ (2004) Chondrocyte viability in refrigerated osteochondral allografts used for transplantation within the knee. *Am J Sports Med* 32:125-131
141. Pei M, Luo J, Chen Q (2008) Enhancing and maintaining chondrogenesis of synovial fibroblasts by cartilage extracellular matrix protein matrilins. *Osteoarthritis Cartilage* 16:1110-1117
142. Pei M, Chen D, Li J, Wei L (2009) Histone deacetylase 4 promotes TGF- β 1-induced synovium-derived stem cell chondrogenesis but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy. *Differentiation* 78:260-268
143. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, et al. (2020) The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 40:1769-1777
144. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Brunger JM, Farin AM, Glass KA, et al. (2013) Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods* 10:239-242
145. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale or histologic grading of articular cartilage repair. *Cells Tissues Organs* 143:335-340
146. Pombo-Suarez M, Castano-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino J, Gonzalez A (2009) Differential upregulation of the three transforming growth factor β isoforms in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis* 68:568-571
147. Pridie K (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg* 41:618-619
148. Pujol JP, Loyau G (1987) Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci* 41:1187-1198
149. Qi BW, Yu AX, Zhu SB, Zhou M, Wu G (2013) Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel combined with Ad-hTGF- β 1 transfected mesenchymal stem cells to repair rabbit articular cartilage defects. *Exp Biol Med (Maywood)* 238:23-30

Literaturverzeichnis

150. Randsborg PH, Brinchmann J, Loken S, Hanvold HA, Aae TF, *et al.* (2016) Focal cartilage defects in the knee - a randomized controlled trial comparing autologous chondrocyte implantation with arthroscopic debridement. *BMC Musculoskelet Disord* 17:1-9
151. Redini F, Galera P, Mauviel A, Loyau G, Pujol JP (1988) Transforming growth factor β stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 234:172-176
152. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005) Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9:23-32
153. Roach HI (1992) Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner* 19:1-20
154. Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB (2010) Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 18:12-23
155. Saberi Hosnijeh F, Zuiderwijk ME, Versteeg M, Smeele HT, Hofman A, *et al.* (2017) Cam Deformity and Acetabular Dysplasia as Risk Factors for Hip Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 69:86-93
156. Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwagh D, Truyers C, *et al.* (2021) Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 384(19):1824-1835
157. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I (2009) Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 39:345-354
158. Sanders TL, Pareek A, Obey MR, Johnson NR, Carey JL, *et al.* (2017) High Rate of Osteoarthritis After Osteochondritis Dissecans Fragment Excision Compared With Surgical Restoration at a Mean 16-Year Follow-up. *Am J Sports Med* 45:1799-1805
159. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, *et al.* (2002) Inhibition of endogenous TGF- β during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* 169:507-514
160. Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, *et al.* (2012) Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. *J Orthop Res* 30:214-220
161. Schinhan M, Toegel S, Weinmann D, Schneider E, Chiari C, *et al.* (2020) Biological Regeneration of Articular Cartilage in an Early Stage of Compartmentalized Osteoarthritis: 12-Month Results. *Am J Sports Med* 48:1338-1346
162. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79:1452-1463
163. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553
164. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, *et al.* (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699

165. Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, et al. (2001) Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten--Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafmodell *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 139:382-386
166. Smelser E, Hochberg MC (2013) New treatments for osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 25:310-316
167. Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T (2018) PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim* 52:135-141
168. Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, Erggelet C, Knutsen G, et al. (2005) Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy* 21:1462-1467
169. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk *Orthopäde* 28:26-32
170. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*:362-369
171. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK (2002) Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 15:170-176
172. Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad Shastri V (2004) FGF-2 enhances TGF- β 1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 22:1114-1119
173. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren-Jansson E, Carlsson L, et al. (2005) Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther* 7:560-568
174. Tang LY, Zhang YE (2011) Non-degradative ubiquitination in Smad-dependent TGF- β signaling. *Cell Biosci* 1:1-5
175. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, et al. (2009) TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 15:757-765
176. ten Dijke P, Hill CS (2004) New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29:265-273
177. Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, et al. (2004) Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res* 22:1210-1214
178. Toh WS, Liu H, Heng BC, Rufaihah AJ, Ye CP, et al. (2005) Combined effects of TGF β 1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors* 23:313-321
179. Trengove A, Di Bella C, O'Connor AJ (2021) The Challenge of Cartilage Integration: Understanding a Major Barrier to Chondral Repair. *Tissue Eng Part B Rev* 28:114-128
180. Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ (2004) Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Therapy* 11:351-359

Literaturverzeichnis

181. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, *et al.* (2003) Transforming growth factor- β -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278:41227-41236
182. Ulrich-Vinther M, Duch MR, Soballe K, O'Keefe RJ, Schwarz EM, *et al.* (2004) In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector. *J Orthop Res* 22:726-734
183. Ulrich-Vinther M, Stengaard C, Schwarz EM, Goldring MB, Soballe K (2005) Adeno-associated vector mediated gene transfer of transforming growth factor- β 1 to normal and osteoarthritic human chondrocytes stimulates cartilage anabolism. *Eur Cell Mater* 10:40-50
184. Urban H, Little CB (2018) The role of fat and inflammation in the pathogenesis and management of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 57:10-21
185. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1993) Protection from interleukin 1 induced destruction of articular cartilage by transforming growth factor β : studies in anatomically intact cartilage in vitro and in vivo. *Ann Rheum Dis* 52:185-191
186. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1994) In vivo protection against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor- β 1: age-related differences. *Ann Rheum Dis* 53:593-600
187. van der Kraan PM (2018) Differential Role of Transforming Growth Factor- β in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *J Bone Metab* 25:65-72
188. van der Kraan PM (2022) Inhibition of transforming growth factor- β in osteoarthritis. Discrepancy with reduced TGF β signaling in normal joints. *Osteoarthr Cartil Open* 4:100238; doi: 100210.101016/j.ocarto.102022.100238.
189. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, *et al.* (2012) SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 3:1-15
190. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Wezel A, Madry H, *et al.* (2013) rAAV-mediated overexpression of TGF- β stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *J Transl Med* 11:1-14
191. Venkatesan JK, Gardner O, Rey-Rico A, Eglin D, Alini M, *et al.* (2018) Improved Chondrogenic Differentiation of rAAV SOX9-Modified Human MSCs Seeded in Fibrin-Polyurethane Scaffolds in a Hydrodynamic Environment. *Int J Mol Sci* 19:3359-3364
192. Verdier MP, Seite S, Guntzer K, Pujol JP, Boumediene K (2005) Immunohistochemical analysis of transforming growth factor β isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int* 25:118-124
193. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, *et al.* (1992) Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* 35:806-811
194. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, *et al.* (2021) Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an

- interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet* 397:99-111
195. Wachsmuth L, Soder S, Fan Z, Finger F, Aigner T (2006) Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol* 21:477-485
196. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, et al. (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-592
197. Walenda G, Abnaof K, Joussen S, Meurer S, Smeets H, et al. (2013) TGF- β 1 does not induce senescence of multipotent mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages. *PLoS One* 8:e77655
198. Wang R, Xu B, Xu H (2018) TGF- β 1 promoted chondrocyte proliferation by regulating Sp1 through MSC-exosomes derived miR-135b. *Cell Cycle* 17:2756-2765
199. Welton KL, Logerman S, Bartley JH, Vidal AF, McCarty EC (2018) Knee Cartilage Repair and Restoration: Common Problems and Solutions. *Clin Sports Med* 37:307-330
200. Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J (2000) Effect of transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 61:1003-1010
201. Wu J, Liu W, Bemis A, Wang E, Qiu Y, et al. (2007) Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56:3675-3684
202. Young RD, Lawrence PA, Duance VC, Aigner T, Monaghan P (2000) Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 48:423-432
203. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF (2017) TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a022145
204. Zhen G, Cao X (2014) Targeting TGF- β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 35:227-236
205. Zhu Y, Tao H, Jin C, Liu Y, Lu X, et al. (2015) Transforming growth factor- β induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med Rep* 12:5573-5579
206. Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S, Matosevic S (2017) Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene Ther* 24:441-452

9. Publikationen

Schrenker S, Madry H (2018) Kongresszusammenfassung - AFOR 2018. *Z Orthop Unfall* 156:378-380. Impact-Faktor (2018): 0,631.

Schrenker S, Gao L, Cucchiari M, Madry H (2019a) Future Aspects of Clinical Osteoarthritis Therapies in the Continuum of Translational Research. *Z Orthop Unfall* 157:629-643. Impact-Faktor (2019): 0,798.

Schrenker S, Group AE, Madry H (2019b) Aktuelle Aspekte zur experimentellen und klinischen Knorpel- und Knochenregeneration – Kongresszusammenfassung des AFOR-Expertengremiums 2019. *Z Orthop Unfall* 157:614-621. Impact-Faktor (2019): 0,798.

Michaelis JC, Oláh T, **Schrenker S**, Cucchiari M, Madry H. A high-resolution cross-species comparative analysis of the subchondral bone provides insight into critical topographical patterns of the osteochondral unit. *Clin Transl Med*. 2022 Feb;12(2):e745. doi: 10.1002/ctm2.745. Impact-Faktor (2021): 11.492.

Schrenker S, Cucchiari M, Goebel L, Oláh T, Venkatesan J. K., Schmitt G, Speicher-Mentges S, Maihöfer J, Gao L, Zurakowski D, Menger M, Laschke M, Madry H. *In vivo* rAAV-mediated human TGF- β overexpression reduces perifocal osteoarthritis and improves osteochondral repair in a large animal model at one year. Manuscript eingereicht im Journal: „*Osteoarthritis and Cartilage*“ am 08.05.2022. Status: „*pending on revision*“ (13.08.2022).

10. Danksagung

Die Umsetzung der Arbeit ermöglichte das Zentrum für Experimentelle Orthopädie an der Universität des Saarlandes und die zugehörigen Mitarbeiter. Außerordentlicher Dank gilt:

Herrn *Prof. Dr. med. Henning Madry*, dem Doktorvater, für die herausragende wissenschaftliche Anleitung, die mannigfaltigen Hilfestellungen, die Diskussion der erhobenen Daten und letztlich exzellente Betreuung der durchgeföhrten Langzeitstudie.

Frau *Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini* für die Entwicklung und Bereitstellung der viralen Vektoren, die außerordentliche Unterstützung bei der Konzeption der Studie und Interpretation der Daten sowie der Fertigstellung des veröffentlichten Manuskripts.

Herrn *Dr. med. Lars Goebel* für die praktischen Hilfestellungen, labortechnischen Anleitungen sowie konstruktiven Ratschläge zur Auswertungsmethodik und Interpretation der erhobenen Daten.

Herrn *Dr. rer. nat. Tamás Oláh* für die Hilfe bei Anfertigung und Abschluss der Publikation sowie für die Unterstützung bei der Darstellung der Mikro-CT-Datensätze.

Frau *Gertrud Schmitt* und *Susanne Speicher-Mentges* für die labortechnische Anleitung und Unterstützung bei der feingeweblichen Probenbearbeitung.

Herrn *Dr. rer. nat. Andreas Müller* für die Umsetzung der magnetresonanztomographischen Darstellung der Kondylen.

Herrn *Prof. Dr. med. Michael D. Menger* und *Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke* sowie den Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes für die Bereitstellung von Ressourcen und die Koordination der durchgeföhrten Tierstudie. Zudem gilt der Dank insbesondere den zugehörigen Tierpflegern für die hervorragende Betreuung der Tiere.

Meiner Familie.

11. Lebenslauf

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