

Aus der  
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie  
Klinik der Universität München – MUM  
Muskuloskelettales Universitätszentrum München  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktion:

Prof. Dr. Wolfgang Böcker

Prof. Dr. Boris Holzapfel

***Molekularbiologische Untersuchung von autologen  
chondrocyte-like cells (mb-ACT) unter dem Einfluss  
des Wachstumsfaktors BMP-2 in vitro***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephan Nikolaus Pilsinger

aus

München

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Müller

Mitberichterstatter: PD Dr. Dorit Nägler

Mitbetreuung durch

den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Thomas Niethammer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Mündliche Prüfung: 06.06.2024

**Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Vorwort</b> .....	6
<b>1 Einführung</b> .....	7
1.1 Bedeutung von chondralen Defekten.....	7
1.2 Morphologie des Gelenkknorpels.....	7
1.3 Therapie der Arthrose .....	10
1.3.1 Konservative/medikamentöse Therapie.....	10
1.3.2 Operative Therapie .....	10
1.4 Autologe Chondrozyten Transplantation und matrixgestützte autologe Chondrozyten Transplantation.....	11
1.4.1 Indikation für die matrixgebundene autologe Chondrozytentransplantation .....	13
1.4.2 MACT-Konstrukt.....	14
1.4.3 Operationstechnik MACT.....	14
<b>2 Fragestellung</b> .....	17
<b>3 Material und Methodik</b> .....	18
3.1 Chondrozytenisolation aus dem MACT-Konstrukt.....	18
3.2 Zellkultur .....	19
3.3 Real-Time-PCR .....	19
3.3.1 RNA-Extraktion.....	19
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	20
3.3.3 Reverse Transkription von RNA .....	20
3.3.4 Quantitative Real-Time-PCR.....	21
3.4 Statistische Methoden .....	23
<b>4 Ergebnisse</b> .....	24
4.1 Kollagen-II Expression in ACT-Zellen und Fibroblasten .....	24
4.2 Kollagen-II-Expression in den ACT-Zellen mit und ohne BMP-2 .....	25
4.2.1 Molekularbiologischer Vergleich .....	25
4.2.2 Histologischer Vergleich .....	27
4.3 Kollagen-II-Expression in Fibroblasten mit und ohne BMP-2.....	33
4.3.1 Molekularbiologischer Vergleich .....	33
4.3.2 Histologischer Vergleich .....	34
4.4 Vergleich zwischen ACT-Zellen und Fibroblasten .....	34

---

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	36
5.1	Diskussion der Methode und Limitationen.....	36
5.2	ACT-Zellen und Fibroblasten reagieren unterschiedlich auf BMP-2.....	37
5.3	Dedifferenzierung der ACT-Zellen kann mit BMP-2 nicht verhindert werden.....	38
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	40
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	42
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	44
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	50
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	52
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	53
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae</b> .....	54

## Vorwort

Für mich ist es mehr als bloße Verpflichtung zur Ehrlich- und Genauigkeit, wenn jede Behauptung durch eine Quellenangabe belegt wird. Zudem bedeutet dies eine Entlastung und verdeutlicht, dass ich auf einer wissenschaftlichen Grundlage gearbeitet habe.

Abschließend hoffe ich sehr, den an mich gestellten Anforderungen und Erwartungen gerecht geworden zu sein – hat es mir doch große Freude bereitet, meine Arbeit zu verfassen und eine ganz neue Welt zu betreten, die nicht aus bloßem Zusammenfassen und der Wiedergabe von Bibliografien bestand, sondern mich bereits in aktive Prozesse einband, die mir in meinem späteren Berufsalltag noch häufig begegnen werden.

Allen beteiligten Personen, Institutionen und universitären Einrichtungen, die mich bei der Entstehung und Abfassung meiner Doktorarbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Boris Holzapfel bedanke ich mich, dass ich meine Arbeit in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, absolvieren durfte.

Besonders erwähnen möchte ich meinen Betreuer Herrn PD Dr. med. Thomas Niethammer, Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie, welcher diese Arbeit von fachwissenschaftlicher Seite betreute. Ihm möchte ich für die hilfreichen Anregungen und Empfehlungen danken, die er stets in freundlicher, fachkompetenter und verständnisvoller Weise zu geben wusste.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, vor allem der MTA-Leitung Frau Bärbel Schmitt und Frau Julia Redeker, die mir bei der Anfertigung und Auswertung meiner Befunde geholfen haben.

Zuletzt möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller herzlich danken, der mir die vorliegende Doktorarbeit ermöglicht hat und mir ein großartiger Ideengeber und hervorragender Unterstützer war.

München, im Mai 2023

Stephan Nikolaus Pilsinger

# 1 Einführung

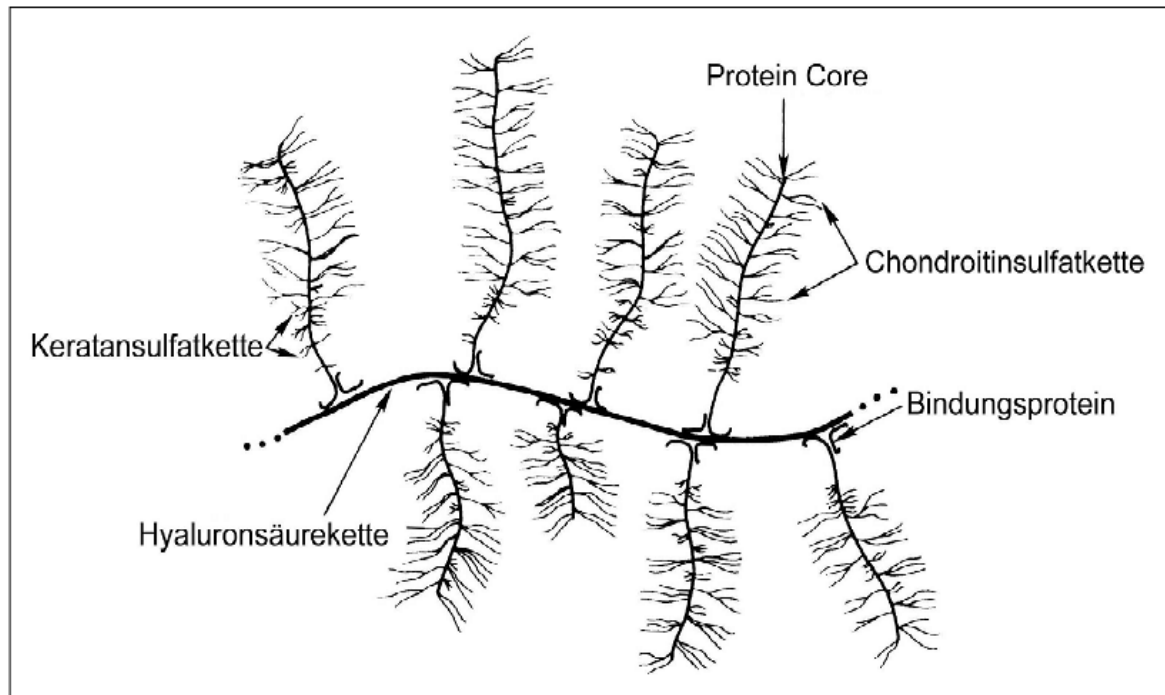
## 1.1 Bedeutung von chondralen Defekten

Der Begriff Arthrose lässt sich in seiner Etymologie von dem altgriechischen Begriff ‚arthron‘ (Gelenk) und dem lateinischen Begriff ‚deformare‘ (verstümmeln) herleiten. Damit wird in Deutschland ein über das altersbedingte Maß hinausgehender Gelenkverschleiß bezeichnet. Gemäß einer Studie des Robert-Koch-Instituts ist die Kniegelenksarthrose die in Deutschland am häufigsten vorkommende Arthroseerkrankung (Rabenberg 2013). Die Ursache für diesen Gelenkverschleiß ist eine irreversible Degeneration des hyalinen Knorpelgewebes (Chondrion). Dies führt im weiteren Verlauf zu Veränderungen der Ligamente, der Gelenkkapsel und der Synovialmembran. Die Folge sind starke Schmerzen und eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, was durch eine frühzeitige Diagnosestellung und Therapie verhindert werden kann (Altman 2010).

## 1.2 Morphologie des Gelenkknorpels

Die Aufgabe des Knorpelgewebes besteht darin, Wasser zu binden (Sophia Fox et al. 2009). Um dies zu gewährleisten, sekretieren die Chondrozyten eine extrazelluläre Matrix. Mit einem Anteil von 65-80% stellt Wasser den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix dar (van Mow et al. 1992). Der Rest besteht zu 90% aus Kollagen Typ II. Die übrigen Komponenten sind Kollagen Typ V, IX, X und XI und Proteoglykane. Die Festigkeit und Struktur des Knorpels wird durch die fibrillären Anteile des Knorpels definiert

Durch eine elektrostatische Anziehung werden die aus Keratansulfat sowie Chondroitinsulfat bestehenden Proteoglykane mit einem Core-Protein vernetzt. Die Hyaluronsäuremoleküle interagieren wiederum mit Proteoglykanen und dadurch entsteht ein Aggregat (siehe Abbildung 1). Diese Aggregate können wiederum mit Kollagen in Wechselwirkung treten (zusammengefasst in Roughley und Lee 1994).



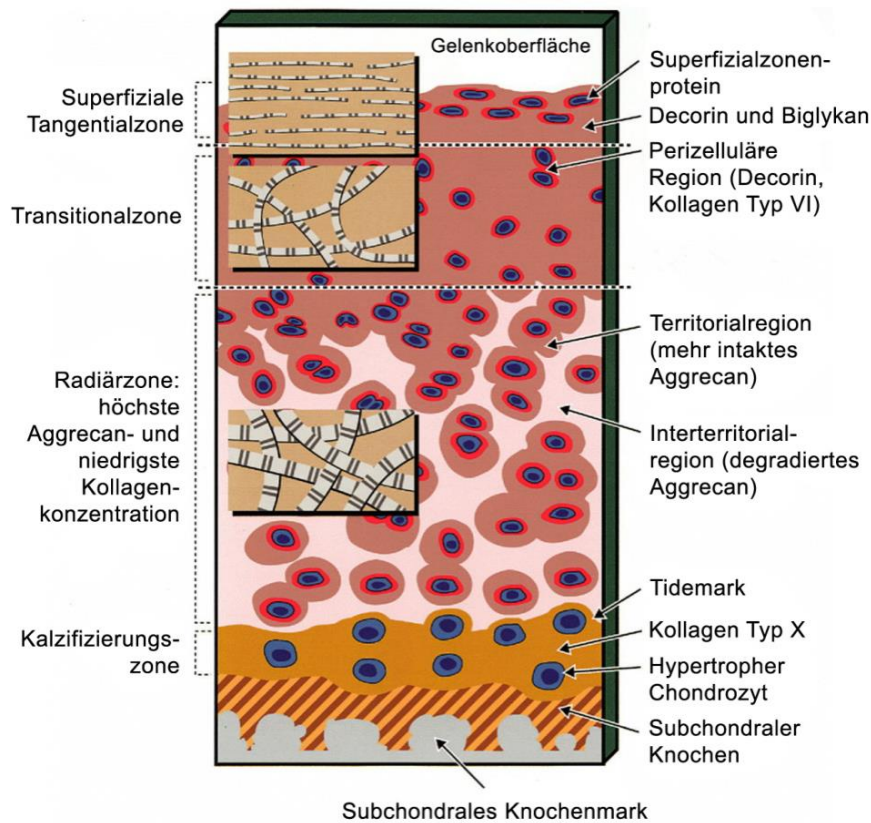
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Proteoglykanaggregatstruktur (Quelle: Buckwalter 1983)

Wasser ist der Hauptsubstituent zwischen den Zellen und nimmt die Funktion einer biomechanischen Feder wahr. Wenn demnach der Druck auf den Knorpel verstärkt wird, dann fließt das Wasser aus der Zellmatrix. Das Gegenteil tritt ein, sobald der Druck absinkt und das Wasser in die Proteoglykanzwischenräume befördert wird (Sophia Fox et al. 2009). Daraus kann gefolgert werden, dass die viskoelastischen und kollagenen Fasern für die Elastizität des Gelenkknorpels ausschlaggebend sind (Sophia Fox et al. 2009).

Weder Gefäße noch Nerven sind im ausdifferenzierten Knorpelgewebe vorhanden. Die Versorgung wird durch den Austausch von Nährstoffen mittels Diffusion sichergestellt. Für die Versorgung des Knorpels ist die Diffusion von Nährstoffen entscheidend, die über den H<sub>2</sub>O-Fluss sichergestellt wird. Mit zunehmendem Alter vermindert sich der Wassergehalt des Knorpels deutlich und folglich kommt es zu einer Abnahme der Druckfestigkeit (Sophia Fox et al. 2009).

Folgende vier — sowohl in der Zusammensetzung als auch hinsichtlich ihrer Aufgabe — divergierende Schichten definieren den hyalinen Knorpel: Superfizielle Tangentialzone, Transitionalzone, Radiärzone und Kalzifizierungszone (siehe Abbildung 2).





**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des hyalinen Knorpels (Quelle: Poole et al. 2001)

Mit Ausnahme des kindlichen Knorpelgewebes, besitzt dieser Gewebetyp nur eine geringfügige Regenerationsfähigkeit. Bei nicht tiefergehenden Knorpeldefekten ist eine wirkungslose Kollagen- und Glykosaminsynthese zu beobachten (Mankin 1982). Ausschlaggebend hierfür ist der morphologische Aufbau des Knorpels.

Die Chondrozyten sind fest in die Matrix eingebettet. Dies führt zu einer reduzierten Beweglichkeit, welche die Zellen an einer erneuten Migration in den Knorpeldefekt hindert. Kleinere Defekte im Knorpelgewebe können dennoch durch eingewanderte Zellen mittels Einblutung aus dem Knochenmarkraum sowie Wachstumsfaktoren geschlossen werden. Dies ist jedoch bei fortgeschrittenen Knorpelschäden ab einer Fläche von 2 cm<sup>2</sup> nicht mehr möglich. (Niemeyer et al.2022) Weitere Gründe für die schlechte Heilung von Knorpeldefekten sind die bradytrophe Beschaffenheit und die geringe Durchblutung des Knorpelgewebes. Therapeutische Maßnahmen sind bei Schäden ab circa 3 mm zu ergreifen. Geschieht dies nicht, so erfolgt eine Degeneration der Chondrozyten (Hall 2019). Hier kommt es zur Auflösung der faserigen Matrix und der Ausbildung eines vaskularisierten Narbengewebes mit einem hohen Anteil an Kollagen Typ I. Dieser Faserknorpel ist weniger belastbar, weniger stabil und degeneriert bei Druckbelastung (Karuppall 2017, Rim und Ju 2020).

### 1.3 Therapie der Arthrose

Als Hauptbehandlungsmethode der Gelenksarthrose hat sich in letzter Zeit die Versorgung mit Endoprothesen als bedeutend und wichtig erwiesen, wodurch sich ein rasanter Anstieg dieser Methode — mit beispielsweise fast 200.000 Knieendoprothesen allein im Jahr 2019 (Statista 2021) — herauskristallisiert hat. Eine Wechseloperation auf ein neues künstliches Kniegelenk, mitsamt den damit verbundenen Kosten, ist jedoch in den meisten Fällen nach einigen Jahren erforderlich. Innerhalb von 25 Jahren muss die Hälfte der Hüftgelenke ausgetauscht werden (Evans et al. 2019a), beim Kniegelenk sind es 28 % (Evans et al. 2019b). Somit ist bei jungen Patienten eine Versorgung mit einer Totalendoprothese zu vermeiden. Dazu stehen neben den konservativen und medikamentengestützten Therapien auch gelenkerhaltende Eingriffe zur Verfügung.

#### 1.3.1 Konservative/medikamentöse Therapie

Das Hauptziel einer medikamentösen Therapie ist die Verminderung von Schmerzen. Dazu wird, aufbauend auf Paracetamol bis hin zu Opioiden bei starken Beschwerden, die Schmerzmedikation gesteigert. In akuten Schmerzphasen ist die Indikation zur intraartikulären Verwendung von Kortikoiden ebenfalls gegeben. (Samson et al. 2007)

Ferner wird oftmals eine intraartikuläre Behandlung mit Hyaluronsäure (Hyalart®) (Miltner et al. 2002, Rodriguez-Merchan 2013, Beudart et al. 2020), Chondroitinsulfat (Beudart et al. 2020) und Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Orthokine®) (Ajrawat et al. 2019) durchgeführt. Diese Therapien wurden bisher nur symptomatisch eingesetzt, aber nicht, um die strukturelle Pathologie rückgängig zu machen. Bei dem in Deutschland nicht zugelassenen Medikament Diacerein konnte ein symptomatischer antiphlogistischer Effekt nachgewiesen werden (Alegría und Irrarázaval 2017, Honvo et al. 2019).

#### 1.3.2 Operative Therapie

Die Vorform von Arthrosen stellen Knorpeldefekte dar. Diese können nicht medikamentös verhindert werden. Somit ist es erforderlich, eine geeignete Behandlungsmethode zu finden, um ein Fortschreiten zur Arthrose zu vermeiden. Eine Möglichkeit besteht darin, den Defekt mit einer dem hyalinen Gelenkknorpel ähnlichen Gewebesubstanz abzudecken, die dauerhaft den mechanischen Belastungen widerstehen kann. Dazu werden aktuell zwei Verfahren genutzt: Eine Möglichkeit besteht darin, die intrinsische Regenerationsfähigkeit des Knorpels durch Pridie-Bohrung, Abrasionschondroplastik und Mikrofrakturierung anzuregen.

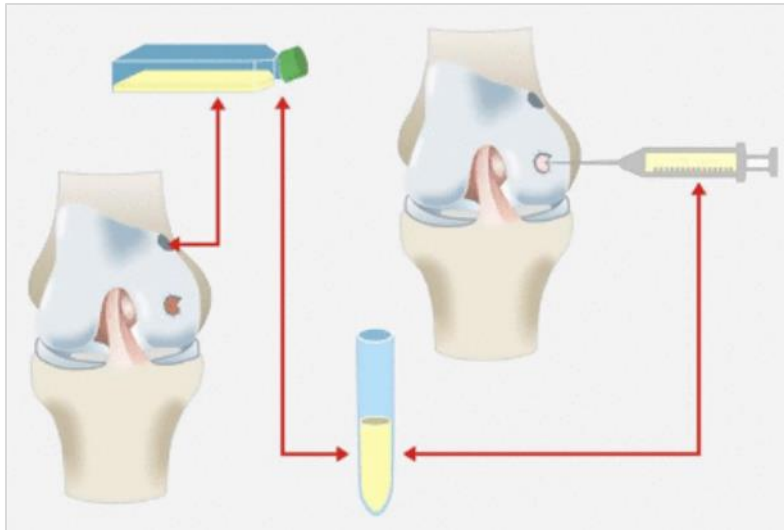
Die andere Methode besteht darin, Knorpelgewebe mittels verschiedener Operationsmethoden (OATS, osteochondral autograft transfer system; Mega-OATS; ACT, autologe Chondrozyten Transplantation; MACT, matrixgestützte ACT) zu transplantieren. Zur symptomatischen Therapie werden zusätzlich oft die arthroskopische Lavage, Debridement und Knorpel-Shaving eingesetzt.

#### **1.4 Autologe Chondrozyten Transplantation und matrixgestützte autologe Chondrozyten Transplantation**

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevante Operationsmethode der Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) und deren Weiterentwicklung, der MACT, näher erläutert (siehe auch Abbildung 3): Bei der erstmals im Jahr 1994 von Brittberg und Petersen durchgeführten ACT werden funktionstüchtige Chondrozyten mittels Arthroskopie aus nicht stark belasteten Gelenkknorpelarealen entnommen, enzymatisch aus ihrer extrazellulären Matrix herausgelöst und anschließend vervielfältigt (Brittberg et al. 1994).

Bei einem Zweiteingriff wird der Knorpeldefekt mit einem Periostlappen übernaht und anschließend die Chondrozytensuspension in die Defektstelle eingespritzt (siehe Abbildung 3). Eine Schmerzreduktion konnte bereits im Jahr 2000 durch eine klinische Studie nachgewiesen werden (Robinson et al. 2000). Nach 20 Jahren wurde bei 80% der Patienten noch keine Knieendoprothese erforderlich (Ogura et al. 2017).

Des Weiteren konnte bei Biopsien ein hyalionartiger Knorpel in den ehemaligen Defektarealen nachgewiesen werden (Paatela et al. 2020, Yoon et al. 2020, Siebold et al. 2018). Nachteile der ACT sind die hohen Kosten (Schrock et al. 2017) und die Notwendigkeit eines Zweiteingriffs.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der autologen Knorpelzelltransplantation (ACT). Dreiphasiger Verlauf: 1. Knorpelzellentnahme aus einer nicht geschädigten Region des Knorpels; 2. Vermehrung der Chondrozyten und Suspensierung; 3. Retransplantation. (Quelle: Marlovits et al. 2006)

Zur Verbesserung der Kosten-Nutzen-Relation und auch der Wirksamkeit der ACT wurde die MACT entwickelt. Hierbei werden die Chondrozyten in eine dreidimensionale Trägermatrix aus Kollagen, Hyaluron oder Polymeren (PLA, PGLA) eingebettet. Auf diese Weise kann, nach Aussage der Hersteller, die Dedifferenzierung der Chondrozyten vermindert und die Herstellung der extrazellulären Matrix verbessert werden. Bei der MACT ist eine wasserdichte Naht zur Anbindung an den intakten Knorpel nicht erforderlich. Sie stellt somit ein vereinfachtes intraoperatives Prozedere mit Verkürzung der Operationszeit dar. Eine arthroskopische Anwendung ist ebenfalls möglich. Die Fixierung der Knorpelmatrix kann mittels Fibrins, einer Einzelkopfnahnt oder resorbierbarer Pins erfolgen. Im Vergleich der ACT mit der MACT konnten in der Studie von Zeifang et al. (2010) keine signifikanten Unterschiede im Outcome festgestellt werden (Zeifang et al. 2010).

Sowohl bei einer ACT als auch bei einer MACT wird zur Indikationsstellung eine Arthroskopie benötigt. Dabei müssen sowohl das gesamte Kniegelenk als auch der betroffene Kniegelenksknorpel dargestellt, vermessen und nach dem International Cartilage Research Society (ICRS) System klassifiziert werden (siehe Tabelle 1). Bis 2003 wurde nach Outerbridge klassifiziert, dann wurde als Erweiterung dazu von der ICRS das „ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System“ als Standardklassifikation eingeführt.

**Tabelle 1:** Gegenüberstellung des ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification Systems und Outerbridge Systems zur Beschreibung von Knorpelschäden (Quelle: Stöve 2018)

Outerbridge	ICRS Grad	ICRS Beschreibung
	0	keine erkennbaren Defekte
I	1a	intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Erweichung
	1b	zusätzlich oberflächliche Risse/Fissuren
II	2	Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)
III	3a	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht (schwer abnormaler Knorpel)
	3b	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke bis zur kalzifizierenden Schicht
	3c	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke bis zur subchondralen Platte
	3d	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke mit Blasenbildung
IV	4a/b	vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte

Die ACT und die MACT eignen sich insbesondere für Knorpelschäden mit einer Fläche von 3 bis 10cm<sup>2</sup> (siehe Tabelle 2). Die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) bzgl. Gewebeersatz sollten bei der Vorbereitung einer MACT/ACT beachtet werden (Niemeyer et al. 2022).

**Tabelle 2:** Abgrenzung der Indikationsstellung der einzelnen Methoden (Quelle: Fritz 2013)

Alter bzw. Defektgröße	Tissue Response	OATS	ACT
Kinder/Jugendliche	+++	-	-
1-2 cm <sup>2</sup>	+++	++	-
3-4 cm <sup>2</sup>	+	+++	++
3-10 cm <sup>2</sup>	-	+	+++

#### 1.4.1 Indikation für die matrixgebundene autologe Chondrozytentransplantation

Eine MACT ist bei Knorpeldefekten Grad III–IV nach Outerbridge bzw. ab ICRS-Grad 3a indiziert. Während für eine ACT der Defekt von einer stabilen Knorpelschulter umgeben sein muss, um den Periostlappen stabil fixieren zu können, ist dies für eine MACT nicht erforderlich. Bei der MACT wird entweder die Matrix mit Zellen eingenäht, seltener mit

Pins befestigt, oder die Zellen sind in einem Gel, welches in den Defekt gefüllt wird und dann aushärtet.

Eine weitere Neuentwicklung in der ACT-Forschung stellen die gelartigen ACTs dar, wie beispielsweise NOVOCART® Inject. Diese sind über eine Arthroskopie mit gegebenenfalls einer Mini-Arthrotomie einbringbar und nicht mehr über eine große Arthrotomie. Im Follow-up bis 24 Monate zeigt diese neue Technik vergleichbar erfolgreiche Ergebnisse wie die klassische MACT. (Niethammer et al.2022)

Mit einer MACT sollten nur maximal zwei Knorpeldefekte gleichzeitig behandelt werden, die voneinander unabhängig sind. Bei fortgeschrittenen degenerativen Knorpelveränderungen, hochgradigen Osteoarthrosen, entzündlichen Gelenkerkrankungen und einer Instabilität des Gelenkes darf eine MACT nicht durchgeführt werden. Des Weiteren ist eine ausreichende Compliance des Patienten erforderlich. Totale/subtotale Menishektomie, Fehlstellungen des Gelenkes sowie implantierte Karbonstifte stellen relative Kontraindikationen für eine MACT dar. (Anders et al. 2008)

#### **1.4.2 MACT-Konstrukt**

Die bei einer MACT verwendete Matrix besteht aus einem Schwamm mit großemäßig definierten Poren, die säulenartig platziert und miteinander verbunden sind. Das Kollagen I, welches die Membran bildet, wird aus bovinem Perikard hergestellt. Das Kollagen I für den Schwamm wird aus Rinderhaut gewonnen. Über einen Lyophilisationsprozess ist die Membran fest mit dem Schwamm vernetzt. Ein spezifisches Aufbereitungsverfahren stellt eine Reinigung von nicht kollagenen Bestandteilen, wie Proteinen und Fetten, sicher.

Durch die säulenartig angeordneten Poren des Schwammes wird das Einwachsen mesenchymaler Zellen in den Knorpeldefekt gefördert. Das Eindringen unspezifischer Bindegewebszellen in den Knorpeldefekt sowie die übermäßige Verteilung mesenchymaler Stammzellen werden durch die nassstabile Membran vermieden. Der Schwamm und die Zellen müssen wegen ihrer mechanischen Stabilität vor Überbelastung protektiert werden.

#### **1.4.3 Operationstechnik MACT**

Zu Beginn einer Operation werden nach Indikationsstellung mit Hohlstanzen mit einem Durchmesser von 4 mm Knorpel-Knochen-Zylinder aus gesundem, nichtbelasteten Knorpelregionen gewonnen. Zur Durchführung wird mittels einer Arthroskopie die interkondyläre Notch eingestellt und eine Hohlstanze von antero-medial bis zur Fossa intercondylica

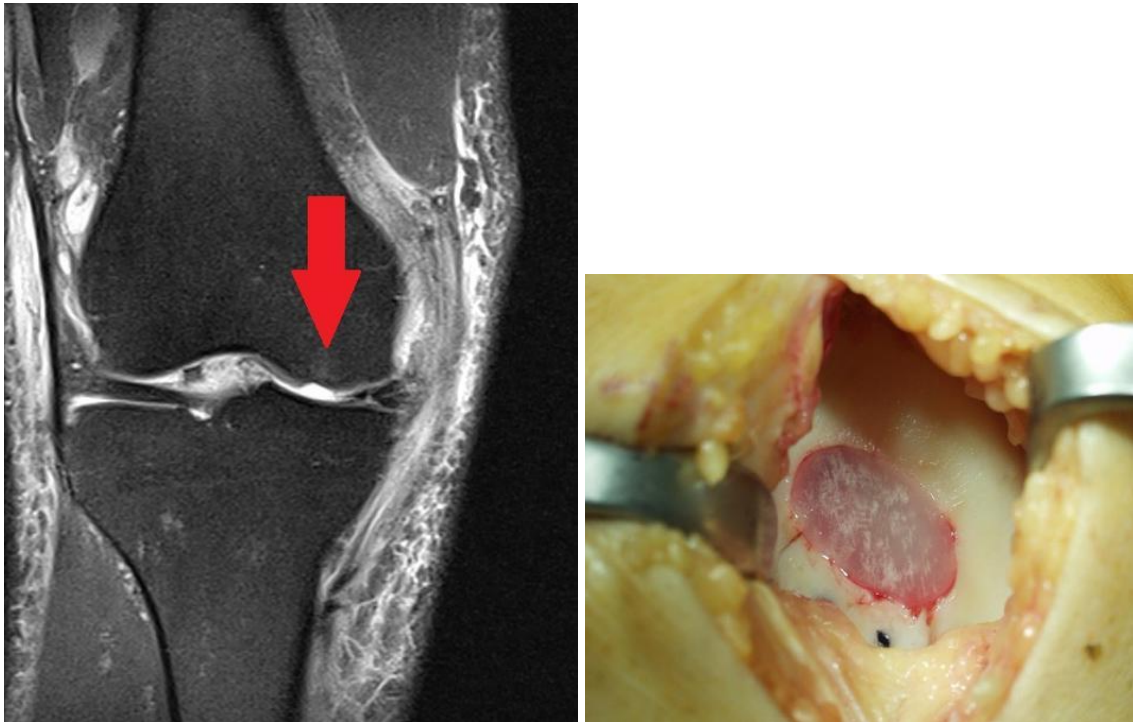
über einen weiteren Zugang eingeführt. Dabei werden Knorpelgewebsbiopsate mit einem Gewicht von 75–300mg entnommen und in steriler Nährlösung (TETEC) transportiert.

Aus den entnommenen Gewebeproben werden die Chondrozyten mechanisch mit Hilfe eines Skalpell und enzymatisch mittels einer Inkubation mit Kollagenase isoliert. Dies erfolgt extern (TETEC®, Reutlingen). Anschließend erfolgt eine zweidimensionale Kultivierung der Knorpelzellen für drei bis vier Wochen in einer Zellkulturflasche. Wenn die entsprechende Zelldichte erreicht ist, wird die Zellschicht ebenmäßig auf den porösen Anteil des Trägermaterials transferiert. Dies wird auf einer Polyethylenplatte gelegt und die Chondrozyten dringen sukzessive in die Poren ein.

Zur Kultivierung der verwendeten Chondrozyten wird nach Herstellerangaben das Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) verwendet, das eine wichtige Rolle im Knorpel- und Knochenwachstum einnimmt (Shah und Mithoefer 2020).

Bei einem zweiten Eingriff nach drei bis vier Wochen werden die MACT-Konstrukte passgenau in den Knorpeldefektbereich eingesetzt. Dazu wird, nach einer parapatellaren Arthrotomie, der defekte Knorpelbereich ausgestanzt und bis zur subchondralen Platte abgetragen.

Vor Durchführung einer MACT wird bei Bestehen eines osteochondralen Defektes eine Spongiosaplastik, z. B. aus dem Tibiakopf, konstruiert. Das Implantat wird aus Knorpel des Patienten, welcher vorab bei einer Arthroskopie gewonnen wurde, ex vivo herangezüchtet und mit der offenporigen Seite der Matrix in Richtung der subchondralen Platte eingebracht (siehe Abbildung 4). Die Kollagenschicht auf der anderen Seite der Matrix dient als Schutz gegenüber dem Gelenkspalt. Das Implantat wird mit resorbierbaren Fäden am gesunden Knorpel und bei fehlender Knorpelschulter mit einem resorbierbaren Pin befestigt.



**Abbildung 4:** Operationstechnik MACT. links: Knorpeldefekt im MRT, rechts: Nahtfixierung des Transplantats (Quelle: eigene Bilder MUM LMU München)

Postoperativ ist bei femoralen Knorpelschäden eine Bettruhe von 48 Stunden indiziert. Danach ist bis zur sechsten postoperativen Woche eine Teilbelastung von bis zu 20 kg erlaubt. Bis zur neunten Woche erfolgt eine Aufbelastung um je 25 kg pro Woche. Bei retropatellaren Knorpelschäden ist eine Vollbelastung ab dem zweiten postoperativen Tag mit einer maximalen Kniebeugung von 30 Grad möglich. Ab der siebten Woche erfolgt eine Steigerung um 15 Grad pro Woche.

Der weitere Verlauf nach Transplantation wird über hochauflösende Kernspinuntersuchungen der MACT in den betroffenen Gelenken kontrolliert. Eine direkte Kontrolle und Analyse der Qualität des Knorpeltransplantats ist nicht möglich.



## 2 Fragestellung

In der Bundesrepublik Deutschland leiden ungefähr fünf Millionen Menschen an Arthrose. Dies führt zu gravierenden Kosten für das deutsche Gesundheitssystem. So wurden im Jahr 2015 über 8,7 Milliarden Euro zur Therapie der Arthrose aufgewendet (Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. 2021). Eine Behandlungsoption für Knorpeldefekte ist die Autologe Chondrozyten-Transplantation.

Zuerst werden dafür arthroskopisch Zellen aus einem unbelasteten Teil des Gelenkknorpels entnommen, in vitro kultiviert und anschließend entweder auf einer Membran oder einer Gerüstmatrix in den Knorpeldefekt implantiert. Auf diese Weise soll das Voranschreiten der Knorpelschäden reduziert und eine Gelenkersatzoperation hinausgezögert werden.

Das Ziel dieser Studie besteht darin, die Behandlung von Knorpelschäden zu verbessern und die Qualität von MACT-Konstrukten zu erkennen. Bisher ist nicht abschließend geklärt, welche Zellen sich in den MACT Scaffolds befinden und welchen Einfluss der Wachstumsfaktor BMP-2 auf die Zellentwicklung der Chondrozyten hat.

In seiner wissenschaftlichen Arbeit konnte Niethammer (2010) einen Zusammenhang zwischen der zellulären Qualität der chondrocyt-like cells und den klinischen Ergebnissen feststellen. Da Chondrozyten ein hohes Dedifferenzierungspotenzial aufweisen, stellen sich folgende Fragen:

1. Sind eingebrachte chondrozytenartige Zellen nach BMP-2-Behandlung chondrozytär oder fibrogen?
2. Kann die Dedifferenzierung der chondrozytenartigen Zellen durch BMP-2 vermindert bzw. verhindert werden?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Chondrozytenisolation aus dem MACT-Konstrukt

Eine Biopsie der MACT-Regenerate ist postoperativ im ethischen Sinne nicht vertretbar. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Teilmengen von MACT-Konstrukten präoperativ als in-vitro-Modell verwendet. Die Präparation des Knorpelmaterials erfolgte dabei unter sterilen Bedingungen.

Die Proben wurden mit einem Skalpell und unter Zugabe von DMEM HAMs F12 Kulturmedium (Biochrom KG, Berlin) in einer Petrischale mechanisch zerkleinert und zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 0,5 % Pronase (5 mg/ml Pronase E, Serva, Heidelberg) für eine Stunde bei 37°C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> enzymatisch verdaut. Danach wurden die MACT-Konstrukte zweimal mit PBS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gewaschen und für einen Zeitraum von drei Stunden mit 0,1 % Kollagenase (Serva) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Anschließend wurde die Suspension gut durchmischt und auf ein 100-µm-Zellsieb (Falcon, N. J., USA) gegeben. Der Durchfluss mit den Chondrozyten wurde zweimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 400 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde schonend in Chondrozytenmedium resuspendiert (DMEM HAMs F12 Kulturmedium mit stabilem Glutamin, 1x Penicillin 100 E/ml (PAA, Cölbe), Streptomycin 0,1 g/l (PAA), 2-Phospho-L-Ascorbinsäure 0,1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 % fötales Kälberserum (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 1 x MEM Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific Inc.)).

Zellzahl und -viabilität wurden mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Dazu wurden 10µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) vermischt, unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm<sup>2</sup>, 0,1 mm Tiefe; Brand, Wertheim, Deutschland) gegeben und lichtmikroskopisch ausgezählt (Leica DM 2000, Wetzlar). Anschließend wurde die Viabilität der Chondrozyten beurteilt.

Mithilfe der Formel  $n = \alpha \times \beta \times \gamma / 100 \times \delta$  (mit  $\alpha$  = ausgezählte Zellzahl;  $\beta$  = ml Zellsuspension insgesamt;  $\gamma$  = Verdünnungsfaktor, hier: 2 (10µl Zellsuspension: 10 µl Trypanblau) und  $\delta$  = Anzahl ausgezählter Quadranten) konnte die absolute Zellzahl berechnet werden. Schließlich wurden die frisch isolierten Chondrozyten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) inkubiert.

## 3.2 Zellkultur

Die isolierten chondrozytenartigen Zellen sowie die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asservierten Fibroblasten wurden mit einer Ausgangsdichte von  $2 \times 10^5$ -Zellen in belüftete  $80 \text{ cm}^2$  Polystyrol-Zellkulturflaschen ausplattiert. Bei den Fibroblasten handelte es sich um im Jahr 2000 von der Provitro GmbH aus Berlin in Passage 2 gekaufte Zellen. Die Kulturen wurden im Chondrozytenmedium einmal ohne und einmal unter Zugabe des rekombinant hergestellten Wachstumsfaktors BMP-2 (150 ng/ml; Thermo Fisher Scientific Inc.) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  (v/v) kultiviert. Das Kulturmedium wurde nach drei Tagen gewechselt – bei gleichzeitiger lichtmikroskopischer Qualitätskontrolle der Zellzahl und -dichte (Leica DM 2000). Am sechsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert (0,25 % Trypsin-EDTA Lösung, Sigma-Aldrich), gewaschen und bei 400 g fünf Minuten lang abzentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden in Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup> (Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande) gegeben und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei einem anderen Ansatz wurde das Medium nach sieben Tagen gewechselt und am neunten Tag wurden die Zellen bei gleichzeitiger lichtmikroskopischer Beurteilung geerntet, pelletiert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Pellets umfassten jeweils  $4 \times 10^5$ -Zellen.

Diese Pellets wurden anschließend als kompakte Struktur ohne Resuspendierung, mit und ohne Zugabe von BMP-2 (150 ng/ml), bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  (v/v) in Chondrozytenmedium inkubiert. Die Probenentnahme und Aufarbeitung der Zellpellets für die Real-Time-PCR (siehe Kapitel 3.3) und die histologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 3.2) erfolgte nach sechs und neun Tagen.

## 3.3 Real-Time-PCR

### 3.3.1 RNA-Extraktion

RNA wurde aus in Flüssigstickstoff asservierten Pellets isoliert. Dafür wurden die Proben in vorgekühlten Gefäßen im Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotech, Melsungen) zermahlen. Anschließend wurden diese in Reaktionsgefäße überführt, in denen 500 µl Trizol vorgelegt war, und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit 200 µl Chloroform gemischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden diese Proben für 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$ , 12.000 G zentrifugiert und die obere wässrige Phase in neue Reaktionsgefäße überführt. Über Nacht erfolgte eine Isopropanolfällung (500 µl) der RNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei 4°C, 12.000 G zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit jeweils 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C, 7.500 g). Die Überstände wurden verworfen, die Pellets getrocknet und schließlich in RNase-freiem Wasser resuspendiert (30 µl).

Für eine optimale RNA-Ausbeute und die Entfernung von residualer DNA wurden die Proben anschließend nach dem Protokoll des RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) mit DNase behandelt. Mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wurde die RNA schließlich gereinigt und eluiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Zur Ermittlung der RNA-Qualität und -Ausbeute wurde das NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) verwendet. Die Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wird dabei mittels Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm gibt Auskunft über die Verunreinigung der Proben mit Proteinen und Phenolen. Hier weisen Werte im Bereich von 1,8 bis 2,0 auf hochreine RNA hin.

### **3.3.3 Reverse Transkription von RNA**

Bei der reversen Transkription wird einzelsträngige cDNA (complementary DNA) spezifisch von mRNA-Templates (messenger RNA) synthetisiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert – eine retrovirale, RNA-abhängige DNA-Polymerase (3). Die stabilere cDNA kann dazu verwendet werden, die Expression bestimmter Gene in der entsprechenden Zellpopulation mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) quantitativ nachzuweisen.

Die reverse Transkription wurde gemäß der Anleitung des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden die RNA-Proben auf Eis aufgetaut und im ersten Schritt erfolgte eine genomische DNA (gDNA)-Eliminationsreaktion. Im zweiten Schritt wurde die Reverse-Transkriptionsreaktion angesetzt und dann die Reverse-Transkriptase bei 95°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.3.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine schnelle und automatisierte Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression in Echtzeit. Dabei werden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Oligonukleotide (sog. Sonden) oder Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sequenzspezifisch oder -unspezifisch an die Ziel-DNA binden und die Akkumulation des PCR-Produkts ermöglichen.

Die qPCR basiert auf der konventionellen PCR (Polymerase Chain Reaction) – einer In-vitro-Methode, mittels derer ein definierter DNA-Abschnitt in kurzer Zeit millionenfach amplifiziert werden kann. Während der qPCR interkaliert der Farbstoff SYBR Green I spezifisch in die dsDNA und verändert seine Fluoreszenz. Diese wird dementsprechend im Light-Cycler-2.0-Instrument erfasst und gemessen. Die Änderung korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt. Somit ist es möglich, während der PCR jederzeit eine Aussage über die Menge des PCR-Produkts zu treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Real-Time-PCR mit dem Light Cycler System von Roche® (Basel, Schweiz) durchgeführt. Dieses umfasst das LightCycler-2.0-Instrument mit dazugehöriger Software 4.0 und das LightCycler® FastStart Essential DNA Green Master Kit. Die qPCR kann entweder als sog. Two-Step- oder als One-Step-qPCR durchgeführt werden. Hier wurde die Two-Step qPCR verwendet, bei der zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben wurde und diese anschließend in einem zweiten Reaktionsansatz mit sequenzspezifischen Primern für eine spezifische Amplifikation gewählter Gene bzw. Genabschnitte inkubiert wurde. Bei der One-Step-qPCR laufen beide Reaktionen im gleichen Reaktionsansatz ab. Der Vorteil der Two-Step-qPCR besteht in der höheren Sensitivität und der Ergiebigkeit der cDNA-Menge.

Es wurden die im LightCycler® FastStart Essential DNA Green Master-Kit-Handbuch (Roche) empfohlenen Programmeinstellungen verwendet. Die qPCR-Reaktionen wurden in 96-well qPCR-Platten angesetzt (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** qPCR pro Reaktionsansatz

Reaktant	Volumen pro Ansatz (µl)
FastStart Essential DNA Green Master 2x	5
PCR-grade H <sub>2</sub> O	2
Primer (forward + reverse) 500 nM	0,5
cDNA	2,5

Vor den Amplifikationszyklen wurde die Taq-DNA-Polymerase für fünf Minuten bei 95°C hitzeaktiviert und die cDNA denaturiert. Die Amplifikation umfasste insgesamt 45 Zyklen, bestehend aus jeweils einer Denaturierungsphase bei 95°C für 15 Sekunden, einer Primer-Hybridisierungsphase (Annealing) bei 60°C für 15 Sekunden und einer Elongationsphase bei 72°C für 30 Sekunden. Im Rahmen dieses Projektes wurde die Expression des Kollagens Typ II, normiert auf das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), gemessen.

**Tabelle 4:** Humanes Gen, Primersequenz 5' --> 3'.

Humanes Gen	Primersequenz 5' --> 3'
GAPDH forward	TGC ACC Forward AAC TGC TTA GC
GAPDH reverse	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
3. Collagen 2 forward	CGC ACC TGC AGA GAC CTG AA
Collagen 2 reverse	TCT TCT TGG GAA CGT TTG CTG G

### Histologische Untersuchung

Die fixierten und in Flüssigstickstoff asservierten Pellets wurden im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik histologisch untersucht. Dazu wurden die Proben zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) und anschließend für jeweils eine Stunde in das Intermedium Xylol gegeben. Nach der Entwässerung wurden die Proben mit flüssigem Paraffin überschichtet (Leica) und schließlich mittels eines Mikrotoms bei RT geschnitten.

Die Schnitte wurden mit Toluidinblau (Merck), Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und Orcein gefärbt. Die Toluidinblau-Färbung dient dem Nachweis von Glycosaminoglykanen (Bestandteile der im Knorpel reichlich vorhandenen Proteoglykane), da sich der Farbstoff an deren negative Ladungen lagert (Vidal und Mello 2019). Anschließend wurden die Schnitte lichtmikroskopisch untersucht (Leica DM 2000). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA).

Vitale Chondrozyten weisen eine hohe Syntheseaktivität von Proteoglykanen und Kollagen auf und sind daher gut mit Toluidinblau färbbar. Eine morphologische Unterscheidung zwischen vitalen, avitalen und apoptotischen/nekrotischen (ungefärbten) Chondrozyten ist ebenfalls möglich. Vitale Chondrozyten zeichnen sich durch einen intakten Zellkern und

Nukleolus, eine intakte Zellmembran sowie ein homogenes Zytoplasma aus. Aufgrund ihrer hohen Syntheseaktivität sind sie gut mit Toluidinblau anfärbbar. Dahingegen zeigen nekrotische Zellen einen fragmentierten Zellkern und/oder Zytoplasma mit kleinem, verdichtetem Nukleolus und/oder beschädigter Zellmembran mit Abschnürungen. Avitale Zellen sind aufgrund ihrer niedrigen Syntheseaktivität nicht anfärbbar und als inaktive, sterbende oder dedifferenzierte Zellen definiert. Morphologisch ähneln diese jedoch den vitalen Zellen.

Die Zellzahl wurde ermittelt, indem sechs mikroskopische Felder mehrmals ausgezählt wurden. Darüber hinaus wurde die Vitalitätsrate bestimmt.

### **3.4 Statistische Methoden**

Die statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics (Version 23) anhand eines aktuellen Statistiklehrbuchs durchgeführt (Bortz und Schuster 2010). Als Lage- und Streuungsmaße wurden Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Zur grafischen Illustration der Verteilung von metrischen Daten wurden Boxplots erstellt.

Die normierten Werte wurden als Quotient des Ct-Wertes vom Kollagen- zum Ct-Wert vom Housekeeping-Gen GAPDH beziehungsweise als Quotient des Ct-Wertes der Fibrozyten zum Ct-Wert vom Housekeeping-Gens GAPDH berechnet.

Mit einem Zweistichproben-t-Test wurde überprüft, wie sich die Mittelwerte verschiedener Gruppen zueinander verhalten (zum Beispiel der mittlere normierte Wert von Proben mit BMP-2 im Vergleich zu Proben ohne BMP).

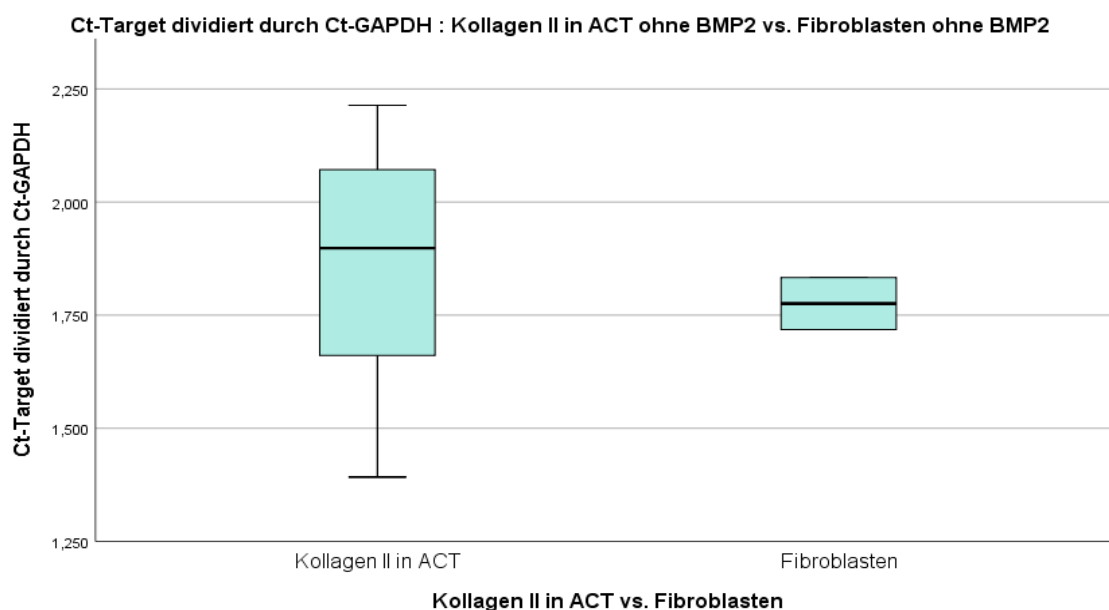
## 4 Ergebnisse

Es sollte die Frage beantwortet werden, welche Differenzierung die Zellen aus der Matrix der MACT-Konstrukte aufweisen. Eines der größten Probleme ist nach wie vor die Dedifferenzierung der Chondrozyten, die sich durch eine morphologische Veränderung und eine veränderte Genexpression auszeichnet. Ein Hauptmerkmal ist die verringerte Kollagen II-Expression (Benya et al. 1978, Kang et al. 2007, Mark et al. 1977, Mayne et al. 1976, Schulze-Tanzil et al. 2002).

Es wurden die chondrozytenartigen Zellen aus den ACT-Scaffolds aus MACT Konstrukten (im Weiteren mit ACT-Zellen abgekürzt) mit Fibroblasten verglichen. Dabei handelt es sich um Bindegewebszellen, die ebenfalls eine Reparatur des Knorpeldefekts bewerkstelligen können, allerdings nur den minderwertigen Faserknorpel bilden. Dessen mechanische Eigenschaften sind dem hyalinen Knorpel unterlegen. Ein Kriterium bei dieser Unterscheidung war das Verhalten der ACT-Zellen und der Fibroblasten in Gegenwart von BMP-2.

### 4.1 Kollagen-II Expression in ACT-Zellen und Fibroblasten

Es wurde überprüft, ob in ACT-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten mehr Kollagen-II-mRNA exprimiert wird. Dazu wurde eine qPCR nach reverser Transkription mit den beiden Zelltypen durchgeführt. Die Normierung erfolgte auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Vergleich zwischen dem mRNA-Gehalt für Kollagen II der ACT und dem der Fibroblasten zeigte keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 5:** Vergleich der relativen Kollagen-II-mRNA-Menge in den Fibroblasten und den ACT-Zellen. qRT-PCR normiert auf GAPDH; ACT-Reaktionen n=13; Fibroblasten-Reaktionen n=2.

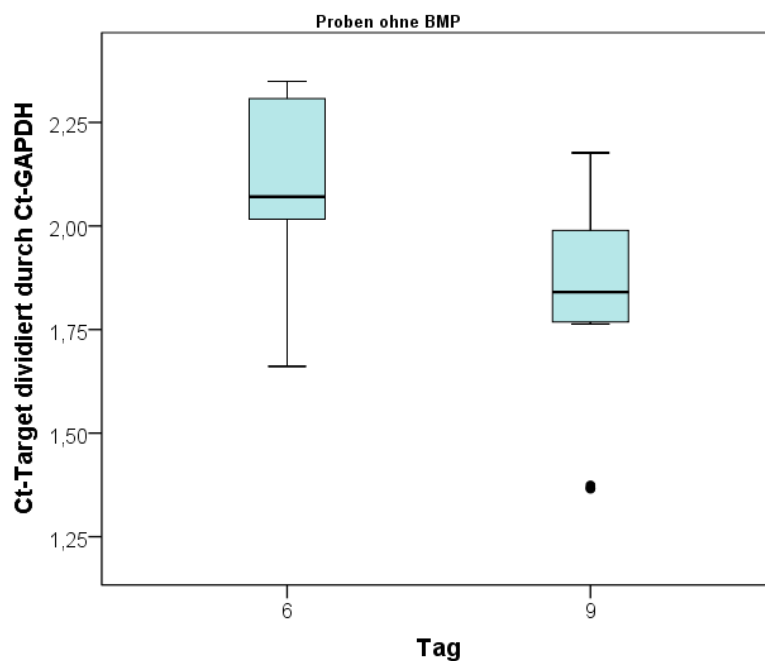


## 4.2 Kollagen-II-Expression in den ACT-Zellen mit und ohne BMP-2

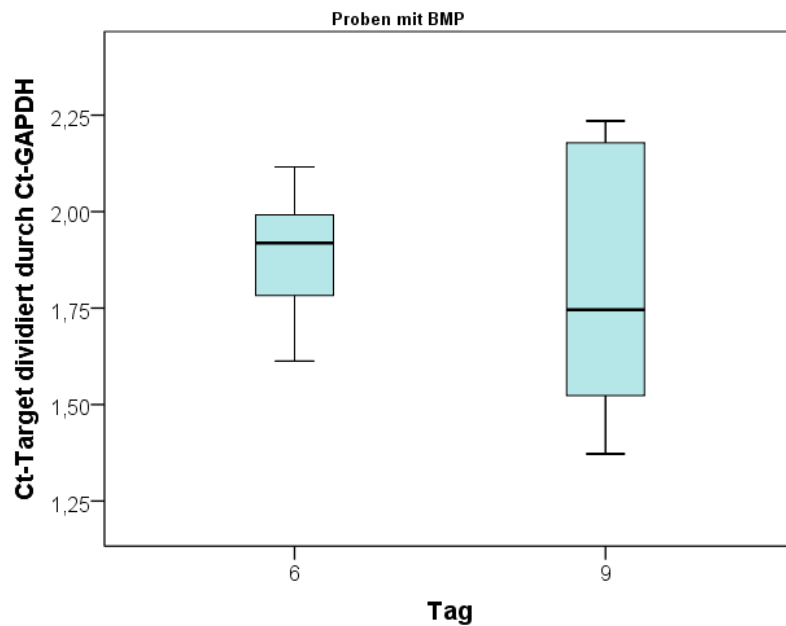
### 4.2.1 Molekularbiologischer Vergleich

Zur Überprüfung des Einflusses von BMP-2 auf die Expression von Kollagen II in den ACT-Zellen wurden diese über mehrere Tage mit und ohne den Wachstumsfaktor inkubiert. Nach sechs bzw. neun Tagen wurde die Expression mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung 6). Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen (Proben mit BMP-2 und Proben ohne BMP-2) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 6 und Tag 9) mittels Zweistichproben-t-Tests miteinander verglichen.

Bei Proben ohne BMP-2 gab es einen statistisch hochsignifikanten Unterschied zwischen Tag 6 ( $2,1 \pm 0,2$ ) und Tag 9 ( $1,8 \pm 0,3$ ) (Abbildung 6:  $p < 0,001$ ). Am Tag 6 war damit deutlich mehr Kollagen-II-RNA vorhanden als an Tag 9.



**Abbildung 6:** Vergleich der relativen Kollagen-II-mRNA-Menge in den ACT-Zellen nach sechs und neun Tagen. qRT-PCR normiert auf GAPDH. Zellen in Standardmedium kultiviert.

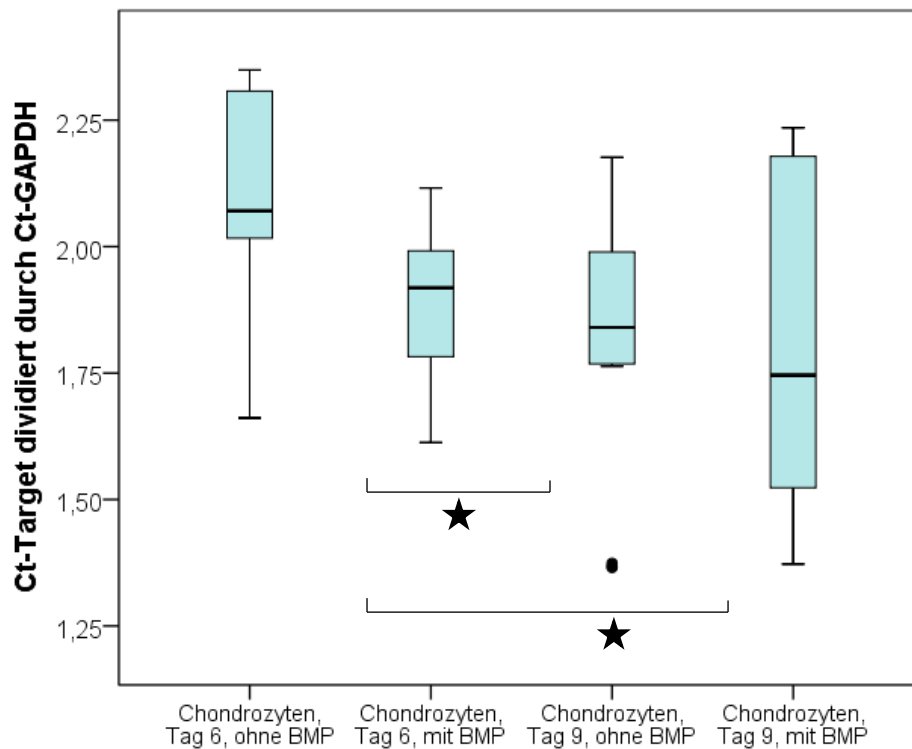


**Abbildung 7:** Vergleich der relativen Kollagen II mRNA-Menge in den ACT-Zellen mit BMP-2 nach sechs und neun Tagen. qRT-PCR normiert auf GAPDH. Zellen in Standardmedium unter Zugabe von BMP-2 kultiviert.

Bei Proben mit BMP-2 gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Tag 6 ( $1,9 \pm 0,2$ ) und Tag 9 ( $1,8 \pm 0,3$ ) (Abbildung 7:  $p = 0,256$ ).

Der Vergleich der normierten Kollagen-II-Expression mit bzw. ohne BMP-2 zeigt, dass in der Präsenz des BMP-2 insgesamt geringere Mengen an KollagenII mRNA gebildet werden als ohne BMP-2. Dies ist zu beiden Zeitpunkten (Tag 6 und Tag 9) der Fall. Der Unterschied an Tag 6 war statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), der Unterschied an Tag 9 erreichte nicht die statistische Signifikanz ( $p = 0,763$ ).

Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Gesamtergebnisse der Messungen an den ACT-Zellen. Es ist evident, dass die Behandlung mit BMP-2 zu niedrigeren Werten von Kollagen II führte und dass mit zunehmender Zeitachse die Messwerte geringer wurden. Gleichzeitig lassen sich eine relativ große Streuung und eine ungleichmäßige Verteilung der Messwerte innerhalb der vier untersuchten Gruppen erkennen. Durch die große Streuung ergab sich eine Überlappung der Konfidenzintervalle um den jeweiligen Gruppenmittelwert, sodass kaum statistisch signifikante p-Werte erreicht werden konnten.



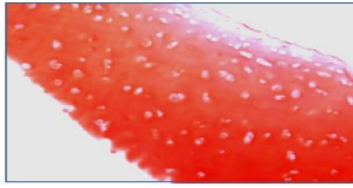
**Abbildung 8:** Vergleich der relativen Kollagen-II-Expression der ACT-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Gegenwart von BMP-2. qRT-PCR normiert auf GAPDH. Zellen in Standardmedium mit und ohne Zugabe von BMP-2 kultiviert. ★ : statistisch signifikant:  $p < 0,001$ .

Die statistische Auswertung zeigt somit, dass die Transkription von Kollagen II in den ACT-Zellen im Laufe der Kultivierung im Chondrozytenmedium statistisch signifikant abnimmt. Diese Abnahme ist bei der Kultivierung in Gegenwart von BMP-2 im Mittel ebenfalls vorhanden, erreicht aber nicht die statistische Signifikanz. Des Weiteren hemmt die Gegenwart von BMP-2 die Kollagen-II-Expression innerhalb von sechs Tagen signifikant. Allerdings ist dieser Effekt nach neun Tagen nicht mehr vorhanden.

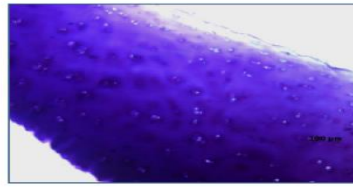
#### 4.2.2 Histologischer Vergleich

Durch die qRT-PCR kann nachgewiesen werden, ob ein Gen transkribiert wird. Die tatsächliche Proteinsynthese und der Transport können damit jedoch nicht gezeigt werden. Daher wurden im nächsten Schritt die ACT-Zellen, die mit oder ohne BMP-2 neun Tage lang kultiviert worden waren, nach ihrer Einbettung in Paraffin mit Hämatoxylin-Eosin, Toluidin bzw. Orcein angefärbt. Hämatoxylin-Eosin färbt Kollagenfasern, Toluidin färbt die Glykosaminoglykane und Orcein färbt Chromosomen und Chromatiden, aber auch elastische Fasern. Da das Ziel ist, die Ähnlichkeit der ACT-Zellen zu Chondrozyten nachzuweisen, wurde als Kontrolle humanes hyalines Knorpelgewebe der gleichen Prozedur unterworfen

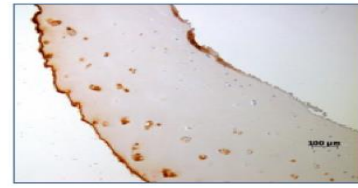
(Abbildung 9). Der Knorpel enthält viele Kollagene und Glykosaminoglykane, jedoch nur wenige elastische Fasern.



Hämatoxylin-Eosin



Toluidinblau

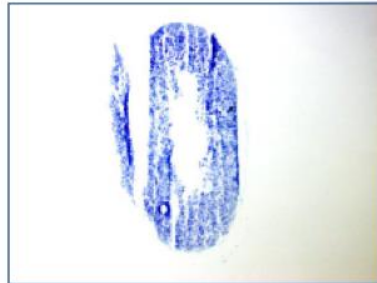


Orcein

**Abbildung 9:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in humanem Knorpelgewebe links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

Abbildung 10 bis Abbildung 17 zeigen ACT-Zellen aus 8 verschiedenen MACT-Konstrukten, die 9 Tage lang mit oder ohne BMP-2, kultiviert worden waren und mit Hämatoxylin-Eosin, Toluidinblau und Orcein angefärbt wurden. Bei der Probennummerierung handelt es sich um ein laborinternes System.

94 ohne BMP

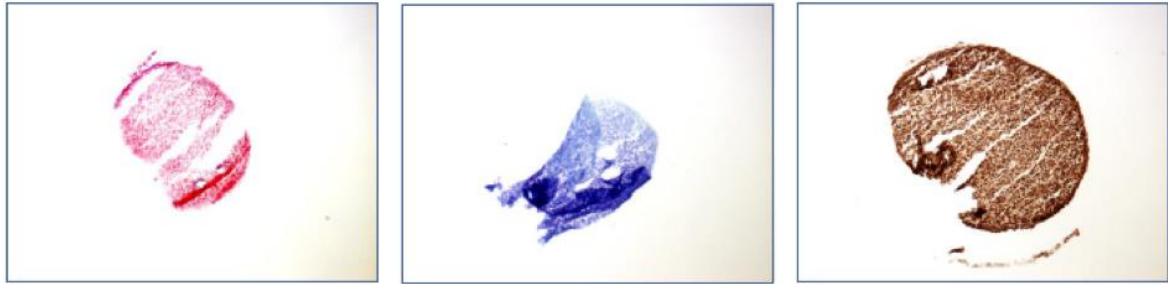


94 mit BMP

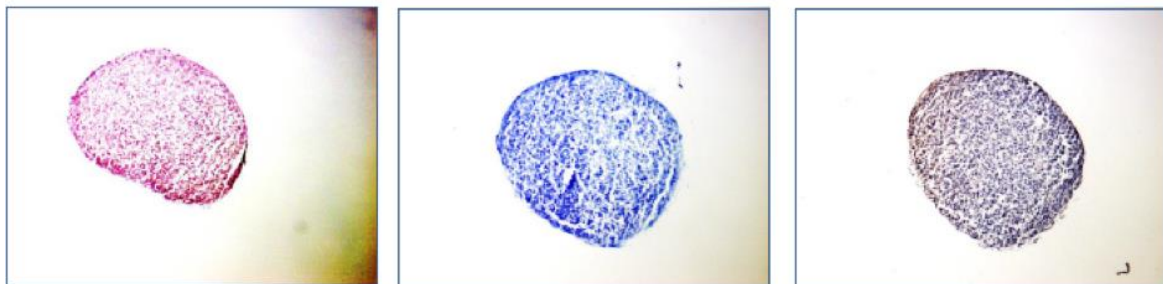


**Abbildung 10:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 94. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 95 ohne BMP

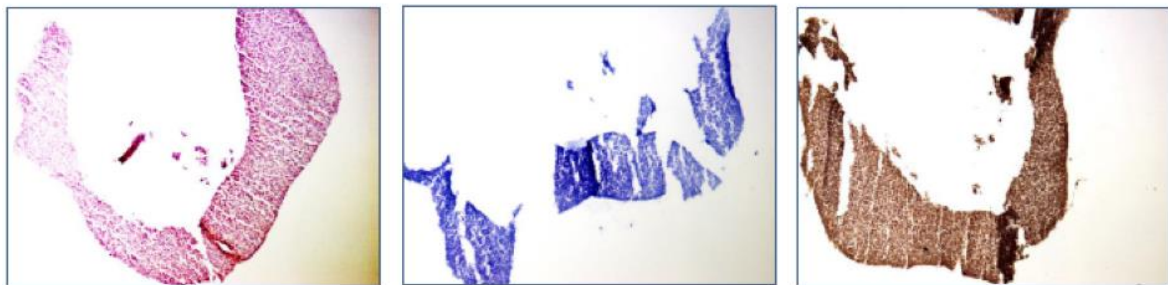


## 95 mit BMP

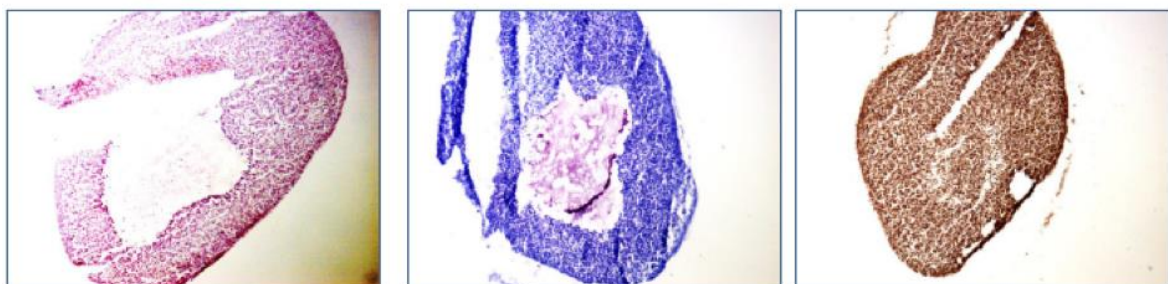


**Abbildung 11:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 95. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 97 ohne BMP

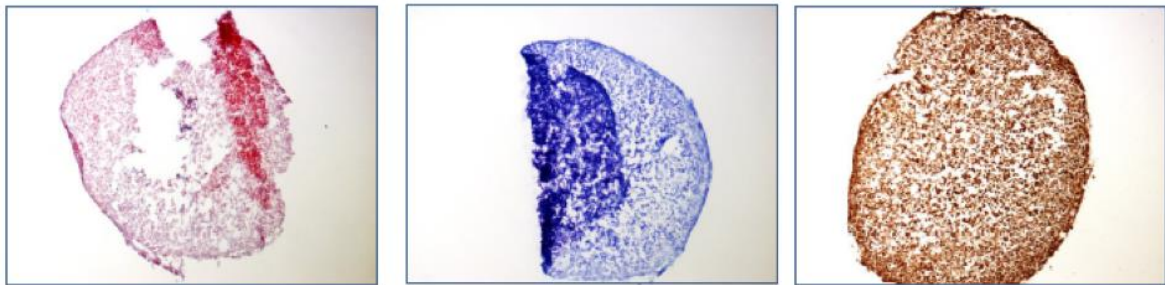


## 97 mit BMP

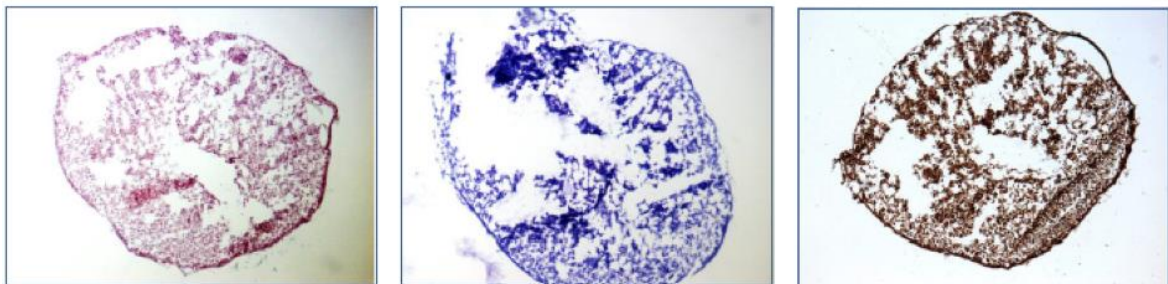


**Abbildung 12:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 97 links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 99 ohne BMP

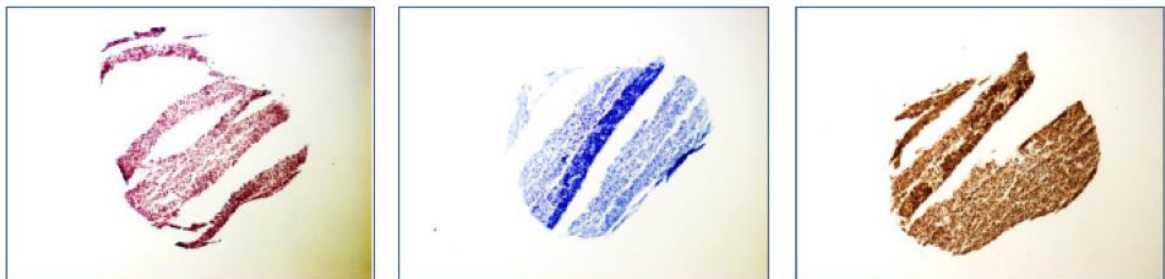


## 99 mit BMP

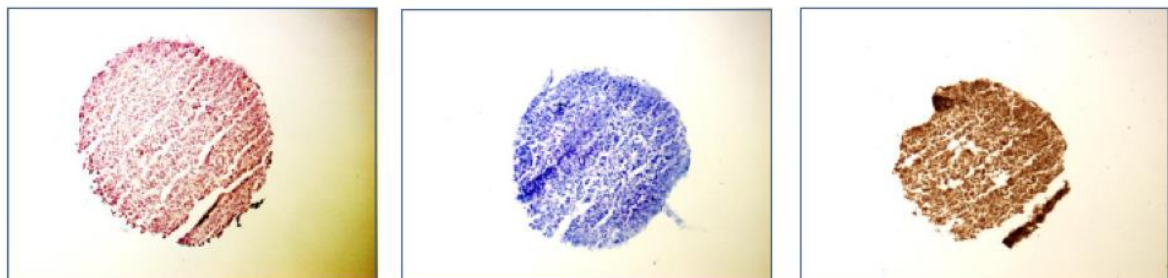


**Abbildung 13:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 99. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 100 ohne BMP

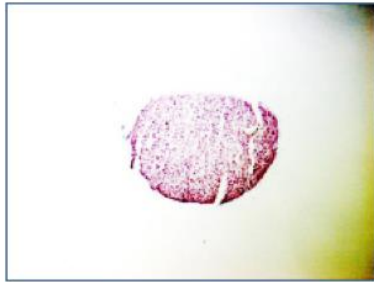


## 100 mit BMP

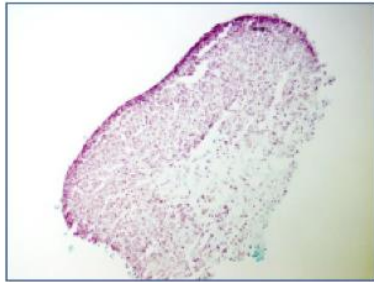


**Abbildung 14:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 100. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 103 ohne BMP

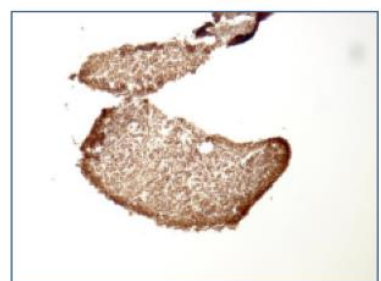
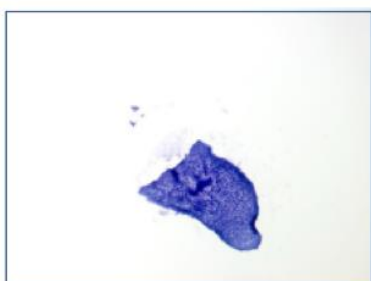
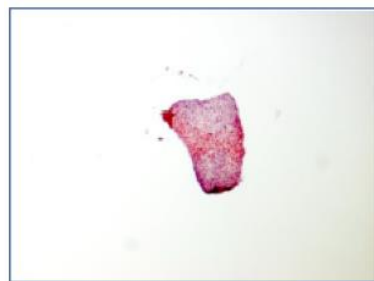


## 103 mit BMP

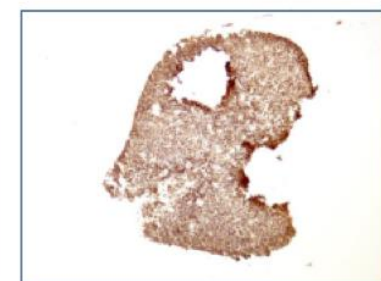
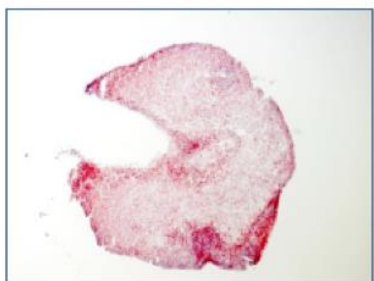


**Abbildung 15:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 103. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung; Toluidinfärbung der Zellen ohne BMP-2 Färbung wurde wegen technischer Probleme nicht dargestellt

## 104 ohne BMP

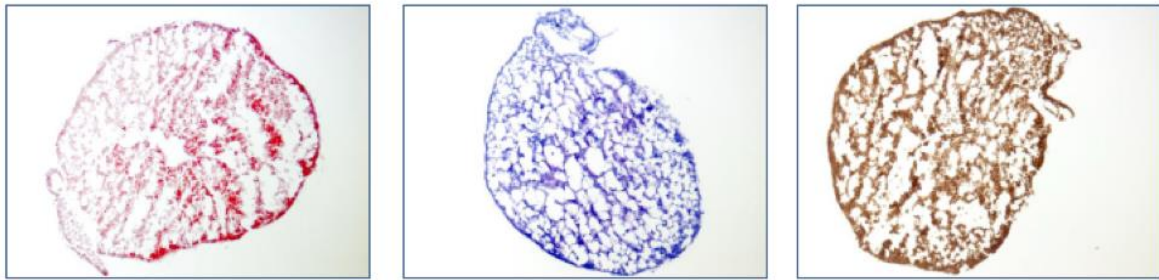


## 104 mit BMP

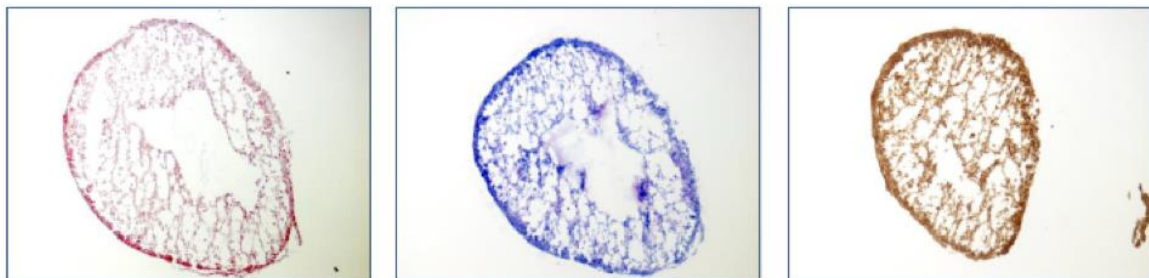


**Abbildung 16:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 104. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

## 108 ohne BMP



## 108 mit BMP



**Abbildung 17:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 108. links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidinblau; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

- Probe 94: intensivere Färbung bei den Proben ohne BMP-2-Zusatz
- Probe 95: intensivere Färbung bei den Proben ohne BMP-2-Zusatz
- Probe 97: kein wesentlicher Unterschied zwischen den Proben bzgl. der Anfärbung
- Probe 99: intensivere Färbung bei den Proben ohne BMP-2-Zusatz
- Probe 100: kein wesentlicher Unterschied zwischen den Proben bzgl. der Anfärbung
- Probe 103: kein wesentlicher Unterschied zwischen den Proben bzgl. der Anfärbung
- Probe 104: intensivere Färbung bei den Proben ohne BMP-2-Zusatz
- Probe 108: kein wesentlicher Unterschied zwischen den Proben bzgl. der Anfärbung

Bei 4 von 8 Proben zeigt sich im Hinblick auf die histologischen Schnitte, die aus 3D-Strukturen am 9. Tag entstanden, ohne BMP-2 eine dichtere Anfärbung von Kollagen II als bei den Proben mit BMP-2-Zusatz. Bei vier Proben zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Schnitten mit und ohne BMP-2-Zusatz. Im Vergleich zum menschlichen Knorpelgewebe (Abbildung 9) wiesen alle ACT-Proben eine deutlich stärkere Anfärbung mit Orcein und somit mehr elastische Fasern auf.

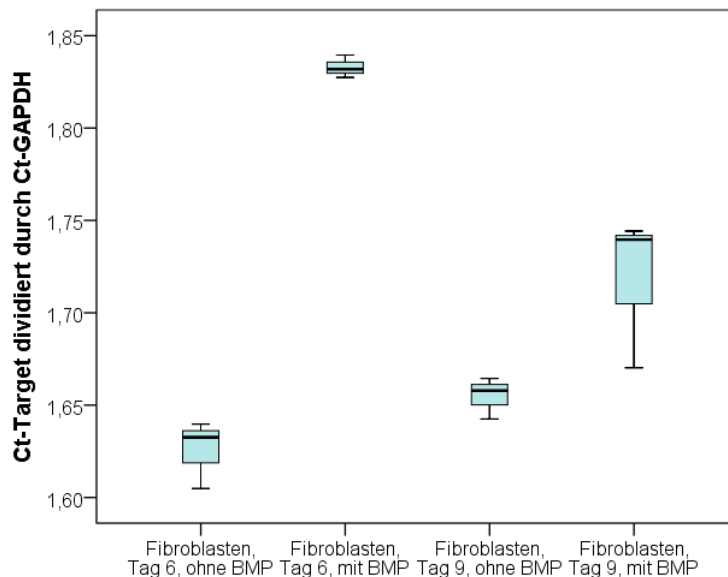


### 4.3 Kollagen-II-Expression in Fibroblasten mit und ohne BMP-2

Um eine Ähnlichkeit der ACT-Zellen mit Fibroblasten nachweisen oder ablehnen zu können, wurde auch bei den Fibroblasten die Abhängigkeit der Kollagen-II-Expression von der Inkubation mit BMP-2 überprüft.

#### 4.3.1 Molekularbiologischer Vergleich

Zur Überprüfung des Einflusses von BMP-2 auf die Expression von Kollagen II in den Fibroblasten wurden auch diese über mehrere Tage mit und ohne den Wachstumsfaktor inkubiert. Nach sechs bzw. neun Tagen wurde die Expression mittels qRT-PCR überprüft. Bei den Fibroblasten zeigte sich die gegensätzliche Beobachtung zu den Messungen an den Chondrozyten (Abbildung 18).

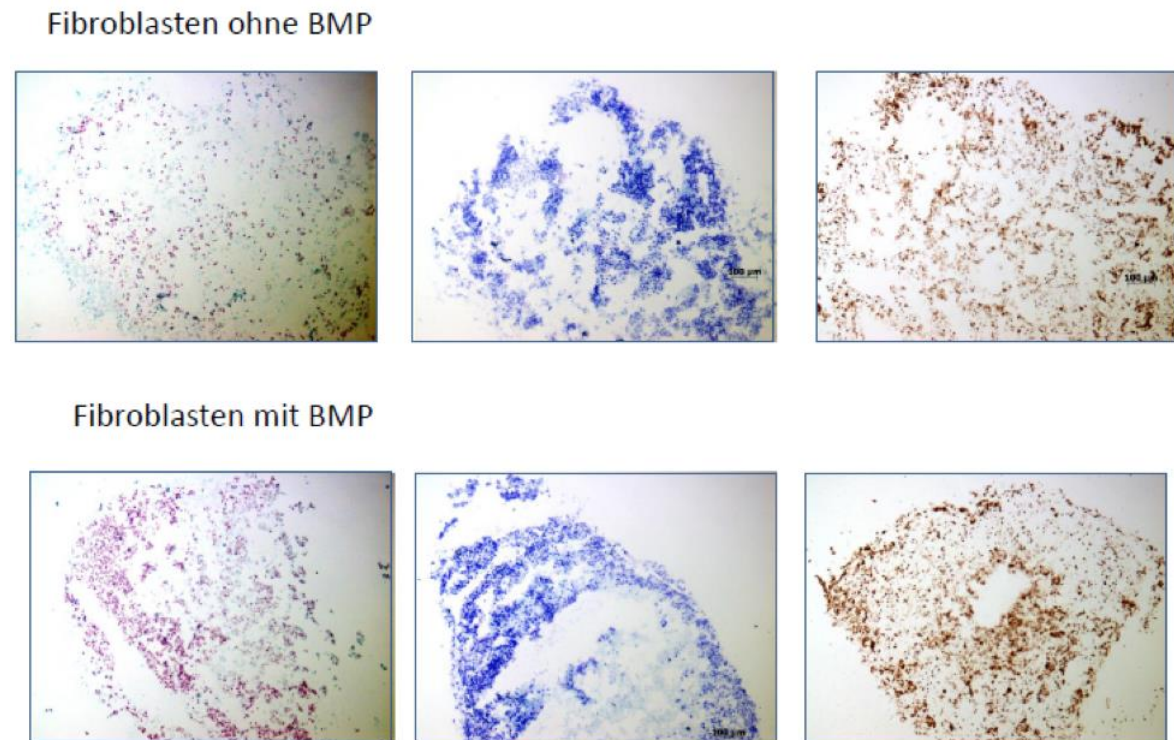


**Abbildung 18:** Vergleich der relativen Kollagen-II-Expression der Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Gegenwart von BMP-2. qRT-PCR normiert auf GAPDH. Zellen in Standardmedium mit und ohne Zugabe von BMP-2 kultiviert.

Werden die Fibroblasten ohne BMP-2 kultiviert, kommt es im Laufe der Kultivierung zu einem leichten Anstieg der Kollagen II-Expression. Im Gegensatz dazu ist die Expression durch Zugabe von BMP-2 nach sechs Tagen gesteigert, der Effekt verliert sich allerdings wieder bei weiterer Inkubation.

### 4.3.2 Histologischer Vergleich

Um die ACT-Zellen von den Fibroblasten abgrenzen zu können, wurden auch Fibroblasten einer Toluidin-, Hämatoxylin- und Orceinfärbung unterzogen. Das Ergebnis der Fibroblasten, die mit und ohne BMP-2 kultiviert worden waren, ist in Abbildung 19 dargestellt. Bei den Fibroblasten ohne BMP-2 ist eine schwächere Anfärbung zu verzeichnen als bei den Fibroblasten mit BMP-2-Zusatz.



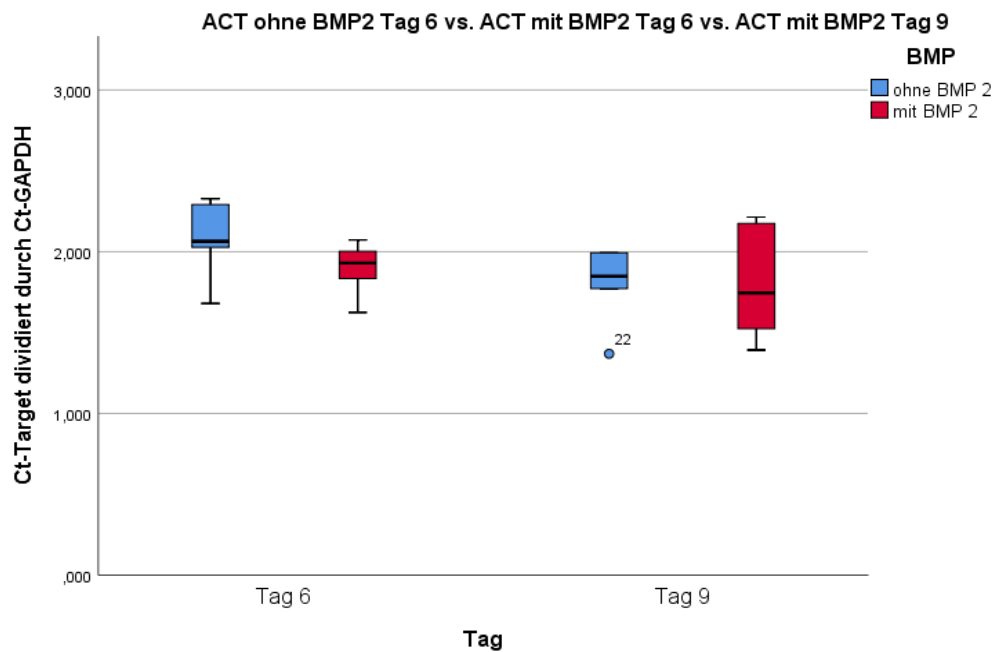
**Abbildung 19:** Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in Fibroblasten

links: Kollagennachweis mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Mitte: Nachweis von Glykosaminoglykanen mit Toluidin; rechts: Nachweis elastischer Fasern mit Orcein; 200-fache Vergrößerung

### 4.4 Vergleich zwischen ACT-Zellen und Fibroblasten

Der Vergleich zwischen der Kollagen-II-Expression in den ACT-Zellen in Abhängigkeit von der Kulturzeit und der Anwesenheit von BMP-2 ist in Abbildung 20 zusammengefasst. Die relative Kollagen-II-Transkription in den ACT-Zellen verringert sich während der Kultivierung in Chondrozytenmedium. Auch in Gegenwart von BMP-2 ist eine Reduktion zu beobachten. Auch die Fibroblasten zeigen in Gegenwart von BMP-2 im Laufe der Kultivierung ebenfalls eine Verringerung der Kollagen-II-Expression. Im Gegensatz dazu verändert sich

die Kollagen-II-Expression der Fibroblasten ohne BMP-2 nicht und bleibt annähernd unverändert.



**Abbildung 20:** Vergleich der relativen Kollagen II-Expression der ACT-Zellen mit und ohne BMP-2 in Abhängigkeit von der Zeit. qRT-PCR normiert auf GAPDH; ACT-Reaktionen n=13.

## 5 Diskussion

Bislang gibt es noch keine detaillierten Daten über die Beschaffenheit der Zellen der präoperativen MACT-Konstrukte, die zur Reparatur von Knorpeldefekten im Kniegelenk eingesetzt werden. Über die Zellzahl und Vitalität der Chondrozyten in den Monolayer-Zellkulturen werden von der Firma TETEC AG, deren Produkte im Rahmen der hier vorgelegten Studie verwendet wurden, Angaben gemacht (Gründer et al. 2004). Diese Angaben beziehen sich aber lediglich auf den Zeitpunkt vor der Besiedelung des Kollagenkonstrukts, nicht auf den Zeitpunkt der abgeschlossenen Besiedlung und Implantation.

Ziel der in dieser Studie durchgeführten histologischen Untersuchungen sowie der Real-Time-PCR-Analyse war es, herauszufinden, ob die Zellen auf den implantationsreifen MACT-Konstrukten einen fibrogenen Charakter haben und ob eine Dedifferenzierung unter Einfluss des Wachstumsfaktors BMP-2 verhindert werden kann. Durch diese Untersuchungen soll ein Beitrag zur Weiterentwicklung der MACT-Konstrukte geleistet werden. Das Problem der Dedifferenzierung der Chondrozyten in den Implantaten ist noch nicht behoben (Jeyakumar et al. 2019). Nach wie vor sind die genauen Vorgänge im Transplantat nach dem Einsetzen nicht vorhersehbar.

### 5.1 Diskussion der Methode und Limitationen

Um die tatsächliche Qualität des Regenerats beurteilen zu können, wäre eine elektive Rearthroskopie erforderlich. Diese Maßnahme ist jedoch aus ethischen Gründen nicht möglich, da durch einen derartigen Eingriff die MACT-Konstrukte beschädigt und dadurch der klinische Erfolg reduziert werden könnte. Zudem wäre die Gefährdung des Patienten durch eine Gelenk- und Implantatinfektion zu hoch.

Aus diesem Grund wurde die Untersuchung an 3D-Pellet-Strukturen aus präoperativem zellulären MACT-Implantatmaterial durchgeführt. Dies ist die einzige Möglichkeit, eine Charakterisierung der Zellen im Implantat durchzuführen und die mögliche Entwicklung der Zellen *in vivo* abschätzen zu können. Allerdings sind die Effekte des BMP-2 von der Qualität der 3D-Struktur abhängig, in der die Chondrozyten kultiviert werden. Da hier lediglich eine Pelletierung ohne Gerüstmoleküle verwendet wurde, kann dies eventuell die Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussen (Gründer et al. 2004). Zudem hat die Steifheit der Matrix einen direkten Effekt auf die Kollagenexpression der Chondrozyten (Selig et al. 2020).

Ein weiterer Faktor, der in der hier vorliegenden Studie nicht berücksichtigt werden konnte, ist die biomechanische Umgebung, in der der hyaline Knorpel seine Funktion erfüllen muss. Die unmittelbare Umgebung der Chondrozyten ist für diese Mechanotransduktion entscheidend und eine physiologische Belastung führt zu einer Erhöhung der Matrixsynthese, der Aktivierung antikataboler Stoffwechselwege und der Hemmung proinflammatorischer Mechanismen (Sanchez-Adams et al. 2014). Dies hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Gene (Statham et al. 2021).

## **5.2 ACT-Zellen und Fibroblasten reagieren unterschiedlich auf BMP-2**

Die Expression des Kollagen II in den ACT-Zellen und den Fibroblasten ist ohne den Zusatz des BMP-2 ungefähr gleich. Dieses Resultat spricht bereits für eine Dedifferenzierung der ACT-Zellen. Bereits nach einer Passage der Chondrozyten tritt dieser Effekt auf (Ling et al. 2021). Die Kollagen-II-Expression bei den Fibroblasten in Abwesenheit von BMP-2 ändert sich während der Inkubation von bis zu neun Tagen nicht. Nach sechs Tagen Inkubationszeit steigt die Kollagen-II-Expression in den Fibroblasten mit BMP-2 leicht an und geht daraufhin wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Im Unterschied zu den Fibroblasten steigt die Kollagen-II-Expression bei den ACT-Zellen mit BMP-2 nicht an, im Gegenteil, BMP2 sorgt bei den ACT-Zellen für keinen zusätzlichen Differenzierungsvorteil. Die Zellen sind wahrscheinlich bereits im Vergleich zu Fibroblasten hoch differenziert und verlieren in der 3D-Kulturflasche über die Zeit ihre Differenzierung. Diese Erwartung bestätigt sich bei der MACT-Gruppe durch eine fallende Kollagen-II-Expression. In der histologischen Untersuchung der ACT-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten und dem humanen hyalinen Knorpel konnten keine signifikanten Unterschiede im Kollagengehalt II der Zellen festgestellt werden. Die ACT-Zellen verhielten sich hier im Vergleich zu den Fibroblasten sehr ähnlich. Im Unterschied zum hyalinen Knorpel, bei dem nur sehr wenige elastische Fasern nachgewiesen werden konnten, war deren Nachweis sowohl bei den Fibroblasten als auch den ACT-Zellen deutlich positiv.

Im Rahmen der MACT-Studie von Niethammer (2010) zeigte sich, dass die Chondrozyten anders auf die Behandlung mit BMP-2 reagieren als die Fibroblasten. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den hier gezeigten Daten und deckt sich mit den Ergebnissen von Sailor et al. (1996). Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit präsentierten histologischen Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit BMP-2 bei den MACT-Zellen zu verringerten Kollagen-II-Levels führt. In der histologischen Beurteilung der

Schnitte durch die 3D-Pelletstrukturen an Tag 9 zeigt sich ebenfalls eine tendenziell erhöhte Kollagen-II-Konzentration bei Proben ohne Behandlung mit BMP-2.

Festgestellt werden kann jedoch, dass die ACT-Zellen auf die Inkubation mit BMP-2 anders reagieren als Fibroblasten. Deswegen muss angenommen werden, dass sich die ACT-Zellen bereits in einem ersten Stadium der Dedifferenzierung befinden. Dies zeigt der fehlende Unterschied der Kollagen-II-Expression zwischen ACT-Zellen und Fibroblasten, durch die BMP-2-Behandlung per se aber nicht fibrogen werden.

### **5.3 Dedifferenzierung der ACT-Zellen kann mit BMP-2 nicht verhindert werden**

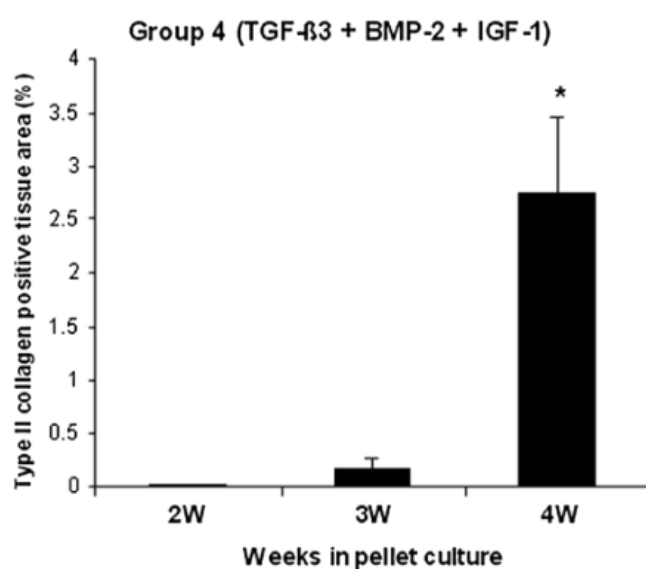
Unklar blieb bisher, inwieweit sich die Chondrozyten mit BMP-2 Zusatz nach Einsetzung in das Kollagen-Konstrukt entwickeln und ob eine Dedifferenzierung erfolgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ACT-Zellen aus dem MACT-Zellvlies herausgelöst, kultiviert und 3D-Pellet-Strukturen erstellt, damit sollte die Dedifferenzierung der Zellen verhindert werden (Schulze-Tanzil et al. 2002). Eine Gruppe von Zellen wurde dabei mit BMP-2 behandelt, bei der anderen Gruppe erfolgte keine Behandlung mit BMP-2. Die Gabe von 100 ng/ml BMP-2 während einer 3D-Aggregatkultur kann die Dedifferenzierung von Chondrozyten umkehren (Murphy et al. 2015). Dies führt zu einer erhöhten Synthese des knorpelspezifischen Kollagen IIB (Gouttenoire et al. 2004).

Anhand der Ergebnisse der hier vorgelegten Studie kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, wie die Kollagen-II-Expression von ACT-Zellen durch BMP-2 beeinflusst wird. Es zeigen sich zwar experimentelle Hinweise darauf, dass die Expression abgesenkt wird, dies steht jedoch im Widerspruch zu Werten aus der Literatur. Wahrscheinlich ergibt sich in Zellkultur kein zusätzlicher Nutzen durch Zusatz von BMP-2 bei der ACT, weil die Kollagen-II-Expression der frischen ACTs bereits durch die Firma TETEC ausgiebig stimuliert wurde, sodass sich in eine fallende Tendenz der Kollagen-II-Expression zeigt. Ebenso ist naheliegend, dass in der Zellkultur die biomechanische Stimulation fehlt. Einen Einfluss auf die Expression könnten auch der zwei- bzw. dreidimensionale Wachstumscharakter der Zellkulturen und der fibroblastische oder chondrozytäre Phänotyp der Zellkulturen gehabt haben. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere, bisher noch nicht beschriebene Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Expression ausüben. Ein Fehlen des biomechanischen Stimulus bei bereits hoher chondrogener Differenzierung des verwendungsbereiten Implantats könnte den ausbleibenden Nutzen von BMP-2 bei ACT-Zellen erklären. Es gilt besonders im muskuloskelettalen System, dass die Form der Funktion folgt

(Fahy et al. 2017). In diesem Versuch könnte es sein, dass dieser Versuch möglicherweise die Grenzen der Zellkultur aufzeigt.

Für die fehlende statistische Signifikanz der Unterschiede gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Einerseits könnte diese auf die ungleichmäßige Verteilung innerhalb der Gruppen sowie die relativ große Streuung der Messwerte für die nicht statistisch signifikanten Testergebnisse ursächlich sein. Andererseits könnten die Chondrozyten in der Ausdifferenzierung bereits zu weit fortgeschritten gewesen sein, um einen ausreichenden Differenzierungsimpuls zu bekommen (Ling et al. 2021).

In der Studie aus dem Jahr 2013 konnte bei mit BMP-2 behandelten Vorläuferzellen von Knochenmarkzellen von Schweinen eine erhöhte Konzentration von Kollagen II festgestellt werden (Abukawa et al. 2013). Die Autoren analysierten die chondrogene Differenzierung mit drei zelllinienspezifischen Differenzierungsmarkern unter unterschiedlichen Kulturbedingungen. Dem Standardkulturmedium wurden dabei TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 3 und BMP-2, TGF- $\beta$ 3 und IGF-1 zugesetzt. Werden die Knochenmarkzellen in Gegenwart von TGF- $\beta$ 3, BMP-2 und IGF-1 kultiviert, zeigen sich zu allen Messzeitpunkten (nach zwei, drei und vier Wochen) signifikant höhere Kollagen-II-Werte (Abukawa et al. 2013). Nach vier Wochen war die Kollagen-II-Produktion auf ein Maximum angestiegen (siehe Abbildung 21). Allerdings wurde der Nachweis hier histologisch erbracht, indem die Kollagen-II-positive Fläche in der Zellkultur vermessen wurde. Jedoch wurden in dieser Studie keine statistisch höheren Werte für die Proteoglykanproduktion gefunden.



**Abbildung 21:** Kollagen-II-Produktion in Gruppe 4 (Abukawa et al. 2013)

Diese wurden jedoch in der Studie von Sailor et al. (1996) beobachtet. So sind mit der Behandlung von Langzeitkulturen artikulärer Knorpelzellen mit BMP-2 erhöhte Konzentrationen von Kollagen II und Proteoglykan diagnostiziert worden. Die Erhöhung der Proteoglykansynthese erreichte innerhalb von 28 Tagen ihr Maximum. Das Maximum war 7,6-mal höher als in der Kontrollkultur ohne BMP-2. Der chondrozytäre Phänotyp der Zellen ist dabei unverändert geblieben. (Sailor et al. 1996)

Für die Kollagen-II-Produktion wurde in einer weiteren Studie festgestellt, dass es relevant ist, ob die Chondrozyten in zwei- oder dreidimensionalen Strukturen herangezogen werden (Gründer et al. 2004). Dazu zogen die Autoren Chondrozyten aus dem Knieknorpel von Probanden als zweidimensionaler Monolayer und als dreidimensionale Struktur zwischen Alginatbeads an. Die Zellen wurden nach zwei Wochen passagiert und die 2D-Kultur wurde anschließend nochmals in eine 2D- und 3D-Passage überführt. Den Kulturen wurden dabei 100 ng/ml BMP-2 zugesetzt. Des Weiteren wurden Negativkontrollen ohne BMP-2 ange-setzt. Die Auswertung der Real-Time-PCR-Daten zeigte, dass in den 3D-Kulturen signifikant höhere Kollagen-II- und BMP-2-mRNA-Level nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu waren die Expressionslevel von Kollagen I, BMP-4 und IL-18 signifikant herabgesetzt. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass bei Anzucht dreidimensionaler Strukturen mit Alginatkügelchen die interessante Möglichkeit besteht, Chondrozyten in einem differenzierten Stadium zu halten oder einen Prozess der Redifferenzierung anzustoßen. (Gründer et al. 2004)

Die Erkenntnis, dass die Kultivierungsbedingungen die Dedifferenzierung der Zellkulturen beeinflussen, ist angesichts der Tatsache, dass Chondrozyten im Allgemeinen ein hohes Dedifferenzierungspotenzial haben, von Bedeutung. Jedoch herrscht keine Klarheit darüber, wie sich die Prozesse der ersteren Dedifferenzierung gezielt anstoßen lassen. Mutmaßlich wird dies durch den fibroblastischen oder chondrozytären Charakter der Zellkulturen mitbestimmt (Gründer et al. 2004).

#### **5.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend kann man in dieser Zellkultur Studie feststellen, dass BMP-2 in der Stimulation einen nicht signifikanten, positiven Einfluss auf Fibroblasten hin zu chondrogener Differenzierung bringt, wie man ihn in der Literatur erwarten konnte. Für MACT-Zellen entsteht kein zusätzlicher Nutzen. Diese sind wohl bereits optimal vorbereitet auf die Implantation in ein Gelenk und dedifferenzieren in der Zellkultur, was BMP-2 wohl allein nicht



verhindern kann. Ebenso wie die PCR, lässt die Histologie positive Effekte von BMP-2 hin zu Knorpel auf Fibroblasten vermuten.

Eine Kombination aus mehreren Wachstumsfaktoren wird in Zukunft erfolgreiche Ergebnisse liefern können, wie bereits seit mehreren Jahren bekannt ist (Fortier et al. 2011). Entscheidend ist die Kombination dieser Faktoren in den entsprechenden Konzentrationen und idealerweise in Verbindung mit einer passenden biomechanischen Stimulation.

Entscheidend für die Haltbarkeit des Transplantates ist sicherlich unter anderem die Knorpelqualität (Andriolo et al. 2020). Diese Knorpelqualität unterschiedlicher Transplantate, die verschiedene Herstellungsverfahren durchlaufen haben, sollte in Zukunft genauer im Tierversuch durch Genexpressionsanalysen und Histologie erforscht werden. Hier würden sich enorme Anknüpfungspunkte auftun, die in Zukunft genauer analysiert werden sollten, was den Umfang dieser Studie aber bei weitem überschreiten würde. Es bleibt die Hoffnung, dass in Zukunft durch verbesserte MACT-Verfahren mehr Knorpeldefekte langfristig therapiert werden können, damit weniger Arthrosefälle auftreten und weniger Gelenkendoprothesen notwendig sind. Erwähnenswert ist hierbei, dass es zahlreiche Patienten gibt, die einen negativen schicksalhaften Verlauf mit ihrer Endoprothese haben, was beispielsweise Protheseninfekte oder Lockerungen mit anschließenden Revisionsoperationen betrifft (Pitta et al. 2018). Abschließend ist zu erkennen, dass eine optimierte Knorpeltherapie mit MACT in Zukunft den Patienten ein erhebliches Plus an Lebensqualität bringen kann und zudem Kosten im Gesundheitsbereich vermieden werden könnten.

## 6 Zusammenfassung

Zur Behandlung von fokalen Knorpeldefekten im Kniegelenk wird bereits seit längerem die Matrixgestützte Autologe Chondrozyten Transplantation (MACT) als Weiterentwicklung der klassischen ACT eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung der MACT-Konstrukte war bisher aber nicht bekannt. Da Chondrozyten ein hohes Dedifferenzierungspotential besitzen, wurde in der vorliegenden Studie erforscht, ob dies durch den Wachstumsfaktor BMP-2 vermindert werden kann und die eingebrachten chondrozytenartigen Zellen nach BMP-2-Behandlung einen eher chondrozytären oder fibrogenen Charakter aufweisen.

In vorliegender Untersuchung wurden Patienten aufgrund chondraler Defekte mit einer Matrix gestützten Autologen Chondrozyten Transplantation (MACT) und der entsprechenden Implantation eines mit Chondrozyten besiedelten Kollagenvlieses therapiert. Das Knorpelmaterial wurde unter sterilen Bedingungen präpariert und die chondrozytenartigen Zellen aus dem Zellvlies herausgelöst, in der Zellkultur vermehrt, um dann in der Folge 3D-Pellet-Strukturen herzustellen. Eine Gruppe von Zellen wurde mit BMP-2 behandelt, bei der anderen erfolgte keine BMP-2-Behandlung. Eine Entnahme und Konservierung der 3D-Pellet-Strukturen erfolgte am sechsten und neunten Tag. Als Kontrolle dienten Fibroblastenkulturen. Daraufhin erfolgten eine Überprüfung der Kollagen-II-Expression mittels Real-Time-PCR und histologische Untersuchungen der extrazellulären Matrix.

In der Kollagen-II-Expression war kein signifikanter Unterschied zwischen den ACT-Zellen und den Fibroblasten nachweisbar. Somit konnte die Dedifferenzierung der MACT-Konstrukte in der Zellkultur durch BMP-2-Zusatz nicht verhindert werden. Die Druckbelastung, das 3D-Gerüst und das natürliche Umfeld im Gelenk fehlen der geschredderten MACT in Zellkultur im Gegensatz zu der transplantierten MACT, welche einwächst. Daher verlieren die Zellen über den Versuchsverlauf ihre hohe Spitzendifferenzierung.

Des Weiteren zeigte sich, dass es bei den chondrozytenartigen Zellen durch die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 zu niedrigeren relativen Kollagen-II-Expressionswerten kam als ohne die Behandlung. Statistisch ersichtlich ist am Tag 6 bei den chondrozytenartigen Zellen ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Proben ohne BMP-2 und Proben mit BMP-2. Ferner zeigte sich zudem an Tag 6 bei Zellen ohne BMP-2-Zusatz eine statistisch signifikant höhere Kollagen-II-Expression als an Tag 9. Ein umgekehrtes Expressionsverhalten mit höheren Kollagen-II-Expressionswerten in Gegenwart von BMP-2 wurde in der Fibroblastenkultur festgestellt.

Histologisch zeigte sich in den Schnitten der chondrozytenartigen Zellen bei vier von acht Proben am 9. Tag ohne BMP-2 eine dichtere Anfärbung von Kollagen II als bei Proben mit BMP-2. Insgesamt lässt sich jedoch auch in den histologischen Proben kein signifikanter Unterschied einer höheren Kollagen-II-Proliferation durch BMP-2 nachweisen.

Bei den Fibroblasten zeigte sich eine schwächere Anfärbung von Kollagen II. Die Fibroblasten zeigten analog zu den Ergebnissen der Real-Time-PCR-Analyse im Gegensatz zu den Präparaten der chondrozytenartigen Zellen einen Anstieg von Kollagen II bei einer Behandlung mit BMP-2.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die chondrozytenartigen Zellen anders als die Fibroblasten auf die Behandlung mit BMP-2 reagierten. Folglich ist davon auszugehen, dass die chondrozytenartigen Zellen einen nicht-fibrogenen Charakter haben. Um welche Art von Zellen es sich genau handelt, kann mit dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Da aber u. a. in der Histologie die unbehandelten Fibroblasten eine geringere Anfärbung von Kollagen II aufweisen als die chondrozytenartigen Zellen, ergibt sich der Hinweis darauf, dass sie einen eher chondrozytären Charakter besitzen.

In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Fibroblasten und den chondrozytenartigen Zellen aus den MACT-Konstrukten nachgewiesen werden und auch ein wesentlicher Einfluss von BMP-2 auf den chondrozytären Charakter der ACT-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich die Problematik der Grenzen der Zellkultur, da vermutlich die ACT-Zellen maximal differenziert waren und bereit für den Einsatz im Gelenk des Empfängers. In Zellkultur verlieren diese Zellen ihr Gerüst und BMP-2 kann sie nicht auf dem hohen Differenzierungsniveau halten.

In Zukunft müssen weitere Studien das Verhalten von Chondrozyten und Fibroblasten auf multifaktorielle Wachstumsstimulation analysieren. Das Einbeziehen von biomechanischen Stimuli wäre sicherlich sinnvoll. Ebenso drängt sich der Gedanke nach Tiermodellen und der direkten Analyse des Knorpels, statt der indirekten MRT-Untersuchung beim Menschen auf. Eine weitere Optimierung der MACT wäre stark zu begrüßen für mehr Patientenzufriedenheit in der Knorpeltherapie und zur Vermeidung, beziehungsweise der Verzögerung einer endoprothetischen Versorgung.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abukawa H, Oriol BS, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ, Hartnick CJ. Growth factor directed chondrogenic differentiation of porcine bone marrow-derived progenitor cells. *J Craniofac Surg.* 2013;24(3):1026–1030. doi: 10.1097/SCS.0b013e31827ff323.
- Andriolo L, Reale D, Di Martino A, De Filippis R, Sessa A, Zaffagnini S, Filardo G. Long-term Results of Arthroscopic Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation: A Prospective Follow-up at 15 Years. *Am J Sports Med.* 2020 Oct;48(12):2994–3001. doi: 10.1177/0363546520949849. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32936677.
- Ajrawat P, Dwyer T, Chahal J. Autologous Interleukin 1 Receptor Antagonist Blood-Derived Products for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthroscopy* 2019;35(7): 2211–2221. doi: 10.1016/j.arthro.2018.12.035.
- Alegría A, Irrarázaval S. ¿Es la diacereína una alternativa para el tratamiento de la artrosis? *Medwave* 2017;17(8), e7041. doi: 10.5867/medwave.2017.08.7041.
- Altman RD. Early management of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2010;16 Suppl Management:41–7.
- Anders S, Schaumburger J, Schubert T, Grifka J, Behrens P. Matrixassoziierte autogene Chondrozytentransplantation (MACT): Minimalinvasive Technik am Kniegelenk. *Op Orthop Traumatol* 2008;20(3): 208–219. doi: 10.1007/s00064-008-1303-1.
- Beaudart C, Lengelé L, Leclercq V, Geerinck A, Sanchez-Rodriguez D, Bruyère O, Reginster JY. Symptomatic Efficacy of Pharmacological Treatments for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and a Network Meta-Analysis with a 6-Month Time Horizon. *Drugs* 2020;80(18):1947–1959. doi: 10.1007/s40265-020-01423-8.
- Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 1978;15(4):1313–1321. doi: 10.1016/0092-8674(78)90056-9.
- Bortz J, Schuster C. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler.* 7. Auflage. Heidelberg. Berlin: Springer; 2010. Online verfügbar unter <http://www.springer.com/>.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* 1994;331(14):889–895. doi: 10.1056/NEJM199410063311401.
- Buckwalter JA. Proteoglycan structure in calcifying cartilage. *Clin Orthop* 1983(172):207–232.
- Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. Kosten. 2021: online verfügbar unter <https://www.arthrose.de/arthrose/kosten>, zuletzt aktualisiert am 05.03.2021, zuletzt geprüft am 05.03.2021.

- Evans JT, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019a;393(10172):647–654. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31665-9.
- Evans JT, Walker RW, Evans JP, Blom AW, Sayers A, Whitehouse MR. How long does a knee replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019b;393(10172):655–663. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32531-5.
- Fahy N, Alini M, Stoddart MJ. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res.* 2018 Jan;36(1):52-63. doi: 10.1002/jor.23670. Epub 2017 Aug 11. PMID: 28763118.
- Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Oct;469(10):2706-15. doi: 10.1007/s11999-011-1857-3. PMID: 21403984; PMCID: PMC3171543.
- Fritz J. Differentialindikationen zu unterschiedlichen biologischen Rekonstruktionsverfahren. In: Fritz J, Aicher WK, Eichhorn HJ (Hg.): *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*: Springer-Verlag; 2013. S. 97–100.
- Gouttenoire J, Valcourt U, Ronzière M-C, Aubert-Foucher E, Mallein-Gerin F, Herbage D. Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* 2004; 41(3-4):535–542.
- Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(7):559–567. DOI: 10.1016/j.joca.2004.04.001.
- Hall AC. The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype-Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering. *Curr Rheumatol Rep* 2019;21(8):38. doi: 10.1007/s11926-019-0837-6.
- Honvo G, Reginster JY, Rabenda V, Geerinck A, Mkinsi O, Charles A, et al. Safety of Symptomatic Slow-Acting Drugs for Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs Aging* 2019;36(Suppl 1):65–99. doi: 10.1007/s40266-019-00662-z.
- Jeyakumar V, Niculescu-Morzsa E, Bauer C, Lacza Z, Nehrer S. Redifferentiation of Articular Chondrocytes by Hyperacute Serum and Platelet Rich Plasma in Collagen Type I Hydrogels. *J Mol Sci* 2019;20(2). doi: 10.3390/ijms20020316.
- Kang S-W, Yoo SP, Kim B-S. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. *Biomed Eng* 2007;17(5):269–276.
- Karuppall R. Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. *J Orthop* 2017;14(2):A1-A3. doi: 10.1016/j.jor.2017.05.001.

- Li Y, Liu Y, Guo Q. Silk fibroin hydrogel scaffolds incorporated with chitosan nanoparticles repair articular cartilage defects by regulating TGF- $\beta$ 1 and BMP-2. *Arthritis Res Ther* 2021;23(1):50. doi: 10.1186/s13075-020-02382-x.
- Ling Y, Zhang W, Wang P, Xie W, Yang W, Wang D-A, Fan C. Three-dimensional (3D) hydrogel serves as a platform to identify potential markers of chondrocyte dedifferentiation by combining RNA sequencing. *Bioactive materials* 2021;6(9):2914–2926. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.018.
- Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64(3):460–466.
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977;267(5611):531–532. doi: 10.1038/267531a0.
- Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vécsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 2006;57(1):24–31. doi: 10.1016/j.ejrad.2005.08.009.
- Mayne R, Vail MS, Mayne PM., Miller EJ. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(5):1674–1678. doi: 10.1073/pnas.73.5.1674.
- Miltner O, Schneider U, Siebert CH, Niedhart C, Niethard FU. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis--a prospective clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2020;10(9):680–686. doi: 10.1053/joca.2002.0815.
- Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF- $\beta$ 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells* 2015;33(3):762–773. doi: 10.1002/stem.1890.
- Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M., et al. Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. *Z Orthop und Unfall* 2013;151(1):38–47. doi: 10.1055/s-0032-1328207.
- Niemeyer P, Albrecht D, Aurich M, Becher C, Behrens P, Bichmann P, Bode G, Brucker P, Erggelet C, Ezechieli M, Faber S, Fickert S, Fritz J, Hoburg A, Kreuz P, Lützner J, Madry H, Marlovits S, Mehl J, Müller PE, Nehrer S, Niethammer T, Pietschmann M, Plaass C, Rössler P, Rhunau K, Schewe B, Spahn G, Steinwachs M, Tischer T, Volz M, Walther M, Zinser W, Zellner J, Angele P. Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk. *Z Orthop Unfall*. 2022 Feb 21. English, German. doi: 10.1055/a-1663-6807. Epub ahead of print. Erratum in: *Z Orthop Unfall*. 2022 Mar 28;; PMID: 35189656.
- Niethammer T. Matrix gestützte Autologe Chondrozyten Transplantation (MACT) am Kniegelenk – klinische, histologische und radiologische Einjahresergebnisse [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2010.

- Niethammer TR, Uhlemann F, Zhang A, Holzgruber M, Wagner F, Müller PE. Hydrogel-based autologous chondrocyte implantation leads to subjective improvement levels comparable to scaffold based autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2022 Feb 28. doi: 10.1007/s00167-022-06886-8. Epub ahead of print. PMID: 35226109.
- Ogura T, Mosier BA, Bryant T, Minas T. A 20-Year Follow-up After First-Generation Autologous Chondrocyte Implantation. *The American journal of sports medicine* 2017;45(12):2751–2761. doi: 10.1177/0363546517716631.
- Paatela T, Vasara A, Nurmi H, Kautiainen H, Jurvelin JS, Kiviranta I. Biomechanical Changes of Repair Tissue after Autologous Chondrocyte Implantation at Long-Term Follow-Up. *Cartilage* 2020; 1947603520921433. doi: 10.1177/1947603520921433.
- Poole AR, Kojima, T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. In: *Clin Orthop* 2001;391 Suppl:26-33. doi: 10.1097/00003086-200110001-00004.
- Pitta M, Esposito CI, Li Z, Lee YY, Wright TM, Padgett DE. Failure After Modern Total Knee Arthroplasty: A Prospective Study of 18,065 Knees. *J Arthroplasty.* 2018 Feb;33(2):407-414. doi: 10.1016/j.arth.2017.09.041. Epub 2017 Sep 25. PMID: 29079167; PMCID: PMC5794604.
- Rabenberg M. *Arthrose.* Berlin (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 54); 2013.
- Rim YA, Ju JH. The Role of Fibrosis in Osteoarthritis Progression. *Life (Basel, Switzerland)* 2020;11(1). doi: 10.3390/life11010003.
- Robinson D, Ash H, Aviezer D, Agar G, Halperin N, Nevo Z. Autologous chondrocyte transplantation for reconstruction of isolated joint defects: the Assaf Harofeh experience. *Isr Med Assoc J* 2000;2(4):290–295.
- Rodriguez-Merchan EC. Intra-articular Injections of Hyaluronic Acid and Other Drugs in the Knee Joint. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery* 2013;9(2):180–182. doi: 10.1007/s11420-012-9320-x.
- Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994;28(5):385–397. doi: 10.1002/jemt.1070280505.
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* 1996;14(6):937–945. DOI: 10.1002/jor.1100140614.
- Samson DJ, Grant MD, Ratko TA, Bonnell CJ, Ziegler KM, Aronson N. Treatment of primary and secondary osteoarthritis of the knee. *Evid Rep Technol Assess* 2007;157:1–157.
- Sanchez-Adams J, Leddy HA, McNulty AL, O'Connor CJ, Guilak F. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16(10):451. doi: 10.1007/s11926-014-0451-6.

- Schrock JB, Kraeutler MJ, Houck DA, McQueen MB, McCarty EC. A Cost-Effectiveness Analysis of Surgical Treatment Modalities for Chondral Lesions of the Knee: Microfracture, Osteochondral Autograft Transplantation, and Autologous Chondrocyte Implantation. *Orthop J Sports Med* 2017;5(5):2325967117704634. DOI: 10.1177/2325967117704634.
- Schulze-Tanzil G, de Souza P., Villegas CH, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002;308(3):371–379. doi: 10.1007/s00441-002-0562-7.
- Selig M, Lauer JC, Hart ML, Rolauffs B. Mechanotransduction and Stiffness-Sensing: Mechanisms and Opportunities to Control Multiple Molecular Aspects of Cell Phenotype as a Design Cornerstone of Cell-Instructive Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Int J Mol Sci* 2020;21(15). doi: 10.3390/ijms21155399.
- Shah SS, Mithoefer K. Current Applications of Growth Factors for Knee Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2020;13(6):641–650. doi: 10.1007/s12178-020-09664-6.
- Siebold R, Suezter F, Schmitt B, Trattnig S, Essig M. Good clinical and MRI outcome after arthroscopic autologous chondrocyte implantation for cartilage repair in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2018;26(3):831–839. doi: 10.1007/s00167-017-4491-0.
- Sophia Fox, AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 2009;1(6):461–468. doi: 10.1177/1941738109350438.
- Statham P, Jones E, Jennings LM, Fermor HL. Reproducing the biomechanical environment of the chondrocyte for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2021. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0373.
- Statista. Endoprothetik - Implantationen künstlicher Kniegelenke in deutschen Krankenhäusern nach Alter 2019 | Statista. 2021: online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/785126/umfrage/implantationen-kuenstlicher-kniegelenke-in-deutschen-krankenhaeusern-nach-alter/>, zuletzt aktualisiert am 04.03.2021, zuletzt geprüft am 04.03.2021.
- Stöve J. S2k-Leitlinie Gonarthrose. 2018.
- Universität Regensburg. 2021: mact.jpg (JPEG-Grafik, 555 × 202 Pixel), zuletzt aktualisiert am 05.03.2021, zuletzt geprüft am 05.03.2021.
- van Eegher S, Perez-Lozano M-L, Toillon I, Valour D, Pigenet A, Citadelle D, et al. The differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes drives an OA-remodeling program and IL-34 expression. *Osteoarthritis Cartilage* 2021;29(2):257–268. doi: 10.1016/j.joca.2020.10.013.
- van Mow C, Ratcliffe A, Robin Poole A. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992;13(2):67–97. doi: 10.1016/0142-9612(92)90001-5.



- de Campos Vidal B, Mello MLS. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. *Acta histochem* 2019;121(2):101–112. doi: 10.1016/j.acthis.2018.11.005.
- Weizel A, Distler T, Schneidereit D, Friedrich O, Bräuer L, Paulsen F, et al. Complex mechanical behavior of human articular cartilage and hydrogels for cartilage repair. *Acta biomaterialia* 2020;118:113–128. doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.025.
- Yoon T-H, Jung M, Choi C-H, Kim H-S, Lee Y-H, Choi Y-S, et al. Arthroscopic gel-type autologous chondrocyte implantation presents histologic evidence of regenerating hyaline-like cartilage in the knee with articular cartilage defect. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2020;28(3):941–951. doi: 10.1007/s00167-019-05572-6.
- Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *American J Sports Med* 2010;38(5):924–933. doi: 10.1177/0363546509351499.

## 8 Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Proteoglykanaggregatstruktur.....	8
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des hyalinen Knorpels.....	9
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der autologen Knorpelzelltransplantation (ACT) .....	12
<b>Abbildung 4:</b> Operationstechnik MACT. ....	16
<b>Abbildung 5:</b> Vergleich der relativen Kollagen-II-mRNA-Menge in den Fibroblasten und den ACT-Zellen.....	24
<b>Abbildung 6:</b> Vergleich der relativen Kollagen-II-mRNA-Menge in den ACT-Zellen nach sechs und neun Tagen. ....	25
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der relativen Kollagen II mRNA-Menge in den ACT-Zellen mit BMP-2 nach sechs und neun Tagen. ....	26
<b>Abbildung 8:</b> Vergleich der relativen Kollagen-II-Expression der ACT-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Gegenwart von BMP-2... ..	27
<b>Abbildung 9:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in humanem Knorpelgewebe.....	28
<b>Abbildung 10:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 94 .....	28
<b>Abbildung 11:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 95 .....	29
<b>Abbildung 12:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 97 .....	29
<b>Abbildung 13:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 99 .....	30
<b>Abbildung 14:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 100 .....	30
<b>Abbildung 15:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 103 .....	31
<b>Abbildung 16:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 104 .....	31
<b>Abbildung 17:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in ACT-Zellen aus Probe 108 .....	32

---

<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der relativen Kollagen-II-Expression der Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Gegenwart von BMP-2...	33
<b>Abbildung 19:</b> Histologischer Nachweis von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern in Fibroblasten.....	34
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der relativen Kollagen II-Expression der ACT-Zellen mit und ohne BMP-2 in Abhängigkeit von der Zeit.....	35
<b>Abbildung 21:</b> Kollagen-II-Produktion in Gruppe 4 (Abukawa et al. 2013) .....	39

## 9 Tabellenverzeichnis

	Seite
<b>Tabelle 1:</b> Gegenüberstellung des ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification Systems und Outerbridge Systems zur Beschreibung von Knorpelschäden.....	13
<b>Tabelle 2:</b> Abgrenzung der Indikationsstellung der einzelnen Methoden .....	13
<b>Tabelle 3:</b> qPCR pro Reaktionsansatz.....	21
<b>Tabelle 4:</b> Humanes Gen, Primersequenz 5' --> 3' .....	22

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

*Pilsinger, Stephan Nikolaus*

an Eides statt, gegenüber der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, dass die vorliegende Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin mit dem Titel

*Molekularbiologische Untersuchung von autologen chondrocyte-like cells (mb-ACT)  
unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors BMP-2 in vitro*

selbstständig und unter Zuhilfenahme ausschließlich der im Literaturverzeichnis genannten Quellen angefertigt wurde.

Sämtliche Ausführungen, die benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich durch Quellenangaben kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen sowie für Quellen aus dem Internet.

München, 25.06.2024 Stephan Pilsinger

---

(Ort, Datum, Unterschrift)

## 11 Curriculum Vitae

### Schulischer Werdegang

2007 Abitur am städt. Adolf-Weber-Gymnasium in München

### Universitärer Werdegang

WS 2007 Beginn des Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-  
Maximilians-Universität München

24.10.2014 Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit Bestehen des  
Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note  
„gut“

WS 2018 Beginn des Studiengangs Master of Health Business  
Administration an der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

25.03.2021 Abschluss des Studiengangs Master of Health Business  
Administration mit dem Erreichen des entsprechenden  
akademischen Grads