

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**Evaluation der chondroprotektiven Eigenschaften eines BMP-7
augmentierten, thermosensitiven Hydrogels am murinen
Gonarthrosemodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrads der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexander Martin Keppler

aus Neuenbürg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Jörg Hausdorf

Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Carl Neuerburg

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen

Prüfung: 11.10.2018

Die Körper wären nicht schön, wenn sie sich nicht bewegten.

Johannes Kepler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einführung in die Thematik	1
1.1. Volkskrankheit Arthrose	1
1.1.1. Klinische Definition.....	2
1.1.2. Ätiologie der Arthrose	2
1.1.3. Degeneration des Knorpels als Kernelement der Arthrose.....	4
1.1.4. Problematik des Knorpelersatzes und Therapieansätze	5
1.2. Hyaliner Knorpel.....	7
1.2.1. Struktureller Aufbau	7
1.2.2. Chondrozyten.....	8
1.2.3. Wasser.....	9
1.2.4. Kollagene	9
1.2.5. Proteoglykane	10
1.3. Aktuelle regenerative Forschungsansätze	10
1.3.1. Hydrogele.....	10
1.3.1.1. Thermosensitive Hydrogele	11
1.3.2. Bone Morphogenetic Proteins.....	12
1.3.2.1. BMP-7.....	14
1.4. Zielsetzung des Versuchsvorhabens	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Verbrauchsartikel, Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.2. Lösungen	19
2.1.3. Tiere.....	19

Inhalt

2.1.4. Anästhetika und Medikamente.....	19
2.1.5. Geräte	20
2.2. Hydrogel.....	21
2.2.1. Herstellung des Hydrogels.....	21
2.3. Versuchsmodell.....	21
2.3.1. Instabilitätsmodell des Mäuseknies	21
2.3.2. Tiere und Tierhaltung.....	22
2.3.3. Versuchsaufbau	23
2.4. Versuchsdurchführung	24
2.4.1. Operative Vorbereitung und Anästhesie	24
2.4.2. Operatives Vorgehen	24
2.4.3. Postoperative Nachsorge.....	25
2.4.4. Tiertötung.....	26
2.4.5. Materialentnahme und -aufbereitung	26
2.5. Auswertung	26
2.5.1. Sichtkontrolle bei Explantation.....	26
2.5.2. „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Bestimmung von Knorpelabbauprodukten (C2C) im Urin.....	26
2.5.3. Histologie	27
2.5.3.1. Entkalkung.....	27
2.5.3.2. Einbettung.....	28
2.5.3.3. Anfertigen der Schnittpräparate.....	28
2.5.3.4. Histologische Färbungen	29
2.5.3.4.1. Hämatoxyllin und Eosin (H&E) Färbung.....	29
2.5.3.4.2. Toluidinblaufärbung	30
2.5.3.4.3. Immunhistochemische Färbung für Aggrecan.....	30
2.5.4. Mikroskopie und Beurteilung.....	32

Inhalt

2.5.5. Statistische Analyse	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Ergebnisse der 4-Wochen Tiere	35
3.1.1. Klinischer Verlauf	35
3.1.2. Makroskopische Beurteilung nach Explantation	36
3.1.3. Histologische Ergebnisse.....	36
3.1.3.1.1. Struktur des Knorpels	36
3.1.3.1.2. Aggrecangehalt	40
3.2. Ergebnisse der 8-Wochen Tiere	43
3.2.1. Klinischer Verlauf	43
3.2.2. Makroskopische Beurteilung nach Explantation	43
3.2.3. Histologische Ergebnisse.....	44
3.2.3.1.1. Struktur des Knorpels	44
3.2.3.1.2. Aggrecangehalt	47
3.3. Vergleich der 4-Wochen und 8-Wochen Tiere	50
3.3.1. Vergleich der Struktur	50
3.3.2. Vergleich des Aggrecangehalts	51
3.4. ELISA	51
4. Diskussion	53
4.1. Diskussion der Methodik	53
4.1.1. Anforderungsprofil.....	53
4.1.2. Tiermodell und chirurgische Induktion der Arthrose	54
4.1.3. Versuchstierzahl	56
4.1.4. Versuchsdauer	56
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	56
4.2.1. Das DMM-Modell löst eine reproduzierbare Arthrose aus	56

Inhalt

4.2.2. BMP-7 augmentiertes BDI-Hydrogel hat einen positiven Einfluss auf die Progression einer Arthrose	57
4.2.3. Potentieller protektiver Effekt des BDI-Hydrogels.....	60
4.2.4. C2C im Urin korreliert nicht mit der histologischen Schwere der Arthrose	61
4.3. Schlussfolgerung und Ausblick	63
5. Zusammenfassung.....	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Anhang	86
7.1. Abkürzungsverzeichnis	86
7.2. Abbildungsverzeichnis	88
7.3. Tabellenverzeichnis	88
7.4. Zusammensetzung der selbsthergestellten Lösungen.....	89
7.4.1. DAB Färbelösung.....	89
7.4.2. 1M Tris-HCl Puffer	89
7.4.3. EDTA-Lösung (20%, pH 8) zur Entkalkung	89
7.4.4. Toluidinpuffer	89
7.5. Aufzeichnungsbögen.....	90
7.6. Danksagung	91
7.7. Veröffentlichungen	92
7.8. Eidesstattliche Versicherung.....	93

1. Einführung in die Thematik

Im Jahr 2011 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 168 486 primäre Knieendothprothesen implantiert [1]. Diese Operation ist oftmals die letzte Hoffnung vieler Arthrosepatienten wieder ein schmerzfreies und mobiles Leben führen zu können. Dabei haben die Patienten oftmals eine jahrzehntelange Krankheitsgeschichte hinter sich mit vielen konservativen und operativen Therapieversuchen. Im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens steht dabei der progrediente und irreversible Verlust von hyalinem Gelenkknorpel.

Gegenstand der aktuellen Knorpelforschung sind deswegen nicht nur Verfahren für den Knorpelersatz, sondern auch präventive Therapieansätze. Hierbei ist es das Ziel den körpereigenen Knorpel möglichst lange zu erhalten, beziehungsweise zur Regeneration anzuregen, um somit die Arthroseprogression und einen künstlichen Gelenkersatz hinauszuzögern. Diese Therapien müssen dabei sehr frühzeitig ansetzen, denn bereits kleine Knorpelschäden können sich ausdehnen und im weiteren Verlauf zu einer manifesten Arthrose des Gelenks werden [2,3].

1.1. Volkskrankheit Arthrose

In der Rangliste der wichtigsten orthopädischen Erkrankungen nimmt die Arthrose weltweit einen Spitzenplatz ein und stellt ein zunehmend sozioökonomisches Problem dar [4,5]. Dabei können alle Gelenke des menschlichen Körpers erkranken, wobei insbesondere bei den großen Gelenken die Hüfte, das Knie und das Sprunggelenk betroffen sind. Das Kniegelenk, als größtes Gelenk des Körpers, ist dabei überproportional oft betroffen. Man spricht dann von einer Gonarthrose.

Beschwerden in diesem Gelenk führen aufgrund der Bedeutung für einen natürlichen Bewegungsablauf zu erheblichen Einschränkungen. Für Deutschland sind epidemiologische Daten nur sehr spärlich vorhanden. In einer Publikation des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2013 wird von einer Arthroseprävalenz in Deutschland von 17,9% für Männer und von 22,9% bei Frauen ausgegangen. Dabei entstanden dem Gesundheitssystem im Jahr 2008 Kosten von mehr als 7,62 Milliarden Euro [6].

Für die Zukunft ist dabei nicht nur mit einer weiteren Zunahme der Kosten zu rechnen, sondern auch mit einer Zunahme der Prävalenz [7]. Sozioökonomisch dürfen bei der

Einleitung

Arthrose vor allem nicht nur die direkten Krankheitskosten beachtet werden, sondern auch die indirekten, welche durch den Ausfall, insbesondere von Arbeitsleistung entstehen. Ein weiterer Aspekt, der die Bedeutung der Arthrose widerspiegelt, ist das Bestreben vieler Patienten ein aktives Leben bis ins hohe Alter führen zu können. Dieser hohe Anspruch an eine funktionierende, schmerzfreie Bewegung spiegelt sich auch in der Erwartungshaltung der Patienten wider. *Gignac et al.* konnten 2013 zeigen, dass die Ansprüche von Patienten mit Arthrose im mittleren Lebensabschnitt oft übersehen und bagatellisiert werden und bis hin zu Depressionen und sozialer Ausgrenzung führen können [8].

1.1.1. Klinische Definition

Nach der Definition des American College of Rheumatology (ACR) wird eine Gonarthrose durch die folgenden Punkte definiert [9]: Alter über 38 Jahre, Morgensteifigkeit über 30 Minuten, sowie Knieschmerz und Krepitismus. Diese Definition wurde jedoch rein anhand von epidemiologischen Daten erhoben und zeigt in der Klinik Defizite. Im klinischen Alltag hat sich insbesondere die radiologische Einteilung der Arthrose nach *Kellgren und Lawrence* durchgesetzt und bewährt [10]. Sie dient neben der Diagnosesicherung auch der Stadieneinteilung. Radiologische Zeichen der Gonarthrose sind die Gelenkspaltverschmälerung, osteophytäre Anbauten, subchondrale Skleosierung und subchondrale Zysten [11]. Insbesondere die Gelenkspaltverschmälerung korreliert dabei mit dem Knorpelverlust und klinischer Symptomatik [12].

1.1.2. Ätiologie der Arthrose

Die genaue Ursache der (Gon-)Arthrose ist immer noch ungeklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Drei Punkte scheinen dabei von besonderer Bedeutung zu sein: genetische Faktoren, mechanische Belastung und altersbedingte, degenerative Veränderungen.

Durch die Altersprozesse sind auch im muskuloskelettalen System viele Gewebe einem natürlichen degenerativen Prozess unterworfen.

Im Knorpelgewebe reduzieren die Chondrozyten mit fortgeschrittenem Alter ihre Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen und verlieren somit regeneratives Potential, während die Synthese proinflammatorischer und knorpelabbauender

Einleitung

Zytokine erhalten bleibt oder sogar zunimmt [13].

Genetische Faktoren haben sowohl Einfluss auf den Zeitpunkt des Auftretens als auch auf die Krankheitsprogression [14]. Dabei scheinen vor allem Gene, die extrazelluläre Matrixkomponenten wie das *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) oder den *Growth Differentiation Factor-5* (GDF-5) kodieren, verändert zu sein und wurden bei frühzeitiger einsetzender Arthrose beschrieben [15,16]. Weitere Studien konnten auch für genetische Polymorphismen und Mutationen ein erhöhtes Krankheitsrisiko feststellen [17,18]. So scheint insbesondere der *Osteoprotegerin* (OPG)-Polymorphismus das Risiko an Arthrose zu erkranken signifikant zu erhöhen [19].

Aber auch geschlechtsspezifische genetische Unterschiede scheinen einen Einfluss zu haben. Durch klinische Beobachtungen wurde festgestellt, dass Männer bis zum 50. Lebensjahr häufiger von Arthrose betroffen sind. Dies ändert sich jedoch mit dem Ende der Menopause bei Frauen. Hier ist die Prävalenz der Arthrose in der Altersgruppe über 55 Jahre höher. Zudem nimmt die Schwere der Arthrose und die Anzahl der betroffenen Gelenke zu [20]. Es wird dabei ein genetischer, chondroprotektiver Effekt der Geschlechtshormone diskutiert. Diese These wird durch Tiermodelle gestützt. In mehreren Studien zeigten männliche C57BL/6 Mäuse eine höhere Anfälligkeit für spontane Arthrose als weibliche [21].

Eine mechanische Mehrbelastung, die beispielsweise aus exzessiver sportlicher Belastung oder einer Fehlstellung resultieren kann, gilt als einer der größten Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer Arthrose. Die exzessive Belastung wird direkt durch die Chondrozyten und Mechanorezeptoren registriert und dadurch die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Signalproteine angeregt [22,23]. Zudem treten Veränderungen in der Zusammensetzung der Matrixproteine auf [23]. *Kujit et al.* zeigten dabei am Beispiel von professionellen Fußballspielern, dass eine vermehrte mechanische Beanspruchung und eine höhere Anzahl an Verletzungen zu einer erhöhten Rate von symptomatischer Arthrose an der unteren Extremität führt [24]. Inwieweit der subchondrale Knochen dabei einen Einfluss auf die Progression der Arthrose hat ist noch ungeklärt. Zusammen mit dem Knorpel wird er als eine osteochondrale Einheit aufgefasst und zeigt bei erhöhter mechanischer Belastung Risse und ultrastrukturelle Umstrukturierungen [25].

Einleitung

1.1.3. Degeneration des Knorpels als Kernelement der Arthrose

Trotz der multifaktoriellen Ätiologie der Arthrose scheint der Knorpelschaden der entscheidende pathophysiologische Mechanismus für die Entstehung der Arthrose zu sein.

Es können zwei Formen der Knorpelschädigung unterschieden werden. Die primäre Arthrose als eine degenerative Schädigung des Knorpels, welche durch eine sinkende Syntheseleistung der Matrix und Apoptose von Zellen zustande kommt, sowie die sekundäre Arthrose, welche im Zusammenhang mit Verletzungen der Gelenke auftreten kann oder entzündliche Gelenkserkrankungen als Ausgangspunkt hat [26]. Kleine Knorpeldefekte sind dabei oftmals klinisch stumm. Sie resultieren nicht selten aus einem Bagatelltrauma und werden nicht entdeckt. Eine Überschneidung zwischen den beiden Schädigungsformen ist möglich, wenn zu einem traumatischen Schaden noch degenerative Veränderungen kommen. Weitere Faktoren wie Alter, Gewicht, Belastung aber auch inadäquate Ernährung spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle und können den zeitlichen und klinischen Verlauf der Arthrose maßgeblich beeinflussen [27].

Zu Beginn einer Arthrose zeigen die Chondrozyten einen gesteigerten Stoffwechsel um die verletzte Matrix zu regenerieren. Es werden sowohl knorpelspezifische Kollagene wie Typ II oder XI gebildet als auch spezifische Reparaturkollagene welche in gesundem hyalinen Knorpel nicht zu finden sind [28,29]. Zusätzlich werden von den Chondrozyten vermehrt Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-1, MMP-3, MMP-13 und ADAM-TS 5 gebildet, die den Knorpel aktiv abbauen [23,30]. Das Gleichgewicht ist dabei deutlich zu Gunsten der knorpelabbauenden Substanzen verschoben. Die Untersuchung von Synovialflüssigkeit hat gezeigt, dass noch Jahre nach einem Gelenktrauma mit Knorpelschaden der Gehalt an MMP-3 erhöht ist [31]. Zudem können vermehrt Abbauprodukte des Kollagens und von Aggrecan gemessen werden [32–34]. Diese Produktion von MMPs und Aggrecanasen führt dann zu einem signifikanten Verlust von Kollagen II und Proteoglykanen wie Aggrecan und immer größer werdenden Läsionen im Knorpel [35,36]. Der voranschreitende Knorpelverlust führt weiter zu Schmerzen und einem Reizzustand im Gelenk.

1.1.4. Problematik des Knorpelersatzes und Therapieansätze

Hyaliner Knorpel besitzt als brachytrophes Gewebe nur ein geringes intrinsisches Potential für die Regeneration. Pluripotente Zellen, wie sie beispielsweise in der Muskulatur vorkommen und den Knorpel zu einer endogenen Regeneration befähigen könnten fehlen [37]. Zudem sind auch keine Nerven, Gefäße oder Lymphbahnen vorhanden welche eine Regeneration zusätzlich unterstützen könnten [38]. Es können nur kleine Defekte mit einem minimalen Verlust der Matrixkomponente durch eine Neusynthese von Proteoglykanen vom Knorpel selbst regeneriert werden. Hat der Defekt jedoch ein größeres Ausmaß erreicht, stößt dieser Reparaturmechanismus schnell an seine Grenzen [38].

Die Therapie der Arthrose erfolgt aktuell symptomorientiert, da kein Therapeutikum zur Verfügung steht, welches die Arthrose kausal heilen oder zumindest in ihrer Progression aufhalten kann [39]. Zu Beginn einer Therapie stehen konservative Methoden wie Physiotherapie zur Muskelkräftigung oder eine Änderung des Lebensstils mit Bewegungstherapie und Gewichtsreduktion im Vordergrund. Diese Maßnahmen können aber allenfalls eine Progression verlangsamen [40–42]. Zusätzlich kommen lokale und systemische Schmerzmittel zum Einsatz. Hier zeigt aber vor allem die Substanzklasse der nichtsteroidalen Antirheumatika Nebenwirkungen und sollte nur kurzfristig eingesetzt werden [43]. So sind vor allem bei einem Langzeitgebrauch ausgeprägte kardiale und renale Nebenwirkungen bis hin zu lebensbedrohlichen gastrointestinalen Blutungen beschrieben [44,45]. Bei einem Versagen der pharmakologischen Therapie hat sich in letzter Zeit noch die Injektion von Hyaluronsäure in das Gelenk etabliert. Hierbei werden viskoelastische Lösungen in das Gelenk injiziert mit dem Ziel die rheologischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit nachzuahmen und so die Reibung und den Schmerz zu verringern [46]. Dabei kommen vor allem Flüssigkeiten auf Basis von synthetisch hergestellter, im Gelenk natürlich vorkommender, Hyaluronsäure zum Einsatz [47]. Die Wirkungen der Injektionen sind jedoch umstritten und die Wirkung meist nur von kurzer Dauer [48,49].

Bei posttraumatisch bedingten Arthrosen und klar umschriebenen Knorpeldefekten stehen diverse knorpelchirurgische Verfahren, mit dem Ziel den Krankheitsverlauf hinauszuzögern, zur Verfügung. Hier hat sich neben dem arthroskopischen Débridement von Defektzonen mit Mikrofrakturierung vor allem die autologe

Einleitung

Chondrozytentransplantation am Kniegelenk etabliert. Mehrere Studien konnten hier aber insbesondere für das Débridement keinen besseren Outcome im Vergleich zu einer Placebothherapie nachweisen [50,51].

Bei der Mikrofrakturierung werden mittels einer Ahle oder eines Bohrers kleine Löcher bis auf den subchondralen Knochen gesetzt, so dass Stammzellen und Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmark in das Gelenk übertreten können. *Steadman et al.* konnten in einer großangelegten Nachuntersuchung zeigen, dass hierbei der gebildete Ersatzknorpel aus faserigen und hyalinen Anteilen besteht und sich dieses Verfahren vor allem für frische und kleine Defekte bei jungen Patienten eignet [52]. Eine aktuelle Modifikation des Verfahrens ist die sogenannte autologe matrixinduzierte Chondrogenese (*AMIC*). Hierbei wird in den mikrofrakturierten Defekt eine zusätzliche Kollagen-II-Membran eingebracht und fixiert. Diese Membran dient als „Netz“ für die aus dem mikrofrakturierten Knochen austretenden Stammzellen und Wachstumsfaktoren und unterstützt ihre Differenzierung [53]. Die klinischen Untersuchungen beschränken sich auf Fallserien. Eine aktuelle Studie von *Anders et al.* konnte keine signifikanten Vorteile des Verfahrens belegen [54].

Ein jüngeres und invasiveres Verfahren ist die autologe Chondrozytentransplantation (*ACI*). Dieses Verfahren wurde von *Grande et al.* 1989 erstmals im Tierversuch beschrieben und stellt die Geburtsstunde des Tissue Engineering von Knorpel dar [55]. Hierbei werden mittels eines zweizeitigen Vorgehens, erst Chondrozyten aus einer mechanisch weniger belasteten Region des Gelenks arthroskopisch entnommen und nach einer Anzucht im Labor in den Defekt transplantiert [56]. Dabei dient ein Hydrogel als Trägersubstanz und künstliche Matrix für die gezüchteten Chondrozyten. Diese Methode kann allerdings nur bis zu einer gewissen Defektgröße angewandt werden [57]. Zudem reicht der im Labor gezüchtete Knorpel von den Eigenschaften nicht an den originalen Knorpel heran und kann nach der Implantation fibrosieren [58]. Problematisch ist zudem teilweise die Einheilung in den Defekt, welche Revisionseingriffe notwendig machen kann [59]. Dieses Verfahren eignet sich vor allem für kleine, traumatisch erworbene Defekte bei jüngeren Patienten und kann aufgrund der Heterogenität der einzelnen Studien noch nicht abschließend bewertet werden [60,61]. Alternativ steht die autologe osteochondrale Transplantation zur Verfügung. Hierbei wird ein Knorpel-Knochen Zylinder aus einer gesunden, wenig belasteten Gelenkregion ausgestanzt und in die Defektregion implantiert. Der Vorteil

Einleitung

ist neben dem einzeitigen Vorgehen die Unabhängigkeit von im Labor gezüchteten Zellen [62]. Jedoch kommt es nur für Defekte bis 25 mm Durchmesser in Frage [63]. Beide Verfahren haben zudem den Nachteil, dass ein iatrogenes Knorpeldefekt an der Entnahmestelle gesetzt wird, der gerade bei jungen Patienten eine potentielle Schwachstelle sein kann [64].

Ein aktueller vielversprechender Forschungsansatz ist die Gewinnung von humanen Chondrozyten aus dem Nasenseptum der Patienten. Im Labor werden die gewonnenen Zellen dann gezüchtet. Anschließend können die so gewonnenen Knorpelpräparate in den Knorpeldefekt implantiert werden. Erste Ergebnisse an der Femurkondyle sind vielversprechend, aber das Verfahren ist noch nicht geeignet für eine breite Anwendung in der Klinik [65].

Bei einer ausgeprägten Arthrose und in einem fortgeschrittenen Alter der Patienten bleibt als ultima ratio oftmals nur noch der künstliche Gelenkersatz. Viele Patienten können dadurch einen Zuwachs an Mobilität und Lebensqualität erreichen [66]. Durch verbesserte OP-Techniken und Implantate steht immer mehr betroffenen Patienten diese Möglichkeit zur Verfügung [67]. Aber auch diese Methode hat ihre Limitationen. Ein Gelenkersatz stellt immer einen größeren chirurgischen Eingriff mit Risiken wie Infektion oder intraoperativer Embolie dar [68,69]. Zudem kommen nicht alle Patienten für eine Operation in Frage. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der Implantate von 10-20 Jahren je nach Gelenk, und der erweiterten Risiken einer Wechseloperation ist eine solche Operation vor allem für Patienten im mittleren Lebensabschnitt keine zufriedenstellende Lösung [70]. Vor allem Knieendoprothesen weisen aufgrund einer erhöhten mechanischen Belastung und einer komplexen Gelenkmechanik eine reduzierte Lebensdauer von 10-12 Jahren auf [71]. Die möglichen Einschränkungen nach einer Operation bestimmte Sportarten oder Tätigkeiten nicht mehr zufriedenstellend ausüben zu können, schränkt den Kreis der in Frage kommenden Patienten weiter ein [72,73].

1.2. Hyaliner Knorpel

1.2.1. Struktureller Aufbau

Hyaliner Gelenkknorpel bedeckt die Gelenkflächen aller echten Gelenke. Seine Zusammensetzung macht ihn zu einem besonderen Gewebe, dessen physikalische

Einleitung

Eigenschaften bis heute noch nicht industriell oder künstlich nachgeahmt werden können [38,74]. Er vereint in einer einzigartigen Weise Steifheit, Elastizität und Reibung. Sein Reibungskoeffizient (0,02 – 0,002) ist wesentlich geringer als bei Stahl/Stahl (0,6) oder auch Teflon/Stahl (0,3) [75]. Dabei muss er Spitzendruckbelastungen bis 400 kg/cm² an der unteren Extremität standhalten [76]. Zusammen mit dem darunterliegenden subchondralen Knochen bildet er eine osteochondrale Einheit [77]. Zusammengesetzt ist der hyaline Gelenkknorpel aus Chondrozyten, welche umgeben sind von extrazellulärer Matrix. Ein wesentlicher Hauptbestandteil dieser extrazellulären Matrix ist das Typ-II-Kollagen, welches dem hyalinen Gelenkknorpel seine Form und auch mechanische Festigkeit gibt. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil ist Wasser in gebundener Form. Dabei speichern die negativ geladenen Proteoglykane sowie die Hyaluronsäure einen Großteil des Wassers [37].

Der strukturelle Aufbau des Knorpels variiert im Gelenk und kann in verschiedene Schichten aufgeteilt werden: Tangentialfaserzone (Zone I), Übergangszone (Zone II), Radiärzone (Zone III) und kalzifizierte Zone (Zone IV). Die kalzifizierte Zone wird von dem sogenannten Tidemark abgegrenzt. Es schließt sich der subchondrale Knochen an, der unterstützende Funktionen für den hyalinen Knorpel übernimmt beispielsweise durch Aufnahme und Verteilung auftretender Kräfte oder adaptive und aktive Umbauprozesse und Heilungsvorgänge [25,78].

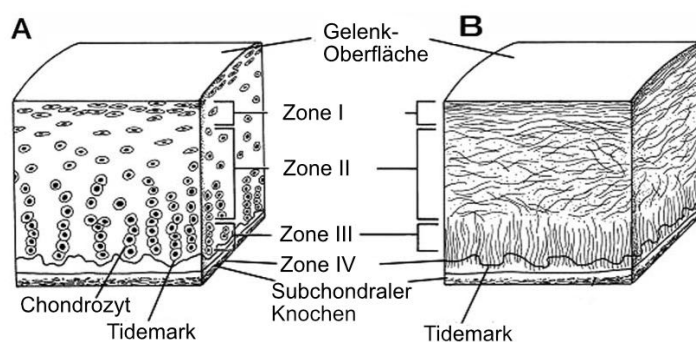


Abbildung 1: Struktureller Aufbau des Knorpels. Abbildung entnommen und adaptiert aus [79].

1.2.2. Chondrozyten

Der Anteil der Chondrozyten am hyalinen Knorpel beträgt nur 1-5% des Gesamtvolumens [80]. Eingebettet sind die Chondrozyten in die Matrix des Knorpels, durch welche sie auch via Diffusion ernährt werden. Die Matrix reichert sich um die Chondrozyten herum vermehrt an und wird als Lakune bezeichnet. Sie ist besonders

Einleitung

reich an den von den Chondrozyten sezernierten Stoffen. Die Diffusion wird dabei durch die Walkung des Knorpels während Bewegung unterstützt.

Die Hauptaufgabe der Chondrozyten ist die Synthese der Matrix und Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase [81]. Dadurch, dass sie von der Blutzufuhr abgetrennt sind, ist ihr Stoffwechsel sowohl von Wachstumsfaktoren als auch von äußeren mechanischen Faktoren abhängig [37].



Abbildung 2: Chondrozyten im Knorpel, Safranin-o-Färbung. Eigene Aufnahme.

1.2.3. Wasser

Der Hauptbestandteil des Knorpels ist Wasser (65-80% des Feuchtgewichts), welches sich insbesondere in den oberen Knorpelschichten im intrafibrillären Raum befindet [80]. Durch den hohen Wassergehalt und die Interaktion des Wassers mit den Matrixmolekülen bekommt der Knorpel seine besonderen mechanischen Eigenschaften wie die Elastizität. Zudem unterstützt das Wasser die Aufrechterhaltung eines niedrigen Reibungskoeffizienten und die Nährstoffaufnahme [75].

1.2.4. Kollagene

Die Grundkonstruktion des hyalinen Knorpels stellen die Kollagene dar. Sie machen 60% des Trockengewichts aus und verleihen dem Knorpel durch ihre Triple-Helix-Struktur seine Festigkeit und Form [82]. Hyaliner Knorpel besteht dabei aus zahlreichen, unterschiedlichen Kollagentypen wie Kollagen I, II, IV, V, VI, IX und XI. Kollagen Typ II bildet dabei die Hauptkomponente der Fibrillen mit einem Anteil von bis zu 95%, während Kollagen IX und XI nur eine untergeordnete Rolle spielen [80]. Mit zunehmendem Alter ändert sich die Kollagenstruktur im Knorpel und der Anteil von Kollagen II wird geringer [83].

Einleitung

1.2.5. Proteoglykane

Wichtigste Aufgabe der Proteoglykane (25-35% des Knorpeltrockengewichts) ist die chemische und mechanische Bindung des Wassers [84]. Sie bestehen aus einem zentralen Protein an welches wiederum unterschiedliche Polysaccharide gebunden sind. Gebildet werden die Proteoglykane in den Chondrozyten [85]. Das größte und wichtigste Proteoglykan ist dabei Aggrecan, welches neben Kollagen II den wichtigsten Bestandteil hyalinen Knorpels darstellt und Hyaluronsäure binden kann [86]. Der Verlust von Aggrecan ist nach aktuellem Stand der Forschung einer der entscheidenden Mechanismen für das Voranschreiten einer Arthrose [87].

1.3. Aktuelle regenerative Forschungsansätze

Gegenstand der aktuellen Forschung ist es vor allem aktiv modulierend in den Krankheitsprozess einzugreifen und so den Verlauf der Arthrose zu verlangsamen oder aufzuhalten. Ein möglicher Angriffspunkt dafür ist die Blockade molekularer Vorgänge um dem Abbau des Knorpels zu unterbinden und so einen Gelenkersatz hinauszuzögern. Insbesondere die Blockade von MMPs, ADAM-TS5 oder Aggrecanase wird aktuell in mehreren Studien untersucht [88].

Neben der Modulation des Krankheitsverlaufes ist die Regeneration von Knorpel ein zentrales Thema. Ziel ist es die betroffenen Gewebe bei Arthrose zur Regeneration anzuregen und damit die Funktion des Gelenks wiederherzustellen. Der Verlust an Knorpel soll dabei durch künstliche Ersatzgewebe ausgeglichen werden. Dabei kommen viele unterschiedliche Ansätze wie zellbasierte Therapien, Scaffolds, Hydrogele oder andere bioaktive Stoffe wie Wachstumsfaktoren in Betracht [89].

1.3.1. Hydrogele

Hydrogele sind ein vielversprechender Ansatz für zukünftige regenerative Therapien in der Medizin. Sie haben den Vorteil einer homogenen Struktur, die es ermöglicht Zellen oder Therapeutika an einer bestimmten Stelle freizusetzen und somit als Trägermaterial für zielgerichtete Therapien zu wirken. In der Forschung existiert eine Vielzahl von Grundlagen auf denen Hydrogele chemisch aufbauen. Am meisten verbreitet sind Hydrogele auf natürlicher Basis wie Agarose und Kollagen oder auf der Grundlage von synthetisch erzeugten Polymeren wie Polyethylenglycol (PEG) und Polyvinylalkohol (PVA) [90]. Durch modifizierte Seitenketten kann eine

Einleitung

Quervernetzung stattfinden, die durch chemische, enzymatische oder physikalische Prozesse getriggert werden kann. Idealerweise tritt diese Quervernetzung *in-situ* an der gewünschten Stelle auf.

Für einen präventiven Ansatz ist die Möglichkeit einer minimalinvasiven Applikation dabei besonders interessant. So besteht die Möglichkeit ohne aufwendigen chirurgischen Eingriff einen positiven Einfluss auf die Heilung geschädigter Gewebe oder Strukturen zu nehmen. *Park et al.* konnten mittels eines synthetischen Hydrogels 2007 erstmals mesenchymale Stammzellen erfolgreich zur Regeneration von Knorpelgewebe *in vivo* einsetzen [91]. Frühere Studien von *Seo et al.* zeigten positive Effekte auf die Knochenbildung *in vivo* mit einem BMP-2 beladenen Hydrogel [92].

1.3.1.1. Thermosensitive Hydrogele

Thermosensitive Hydrogele sind für minimalinvasive Anwendungen und die zielgerichtete Applikation von besonderem Interesse. Sie haben die Eigenschaft durch ihre polymere Struktur auf geringe Temperaturdifferenzen zu reagieren und dabei ihre chemischen, physikalischen oder mechanischen Eigenschaften zu verändern, ohne dabei auf externe Katalysatoren wie UV-Strahlung oder Chemikalien angewiesen zu sein [93].

Idealerweise härten die thermosensitiven Gele dabei bei Körpertemperatur aus und sind zuvor flüssig um eine einfache Applizierbarkeit zu gewährleisten. Sie können *ex vivo* mit Zellen oder Wachstumsfaktoren beladen werden um dann *in vivo* auszuhärten und die Stoffe an der gewünschten Stelle abzugeben [94,95]. Es können zwei Klassen von thermosensitiven Hydrogelen unterschieden werden. Auf der einen Seite *positive-sense* Hydrogele mit einer *upper critical solution temperature* (UCST) und *negative-sense* Hydrogele mit einer *lower critical solution temperature* (LCST). UCST-Hydrogele erstarren beim Abkühlen, wenn sie UCST erreichen, während LCST-Hydrogele beim Erhitzen über der LCST fest werden [96].

Einleitung

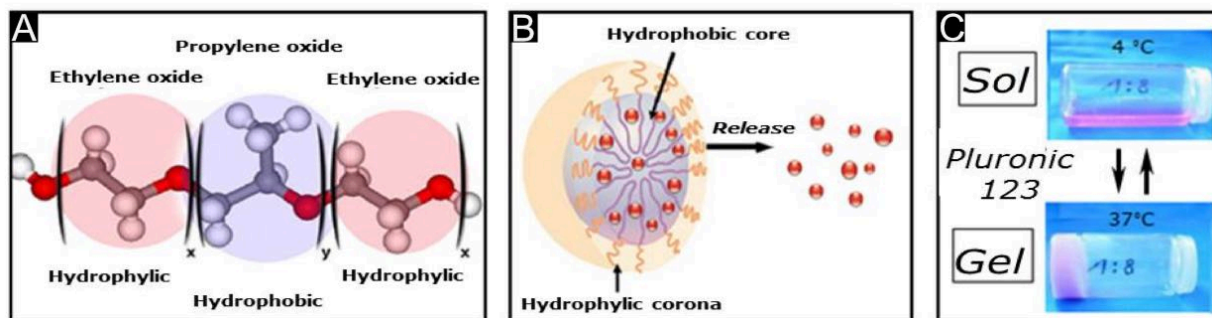


Abbildung 3: Die generelle Struktur des Pluronic® 123 Block-Copolymer-Moleküls (A); Mizellen mit eingeschlossenen Wirkstoffen (B); adaptiert von [97]. C zeigt den thermisch bedingten Gelübergang von Pluronic® 123.

Wässrige Lösungen von poly(ethylenoxid)/poly(propylenoxid)/poly(ethylenoxid) Triblock-Copolymeren wie *Pluronic*® 123 gehören dabei zur Klasse der *negativ-sense* Hydrogele mit einer sehr niedrigen Viskosität unterhalb der LCST und einem Übergang in einen festen Aggregatzustand darüber aufgrund von Mizellenbildung (Abb. 3). Diese Mizellenbildung ist abhängig von der Temperatur und der Konzentration der Triblock-Polymere [98]. Um eine Änderung des Aggregatzustands bei physiologischen Temperaturen zu erreichen, sind hohe Co-Polymerkonzentrationen von 15-20% notwendig. Diese hohen Konzentrationen sind für *in vivo* Anwendungen jedoch nicht optimal, da hier eine möglichst geringe Polymerkonzentration angestrebt werden sollte. Um trotzdem eine Mizellenbildung bei physiologischen Temperaturen und geringer Polymerkonzentration zu erreichen, kann das Hydrogel mit Kettenverlängerern modifiziert werden. Hierbei hat vor allem eine Kettenverlängerung mit Butan-Diisocyanat (BDI) sehr gute *in vivo* Eigenschaften gezeigt [99].

1.3.2. Bone Morphogenetic Proteins

Bone Morphogenetic Proteins oder kurz BMP genannt, sind eine Untergruppe von Wachstumsfaktoren der Superfamilie *Transforming Growth Factor beta*, kurz TGF- β . Zu dieser großen Gruppe von Signalproteinen gehören neben BMPs weitere Proteine wie *Inhibine*, *Aktivine*, *Nodal*, *Glial Derived Neurotrophic Factor*, *Growth/Differentiation Factors* und die *Müllerian Inhibiting Substanz* [100]. Diese lassen sich in einer Vielzahl von Körpergeweben wie Knorpel, Thrombozyten, Knochen oder aktivierten Lymphozyten finden. Die Familie der TGF- β Signalproteine ist dadurch an unzähligen Signalkaskaden im Körper beteiligt und übernimmt vielfältige regulatorische Funktionen. Die Signalkaskaden wurden dabei nicht nur im Menschen, sondern auch

Einleitung

an anderen Organismen wie Zebrafisch und Taufliede beschrieben [100,101].

Aus der Sicht der regenerativen Orthopädie und Unfallchirurgie ist dabei besonders die Stimulation der Synthese von extrazellulärer Matrix und die Verhinderung des Abbaus derer durch Stimulierung kataboler Enzyme interessant [102].

Die erste Beschreibung von BMP datiert auf das Jahr 1965 als *Urist* eine Knochenneubildung in Muskeln von Mäusen beobachtete, nachdem ihnen ein Extrakt aus demineralisiertem Knochen appliziert wurde [103]. Damals war jedoch noch nicht klar um welches Protein es sich genau handelt. Dies wurde erst in den 1980er Jahren durch *Wozney et al.* herausgefunden, die erstmalig die Struktur von BMP-3 analysieren und sequenzieren konnte [104]. Bis heute wurden über 20 Mitglieder der BMP-Familie beschrieben [100]. Die große Gruppe der BMPs kann abhängig von ihrer Sequenz und Funktion in vier Unterfamilien eingeteilt werden: BMP-3 und 4; BMP-5,6,7,8a und 8b; BMP-9,10 sowie BMP-12,13,14. Dabei zeigen vor allem BMP-2,4 und 7 ein hohes osteogenes Potential [105,106]. Aber BMPs sind, anders als der Name vermuten lässt, nicht nur an der Regulation von Stützgeweben beteiligt, sondern auch an embryonalen Entwicklungsprozessen wie der epidermalen Induktion oder der Bildung der Neuralleiste. Diese Beteiligung an grundlegenden Prozessen der Organogenese zeigt die hohe Stabilität und Konservierung der Proteine aus evolutionärer Sicht [101,107].

Strukturell sind die BMPs als homo- oder heterodimere Molekül aus Polypeptidketten aufgebaut, welche von Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Durch die Dimere Struktur zeigen die BMPs im Körper eine erhöhte Stabilität und verlängerte Halbwertszeit [108,109]. Sie vermitteln ihre Wirkung über spezifische, membranständige Rezeptoren. Die Anordnung der Aminosäuresequenzen zeigt dabei in allen BMPs eine identische Sequenz in der N-terminalen Carboxylgruppe [110]. Synthetisiert werden die BMPs als große Vorläuferproteine die aus einem Signalpeptid, einer N-terminalen Carboxylgruppe und einer Prodomäne bestehen. Die N-terminale Carboxylgruppe stellt dabei das aktive Protein dar, welches intrazellulär proteolytisch abgespalten wird. Für die Sekretion des Proteins ist das Signalpeptid für die Proteinfaltung die Prodomäne entscheidend [111].

Aus klinischer Sicht sind insbesondere BMP-2 und BMP-7 interessant. Beide kommen bereits seit einiger Zeit in der Therapie von atrophischen Pseudarthrosen zum Einsatz. Hier spielen beide BMPs aufgrund ihres hohen osteogenen Potentials eine klinisch

Einleitung

wichtige Rolle und kommen regelmäßig beim Versagen der Standardtherapie zum Einsatz [112]. Aber auch im Bereich der regenerativen Knorpeltherapien sind BMPs ein vielversprechender Ansatz. Dank ihrer chondrogenen Eigenschaften gelten sie als wichtiger Schlüssel zu regenerativen Knorpeltherapien [88,113,114].

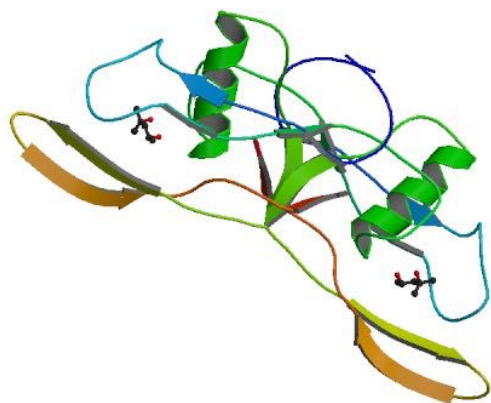


Abbildung 4: Ultrastruktur der BMPs am Beispiel von heterodimeren BMP-2. Abbildung entnommen aus [105].

1.3.2.1. BMP-7

Die biologischen Eigenschaften von BMP-7, oder auch *Osteogenic Protein-1* (OP-1) genannt, sind extrem vielfältig und wurden in einer Vielzahl von experimentellen Arbeiten untersucht. So ist BMP-7 nicht nur in einem breiten Spektrum von Geweben während der embryonalen Entwicklung exprimiert, sondern auch in der Frühphase der Frakturheilung beteiligt [115,116]. Knock-out Mäuse die nach der Geburt kein BMP-7 exprimieren können, zeigen neben einer Fehlentwicklung der Niere auch vielfältige Skelettfehlbildungen an den Extremitäten und im Stammskelett [117,118].

Besonders die Eigenschaften von BMP-7 auf die Knochen und Knorpelbildung wurden früh erkannt. Bereits 1993 konnten *Asahina et al.* nachweisen, dass BMP-7 die Chondrogenese *in vitro* stimuliert und einen anabolen Einfluss auf Knorpelgewebe hat [119]. Im direkten Vergleich zu BMP-2 konnte BMP-7 hier ein stärkeres chondrogenes Potential vorweisen [120]. *Chubinskaya et al.* konnten dann erstmalig den Nachweis erbringen, dass in humanen Chondrozyten endogenes BMP-7 exprimiert wird und die BMP-7 Konzentration im Gelenk altersabhängig zu sein scheint [121,122].

Einleitung

Auf molekularer Ebene beeinflusst BMP-7 dabei besonders den Stoffwechsel der Chondrozyten. So wird die Proteinsynthese von Matrixkomponenten gesteigert ohne dabei eine unkontrollierte Zellproliferation zu stimulieren [121,123–126]. Des Weiteren wird von BMP-7 nur die Produktion von knorpelspezifischen Matrixproteinen wie Kollagen II und VI, sowie Aggrecan, Decorin, Fibronectin und Hyaluronan angeregt [124,126–128]. Im Vergleich zu anderen BMPs wie BMP-2, 4 und 6 stimuliert BMP-7 wesentlich besser die Synthese dieser Matrixbestandteile ohne zu einer Hypertrophie der Chondrozyten zu führen [129]. Die Effekte waren dabei sowohl in normalen, als auch arthrotischen Chondrozyten von jungen und alten Spendern gleichermaßen nachweisbar [121,125,130,131].

Ein stimulierender Effekt auf die Matrix abbauenden Enzyme wie MMP-1,3 oder 13 konnte nicht beobachtet werden, vielmehr wurde die Synthese dieser Enzyme von BMP-7 verhindert [132,133]. BMP-7 inhibiert hierzu vermutlich die Transkription von NF- κ B und AP-1 und führt so zu einer Inhibierung der MMPs [134]. In einer weiteren Studie konnte insbesondere auch gezeigt werden, dass BMP-7 das nach einem Knorpelschaden hoch exprimierte ADAM-TS5 gezielt antagonisiert und so den Verlust von Matrixbestandteilen aufhalten kann [135].

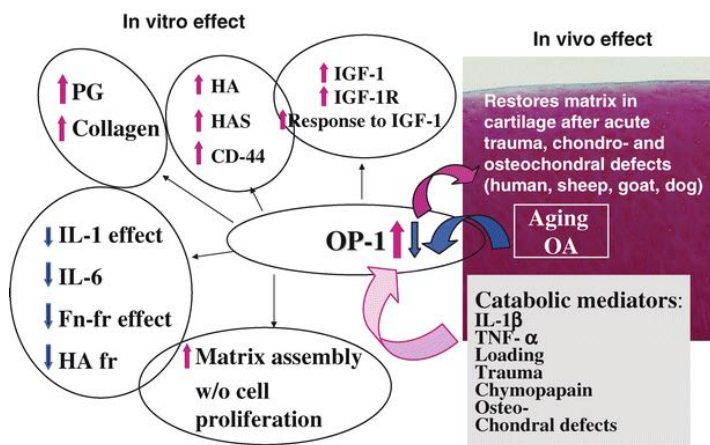


Abbildung 5: Übersicht über die Wirkungen von BMP-7 (OP-1) auf den hyalinen Knorpel. Abbildung entnommen aus [136].

1.4. Zielsetzung des Versuchsvorhabens

Mit dieser Arbeit soll ein neuartiger Ansatz zur Prävention von degenerativen Knorpelschäden mittels eines thermosensitiven Hydrogels basierend auf Pluronic P-123® und rekombinant hergestelltem BMP-7 vorgestellt werden.

Dabei steht vor allem die Prävention der Arthrose nach traumatischen Ereignissen und im Rahmen degenerativer Prozesse im Fokus der Studie. Der Behandlungsansatz verfolgt dabei eine Anregung der Proliferation des entsprechenden Knorpelgewebes *in vivo*, von dem die Patienten langfristig profitieren können. So könnten eventuell invasivere Therapien wie der operative Gelenkersatz hinausgezögert werden.

In der experimentellen Studie soll bei Mäusen mittels eines operativen Eingriffs ein degenerativer Knorpelschaden induziert werden, wie er beispielsweise am Menschen nach sporttraumatologischen Ereignissen auftreten kann. Dazu wird operativ der mediale Meniskus destabilisiert und somit die Arthrose durch eine veränderte Biomechanik im Gelenk induziert. Anschließend erhalten die Tiere eine intraartikuläre Injektion eines BMP-7 augmentierten thermosensitiven Hydrogels, nur das BDI-Hydrogel oder keine Injektion nach der Operation. Als Kontrolle dient das kontralaterale, nicht operierte Kniegelenk. Zum Vergleich der Gruppen erfolgt anschließend eine histologische Beurteilung sowie eine Analyse des Urins auf Knorpelabbauprodukte.

Ziel des Versuchsvorhabens ist die Prüfung eines mit Wachstumsfaktoren beladenen Hydrogels hinsichtlich einer chondroprotektiven und -induktiven Wirkung im arthrotischen Kniegelenk der Maus.

Wir hypothesieren, dass das mit BMP-7 augmentierte BDI-Hydrogel einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Mit Wachstumsfaktoren beladene Hydrogele könnten damit bei positiven Ergebnissen ein geeigneter Therapieansatz für die Prävention von Arthrose beim Menschen sein.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsartikel, Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Typ/Name	Firma
Antikörper	Anti-Aggregan Cat. AB 1031	Milipore, USA
Antikörperfärbekit	Vecastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, USA
DAB	Diamino-Benzidine	Roth, Deutschland
Dest. Wasser	Aqua dest.	Klinikapotheke, LMU
BDI-Hydrogel	Pluronic® 123- BDI, FSC028	LivImplant, Deutschland
BMP-7	rh-BMP-7	Olympus, Frankreich
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, USA
EDTA	EDTA, rein	Merck, Deutschland
ELISA-Kit, C2C	Mouse Collagen Type II; MBS725817	mybiosource.com, Kanada
Eosinlösung	Eosin 1%	Sigma, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolut	Merck, Deutschland
Ethanol 70%	Ethanol 70%	Klinikapotheke LMU
C6N6FeK3	Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Sigma, Deutschland
Einmalskalpelle (Fig.11 und 12)	Feather Stainless	Feather, Japan
Einmalspritzen	Omnifix®-solo	B.Braun, Deutschland
Formaldehyd	Formaldehyd 37%	Merck, Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S®	Eppendorf, Deutschland
Feindosierspritze	Omnican®-F	B.Braun, Deutschland

Material und Methoden

Hyaluronidase	Bovine testikuläre Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kanüle (26 Gauge)	Sterican®	B.Braun, Deutschland
Lochtuch, steril	Secudrape-steril ®	Sengewald, Deutschland
Mayer's H&E	Hämalaunlösung sauer n. Mayer	Roth, Deutschland
Methanol	Methanol, rein	Merck, Deutschland
Mikro-Iris-Schere		Aesculap, Deutschland
Nahtmaterial (resorbierbar)	Vicryl 5-0	Ethicon, Deutschland
Nahtmaterial (nicht resorbierbar)	Prolene 6-0	Ethicon, Deutschland
Nadelhalter		Aesculap, Deutschland
Natriumhydroxid	NaOH, 99,9%	Roth, Deutschland
Paraffin	Paraplast ®	Leica Biosystems, Deutschland
PBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco, USA
Pinzette, fein		Aesculap, Deutschland
Präparierschere		Aesculap, Deutschland
Roti®-Histol	Roti®-Histol	Roth, Deutschland
Roti®-Histokit	Roti®-Histokit	Roth, Deutschland
Salzsäure	0,1 M HCl	Merck, Deutschland
Tierfutter	ssniff ® M-Z	Ssniff, Deutschland
Toluidinblau	Toluidinblau	Sigma, Deutschland
TRIS	Trizma ® TRIS Base	Sigma Aldrich, Deutschland
Wägeschälchen	Rotilab Super	Roth, Deutschland

Material und Methoden

Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ , 30%	Roth, Deutschland
Watmanpapier	Watman-Paper	Roth, Deutschland

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien

2.1.2. Lösungen

Artikel	Typ/Name	Firma
EDTA/PBS	Entkalkungslösung	eigene Herstellung
Eosinlösung	Eosin 1%	Sigma, Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, USA
Mayer's H&E	Hämalaunlösung sauer n. Mayer	Roth, Deutschland
PBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco, USA
Toluidinpuffer	Toluidinpuffer	eigene Herstellung

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Lösungen

2.1.3. Tiere

Artikel	Typ/Name	Firma
Mäuse (n=38)	Weibliche C57BL/6 Tiere, 9 Wochen alt	Charles River, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Tiere

2.1.4. Anästhetika und Medikamente

Artikel	Typ/Name	Firma
Atimapezol	Atipam ® 5mg/ml	Eurovet, Niederlande
Augensalbe	Bepanthen ® Augensalbe	Bayer Vital, Deutschland
Buprenorphin	Buprenorphin animal 0,3 mg/ml	Bayer Vital, Deutschland
Clindamycin	Clindaseptin ® 25 mg/ml	Vetiquol, Österreich

Material und Methoden

Fentanyl	Fentanyl-Janssen 0,5 mg	Janssen-Cilag, Deutschland
Flumanezil	Anexate ® 1 mg/2 ml	Roche, Deutschland
Medetomidin	Antisedan 5 mg/ml	Orion, Finnland
Naloxon	Narcanti ® 0,4mg/ml	Bristol-Meyer, Deutschland

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Anästhetika und Medikamente

2.1.5. Geräte

Artikel	Typ	Firma
Autoklav	Varioklav 300	H+P, Deutschland
Digitalkamera	Axiocam	Zeiss, Deutschland
Einbettstation		Leica Biosystems, Deutschland
Käfige	IVC Sealsafe	Tecniplast, Italien
Kühlschrank	VarioFrost	Liebherr, Deutschland
Mikrotom	HM 340 E	ThermoScientific, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 2	Zeiss, Deutschland
Laborwaage	Typ 770	Kern, Deutschland
pH-Meter	Typ pH 525	WTW, Deutschland
Pipette	Reference® 2	Eppendorf, Deutschland
Statistiksoftware	Prism 7	GraphPad, USA
Wärmematte	37°C	Beurer, Deutschland
Wärmeschrank	37°C	Memmert, Deutschland
Photometer	Multiscan FC	ThermoScientific, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte und Software

2.2. Hydrogel

2.2.1. Herstellung des Hydrogels

Für die Versuche wurde ein thermosensitives Hydrogel auf Butan-Diisocyanat (BDI) Basis der Firma LivImplant, Deutschland verwendet. Die Grundkomponente des Hydrogels bildet dabei Pluronic® P123-BDI (# FSC028; LivImplant, Deutschland), welches mittels Butane-diidsocynat kettenverlängert wurde und somit die temperaturabhängigen Eigenschaften bekommt. Die kritische Lösungstemperatur liegt für das verwendete Hydrogel bei 26,2 °C. Bei 37°C zeigt sich neben einer guten mechanischen Stabilität auch eine gute Elastizität. Es besteht ein solider, geleeartiger Aggregatzustand bei 37 °C. Im gekühlten Zustand besteht ein wässriger Lösungszustand. Für die Versuche wurde eine Konzentration des BDI-Hydrogel von 1:11 gewählt. Diese Konzentration zeigte in Vorversuchen die besten Eigenschaften für eine *in vivo* Applikation [99].

Das Hydrogel wurde wie folgt vorbereitet: 1 g des gekühlten (8°C) BDI-Polymers wurde abgewogen, autoklaviert und anschließend mit 8 ml DMEM-Medium versetzt. Dieses Gemisch wurde dann für drei Tage bei 4°C aufbewahrt und täglich mithilfe einer sterilen Pipette unter einer Sterilbank durchmischt um eine homogene Flüssigkeit zu bekommen. Abschließend erfolgte am dritten Tag eine Sichtkontrolle des BDI-Hydrogels auf Homogenität und Reinheit. Um eine gute Lösung des rhBMP-7 im BDI-Hydrogel zu gewährleisten, wurde das als Pulver gelieferte rhBMP-7 mit wenigen Tropfen PBS-Lösung gelöst. Das BDI-Hydrogel wurde im Anschluss, am OP-Tag, unter sterilen Bedingungen mit 20 µg/ml rhBMP-7 (Olympus, Frankreich) versetzt und bis zur Injektion auf Eis gelagert, um eine optimale Rheologie und Applizierbarkeit zu gewährleisten.

2.3. Versuchsmodell

2.3.1. Instabilitätsmodell des Mäuseknies

Die Induktion der Arthrose im Mäuseknie wurde durch eine chirurgische Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM-Modell) hervorgerufen [137]. In diesem Modell wird das Menisko-tibiale Ligament (MMTL) durchtrennt. Dieses Band verbindet den medialen Meniskus mit dem medianen Abschnitt der proximalen Tibia (Abb. 6).

Material und Methoden

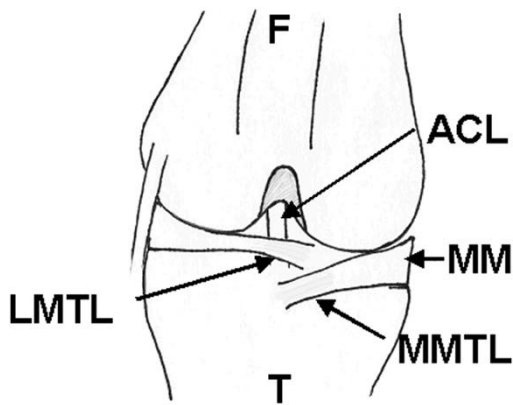


Abbildung 6: Rechtes Kniegelenk einer Maus von frontal. Zur Destabilisierung des medialen Meniskus wird das MMTL durchtrennt. F = Femur, T = Tibia, ACL = anteriores Kreuzband, MM = medialer Meniskus, MMTL = mediales meniskotibiales Ligament, LMTL = laterales meniskotibiales Ligament. Abbildung entnommen aus [137].

Dadurch wird der mediale Meniskus destabilisiert und weicht lateral zur Seite aus. Die Folge ist eine veränderte Gelenkkongruenz und eine Verkleinerung der Kontaktfläche im Gelenk. Eine Änderung der biomechanischen Belastungsachse führt zu einer lokalen erhöhten Gelenkbelastung. Diese Fehlbelastung mündet in einer arthrotischen Veränderung des Kniegelenks. Durch dieses Modell kann eine Arthrose erzeugt werden, die sowohl dem zeitlichen als auch in der Intensität dem Verlauf der Arthrose beim Menschen ähnlich ist [137].

2.3.2. Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse der Rasse C57BL/6 im Alter von 9 Wochen aus der Zucht der Firma Charles River, Deutschland verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß FELASA-Richtlinien in der Zentralen Versuchstierhaltung Innenstadt der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie. Der Tierversuch wurde der Regierung von Oberbayern als genehmigungspflichtiges Tierversuchsvorhaben angezeigt und von dieser genehmigt (Az.: 55.2-1-54-2532-150-13).

Die Tiere wurden in „individually ventilated cages“ (IVC)-Käfige unter SPF-I Bedingungen gehalten. Es handelt sich um Käfige mit HEPA-Filtern in der Zu-/Abluft mit den Maßen 365x207x140 (LxBxH) mm. Die Gruppengröße entsprach max. 5 Tieren je Käfig. Der Käfig besteht aus U-Temp Polyetherimid (PEI), ist extrem beständig und kann bei 134 °C autoklaviert werden. Die Farbe des Käfigs ist bernsteingelb, um das einfallende Licht in den Käfig zu reduzieren.

Material und Methoden

Der Lichtrhythmus wurde über Zeitschaltuhren alle 12 h zwischen hell und dunkel gewechselt. Durch die Lüftungsführung wird eine Luftgeschwindigkeit unter 0,2 m/s auf Höhe der Tiere erreicht. Die Temperatur in den IVC Käfigen hängt von der Raumtemperatur ab, die in der ZVH 20-22°C beträgt. Die Luftfeuchtigkeit beträgt zwischen 45-55%.

Jeder Käfig war mit einem roten Häuschen als Schutzbau, Nistmaterial, Nagematerial und Einstreu ausgestattet. Die Einstreu wurde einmal in der Woche gewechselt, ebenso das Nagematerial. Als Futter erhielten die Tiere pelletiertes Alleinfuttermittel sowie Wasser ad libitum. Die Pflege der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger in der ZVH. Ebenso erfolgten mehrmals täglich Kontrollen durch medizinisches Personal mit tierexperimenteller Erfahrung.

Nach Ankunft der Tiere in der ZVH schloss sich eine zweiwöchige Akklimatisierungsphase an, damit die Tiere sich an die neue Umgebung sowie das Personal gewöhnen konnten.

2.3.3. Versuchsaufbau

Die Tiere (n=38) wurden randomisiert auf die folgenden Gruppen aufgeteilt:

	Gruppe 1 BMP-7 und Hydrogel	Gruppe 2 Hydrogel	Gruppe 3 DMM-OP
4-Wochen Tiere	4	4	4
8- Wochen Tiere	7	7	7

Tabelle 6: Versuchsgruppen

Jedes Tier wurde einmal am linken Kniegelenk operiert. Nach dem jeweiligen Beobachtungszeitraum von vier oder acht Wochen erfolgte die Tötung der Tiere. Fünf Tiere dienten als Ausfallreserve für den gesamten Versuchszeitraum. Das kontralaterale unoperierte Kniegelenk diente als Kontrolle.

2.4. Versuchsdurchführung

2.4.1. Operative Vorbereitung und Anästhesie

Unmittelbar präoperativ wurden die Tiere gewogen und der aktuelle Gesundheitszustand der Versuchstiere erfasst. Anschließend erfolgte eine Injektionsnarkose. Dazu wurde ein Gemisch aus Fentanyl (0,05 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG) intramuskulär appliziert. Bis zum Wirkungseintritt der Narkose wurden die Tiere einzeln in einem Käfig beobachtet. Nach dem Wirkeintritt der Narkose erfolgte die Rasur des linken Hinterlaufs sowie die anschließende Desinfektion mittels 70%iger Ethanollösung. Die Tiere wurden anschließend in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert. Über einen Sauerstoffschlauch an der Schnauze erfolgte eine Applikation von 2l Sauerstoff pro Minute. Um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden wurde eine dexpanthenolhaltige Augensalbe aufgetragen. Als perioperative Antibiose wurde Clindamycin (45 mg/kg KG) verabreicht. Zuletzt erfolgte ein steriles Abdecken der Gliedmaße mittels eines Lochtuchs.

2.4.2. Operatives Vorgehen

Nach nochmaliger Desinfektion des Operationsgebiets und des gesamten linken Hinterlaufs mit 70%iger Ethanollösung erfolgte die ca. 4 mm lange Hautinzision medial des Ligamentum patellae. Die Gelenkkapsel wurde mit einer mikrochirurgischen (Mikro-Iris) Schere eröffnet. Durch eine feine chirurgische Pinzette wurde das Fettgewebe am kranialen Rand des medialen Meniskus sorgfältig abpräpariert. Es wurde darauf geachtet den Meniskus und andere Gelenkstrukturen nicht durch die Instrumente zu schädigen. Nach Darstellung der tibialen intercondylären Region, des vorderen Kreuzbandes und des medialen meniskotibialen Ligaments (MMTL) wurde dieses Ligament mit der mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Anschließend wurde die Gelenkkapsel mittels fortlaufender resorbierbarer Naht der Stärke 6-0 verschlossen. Der Wundverschluss erfolgte mittels resorbierbaren Einzelknopfnähten der Stärke 5-0.

Direkt nach dem Verschluss der Gelenkkapsel erfolgte je nach Versuchsgruppe die intraartikuläre Injektion. Um eine gute Injizierbarkeit des BDI-Hydrogels zu gewährleisten, erfolgte bis kurz vor der Injektion die Lagerung der Spritze auf Eis. Es

Material und Methoden

wurden jeweils 10 µl BDI-Hydrogel oder 10 µl BDI-Hydrogel/BMP-7 Gemisch in das Knie injiziert. Die Injektion erfolgte mittels einer Feindosierspritze und einer 26 Gauge Kanüle. Aufgrund der postoperativ zu erwartenden Schmerzen wurde noch in Narkose Buprenophin (0,1 mg/kg KG) s.c. appliziert.

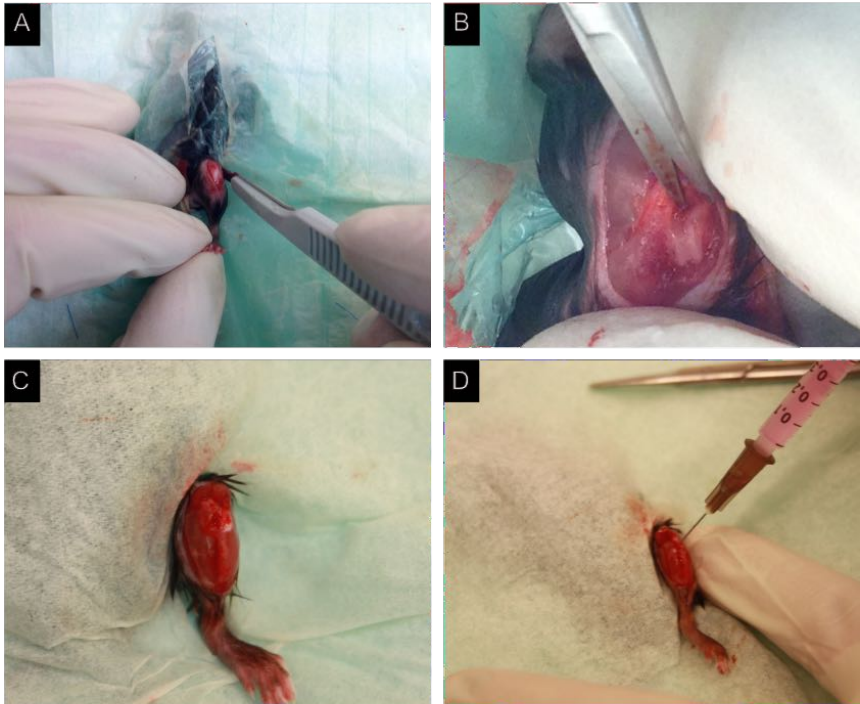


Abbildung 7: Operationsablauf am linken Hinterlauf; A: Hautinzision und Eröffnung der Gelenkkapsel; B: Durchtrennung des MMTL; C: OP-Situs vor Wundverschluss; D: Injektion des BDI-Hydrogels

Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch s.c. Injektion von 0,2 ml Kochsalzlösung (0,9% NaCl) mit einem Gemisch von Naloxon (1,2 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Atipamezol (2,5 mg/kg KG). Bis zum Erwachen wurden die Tiere unter einer Infrarotlampe gelagert um eine postoperative Unterkühlung zu verhindern. Nach dem Erwachen wurden die Tiere in den Käfig zurückgegeben.

2.4.3. Postoperative Nachsorge

Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Tiere. Hierbei wurde insbesondere auf Unregelmäßigkeiten in der Bewegung oder im Verhalten geachtet. Es erfolgte bis zum dritten postoperativen Tag eine Analgesie mit Buprenophin s.c. (0,1 mg/kg KG). Ergaben sich Auffälligkeiten, wurde das Score-Sheet zur Beurteilung herangezogen. Ansonsten erfolgte dessen Anwendung alle drei Tage.

2.4.4. Tiertötung

Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils am 28. oder 56. postoperativen Tag. Zuvor erfolgte noch eine nichtinvasive Gewinnung von Spontanurin mittels Bauchmassage. Die Tiere wurden gewogen und anschließend mittels CO₂ euthanasiert.

2.4.5. Materialentnahme und -aufbereitung

Die Kniegelenke der linken Seite wurden nach der Euthanasie von Haut und Muskeln freipräpariert und nach Durchtrennung von Femur und Tibia entnommen. Es wurde darauf geachtet möglichst alle Gewebeanteile bis auf die Kapsel zu entfernen. Stichprobenartig wurde Das rechte unoperierte Kniegelenk wurde ebenso entnommen und stichprobenartig der Aufarbeitung zugeführt. Im direkten Anschluss an die Präparation erfolgte die Fixierung in gekühlter, 4%iger Paraformaldehydlösung für 24 Stunden bei 8°C. Im nächsten Schritt wurden die Proben jeweils dreimal für 15 Minuten mit PBS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte die weitere histologische Aufarbeitung.

2.5. Auswertung

2.5.1. Sichtkontrolle bei Explantation

Bei Explantation der Kniegelenke wurde auf makroskopische Veränderungen der äußerlichen Gelenkkapsel geachtet. Das Kniegelenk wurde nicht eröffnet.

2.5.2. „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Bestimmung von Knorpelabbauprodukten (C2C) im Urin

Um den Abbau des Knorpels in den einzelnen Versuchsgruppen zu quantifizieren, wurde mittels eines ELISA das knorpelspezifische Abbauprodukt von Kollagen 2, das *Collagen 2 Cleavage Product (C2C)* im Urin quantifiziert. Dies geschah mithilfe eines kompetitiven ELISA-Kits der Fa. MyBioSource, Vancouver, Kanada. Hierzu wird anstatt eines zweiten, markierten Antikörpers, ein markiertes Kompetitor-Antigen verwendet. Dieses Antigen ist dem eigentlichen Analyten (Antigen) strukturell ähnlich und konkurriert mit diesem um die Bindungsstelle am Antikörper. Je weniger Analyt in einer Probe existent ist, desto mehr Kompetitor bindet an den Antikörper und die Farbreaktion ist intensiver.

Material und Methoden

Die Messungen wurden laut Herstellerprotokoll durchgeführt. In dem verwendeten Kit ist der Antikörper (CoL—2CAV) bereits an die Mikrotiterplatte gebunden. Für die Messungen wurden die Reagenzien laut Herstellerangaben vorbereitet und der Urin wurde mittels PBS auf ein Verhältnis von 1:5 verdünnt. Zuerst wurden jeweils 100 µl des im Kit enthaltenen Standards in die vorgesehenen Wells pipettiert. Anschließend wurde jeweils 100 µl der verdünnten Proben in die entsprechenden Wells pipettiert. Als Leerkontrolle dienten 100 µl PBS. Anschließend wurde jeweils 10 µl Balancelösung zu den Proben hinzugegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 50 µl Konjugat (CoL-2CAV-HRP) in jedes Well, außer der Leerkontrolle. Die Proben wurden gut gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die überschüssigen Reaktionspartner mittels eines Waschpuffers entfernt. Insgesamt wurde die Mikrotiterplatte fünfmal gewaschen. Nun wurden jedem Well 100 µl Peroxidase (Substrat A und B) hinzugefügt und gut durchmischt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Enzym-Substratkomplex bildet nun als Reaktionsprodukt einen blauen Farbkomplex. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stoppreagenz beendet. Dabei zeigte sich ein Farbstoffumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der Proben wurden mittels der konstruierten Standardkurve der bekannten Konzentrationen erstellt. Dabei verhält sich die Farbintensität umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

2.5.3. Histologie

2.5.3.1. Entkalkung

Für die weitere histologische Aufarbeitung der Kniegelenke war eine Entkalkung der Knochenblöcke notwendig um diese in Paraffin einzubetten und schneiden zu können. Die Entkalkung der Probenstücke erfolgte in 20%iger EDTA/PBS Lösung (pH 8) für vier Wochen. Die EDTA/PBS Lösung bildet mit dem im Knochen enthaltenen Calcium wasserlösliche Komplexe und führt so zu einer Erweichung des Knochengewebes. Um eine vollständige Entkalkung zu gewährleisten wurde die EDTA/PBS Lösung zweimal die Woche gewechselt.

2.5.3.2. Einbettung

Die entkalkten Proben wurden nach folgendem Protokoll auf die Paraffineinbettung vorbereitet:

- 3x Waschen in PBS für jeweils 15 min bei Raumtemperatur
- Aufsteigende Ethanolreihe zum Entwässern
 - 1h 50% EtOH
 - 1h 70% EtOH
 - 1h 80% EtOH
 - 1h 90% EtOH
 - 1h 100% EtOH
 - 1h 100% EtOH
 - 5 min Roti ®-Histol
 - 5 min Roti ®-Histol
- Durchtränken in Einbettmittel
 - 1h Paraplast Paraffin Medium bei 60°C
 - 1h Paraplast Paraffin Medium bei 60°C
 - 24h Paraplast Paraffin Medium bei 60°C

Beim darauffolgenden Einbetten wurden die Kniegelenke so orientiert, dass ein späteres Schneiden der Proben in sagittaler Schnittrichtung möglich ist. Die Proben wurden in Einbettkassetten gegeben, mit Paraplast ausgegossen, ausgerichtet und bei 4°C für 24h ausgehärtet.

2.5.3.3. Anfertigen der Schnittpräparate

Nach dem Aushärten wurden die Kniegelenke in sagittaler Schnittrichtung auf einem Rotationsmikrotom in 8 µm dünne Schnitte geschnitten. Jeweils drei Schnitte wurden in einem 55°C warmen Wasserbad auf einen Objektträger aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht.

2.5.3.4. Histologische Färbungen

2.5.3.4.1. Hämatoxyllin und Eosin (H&E) Färbung

Für eine erste Evaluierung der Schnitte und eine Beurteilung der Morphologie erfolgte eine H&E Färbung. Jeder zweite Schnitt wurde mittels H&E angefärbt. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll angefertigt:

- Entparaffinisieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte
 - 5 min Roti®-Histol
 - 5 min Roti®-Histol
 - 3 min 100% EtOH
 - 3 min 100% EtOH
 - 5 min 90% EtOH
 - 5 min 80% EtOH
 - 5 min 70% EtOH
 - 3 min Aqua dest.
 - 5 min 0,1% Mayer's Hämatoxylinlösung 1:5
 - 3 min Waschen mit Leitungswasser
 - 3 min 95% EtOH
 - 3 min 100% EtOH
- Färbung
 - 5 min Inkubation mit 1 % Eosinlösung
- Dehydrierung der Schnitte
 - 5 min 70% EtOH
 - 5 min 80% EtOH
 - 5 min 90% EtOH
 - 5 min 100% EtOH
 - 5 min 100% EtOH
 - 5 min Roti®-Histol
 - 5 min Roti®-Histol

Abschließend wurden die Schnitte mit Roti®-Histokit eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Material und Methoden

2.5.3.4.2. Toluidinblaufärbung

Die Toluidinblaufärbung dient zur metachromischen, blauvioletten Darstellung des extrazellulären Proteoglykangehalts des hyalinen Knorpels und erlaubt damit eine genaue Beurteilung des Aggrecanverlustes. Jeder dritte Schnitt wurde mittels Toluidinblau angefärbt.

- Entparaffinisieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte
 - 5 min Roti®-Histol
 - 5 min Roti®-Histol
 - 3 min 100% EtOH
 - 3 min 100% EtOH
 - 5 min 90% EtOH
 - 5 min 80% EtOH
 - 5 min 70% EtOH
 - 3 min Aqua dest.
- Färbung
 - 10 min 0,1% Toluidinblau in Toluidinpuffer, pH 2,5 und 0,1M HCl
 - 1 min Abtropfen lassen auf Wattman-Papier
 - 3 min 2%K₃Fe(CN₆)
 - 1 min Abtropfen lassen auf Wattman-Papier

Abschließend wurden die Schnitte wie unter 2.5.3.4.1. beschrieben dehydriert und mit Roti®-Histokit eingedeckelt sowie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5.3.4.3. Immunhistochemische Färbung für Aggrecan

Um den Aggrecanverlust genauer darstellen zu können, erfolgte die Färbung von ausgewählten Schnitten mit einer Antikörperfärbung gegen Aggrecan. Verwendet wurde Anti-Aggrecan Antikörper Cat.-nr. Ab 1031 von Chemicon/Milipore, USA.

- Entparaffinisieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte
 - 5 min Roti®-Histol
 - 5 min Roti®-Histol
 - 3 min 100% EtOH
 - 3 min 100% EtOH
 - 5 min 90% EtOH

Material und Methoden

- 5 min 80% EtOH
- 5 min 70% EtOH
- 3 min Aqua dest.
- Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität
 - 20 min Objektträger in 75 ml Methanol und 2,5 ml H₂O₂ lagern
 - 2 x 3 min Waschen mit PBS
- Inkubieren mit Hyaluronidase
 - 30 min 0,2% Hyaluronidase in PBS pH 5
 - 2 x 3 min Waschen mit PBS
- Blocken des Hintergrunds
 - 60 min 1% BSA/PBS Lösung pH 7,4
- Inkubieren mit Primärantikörper
 - 12 h Anti-Aggregan 1:200 gelöst in 1%iger BSA/PBS Lösung
 - 2 x 3 min Waschen mit PBS
- Inkubieren mit Sekundärantikörper
 - 60 min Vecastain ABC Kit Anti-Rabbit, 1:200
 - 2 x 3 min Waschen mit PBS
- Inkubieren mit ABC-Komplex
 - 30 min Vecastain ABC reagent; 2,5 ml PBS mit je 1 Tropfen A und B Reagenz
- DAB-Färbung
 - 7 min DAB Färbung im Dunkeln
 - 1 min Waschen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung
 - 20 sec Mayer's Hämalaun 1:5

Abschließend wurden die Schnitte wie unter 2.5.3.4.1. beschrieben dehydriert und mit Roti®-Histokit eingedeckelt sowie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5.4. Mikroskopie und Beurteilung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Deutschland) bei bis zu 40-facher Vergrößerung. Die Bilder der Schnitte wurden mittels einer Digitalkamera (Axiocam, Zeiss, Deutschland) in den Computer eingespeist. Die H&E und Toluidinblau gefärbten Präparate wurden geblindet von zwei unabhängigen Untersuchern mittels eines Punktesystems bewertet. Die Bewertung erfolgte analog nach dem Punktesystem welches von *Little et al.* 2007 veröffentlicht wurde [138]. Hierbei wurden die Knorpeloberfläche (H&E) als auch der Aggrecangehalt (Toluidinblau) des Knorpels an den sagittalen Schnitten separat begutachtet und entsprechend bewertet. Die Punkte wurden jeweils für Femur und Tibia getrennt vergeben und anschließend addiert. Somit erhält jeder Schnitt eine Punktzahl zwischen null und 14 für die Struktur des Knorpels und zwischen null und sechs für den Aggrecangehalt. Die jeweils höchste absolute Punktzahl eines Tieres ging dann in die weitere Auswertung mit ein. Je höher die Punktzahl ist, desto schwerwiegender ist die Arthrose im betreffenden Gelenk, wobei ab 10 Punkten für die Struktur von einer schweren Arthrose gesprochen kann. Die unoperierten kontralateralen Kniegelenke dienten als Kontrolle.

Um den Aggrecanverlust auch auf zellulärer Ebene genauer darstellen und verifizieren zu können, wurden von mindestens zwei Tieren pro Gruppe die Kniegelenke mit einer Antikörperfärbung gegen Aggrecan gefärbt und miteinander verglichen. Hierbei wurde insbesondere auf die Chondrozytenmorphologie und den umgebenden Saum geachtet. Arthrotisch veränderte Chondrozyten hypertrophieren und zeigen sich aufgrund des fehlenden Aggrecans optisch leer.

Eigenschaften	Punkte
I. Struktur	
Normaler, hyaliner Knorpel	0
Aufgeraute Oberfläche und kleine Auflagerungen	1
Teilweiser Verlust der oberflächlichen Schicht	2
Horizontale Risse zwischen kalzifiziertem und nicht kalzifiziertem Knorpel; aber kein Verlust von kalzifiziertem Knorpel	3
Geringer Verlust von nicht kalzifiziertem Knorpel (< 10% der Oberfläche)	4
Moderater Verlust von nicht kalzifiziertem Knorpel (10%-50% der Oberfläche)	5
Schwerer Verlust von nicht kalzifiziertem Knorpel (>50% der Oberfläche)	6
Verlust des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen	7
II. Aggrecanverlust	
Normaler, gleichmäßig gefärbter Knorpel	0
Verminderte Toluidinblaufärbung (TB), aber kein vollständiger Verlust der Färbung im nicht kalzifiziertem Knorpel	1
Teilweiser Verlust der TB-Färbung in nicht kalzifiziertem Knorpel (<30%)	2
Diffuser Verlust der TB-Färbung in nicht kalzifiziertem Knorpel (>30%)	3

Tabelle 7: Histologisches Scoringsystem; modifiziert nach [138].

2.5.5. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7 (GraphPad, USA). Als Test wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ angenommen. Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der 4-Wochen Tiere

3.1.1. Klinischer Verlauf

Insgesamt wurden 14 gleichaltrige Mäuse der Rasse C57BL/6 operiert. Am zweiten postoperativen Tag musste ein Tier aufgrund einer eitrigen Wundheilungsstörung am operierten Kniegelenk euthanasiert werden. Ein weiteres Tier wurde am fünften postoperativen Tag morgens tot im Käfig aufgefunden. Die festgestellten Bissspuren am Kadaver ließen einen Kampf mit einer anderen Maus wahrscheinlich erscheinen. Die beiden Ausfälle wurden durch Nachoperation der Reservetiere ausgeglichen, so dass 12 Tiere (jeweils vier pro Gruppe) in die Auswertung eingehen. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein durchschnittliches Gewicht von 19,8 g (\pm 3,4 g). Bei Tötung betrug das durchschnittliche Gewicht 22,6 g (\pm 4,6 g)

	Gruppe 1 DMM-OP	Gruppe 2 DMM-OP, BMP-7 und Hydrogel	Gruppe 3 DMM-OP und Hydrogel
Operierte Tiere	5	5	4
Ausfälle	1	1	0
Auswertung	4	4	4

Tabelle 8: Klinischer Verlauf 4-Wochen Tiere; Gesamtüberblick

Das postoperative Mobilisationsverhalten der Tiere war insgesamt gut. Die meisten Tiere belasteten sofort postoperativ wieder das operierte Bein und begannen bereits nach kurzer Zeit damit im Käfig zu klettern. Andere wenige Tiere brauchten hingegen etwas länger. Hier fiel über kurze Zeit ein leichtes Entlastungshinken auf, welches sich aber nach kurzer Zeit legte. Am ersten postoperativen Tag zeigten alle Tiere eine exzellente Mobilität und belasteten allesamt das operierte Bein voll.

Ergebnisse

3.1.2. Makroskopische Beurteilung nach Explantation

Die Wunden erschienen bei der Explantation alle reizlos und zeigten eine regelrechte Narbenbildung. Nach Entfernung der Haut zeigte sich das subkutane Gewebe ebenfalls reizlos und unauffällig mit einer Ausnahme bei der sich ein abgekapseltes Fadengranulom zeigte. Heterotrope Ossifikationen konnten nicht festgestellt werden.

3.1.3. Histologische Ergebnisse

3.1.3.1.1. Struktur des Knorpels

Nach vier Wochen zeigte sich in der mit BMP-7 und BDI-Hydrogel behandelten Gruppe eine durchschnittliche Punktzahl von 2,0 Punkten ($SD \pm 0,82$), was die niedrigste Punktzahl bei den operierten Tieren darstellt und ein signifikant ($p=0,029$) besseres Ergebnis ist als in der DMM-OP Gruppe. In beiden Gruppen zeigten die Tiere eine durchweg erhaltene Struktur des hyalinen Knorpels ohne größere Defektzonen. Eine Freilegung des subchondralen Knochen und damit eine schwere Arthrose war nicht feststellbar. In der BMP-7 Gruppe zeigte sich als schwerster Defekt bei einem Tier ein kleiner Einriss zwischen kalzifiziertem Knorpel und nicht kalzifiziertem Knorpel (Abb.10). Ein Verlust von kalzifiziertem Knorpel war nicht feststellbar.

Die Gruppe welche nach der DMM-Operation nur das BDI-Hydrogel injiziert bekommen hat, zeigt bei einer durchschnittlichen Punktzahl von 5,5 ($SD \pm 3,5$) bereits eine deutlich schlechtere Knorpelstruktur und teilweise ausgeprägte arthrotische Veränderungen im Gelenk. Zwei Tiere zeigten einen moderaten Verlust von kalzifiziertem Knorpel, wobei sich der Schwerpunkt des Knorpelverlustes auf den hinteren tibialen Gelenkanteil beschränkte. Bei einem Tier konnten kleinflächige Stellen beobachtet werden an welchen der subchondrale Knochen bereits freilag. Am ausgeprägtesten war in dieser Gruppe der Verlust von kalzifiziertem Knorpel, welcher bei drei Tieren festzustellen war und teilweise mehr als 50% der Gelenkoberfläche betraf. Auch hier waren die Veränderungen überwiegend im Bereich der Tibia festzustellen.

In der Gruppe welche nach der DMM-OP keinerlei weitere Behandlung bekommen hat, zeigten sich die am ausgeprägtesten arthrotischen Veränderungen. Die Punktzahl betrug hier 7,0 Punkte im Durchschnitt ($SD \pm 4,7$). Bei einem Tier dieser Gruppe konnte

Ergebnisse

mit 12 Punkten die schlechteste Punktzahl aller vier Wochen alten Tiere festgestellt werden. Es zeigte sich in diesem Gelenk ein ausgeprägter Verlust von kalzifiziertem Knorpel, welcher über 50% der Gelenkfläche betraf, sowie eine Freilegung des tibialen subchondralen Knochens. Die anderen Tiere zeigten ebenfalls einen überwiegenden Verlust des kalzifizierten Knorpels. Ein Tier der Gruppe zeigte eine überraschend intakte und nahezu unveränderte Gelenkstruktur auf. Es fielen nur minimale Oberflächenunregelmäßigkeiten und kleinere Auflagerungen auf.

Die nicht operierten kontralateralen Gelenke zeigten eine durchschnittliche Punktzahl von 1,75 (SD \pm 2,9) und wiesen nur sehr moderate Veränderungen im Knorpel auf. Bei zwei Tieren zeigte sich eine leicht aufgeraute Oberfläche, sowie bei einem Tier einen stellenweisen, minimalen Verlust der oberflächlichen Schicht.

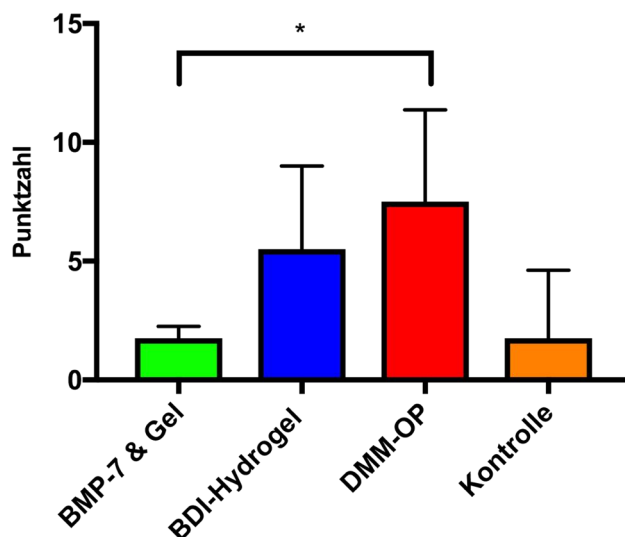


Abbildung 8: Ergebnisse der geblindeten Bewertung der Knorpelstruktur nach vier Wochen ($p=0,029$). Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Ergebnisse

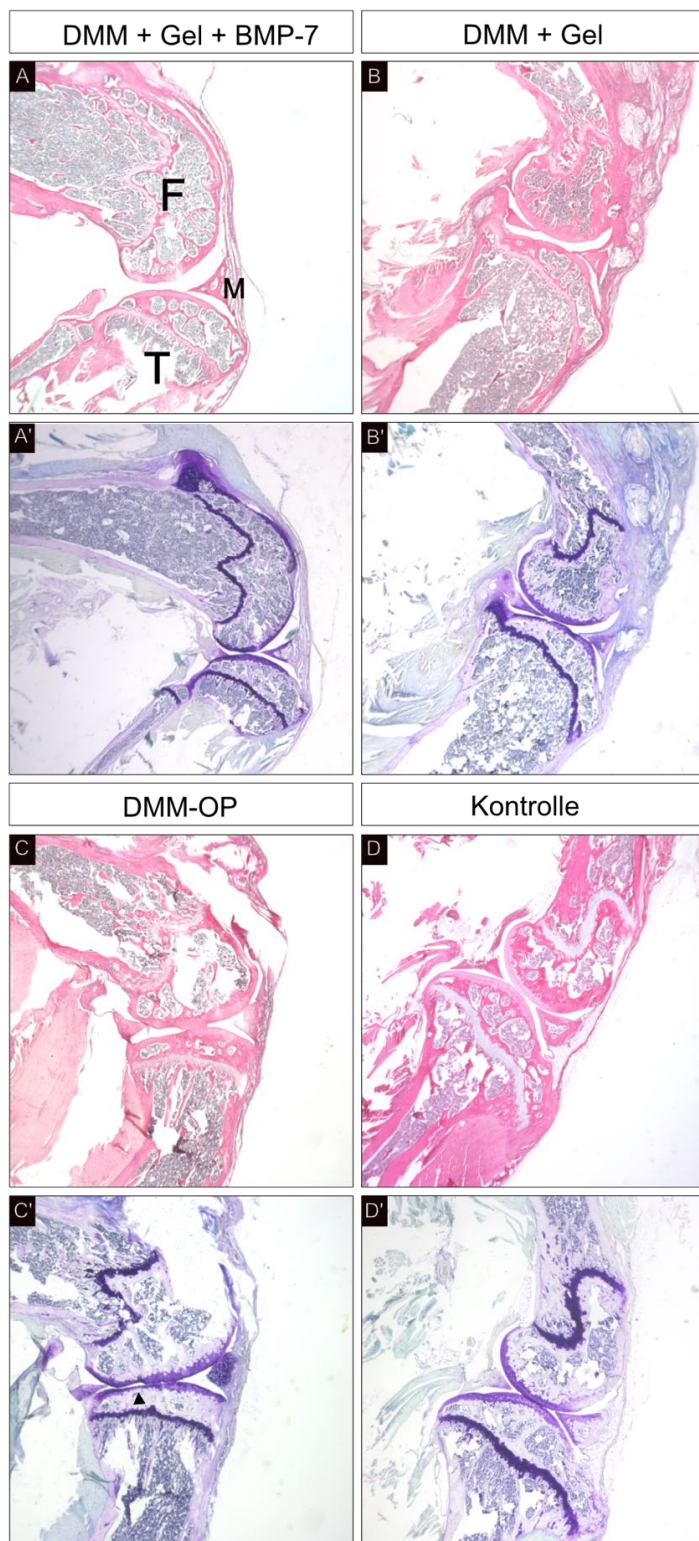


Abbildung 9: Übersicht nach vier Wochen (*F: Femur, T: Tibia, M: Meniskus; 2,5x Vergrößerung*). Die obere Reihe zeigt die Knorpelstruktur in H&E- Färbung, die untere Reihe den Aggrecanverlust der korrespondierenden Schnitte mittels Toluidinblaufärbung. A' zeigt eine kräftige Anfärbung über den gesamten Gelenkknorpel. Als Vergleich kann die Epiphysenfuge dienen, welche einen hohen Aggrecangehalt aufweist. In Bild C' ist bereits eine Höhenminderung des Knorpels im posterioren Bereich der Tibia festzustellen (*Pfeilkopf*).

Ergebnisse

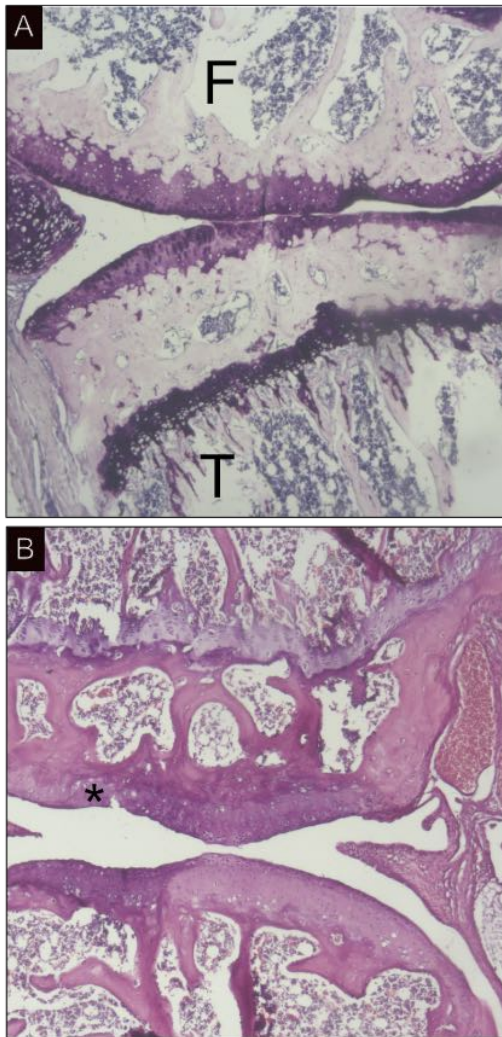


Abbildung 10: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels in Toluidinblaufärbung (5x Vergrößerung) nach vier Wochen (*F*: Femur, *T*: Tibia). Das obere Bild (*A*) zeigt ein Knie nach der DMM-OP. Auffällig ist die Verringerung der Knorpelstruktur im tibialen Bereich. Ebenso fällt tibial eine Verringerung der Anfärbung und damit ein Aggrecanverlust auf. Im Bereich des Femurs zeigt sich eine besser erhaltene Knorpelarchitektur, sowie eine deutlichere Anfärbung vor allem der oberflächlichsten Knorpelschicht. Das untere Bild (*B*) zeigt ein Knie nach BMP-7-Hydrogel Behandlung. Im Vergleich zum oberen Bild stellt sich der Knorpel dicker dar und zeigt ein gleichmäßigeres Anfärbeverhalten. Der Stern markiert einen Riss zwischen dem kalzifizierten und nicht kalzifizierten Knorpel.

Ergebnisse

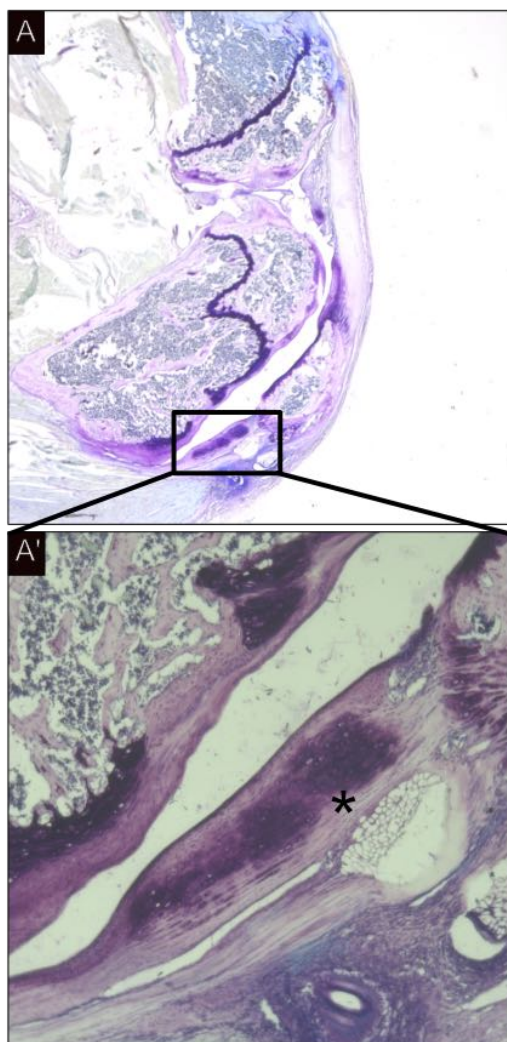


Abbildung 11: Die obere Übersichtsaufnahme (2,5x) zeigt ein Knie der BMP-7-Hydrogel Gruppe vier Wochen nach der Operation. Auffällig ist hier die starke Anfärbung im Bereich des Patellarsehnenansatzes. In dem unteren stark vergrößerten Bildausschnitt (20x) zeigt sich in der Sehne eine ektope Bildung von Chondrozyten (*mit Stern markiert*).

3.1.3.1.2. Aggrecangehalt

Bei der Beurteilung des Aggrecanverlustes nach vier Wochen, zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Beurteilung der Struktur. Die Tiere die BMP-7 erhielten, wiesen zusammen mit den Kontrollen, den geringsten Aggrecanverlust auf. Beide Gruppen kamen jeweils auf einen Mittelwert von 0,75 Punkten (BMP-7: $SD \pm 1,5$; Kontrolle: $SD \pm 0,96$). In der BMP-7 Gruppe zeigt nur ein Tier einen diffusen Verlust der Toluidinblaufärbung, während die anderen Tiere allesamt einen normalen, gleichmäßig angefärbten Knorpel ohne Aggrecanverlust zeigen. Im Bereich des Patellarsehnenansatzes konnte bei einem Tier aus der BMP-7 Gruppe eine ektope

Ergebnisse

Bildung von Chondrozyten beobachtet werden (Abb. 11). Die unoperierten Gelenke zeigten, wie auch schon in der Knorpelstruktur, nur geringe Veränderungen im Aggrecangehalt. Hier fiel bei zwei Tieren eine punktuell verminderte Anfärbung auf. Ein großflächiger Verlust der Anfärbung war nicht zu verzeichnen. In der Antikörperfärbung gegen Aggrecan, zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von Aggrecan im gesamten Gelenkknorpel. Die Chondrozyten waren dabei gleichmäßig verteilt und nicht hypertrophiert (Abb. 13).

Deutlicher fiel der Aggrecanverlust bei den Tieren auf, welche nur das BDI-Hydrogel bekommen hatten. Die durchschnittliche Punktzahl betrug 1,5 (SD \pm 1,5). Zwei Tiere dieser Gruppe zeigten einen deutlichen Verlust der Färbung im nicht kalzifiziertem Knorpel. Bei der Antikörperfärbung zeigten sich vereinzelt hypertrophe Chondrozyten mit reduzierter Aggrecanproduktion.

Deutlich stärker ausgeprägt war der Aggrecanverlust in der DMM-Gruppe mit einem mittleren Punktwert von 2,25 (SD \pm 0,96). Hier zeigte jedes Tier zumindest eine punktuell verminderte Anfärbung des Knorpels, zwei Tiere sogar einen großflächigen diffusen Verlust der Anfärbung in über 30% der Gelenkfläche. Schwerpunktmäßig war der Verlust im hinteren Tibiaplateau festzustellen. In der Antikörperfärbung fielen pro Gesichtsfeld die meisten hypertrophierten Chondrozyten auf, welche optisch leer erschienen (Abb. 13).

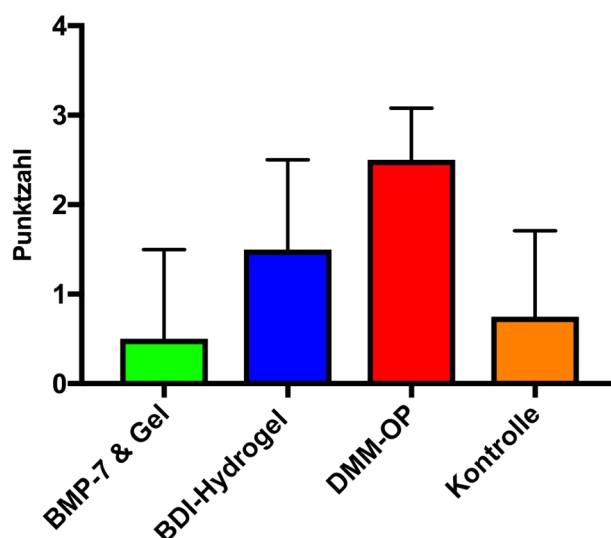


Abbildung 12: Ergebnisse der geblindeten Bewertung des Aggrecangehalts nach acht Wochen. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Ergebnisse

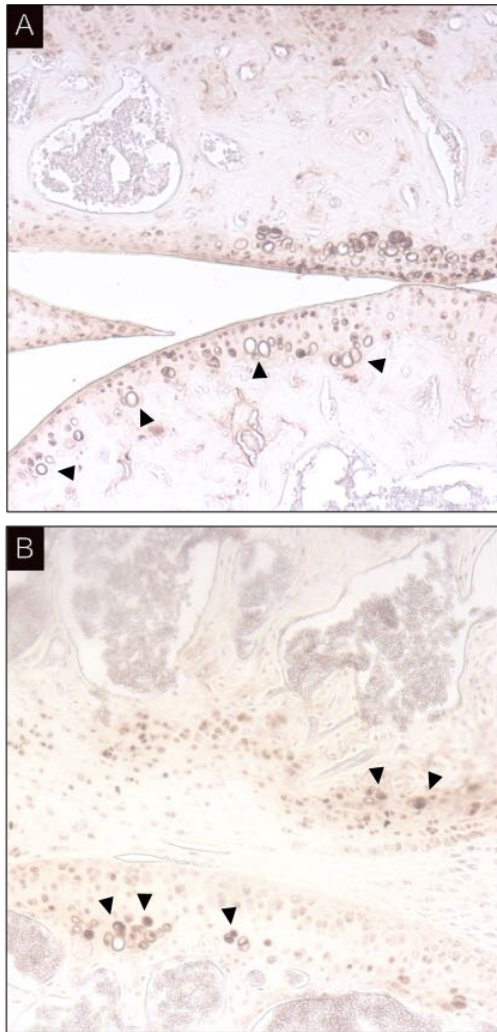


Abbildung 13: Vergrößerte Darstellung des Gelenknorpels in Aggrecan-Antikörperfärbung (5x Vergrößerung). Die obere Abbildung (A) zeigt ein Tier der DMM-Gruppe. Deutlich sichtbar sind die hypertrophen und blass erscheinenden Chondrozyten in der posterioren Tibia mit fehlendem umgebendem Saum (*schwarze Pfeilköpfe*). Dies spricht für eine verminderte Produktion von Aggrecan. Die untere Abbildung (B) zeigt dagegen kleine, nicht hypertrophierte Chondrozyten mit regelmäßigem Saum, was für einen gleichmäßigen Aggrecangehalt und konstante Produktion spricht. Dieses Tier wurde mit BMP-7-Hydrogel behandelt.

Ergebnisse

3.2. Ergebnisse der 8-Wochen Tiere

3.2.1. Klinischer Verlauf

Insgesamt wurden 22 gleichaltrige Mäuse der Rasse C57BL/6 operiert. Am dritten postoperativen Tag musste ein Tier aufgrund des schlechten objektiven Wohlbefindens euthanasiert werden. Der Ausfall eines Tieres wurde durch Nachoperation der Reservetiere ausgeglichen, so dass 21 Tiere (jeweils sieben pro Gruppe) in die Auswertung gingen. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein durchschnittliches Gewicht von 19,8 g (\pm 4,4 g). Bei Tötung betrug das durchschnittliche Gewicht 23,4 g (\pm 2,9 g)

	Gruppe 1 DMM-OP	Gruppe 2 DMM-OP, BMP-7 und Hydrogel	Gruppe 3 DMM-OP und Hydrogel
Operierte Tiere	7	7	8
Ausfälle	0	0	1
Auswertung	7	7	7

Tabelle 9: Klinischer Verlauf der 8-Wochen Tiere; Gesamtüberblick

Die meisten Tiere zeigten nach dem Aufwachen aus der Narkose eine spontane Bewegung der operierten Extremität und belasteten das operierte Bein vollständig. Nach Rückgabe in den Käfig kletterten die meisten Tiere sofort und ohne offensichtliche Einschränkungen an den Gittern hinauf. Die Tiere, welche postoperativ ein etwas zögerliches Verhalten zeigten, waren spätestens bei der Kontrolle am ersten postoperativen Tag vollständig mobil.

3.2.2. Makroskopische Beurteilung nach Explantation

Die Wundverhältnisse waren bei allen 22 Tieren unauffällig und reizlos. Es konnte keine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion festgestellt werden. Bei einem Tier in der BMP-7 Gruppe konnte eine dezente heterotrope Ossifikation im Bereich des operativen Zugangswegs festgestellt werden.

3.2.3. Histologische Ergebnisse

3.2.3.1.1. Struktur des Knorpels

Nach acht Wochen zeigte der Knorpel in allen operierten Gruppen ein ähnliches strukturelles Erscheinungsbild. Die BMP-7 behandelte Gruppe zeigte mit einem durchschnittlichen Punktwert von 9,6 Punkten (SD \pm 3,60) annähernd ein gleiches Ergebnis wie die Gruppe welche nur das Hydrogel bekommen hat und 9,3 Punkte aufwies (SD \pm 4,0). Die DMM-Gruppe hatte nach acht Wochen ein Ergebnis von 10,0 Punkten erreicht (SD \pm 4,0). Die Spanne der strukturellen Schäden war in allen operierten Gelenken gleich. In allen Gruppen traten schwere arthrotische Veränderungen, bis hin zu freiliegendem subchondralem Knochen auf (Abb. 15; A-C). Insbesondere im Bereich des Tibiaplateaus waren diese schweren strukturellen Veränderungen festzustellen. In wenigen Tieren gingen diese Veränderungen mit osteophytären Anbauten an der Tibia einher, sowie einem regelrechten „Einschleifen“ der Femurkondylen in das Tibiplateau (Abb. 15; C). Hierbei waren Substanzdefekte im Knochen nachweisbar, welche bis an die Epiphysenfuge heranreichten. Der korrespondierende femurseitige Knorpel zeigte dabei einen Substanzverlust bis auf den nicht kalzifizierten Knorpel. Generell war aber der Substanzverlust tibialseitig wesentlich ausgeprägter und großflächiger als am Femur. Hier zeigten zwar auch einige wenige Tiere Defekte bis auf den subchondralen Knochen, diese waren jedoch größenmäßig wesentlich geringer als an der Tibia und reichten von der Tiefe maximal an die obersten subchondrale Knochentrabekel heran, während die tibialen Schäden wesentlich tiefer reichten und auch größer waren.

Bei den unoperierten Kontrollen waren keine strukturellen Knorpelschäden feststellbar (Abb. 15; D). Die Gelenke präsentierten sich hier durchweg in einem vitalen Zustand mit einer regelmäßigen und glatten Knorpelstruktur.

Ergebnisse

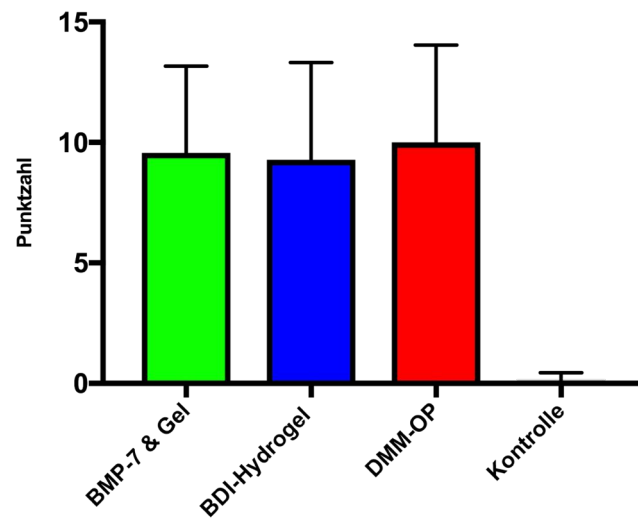


Abbildung 14: Ergebnisse der geblindeten Bewertung der Knorpelstruktur nach acht Wochen. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Ergebnisse

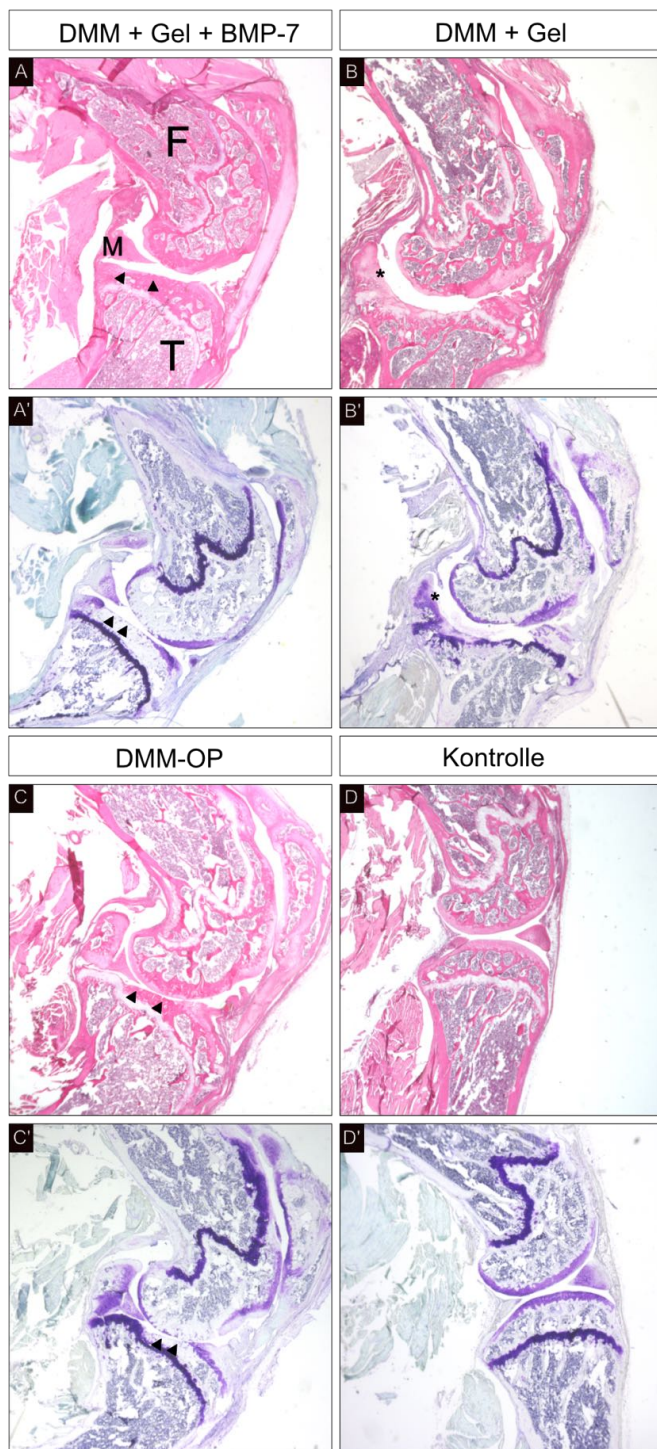


Abbildung 15: Übersicht nach acht Wochen (*F: Femur, T: Tibia, M: Meniskus; 2,5x Vergrößerung*). Die obere Reihe zeigt die Knorpelstruktur der am schwersten betroffenen Tiere in H&E- Färbung, die untere Reihe den Aggrecanverlust der korrespondierenden Schnitte mittels Toluidinblaufärbung. In der Knorpelstruktur zeigen sich in den operierten Gruppen (A-C) nur geringe strukturelle Unterschiede. Im Vergleich zur Kontrolle (D) ist vor allem der Knorpel im posterioren tibialen Bereich betroffen und nicht mehr vorhanden (*Pfeilköpfe*). Teilweise lassen sich starke osteophytäre Anbauten beobachten (B, mit Stern markiert). Im Bereich der korrespondieren Femurkondyle zeigen sich die analogen Veränderungen dazu. Hier ist ebenfalls ein Freiliegen des subchondralen Knochens zu beobachten.

Ergebnisse

3.2.3.1.2. Aggrecangehalt

Im Gegensatz zur strukturellen Beschaffenheit des Knorpels zeigen sich im Aggrecangehalt nach acht Wochen Unterschiede in den Gruppen (Abb. 17). Am schlechtesten schnitt die DMM-Gruppe ab. Hier war die Punktzahl am höchsten mit einem Mittelwert von 4,57 (SD \pm 1,61). Es zeigten sich großflächige, teilweise nahezu das ganze Gelenk betreffende Verluste von Aggrecan und deutlich hypertrophierte, leere Chondrozyten.

Die BDI-Hydrogel-Gruppe zeigte eine geringfügig bessere Punktzahl mit durchschnittlich 3,74 (SD \pm 1,7). Der Aggrecanverlust war hier weniger großflächig, aber vor allem im tibialen Bereich sehr ausgeprägt.

Am besten von allen operierten Gruppen schnitt die mit BMP-7 behandelte Gruppe ab. Die Punktzahl war dort mit einem Mittelwert von 3,14 8 (SD \pm 1,2) am geringsten. Die Veränderungen im Knorpel waren schwerpunktmäßig wieder im posterioren tibialen Bereich, während der Knorpel auf den Femurkondylen nur mäßigere Veränderungen zeigte. Der Knorpel zeigte nur punktuelle Verluste von Aggrecan ohne großflächigere Schäden. In der Antikörperfärbung fiel punktuell ein stark vermehrter Aggrecangehalt auf. Morphologisch zeigten sich keine hypertrophierten Chondrozyten.

Ergebnisse

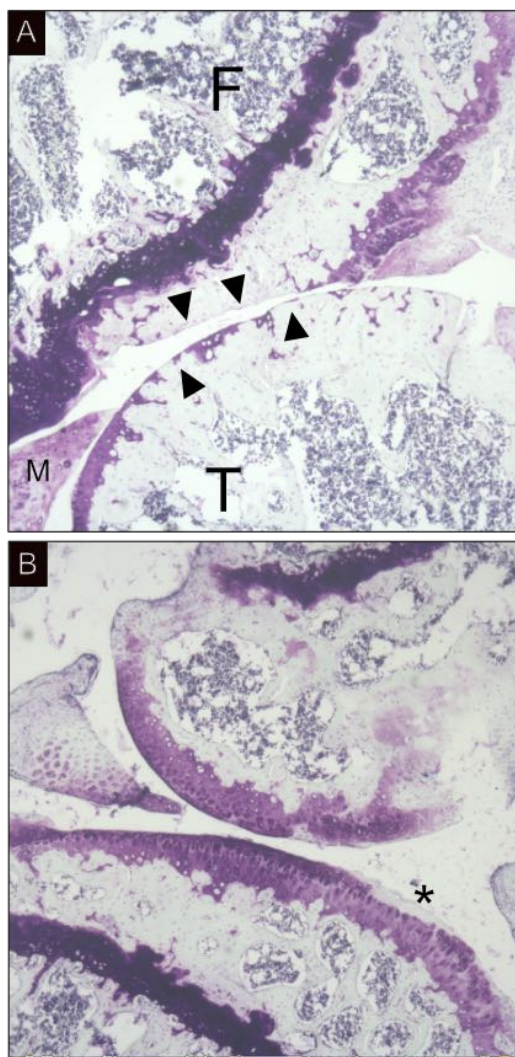


Abbildung 16: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels in Toluidinblaufärbung (5x Vergrößerung) nach acht Wochen (*F: Femur, T: Tibia, M: Meniskus*). Das obere Bild (*A*) zeigt ein Gelenk aus der DMM-Gruppe mit schwersten Schäden. Der subchondrale Knochen liegt großflächig frei (*Pfeilköpfe*). Es lässt sich eine beginnende Veränderung der Knochenstruktur im femoralen Bereich erahnen. Stellenweise ist der Defekt nicht mehr weit von der Epiphysenfuge entfernt und zeigt damit deutlich wie schwer die Veränderungen sind. Im Gegensatz dazu zeigt das untere Bild (*B*) Gelenk welches mit BMP-7-Hydrogel postoperativ behandelt wurde. Dieses zeigt auch arthrotische Veränderungen mit einem teilweisen Verlust der oberen Knorpelschichten (*mit Stern markiert*) und der Anfärbung. Jedoch sind diese Veränderungen sehr moderat und betreffen nur einen kleinen Teil des Gelenks. Der überwiegende Teil des Knorpels stellt sich gut erhalten dar.

Ergebnisse

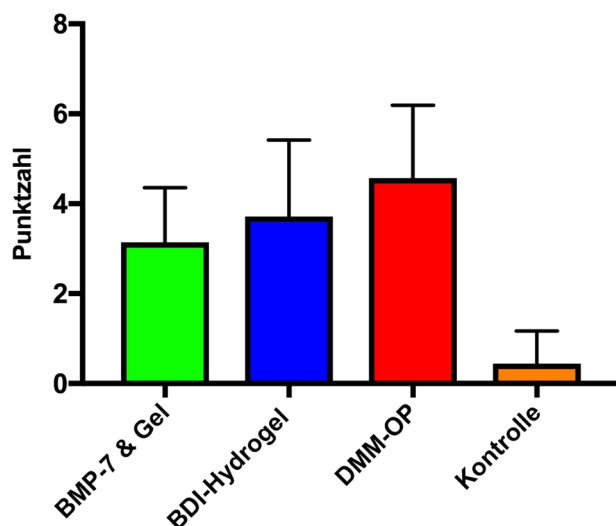


Abbildung 17: Ergebnisse der geblindeten Bewertung des Aggrecangehalts nach acht Wochen. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

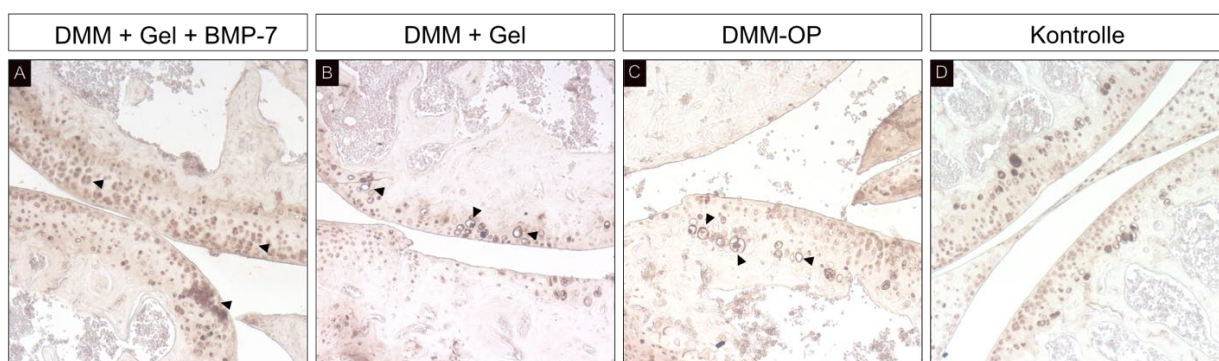


Abbildung 18: In der immunhistochemischen Färbung gegen Aggrecan werden nach acht Wochen deutliche Unterschiede sichtbar (5x Vergrößerung). Die mit BMP-7-Hydrogel behandelte Gruppe (A) zeigt eine wesentlich kräftigere Färbung und gleichmäßige, dunkle Chondrozyten ohne Hypertrophie (*schwarze Pfeilköpfe*). Dies spricht für einen hohen Aggrecangehalt und eine gesteigerte Aggrecanproduktion. In der DMM-Gruppe (C) zeigen sich dagegen blasse, leere Chondrozyten mit einem hypertrophen Wachstumsmuster. Eine starke Dunkelfärbung und damit Aggrecanproduktion lässt sich nicht feststellen. Auch in der BDI-Hydrogel-Gruppe (B) neigen die Chondrozyten eher zu einem hypertrophen Wachstum und geringer Aggrecanproduktion. In der Wildtyp-Gruppe (D) zeigt sich zum Vergleich eine gleichmäßige Anfärbung der normal großen Chondrozyten.

Ergebnisse

3.3. Vergleich der 4-Wochen und 8-Wochen Tiere

3.3.1. Vergleich der Struktur

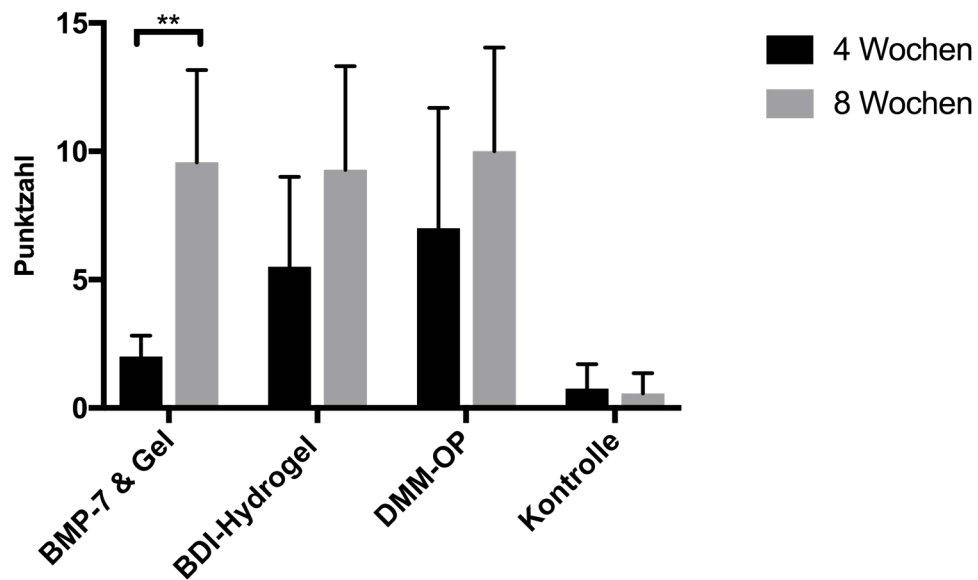


Abbildung 19: Vergleich der Struktur. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung, $p=0,0152$.

Im Vergleich der beiden Zeitpunkte und der Knorpelstruktur (Abb. 19) zeigt sich in allen operierten Gruppen eine Zunahme der Punktzahl und damit eine Verschlechterung. In der BMP-7 behandelten Gruppe ist die Veränderung statistisch signifikant ($p=0,0152$).

Ergebnisse

3.3.2. Vergleich des Aggrecangehalts

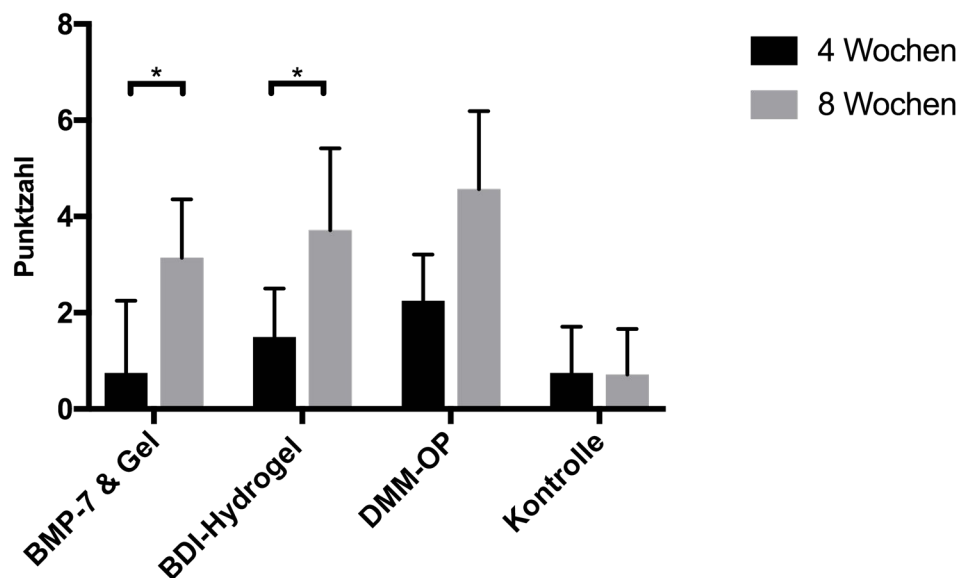


Abbildung 20: Vergleich des Aggrecangehalts. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung. $p=0,0364$ in der BMP-7 Hydrogel-Gruppe; $p=0,0394$ in der BDI-Hydrogel-Gruppe.

Beim Aggrecangehalt zeigt sich ein ähnliches Bild (Abb. 20) wie bei der Knorpelstruktur. Auch hier schneiden alle Tiere nach acht Wochen schlechter ab. Die mit BMP-7 behandelten Tiere als auch die Tiere, welche nur das BDI-Hydrogel bekommen haben, zeigen eine signifikante Zunahme der Punktzahl.

3.4. ELISA

Der jeweils vor der Tötung der Tiere gewonnene Spontanurin wurde auf das Knorpelabbauprodukt C2C untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den operierten Gruppen festgestellt werden (Abb. 21). Auch zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der individuelle Wert von C2C im Urin korrelierte nicht mit dem histologischen Ausmaß der Arthrose.

Ergebnisse

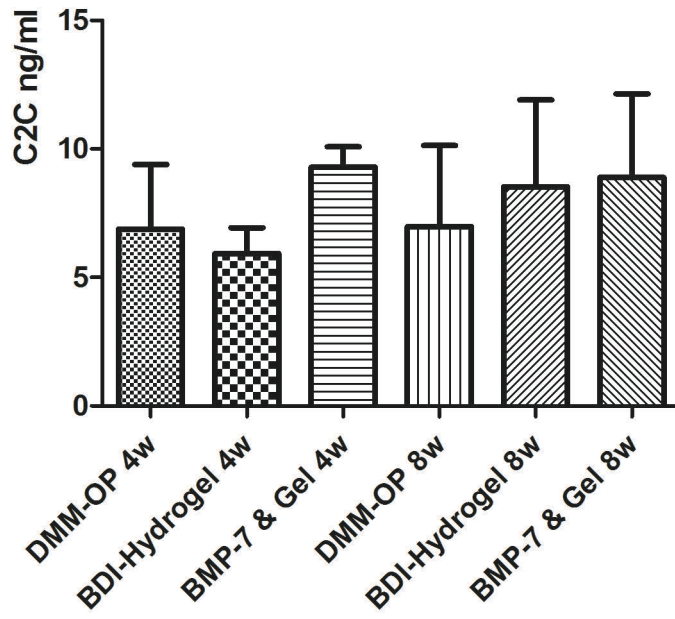


Abbildung 21: C2C-Werte der operierten Tiere nach vier und acht Wochen. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

4. Diskussion

Aktuell steht keine therapeutische Möglichkeit zur Verfügung, welche die Gonarthrose in ihrem Verlauf wesentlich positiv zu beeinflussen scheint [139–141]. Die aktuellen Möglichkeiten beschränken sich im Wesentlichen auf eine Linderung der Symptomatik mit besonderem Augenmerk auf die Schmerztherapie [142]. Als Ultima Ratio kommt im fortgeschrittenen Stadium nur die endoprothetische Versorgung des Gelenks in Betracht, die aber einen erheblichen Eingriff darstellt und mit nicht unerheblichen Komplikationen belastet ist [143,144]. Eine präventive Therapie, die in einem frühen, asymptomatischen Krankheitsstadium einsetzt oder präventiv nach Sportverletzungen verabreicht wird, ist eine vielversprechende Möglichkeit um komplexe operative Eingriffe hinauszuzögern oder gar zu ersetzen [7,39,145,146]. Als entscheidender, regenerativer therapeutischer Ansatz gilt dabei die positive Beeinflussung der Knorpelhomöostase. Eine Hauptproblematik ist dabei die geringe Regenerationsfähigkeit der Knorpelzellen, welche aus schwacher Vaskularisierung, geringem Stammzellgehalt und einer komplexen Matrixkomposition resultiert [147].

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Anforderungsprofil

Anhand eines Tiermodells sollte versucht werden, die Möglichkeiten und Grenzen des klinischen Einsatzes einer neuartigen Kombination des vielversprechenden Wachstumsfaktors BMP-7 und einem neuartigen thermosensitiven Hydrogel zur Prävention degenerativer Knorpelschäden aufzuzeigen.

Diese Fragestellung befindet sich in einem Grenzgebiet zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung. Um diese zufriedenstellend zu beantworten muss das Versuchsmodell eine möglichst realistische und klinisch relevante Problemsituation widerspiegeln. Dabei muss aber auch gewährleistet sein, dass die gewonnenen Ergebnisse auf den humanmedizinischen und klinischen Einsatzbereich übertragbar sind. Obwohl in der letzten Zeit mit zunehmendem Erfolg Alternativen zu Tierversuchen erforscht und auch erfolgreich eingesetzt wurden, scheint es notwendig für eine Versuchsreihe mit einem derartigen Anforderungsprofil die Experimente im Tierversuch zu realisieren.

Diskussion

Arthrose und die damit verbundenen Veränderungen in der Biomechanik und Knorpelhomöostase sind komplexe Abläufe deren Simulation *in vitro* nur sehr eingeschränkt oder gar nicht zu untersuchen ist [148]. In ihrem Review 2010 zu neuartigen Knorpeltherapien wiesen *Chu et al.* ausdrücklich darauf hin, dass Tierversuche essentiell sind um die Lücke zwischen *in vitro* und klinischer Studie zu schließen [149]. Gerade neue Ansätze im regenerativen Bereich und im Tissue Engineering sind auf eine intakte Gelenksphysiologie angewiesen, um Abläufe in der Regenerierung von Gewebestrukturen möglichst realitätsnah ablaufen zu lassen. Im Rahmen von Voruntersuchungen zu dieser Dissertation wurden die bestehenden Methoden in der Zellkultur erschöpfend untersucht. Um die resultierende Lücke zwischen *in vitro* Untersuchungen und humanen klinischen Studien zu schließen, sind *in vivo* Versuche unerlässlich.

4.1.2. Tiermodell und chirurgische Induktion der Arthrose

Um einen Einfluss auf den Verlauf der chirurgisch induzierten Arthrose beobachten zu können, verwendeten wir Mäuse als Versuchstiere. Diese bieten den Vorteil einer einfachen und standardisierten Haltung in der ZVH und sind zudem etablierte Modelle in der Knorpelgrundlagenforschung. Des Weiteren scheinen eine Vielzahl von molekularen und genetischen Mechanismen der Arthrose-Pathogenese, wie Aggrecanverlust und Veränderungen der Knorpelmatrix, ähnlich dem Menschen zu sein und auch die Struktur des Gelenks ist im Aufbau vergleichbar [150,151].

Als Limitation kann am Mausmodell die kleine Gelenkstruktur und damit auch der im Vergleich zum Menschen dünnere Knorpel kritisiert werden [152]. Zudem ist wesentlich weniger Synovialflüssigkeit vorhanden. Diese Kritikpunkte sind jedoch relativiert zu beobachten, da gerade für das Mausmodell eine Vielzahl an Vergleichsdaten existiert und gerade im Vergleich zu Großtieren, das Mausmodell leicht verfügbar und auch kostengünstig ist [152,153]. Zudem können an Mäusen leicht die genetischen Einflüsse mithilfe von knock-out Linien untersucht werden. Da auch die geschlechtsspezifische genetische Variabilität einen Einfluss auf die Arthrose hat, verwendeten wir für diese Studie ausschließlich weibliche Tiere. So konnten wir die von *Ma et al.* beschriebenen möglichen geschlechtsabhängigen Einflüsse eliminieren. Männliche Mäuse entwickeln in chirurgischen Arthrosemodellen oftmals eine schwerere Arthrose und einen deutlich progredienteren Verlauf [21].

Diskussion

Chirurgische Modelle für die Arthroseinduktion an der Maus sind erst seit jüngerer Zeit etabliert und haben sich durch die Verbreitung mikrochirurgischer Techniken rasch verbreitet. Es kann mittels eines einfachen und standardisierten chirurgischen Eingriffs am Hinterlauf eine Arthrose induziert werden ohne dabei das umliegende Gewebe zu schädigen [149,154,155]. Der Vorteil gegenüber den älteren Modellen mit spontaner oder medikamentös induzierter Arthrose ist die Unabhängigkeit vom Alter und der Zuchtlinie der Mäuse, sowie die geringere Variabilität der Ergebnisse. In den spontanen Modellen entwickeln die Mäuse erst in fortgeschrittenem Alter und auch nur in bestimmten Zuchtlinien Arthrose [156]. Modelle, die auf der medikamentösen Induktion beruhen zeigten eine rapide einsetzende Arthrose mit schneller Progression und nicht die typischen eher langsamen Veränderungen wie bei einer degenerativen oder posttraumatischen Arthrose [152].

Für *in vivo* Studien existieren dabei verschiedene chirurgische Modelle der Arthroseinduktion, die alle auf einer mechanischen Destabilisierung des Kniegelenkes basieren [157]. Das DMM-Modell welches erstmals von *Glasson et al.* 2007 beschrieben wurde ist dabei das favorisierte Modell zur Destabilisierung und kam auch in unserer Studie zum Einsatz. Es löst eine milde bis moderate Arthrose aus und ist in der zeitlichen Progression mit dem Auftreten der natürlichen, degenerativen Arthrose beim Menschen vergleichbar und einfach durchführbar [137,156]. Alternative Modelle wie die Entfernung eines Meniskus oder die Resektion des vorderen Kreuzbandes weisen ein höheres Risiko für iatrogene Knorpelschäden auf und stellen einen wesentlich invasiveren Eingriff dar [152]. Umstritten ist dabei, ob in solchen Modellen das kontralaterale Kniegelenk als mögliche Kontrolle in Frage kommt. *Fang et al.* haben in kontralateralen Kniegelenken von operierten Tieren erhöhte Raten an Arthrose feststellen können, während *Little et al.* keine Unterschiede an der kontralateralen Seite zwischen Sham operierten (Placebo-Operation) Tieren und DMM-operierten Tieren feststellen konnte [138,152]. Beide Beobachtungen resultieren jedoch aus Einzelfällen und es existiert keine exakte Untersuchung über die Eignung der jeweiligen kontralateralen Kniegelenke. Wir konnten in den meisten kontralateralen Kniegelenken nur eine sehr moderate Arthrose feststellen, die durchaus auch mit einer spontan auftretenden Arthrose zu vereinbaren ist. Deswegen gehen wir von keiner signifikanten Mehrbelastung der unoperierten Extremität aus. Trotzdem bleibt dies eine mögliche Limitation in dieser Studie.

4.1.3. Versuchstieranzahl

Um die im Rahmen dieser Dissertation zu beantwortende Fragestellung zu untersuchen, erschien eine Beschränkung auf eine Mindestprobenzahl für die Formulierung einer wissenschaftlichen Fragestellung und Untersuchung der generellen Machbarkeit (*proof of concept*) als gerechtfertigt.

4.1.4. Versuchsdauer

Die Versuchsdauer wurde mit vier und acht Wochen postoperativ bewusst so gewählt, da hier bereits mit einem positiven Effekt zu rechnen war. In *in vitro* Vorversuchen in unserem Labor konnte eine hohe BMP-7 Freisetzung aus dem BDI-Hydrogel in den ersten 30 Tagen beobachtet werden (unveröffentlichte Daten). Zudem sind Wachstumsfaktoren der BMP-Superfamilie überwiegend in der Frühphase der Defektheilung wirksam [158–160]. Nach einem sehr langen Beobachtungszeitraum wäre dieser Effekt möglicherweise nicht mehr erkennbar gewesen, da auch von einem körpereigenen Abbau des BMP-7 ausgegangen werden muss [161]. Zudem zeigten sich im DMM-Modell die ersten Ergebnisse nach vier und acht Wochen. Diese beiden Zeiträume sind in der Knorpelforschung weit verbreitet und bieten damit auch eine gute Vergleichbarkeit zur Literatur [137,162].

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Das DMM-Modell löst eine reproduzierbare Arthrose aus

In dieser Versuchsreihe konnte mittels der DMM-OP in allen operierten Gruppen eine milde bis schwerwiegende Arthrose ausgelöst werden, die einen langsam fortschreitenden Verlauf aufwies. Dabei wurde besonders eine Belastung und degenerative Abnützung der zentralen Lastbereiche wie der medialen Tibia und der medialen Femurkondyle beobachtet (Abb. 15). Ebenso konnte eine Zunahme der Punktzahl und damit des Arthrose-Schweregrades bei den operierten Tieren während der Versuchsdauer beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den aus der Literatur bekannten Daten und sind ähnlich dem langsam progredienten Verlauf einer degenerativen oder posttraumatischen Arthrose beim Menschen [29,156,163].

Diskussion

Im Verlauf dieser Dissertation konnte damit das DMM-Modell als murines *in vivo* Arthrosemodell erfolgreich reproduziert und im Labor für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin etabliert werden.

4.2.2. BMP-7 augmentiertes BDI-Hydrogel hat einen positiven Einfluss auf die Progression einer Arthrose

BMP-7 besitzt nachweisbare positive Effekte auf den Chondrozytenstoffwechsel und wirkt stimulierend auf die Synthese und Organisation der Matrixmoleküle [133,164]. Dabei verbessert BMP-7 auch das Zellüberleben und inhibiert knorpelabbauende Stoffwechselwege. Mit zunehmenden Alter und fortschreitender Knorpeldegeneration reduziert sich die BMP-7 Expression im hyalinen Knorpel auf ein Minimum [131]. Gesteigerte Spiegel von BMP-7 konnten dabei in Geweben und Synovialflüssigkeit von verletzten Gelenken oder nach Arthrotomie beobachtet werden [165]. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass BMP-7 Teil des körpereigenen Reparaturpotentials ist. Eine periodische und zielgerichtete Supplementation von BMP-7 wäre damit ein möglicher Ansatz für die Prävention der Arthrose.

Wir konnten in dieser Arbeit erstmalig einen positiven Effekt eines mit BMP-7 augmentierten, thermosensitiven Hydrogels auf den Verlauf der Arthrose im Mausmodell zeigen. Vier Wochen nach der Injektion zeigte sich eine signifikant bessere Knorpelstruktur in der mit BMP-7 und BDI-Hydrogel behandelten Gruppe. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine *in vivo* Freisetzung des BMP-7 aus dem BDI-Hydrogel erfolgt und das freigesetzte BMP-7 einen protektiven Effekt auf den hyalinen Knorpel besitzt.

Andere Gruppen konnten ebenfalls die positiven Effekte von BMP-7 *in vivo* auf den Knorpel nachweisen, jedoch wurden nicht-injizierbare Carrier als Trägersubstanz für das BMP-7 benutzt, welche meist auf Milchsäure basierten und operativ implantiert werden mussten. Die Herausforderung dabei ist, BMP-7 zielgerichtet und nachhaltig zur Verfügung zu stellen. *Jung et al.* wählten für die Reparatur osteochondraler Defekte beim Kaninchen einen Scaffold auf der Basis von Polylactid (PLGA). Die histologischen Verbesserungen zeigten sich in der guten Einheilung des neugebildeten Knorpels in den lokalen Defekt und der Neubildung von Kollagen II und Proteoglykanen [166]. Ähnliche Effekte konnten *Solchaga et al.* beobachten. Hierbei kam ein Scaffold auf Hyaluronan-Basis zum Einsatz, welcher die Defektheilung im

Diskussion

osteocondralen Defektmodell signifikant verbesserte [167]. *Badlani et al.* nutzen erstmals keinen festen Scaffold, sondern injizierten mithilfe eines Katheters und einer osmotischen Pumpe neun Wochen lang kontinuierlich BMP-7 in das Kniegelenk von Kaninchen. Dabei konnte zwar ein positiver Effekt auf den Knorpel gesehen werden, jedoch brachte die Form der Applikation eine Reihe von Problemen wie Infektionen oder fehlende Mobilität mit sich [114]. Einen ähnlichen, anhaltenden Effekt von BMP-7 nach einer Injektion konnten *Hayashi et al.* erstmals 2007 beim Hasen beobachten [168]. Hier stimulierte BMP-7 noch eine Woche nach der Injektion die endogene Expression von BMP-7 in den Chondrozyten. In dieser Studie wurde das BMP-7 jedoch in einer wässrigen Kochsalzlösung wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen injiziert. Es ist davon auszugehen, dass das BDI-Hydrogel über einen längeren Zeitraum eine konstantere Freisetzung von BMP-7 gewährleistet als dies eine Kochsalzlösung leisten kann. Diese These wird durch *in vitro* Daten aus unserem Labor gestützt, in der BMP-7 in den ersten 14 Tagen einen maximalen Release aus dem BDI-Hydrogel zeigt (unveröffentlichte Daten).

Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse nach acht Wochen keine signifikanten Unterschiede mehr in der Knorpelstruktur, jedoch weist der Aggrecangehalt in der BMP-7 Gruppe den tendenziell geringsten Verlust von Aggrecan auf. Diesen Einfluss auf den Aggrecangehalt können auch andere Studien nachweisen. *Badlani et al.* konnten eine Abnahme der knorpelabbauenden Proteasen wie MMP-13 oder Aggrecanase zeigen und eine Zunahme der Kollagen II Produktion [113]. In anderen *in vivo* Studien zeigte BMP-7 auch positive Effekte auf den Proteoglykangehalt in der Bandscheibe. Hier konnte nicht nur die Zunahme von Proteoglykanen in der Knorpelmatrix beobachtet werden, sondern auch eine absolute Zunahme der Bandscheibendicke, was deutlich die Verringerung der degenerativen Vorgänge zeigt [169,170].

Dabei wird vermutet, dass vor allem die Aggrecanasen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthrose spielen. Ihr Gehalt im Knorpel korreliert mit der Schwere und Progression von Arthrose [171]. Aufgrund der Angleichung der Struktur in unserer Studie vermuten wir, dass der BMP-7 Release aus dem BDI-Hydrogel nachlässt und nach acht Wochen nicht mehr ausreichend ist. Trotzdem ist aufgrund des besseren Aggrecangehalts davon auszugehen, dass BMP-7 auch noch nach acht Wochen einen protektiven Effekt hat, welcher nicht nur durch die Pharmakodynamik der injizierten Kombination von BDI-Hydrogel und BMP-7 zu erklären ist.

Diskussion

Diese These wird von den Beobachtungen gestützt, die *Sekiya et al.* gemacht haben. Dort war die BMP-7 Expression in Chondrozyten noch sieben Tage nach der Applikation von BMP-7 gesteigert [168].

Wir vermuten in unserem Modell neben einer länger andauernden Freisetzung von BMP-7 durch das BDI-Hydrogel die Stimulation der endogenen BMP-7 Produktion. Möglicherweise wird das exogen zugeführte BMP-7 vom Synovialgewebe absorbiert und die Synovialzellen dadurch zu einer gesteigerten endogenen BMP-7 Produktion angeregt. Eine ähnliche Steigerung der endogenen BMP-7 Produktion ließ sich im Schaf beobachten [172].

Obwohl BMP-7 damit allgemein als potenter chondrogener Faktor angesehen wird und intensiv auf dieses Potential hin untersucht wurde, ist die Frage nach der optimalen Dosierung noch ungeklärt. Im Vergleich zu anderen *in vivo* Studien wurde bewusst eine höhere Dosierung von BMP-7 gewählt. Wir injizierten eine Dosis von 200 ng BMP-7 in das Gelenk. In der Literatur werden Dosisbereiche bis zu 1000 ng angegeben, wobei eine sehr große Bandbreite in der Dosierung herrscht und für Mäuse keine *in vivo* Daten existieren [136]. In einer *in vitro* Versuchsreihe konnten *Klatte-Schulz et al.* 2013 nachweisen, dass BMP-7 im Vergleich zu BMP-2 vergleichbare Wirkungen bei niedrigeren Dosierungen zeigt [173]. Übliche Dosierungen für BMP-2 liegen dabei in einem Dosisbereich von 5 µg bis 20 µg [174,175].

Hayashi et al. wählten für Ratten eine Dosierung von 250 ng BMP-7 und konnten keine unerwünschten Wirkungen feststellen [168]. Neuere Daten zeigen, dass BMP-7 einen sehr hohen und weiten Dosisbereich hat und es keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zu geben scheint [162]. Wir konnten bei unserer Dosierung lediglich in einem Tier eine ektope Bildung von Chondrozyten in der Patellarsehne nach vier Wochen nachweisen. Relevante Nebenwirkungen wie Osteophyten oder Fibrosierung konnten wir nicht feststellen. Wir vermuten jedoch, dass höhere Dosen von BMP-7 die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Wirkungen wie ektopter Knorpel- oder Knochenbildung sowie synovialer Fibrose ansteigen lässt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Dosis von BMP-7 in dieser Studie richtig gewählt wurde. Um eine genaue Dosis-Wirkungsbeziehung feststellen zu können sind weitere Studien notwendig, auch im Hinblick auf einen möglichen Einsatz beim Menschen. Unsere Studie liefert damit erstmals einen konkreten Hinweis auf eine *in vivo* Dosierung bei der Maus. Dies stellt eine wichtige Grundlage für weitere Versuchsreihen dar.

Diskussion

Mit dem von uns verwendeten BDI-Hydrogel steht damit erstmals eine minimalinvasive, nicht-operative Möglichkeit zur Verfügung BMP-7 zielgerichtet zu applizieren. Durch die Thermosensitivität bleibt das Hydrogel dabei auch nach Injektion am gewünschten Ort und kann zielgerichtet seine Wirkung entfalten. In Anbetracht der Wirksamkeit von BMP-7 scheinen therapeutische Injektionen eines mit BMP-7 augmentierten BDI-Hydrogel eine attraktive klinische Option zu sein, um den Verlust von Knorpelmasse zu reduzieren.

4.2.3. Potentieller protektiver Effekt des BDI-Hydrogels

Unsere Ergebnisse indizieren, dass möglicherweise das BDI-Hydrogel selbst einen positiven Einfluss auf die Knorpelhomöostase hat. Abbildung 20 zeigt, dass der Aggrecangehalt der mit BDI-Hydrogel behandelten Gruppen zwar schlechter ist als in den Gruppen die zusätzlich BMP-7 bekommen haben, aber tendenziell besser ist als in der Kontrollgruppe. *Tan et al.* gehen davon aus, dass Hydrogele das Potential besitzen durch ihre besondere Struktur die Knorpelhomöostase positiv zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass Hydrogele das Überleben von Chondrozyten unterstützen können und dabei kein negativer Effekt auf die Chondrozytenmorphologie besteht [176]. Aber auch ein Einsatz als direkter Knorpelersatz ist denkbar. So haben *Kobayashi et al.* 2004 ein wirkstofffreies Hydrogel als Knorpelersatz *in vivo* getestet und dabei vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der mechanischen Belastbarkeit erzielt [177]. Durch die Vielfältigkeit der Hydrogele sind auch keine Grenzen im Design der Anwendung gegeben. So ist es mit Hydrogelen auch möglich dreidimensionale Scaffolds zu erzeugen und so für größere Defekte passgenaue Implantate zu erhalten. Hier ist insbesondere auch die Kombination von 3D-Druck und Hydrogelen eine vielversprechende Option um komplexe Strukturen individuell nachzubilden. 2012 wurde erstmals eine Aortenklappe aus Hydrogelen gedruckt [178]. Ähnliche Bestrebungen für einen Knorpelersatz aus dem Drucker sind aktuell Gegenstand der Forschung [179,180]. Hier ist aber noch kein klinischer Einsatz absehbar, da der gedruckte Knorpel noch nicht die komplexen biomechanischen Eigenschaften erfüllen kann [181].

Volkmer et al. konnten speziell für das in dieser Studie verwendete BDI-Hydrogel eine gute Zellüberlebensrate beschreiben [99]. Wir vermuten, dass das BDI-Hydrogel einen adhäsiven Charakter im Gelenk entwickelt und möglicherweise Chondrozyten adhären und in ihrer Funktion unterstützen kann.

Diskussion

Erste aktuelle *in vitro* Daten können diese These stützen. So konnten Hydrogele in der Zellkultur das Überleben von Chondrozyten und die Expression von extrazellulärer Matrix verbessern [182]. Zudem wird die Bioaktivität von Chondrozyten gesteigert [183]. Dabei sind die Mechanismen die hinter diesen positiven Effekten stehen noch völlig unklar. Um hier mögliche regenerative Therapien zu entwickeln, sind genaue Charakterisierungen der Hydrogele hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion *in vivo* und *in vitro* notwendig.

4.2.4. C2C im Urin korreliert nicht mit der histologischen Schwere der Arthrose

Die Ergebnisse des ELISA zeigen keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen den Urinspiegeln von C2C. C2C ist ein Abbauprodukt des Kollagen II und wurde in mehreren Studien als Biomarker für eine Arthrose verwendet [184,185]. Normalerweise wird dieser Biomarker aus dem Blutserum bestimmt. Aufgrund der einfacheren Entnahme entschieden wir uns in dieser Studie das C2C aus dem Urin zu bestimmen. *He et al.* konnten 2014 zeigen, dass Patienten mit Arthrose einen signifikant höheren Spiegel von C2C im Urin haben als gesunde Patienten [186]. Wir konnten diese Ergebnisse für Mausurin nicht replizieren.

Die von uns gemessenen Spiegel von C2C lagen deutlich unter den Spiegeln die *Raducanu et al.* bei arthrotischen Mäusen im Serum messen konnten [187]. Auch *Ameys et al.* konnten für eine chemisch induzierte Arthrose höhere Werte für C2C im Serum messen als wir, aber wesentlich geringere als *Raducanu et al.* [188]. Andere Studien die C2C aus dem Serum bestimmt haben, kamen jedoch zu einem ähnlichen Ergebnis wie wir. *Yamaguchi et al.* untersuchten die C2C Konzentrationen in einem operativen Arthrosemodell an der Ratte im Serum und konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede oder eine Korrelation mit dem histologischen Schweregrad feststellen [189]. Dabei ist in allen Studien die Streuung der gemessenen Werte sehr groß. Eine aktuelle Studie von *Aurich et al.* hat den C2C Gehalt direkt in Biopsien von menschlichem Knorpel untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der C2C Gehalt in arthrotischen Sprunggelenken höher ist als in arthrotischen Kniegelenken [190]. Möglicherweise spielten hier gelenksspezifische Unterschiede im Knorpelstoffwechsel eine Rolle und C2C ist ein nicht geeigneter Biomarker für die Gonarthrose.

Somit muss aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse kritisch hinterfragt werden, ob C2C ein geeigneter Biomarker ist um die Arthrose zu untersuchen und zu

Diskussion

quantifizieren. Seine Schwächen liegen darin, dass er nicht den gesamten Knorpelstoffwechsel erfasst und neben einer Gelenkspezifität eine große individuelle Streuung zu besitzen scheint.

Zudem müssen weitere Untersuchungen erfolgen, hinsichtlich der Frage welches Probenmaterial für die Bestimmung überhaupt geeignet erscheint. Gerade bei der Bestimmung aus dem Urin könnten weitere Faktoren, die beispielweise die renale Clearance beeinflussen, Auswirkungen auf die C2C Konzentration haben.

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

BMP-7 ist ein Hoffnungsträger und ein vielversprechendes therapeutisches Target in der Knorpelforschung. Die Wirksamkeit konnte in Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mehrfach nachgewiesen werden [166,168,191]. Auch in einer ersten humanen Studie zeigte BMP-7 eine schmerzlindernde und mobilitätsfördernde Wirkung [192]. Die Schwierigkeit ist jedoch oftmals die zielgerichtete Applikation und Freisetzung des Wirkstoffes. Hydrogele sind dabei ein Hoffnungsträger im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen Medizin. Neben den klinischen Vorteilen von Hydrogelen wie einer einfachen, minimalinvasiven Applikation stehen auch biologische Vorteile im Vordergrund. Dabei sind Hydrogele außerordentlich vielseitig und können in einem breiten Spektrum von Methoden benutzt werden. Sowohl im 3D-Druck als auch in der klassischen operativen Medizin sind Hydrogele einsetzbar. Dabei ist das chemische Spektrum der Hydrogele mindestens so breit wie ihre potenziellen Einsatzgebiete. Die einfache Handhabung und Applikation des Hydrogels in unserer Studie lässt einen breiten klinischen Einsatz realistisch erscheinen. So können nicht nur Wachstumsfaktoren zielgerichtet appliziert werden, denkbar ist auch der Einsatz von Zellen oder anderen Therapeutika beispielsweise in der Onkologie. Dies würde den zielgerichteten Einsatz von Zytostatika ermöglichen und so eine effiziente und nebenwirkungsarme Krebstherapie möglich machen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein mit BMP-7 augmentiertes, thermosensitives Hydrogel initial einen positiven Einfluss auf die Verhinderung einer Arthrose hat und deren Progression verlangsamen kann. Zudem stellt die intraartikuläre Injektion eines thermosensitiven Hydrogels eine minimalinvasive und praktikable Möglichkeit dar, zielgerichtet Wirkstoffe zu applizieren. Diese Möglichkeit eröffnet ein breites Feld von Anwendungsmöglichkeiten. Um einen potentiellen Einsatz von BMP-7 am Menschen zu prüfen, müssen weitere Studien folgen um mehr Daten, insbesondere im Hinblick auf Dosierungen und Applikationshäufigkeit, zu erlangen. Zudem müssen weitere Charakterisierungen der Hydrogele folgen, um ihre endogene Bioaktivität besser beurteilen und verstehen zu können.

5. Zusammenfassung

Fragestellung: Die Arthrose des Kniegelenkes stellt aufgrund unserer zunehmend alternden Gesellschaft eine wachsende sozioökonomische Belastung dar. Wachstumsfaktor-basierte regenerative Therapieansätze könnten eine zukünftige Behandlungsoption darstellen dem Knorpelverlust, zum Beispiel nach Trauma, entgegenzuwirken. Aufgrund der chondroprotektiven Eigenschaften und anabolen Effekte von BMP-7 auf Chondrozyten wurde in der vorliegenden Arbeit die Biokompatibilität und Funktionalität eines BMP-7 augmentierten thermosensitiven Hydrogels unter *in vivo* Bedingungen getestet.

Methodik: Es wurde BMP-7 (rhBMP-7, Olympus Biotech, Frankreich) augmentiertes BDI-Hydrogel (Pluronic 123 ® mit Butandiisocyanat (BDI); LivImplant GmbH, Deutschland; BMP-7 Konzentration: 0,2 µg/10 µl Hydrogel) in adulten, weiblichen C57BL/6 Mäusen (n=38) untersucht. Um den Einfluss auf die Arthrose darzustellen, wurde bei den Mäusen eine Arthrose mithilfe der Dissektion des medialen meniskotibialen Ligaments (DMM-Modell) induziert. Die Injektion erfolgte jeweils direkt im Anschluss an die Operation. Folgende Gruppen wurden untersucht: A) BMP-7 augmentiertes Hydrogel; B) Hydrogel; C) keine Injektion nach OP D) Kontrolle: kontralaterales Kniegelenk.

Nach vier (n=4 pro Gruppe) und acht (n=7 pro Gruppe) Wochen wurden die Tiere exsanguiniert und die Kniegelenke der histologischen Evaluation mittels sagittalen Schnitten zugeführt. Es wurden Hämatoxylin und Eosin (Übersicht) Toluidinblaufärbungen (Proteoglykane) sowie immunhistochemische Färbungen gegen Aggrecan angefertigt. Die histologische Auswertung erfolgte mittels eines semi-quantitativen Scores, der die Knorpelstruktur und den Aggrecangehalt beurteilt. Zusätzlich wurde Spontanurin gesammelt und dieser auf das Kollagen II Abbauprodukt C2C untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: In der vier Wochen BMP-7-Hydrogel Gruppe konnte eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Knorpelerosion als in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Nach acht Wochen konnte eine tendenziell geringere Knorpelerosion als in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Es ist davon

Zusammenfassung

auszugehen, dass hier der BMP-7 Release nicht mehr ausreichend ist. Die nicht operierten Gelenke zeigten eine nicht feststellbare bis sehr moderate Arthrose. Eine alleinige Injektion von BDI-Hydrogel hatte keinen signifikant positiven Einfluss auf den Verlauf der Arthrose. Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen auf das Gel konnten nicht festgestellt werden. Ein Gruppenunterschied auf das untersuchte Knorpelabbauprodukt C2C im Urin konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein mit BMP-7 augmentiertes thermosensitives Hydrogel initial einen positiven Einfluss auf die Verhinderung einer Arthrose hat und deren Progression verlangsamen kann. Zudem stellt die intraartikuläre Injektion eines thermosensitiven Hydrogels eine minimalinvasive und praktikable Möglichkeit dar, zielgerichtet Wirkstoffe zu applizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. Hip and Knee Replacement in Germany and the USA: Analysis of Individual Inpatient Data From German and US Hospitals for the Years 2005 to 2011. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2014;111(23–24):407–16.
2. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. März 1982;64(3):460–6.
3. Kleeman RU, Krockner D, Cedrano A, Tuischer J, Duda GN. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: Relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(11):958–63.
4. Hoy D, Cross M, Smith E, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, u. a. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(7):1323–30.
5. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2014;10(7):437–41.
6. Koch-Institut R. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54.
7. Gupta S, Hawker GA, Laporte A, Croxford R, Coyte PC. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology*. 2005;44(12):1531–7.
8. Gignac MAM, Backman CL, Davis AM, Lacaille D, Cao X, Badley EM. Social role participation and the life course in healthy adults and individuals with osteoarthritis: Are we overlooking the impact on the middle-aged? *Social Science & Medicine*. März 2013;81:87–93.
9. Croft P, Cooper C, Coggon D. Case definition of hip osteoarthritis in epidemiologic studies. *The Journal of rheumatology*. April 1994;21(4):591–2.
10. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: A systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. November 2011;19(11):1270–85.
11. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. Dezember 1957;16(4):494–502.

Literaturverzeichnis

12. Fife RS, Brandt KD, Braunstein EM, Katz BP, Shelbourne KD, Kalasinski LA, u. a. Relationship between arthroscopic evidence of cartilage damage and radiographic evidence of joint space narrowing in early osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*. April 1991;34(4):377–82.
13. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*. August 2009;17(8):971–9.
14. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, u. a. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis & Rheumatism*. Februar 2006;54(2):533–9.
15. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, u. a. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics*. 25. April 2007;39(4):529–33.
16. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus V., Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. September 2002;10(9):707–13.
17. Na Y, Bai R, Zhao Z, Wei Y, Li D, Wang Y, u. a. <i>IL1R1</i> gene polymorphisms are associated with knee osteoarthritis risk in the Chinese Han population. *Oncotarget*. 16. Januar 2017;8(3):4228–33.
18. Cong Y, Ru J-Y, Bao N-R, Guo T, Zhao J-N. A single nucleotide polymorphism in the TGF-β1 gene (rs1982073 C>T) may contribute to increased risks of bone fracture, osteoporosis, and osteoarthritis: a meta-analysis. *Clinical Rheumatology*. 13. April 2016;35(4):973–85.
19. Chu X, Xu D, Gao J, Wang L, Yan S. Association of OPG gene polymorphisms with the incidence and radiographic stage of knee osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(2):5144–53.
20. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. September 2005;13(9):769–81.

Literaturverzeichnis

21. Ma H-L, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis and Cartilage*. Juni 2007;15(6):695–700.
22. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetky DS, u. a. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical orthopaedics and related research*. Juni 2004;(423):17–26.
23. Lee JH, Fitzgerald JB, DiMicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis & Rheumatism*. August 2005;52(8):2386–95.
24. Kuijt M-TK, Inklaar H, Gouttebauge V, Frings-Dresen MHW. Knee and ankle osteoarthritis in former elite soccer players: A systematic review of the recent literature. *Journal of Science and Medicine in Sport*. November 2012;15(6):480–7.
25. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2010;18(4):419–33.
26. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;58–69.
27. Berran Y, Luenda C, Brent B, Cecil B. Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: A review. 2015;57(6):742–68.
28. Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 28. November 2003;55(12):1531–46.
29. Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Lavery S, Little CB, u. a. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18 Suppl 3:S2-6.
30. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, u. a. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: Interaction with exogenous cytokines. *Arthritis & Rheumatism*. Mai 2003;48(5):1292–301.
31. Lohmander LS, Hoerrner LA, Dahlberg L, Roos H, Björnsson S, Lark MW. Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments

Literaturverzeichnis

- in human knee joint fluid after injury. *The Journal of rheumatology*. August 1993;20(8):1362–8.
32. Lohmander LS, Saxne T, Heinegård DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. Januar 1994;53(1):8–13.
 33. Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. März 1999;42(3):534–44.
 34. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, u. a. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 15. April 2005;64(5):694 LP-698.
 35. Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Clinical Practice Rheumatology*. März 2008;4(3):128–35.
 36. Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. Oktober 2006;20(5):983–1002.
 37. Martinek V. Anatomie und pathophysiologie des hyalinen knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2003;54(6):166–70.
 38. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional course lectures*. 1998;47:487–504.
 39. Ondrésik M, Azevedo Maia FR, da Silva Morais A, Gertrudes AC, Dias Bacelar AH, Correia C, u. a. Management of knee osteoarthritis. Current status and future trends. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016;9999(xxx):1–23.
 40. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 19. September 2006;66(4):433–9.
 41. Mcalindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-

Literaturverzeichnis

- Zeinstra SM, u. a. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. 2014;
42. Bennell KL, Hinman RS. A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee. *Journal of Science and Medicine in Sport*. Januar 2011;14(1):4–9.
 43. Gallelli L, Galasso O, Falcone D, Southworth S, Greco M, Ventura V, u. a. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on clinical outcomes, synovial fluid cytokine concentration and signal transduction pathways in knee osteoarthritis. A randomized open label trial. *Osteoarthritis and Cartilage*. September 2013;21(9):1400–8.
 44. Mandegar R, Conway C, Elton C. Lower gastrointestinal adverse effects of NSAIDs: an extreme example of a common problem. *BMJ case reports*. 20. Februar 2013;2013:bcr2012008274.
 45. Scarpignato C, Lanas A, Blandizzi C, Lems WF, Hermann M, Hunt RH. Safe prescribing of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with osteoarthritis--an expert consensus addressing benefits as well as gastrointestinal and cardiovascular risks. *BMC medicine*. Januar 2015;13:55.
 46. Peyron JG. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. *The Journal of rheumatology Supplement*. August 1993;39:10–5.
 47. Moreland LW, Yamada H, Fujikawa K, Nishikori T, Chen J, Naora H, u. a. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Research & Therapy*. 2003;5(2):54.
 48. Bannuru RR, Natov NS, Dasi UR, Schmid CH, McAlindon TE. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis – meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*. Juni 2011;19(6):611–9.
 49. Rutjes AWS, Jüni P, da Costa BR, Trelle S, Nuesch E, Reichenbach S. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. *Annals of Internal Medicine*. 7. August 2012;157(3):180.
 50. Karkabi S, Rosenberg N. Arthroscopic Debridement with Lavage and

Literaturverzeichnis

- Arthroscopic Lavage Only as the Treatment of Symptomatic Osteoarthritic Knee. *Open Journal of Clinical Diagnostics*. 2015;5(2):68–73.
51. Spahn G, Schiele R, Hofmann G, Schiltenswolf M, Grifka J, Vaitl T, u. a. Metaanalyse zur Bestimmung des relativen Risikos posttraumatischer Gonarthrosen. *Physikalische Medizin, Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin*. 17. Februar 2012;22(1):33–33.
 52. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Der Orthopade*. Januar 1999;28(1):26–32.
 53. Behrens P. Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. *Arthroskopie*. August 2005;18(3):193–7.
 54. Anders S, Volz M, Frick H, Gellissen J. A Randomized, Controlled Trial Comparing Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC®) to Microfracture: Analysis of 1- and 2-Year Follow-Up Data of 2 Centers. *The Open Orthopaedics Journal*. 5. Mai 2013;7(1):133–43.
 55. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research*. März 1989;7(2):208–18.
 56. Minas T. Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: economics and quality of life. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*. November 1998;27(11):739–44.
 57. Ossendorf C, Steinwachs MR, Kreuz PC, Osterhoff G, Lahm A, Ducommun PP, u. a. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the treatment of large and complex cartilage lesions of the knee. *Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology : SMARTT*. 21. Mai 2011;3(1):11.
 58. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, u. a. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis research & therapy*. 2003;5(1):R60-73.
 59. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, u. a.

Literaturverzeichnis

- Characteristic Complications after Autologous Chondrocyte Implantation for Cartilage Defects of the Knee Joint. *The American Journal of Sports Medicine*. November 2008;36(11):2091–9.
60. Filardo G, Kon E, Andriolo L, Di Matteo B, Balboni F, Marcacci M. Clinical Profiling in Cartilage Regeneration. *The American Journal of Sports Medicine*. April 2014;42(4):898–905.
61. Filardo G, Andriolo L, Balboni F, Marcacci M, Kon E. Cartilage failures. Systematic literature review, critical survey analysis, and definition. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 6. Dezember 2015;23(12):3660–9.
62. Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD. Advances in articular cartilage repair. *Injury*. November 2005;36(4):S14–23.
63. Bobic V, Morgan CD, Carter T. Osteochondral autologous graft transfer. *Operative Techniques in Sports Medicine*. April 2000;8(2):168–78.
64. Matricali GA, Dereymaeker GPE, Luyten FP. Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review. *Acta orthopaedica Belgica*. Oktober 2010;76(5):669–74.
65. Mumme M, Steinitz A, Nuss KM, Klein K, Feliciano S, Kronen P, u. a. Regenerative Potential of Tissue-Engineered Nasal Chondrocytes in Goat Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part A*. November 2016;22(21–22):1286–95.
66. Thomas D, Knight P, White K, Mencia M. Are Patients Satisfied with their Total Joint Replacement Surgery? A Prospective Cross Sectional Survey. *West Indian Medical Journal*. 1. April 2016;
67. Jain NB, Higgins LD, Ozumba D, Guller U, Cronin M, Pietrobon R, u. a. Trends in epidemiology of knee arthroplasty in the United States, 1990-2000. *Arthritis & Rheumatism*. Dezember 2005;52(12):3928–33.
68. Memtsoudis SG, Ma Y, Chiu Y-L, Poultsides L, Gonzalez Della Valle A, Mazumdar M. Bilateral total knee arthroplasty: risk factors for major morbidity and mortality. *Anesthesia and analgesia*. Oktober 2011;113(4):784–90.
69. Saleh K, Olson M, Resig S, Bershady B, Kuskowski M, Gioe T, u. a. Predictors of wound infection in hip and knee joint replacement: results from a 20 year

Literaturverzeichnis

- surveillance program. *Journal of Orthopaedic Research*. Mai 2002;20(3):506–15.
70. Harrysson OLA, Robertsson O, Nayfeh JF. Higher Cumulative Revision Rate of Knee Arthroplasties in Younger Patients with Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. April 2004;421:162–8.
71. Buechel FF, Buechel FF, Pappas MJ, D'Alessio J. Twenty-year evaluation of meniscal bearing and rotating platform knee replacements. *Clinical orthopaedics and related research*. Juli 2001;(388):41–50.
72. McGroarty BJ, Stuart MJ, Sim FH. Participation in Sports After Hip and Knee Arthroplasty: Review of Literature and Survey of Surgeon Preferences. *Mayo Clinic Proceedings*. April 1995;70(4):342–8.
73. Parvizi J, Nunley RM, Berend KR, Lombardi A V., Ruh EL, Clohisy JC, u. a. High Level of Residual Symptoms in Young Patients After Total Knee Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 24. Januar 2014;472(1):133–7.
74. Bruns J, Steinhagen J. [Transplantation of chondrogenic tissue in the treatment of lesions of of the articular cartilage]. *Der Orthopade*. Januar 1999;28(1):52–60.
75. Mow VC, Holmes MH, Michael Lai W. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *Journal of Biomechanics*. Januar 1984;17(5):377–94.
76. Hasler EM, Herzog W, Wu JZ, Müller W, Wyss U. Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Critical reviews in biomedical engineering*. 1999;27(6):415–88.
77. Bötsch K. Funktionelle Anatomie des Gelenkknorpels. Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde an der tierärztlichen Fakultät der LMU München. LMU München; 2007.
78. Imhof H, Breitensteiner M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI*. Juni 1999;10(3):180–92.
79. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*. 2009;1(6):461–8.
80. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of

Literaturverzeichnis

- management. *British Medical Bulletin*. 2008;87(1):77–95.
81. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*. Januar 1999;28(1):31–3.
 82. Jeffery A, Blunn G, Archer C, Bentley G. Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *Bone & Joint Journal*. 1991;73–B(5).
 83. Eyre DR, Wu J-J, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochemical Society Transactions*. 1. November 2002;30(6):894–900.
 84. Huang K, Wu L. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: A Review. *Journal of International Medical Research*. Dezember 2008;36(6):1149–60.
 85. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microscopy Research and Technique*. 1. August 1994;28(5):385–97.
 86. Stefan Lohmander L, Neame PJ, Sandy JD. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. September 1993;36(9):1214–22.
 87. Mort JS, Geng Y, Fisher WD, Roughley PJ. Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;17(1):89.
 88. Martel-Pelletier J, Wildi LM, Pelletier J-P. Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone*. 2012;51(2):297–311.
 89. Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, u. a. Advanced Tools for Tissue Engineering: Scaffolds, Bioreactors, and Signaling. *Tissue Engineering*. Dezember 2006;12(12):3285–305.
 90. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2011;17(4):281–99.
 91. Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. Juli 2007;28(21):3217–

Literaturverzeichnis

- 27.
92. Seo BB, Choi H, Koh JT, Song SC. Sustained BMP-2 delivery and injectable bone regeneration using thermosensitive polymeric nanoparticle hydrogel bearing dual interactions with BMP-2. *Journal of Controlled Release*. 2015;
93. Park D, Wu W, Wang Y. A functionalizable reverse thermal gel based on a polyurethane/PEG block copolymer. *Biomaterials*. Januar 2011;32(3):777–86.
94. Nguyen MK, Lee DS. Injectable Biodegradable Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*. 9. Juni 2010;10(6):563–79.
95. Liao H-T, Chen C-T, Chen J-P. Osteogenic Differentiation and Ectopic Bone Formation of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Injectable Thermo-Responsive Polymer Hydrogel. *Tissue Engineering Part C: Methods*. November 2011;17(11):1139–49.
96. Cohn D, Sosnik A. Responsive biomedical composites. Google Patents; 2008.
97. Batrakova E V., Kabanov A V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*. 2008;130(2):98–106.
98. Cohn D, Lando G, Sosnik A, Garty S, Levi A. PEO–PPO–PEO-based poly(ether ester urethane)s as degradable reverse thermo-responsive multiblock copolymers. *Biomaterials*. März 2006;27(9):1718–27.
99. Volkmer E, Leicht U, Moritz M, Schwarz C, Wiese H, Milz S, u. a. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature as carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2013;24(9):2223–34.
100. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*. 7. Dezember 2004;22(4):233–41.
101. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of dental research*. 2014;93(4):335–45.
102. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney International*. März 1992;41(3):557–9.
103. Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*. 1965;150(3698).

Literaturverzeichnis

104. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, u. a. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528–35.
105. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. März 1999;287(1):103–15.
106. Cowan CM, Aghaloo T, Chou Y-F, Walder B, Zhang X, Soo C, u. a. MicroCT Evaluation of Three-Dimensional Mineralization in Response to BMP-2 Doses *In Vitro* and in Critical Sized Rat Calvarial Defects. *Tissue Engineering*. März 2007;13(3):501–12.
107. Muñoz-Sanjuán I, Brivanlou AH. Neural Induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*. 1. April 2002;3(4):271–80.
108. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone*. Juni 1998;22(6):591–603.
109. Vaibhav B, Nilesh P, Vikram S, Anshul C. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: A current concept update. *Injury*. November 2007;38(11):1227–35.
110. Kingsley DM. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends in Genetics*. 1994;10(1):16–21.
111. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. Januar 2008;2(1):1–13.
112. Hausmann M, Ehnert S, Hofmann V, Döbele S, Freude T, Stöckle U, u. a. Einsatz der Bone morphogenetic Proteins (BMPs) zur Behandlung von Pseudarthrosen – Effizienz und Therapieversagen. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 23. April 2014;152(2):144–51.
113. Badlani N, Oshima Y, Healey R, Coutts R, Amiel D. Use of Bone Morphogenic Protein-7 as a Treatment for Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2009;467(12):3221–9.
114. Badlani N, Inoue A, Healey R, Coutts R, Amiel D. The protective effect of OP-1

Literaturverzeichnis

- on articular cartilage in the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2008;16(5):600–6.
115. Lyons KM, Hogan BLM, Robertson EJ. Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mechanisms of Development*. März 1995;50(1):71–83.
116. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1. März 2002;17(3):513–20.
117. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & development*. 15. November 1995;9(22):2808–20.
118. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & development*. 15. November 1995;9(22):2795–807.
119. Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka P V. Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *The Journal of cell biology*. November 1993;123(4):921–33.
120. Shintani N, Hunziker EB. Chondrogenic differentiation of bovine synovium: Bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor β 1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis & Rheumatism*. Juni 2007;56(6):1869–79.
121. Chubinskaya S, Kumar B, Merrihew C, Heretis K, Rueger DC, Kuettner KE. Age-related changes in cartilage endogenous osteogenic protein-1 (OP-1). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2002;1588(2):126–34.
122. Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J, McCartney J, Rueger DC, u. a. Human Articular Chondrocytes Express Osteogenic Protein-1. 2000;48(2):239–50.

Literaturverzeichnis

123. Chubinskaya S, Otten L, Soeder S, Aigner T, Loeser R. Regulation of anabolic and catabolic pathways by osteogenic protein-1: gene array data. *Trans 53rd ORS*. 2007;
124. Flechtenmacher J, Huch K, Thonar EJ-MA, Mollenhauer JA, Davies SR, Schmid TM, u. a. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. November 1996;39(11):1896–904.
125. Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. August 2003;48(8):2188–96.
126. Nishida Y, Knudson CB, Eger W, Kuettner KE, Knudson W. Osteogenic protein 1 stimulates cell-associated matrix assembly by normal human articular chondrocytes: Up-regulation of hyaluronan synthase, CD44, and aggrecan. *Arthritis & Rheumatism*. Januar 2000;43(1):206–14.
127. Chubinskaya S, Hakimiyan A, Pacione C, Yanke A, Rappoport L, Aigner T, u. a. Synergistic effect of IGF-1 and OP-1 on matrix formation by normal and OA chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage*. April 2007;15(4):421–30.
128. Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im H-J. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. Dezember 2005;52(12):3910–7.
129. Rueger DC, Chubinskaya S. Bone morphogenetic proteins in articular cartilage repair. In: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond*. Basel: Birkhäuser Basel; 2004. S. 109–32.
130. Chubinskaya S, Hakimiyan A a, Rappoport L, Yanke A, Rueger DC, Cole BJ. Response of human chondrocytes prepared for autologous implantation to growth factors. *The journal of knee surgery*. 14. Januar 2008;21(3):192–9.
131. Merrihew C, Kumar B, Heretis K, Rueger DC, Kuettner KE, Chubinskaya S. Alterations in endogenous osteogenic protein-1 with degeneration of human articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. September

Literaturverzeichnis

- 2003;21(5):899–907.
132. Chubinskaya S, Kawakami M, Rappoport L, Matsumoto T, Migita N, Rueger DC. Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs. *Journal of Orthopaedic Research*. April 2007;25(4):517–30.
 133. Fan Z, Chubinskaya S, Rueger DC, Bau B, Haag J, Aigner T. Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1. *Clinical and experimental rheumatology*. 2004;22(1):103–6.
 134. Im H-J, Pacione C, Chubinskaya S, Van Wijnen AJ, Sun Y, Loeser RF. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 11. Juli 2003;278(28):25386–94.
 135. Wang Z, Hutton WC, Yoon ST. Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor- α -induced activation of nuclear factor κ B and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II. *The Spine Journal*. März 2014;14(3):505–12.
 136. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *International orthopaedics*. 2007;31(6):773–81.
 137. Glasson SSS, Blanchet TJJ, Morris EAA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2007;15(9):1061–9.
 138. Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, u. a. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(6):1627–36.
 139. Cheng DS, Visco CJ. Pharmaceutical therapy for osteoarthritis. *PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation*. 2012;4(5 Suppl):S82-8.
 140. Dequeker J, Luyten FP. The history of osteoarthritis-osteoarthrosis. *Annals of*

Literaturverzeichnis

- the Rheumatic Diseases. 2008;67(1):5–10.
141. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377(9783):2115–26.
 142. Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet (London, England)*. 12. Januar 2005;365(9463):965–73.
 143. Fry DE, Pine M, Nedza SM, Locke DG, Reband AM, Pine G. Risk-Adjusted Hospital Outcomes in Medicare Total Joint Replacement Surgical Procedures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 4. Januar 2017;99(1):10–8.
 144. Ricciardi BF, Oi KK, Daines SB, Lee Y-Y, Joseph AD, Westrich GH. Patient and Perioperative Variables Affecting 30-Day Readmission for Surgical Complications After Hip and Knee Arthroplasties: A Matched Cohort Study. *The Journal of arthroplasty*. 21. Oktober 2016;
 145. Kon E, Filardo G, Drobic M, Madry H, Jelic M, van Dijk N, u. a. Non-surgical management of early knee osteoarthritis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2012;20(3):436–49.
 146. Gouttebauge V, Inklaar H, Frings-Dresen MH. Risk and consequences of osteoarthritis after a professional football career: a systematic review of the recent literature. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. August 2014;54(4):494–504.
 147. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Foundation symposium*. 2003;249:175-86-9, 234–8, 239–41.
 148. Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Laboratory animals*. 2008;42(1):71–82.
 149. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(1):105–15.
 150. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18 Suppl 3:S17-23.

Literaturverzeichnis

151. Silberberg R. Epiphyseal growth and osteoarthritis in blotchy mice. *Experimental cell biology*. 1977;45(1–2):1–8.
152. Fang H, Beier F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nature reviews Rheumatology*. 2014;10(7):413–21.
153. Buma P, Schreurs W, Verdonschot N. Skeletal tissue engineering—from in vitro studies to large animal models. *Biomaterials*. April 2004;25(9):1487–95.
154. Joosten LAB, Smeets RL, Koenders MI, Lubberts E, Iwakura Y, Loo FAJ Van De, u. a. Interleukin-18 Promotes Joint Inflammation and Induces Interleukin-1-Driven Cartilage Destruction. 2004;165(3):959–67.
155. van Osch GJ, van der Kraan PM, Blankevoort L, Huiskes R, van den Berg WB. Relation of ligament damage with site specific cartilage loss and osteophyte formation in collagenase induced osteoarthritis in mice. *The Journal of rheumatology*. Juli 1996;23(7):1227–32.
156. Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, u. a. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010;18(SUPPL. 3):S10–6.
157. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, u. a. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis and cartilage*. 2005;13(7):632–41.
158. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European journal of endocrinology*. Januar 2000;142(1):9–21.
159. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1997;8(2):154–63.
160. Gibson JD, O'Sullivan MB, Alaei F, Paglia DN, Yoshida R, Guzzo RM, u. a. Regeneration of Articular Cartilage by Human ESC-Derived Mesenchymal Progenitors Treated Sequentially with BMP-2 and Wnt5a. *STEM CELLS Translational Medicine*. Januar 2017;6(1):40–50.
161. Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, u. a. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone

Literaturverzeichnis

- regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(22):5241–51.
162. Hayashi M, Muneta T, Ju Y-J, Mochizuki T, Sekiya I. Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):R118.
163. Huang H, Skelly JD, Ayers DC, Song J. Age-dependent Changes in the Articular Cartilage and Subchondral Bone of C57BL/6 Mice after Surgical Destabilization of Medial Meniscus. *Scientific Reports*. 2017;7(September 2016):42294.
164. Stöve J, Schneider-Wald B, Scharf H-P, Schwarz ML. Bone morphogenetic protein 7 (bmp-7) stimulates Proteoglycan synthesis in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2006;60(10):639–43.
165. Muehleman C, Kuettner KE, Rueger DC, ten Dijke P, Chubinskaya S. Immunohistochemical Localization of Osteogenic Protein (OP-1) and Its Receptors in Rabbit Articular Cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1. Oktober 2002;50(10):1341–9.
166. Jung MR, Shim IK, Chung HJ, Lee HR, Park YJ, Lee MC, u. a. Local BMP-7 release from a PLGA scaffolding-matrix for the repair of osteochondral defects in rabbits. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;162(3):485–91.
167. Solchaga LA, Gao J, Dennis JE, Awadallah A, Lundberg M, Caplan AI, u. a. Treatment of Osteochondral Defects with Autologous Bone Marrow in a Hyaluronan-Based Delivery Vehicle. *Tissue Engineering*. April 2002;8(2):333–47.
168. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju Y-J, Mochizuki T, u. a. Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(8):1088–92.
169. Masuda K, Imai Y, Okuma M, Muehleman C, Nakagawa K, Akeda K, u. a. Osteogenic Protein-1 Injection Into a Degenerated Disc Induces the Restoration of Disc Height and Structural Changes in the Rabbit Anular Puncture Model. *Spine*. April 2006;31(7):742–54.
170. Miyamoto K, Masuda K, Kim JG, Inoue N, Akeda K, Andersson GBJ, u. a.

Literaturverzeichnis

- Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 2006;6(6):692–703.
171. Yang C-Y, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the „usual suspects“. *Osteoarthritis and cartilage*. 12. Februar 2017;0(0).
172. Hurtig M, Chubinskaya S, Dickey J, Rueger D. BMP-7 protects against progression of cartilage degeneration after impact injury. *Journal of Orthopaedic Research*. Mai 2009;27(5):602–11.
173. Klätte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, Greiner S, Gerhardt C, Hartwig J, u. a. Characteristics and Stimulation Potential with BMP-2 and BMP-7 of Tenocyte-Like Cells Isolated from the Rotator Cuff of Female Donors. *PLoS ONE*. 2013;8(6):1–13.
174. Tamai N, Myoui A, Hirao M, Kaito T, Ochi T, Tanaka J, u. a. A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis and Cartilage*. Mai 2005;13(5):405–17.
175. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, u. a. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *The Journal of bone and joint surgery American volume*. Februar 2000;82(2):151–60.
176. Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. Mai 2009;30(13):2499–506.
177. Kobayashi M, Oka M. Characterization of a polyvinyl alcohol-hydrogel artificial articular cartilage prepared by injection molding. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. Januar 2004;15(6):741–51.
178. Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PYC, Duan B, Malone E, u. a. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*. 1. September 2012;4(3):35005.

Literaturverzeichnis

179. Ozbolat IT, Peng W, Ozbolat V. Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today*. August 2016;21(8):1257–71.
180. Yu Y, Moncal KK, Li J, Peng W, Rivero I, Martin JA, u. a. Three-dimensional bioprinting using self-assembling scalable scaffold-free "tissue strands" as a new bioink. *Scientific reports*. 27. Juni 2016;6:28714.
181. Zhang W, Lian Q, Li D, Wang K, Hao D, Bian W, u. a. Cartilage repair and subchondral bone migration using 3D printing osteochondral composites: a one-year-period study in rabbit trochlea. *BioMed research international*. 2014;2014:746138.
182. Sala R, Kwon MY, Kim M, Gullbrand S, Henning EA, Mauck RL, u. a. Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. März 2017;ten.TEA.2016.0464.
183. Peng S, Wu C-W, Lin J-Y, Yang C-Y, Cheng M-H, Chu I-M. Promoting chondrocyte cell clustering through tuning of a poly(ethylene glycol)-poly(peptide) thermosensitive hydrogel with distinctive microarchitecture. *Materials Science and Engineering: C*. Februar 2017;
184. Pietrosimone B, Troy Blackburn J, Harkey MS, Luc BA, Hackney AC, Padua DA, u. a. Walking Speed As a Potential Indicator of Cartilage Breakdown Following Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthritis Care & Research*. Juni 2016;68(6):793–800.
185. Schmal H, Bernstein A, Feucht MJ, Erdle B, Pestka JM, Pham TM, u. a. Prospective Clinical Trial for Septic Arthritis: Cartilage Degradation and Inflammation Are Associated with Upregulation of Cartilage Metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:1–7.
186. He G, Chen X, Zhang G, Lin H, Li R, Wu X. Detection of Urine C2C and Trace Element Level in Patients with Knee Osteoarthritis. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 12. September 2014;70(1):475–9.
187. Raducanu A, Hunziker EB, Drosse I, Aszódi A. Beta1 integrin deficiency results in multiple abnormalities of the knee joint. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(35):23780–92.
188. Ameye LG, Deberg M, Oliveira M, Labasse A, Aeschlimann JM, Henrotin Y. The

Literaturverzeichnis

- chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO2 provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. *Arthritis & Rheumatism*. Oktober 2007;56(10):3336–46.
189. Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, u. a. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. Juli 2013;31(7):1026–31.
190. Aurich M, Hofmann GO, Rolauffs B. Differences in type II collagen turnover of osteoarthritic human knee and ankle joints. *International Orthopaedics*. 6. Februar 2017;1–7.
191. Takahashi T, Muneta T, Tsuji K, Sekiya I. BMP-7 inhibits cartilage degeneration through suppression of inflammation in rat zymosan-induced arthritis. *Cell and tissue research*. 2011;344(2):321–32.
192. Hunter DJ, Pike MC, Jonas BL, Kissin E, Krop J, McAlindon T. Phase 1 safety and tolerability study of BMP-7 in symptomatic knee osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:232.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua des.	Destilliertes Wasser
BDI	Butandiisocyanat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C2C	Collagen 2 Cleavage Product
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMM	Destabilisierung des medialen Meniskus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
HEPA	High Efficiency particualr air filter
H&E	Hämatotoxylin-Eosin
i.v.	intravenös
IVC	Individually ventilated cage
kg	Kilogramm

Anhang

KG	Körpergewicht
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LCST	Lower Critical Solution Temperature
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMTL	Meniskotibiales Ligament
OP-1	Osteogenic Protein 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potentia Hydrogenii
s.c.	Subkutan
SD	Standard Deviation
SPF	Specific-Pathogen-Free
TGF- β	Transforming growth factor β
TRIS	Tris-aminomethan
UCST	Upper Critical Solution Temperature
UV	Ultraviolett
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

Anhang

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktureller Aufbau des Knorpels.....	8
Abbildung 2: Chondrozyten im Knorpel.....	9
Abbildung 3: Die generelle Struktur des Pluronic® 123 Bloc-Copolymer-Moleküls	12
Abbildung 4: Ultrastruktur der BMPs	14
Abbildung 5: Übersicht über die Wirkungen von BMP-7	15
Abbildung 6: Rechtes Kniegelenk einer Maus von frontal	22
Abbildung 7: Operationsablauf am linken Hinterlauf.	25
Abbildung 8: Ergebnisse der geblindeten Bewertung der Knorpelstruktur nach vier Wochen	37
Abbildung 9: Übersicht nach vier Wochen	38
Abbildung 10: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels in Toluidinblaufärbung nach vier Wochen	39
Abbildung 11: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels der BMP-7 Gruppe nach vier Wochen ..	40
Abbildung 12: Ergebnisse der geblindeten Bewertung des Aggrecangehalts nach acht Wochen.....	41
Abbildung 13: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels in Aggrecan-Antikörperfärbung	42
Abbildung 14: Ergebnisse der geblindeten Bewertung der Knorpelstruktur nach acht Wochen	45
Abbildung 15: Übersicht nach acht Wochen	46
Abbildung 16: Vergrößerte Darstellung des Gelenkknorpels in Toluidinblaufärbung nach acht Wochen	48
Abbildung 17: Ergebnisse der geblindeten Bewertung des Aggrecangehalts nach acht Wochen.....	49
Abbildung 18: Immunhistochemischen Färbung gegen Aggrecan nach acht Wochen	49
Abbildung 19: Vergleich der Struktur.....	50
Abbildung 20: Vergleich des Aggrecangehalts.....	51
Abbildung 21: C2C-Werte der operierten Tiere nach vier und acht Wochen.	52

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien	19
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Lösungen	19
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Tiere.....	19
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Anästhetika und Medikamente	20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte und Software.....	20
Tabelle 6: Versuchsgruppen	23
Tabelle 7: Histologische Scoringssystem modifiziert nach [138]	33
Tabelle 8: Klinischer Verlauf 4-Wochen Tiere, Gesamtüberblick	35
Tabelle 9: Klinischer Verlauf der 8-Wochen Tiere, Gesamtüberblick.....	43

7.4. Zusammensetzung der selbsthergestellten Lösungen

7.4.1. DAB Färbelösung

- Lösung 1: 0,027g DAB
- 50 ml Aqua dest.
- 50 ml 1M Tris HCl, pH 7,6
- Lösung 2: 500 µl Aqua dest.
- 100 µl H₂O₂, 30%
- Kurz vor Gebrauch: 120 µl von Lösung 2 zu Lösung 1 hinzugeben

7.4.2. 1M Tris-HCl Puffer

- 121,14 g TRIS in 800 ml Aqua dest. lösen
- pH auf 7,4 mittels 1 M HCl einstellen
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- anschließend autoklavieren

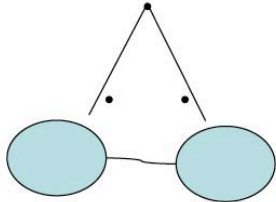
7.4.3. EDTA-Lösung (20%, pH 8) zur Entkalkung

- 1000 ml PBS-Lösung
- 200 g EDTA hinzufügen
- pH auf 8 mit Natriumhydroxid einstellen
- anschließend autoklavieren

7.4.4. Toluidinpuffer

- 100 ml 0,1 M K₂HPO₄ lösen in
- 77,6 ml 0,1 M HCl
- pH auf 2,5 einstellen mittels 1 M HCl

7.5. Aufzeichnungsbögen



Aktenzeichen: _____

Tier-Nummer: _____ (Randomisierung: _____)

Herkunft der Tiere: _____

Gewicht: _____ Lieferdatum: _____ Geschlecht: _____

OP-Tag: _____

Operateur: _____

	Uhrzeit	Bemerkungen:
Narkose		
Bemerkungen		
OP Ende		

Gel mit Wachstumsfaktoren auf _____ Körperseite

Versuchsdauer: _____

Datum: _____

Gewicht: _____

	Uhrzeit	Bemerkungen
Euthanasie		

Medikamente (Applikationsarten):

Narkose: Fentanyl 0,05 mg/kg + Dormicum® (Midazolam 5 mg/kg) + Domitor® (Medetomidin 0,5 mg/kg)

Antagonisierung: Narcanti® (Naloxon 1,2 mg/kg) + Anexate® (Flumazenil 0,5 mg/kg) + Antisedan® (Atipamezol 2,5 mg/kg)

postop. Analgesie: Temgesic® 0,1 mg/kg s.c. (Buprenorphin)

7.6. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei nachfolgenden Personen, die mich im Rahmen meiner Dissertation unterstützt und diese erst in dieser vorliegenden Form ermöglicht haben:

Ohne die große Unterstützung durch Herrn PD Dr. Carl Neuerburg wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank für die Unterstützung, Heranführung an die Wissenschaft und enge Betreuung von den ersten Tierversuchsanträgen bis zum Lesen des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Matthias Schieker für die Überlassung des Themas und die erste Heranführung sowie die Begleitung über alle Phasen der Arbeit hinweg.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Böcker für die Unterstützung und Überlassung der Arbeitsmaterialien durch die Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungs-chirurgie

Ganz besonders erwähnt sei das gesamte Team des ExperiMed Labors der Klinik für Allgemeine, Unfall und Wiederherstellungschirurgie. Insbesondere Herrn PD Dr. Attila Aszodi, Dr. Maximilian Saller, Dr. Paolo Alberton und Frau Zuzanna Farkas seien an dieser Stelle ausdrücklich erwähnt. Hier konnte ich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens erlernen und mein wissenschaftliches Interesse wurde geweckt.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und bei meiner Familie bedanken, die mich während des gesamten Studiums und auch der Erstellung dieser Arbeit immer größtmöglich unterstützt haben. Ohne Sie wäre die heute vorliegende Arbeit nicht denkbar gewesen.

7.7. Veröffentlichungen

Vorträge

Prävention degenerativer Knorpelschäden mittels BMP-7 augmentiertem Hydrogel;
93. Jahrestagung der Vereinigung Bayerischer Chirurgen e.V. 2016, München

Can a hydrogel augmented with BMP-7 prevent progression of osteoarthritis?
ExperiMed Symposium 2015, München

Can a hydrogel augmented with BMP-7 prevent progression of osteoarthritis?
EORS 25th annual meeting 2017, München

Posterpräsentationen

Prävention degenerativer Knorpelschäden mittels BMP-7 augmentiertem
thermosensitivem Hydrogel; Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie
(DKOU 2016). Berlin, 25.-28.10.2016. Düsseldorf: German Medical Science GMS
Publishing House; 2016. DocPO19-96

Rekonstruktion von Knochendefekten mit Calciumphosphat haltigen Biomaterialien;
Alterstraumatologie Kongress 2016. Marburg, 10.-11.03.2016. Düsseldorf: German
Medical Science GMS Publishing House; 2016. DocPO01-36

Anhang

7.8. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Evaluation der chondroprotektiven Eigenschaften eines BMP-7 augmentierten, thermosensitiven Hydrogels am murinen Gonarthrosemodell“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.10.2018

Ort, Datum

Alexander M. Keppler

Unterschrift