

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Rüdiger Krauspe

**Grundlagenuntersuchungen zur Entwicklung
eines neuen transplantierbaren Biokomposites zur
Behandlung von Gelenkknorpelschäden unter Verwendung
von humanen Stammzell-Linien**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach
Orthopädie

der Hohen Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dr. med. Andreas Wolfgang Werner
Düsseldorf 2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I) Einleitung	
1. Morphologie und Physiologie des hyalinen Gelenkknorpel	4
2. Pathophysiologie von Gelenkknorpelschäden und Arthrosentstehung	17
3. Prävalenz und sozio-ökonomische Daten	20
4. Diagnostik und aktuelle Behandlungsstrategien bei Gelenkknorpelschäden	23
5. Einführung in das Tissue Engineering von Gelenkknorpel	36
II) Problemstellung	42
III) Material und Methoden	
3.1 Nachuntersuchung nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation:	44
3.1.1 Patientengut	44
3.1.2 Operationstechnik	45
3.1.3 WOMAC-Score	46
3.1.4 Statistische Methoden	47
3.2 Zellkulturen in Monolayer und dreidimensionalen Pellets	48
3.2.1 Rekrutierung von verschiedenen Stammzelltypen	48
3.2.2 Chondrogene Stimulierung der Zellkulturen	52
3.2.3 Nachweismethoden chondrogener Differenzierung in der Zellkultur	54
3.3 Zellkulturen humaner unrestringierter somatischer Stammzellen aus Nabelschnurblut auf Biomaterial	56
3.3.1 Charakterisierung der Matrix	56
3.3.2 Matrix-Kultur in chondrogen stimulierendem und Kontroll-Medium	57
3.3.3 Nachweismethoden chondrogener Differenzierung von humanen unrestringierten somatischen Stammzellen aus Nabelschnurblut in Matrix-Kulturen	60

IV) Ergebnisse	
4.1 Funktionelle Ergebnisse nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation	62
4.1.1 Gruppe 1 : multilokuläre Knorpelschäden	62
4.1.2 Gruppe 2 : unilokuläre Knorpelschäden	64
4.1.3 Kontrollgruppe	65
4.1.4 Vergleich der Gruppen	66
4.2 Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen	69
4.2.1 Chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark, Periost und unrestringierten somatischen Stammzellen aus Nabelschnurblut in serumfreiem Medium	69
4.2.1.1 Knochenmarkzellen	69
4.2.1.2 Periostzellen	72
4.2.1.3 Unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut	74
4.2.2 Chondrogene Differenzierung von unrestringierten somatischen Stammzellen aus Nabelschnurblut in serumfreiem und serumhaltigem Medium	76
4.2.3 Chondrogene Differenzierung von unrestringierten somatischen Stammzellen aus Nabelschnurblut in Bio-Matrix-Kulturen (Chondro-Gide)	82
V) Diskussion	92
VI) Zusammenfassung	118
VII) Literatur	123
VIII) Abkürzungsverzeichnis	146
IX) Danksagung	148
Anhang : WOMAC-Score : Deutsche Originalversion des Score 3 Daten-Tabellen	

I. Einleitung

1. Morphologie und Physiologie des hyalinen Gelenkknorpels :

Gelenke als funktionelle Einheit aus subchondralem Knochen, Knorpel, Membrana synovialis, Synovia, Gelenkkapsel und periartikulärer Muskulatur dienen als Bewegungs-, aber auch Stützorgane des menschlichen Organismus. Die „organspezifische“ Struktur stellt dabei der hyaline Gelenkknorpel dar, der zum Funktionserhalt des Gelenkes eine gegenüber Druck- und Scherkräften stabile, quasi reibungs- und abriebsfreie Oberfläche bilden muss (213). Die unterschiedlichen mechanischen Belastungen sowohl in verschiedenen Gelenken als auch in verschiedenen Abschnitten eines Gelenkes spiegeln sich dabei in entsprechenden strukturellen und biochemischen Eigenschaften des jeweiligen Knorpelbelages wider (52,109,272,281).

Bei der Embryonalentwicklung wird der Gelenkknorpel durch mesenchymale Vorläuferzellen (Precursorzellen) direkt an der späteren Knorpel-Knochen-Grenze angelegt. Durch Kollagen II-synthetisierende, adhärent wachsende und proliferierende Chondrozyten mit fibroblastischer Morphologie wird eine extrazelluläre Matrix (EZM) gebildet (52,94). Die adhärennten Chondrozyten nehmen später die typische, sphärische Morphologie der Knorpelzellen im hyalinen Knorpel an. Dabei bilden sich Zellnester (Cluster) im umgebenden Kollagengerüst aus. Mit zunehmender Matrixsynthese werden die Zellen in ihre endgültige Form und Lage gebracht (52,94). Dabei unterscheiden sich die Chondrozyten in den verschiedenen Zonen des hyalinen Knorpels (s.1.1) sowohl in ihrer Form, Größe und Orientierung als auch in ihrer metabolischen Akitivität (19).

Adulter Gelenkknorpel besteht als avaskuläres Gewebe hauptsächlich aus der extrazellulären Matrix (EZM) und den Chondrozyten als einzigem Zelltyp. Der zelluläre Anteil beträgt nur ca. 1-5% des Gesamtvolumens. Während die Chondrozyten in der Wachstumsphase des Körpers eine durch Cytokine wie „Transforming-growth-factor-Beta“ (TGF-beta) oder „insulin-dependent-growth-factor“ (IGF) regulierte hohe Proliferations- und Syntheserate haben, sinkt diese beim Erwachsenen mit zunehmendem Alter stetig ab. Dennoch können die Chondrozyten auch im Alter eine kontinuierliche Remodellierung der Extrazellulärmatrix aufrechterhalten (52).

Vom Volumen der EZM macht Wasser etwa 66-79% aus, während die restlichen 21-34% auf feste Bestandteile entfallen (237). Diese festen Matrix-Bestandteile werden zu 50-70% aus Kollagen (Typ II, VI, IX, X und XI) gebildet, 20-25% machen Proteoglykane und 15-25% nichtkollagene Proteine und Glykoproteine aus, die durch ihre osmotische Wasserbindung wesentlich zu den biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels beitragen (51,54,213, 237).

Tab.1 : Biochemische Zusammensetzung von Gelenkkknorpel nach Pullig (237) :

	%
Wasser	66-79
Feste Bestandteile	21-34
Anorganisch	5-6
Organisch	
Kollagene	48-62
Proteine	8-15
Glykosaminoglykane	14-23
Hyaluronsäure	<1
Sonstige Moleküle	<3

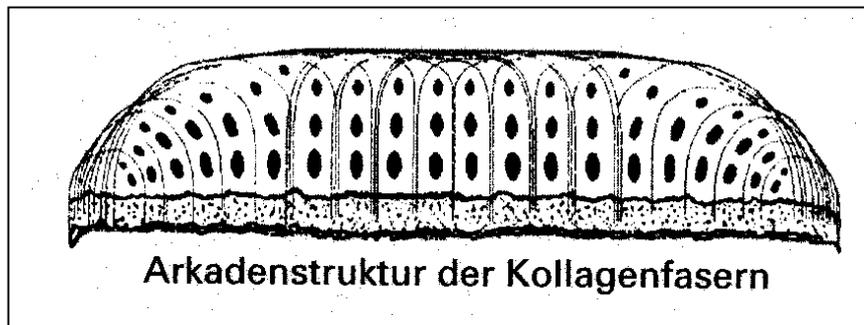
Im folgenden sollen der zonale Aufbau, die Zusammensetzung sowie die grundsätzlichen biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels dargestellt werden.

1.1 Zonaler Aufbau des Gelenkknorpels :

Die Organisation des Gelenkknorpels spiegelt dessen funktionelle Rolle wider. Die Kollagenfasern wie auch die Chondrozyten ordnen sich zonenspezifisch an, so dass eine oberflächliche Tangential-, eine mittlere Übergangs-, eine tiefe Radiär- und eine kalzifizierende Knorpelzone unterschieden werden (237). Bereits 1925 beschrieb Benninghoff (30) die histologische „Arkadenstruktur“ des Gelenkknorpels (Abb.1). Die wesentlichen Merkmale bestehen in der Verankerung der Kollagenfasern in der kalzifizierenden Basalzone, der Faser-Ausrichtung senkrecht zur Oberfläche in der

Radiär-Zone und der „arkaden-artigen“ Anordnung in der oberflächlichen Tangentialzone (64).

Abb. 1: Arkadenstruktur der Kollagenfasern im Gelenknorpel (n.Benninghoff)



In der oberflächlichen Zone sind die Chondrozyten abgeflacht und wie die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Die oberflächlichen Zellen sind von einem stark polarisierten, eng verknüpften Netz aus dünnen Kollagenfibrillen, die parallel zueinander und tangential zur Oberfläche verlaufen, umgeben (siehe Abb.1+2). Die Struktur der Matrix wird hier durch das fibrilläre Kollagen-Netzwerk bestimmt. Der Anteil am Proteoglykan Aggrekan ist in dieser Zone am geringsten (286), Dekorin und Biglykan als weitere Matrix-Proteine (s.u.) sind dagegen hier am höchsten konzentriert (229,230). Die oberflächliche Zone besitzt die höchste Zugfestigkeit, die im Gelenknorpel gefunden wird (6,152), und ist somit besonders geeignet, den Zug-, Scher- und Druckkräften, die während der Bewegung auf sie einwirken, standzuhalten.

Unterhalb dieser Tangential-Zone findet sich die mittlere Übergangs-Zone mit einer geringeren Zelldichte. Hier zeigen sich die eher typischen morphologischen Merkmale des hyalinen Knorpels, mit abgerundeten Zellen und einer ausgedehnten extrazellulären Matrix mit einer hohen Konzentration an Aggrekan. In dieser Zone erreichen die Kollagenfibrillen einen größeren Durchmesser und sind scheinbar weniger gerichtet angeordnet, da sie hier eine Umlenkung erfahren.

Unter dieser mittleren Schicht ist die tiefe, radiäre Knorpelzone gelegen. Die Ausrichtung der Kollagenfasern wie auch der Zellen, die säulenartig übereinander liegen, ist gesehen zur Knorpeloberfläche radiär. Die Zelldichte ist hier am geringsten

und der Fibrillendurchmesser und der Aggregatgehalt am höchsten, obwohl der Kollagenanteil in Relation gering ist (286).

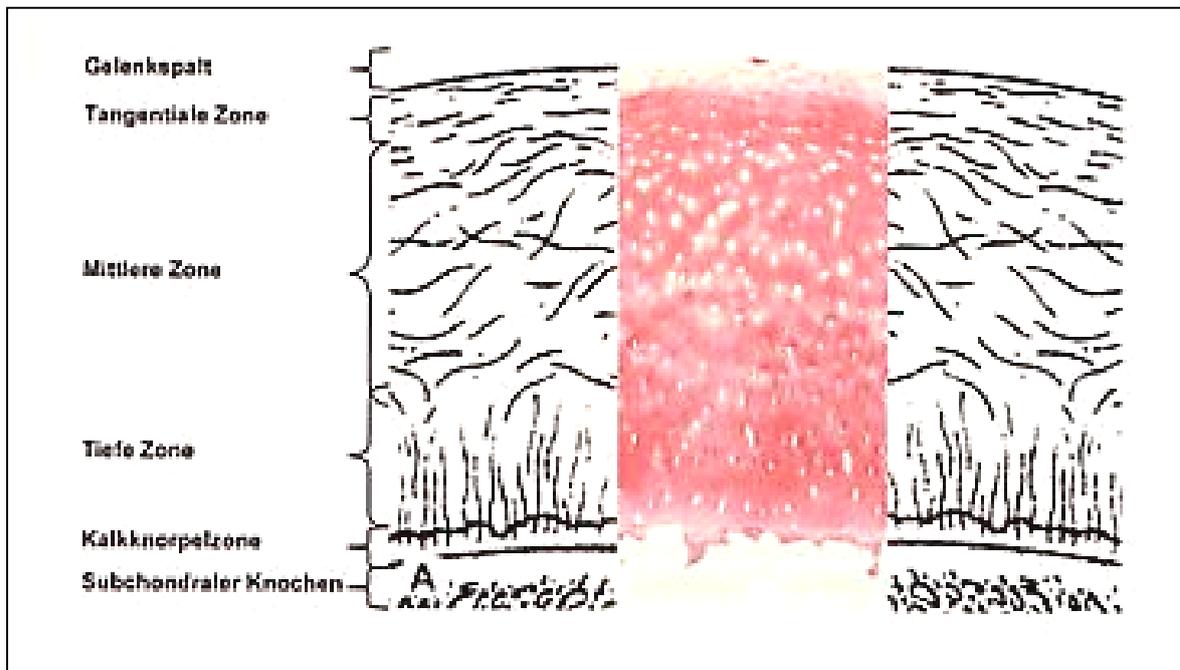
Innerhalb der genannten Schichten kann die Matrix in drei Regionen differenziert werden: eine perizelluläre, eine territoriale und eine interterritoriale Matrix. Während die perizelluläre und die territoriale Matrix der Bindung und dem Schutz der Chondrozyten dienen, ist die interterritoriale Matrix für die mechanischen Eigenschaften des Gewebes (s.1.3) verantwortlich (52).

Die Chondrozyten der mittleren und tiefen Schicht sind von einer schmalen perizellulären Region umgeben, die von einer faserigen Kapsel begrenzt wird. Typ VI-Kollagen (s.u.) ist an den Faserstrukturen stark beteiligt, die zum Schutz der Zellen vor mechanischer Schädigung sog. Chondrone bilden. Diese strukturellen Einheiten bestehen aus kleinen Gruppen von Chondrozyten, der perizellulären Matrix und Kapsel sowie der territorialen Matrix (237). Die stark basophile territoriale Matrix kann elektronen-mikroskopisch von der interterritorialen Matrix abgegrenzt werden und besitzt einen geringeren Anteil an Proteoglykanen sowie dichter gepackte Kollagenfibrillen. Morphologisch wurden die Chondrone erstmals von Benninghoff (30) 1925 charakterisiert und auch biomechanisch interpretiert. Demnach fungieren die Kollagenfasern, welche die Chondrozyten „zirkulär umspinnen“ und dadurch abgrenzende „Wicklungen“ formieren, als zellschützende „federnde Kugeln“. Im Chondron geht das hydrodynamische Element von den konzentrierten perizellulären Proteoglykanen und dem daraus resultierenden Wassereinstrom aus (s. 1.3). Die folgende Expansion wird durch die Kapsel aus Kollagenfibrillen gebremst. Funktionell führt dies dazu, dass gesunder hyaliner Knorpel nur minimal komprimierbar ist (213,231).

Die sogenannte kalzifizierte Schicht, durch eine „tide mark“ von der tiefen Knorpelzone abgegrenzt, stellt einen Puffer mit mittlerer mechanischer Festigkeit dar, die zwischen der des unkalzifizierten Knorpels und der des subchondralen Knochens liegt. Die Chondrozyten in dieser kalzifizierten Zone zeigen einen hypertrophen Phänotyp. Diese hypertrophierten Zellen synthetisieren Typ-X-Kollagen und können eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix induzieren, so dass Typ-X-Kollagen als Marker der hypertrophierten Chondrozyten gilt. Anders als bei der Verknöcherung wird diese kalzifizierte Matrix während ihrer Entwicklung nicht vollständig resorbiert und widersteht für gewöhnlich einer vaskulären Invasion. Diese Zwischenschicht

stellt eine exzellente biologische und biomechanische Verbindung zum subchondralen Knochen dar.

Abb. 2 : Struktureller und zonaler Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels (aus 237)



1.2 Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix des Knorpels:

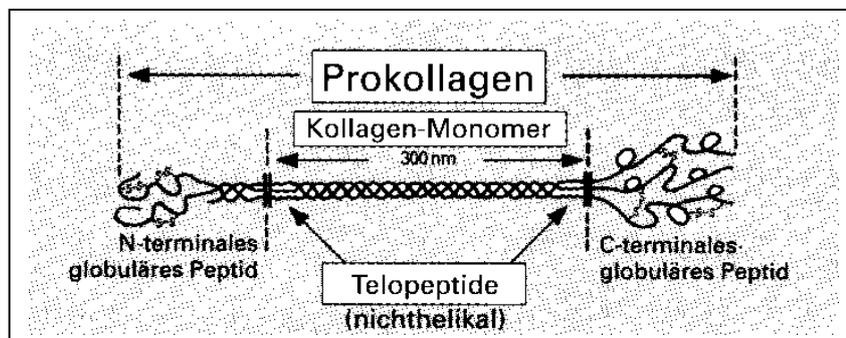
Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels (EZM) setzt sich aus Kollagenen, Proteoglykanen und „nicht-kollagenen“ Proteinen zusammen.

1.2.1 Kollagene und Kollagenfibrillen

Die Kollagene bestehen charakteristischerweise aus drei linksgewundenen Polypeptid-Ketten („ α -Ketten“) mit der Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin. Bei der Kollagenbiosynthese werden zunächst Hydroxyprolin- und Hydroxylysinfreie sog. „Pro- α -Ketten“ gebildet, deren Prolin- und Lysinreste dann durch Hydroxylasen teilweise in Hydroxyprolin und Hydroxylysin umgewandelt werden. Von den Pro- α -Ketten werden für die verschiedenen Kollagentypen

entsprechende in ihrer Aminosäurezusammensetzung geringfügig variierende Kettentypen ($\alpha 1I$, $\alpha 1II$, $\alpha 1III$, $\alpha 1IV$, αA , αB , $\alpha 2$) synthetisiert. Durch Assoziation von drei $\alpha 1$ -Ketten (z.B. Kollagen-Typ II, „homo-trimer“) oder zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette (Kollagen-Typ I, „hetero-trimer“) entsteht eine stabile spiralige Quartärstruktur, die sog. „Super-Helix“. Von diesem „Prokollagen“ werden durch Peptidasen die beiden nicht-helikalen Endbereiche („Telopeptide“, N-terminales und C-terminales Peptid) abgespalten, wodurch das Kollagenmolekül entsteht (Abb.3). Extrazellulär kommt es durch Anlagerungsvorgänge der Kollagenmoleküle zur Bildung von Kollagenfibrillen (s.u.).

Abb. 3 : Abspaltung der Telopeptide vom Prokollagen (aus 213)



Hauptbestandteil der Kollagen-Fraktion des hyalinen Gelenkknorpels ist das Typ II-Kollagen (90-95% der Kollagene), das zusammen mit Typ IX (1-2%) und Typ XI (2-3%) die typischen Kollagenfibrillen aufbaut. Daneben findet man in geringen Mengen Typ VI- und Typ X-Kollagen, nicht aber Kollagen Typ I, was typischerweise z.B. in Knochen, Sehnen und Haut vorliegt (82,183,237). Die verschiedenen, im hyalinen Knorpel vorkommenden Kollagene zeigen in ihrer Struktur und Funktion einige Unterschiede (71):

Kollagen Typ II: Dieses Kollagenmolekül entsteht aus von Chondrozyten gebildetem Prokollagen und ist aus 3 identischen $\alpha 1(II)$ -Ketten aufgebaut (homo-trimere $[\alpha 1(II)]_3$ -Struktur). Kollagen Typ II bildet die Basis der extrazellulären Knorpelmatrix. Es kann während der Embryogenese temporär auch in anderen Geweben nachgewiesen werden und enthält einen hohen Anteil von Hydroxylysin, das eine Glykosylierung erleichtert und die hydrophilen Eigenschaften des Moleküles stärkt.

Kollagen Typ VI: Kollagen Typ VI ist nicht chondrozytenspezifisch und tritt ubiquitär in Form von Mikrofibrillen auf. Kollagen Typ VI bildet ein eigenes Netzwerk von übergeordneten, durch Disulfidbindungen organisierten Tetrameren, welche miteinander End-zu-End verbunden sind. Im Knorpel ist es an den Faserstrukturen beteiligt, die zum mechanischen Schutz der Zellen die Chondrone (s.o.) bilden (213). Über eine Assoziation mit der perizellulären Kapsel stellt Kollagen Typ VI nach außen hin die Verbindung zum radiären Kollagennetzwerk dar, nach innen stabilisiert es die anderen Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine (213,237). Zum anderen dient es der Verankerung der Chondrozyten (213). Durch die hohe Konzentration in der Kapsel gilt Kollagen Typ VI als immunhistochemischer Marker für Chondrone (213).

Kollagen Typ IX: Das hetero-trimere Kollagen Typ IX spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. So erleichtert die antiparallele Orientierung mit nichthelikalen Abschnitten eine Fibrilleninteraktion mit Proteoglykan-Makromolekülen. Die Kollagenmoleküle vom Typ IX liegen an der Oberfläche der Kollagenfibrillen und sind kovalent an Typ II-Kollagen gebunden. Des Weiteren übernimmt Kollagen Typ IX eine Platzhalterfunktion zwischen den Kollagen Typ II-Fibrillen. Von entscheidender biomechanischer Bedeutung ist jedoch die Ausbildung von kovalenten IX-IX-Crosslinks, mit deren Hilfe die Vernetzung der großen Fibrillen zum Kollagenmaschenwerk zustande kommt und stabilisiert wird (36,74,76,83,237). Diese „Verleimung“ der Fasern durch die Kollagene vom Typ IX ist für das viskoelastische Element der Materialeigenschaften des Knorpels wichtig (264). Andererseits besteht eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Protease Stromelysin („Matrix-Metalloproteinase-3“, MMP-3) mit dem Effekt der Fasernetzlockerung am Anfang eines Arthroseprozesses (213).

Kollagen Typ X : Das Kollagen X-Molekül ist kürzer als die Kollagene Typ II und Typ XI und hat eine nicht-fibrilläre, homo-trimere Struktur. Kollagen X wird ausschließlich von hypertrophen Chondrozyten gebildet wie z. B. in der epiphysealen Wachstumsfuge (237), oder im Bereich der Frakturheilung (Kallus) (182). Es wird im adulten Knorpelgewebe lediglich in der Zone des kalzifizierten Knorpels nachgewiesen (237,252). Ein Nachweis der Expression von Kollagen X in Kulturen

von Chondrozyten wird mit einer Differenzierung in Richtung der enchondralen Ossifikation in Verbindung gebracht (35).

Kollagen Typ XI: Kollagen Typ XI hat eine hetero-trimere, fibrilläre Struktur. Es ist es dem Kollagen Typ II ähnlich, da auch in diesem Molekül keine Unterbrechungen der helikalen Abschnitte durch nichtkollagene Aminosäuresequenzen stattfinden. Des weiteren werden einige Abschnitte der α -Ketten von Kollagen II und XI von dem gleichen Gen codiert (71). Partiiell bestehen auch Ähnlichkeiten in der Sequenz zu Kollagen Typ V. Kollagen Typ XI ist an der Regulation von Fibrillengrößen beteiligt (Blaschke), indem Kollagen Typ XI kovalent über Hydroxylysin-Aldehyd-Bindungen an Kollagen Typ II gebunden wird. Es ist dabei sowohl innerhalb als auch an der Oberfläche einer Fibrille zu finden (183).

Tabelle 2 : Kollagene des hyalinen Gelenkknorpels

Molekül	Eigenschaften	Funktion
Kollagen II	Hauptkomponente der Makro-Fibrillen	Nimmt Zugkräfte auf
Kollagen VI	Formt perizelluläre Mikro-Fibrillen	Sicherung der Chondrone
Kollagen IX	Verbunden mit der Oberfläche von Makromolekülen	Nimmt Zugkräfte auf, Fibrillenvernetzung
Kollagen X	Durch hypertrophe Chondrozyten, in kalzif.Zone	Strukturelle Stabilisierung (?)
Kollagen XI	In und auf Makrofibrillen	Unterstützt Fibrillenformation, reguliert Fibrillendicke

Wie auch in anderen zusammengesetzten Geweben mit extrazellulärer Matrix, besteht das Endoskelett des hyalinen Knorpels aus Kollagenfibrillen, die ein Netzwerk aus übergeordneten Kollagenfasern über die gesamte Matrix ausbilden. Diese Fibrillen variieren im Durchmesser zwischen 20 nm in der oberflächlichen Zone des Knorpels (s.o.) und 70-120 nm in der tiefen Zone. Eine wichtige Rolle in der Entstehung der Fibrillen spielt das "Cartilage oligomeric matrix protein" (COMP)

(s.u.), indem es verschiedene Kollagenmonomere binden kann (280). Bei der Fibrillenentstehung werden mehrere Kollagenmoleküle gebunden, um zunächst eine Mikrofibrille zu formen; die Fibrille stellt schließlich die Struktur aus parallel angeordneten Mikrofibrillen dar. Auf der Ebene der Mikrofibrille entsteht das Prinzip der Querstreifung der Kollagenfibrillen, als das bekannteste elektronenoptisch nachweisbare Merkmal. Es beruht auf der geregelten Versetzung der Moleküle um jeweils ein Viertel in ihrer Länge, die einheitlich 300 nm beträgt. Die hellen Streifen stammen von einer durch Telopeptide gebildeten Lücke zwischen den Molekül-Enden, während die dunkleren Perioden von den lückenfreien Abschnitten in der sog. Überlappungszone stammen. Neben dem COMP sind auch intermolekulare Crosslinks an der Verknüpfung zur Mikrofibrille beteiligt. Dies sind molekulare „Brückenköpfe“ an spezifischen Positionen auf den α -Ketten der Kollagene im helikalen und im Telopeptid-Bereich. Es sind Aldehydreste an den beiden Enden, die als Reaktionspartner einem Hydroxylysin in der Helix gegenüberstehen und kovalente Bindungen herstellen (82).

1.2.2. Proteoglykane

Proteoglykane sind Kohlenhydrat-Proteinverbindungen, in denen eine variable Anzahl von Polysaccharidketten und häufig eine ebenfalls variable Anzahl von Oligosaccharidresten mit einem Proteinteil in kovalenter Bindung verknüpft sind. Aufgrund ihrer Aminosäuren haben die Polysaccharide der Proteoglykane die Bezeichnung Glykosaminoglykane erhalten. Typische Glykosaminoglykankomponenten des Knorpels sind Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat (55,243). Hyaluronat dagegen liegt als Glykosaminoglykan in proteinfreier Form vor. Proteoglykane binden über „Link-Proteine“ an Hyaluronsäure zu großen, strukturspezifischen Komplexen mit hoher Wasserbindungskapazität (213). Diese Aggregate können ihrerseits mit kollagenen Fasern oder anderen Molekülen des Extrazellulärraumes makromolekulare „Überstrukturen“ bilden (55). Aggrekan ist das bedeutendste und zugleich größte Strukturmolekül aus der Gruppe der Proteoglykane. Es ist für die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich. Beim Aggrekan ist ein zentrales „core protein“ mit über 100 Chondroitin- und Keratansulfatketten verbunden, so dass das Molekül elektronen-

mikroskopisch einer Flaschenbürste ähnelt (213,237). Auch Versikan gehört wie das „Link Protein“, allerdings in viel geringerer Konzentration als Aggrekan, zu den komplexbildenden Proteoglykanen des Knorpels (243).

Die sogenannten kleinen, leucinreichen Proteoglykane des Knorpels („small leucine-rich repeat proteoglycans“, SLRPs) können nach der Sulfat-Kette (Dermatan-Sulfat bzw. Keratan-Sulfat) unterschieden werden. Dekorin und Biglykan enthalten Dermatan-sulfat, Fibromodulin und Lumikan enthalten Keratansulfat-Ketten (Roughley). Alle genannten „SLRPs“ interagieren mit Kollagenfibrillen der Extrazellulärmatrix und beeinflussen den Fibrillendurchmesser (61,119). Sie sind im Vergleich zu Aggrekan unempfindlicher gegenüber Proteasen.

Weitere Proteoglykane der kartilaginären Matrix sind Perlekan, ansonsten hauptsächlich in Basalmembranen zu finden, und das sogenannte „Oberflächenzonen-Protein“ („superficial zone protein“), welches speziell von den oberflächlich gelegenen Chondrozyten synthetisiert wird (243). Perlekan ist anscheinend zum Matrixaufbau notwendig, denn bei dessen Abwesenheit kommt es zu einer Matrixdisorganisation (68). Typ-VI-Kollagen kann Perlekan binden, was dazu dient, dass die Zelloberfläche mit molekularen Strukturen der Matrix verknüpft wird. Das „superficial zone protein“ ist weitgehend identisch mit dem von synovialen Fibroblasten gebildeten Lubricin, welches für die Lubrikation und friktionsfreie Bewegung der Knorpeloberfläche verantwortlich ist (145,243,256,297).

1.2.3. Weitere nicht-kollagene Matrixproteine:

Das „Cartilage Oligomeric Matrix Protein“ (COMP), ein Glykoprotein aus der Familie der Thrombospondine, ist in allen Knorpel-Geweben nachweisbar und spielt eine Rolle in der Vernetzung der Kollagenfibrillen. Insbesondere scheint eine Assoziation zwischen COMP und Kollagen Typ IX zu bestehen (243)(s.o.).

Dem „Cartilage matrix protein“ (CMP) oder Matrilin-1 wird ebenfalls eine strukturelle Rolle in der extrazellulären Matrix zugesprochen (146), indem es mit Kollagen Typ II und Aggrekan interagiert. Es ist jedoch nur während des Wachstums in normalem Gelenkknorpel nachweisbar, beim Erwachsenen wird es nur von Chondrozyten in arthritisch verändertem Knorpel produziert (211, 232).

Fibrillin-1 ist ein perizellulär gelegenes Protein und ist an der Fibrillenbildung beteiligt (150).

Nach seiner Lokalisation benannt ist das „Cartilage intermediate-layer protein“ (CILP), welches in der mittleren Knorpelzone hauptsächlich im erwachsenen Gelenkknorpel gefunden wird. Seine Rolle ist bisher unklar (243). Ein weiteres Strukturprotein des artikulären Knorpels ist das Fibronectin, welches in verschiedenen Geweben jeweils in typischen Isoformen vorliegt. Ihm wird eine Rolle in der Zell-Matrix-Interaktion zugeschrieben. Eine Anhäufung von Fibronectin-Fragmenten im arthritischen Gelenk kann über eine Interleukin-1-Stimulation zu einer beschleunigten Aggrekan-Degradation führen (126). Chondroadherin und das „Proline-and-arginine-rich end leucin-rich repeat protein“ (PRELP) binden an der Zelloberfläche der Chondrozyten und unterstützen Zell-Matrix-Interaktionen durch ihre Affinität zu Sulfatketten (59,243). Die Kalzifikation der Matrix wird durch die Anwesenheit des Matrix-GLA-Proteins verhindert, dessen Fehlen nicht nur zu einer Kalzifikation des Knorpels, sondern auch anderer Gewebe führt (169). Weitere Proteine der extrazellulären Matrix sind beschrieben, in ihrer Funktion jedoch noch nicht ausreichend charakterisiert. Man nimmt an, dass sie eher eine Rolle bei der Zellproliferation bzw. dem Metabolismus spielen (243). Eine Übersicht gibt Tabelle 3.

Tabelle 3 a + b : Proteoglykane und nicht-kollagene Matrix-Proteine des Gelenkknorpels modifiziert. n. Roughley (243)

Tab. 3 a : Proteoglykane (PG)

Aggregatbildend	„Leucin-rich-repeat-PG“	Andere
Aggrekan	Biglykan	Perlekan
Versikan	Dekorin	SPZ* / Lubricin
Link-Protein	Fibromodulin	
	Lumikan	

*SPZ = Superficial zone protein

Tab. 3 b : nicht-kollagene Proteine

Strukturproteine	Regulationsproteine	Andere
COMP*	MPG*	Chondrocalcin
CMP*	Chondromodulin I + II	PARP*
CILP*	CD-RAP*	Lysozym
Fibronektin	Wachstumsfaktoren	Phospholipase A2
PRELP*		Proteasen
Chondroadherin		
Tenascin		
Fibrillin		
Elastin		

*COMP = Cartilage oligomeric matrix protein CMP = Cartilage matrix protein CILP = Cartilage intermediate layer protein CD-RAP = Cartilage-derived retinoic acid sensitive protein
 PRELP = Proline-and-arginine rich end leucine-rich repeat protein MPG = Matrix-gla protein
 PARP = Proline-and-arginine-rich protein

1.3 Biomechanisches Grundprinzip der Visko-Elastizität von Gelenkknorpel

Die Visko-Elastizität des Gelenkknorpels ermöglicht das Auffangen von Energie unter Belastung und die Rückführung in die ursprüngliche Form ähnlich einer Feder. Diese Funktion wird durch das Zusammenspiel des Kollagenfasernetzes mit den Komponenten der Extrazellulärmatrix, hauptsächlich dem Aggrecan, und dem durch sie gebundenen Wasser erreicht. Das Wirkprinzip besteht im osmotisch erzeugten Quellungsdruck und dem vom dehnungsresistenten Fasernetz entgegengesetzten Widerstand gegen diesen Druck. Der osmotische Effekt, den die Proteoglykane ausüben, beruht auf der Anziehung von Gegenionen aus dem synovialen Milieu. In dieser Situation verursacht die ungedeckte Wasseraffinität der Aggrecane einen permanent starken Expansionsdruck (180,183,194,195).

Das Phänomen der Viskosität wird dadurch bewerkstelligt, dass der bei Belastung auftretende Druck den beschriebenen osmotischen Quelldruck überschreitet und es zur Verdrängung von Wasser kommt. Der Widerstand, auf den der kompressionsbedingte Abstrom des Wassers trifft, beruht auf der Reibung, die das verdrängte Wasser in den Poren zwischen den eng vernetzten Makromolekülen der

extrazellulären Matrix zu überwinden hat. Dieses Reibungshindernis, und daher auch die hydraulische Permeabilität, erfährt durch die Abhängigkeit von der Belastungsgröße eine automatische Regulierung: die Porengröße verringert sich durch die unter Druck eintretende Verdichtung der makromolekularen Strukturen. Auf diese Weise werden dem Flüssigkeitsstrom Grenzen gesetzt, die schließlich einen Gleichgewichtszustand erreichen, in dem eine weitergehende Druckdeformierung dann nicht mehr möglich ist (193).

Die elastische Eigenschaft beruht auf dem Rückstrom des Wassers und einer elektrostatischen Komponente: die an den Seitenketten der Proteoglykane sitzenden Ladungen mit gleichnamigem Vorzeichen stoßen sich gegenseitig ab. Mit ihren Repulsionskräften beteiligen sie sich an der intramolekularen Entfaltung und wirken synergetisch mit den osmotischen Kräften. Im Zustand der Kompression werden die Ladungen gegen den elektrostatischen Widerstand verdichtet. Proportional mit der Verdichtung steigt die Intensität der Abstoßung mit einem Effekt, auf den die Definition des elastischen Elements zutrifft (57).

2. Pathophysiologie von Gelenkknorpelschäden und Arthrose-entstehung:

Als Schädigungsmechanismen des Gelenkknorpels kommen neben einem Trauma biomechanische Fehlbelastungen der Gelenke sowie endogen genetische und entzündliche Ursachen in Frage. Allgemein anerkannte Risikofaktoren der Arthroseentstehung schließen daneben das weibliche Geschlecht, zunehmendes Alter und Übergewicht ein (124,273). Berufliche und sportliche Belastung scheint eine ungeordnete Rolle zu spielen (273).

Auf Grund der Avaskularität des Knorpelgewebes sowie der Immobilität und der verminderten Proliferation von Chondrozyten (176) in hyalinem Gelenkknorpel führt jegliche Schädigung des adulten Knorpels zu einem bleibenden Defekt. Dabei resultiert aus oberflächlichen, die subchondrale Grenzlamelle nicht erreichenden Knorpelverletzungen zwar nicht obligat eine Arthrose, sie zeigen aber auch keine Heilungstendenz (52,53,67,277). Bei Beteiligung des subchondralen Knochens kommt es durch Eröffnung ossärer Blutgefäße zum Einwandern mesenchymaler Zellen aus dem Blut bzw. Knochenmark (54,260). Dies führt zu einer langsamen Defektheilung mit der Ausbildung eines mechanisch minderwertigen Faserknorpels: dieser Regeneratknorpel enthält vorwiegend Kollagen Typ I, der Proteoglykangehalt ist reduziert, die zonale Textur typisch für den hyalinen Knorpel kann nicht mehr aufgebaut werden und eine Verbindung des Reparationsgewebes mit dem Fasergerüst des angrenzenden unverletzten Gewebes findet nicht statt (52,86, 95,137). Außerdem wurde eine verminderte Expression von Kollagen II und Aggrecan auch im periläsionalen Gewebe gesehen (86). Der Regeneratknorpel ist weniger belastbar und zeigt typischerweise einen rascheren Verschleiß mit erneuten klinischen Beschwerden (104,196). Mechanische Aspekte spielen besonders bei posttraumatischen Läsionen oder der Osteochondrosis dissecans eine Rolle: insbesondere bei osteochondralen Defekten kommt es über eine pathologische Last-Umverteilung auf angrenzende Bezirke mit einem erhöhten lokalen Druckkontakt zur nachfolgenden Knorpeldegeneration (44,251). Bei Mitbeteiligung anderer Gelenkstrukturen wie den Kreuzbändern und Menisken des Kniegelenkes steigt das Arthroserisiko stark an (102, 184, 199), insbesondere wenn der Patient zum Zeitpunkt der Verletzung älter als 30 Jahre ist (102,183,184,251). So zeigten Gillquist und Messner (102) in einer Übersichtsarbeit, dass Meniskus- oder vordere

Kreuzbandverletzungen zu einem 10-fach höheren Arthroserisiko führten im Vergleich zu einer Population ohne Knieverletzung. Andererseits konnten Messner und Maletius (184) in einer Langzeitstudie von jungen Athleten mit isolierten Knorpelschäden nach 14 Jahren bei 22 von 28 Patienten eine exzellente oder gute Kniefunktion feststellen, dabei hatten jedoch 12 Patienten bereits radiologische Zeichen der Gonarthrose.

Zusammenfassend ist zwar der natürliche Verlauf von isolierten chondralen und osteochondralen Defekten noch nicht gut definiert (102,184), jedoch zeigt die klinische Erfahrung, dass unbehandelte Defekte, die einen größeren Gelenkbereich betreffen, zu einer symptomatischen Degeneration führen (53).

2.1.Knorpeldegeneration im Rahmen der Arthroseentstehung

Im Rahmen der Arthroseentstehung kommt es zu einer chronischen, fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels und damit zum Funktionsverlust des Gelenksystems (174,189,191). Neben der Degradation auf molekularer Ebene kommt es auch zur Destabilisierung und Zerstörung von supra-molekularen Strukturen wie des Kollagennetzwerkes und der Knorpelgrundsubstanz. Beide Mechanismen führen zur mikroskopisch nachweisbaren Matrixzerstörung und letztlich zum makroskopisch sichtbaren Matrixverlust, erkennbar am Knorpelabrieb. Für die Zerstörung der Extrazellulärmatrix spielt neben mechanischen Belastungen vor allem auch der enzymatische Abbau von Matrixmolekülen eine Rolle. Wichtig scheint daher auch eine mangelnde oder fehlgesteuerte Matrixneusynthese zu sein. Entsprechende Untersuchungen konnten zeigen, dass gerade in den Knorpelzonen mit fortschreitender Matrixzerstörung die anfangs in der frühen Osteoarthrose verstärkt exprimierten anabolen Matrixgene im Verlauf vermindert exprimiert werden (3,5,174). Dies führt zur Knorpelmatrixzerstörung auf molekularer (z.B. Proteoglykanverlust), makro-molekularer (z.B. Kollagennetzwerkzerstörung), mikroskopischer (z.B. Fibrillierung) und makroskopischer Ebene (Knorpelabrieb) und mündet schließlich in das klinisch bekannte Bild der Arthrose. Die genannten molekularen Mechanismen sowie die dadurch induzierten zellulären Reaktionen führen zu einem typischen histopathologischen Erscheinungsbild: Die Matrixzerstörung auf molekularer Ebene zeigt sich am Verlust der typischen Anfärbbarkeit für Proteoglykane, die supramolekulare Matrixzerstörung an Rißbildungen und schließlich an Defekten von Knorpelschichten.

Die Zellen reagieren auf die schädigenden Einflüsse initial mit einer verstärkten Neusynthese von Knorpelmatrixkomponenten wie Kollagen II, IX und XI sowie von Aggrecan und Link-Protein (3,4). Weiterhin kommt es zu einer Proliferation vor allem der Knorpelzellen der oberen und mittleren Zone, die sich histologisch im Auftreten der charakteristischen Zellnester im osteoarthrotisch geschädigten Gelenkknorpel zeigt. Zellbiologisch interessant ist zudem, dass es in bestimmten Knorpelbereichen zu Umdifferenzierungen der Knorpelzellen kommt. Zellum-differenzierungsphänomene sind vermutlich dafür verantwortlich, dass in den untersten Knorpelschichten eine progrediente Kalzifizierung stattfindet, was sich histo-morphologisch in der für die Osteoarthrose charakteristischen Vervielfachung der „tidemark“ zeigt (189,190,191). Neben den Veränderungen im Bereich des Gelenkknorpels gibt es drei weitere pathologisch relevante Mechanismen im Bereich der Gelenk-gewebe (174):

1. Bildung von Knorpelregeneraten: In Randbereichen sowie Arealen der totalen Knorpelzerstörung mit Freilegung des subchondralen Knochens kommt es zur Bildung von Regeneratknorpel im Sinne von faser-knorpeligem, mechanisch minderwertigem Ersatzgewebe.
2. Subchondrale Knochenveränderungen: Im Rahmen der Osteoarthrose kommt es frühzeitig zu Knochenum- und -anbauvorgängen im Sinne der radiologisch sichtbaren Sklerosierung der subchondralen Knochenschicht sowie der Bildung von osteophytären Anbauten der Gelenkflächen. Unklar ist hierbei, inwieweit die dadurch erhöhte Steifheit des Knochens Folge einer zunehmend fehlenden Stoßabfederung durch den geschädigten Oberflächenknorpel ist oder ob eine erhöhte subchondrale Knochensteifheit dem Knorpelschaden als Mitursache vorausgeht. Im Spätstadium der Arthrose kommt es dann zu teilweise ausgedehnten Sklerosen und Nekrosen im Bereich des freigelegten Knochens.
3. Synoviale Reaktionen: Neben Veränderungen am Knorpel und Knochen kommt es bei der Arthroseentwicklung auch zur Mitreaktion der Synovialmembran unter Einschluss der Gelenkkapsel. Als wahrscheinlich wichtigste pathologische Faktoren werden diese durch molekulare Degradationsprodukte und später durch Abriebfragmente induziert (189). Diese synovialen Veränderungen und die parallel eintretende Gelenkkapsel-fibrinose sind für einen Großteil der klinischen Symptomatik der Osteoarthrose verantwortlich: Schmerz, Schwellung und Steifigkeit.

3. Prävalenz von Knorpelschäden und sozio-ökonomische Daten am Beispiel der Kniegelenksarthrose:

Nach Sellards (258) leiden 10 bis 12% aller Individuen an Knorpel-Läsionen. Curl et al. (70) sahen in einer Serie von 31.516 Kniegelenks-Arthroskopien 53.569 Knorpelläsionen bei 19.827 Patienten. Dabei betrafen 5% aller Arthroskopien Patienten unter 40 Jahren mit Knorpelschäden Grad 4 (freiliegender subchondraler Knochen). In einer Studie von Hardaker et al. (117) wurden bei 16% von 132 Patienten mit Knieverletzungen Knorpelschäden gefunden. In anderen Serien wurden bei Kniegelenksbeschwerden isolierte Knorpelschäden in 1-3% der Arthroskopien diagnostiziert (128,184).

Untersuchungen zur Arthrose zeigen, dass einheitlich die Prävalenz, d.h. die Erkrankungshäufigkeit mit dem Alter zunimmt und Frauen häufiger betroffen sind als Männer (273). Nach Felson (85) beträgt im Erwachsenenalter die Rate klinisch symptomatischer Arthrosen am Knie 1,6-9,4 %. Dagegen beträgt die Häufigkeit radiologisch gesicherter Gonarthrosen bei Frauen zwischen dem 45. und 49. Lebensjahr 12,4-12,7% und zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr 33,3 % (247). Die Prävalenz klinisch symptomatischer Arthrosen ist somit geringer als nach radiologischen Studien anzunehmen. Neuerkrankungen treten für das Kniegelenk nach Oliveria (212) jährlich bei 240 von 100.000 Patienten auf.

Bezogen auf die Notwendigkeit einer operativen Therapie liegt die Zahl der möglichen Indikationen für gelenkerhaltende operative Maßnahmen bei isolierten Knorpeldefekten in der Bundesrepublik Deutschland derzeit bei 1500 – 5400 pro Jahr (300). Dagegen werden in Deutschland pro Jahr etwa 50.000 Kniegelenksendoprothesen implantiert, mit deutlich steigender Tendenz. Nimmt man für gelenkerhaltende Eingriffe am Knorpel erweiterte Indikationen im Sinne von beginnenden Gonarthrosen (s.u.) hinzu, ist nach den genannten Daten zur Prävalenz mit deutlich höheren Zahlen für diese Indikationen zu rechnen. In Deutschland wird die Zahl von Patienten, die täglich an Arthrosebeschwerden unterschiedlicher Gelenke leiden, auf 5 Millionen geschätzt (301). Auch dadurch ergibt sich potentiell eine deutlich höhere Zahl möglicher Indikationen für gelenkerhaltende Eingriffe am Knorpel.

Diverse Studien belegen den klinischen Effekt gelenkerhaltender operativer Eingriffe am Knorpel. Dies trifft sowohl für Verfahren zu, die zur Bildung eines Faserknorpels führen als auch für solche, die den Wiederaufbau eines zumindest hyalinartigen, im Vergleich zum Faserknorpel höherwertigen Knorpels durch Transplantation von Chondrozyten in Knorpeldefekte zum Ziel haben (s.4.2). Aus ökonomischer Sicht konnte Wildner (300) am Beispiel der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) den Effekt von modernen Verfahren zeigen, die dem Wiederaufbau einer solchen tragfähigen biologischen Gelenkfläche dienen. Aus seinen Berechnungen geht hervor, dass bei der Behandlung von jährlich 3400 Patienten mit isolierten Knorpeldefekten mit konventionellen Verfahren bei diesen im Laufe des weiteren Lebens etwa 2000 Gelenkersatzoperationen notwendig werden. Nach seiner Hypothese kann diese Zahl bei Behandlung mittels ACT auf 1000 halbiert werden ! Danach verhindern 1000 durchgeführte ACT 310 spätere Kniegelenksprothesen und 3 (Prothesen-) operationsassoziierte Todesfälle. Im Vergleich dazu ist z.B. die Mikrofrakturierung zwar zunächst ökonomischer (Tab.4), jedoch weniger effizient: durchschnittlich werden entsprechend der genannten Halbierung bei ACT während der mittleren Lebenszeit nach hyalinartiger Knorpeldefektheilung 0,31 Endoprothesen-Operationen, nach faserknorpeliger Defektheilung jedoch 0,62 Gelenkersatzoperationen notwendig.

Tab. 4 : Aktuelle Behandlungskosten (in DM) gelenkerhaltender Eingriffe am Kniegelenk im Jahre 2000 (nach Wildner (300), zugrundegelegter KH-Tagessatz 600.- DM, Reha-/Arztkosten 3000.-)

Therapieverfahren	Berechnungsgrundlage	Kosten (in DM !)
Abrasionsarthroplastik	5 KH-Tage, Nachbehandlg.	6.000.-
Mikrofrakturierung	4 KH-Tage, Nachbehandlg	5.400.-
Mosaikplastik	5 KH-Tage, Nachbehandlg	6.000.-
Periostlappen-Plastik	9 KH-Tage, Nachbehandlg	8.400.-
Autologe Chondrozyten-Transplantation	9+1KH-Tage,Nachbehandlung, 13.000.- Extrakosten	21.000.-

Diese Zahlen belegen, dass, zumindest beim isolierten Knorpelschaden, auch aus gesundheits-ökonomischer Sicht eine gelenkerhaltende Therapie, die zur Bildung eines hyalinartigen Ersatzknorpels führt, erstrebenswert erscheint. Im Zeitverlauf resultieren pro Patienten weniger Folgekosten bei anfänglich höheren Behandlungskosten. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass z.B. im Jahre 1994 die Summe der Leistungen für die Behandlung von Arthrosepateuten insgesamt 10,6 Milliarden DM betrug (Gesundheitsbericht für Deutschland 1998 (101))

Die weitere Optimierung der Gelenkflächen-wiederherstellenden Therapieverfahren würde die Effizienz noch verbessern, eine entsprechende wissenschaftliche Bearbeitung solcher Therapieformen ist demnach auch gesundheits-ökonomisch wünschenswert.

4. Diagnostik und aktuelle Behandlungsstrategien bei Gelenkknorpelschäden :

4.1. Diagnostik und Klassifikation

4.1.1 Klinische Diagnostik und Klassifikation

Die klinische Diagnostik von Gelenkknorpelschäden ist bis heute unzuverlässig (38). Aus klinischer Sicht gibt es mehrere zwar typische, aber unspezifische Zeichen für das Vorliegen von Knorpelschäden bzw. einer Arthrose (308): Schmerz, Funktionseinschränkung, Schwellung und Ergussbildung, Kreptiation und später Vergrößerung der Konturen, tastbare Osteophyten, Achsabweichungen und Instabilität. Führend ist der Gelenkschmerz, gefolgt von der gelenkspezifischen Funktionseinschränkung. Anlauf-, Belastungs- und Nachtschmerz sind Schmerzqualitäten, die besonders bei Befall großer, lasttragender Gelenke auftreten. Je nach Ausmaß der Symptome spricht man von stummer bzw. latenter, von manifester oder von aktivierter Arthrose. Als stumme oder latente Arthrose wird ein positiver radiologischer Befund ohne klinische Symptome bezeichnet. Bei der manifesteren Arthrose bestehen zum Röntgenbefund auch Schmerzen und eine Funktionseinschränkung, bei der aktivierten Arthrose kommt ein entzündlicher Reiz- und Schwellungszustand, hervorgerufen durch eine Synovialitis, hinzu.

Eine vergleichsweise hohe Aussagekraft haben die vom American College of Rheumatology (ARC) erarbeiteten Klassifikationskriterien für Knie, Hüfte und Hand (Tab.5) (8-10). Diese kombinieren klinische, radiologische und laborchemische Parameter und ermöglichen die Diagnose einer Arthrose der genannten Gelenke mit relativ hoher Sensitivität und Spezifität (308).

Zur Klassifikation einer funktionellen Beeinträchtigung an Hüfte und Kniegelenk werden heute zunehmend der validierte WOMAC-Score (Western Ontario McMasters University) (25,26,270), der SMFA-Score (Short musculoskeletal function assessment questionnaire) (271) und der Lequesne-Funktionsindex (160) eingesetzt. Dabei sind vom Patienten Fragen zu Schmerzen, Steifigkeit und Funktionsstatus zu beantworten (s.Tab.6.). Daneben existieren besonders für Knie, Schulter und Hüfte verschiedene, nicht-arthrose spezifische Scores, die den Funktionsstand der Gelenke unter verschiedenen Schwerpunkten dokumentieren. Als Beispiele seien

der Lysholm-Score (170), IKDC-Score (29) und OAK-Score (197) für das Knie, Constant-Score (66) und Rowe-Score (244) für die Schulter) oder der Harris-Hip-Score (118) für die Hüfte genannt.

Tab. 5: ACR-Klassifikationskriterien der Kniegelenksarthrose (aus 308)

Klinische Befunde	Klinische u. Röntgen-Bef.	Klinische u. Laborbef.
<p>Knieschmerz und mind. 3 (4) der folgenden Parameter: Alter > 50 J. Steifigkeit < 30 Min. Krepitation Druckschmerz am Knochen Vergrößerung der Knochenkonturen Keine Überwärmung</p>	<p>Knieschmerz und mind. 3 der folgenden Parameter: Alter > 50 J. Steifigkeit < 30 Min. Krepitation Osteophyten (Röntgen)</p>	<p>Knieschmerz und mind. 5 der folgenden Parameter: Alter > 50 J. Steifigkeit < 30 Min. Krepitation Druckschmerz am Knochen Vergrößerung der Knochenkonturen Keine Überwärmung BSG < 40 mm/1.Std Rheumafaktor < 1:40 Gelenkerguß</p>
<p>Sensitivität 95(84) % Spezifität 69 (89) %</p>	<p>Sensitivität 91 % Spezifität 86 %</p>	<p>Sensitivität 92 % Spezifität 75) %</p>

Tab. 6 : Kriterien des WOMAC-Arthroseindex (max.96 Punkte)
 (Vollständiger WOMAC-Score siehe Anhang 1)

Schmerzen	Steifigkeit	Funktionsstatus
<p>5 Fragen</p> <p>Gehen, Treppensteigen, Nachts, in Ruhe, bei Anstrengung</p>	<p>2 Fragen</p> <p>Morgensteifigkeit, Steifigkeit später am Tag</p>	<p>17 Fragen</p> <p>u.a. Treppensteigen, Stehen, Aufstehen, Gehen in der Ebene, Einkaufen, Ein-/Aussteigen aus dem Auto etc.</p>

4.1.2 Bildgebende Verfahren

Röntgendiagnostik und Magnetresonanztomographie (MRT)

Standard-Röntgenaufnahmen des betroffenen Gelenkes in mindestens zwei Ebenen sind Bestandteil der Basis-Diagnostik. Diese sollten besonders am Knie unter Belastung durchgeführt werden. Nativ-röntgenologische Zeichen bei fortgeschrittener Knorpelschädigung bzw. bei Arthrose sind subchondrale Sklerosierung, Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten- und Zystenbildung. Zur Klassifikation dient die Einteilung nach Kellgren (Tab.7). Jedoch sind aufnahmetechnische Fehlerquellen zu beachten, die eine Standardisierung erschweren (308).

Die MRT eignet sich besonders zur Darstellung des Gelenkknorpels aufgrund seines hohen Wasser- und Proteoglykangehaltes. Gelenkknorpel besitzt in der MRT eine uniforme Signalintensität, sofern eine kurze Echozeit (<10 ms) in der T₁-Wichtung benutzt wird (Frank), in der T₂-Wichtung gegenüber der Gelenkflüssigkeit eine niedrige Signalintensität (73). Insbesondere mit neueren Techniken unter Anwendung spezieller Sequenzen wie der zwei-dimensional (2-D-) fettsaturierten protonen- gewichteten Fast-Spinecho-Sequenz und der 3-D-fett-saturierten Spoiled-Gradientenecho-Sequenz lassen sich selbst kleine intrachondrale und Oberflächenläsionen darstellen (156). Dennoch ist die MRT keine Methode der ersten Wahl, sondern dient der Differentialdiagnostik zu anderen Krankheitsbildern oder in Einzelfällen der differentialtherapeutischen Abwägung (308).

Tabelle 7 : Röntgenologische Stadieneinteilung der Arthrose nach Kellgren (151)

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Geringe subchondrale Sklerosierung Keine Osteophyten Keine Gelenkspaltverschmälerung	Unregelmäßigkeit der Gelenkfläche Beginnende Osteophytenbildung Geringe Gelenkspaltverschmälerung	Deutliche Unregelmäßigkeit der Gelenkfläche Subchondrale Sklerosierung Ausgeprägte Osteophytenbildung Gelenkspaltverschmälerung	Ausgeprägte Gelenkspaltverschmälerung Deformierung / Nekrose der Gelenkpartner

4.1.3 Laboruntersuchungen

Der qualitative und quantitative Nachweis von biochemischen Stoffwechselprodukten aus Knorpel (Tab.8), Knochen und Synovialmembran ist derzeit zwar Gegenstand aktueller Forschung, jedoch noch nicht im klinischen Alltag integriert (97,163,166,214,308).

Tab. 8 : Marker des Knorpelstoffwechsels nach Zacher (308)

Anabole Marker	Katabole Marker
Chondroitin-Glykosaminstrukturen Kollagen-II-Propeptide Kollagen-X-Produkte COMP-Biosynthese	Abbauprodukte von : Aggrecan Kollagen II Matrixglykoprotein (Matrix-GLA-Protein) COMP Hydroxy-Pyridinoline Metallo-Proteasen (MMP-1,-3) Proteasen-Inhibitor (TIMP)

4.1.4 Intraoperative Diagnostik und Exploration

Die direkte Inspektion eines Gelenkknorpeldefektes, in der Regel die arthroskopische, in Ausnahmefällen die offene Exploration ist nach wie vor das genaueste Diagnostikum, wobei die unterschiedlichen Klassifikationen von Knorpelschäden u.a. auf subjektiven Einschätzungen des Untersuchers basieren (38). Am weitesten verbreitet ist die Einteilung nach Outerbridge (216). Eine weitere Anwendung finden noch die Klassifikation nach Bauer und Jackson (23) sowie die neue Klassifikation der International Cartilage Repair Society ICRS (275).

Tabelle 9: Klassifikation von Gelenkknorpelschäden nach Outerbridge (216)

Grad 0 : Normaler Gelenkknorpel

Grad 1 : Leichte Knorpelerweichung und –verdickung

Grad 2 : Oberflächliche Rißbildung, Länge < 1,3 cm (0,5 inch)

Grad 3 : Tiefe Rißbildung, bis zum subchondralen Knochen reichend,
Länge > 1,3cm (0,5 inch)

Grad 4 : Freiliegender subchondraler Knochen

Abb. 4 : Arthroskopisches Bild eines (symptomatischen) Knorpelschadens Grad 3-4 nach Outerbridge, mediale Femurkondyle



4.2 Aktueller Stand der Behandlungsmöglichkeiten beim Gelenk-Knorpeldefekt:

4.2.1 Konservative Therapie

Bei den konservativen Therapiemöglichkeiten sind lokale oder systemische Gabe von analgetisch und anti-inflammatorisch wirksamen Medikamenten, krankengymnastische und physikalische Behandlung sowie gegebenenfalls die orthopädie-technische Versorgung mit Orthesen, Schuhzurichtungen oder Gehhilfen zu nennen. Es darf Schmerzlinderung, aber keine Heilung erwartet werden.

4.2.2 Operative Therapie

Das operative Behandlungsspektrum beginnt mit minimal-invasiven Verfahren, die auch bei der manifesten Gonarthrose zur Anwendung kommen (12,56): Gelenk-Lavage mit Ausspülen von arthrose- und entzündungsfördernden Mediatoren, Gelenk-Debridement und „Shaving“ bzw. Chondroplastik im Sinne einer Glättung der

Knorpelflächen und Abtragung störender Osteophyten. Diese Therapien weisen kurzfristig eine Erfolgsrate von bis zu 80% und mittelfristig zufriedenstellende Ergebnisse von 50% in einem Nachuntersuchungszeitraum von 5 Jahren auf (12,56). Andere Autoren (140,254) beschreiben deutlich geringere Erfolgsraten. Insgesamt wird die weitere Arthroseentwicklung durch diese Verfahren nicht wesentlich beeinflusst.

Insbesondere beim umschriebenen Knorpeldefekt des jüngeren Patienten, z.B. posttraumatisch oder nach Osteochondrosis dissecans, stehen heute operative Verfahren im Mittelpunkt, die zur Wiederherstellung einer tragfähigen Gelenkfläche führen sollen. Dabei kann grundsätzlich zwischen zwei Strategien unterschieden werden: a) der Initiierung und Förderung der intrinsischen Regenerationsmechanismen und b) der Wiederherstellung der Gelenkoberfläche durch Zell- und/oder Gewebstransplantation. Folgende Techniken finden derzeit klinische Anwendung:

Verfahren zur Faserknorpelinduktion

Transplantation von Geweben mit potentieller chondrogener Differenzierung (Periost, Perichondrium)

Transplantation von *in vitro* –vermehrten autologen Chondrozyten mit und ohne Matrix (ACT)

Einsatz von kompletten osteochondralen Transplantaten (OCT) (Autolog, Allograft)

4.2.2.1 Verfahren zur Faserknorpelinduktion

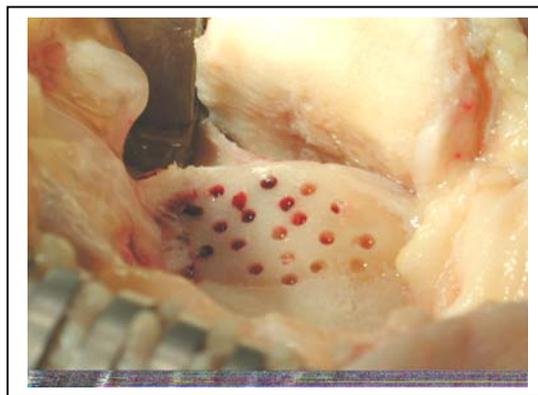
Über eine Eröffnung des subchondralen Knochens bzw. von intra-ossären Blutgefäßen kommt es zur lokalen Bildung und Anlagerung eines Blutkoagels, dem sog. „super clot“. Darin enthaltene mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (56,260,307) und solche aus der Synovialis (133) sollen zu einem Faserknorpel differenzieren. Histologisch enthält dieser Ersatz-Knorpel vorwiegend Typ-I-Kollagen im Gegensatz zum hyalinen Knorpel (Typ-II-Kollagen). Biomechanische Testungen zeigen eine deutlich geringere Belastbarkeit des Regeneratgewebes im Vergleich zum hyalinen Knorpel (Peterson, Steinwachs). Längerfristig ist der gebildete Faserknorpel somit den mechanischen Anforderungen,

welche bei alltäglicher Belastung auftreten, nicht gewachsen, so dass es bei entsprechender Defektgröße zur nachfolgenden Arthrose kommt (137).

Techniken :

Bei der Abrasionsarthroplastik nach Johnson (147) wird die gesamte subchondrale Knochenschicht oberflächlich eröffnet. Bei der Anbohrung nach Pridie (233) wird der Knochen mit einem 2,7mm-Bohrer oder 2mm-Kirschner-Draht bis in tiefere Zonen aufgebohrt. Die arthroskopische Technik bietet neben der geringeren Morbidität den Vorteil, dass durch die Spülflüssigkeit Hitzenekrosen vermieden werden (196). Bei der „Mikrofrakturierung“ nach Steadman (266) werden lediglich punktuell mit einer Ahle kleine Knocheneröffnungen von ca. 3-4mm Tiefe gesetzt ohne weitere Knochenabtragung. Auch bei dieser Technik werden Hitzenekrosen vermieden (207).

Abb. 5 : Anbohrung bei Knorpelschaden Grad 4 an der lateralen Femurkondyle



4.2.2.2 Transplantation von Geweben mit potentieller chondrogener Differenzierung

Periost (139,205-208) und Perichondrium (49,50,127) besitzen in ihrer Cambium-Schicht mesenchymale Vorläuferzellen, die nach der Transplantation entsprechender Lappen in der Defektzone zur Bildung eines Ersatzknorpels führen. Dabei konnte im Tierexperiment jeweils auch hyaliner Knorpel nachgewiesen werden. Osteochondrale Defekte, die mittels autologer Periostlappen bei Kaninchen gedeckt wurden, zeigten in der histologischen Untersuchung einen vornehmlich hyalinen Knorpel mit einem Kollagen-II-Gehalt von über 90% und normalem Gehalt an Wasser, Proteoglykanen, Chondroitin- und Keratansulfat (205,206,208). Die postoperative Anwendung einer kontinuierlichen passiven Bewegung (CPM) führte

zu einer signifikanten besseren Qualität des Regeneratgewebes (205). Die Ergebnisse waren schlechter bei älteren Tieren oder bei Plazierung der Cambiumschicht des Periostlappen zum subchondralen Knochen hin. Beim Vergleich des Ersatzgewebes 4 Wochen und 1 Jahr nach Operation konnte kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung und der strukturellen Qualität des Regeneratgewebes nachgewiesen werden, obwohl frühe degenerative Veränderungen vorhanden waren. Der subchondrale Knochen konnte komplett wiederhergestellt werden. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da die Haltbarkeit eines Knorpelregenerates von physiologischen biomechanischen Eigenschaften des subchondralen Knochens abhängt (240).

4.2.2.3 Knorpel-Knochen-Transplantation

Bis heute stellt die Transplantation osteochondraler Segmente die einzige Methode dar, einen bestehenden Gelenkknorpeldefekt mit intaktem hyalinen Knorpel zu decken. Bereits 1964 berichtete Wagner (292) über osteochondrale autologe Transplantationen (OAT) zur Deckung von Gelenkknorpeldefekten bei der Osteochondrosis dissecans. In der Folgezeit wurden sowohl autologe als auch allogene Transplantationen in offener Technik vornehmlich am Knie durchgeführt (98,158,293,306). Anfang der neunziger Jahre publizierte zunächst Matsusue (181), später dann Bobic (38) über arthroskopische osteochondrale autologe Transplantationen zur Deckung von Knorpeldefekten am Knie. Hangody berichtete über die sogenannte Mosaikplastik (111-114). Agneskirchner (1) und Imhoff (138) zeigte die Möglichkeiten des posterioren Kondylentransfers als Salvage-Operation bei großen osteochondralen Defekten. Zwischenzeitlich wird die Methode auch an der Patella und der Tibia sowie an anderen Gelenken wie Sprunggelenk, Ellenbogen, Schulter und am Femurkopf eingesetzt (116,137). Autologe Transplantate werden sowohl vom lateralen als auch medialen Kondylus, von der femoralen Notch, der Patella und den dorsalen Kondylenanteilen aus dem Kniegelenk gewonnen (38,112,137,215,292,306). Simonian (263) zeigte im Hinblick auf eventuelle Probleme im Entnahmebezirk, dass für die proximale laterale Kondyle und die mediale Wange der Notch die geringsten Anpressdruckwerte zwischen 0 und 110° Kniebeugung auftreten. Er wies jedoch gleichzeitig darauf hin, dass keine der von ihm getesteten Spenderregionen vollständig ohne Belastung gewesen wäre.

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer vollständigen Integration im Bereich der subchondralen Platte sowie der übrigen knöchernen Anteile kommt. Eine Integration der Knorpelplatte mit dem umgebenden Knorpel ließ sich jedoch nicht nachweisen (262). Vielmehr kommt es hier zu einer faserknorpeligen Narbe im Bereich der Grenzzone (113,114). Hangody (112) beobachtete im Tierexperiment vitale Transplantate mit fibro-kartilaginärer Einheilung in die Umgebung. Inkongruenzen durch unterschiedliche Krümmungsradien zwischen Entnahmebereich und Empfängerlokalisierung sowie fehlende Höhenangleichung der subchondralen Knochenschicht aufgrund unterschiedlicher Knorpeldicke führen über mechanische Belastung möglicherweise zu einer frühen Transplantatdegeneration (137).

Bobic (38) benannte als „ideale“ Indikation zur OAT einen bis auf den subchondralen Knochen durchgängigen Knorpeldefekt, der relativ klein ist (12-20mm) und häufig zusammen mit Läsionen des vorderen Kreuzbandes zu finden ist. Tiefe und großflächige Defekte hielt er für nicht geeignet. Hangody (114) nannte als Kontraindikationen neben Infekten und Tumoren die rheumatoide Arthritis und die Arthrose. Für Imhoff et al. (137) gelten folgende Indikationen:

- Fokale osteochondrale Läsionen von 1-9 cm², in der Belastungszone der Femurkondylen, retropatellar, Talusschulter
- Lokale Knorpelschäden von 1-9 cm² in der Belastungszone der Femurkondylen, retropatellar, Talusschulter
- OD-Herde Grad III und IV sowie begrenzte Osteonekrosen in der Belastungszone der Femurkondylen, retropatellar, Talusschulter
- Relativ : Chondrale und osteochondrale Läsionen (s.o.) an Schulter-, Ellenbogen- und Hüftgelenk

Die zunehmende Erfahrung mit der Methode führte zuletzt zu einer Ausweitung der Indikation auf begrenzte degenerative Knorpelschäden und arthrotische Veränderungen bei jüngeren Patienten (161).

Bei der Mosaiktechnik nach Hangody (112-116) wird zunächst eine Stabilisierung des Defektrandes, anschließend eine Abrasion bis auf vitalen subchondralen Knochen durchgeführt. Dies soll eine fibro-kartilaginäre Auffüllung zwischen den

Transplantaten gewährleisten. Im weiteren werden die mit Hohlmeißeln gewonnenen Zylinder in vorgebohrte 2,7 bis 4,5mm breite Betten versenkt, wodurch ca. 60-80% des Defektareals mit hyalinem Knorpel gedeckt wird. Hangody sieht in den multiplen kleinen Transplantaten den Vorteil, die Kongruenz des Defektareals optimal wiederherstellen zu können. Alternativ zur Mosaikplastik mit vielen kleinen Zylindern können auch einzelne oder mehrere größere Zylinder transplantiert werden (38,137,158). Verschiedene Instrumentarien stehen zur Verfügung (38,77). Entnahme- und Empfängerareal sollten von der Oberflächenwölbung möglichst identisch sein. Die Hohlmeißel für das Spendertransplantat sind minimal größer als die für die Entnahme aus der Empfängerregion, um eine „press-fit“-Implantation zu gewährleisten (77). Die „Spenderbetten“ können entweder „frei“ gelassen werden oder mit den entknorpelten Zylindern aus dem Empfängerareal bzw. mit Knochenersatzstoffen wie Hydroxyl-Appatit oder Tri-Calcium-Phosphat aufgefüllt werden. Normalerweise sollen sich die Defekte spontan innerhalb von zwölf Wochen mit Knochen und Faserknorpel füllen (38).

Osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von mehr als 20-25mm erscheinen für die OATS®-Technik oder die Mosaikplastik nur eingeschränkt geeignet. Zum einen sind die Spenderareale begrenzt, zum anderen ist bei dieser Defektgröße eine stabile press-fit-Verankerung nicht mehr gewährleistet (1). Die Gruppe von Imhoff (1,138) berichtete über den (partiellen) Transfer der posterioren Femurkondyle, den sog. Mega-OATS zur autologen Deckung solcher Defekte, z.B. bei M. Ahlbäck oder bei großem OD-Herd. Dabei wird zunächst der dorsale Abschnitt der betroffenen Kondyle mit einem Meißel osteotomiert. Daraus wird dann ein der Defektgröße entsprechendes Transplantat mit einem speziellen Instrumentarium entnommen und press-fit eingebracht. Bei Versorgung von Defekten an anderen Gelenken als dem Knie werden die Spendertransplantate i.d.R. aus dem Kniegelenk entnommen („2-Gelenk-Technik“, 20,116,137).

Osteochondrale allogene Transplantate können sowohl als Zylinder wie bei den autologen Techniken als auch passgenau dem Defekt entsprechend aus dem meist tiefgefrorenen Spendergewebe gewonnen werden. Malinin et al. (175) sahen im Langzeitverlauf nach 5 Jahren am Affen bei tiefgefrorenen Allografts degenerative Veränderungen am Knorpel bei vollständiger knöcherner Einheilung. Frische Allografts heilten nur fibrös ein, jedoch war bei 50% der Knorpel vollständig intakt. Bei experimentellen Studien an Hunden (268) konnte gezeigt werden, dass die

Immunantwort des Empfängers gegenüber tiefgefrorenen Allografts geringer ausfiel als bei frischen Allo-Transplantaten. Histokompatibilität ist zumindest für massive osteochondrale Allografts ein positiver Faktor im Hinblick auf das Langzeitergebnis (92). Sammarco (248) konnte vitale Chondrozyten über die gesamte Knorpeldicke nach 24-48-stündiger Tiefkühlung nachweisen, dagegen konnte Ohlendorf (210) nach Tiefkühlung und Auftauen von osteochondralen Transplantaten vitale Chondrozyten nur in der oberflächlichen Knorpelschicht finden. In einer Studie von Czitrom (72) betrug der Anteil von vitalen Chondrozyten nach allogener Transplantation nach 2 Jahren noch mehr als 60%, nach 6 Jahren nur noch 37%.

4.2.2.4 Autologe Chondrozytentransplantation

Einen weiteren Ansatz zur Therapie von Gelenkknorpelschäden stellt die Transplantation kultivierter Chondrozyten dar, die mit oder ohne Trägersysteme in Knorpeldefekte eingebracht werden können. Grundlage dieser Therapie ist die Möglichkeit, Chondrozyten aus der sie umgebenden Matrix enzymatisch herauszulösen (125,153). Die Arbeitsgruppe um Brittberg (42,43) entwickelte in Schweden in den 80er Jahren die sogenannte autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT). Als Indikation für dieses Verfahren gelten nach einer Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft „Autologe Chondrozyten-Transplantation ACT und Tissue Engineering“ (15):

Defekte Grad 3-4 nach Outerbridge

Defektzone 3-10 cm²

Defektlokalisation

Kniegelenk : mediale und laterale Kondyle

Trochlea, Patella

OSG : zentrale Defekte am Talus

Defekttiefe bis zur intakten subchondralen Lamelle

Patientenalter : Wachstumsabschluss bis ca. 50 Jahre

Als Grundvoraussetzungen sollten gegeben sein :

Erhaltene Knorpelschulter

Intakter Umgebungsknorpel (keine Arthrose !)
Intakte korrespondierende Gelenkfläche
Intakter Meniskus (max. 1/3 Teilresektion)
Max. 2 Läsionen
Intakte Bandführung, physiologische Beinachse
Freie Gelenkbeweglichkeit

Bei der ACT wird Knorpelgewebe aus nicht belasteten Gelenkbereichen, in der Regel arthroskopisch, entnommen. Daraus werden Chondrozyten isoliert und unter speziellen Bedingungen in der Monolayer-Zellkultur vermehrt (15). In einem zweiten operativen Eingriff wird die Zell-Suspension in den angefrischten und mit einem Periostlappen versiegelten Defekt retransplantiert. Alternativ kann eine resorbierbare Matrix (15,220,245,250,255) mit den kultivierten Zellen beladen werden, um dann implantiert zu werden. Hierdurch scheint ein besseres Handling der zu transplantierenden Zellen mit besserer lokaler Adhäsion möglich (250). Im Rahmen der Kultivierung der Chondrozyten kommt es zu einer zumindest partiell reversiblen Entdifferenzierung der Zellen. Am Ende des biologischen Regenerationsprozesses steht ein hyalin-artiges Repairgewebe, welches jedoch histologisch, biochemisch und biomechanisch nicht vollständig dem intakten Gelenkknorpel entspricht (267). Biomechanische Messungen der Knorpelsteife bei 10 Patienten zeigten 90% oder mehr der Werte des normalen hyalinen Gelenkknorpels (223). Die Messwerte waren mit 2,77 Newton für das hyaline Reparationsgewebe im Vergleich zu 3,08 N bei gesundem hyalinem Knorpel und 1,23 N bei Bindegewebe auch nach langen Zeiträumen fast normal.

4.2.5 Weitere, nicht zellgebundene experimentelle Ansätze zur Regeneration von Gelenkknorpel

Erste Ansätze einer gentechnisch induzierten Wiederherstellung von Gelenkknorpel scheinen erfolgreich. So wurde ein die Matrixsynthese stimulierender Effekt durch TGF β -1-Gentransfer in Gelenkknorpelzellen von Moeller (188) beschrieben. Gentransfer in mesenchymale Stammzellen aus Skelettmuskulatur führt zur Expression von Wachstumsfaktoren und zur chondrogenen Differenzierung (218).

Experimente zur gentherapeutisch gestützten Knorpeltherapie befinden sich derzeit im Stadium erster Tierversuche. Dabei konnte in transduzierten, heterologen Chondrozyten eine Markergenexpression bis zu acht Wochen in iatrogen gesetzten „full thickness“-Defekten, nicht jedoch in anderen Geweben gesehen werden (218). Lippiello und Mitarbeiter (164) berichteten über einen möglichen positiven Effekt auf die Knorpelregeneration durch eine elektrische Stimulation. Die vorliegenden Daten reichen jedoch nicht aus, um eine sichere Rolle dieser Verfahren auf die Regeneration von Knorpelgewebe zu definieren. Auch der Effekt einer Laserbehandlung auf die Regeneration von Gelenkknorpel ist bisher nicht ausreichend belegt (17,65,121,192). Collier et al. (65) berichteten über einen möglichen positiven Effekt einer niedrigen Energieanwendung von Ho:YAG-Laser in einem Tiermodell. Neuere Arbeiten von Morrone (192) mit Ga-Al-As-Laser konnten in vitro einen positiven Effekt auf den Zellmetabolismus von humanen Chondrozyten nachweisen. Es bestehen derzeit für die Laseranwendung keine ausreichenden Daten, um eine klinische Anwendung zu untermauern.

5. Einführung in das Tissue engineering von Knorpelgewebe

Tissue engineering stellt eine junge interdisziplinäre Aufgabe dar, in der Material- und Biowissenschaften mit der klinischen Forschung zur Entwicklung von vitalem Gewebeersatz vereinigt werden (157). Diese Entwicklung basiert auf drei Komponenten: Zellen (Matrixproduktion), Trägermaterialien (Konduktion) und Wachstumsfaktoren (Induktion). Essentiell ist dabei das Verständnis von interzellulären Mechanismen (51) über die Wirkung von Wachstumsfaktoren (282) und die Auswahl von biokompatiblen Matrixmaterialien (249). Ziel ist die Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen zur Regeneration, Reparatur und Rekonstruktion von spezifischen Geweben/Organen. Es können dadurch Gewebstransplantate hergestellt werden bei geringem bzw. fehlendem Spenderdefekt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Geweberekonstruktion ist eine Isolierung und Selektion von organotypischen Zellen aus kleinen Gewebebiopsien sowie deren *ex-vivo*-Vermehrung in Zellkulturen (15,148,157,171,198) unter optimalen Wachstumsbedingungen. Auf die Nachteile und die mögliche Morbidität der notwendigen, operativen Gewinnung der Spenderzellen wurde bereits eingegangen (s. 4.2).

Aufgrund dieser Nachteile werden Möglichkeiten untersucht, undifferenzierte Vorläuferzellen aus Zell-Banken durch geeignete Stimulationsmechanismen in die gewünschte Zelllinie zu differenzieren (34,60,90,91). Der Nachweis des spezifischen Phänotyps der Zellen bzw. ihrer Differenzierungsrichtung erfolgt durch immunzytologische und histochemische Methoden. Nach Abschluß der Zellvermehrung bzw. Einleitung der gewünschten Differenzierung erfolgt die Applikation der Zellen entweder direkt in einen Gewebsdefekt oder auf geeignete Trägermaterialien (Bio-Matrix) (294). Dabei werden sowohl biogene als auch synthetische Materialien mit verschiedenen chemischen, biologischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften eingesetzt (s.u.). Grundlegende Interaktionen zwischen den eingesetzten Zellen und den Biomatrices sind die Zelladhäsion am Material sowie die Proliferation und weitere Differenzierung der Zellen zum vitalen Gewebeprodukt (249). Die Biokonstrukte können dann entweder direkt in den Gewebedefekt implantiert oder zunächst *ex vivo* in geeigneten Kulturbedingungen, ggf. unter Gabe von Wachstumsfaktoren weiter kultiviert und/oder differenziert werden.

5.1 Verwendete Zelllinien für ein Tissue Engineering von Gelenkknorpel

Bisher steht der Transfer autologer, ex vivo vermehrter Chondrozyten (ACT) unter Verwendung verschiedener Trägerstoffe in Knorpeldefekte im Mittelpunkt des Tissue Engineering von Gelenkknorpel (siehe 4.2.2.4.). In jüngerer Zeit konnte von einigen Arbeitsgruppen jedoch gezeigt werden, dass sowohl im humanen Knochenmark als auch in Periost mesenchymale Progenitorzellen oder Stammzellen existieren, welche unter definierten Bedingungen in vitro als auch in vivo chondrogen differenzieren einschließlich einer Expression von Kollagen-II und Bildung einer knorpeltypischen Extrazellulärmatrix (60,105,148,208,228,294,307).

5.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Die ersten Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung multipotenter Stromazellen aus humanem Knochenmark stammen von Friedenstein und Mitarbeitern 1968 (90), die den Begriff der „Colony-forming units-fibroblastic“ (CFU-Fs) prägten. Bereits zu dieser Zeit konnte ein breites Spektrum an differenzierten Geweben aus diesen Zellen kultiviert werden: Knorpel, Knochen, Adipozyten, Bindegewebe und myeloproliferatives Stroma (34,90,91). In den achtziger Jahren isolierten weitere Arbeitsgruppen ähnlich potente Vorläuferzellen auch aus Knochenmark von Kaninchen, Ratten und Mäusen (131,178,227). Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell, MSC) wurde Anfang der neunziger Jahre von Caplan (60) mit der Beschreibung von ersten Vorläuferzellen eines mesenchymalen Gewebes aus dem Knochenmark erneut popularisiert. Diese Zellpopulation findet sich im Knochenmark, Periost und Muskelgewebe und unterliegt einer stetigen Erneuerung. Ihre Subpopulationen differenzieren in mesenchymale Gewebezellen wie Osteoblasten, Chondroblasten, Myoblasten, Adipoblasten, Tenoblasten, dermale Fibroblasten und Stromazellen (51,249). Die einzelnen Differenzierungsschritte werden durch extrinsische (Umgebungs-) Signale und intrinsische Wachstumsfaktoren gesteuert (47,48,129,238) sowie deren Wechselwirkung.

Eine Stammzelle wird durch die biologischen Funktionen Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung rein funktionell definiert. Nach dem deterministischen Modell bewirken exogene Signale, dass eine ruhende, undifferenzierte Stammzelle in die Mitose übergeht. Bei asymmetrischer Zellteilung

ersetzt eine Tochterzelle die Stammzelle, die andere differenziert sich in eine spezialisierte, in ihrer Funktion determinierte Progenitorzelle. Diese kann wiederum zur ausdifferenzierten Zelle proliferieren. Nach dem traditionellen Modell sind nur embryonale Stammzellen oder aber Stammzellen aus Nabelschnurblut pluripotent. Embryonale Stammzellen entstammen den frühen Vorläufern der Keimbahnzellen, sind aus dem Embryoblastomer zu gewinnen und besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung von Körperachsen und zur Bildung aller Zelltypen eines Organismus. Zellen aus Nabelschnurblut sind als intermediär stehende Stammzellen zwischen embryonalen Stammzellen und adulten Stammzellen zu bewerten. Sie besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Ausbildung vieler Zelltypen eines Organismus. Im Gegensatz dazu nahm man bisher an, dass adulte (oder somatische) Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential gewebespezifisch sind. Neuere Daten demonstrieren jedoch eine wesentlich breitere Plastizität adulter multipotenter Stammzellen mit der Möglichkeit der Transdifferenzierung (204).

Nach neueren Arbeiten (238) nehmen die Populationen an mesenchymalen Stammzellen mit zunehmendem Alter ab. Daraus kann gefolgert werden, dass besonders bei älteren Patienten die Notwendigkeit einer *ex vivo*-Expansion dieser Progenitoren besteht, um Gewebedefekte durch eine Transplantation von Zell-Gewebe-Therapeutika ausreichend zu füllen.

5.2 Einsatz von Wachstumsfaktoren und Kulturmedien zur chondrogenen Differenzierung von Vorläuferzellen

Verschiedene Wachstumsfaktoren wurden identifiziert und zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung von Stammzellen eingesetzt. „Transforming growth factor- β “ 1 und 3 (TGF- β) (22,89,148,307), „Fibroblast Growthfactor“ 2 (FGF) (Freed,Hiraki), „Insulin-like growth factor“ (IGF) (202) und „Platelet derived growth factor-BB“ (PDGF-BB) (167) scheinen zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung von Vorläuferzellen eine Rolle zu spielen. Auch Faktoren aus der Familie der „Bone morphogenetic proteins“ (BMP) können eine chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen fördern (173,259). Als Kulturmedien dienen Standardmedien, z.B. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), mit oder ohne Zusatz von Serum („FCS“ = Fetal Calf Serum). Daneben

wird die zusätzliche Applikation von L-Ascorbinsäure, Insulin und Dexamethason im Medium empfohlen (89). Zum Nachweis einer chondrogenen Differenzierung dient die Bestimmung von Kollagen II und von Extrazellulärmatrix-Bestandteilen (148,228). Die Differenzierung von Stammzellen zu Chondrozyten wird gefördert durch eine Zentrifugation der gewonnenen Progenitorzellen bei niedrigen Umdrehungen zu einem dreidimensionalen Zellaggregat, der sog. Pellet-Kultur (89). Hierdurch wird die Ausbildung von interzellulären Kontakten gefördert und die zur chondrogenen Differenzierung notwendige kritische Zelldichte und Zellzahl erreicht. Alternativ kann die Aussaat auf verschiedene dreidimensionale Trägersysteme erfolgen (69,105,106,265).

5.3. Biomatrices für ein Tissue Engineering von Gelenkknorpel

Unter Biomaterialien werden heute alle Materialien verstanden, die in Kontakt mit menschlichen Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten stehen. Dies umfasst chirurgische Implantate, dentale Materialien, Verbände, Materialien der Prothetik, sowie auch Materialien in extrakorporalen Kreisläufen und Blutbeutelssystemen (141). Die verwendeten biogenen oder synthetischen Biomaterialien haben in Abhängigkeit des zu ersetzenden Gewebes verschiedene chemische, biologische, physikalische und strukturelle Anforderungen zu erfüllen. Es ist wünschenswert, dass biogene Materialien in ihrer chemischen Zusammensetzung partiell dem Zielgewebe (Kollagen, Kalziumphosphate, Hyaluronsäure, Fibrin) entsprechen. Sie sollten resorbierbar und müssen biokompatibel sein.

Biokompatibilität wird von mehreren Autoren unterschiedlich definiert. Williams (303) z.B. definiert den Begriff als die Fähigkeit des Materials, eine angemessene Gewebsreaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen. Unter Biokompatibilität verstehen wir heute die gewünschte Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System. Diese beinhaltet sowohl die Struktur- wie auch die Oberflächenkompatibilität im Sinne einer Anpassung von Implantatstruktur und Implantatoberfläche an das Empfängergewebe.

Unter Strukturkompatibilität versteht man die Anpassung der Implantatstruktur an die mechanischen Eigenschaften des Empfängergewebes. Hierzu zählen sowohl die Formgebung als auch die innere Struktur (z. B. die Ausrichtung von Fasern in

Werkstoffen). Dagegen bezeichnet die Oberflächenkompatibilität die Anpassung der chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantates an das Empfängergewebe mit dem Ziel der gewünschten klinischen Wechselwirkung.

Williams (303) brachte 1988 in Anlehnung an Empfehlungen der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien (European Society for Biomaterials, ESB) eine erweiterte Definition des Begriffes Biomaterial. Als Biomaterial ist danach jegliche Substanz oder Kombination von Substanzen anzusehen (ausgenommen Medikamente), die synthetischen oder natürlichen Ursprungs ist und für jeden möglichen Zeitraum als Ganzes oder Teil eines Behandlungssystems irgendein Gewebe, ein Organ oder eine Körperfunktion behandelt oder ersetzt. Sonderformen stellen neu entwickelte sogenannten "bioaktive" Materialien dar. Hierfür bestehen in der Literatur keine eindeutigen Definitionen (209). Ihre Ultrastruktur sollte eine gute Adhäsion der Zelle auf ihrer Oberfläche bzw. Suspension der Zellen in Gelen erlauben (249), da durch die Interaktion der Zellen mit dem Biomaterial Differenzierungsschritte eingeleitet werden.

Synthetische Materialien wie z.B. Polyglycol-Lactat (PGLA), stehen in ausreichender Menge zur Verfügung und bergen nicht das Risiko einer Infektübertragung, initiieren jedoch häufig Entzündungsreaktionen während des Degradationsprozesses u.a. durch lokale pH-Wert-Verschiebungen. In vitro-Testverfahren mit organotypischen Zellkulturen sind deshalb als Screening-Verfahren notwendig, um die zur Auswahl stehenden Materialien hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Degradation, Zelladhäsion und ihrer biomechanischen Eigenschaften zu prüfen. An eine optimale Trägermatrix sollte die Anforderung gestellt werden, dass eine in vivo-Degradierung mit einem Ersatz durch das von den Zellen synthetisierte organotypische Gewebe einhergeht (69,249). Coutts (69) fordert speziell für die „ideale Matrix für die Knorpelrekonstruktion“ Charakteristika, welche in Tabelle 10 zusammengefasst sind:

Tab.10 : Charakteristika der „idealen Matrix“

Biodegradierbar
Gute Fixation im Defekt
Nicht toxisch
Gute Zelladhärenz
Mechanische Stabilität
Regulation der Zellexpression
Restitution des zu ersetzenden Gewebes

In der Literatur sind verschiedene, aus natürlichen oder synthetischen Biomaterialien hergestellte Matrices mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften, mit und ohne inkorporierte Wachstumsfaktoren, beschrieben (69,142): Alginat, Kollagen, Hyaluronan, Fibrin, demineralisierter Knochen, Poly-Laktid, Poly-Glykol, Carbonfasermaterial u.a..

Am besten untersucht sind dabei Kollagen und Hyaluronan (148,149,265,294) als biologische Matrices sowie Poly-Laktid (PLA) und Poly-Glykol-Derivate (PGA,PGLA) (203,234,245) als synthetische Matrices. Alle diese Materialien wurden in den zitierten Studien mit mesenchymalen Zellen zu Knorpelgewebe differenziert. Die in Frage stehenden Parameter und Mechanismen zur idealen Dauer der Degradation der Matrix, zu Gewebsreaktionen durch den Degradationsprozess, zur Art und Dauer der Inkubation von Matrix und Zellen und schließlich zur Stabilität der Konstrukte in vivo sind jedoch noch völlig ungeklärt (69,148,149,249,265).

II. Problemstellung

Die Daten zur Prävalenz und zu den sozio-ökonomischen Kosten zeigen die Relevanz, optimale Therapiekonzepte zur Behandlung von Gelenkknorpelschäden zu erarbeiten.

Die bisher publizierten Ergebnisse der aktuellen operativen Behandlungsmethoden von Knorpeldefekten sind vom klinischen Aspekt her durchaus ermutigend. Dabei scheint die Möglichkeit einer Ausweitung der Indikationen auch auf beginnende Arthrosen gegeben. Eine abschließende Beurteilung der unterschiedlichen Verfahren ist derzeit noch nicht möglich. Außer Frage steht, dass keines der aktuellen Verfahren, abgesehen von der Transplantation osteochondraler Gewebseinheiten, in der Lage ist, hyalinen Gelenkknorpel mit allen seinen physiologischen mechanischen Eigenschaften im Defektareal wiederherzustellen. Die funktionellen Defizite, die auch nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation als dem derzeit einzigen in Deutschland angewendeten Verfahren zur Deckung von Gelenkknorpeldefekten verbleiben, werden in dieser Arbeit dargestellt.

Potentieller Nachteil der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation ist das bis heute nicht geklärte Schicksal des Entnahmedefektes, für den die gleiche Inkompetenz zur Regeneration gilt wie für den Defekt in der Belastungszone. Würde sich im Langzeitverlauf zeigen, dass hier iatrogene arthrotische Veränderungen entstehen, wäre das Verfahren als kritisch einzustufen. Allografts bergen neben der unklaren Vitalität der Zellen innerhalb der Transplantate und einer nicht gesicherten Einheilung das Risiko der Infektübertragung auf den Empfänger.

Faserknorpel, als Ersatzgewebe durch Zellen aus dem subchondralen Knochen gebildet, erreicht nicht die notwendigen mechanischen Eigenschaften und damit auch nicht die Belastbarkeit und Haltbarkeit des originären hyalinen Gelenkknorpels. Die Transplantation von Periost oder Perichondrium als Gewebe mit chondrogener Potenz ermöglicht zunächst die Bildung eines vergleichsweise guten Regeneratknorpels, jedoch besteht die Tendenz zu dessen sekundärer Ossifikation und Degeneration.

Die Notwendigkeit eines Zweiteingriffes und die hohen Kosten der autologen Chondrozytentransplantation machen diese Methode zur aufwendigsten unter den derzeit angewendeten Verfahren. Die nachgewiesenen Veränderungen im umgebenden Knorpel nach Gewinnung selbst kleiner Knorpelbiopsate zur Zell-

Kultivierung sind in ihren Auswirkungen noch nicht einzuschätzen. Außerdem erreicht auch der gebildete „hyalinartige“ Knorpel nicht die gleiche mechanische Belastbarkeit wie normaler Gelenkknorpel.

Aufgrund der genannten Einschränkungen der erwähnten Verfahren und der in dieser Arbeit dargestellten funktionellen Rest-Defizite scheint heute die ex-vivo-Herstellung von Gewebstransplantaten mit hohem Regenerationspotential aus multipotenten Stammzellen unter Tissue engineering-Bedingungen eine der aussichtsreichsten Therapieoptionen zu sein. Zur Umsetzung des hohen Anspruches sind genaue Kenntnisse des Differenzierungspotentials der verschiedenen multipotenten Zellen notwendig. In der vorliegenden Arbeit wird das chondrogene Potential verschiedener humaner Stammzellen unter definierten Kulturbedingungen verglichen. Dabei wird erstmalig in der Literatur das chondrogene Potential nicht-hämatopoietischer Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut im Vergleich mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark und Periost dargestellt. Im weiteren wird ein Bio-Komposit aus einer Kollagen-Matrix und nicht-hämatopoietischen Stammzellen aus Nabelschnurblut unter chondrogenen Kulturbedingungen untersucht. Ziel ist schließlich, die Eignung dieser Zellen und der in vitro hergestellten Biokomposite für den weiteren Einsatz im Tissue engineering zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten zu bewerten.

III. Material und Methoden

3.1 Patienten und Methodik der klinischen Untersuchung

3.1.1 Patienten

Untersucht werden sollte das funktionelle Ergebnis nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation am Kniegelenk. Einschlusskriterien waren unilokulär-umschriebene sowie multilokuläre Knorpelläsionen bei Patienten nach Wachstumsabschluß, die mit autologer Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT) behandelt worden waren. Als unilokulär-umschrieben gelten Defekte nach Osteochondrosis dissecans Grad 3 und 4 und isolierte, posttraumatische Knorpeldefekte bei ansonsten intakten Gelenkflächen. Multilokulär Defekte sind solche in mehr als einem Gelenkabschnitt. Bei den sogenannten multilokulären Defekten lagen außer den operativ behandelten Knorpelläsionen Grad 3-4 weitere, geringergradige Schäden (bis Grad 2) vor, bei denen keine KKT sondern lediglich stabilisierende oder glättende endoskopische Eingriffe vorgenommen wurden. Ferner war die fließende Beherrschung der deutschen Sprache Bedingung zur Teilnahme an der Studie. Begleitende Schäden am Bandapparat und/oder den Menisken waren mit Ausnahme von randständigen Meniskusläsionen Ausschlusskriterien. Als Mindest-Nachbeobachtungszeit wurde in Übereinstimmung mit anderen publizierten Studien ein Zeitraum von zwei Jahren gewählt.

Nach den vorliegenden Operationsprotokollen erfüllten 66 Patienten, bei denen in der Zeit von 1/1998 bis 6/2000 in der Orthopädischen Klinik des Universitäts-Klinikums Düsseldorf eine Knochen-Knorpel-Transplantation (KKT) vorgenommen wurde, die Kriterien. Davon konnten 13 Patienten nicht erreicht werden. Sie waren verstorben (2) bzw. unbekannt verzogen (7) oder nicht bereit, an der Studie teilzunehmen (4). Es wurden 53 Patient(inn)en (80,3 %) in die Untersuchung aufgenommen. Alle Patienten wurden ausführlich über den Studienaufbau und die Durchführung schriftlich informiert und waren mit der Veröffentlichung der anonymisierten Daten einverstanden.

Von den 53 Patienten hatten 41 multilokuläre Knorpeldefekte (nachfolgend Gruppe 1 genannt) und 12 (nachfolgend Gruppe 2 genannt) unilokuläre Knorpeldefekte bei

oder nach einer Osteochondrosis dissecans (OD) oder eine isolierte posttraumatische Knorpelläsion.

Es wurde zusätzlich eine Kontrollgruppe aus 30 nach eigener Aussage kniegesunden Probanden gebildet.

Der mittlere Nachuntersuchungszeitraum des gesamten Patientenkollektivs lag bei 33 Monaten (24 –54 Monate).

Das Durchschnittsalter der Patienten in der Gruppe 1 betrug 45 Jahre (18 bis 68 Jahre, Standardabweichung 13,7), 24 waren männlichen (58,5%) und 17 weiblichen Geschlechts (41,5%).

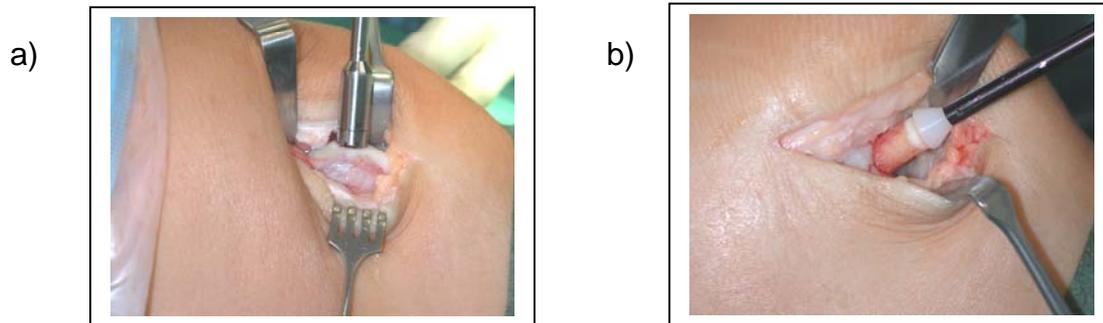
Das Durchschnittsalter der Patienten in der Gruppe 2 betrug 32 Jahre (18 bis 55 Jahre, Standardabweichung 11,2), davon waren 9 männlich (75%) und 3 weiblich (25%).

Das Durchschnittsalter der Patienten in der Kontroll-Gruppe betrug 41 Jahre (25 bis 64 Jahre, Standardabweichung 11,2), 17 waren männlich (56,6%) und 13 weiblich (43,4%).

3.1.2 Operationstechnik und Nachbehandlung

Alle Patienten wurden zu Beginn des operativen Eingriffs zunächst zur Sicherung der Diagnose arthroskopiert. Die Arthroskopie erfolgte in Oberschenkelblutsperre in einem Beinhalter. Nach Beurteilung der Knorpeldefekte wurde die Indikation zur Knorpel-Knochen-Transplantation gesichert. Es erfolgte dann eine mediane Arthrotomie mit nachfolgender Entnahme der Spender-Zylinder sowie der Zylinder aus dem Defektareal mit speziellen Hohlmeisseln (OATS[®]-Instrumentarium der Fa. Arthrex, Karlsfeld). Die im Durchmesser gegenüber dem Empfängerbett 1mm breiteren Spenderzylinder wurden in press-fit-Technik im Defektareal verankert. Die aus dem Defektareal gewonnenen Zylinder wurden entknorpelt und die Spongiosa in die Spenderdefekte replantiert und impaktiert. Anschließend erfolgte der routinemäßige Wundverschluß nach Einlage einer Drainage.

Abb. 6 a + b : autologe Knorpel-Knochen-Transplantation : Transplantatentnahme mit Hohlmeißel (OATS® -System, Fa. Arthrex, Karlsfeld) und Einsetzen in den Defekt



Bei den Patienten der Gruppe 1 wurden im Durchschnitt 2,6 Knorpel-Knochen-Zylinder transplantiert mit einer durchschnittlichen Gesamtfläche pro Patient von 1,7 cm². Bei den Patienten der Gruppe 2 wurden im Durchschnitt 2,9 Knorpel-Knochen-Zylinder transplantiert mit einer durchschnittlichen Gesamtfläche pro Patient von 1,6 cm².

Tabelle 11 : Transplantierte Zylinder und gedeckte Fläche bei der KKT

	Gruppe I (multilokulär)	Gruppe II (unilokulär)
Mittelwert Zylinder	2,6 (1-5)	2,9 (1-5)
Median Zylinder	2	3
Mittelwert Fläche (cm²)	1,7 (0,38-3,78)	1,5 (0,38-2,73)
Median Fläche (cm²)	1,57	1,57

Die Patienten erhielten postoperativ eine Thromboseprophylaxe mit einem niedermolekularen Heparin sowie eine orale Schmerzmedikation. Die krankengymnastische Nachbehandlung begann am ersten postoperativen Tag unter Teilbelastung (für insgesamt 6 Wochen) und einer Gelenk-Mobilisation mit Hilfe einer Motorbewegungsschiene.

3.1.3 Funktionelle Nachuntersuchung : WOMAC-Arthroseindex

Um den Stellenwert der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation als Therapie-Verfahren bei Gelenkknorpelschäden unter allgemein-funktionellen Gesichtspunkten

beurteilen zu können, wurden für die Nachuntersuchung ein etablierter, reliabler Patientenfragebogen, der WOMAC-Arthroseindex (26,27,270), verwendet. Die Patienten und die Personen der Kontroll-Gruppe wurden darauf hingewiesen, den Bogen auf das operierte Knie (Patienten) bzw. beide Knie (Kontroll-Gruppe) zu beziehen.

Beim WOMAC-Arthroseindex oder Score handelt es sich um einen validierten Patientenfragebogen zur Erfassung der Symptome und der physischen Funktionseinschränkungen im Alltag bei Gon- oder Coxarthrose. Der WOMAC-Score umfasst drei Teile bzw. Skalen mit insgesamt 24 Fragen: Teil A mit 5 Fragen zu Schmerz, Teil B mit 2 Fragen zur Steifigkeit sowie Teil C mit 17 Fragen zur körperlichen Belastbarkeit. Die Fragen werden im Original anhand einer ungradierten visuellen Analogskala (0-100 mm) präsentiert. Wir verwendeten die von Stucki et al. (270) etablierte deutsche Version, die mit einem Wertebereich von 0-10 arbeitet und mit einer einfachen Multiplikation der ermittelten Werte mit 10 vergleichbar der visuellen Analogskala des Original-Index ist. Für jede der drei Skalen wird ein Summenscore aus den einzelnen Fragen berechnet (Skalenscore). Dementsprechend beträgt der Wertebereich der deutschen WOMAC-Version pro Patient 0-50 für Schmerz, 0-20 für Steifigkeit und 0-170 für die Funktion, der dann durch Division mit der jeweiligen Anzahl der Fragen (5 für Schmerz, 2 für Steifigkeit und 17 für die Funktion) zu einem Mittelwert mit einem Wertebereich von 0 bis 10 führt. Diese Mittelwerte erleichtern die Interpretation im Vergleich zu den Summenscores. Außerdem ist bei Verwendung des Mittelwertes im Gegensatz zum Summenscore bei fehlender Beantwortung einer Frage nach Stucki (270) der Skalenscore nur unwesentlich beeinflusst und kann trotzdem interpretiert werden. Zur Berechnung des sogenannten Globalindex werden die o.g. Mittelwerte addiert und durch 3 entsprechend der Anzahl der Skalen dividiert.

Wortlaut des WOMAC-Arthroseindex : siehe Anhang

3.1.4 Statistische Methoden

Zur deskriptiven Analyse und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Microsoft Excel gewählt. Die statistische Analyse erfolgte mittels dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows 10.0.

3.2. Zellkulturen in Monolayer und dreidimensionalen Pellets

3.2.1. Rekrutierung von verschiedenen humanen mesenchymalen Stammzelltypen

Zur vergleichenden Untersuchung des chondrogenen Potentials verschiedener humaner Stammzelllinien wurden zunächst Knochenmarkzellen, Periostzellen und unrestringierte somatische Nabelschnurblutstammzellen (USSC) verwendet.

Die Knochenmarkzellen wurden von Knochenmarkspendern, über eine Punktion des hinteren Beckenkammes, in Vakuumtechnik gewonnen. Die Punktion erfolgte mit einer Jamshidi-Nadel. Während der Gewinnung des Knochenmarks in Vakuumtechnik wurde die Jamshidi-Nadel als auch der Spritzenkörper mit ACDA (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A) benetzt. Anschließend wurde zur Antikoagulation das Knochenmark im Verhältnis von je 10 ml Knochenmark/ 2.000 I.E. Heparin antikoagulatorisch versetzt. Alle Knochenmarkspender waren Spender ohne akute oder chronische entzündliche oder andere konsumierende Erkrankungen. Sämtliche Spender waren nicht im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie behandelt worden und sie erfüllten die Kriterien zur primären Knochenmarktransplantation nach den Richtlinien der Bundesärztekammer. Es lag eine rechtskräftige Aufklärung aller Spender im Sinne der Deklaration von Helsinki vor. Die in diesem Versuch verwandten Periost-Zellen stammen von Patienten der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Probeentnahmen fanden nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch mit rechtskräftiger Einwilligung der Patienten im Rahmen regulärer Kniegelenksoperationen statt. Sie bestanden ausschließlich aus bei der Operation reseziertem, überschüssigem Gewebs-Material und wurden stets vom selben Operateur entnommen. Um für unsere Gewebeproben die Richtlinien des Datenschutzgesetzes erfüllen zu können, wurden sie mit einem Nummerncode versehen, so dass Unbefugte keine Rückschlüsse auf unsere Donorpatienten ziehen konnten. Desweiteren untersuchten wir unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurrestblut (USSC). Die Zellen wurden uns vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. P. Wernet, Patent WO 02/36751 A2) zwischen der 7. und 11. Passage zur Verfügung gestellt. Diese CD 34 und CD 45- negativen, adhärent wachsenden Zellen wurden dort aus Nabelschnur-

Restblut gesunder Mütter mit einem Gesamtgewicht von weniger als 100 g, somit zu gering für eine Asservation in der Nabelschnurblutbank der Universität Düsseldorf, über Gradientenzentrifugation isoliert und kultiviert. Auch hierfür lagen Einverständniserklärungen der Mütter vor.

Folgende Lösungen wurden zur Gewinnung der Knochenmarkzellen verwandt:

PBS (Phosphate Buffered Saline, H15-002, PAA, Cölbe)

Lymphozyten-Separationsmedium (J015-004, PAA, Cölbe)

500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, FE15-009, PAA, Cölbe) versetzt mit folgenden Additiven: 10ml L-Glutaminsulfat 200 mM (M11-004, PAA, Cölbe),

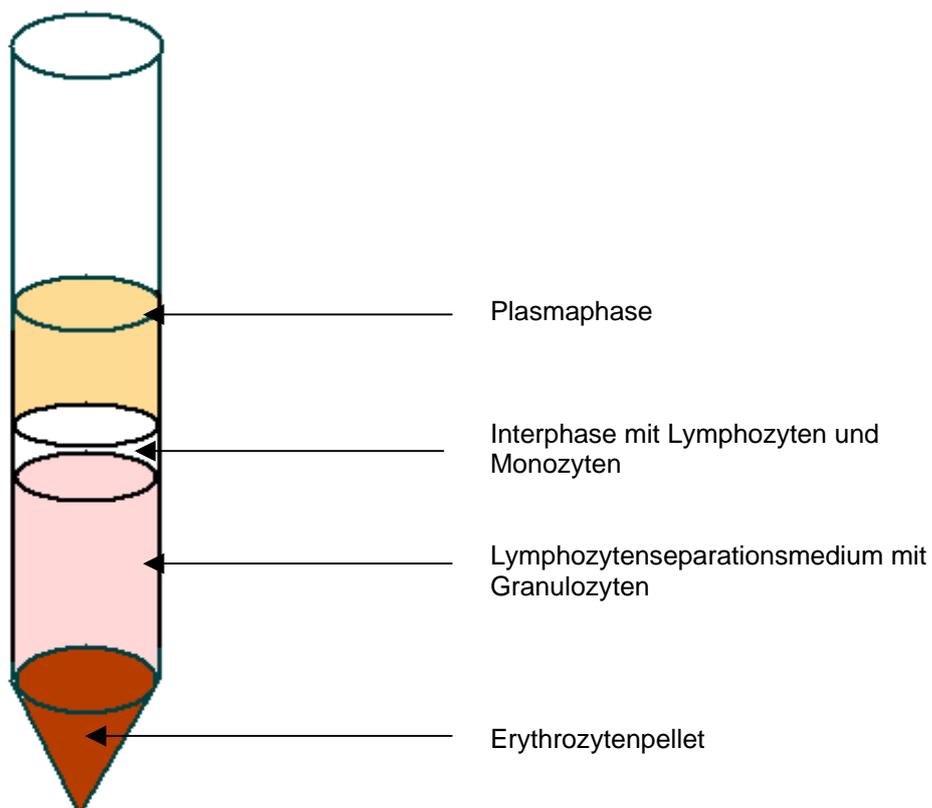
5 ml Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (P 11-002, PAA, Cölbe) und

50 ml fetales Kälberserum (FCS) (S0415, Biochrome, Berlin)

Bei der Aufarbeitung von Knochenmark erfolgte zunächst die Verdünnung der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit PBS. In einem Falcon-Röhrchen wurden 20 ml auf 4°C gekühltes Lymphozyten-Separationsmedium vorgelegt. Anschließend wurden vorsichtig 30 ml der Zellsuspension aufgeschichtet unter Vermeidung einer Vermischung der beiden Suspensionen. Danach folgte die Zentrifugation der beiden Phasen bei 20°C im Dichtegradienten für 30 Min. bei 2000 U/min. Anschließend wurde die weiße Gradientenschicht (= Buffycoat, Abb.7) abpipettiert und jeweils 20 ml dieser Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit PBS aufgefüllt. Es folgte erneut eine Zentrifugation der Zellsuspension für 20 Min. bei 2000 U/min und 20° C. Der Überstand wurde dekantiert, und es folgte die Resuspension des zellulären Pellets mit 20 ml PBS sowie die anschließende Zentrifugation für 20 min. bei 2000 U/min und 20° C. Der Überstand wurde wieder dekantiert, das Zell-Pellet wurde mit 8 ml DMEM, versetzt mit den o.g. Zusätzen, aufgenommen und in eine 25 cm³ Kulturflasche gegeben. Die Inkubation fand bei 37°C und 5 % CO₂ statt. Alle 3-4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Sobald eine ausreichend große Zellzahl vorhanden war, wurden die Primärkulturen trypsiniert. Die Kulturflaschen wurden dazu zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5% Trypsin / EDTA 0,2% für 3-5 Min. im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Ablösung der Zellen vom Boden der

Kulturflasche, wurde die Reaktion gestoppt, indem serumhaltiges DMEM hinzugegeben wurde. Eventuell noch adhärenente Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 6 Min. bei 2000 U/min und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und, wie oben beschrieben, erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit neuem Medium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt. Diese Arbeitsschritte wurden wiederholt, bis eine ausreichende Zellzahl erreicht war, um die Versuchsansätze durchführen zu können. Die Inkubation im Brutschrank fand bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration statt. Die Erneuerung des Kulturmediums erfolgte im Wechsel von 3 und 4 Tagen. Während des Kulturmediumwechsels erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellvitalität.

Abb. 7 : Anteil der verschiedenen Phasen nach Dichtegradientenzentrifugation



Folgende Lösungen wurden zur Isolierung der Periost-Zellen verwandt:

50 ml PBS (H15-002, PAA, Cölbe)

18 ml 0,25% Trypsin in PBS (L 2133, Biochrome, Berlin)

10 ml 0,5% Kollagenase in DMEM (C 9891, Sigma, Taufkirchen)

500 ml DMEM (E 15-009, DAA, Cölbe) versetzt mit folgenden Additiven:

10ml L-Glutaminsulfat 200 mM (M11-004, PAA, Cölbe),

5ml Penicilin/Streptomycin/Amphotericin (P11-002, PAA, Cölbe) und

50 ml fetales Kälberserum (S0415, Biochrome, Berlin)

Mit einem Skalpell wurde das Periost in einer sterilen Glaspetrischale in etwa 2-4 mm² große Stücke zerkleinert, und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in der Trypsin-Lösung im Brutschrank für 10 Min. bei 37°C. Im Anschluss wurde das Periost in 0,5% Kollagenase in DMEM für 120 Min. bei 37°C inkubiert. Um die Gewebestruktur möglichst vollständig aufzulösen, wurde die Periostprobe während der 120-minütigen Inkubation alle 10 Min. auf dem Vortex-Gerät für etwa 90 Sek. geschüttelt. Zum Abschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von PBS gestoppt. Anschließend wurde bei 20°C mit 2000 U/min für 6 Min. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im weiteren wurden die Zellen in gleicher Art wie die Knochenmarkzellen behandelt.

Die Zellen aus dem Nabelschnurrestblut wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Periost- und Knochenmarkzellen (DMEM mit 10% FCS, L-Glutaminsulfat und Penicillin/Streptomycin/Amphotericin) solange kultiviert, bis auch hier eine genügend große Zellzahl erreicht war, um die Versuche durchzuführen.

Bei Erreichen der notwendigen Zellzahl wurden die Zellen zunächst mit 0,5% Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, anschließend in Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 2000 U/min und 20°C für 6 Min. zentrifugiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wie bei den übrigen Zelllinien die Zellzahl bestimmt.

3.2.2 Chondrogene Stimulierung der Zellkulturen

Zur Untersuchung des chondrogenen Potentials der drei Zelllinien wurden diese als Monolayer- und als Pellet-Kulturen in einem aus der Literatur (148,228,307) adaptierten serumfreien Kulturmedium stimuliert:

Tabelle 12 : Serumfreies chondrogenes Kulturmedium, Werte für 100 ml Medium

90 ml DMEM (F0435, Biochrome, Berlin)	1 µl TGF - β - 3 (T5425, Sigma)
100 µl ITS-Premix (2001227, ICN, Eschwege)	100 µl Dexamethason (194561, ICN, Eschwege)
2 ml L – Glutaminsulfat (M11-004, PAA, Cölbe)	1 ml Antibiotic – Antimycotic – Solution (P 11-002, PAA, Cölbe)
125 µl Ascorbinsäure (194629, ICN, Eschwege)	

Für die Monolayer-Kulturen wurden Chamber Slides mit je 1×10^4 Zellen der verschiedenen Zellreihen beladen und über einen Zeitraum von maximal 3 Wochen mit Nährmedium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. In dieser Zeit wurden nach 24h, einer, zwei und drei Wochen jeweils zwei Ansätze pro Zellreihe fixiert, indem einmal mit PBS gewaschen und anschließend 0,7 ml 5% Paraformaldehyd (Merck Eurolab, Darmstadt) hinzugegeben wurde.

Die Zellen für die Pellet-Kulturen ($3,5 \times 10^5$ Zellen pro Pellet) wurden mit 1 ml des Kulturmediums zunächst in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend für 5 Min. bei 2000 U/min und 20°C zentrifugiert, um im Pellet einen dreidimensionalen Zellverband zu erhalten. Anschließend erfolgte die vorsichtige Auffüllung mit dem entsprechenden Nährmedium auf 3 ml Gesamtvolumen.

Nach je 24 Stunden, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen wurden pro Zellreihe je 2 Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die anschließende Aufarbeitung und Auswertung bei -80°C gelagert. Dazu wurde zunächst das Nährmedium dekantiert, die Pellet-Kultur mit PBS gewaschen und anschließend mit Einfriermedium (DMSO, Merck Eurolab, Darmstadt und FCS im Verhältnis 1:9) aufgenommen und in flüssigen Stickstoff gegeben. Weitere zwei Pellets pro Zellreihe wurden zeitgleich fixiert. Dazu wurde auch hier das Nährmedium dekantiert, das Pellet mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 5% Paraformaldehyd fixiert.

Zur spezifischen Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotential der unrestringierten somatischen Nabelschnurzellen wurden diese in einem weiteren Versuch vergleichend zum einen in dem bereits genannten serumfreien Medium, zum anderen in einem aus den genannten Quellen (148,228,307) adaptierten serumhaltigen Kulturmedium stimuliert:

Tabelle 13 : Serumhaltiges chondrogenes Kulturmedium, Werte für 100 ml Medium

87 ml DMEM (F0435, Biochrome, Berlin)	1 µl TGF - β - 3 (T5425, Sigma)
10 ml Fetales Kälberserum 10% (S0415, Biochrome, Berlin)	100 µl Dexamethason (194561, ICN, Eschwege)
2 ml L – Glutaminsulfat (M11-004, PAA, Cölbe)	1 ml Antibiotic – Antimycotic - Solution (P 11-002, PAA, Cölbe)
125 µl Ascorbinsäure (194629, ICN, Eschwege)	

Entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen wurden pro Medium jeweils 6 Pellets aus ca. $3,5 \times 10^5$ Zellen angesetzt, zusätzlich wurden Monolayerkulturen mit 1×10^4 Zellen als Kontrollen angesetzt. Nach 1, 2 und 3 Wochen wurden die Pellets nach den oben genannten Schritten fixiert ebenso wie die Monolayerkulturen.

3.2.3 Nachweismethoden chondrogener Differenzierung in der Zellkultur

Die fixierten Pellets wurden auf einem Kryostaten (CM3050S, Leica, Bensheim) in Schnittdicken von 3 und 6 µm geschnitten, auf einen Glasobjektträger mit Poly-L-Lysin-Beschichtung aufgenommen, luftgetrocknet und bei –80°C gelagert.

Da nach Daten anderer Arbeitsgruppen (89) eine chondrogene Differenzierung mesenchymaler Knochenmarkzellen in der Monolayerkultur mit der von uns gewählten Zellzahl nicht auftreten sollte, wurden für die vorliegende Studie in den Monolayerkulturen gezielt charakteristische chondrogene Merkmale (Kollagen II, Extrazellulär-Matrix) untersucht.

Folgende Nachweise wurden geführt:

Tab. 14 : Immunhistochemie und Färbeverfahren

Nachweismethode	Pellet	Monolayer
Kollagen I	X	0
Kollagen II	X	X
Kollagen X	X	0
CD 34 (Negativ-Nachweis)	X	0
Alcian-blau – PAS (EZM)	X	X

X = durchgeführt, 0 = nicht durchgeführt

Durchführung der Immunhistochemie :

1. Spülung mit PBS für 4 x 5 Min.
2. Immunfärbung mit optimal verdünnten monoklonalen bzw. polyklonalen Primärantikörpern bei 4°C über Nacht.
3. Anschließend Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 60 Min. bei Raumtemperatur
4. Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex für 1 h bei Raumtemperatur
5. Darstellung der AG-AK-Bindung mit einem fluoreszenzgekoppeltem Streptavidin

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBS je 2 x 5 Min. gespült. Die Antikörper wurden mit PBSTA verdünnt.

Tabelle 15 : Verwendete Substanzen für die Immunhistochemie

PBS (Tris Buffer Saline)	(Apotheke des UKD)
PBST (PBS + 0,1% Triton)	Merck Eurolab, Darmstadt
PBSTA (PBST + 2% Rinderalbumin Fraktion V)	Serva, Heidelberg
Kollagen I (Monoklonaler-AK MAB 3391)	Chemicon, Hofheim
Kollagen II (Monoklonaler-AK MAB 8887)	Chemicon, Hofheim
Kollagen X (Polyklonaler-AK 234196)	Calbiochem, Schwalbach
CD 34 (Monoklonaler-AK M 0824)	Dako, Hamburg
Anti-Maus-IgG biotinyliert	Vector, Burlingame, USA
Avidin-Biotin-Komplex	Vector, Burlingame, USA
Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugiert	MoBiTec, Göttingen
Streptavidin Alexa Fluor 594 konjugiert	MoBiTec, Göttingen

Für jede immunhistochemische Färbung wurden Negativ-Kontrollen nach dem oben genannten Schema, jedoch ohne den spezifischen Primärantikörper, durchgeführt.

Alzian-blau/PAS-Reaktion

Die PAS-Reaktion wurde mit einer Alzian-blau-Färbung zum Nachweis der Bildung von extrazellulärer Matrix kombiniert. Hierzu wurden die Schnitte und Monolayer für 5 Min. mit 1 % wässrigem Alzian-blau (Merck, Eurolab Darmstadt) gefärbt. Anschließend folgte die PAS-Reaktion nach Standardprotokoll (PAS-Färbekit, Merck Eurolab, Darmstadt).

Die Auswertung der Pellet-Schnitte und Monolayer erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop der Fa. Zeiss, Jena). Die übrigen Färbungen wurden lichtmikroskopisch (Axioskop der Fa. Zeiss, Jena). ausgewertet.

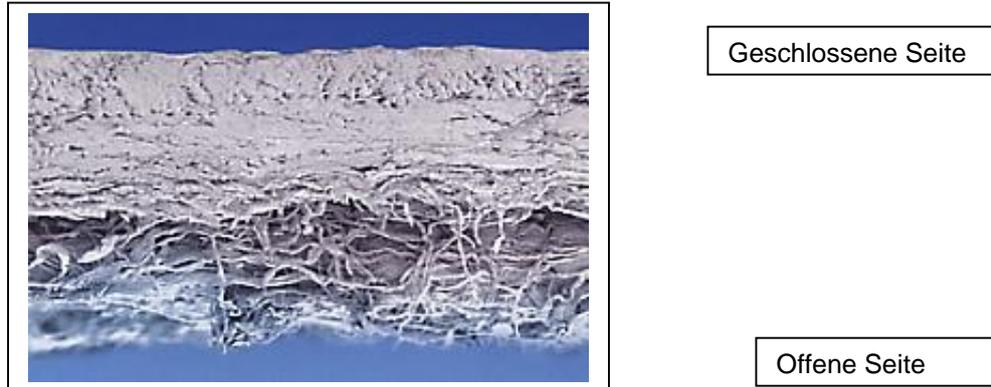
3.3. Zellkulturen auf Biomaterial

Zur Überprüfung eines möglichen Einsatzes der unrestringierten Nabelschnurstammzellen zur Knorpeldefektbehandlung in einem Bio-Komposit wurden diese in einer Biomatrix, die bereits in klinischem Einsatz im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation ist, in einem chondrogen stimulierenden sowie einem Kontroll-Medium kultiviert. Zur Kontrolle dienten parallel erneut Monolayer-Kulturen.

3.3.1 Charakterisierung der Matrix

Chondrozytäre Zellen benötigen zur optimalen phänotypischen Ausbildung und zur Bildung knorpeltypischer Substanzen ein dreidimensionales Wachstumssystem. Als eine solche dreidimensionale Biomatrix wurde in diesem Versuch ein Kollagen-Flies (Chondro-Gide®, Fa. Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) eingesetzt, welches seit mehreren Jahren in der Klinik als Matrix für die autologe Chondrozytentransplantation eingesetzt wird (Codon AG, Berlin, Verigen GmbH Leverkusen). Die Kollagenmembran besteht aus Kollagen Typ I/III porcinen Ursprungs, die in einem von der Herstellerfirma geschützten und daher nicht näher spezifizierten Verfahren gewonnen wurde. Durch spezielle Reinigungsverfahren wurden Fett- und Proteinreste sowie die für eventuelle allergische Reaktionen verantwortlichen Telopeptide, vollständig entfernt. Das Herstellungsverfahren führt zu einer Bilayer-Struktur, deren fibröse Schicht das Anwachsen der Zellen erleichtert. Die umseitige kompakte, zellokklusive Schicht verhindert das Einwachsen von Gewebe und erfüllt so eine Barrierefunktion für zelluläre, jedoch nicht flüssige Bestandteile, wie zum Beispiel Kulturmedium. Durch den hohen Gehalt an elastischen Fasern schrumpft die Kollagenmembran auch im feuchten Zustand nicht und weist eine hohe Stabilität auf. Im menschlichen Körper wird die Kollagenmembran laut Herstellerangaben nach etwa 6 Monaten vollständig resorbiert.

Abb.8 : Chondro-Gide® - Membran



3.3.2 Matrix-Kultur unrestringierter Nabelschnurstammzellen

Nachdem für den kompletten Versuchsansatz genügend Zellen nach den unter 3.2.1. genannten Kulturbedingungen angezchtet worden waren, wurden die Zellen aus ihren Kulturflaschen herausgelöst. Dies erfolgte mit den gleichen Lösungen und nach dem gleichen Schema, wie unter 3.2.1 beschrieben. Nach dem 2. Zentrifugationsdurchgang wurde die Anzahl der sich in den einzelnen Zentrifugenröhrchen befindlichen Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um den Auszählfehler mit der Neubauer-Zählkammer möglichst gering zu halten, wurde jede einzelne Zellsuspension in den verschiedenen Röhrchen doppelt ausgezählt und mit dem arithmetischen Mittelwert der beiden Ergebnisse weitergerechnet.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen aufgrund der praktischeren Handhabung im weiteren Verlauf des Versuches in kleinere, 15ml fassende Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurden die Suspensionen so verteilt, dass sich entsprechend der späteren Beladung der Kollagenmatrix jeweils die gleiche Anzahl an Zellen in den einzelnen Röhrchen befand. Da sich in Vorversuchen eine Mediummenge von 40-50µl und eine Zellzahl von ca. 6×10^5 Zellen als optimal zur Beladung der von uns gewählten Matrixfläche von 5x5 mm herausgestellt hat, wurden die Zellen nach erneutem Zentrifugieren über 6 Min. bei 2000 U/min und 20°C in einer entsprechend kleinen Menge des normalen Nährmediums resuspendiert.

Die Beladung der Kollagenmatrix erfolgte in 24-Well-Platten (Fa. Nunc). Hierzu wurden zunächst unter sterilen Bedingungen 5x5 mm große Stücke der Membran

zugeschnitten und in die Vertiefungen der Well-Platten gelegt. Es wurde nun mittels einer Pipette jeweils die poröse Oberfläche der Membranstücke mit 45µl der vorbereiteten Zellsuspension beladen. Anschließend konnten die Zellen 20 Minuten lang im Inkubator an den Kollagenmatrizes anhaften, bevor die Vertiefungen der Well-Platten mit 1ml chondrogenem bzw. Kontroll-Medium aufgefüllt wurden.

Die Kultivierung erfolgte in dem unter 3.2.2 beschriebenen Versuchsteil definierten chondrogenen Medium (für ca. 100 ml Medium):

90 ml DMEM-Kulturmedium	PAA, Cölbe
2 ml L-Glutaminsulfat 200 mM	M11-004, PAA, Cölbe
125µl Ascorbinsäure	194629, ICN, Eschwege
100µl Dexamethason	194561, ICN, Eschwege
1ml Penicillin/Streptomycin/Amphotericin	P11-002, PAA, Cölbe
10ml fetales Kälberserum	S0415, Biochrome, Berlin
1µl TGF – β – 3	T5425, Sigma

Als Kontrollmedium wurde das unter 3.2.1. beschriebene nicht chondrogen stimulierende Kulturmedium, welches vor Versuchsbeginn zur Zellvermehrung diente, eingesetzt.

DMEM-Kulturmedium	F0435, Biochrome, Berlin
L-Glutaminsulfat 200 mM	M11-004, PAA, Cölbe
Fetales Kälberserum 10%	S0415, Biochrome, Berlin
Penicillin/Streptomycin (1ml/100ml Gesamtmedium)	P11-002, PAA, Cölbe

Es wurden folgende Ansätze durchgeführt:

Tabelle 16 : Kulturdauer und Medium

Kultur-dauer	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz K
7 Tage	Chondrogen	Chondrogen	Chondrogen	Kontrolle
14Tage	Chondrogen	Chondrogen	Chondrogen	Kontrolle
21 Tage	Chondrogen	Chondrogen	Chondrogen	Kontrolle

Zusätzlich wurden als Kontrolle der chondrogenen Stimulation durch das Medium Monolayer-Kulturen mit je 10^4 Zellen in Objektträger-Kultursystemen mit 4 Kammern, sogenannten Chamber-Slides, angesetzt. Zu diesem Zweck wurde das wie oben vorbereitete Zentrifugenröhrchen mit den dafür vorgesehenen Zellen für 6 Minuten mit 2000 U/min bei 30°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge chondrogenem Medium resuspendiert, so dass jede einzelne Kammer der Chamber-Slides mit 0,7 ml zellhaltigem Medium aufgefüllt werden konnte. Um einen größeren Verlust der Zellen durch die einzelnen Arbeitsschritte ausschließen zu können, wurde vor der Verteilung des Mediums auf die einzelnen Kammern erneut mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Entsprechend der oben gewählten Kulturzeiträume wurden folgende Ansätze durchgeführt :

Tabelle 17 : Monolayer-Kulturen

Kultivierungsdauer	Ansatz
7 Tage	4 Kammern mit je 10^4 Zellen
14 Tage	4 Kammern mit je 10^4 Zellen
21 Tage	4 Kammern mit je 10^4 Zellen

Sowohl die Monolayer-Kulturen als auch die Matrix-Ansätze wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und die jeweiligen Nährmedien alle 3-4 Tage gewechselt. Um eine Aussage über die optimale Kultivierungsdauer machen zu können, wurden die Ansätze nach 7, 14 und 21 Tagen fixiert. Dies erfolgte nach einem einmaligen, vorsichtigen Waschen mit PBS mit 5% Paraformaldehyd (Merck Eurolab, Darmstadt). Anschließend wurden die Monolayer-Kulturen, bzw. die Kollagenmembranen im 5% Paraformaldehyd bis zur weiteren Auswertung im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt.

3.3.3 Nachweismethoden chondrogener Differenzierung von humanen unrestringierten somatischen Nabelschnurstammzellen in Matrix-Kulturen

Von den mit Zellen bewachsenen Kollagenmembranen wurden nach ihrer Fixierung mit Hilfe eines Kryostaten (CM 3050 S, Leica, Bensheim) jeweils 15 Schnitte mit einer Dicke von 10µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und im Tiefkühler bei -80°C gelagert, bevor sie mit folgenden Nachweismethoden untersucht wurden: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen I, II und X, COMP, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Alcian-blau/PAS-Färbung. Für die Monolayer-Kulturen erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Kollagen II, COMP und VEGF.

Verwendete Substanzen für die Immunhistochemie :

PBS (Tris Buffer Saline)	(Apotheke des UKD)
PBST (PBS + 0,1% Triton)	Merck Eurolab, Darmstadt
PBSTA (PBST + 2% Rinderalbumin Fraktion V)	Serva, Heidelberg
Kollagen I (Monoklonaler-AK MAB 3391)	Chemicon, Hofheim
Kollagen II (Monoklonaler-AK MAB 8887)	Chemicon, Hofheim
Kollagen X (Polyklonaler-AK 234196)	Calbiochem, Schwalbach
COMP (Monoklonaler-AK Ratte)	Serotec, Oxford, GB
VEGF (Polyklonaler AK, Kanninchen)	Zymed, San Fransisco, USA
Anti-Maus-IgG biotinyliert	Vector, Burlingame, USA
Avidin-Biotin-Komplex	Vector, Burlingame, USA
Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugiert	MoBiTec, Göttingen
Streptavidin Alexa Fluor 594 konjugiert	MoBiTec, Göttingen

Durchführung der Immunhistochemie

1. Spülung in PBS für 30 Min.
2. Immunfärbung mit optimal verdünnten mono- bzw. polyklonalen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C
3. 3 x 2 min. Spülung mit PBST

4. Inkubation mit einem biotinylierten Maus-, Kaninchen- bzw. Ratten-Sekundärantikörper für 60 Min. bei Raumtemperatur
5. 3 x 2 min. Spülung mit PBST
6. Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex für 60 Min. bei Raumtemperatur
7. 3 x 2 min. Spülung mit PBST
8. Darstellung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit einem fluoreszenzgekoppelten Streptavidin

Bei sämtlichen Markern wurde eine Negativkontrolle ohne den Primärantikörper durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte wie unter 3.2.3 am Axioskop, Fa. Zeiss (Jena).

IV. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der klinischen Studie :

Subjektiver Funktionsscore (WOMAC) nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation

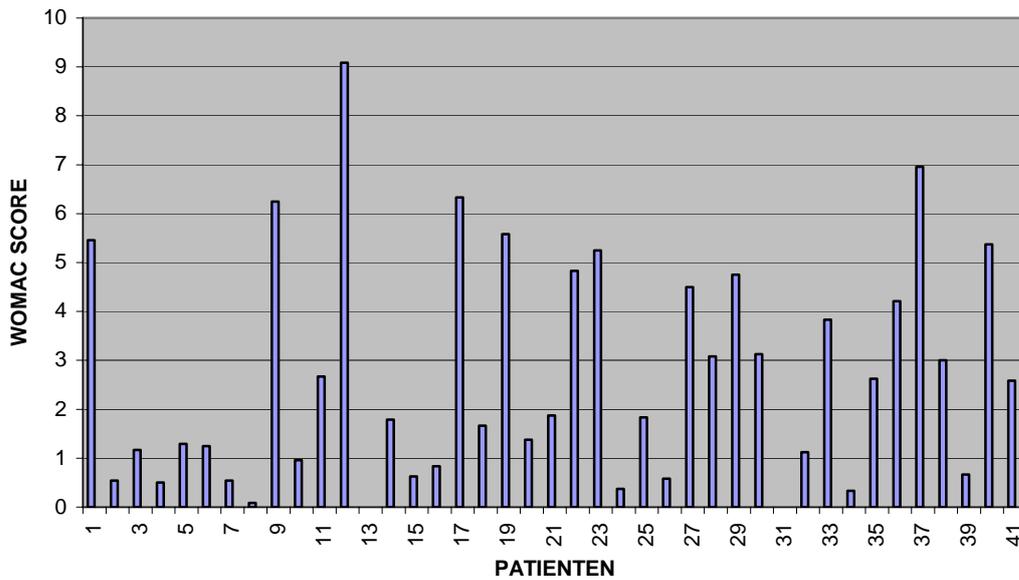
Alle 53 in die Studie aufgenommenen Patienten sowie die 30 Personen der Kontroll-gruppe füllten den Fragebogen des WOMAC-Score formal korrekt aus. Der Abschnitt zur körperlichen Tätigkeit wurde von uns in der tabellarischen Darstellung als Funktion bezeichnet.

4.1.1 Gruppe 1 : Multilokuläre Knorpeldefekte

Die Patienten der Gruppe 1 erzielten in Bezug auf den Globalscore aus allen 24 Fragen der drei Bereiche des WOMAC-Score im Mittel einen Wert von 2,65 (Standardabweichung 2,89). Zwei von 41 Patienten (4,9%) gaben bei allen Fragen „keine Schwierigkeit“ an entsprechend einem Score-Wert von null (Patienten 13 und 31). Dagegen hatten 12 von 41 Patienten (29,3 %) bei einem durchschnittlichen Score von > 4 auch 2 Jahre nach der Operation subjektiv deutliche Beschwerden („extreme Schwierigkeiten“ = Score-Wert 10). Abbildung 8 zeigt die breite Varianz innerhalb der Gruppe.

Im Bereich Schmerz betrug der Score-Wert im Mittel 2,46, im Bereich Steifigkeit 3,38 und im Bereich körperliche Tätigkeit / Funktion 2,63. Die Einzel-Daten der Patienten sind der Tabelle der Anlage zu entnehmen. Die Ergebnisse zeigen, dass nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation bei multilokulärer Knorpelschädigung am Knie entsprechend der in dieser Arbeit verwendeten Kriterien mindestens 2 Jahre postoperativ nur bei einem sehr geringen Anteil der Patienten eine normale subjektive Belastbarkeit sowohl im Hinblick auf Schmerzen wie auch die Funktion des betroffenen Kniegelenkes wiederhergestellt werden kann.

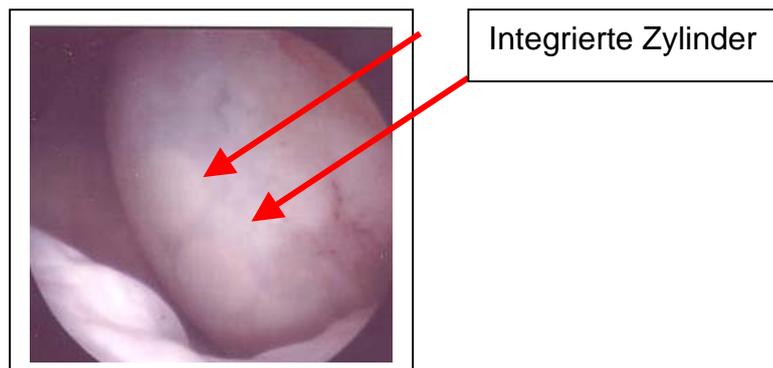
Abb. 8 : Globalscore der Patienten der Gruppe 1



Patienten 13 und 31 : Score-Wert Null

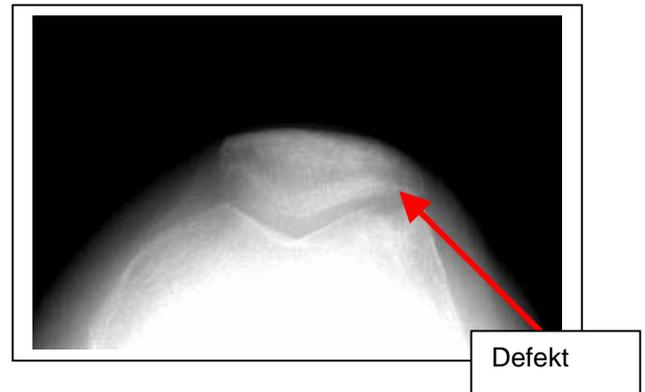
Abbildung 9 zeigt das arthroskopische Bild eines Patienten der Gruppe 1 sechs Monate nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation. Die Zylinder sind makroskopisch gut in eine faserknorpelige Umgebung integriert. Gutes subjektives Ergebnis (Globalscore 0,5). MW = Mittelwert

Abb. 9



Die Abbildungen 10 a+b zeigen 4 Monate (Abb. 10a, arthroskopisches Bild) bzw. 2 Jahre postoperativ (Abb. 10b, tangentielle Röntgenaufnahme des Femoro-Patellargelenkes) den persistierenden Entnahmedefekt an der lateralen Femurkondyle. Hier lag ein schlechtes subjektives Ergebnis vor (Globalscore 4,5). Es bestanden sowohl persistierende Beschwerden im Bereich der behandelten femoralen (medialen) Belastungszone als auch im Entnahmebereich an der lateralen proximalen Femurkondyle.

Abb. 10 a+b

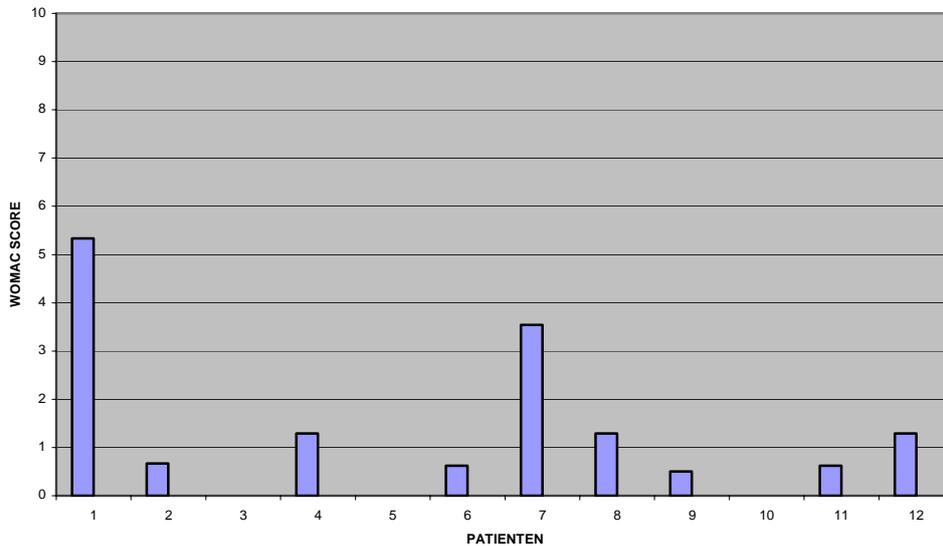


4.1.2 Gruppe 2 : Unilokuläre Knorpeldefekte

Die Patienten der Gruppe 2 erzielten in Bezug auf den Globalscore aller 24 Fragen im Mittel einen Wert von 1,26. (Standardabweichung 2,04). Drei Patienten (25%) gaben bei allen Fragen „keine Schwierigkeit“ an (Score-Wert = 0), 2 Patienten (16,7%) hatten jedoch noch einen Score-Wert über 3.

Abbildung 11 zeigt die Gesamtwerte innerhalb der Gruppe.

Abb. 11 : Globalscore der Patienten der Gruppe 2



Patienten 3, 5 und 10 : Score-Wert Null

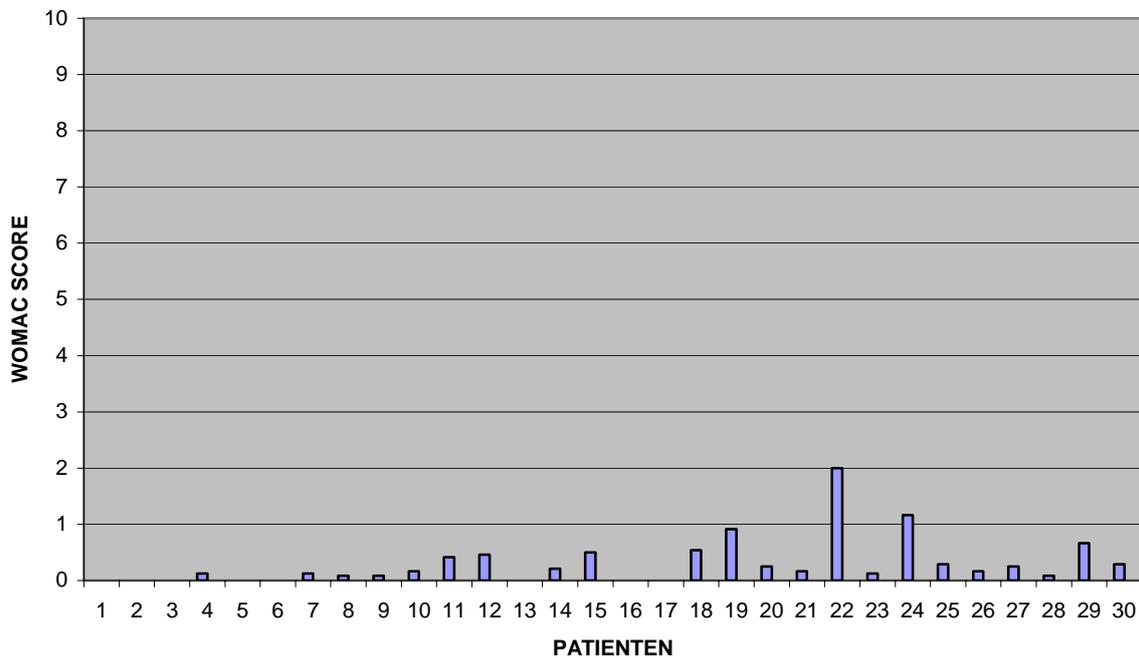
Im Bereich Schmerz betrug der Score-Wert im Mittel 2,05, im Bereich Steifigkeit 1,5 und im Bereich Funktion / körperliche Tätigkeit 1,0. Anders als in der Gruppe 1 standen bei den Patienten der Gruppe 2 Schmerzen gegenüber einer Funktionseinschränkung im Vordergrund. Jedoch konnte auch in der Gruppe 2 nur in 25% ein subjektiver Normalzustand („keine Schwierigkeit“) erzielt werden. Die Einzel-Daten der Patienten sind der Tabelle im Anhang zu entnehmen.

4.1.3 Kontroll-Gruppe

Die Personen der Kontroll-Gruppe erzielten in Bezug auf den Globalscore im Mittel einen Wert von 0,3 (Standardabweichung 0,67). 10 Patienten (33,3%) gaben bei allen Fragen „keine Schwierigkeit“ an (Score-Wert = 0), 2 Patienten (6%) jedoch hatten trotz der bei Aufnahme in die Kontrollgruppe bestätigten subjektiv normalen Kniefunktion einen Globalscore von über 1.

Abbildung 12 zeigt die Gesamtwerte innerhalb der Gruppe.

Abb. 12 : Globalscore der Probanden der Kontrollgruppe



Patienten 1,2,3,5,6,13,16,17 : Score-Wert Null

Im Bereich Schmerz betrug der Score-Wert im Mittel 0,35, im Bereich Steifigkeit 0,2 und im Bereich Funktion / körperliche Tätigkeit 0,3. Die Einzel-Daten der Patienten sind der Tabelle der Anlage zu entnehmen.

4.1.4 Vergleich der 3 Gruppen

Die Werte in beiden Patientengruppen unterschieden sich in allen Bereichen signifikant von denen der Kontrollgruppe mit der Ausnahme, dass der Vergleich zwischen der Gruppe 2 (unilokuläre Defekte) und der Kontrollgruppe im Bereich „Steifigkeit“ zwar einen Trend zeigte, jedoch mit 0,08 nicht das geforderte Signifikanzniveau von 0,05 erreichte.

Die Tabellen 18 und 19 zeigen die entsprechenden Werte (ab der 2.Dezimalstelle gerundet) sowie die Signifikanz.

Tabelle 18 : Vergleich der Gruppe 1 mit der Kontroll-Gruppe

	Gruppe 1	Kontrollgruppe	p-Wert	Signifikanz
Schmerz	2,46	0,35	< 0,001	Ja
Steifigkeit	3,38	0,2	0,01	Ja
Funktion	2,63	0,3	< 0,001	Ja

Tabelle 19 : Vergleich der Gruppe 2 mit der Kontroll-Gruppe

	Gruppe 2	Kontrollgruppe	p-Wert	Signifikanz
Schmerz	2,05	0,35	0,035	Ja
Steifigkeit	1,5	0,2	0,08	Nein
Funktion	1,0	0,3	0,031	Ja

Der Vergleich der beiden Patientengruppen untereinander zeigt, dass lediglich im Bereich „körperliche Tätigkeit“ (Funktion) ein signifikanter Unterschied besteht im Sinne niedrigerer Werte und somit besserer Funktion in der Gruppe 2, nicht jedoch in Bezug auf „Schmerz“ und „Steifigkeit“.

Tabelle 20 : Vergleich der Gruppe 1 mit der Gruppe 2

	Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert	Signifikanz
Schmerz	2,46	2,05	0,53	Nein
Steifigkeit	3,38	1,5	0,08	Nein
Funktion	2,63	1,0	0,031	Ja

Zur besseren Erfassung von funktionellen Einschränkungen, die sich typischerweise auf eine Einschränkung im Kniegelenk zurückführen lassen, wurden aus dem Bereich „körperliche Tätigkeit“ 5 Fragen zu bestimmten Aktivitäten nochmals getrennt analysiert : Treppen hinuntersteigen, Treppen hinaufsteigen, Aufstehen vom Sitzen, Stehen und Gehen auf ebenem Boden (Tabelle 21).

Tabelle 21 : Kniebelastende Aktivitäten, Signifikanz der Score-Differenzen
(KG = Kontrollgruppe)

	Gr.1 vs. KG	Gr.2 vs. KG	Gr.1 vs. Gr.2
Treppe hinunter	< 0,001	0,043	0,052 (n.s.)
Treppe hinauf	< 0,001	0,068 (n.s.)	0,221 (n.s.)
Aufstehen	< 0,001	0,251 (n.s.)	0,202 (n.s.)
Stehen	< 0,001	0,020	0,510 (n.s.)
Gehen a. ebenem B.	< 0,001	0,024	0,557 (n.s.)

Patienten mit behandeltem multilokulären Knorpelschaden unterscheiden sich demnach auch in Bezug auf die knieelenksbelastenden Funktionen in allen untersuchten Tätigkeiten signifikant von der Kontroll-Gruppe, während zwischen Patienten mit unilokulärem Defekt und der Kontroll-Gruppe lediglich signifikante Unterschiede bestehen beim Treppabsteigen, Stehen und gehen auf ebenem Boden. Anders als bei der Betrachtung des Gesamtscore unterscheiden sich die beiden Patientengruppen in dieser Detailanalyse nicht signifikant voneinander.

4.2 Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen

4.2.1 Chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark, Periost und unrestringierten somatischen Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC) in serumfreiem Medium

4.2.1.1. Knochenmarkszellen

In der Versuchsreihe wurden Zellen aus Knochenmarkspunktaten von vier erwachsenen Spendern unter 40 Jahren verwendet. Rechtsgültige Aufklärungen lagen vor.

In der Alzian-blau/PAS-Färbung war bereits nach 24h der Nachweis einer extrazellulären Matrixbildung sowohl in der Pellet- als auch der Monolayer-Kultur innerhalb der chamber slides möglich. Aufgrund starker mechanischer Schädigung (Fragmentation) und konsekutiver Überlagerung waren die Pellets am 7. und 14.Tag der Kultur nicht sicher zu beurteilen. Die Monolayer-Kulturen zu diesen Zeitpunkten waren jeweils positiv, am 14.Tag war eine beginnende Kolonie- oder Clusterbildung zu beobachten. Nach 21 Tagen waren sowohl die Pellet- wie auch die Monolayer-Kultur gut beurteilbar und positiv.

Abb. 13 a+b: Pellet-Kulturen nach chondrogener Differenzierung von Knochenmarkstammzellen, Alzian-blau/PAS-Färbung;

a = 24 h Kulturdauer (400 fach)

b = 21 Tage Kulturdauer (100 fach)

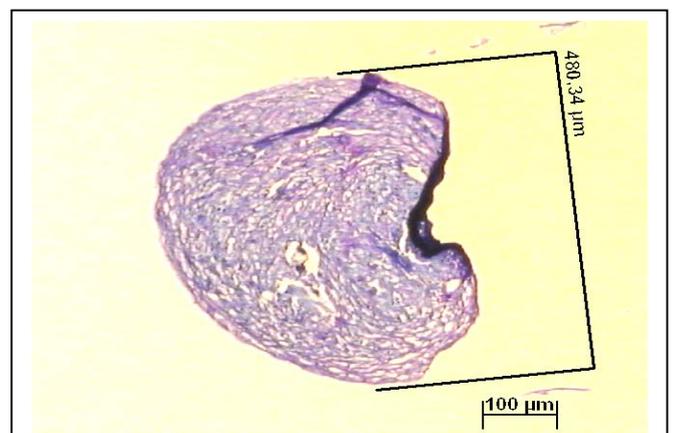
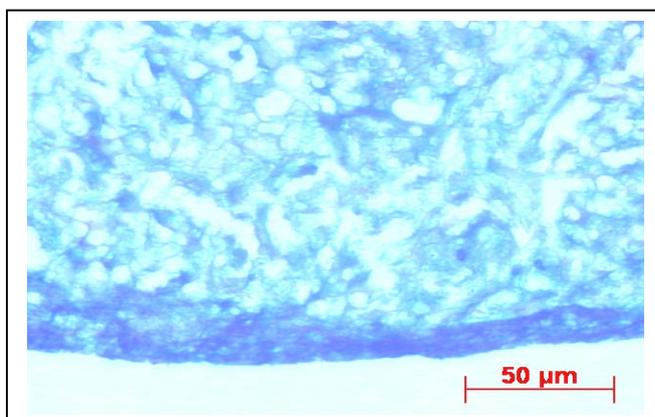
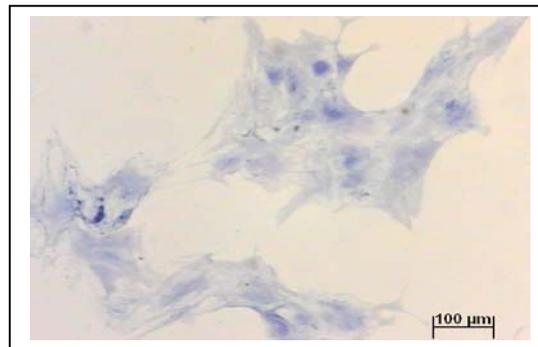


Abb. 14: Monolayer-Kultur von chondrogen differenzierten Knochenmarkstammzellen, Alzian-blau/PAS-Färbung; Kulturdauer 14 Tage; beginnende Koloniebildung



Zur semiquantitativen Bewertung der immunhistochemischen Färbungen für Kollagen I, II und X sowie CD 34 diente das folgende Schema :

- = negativ	(+) = schwach positiv	+ = positiv	++ = stark positiv
-------------	-----------------------	-------------	--------------------

Kollagen I war lediglich in den Monolayer-Kulturen des 7. und des 21. Tages nachweisbar, nicht aber in den Kulturen am 14.Tag. In den Pellets war Kollagen I zu keinem Zeitpunkt nachweisbar.

Kollagen II war nach 7 Tagen im Monolayer, nach 14 auch in der Pelletkultur nachweisbar. In Verlauf der Monolayer-Kulturen konnte auch bei der Kollagen II-Färbung eine Zunahme der Zelldichte beobachtet werden.

Kollagen X, für das nur in der Pellet-Kultur eine Färbung durchgeführt wurde, war bereits nach 7 Tagen nachweisbar und blieb im Verlauf positiv.

CD 34 war in keinem der Kultur-Ansätze positiv.

Tabelle 22 : Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung nach chondrogener Stimulation von Knochenmarkstammzellen; n.u. = nicht untersucht

Nachweis	7 Tage		14 Tage		21 Tage	
	Pellet	Mono	Pellet	Mono	Pellet	Mono
Kollagen I	-	+	-	-	-	(+)
Kollagen II	-	+	+	+	+	+
Kollagen X	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.
CD 34	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.

Abb. 15: Monolayer-Kultur von chondrogen differenzierten Knochenmarkstammzellen, immunhistochemische Färbung für Kollagen II; Kulturdauer 7 Tage

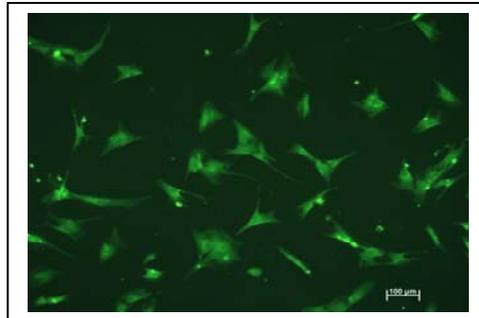
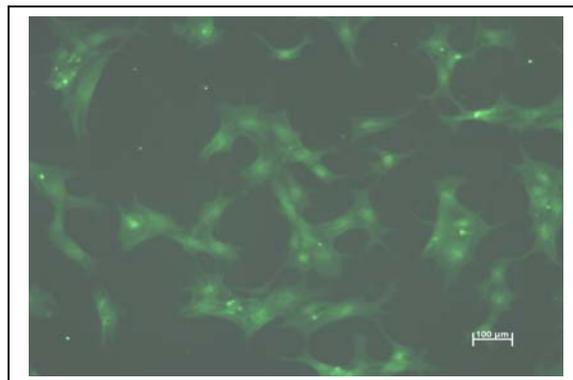


Abb.16: Monolayer-Kultur von chondrogen differenzierten Knochenmarkstammzellen, immunhistochemische Färbung für Kollagen II; Kulturdauer 21 Tage



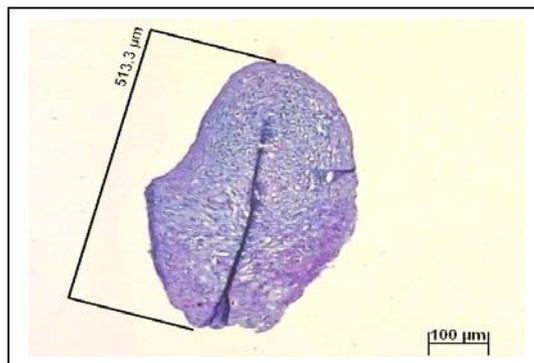
Die Ergebnisse zeigen, dass unter den angewendeten Kulturbedingungen eine Synthese von knorpeltypischer Extrazellulärmatrix, insbesondere von Kollagen II sowie dem für hypertrophe Chondrozyten typischen Kollagen X stattfindet.

4.2.1.2 Periostzellen

In der Versuchsreihe wurden Zellen aus Periostgewebe von drei erwachsenen Spendern zwischen 32 und 65 Jahren verwendet. Rechtskräftige Aufklärungen lagen vor.

In der Alzian-blau/PAS-Färbung war bereits nach 24h der Nachweis einer extrazellulären Matrixbildung sowohl in der Pellet- als auch in der Monolayer-Kultur möglich. Auch zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten nach 7, 14 und 21 Tagen waren jeweils beide Kulturen positiv.

Abb. 17: Pellet-Kultur von chondrogen differenzierten Periostzellen, Alzian-blau/PAS-Färbung; Kulturdauer 7 Tage, Artefakt durch Faltung



Kollagen I war nach 7 Tagen lediglich in der Monolayer-Kultur schwach nachweisbar, nicht aber in der Pellet-Kultur. Die für Kollagen I gefärbten Pellets des 14. und 21. Tages waren aufgrund starker Artefaktbildung nicht ausreichend beurteilbar. Jedoch waren zu diesen Zeitpunkten die Monolayerpräparate positiv.

Kollagen II war nach 7, 14 und 21 Tagen jeweils sowohl im Monolayer als auch in der Pellet-Kultur positiv.

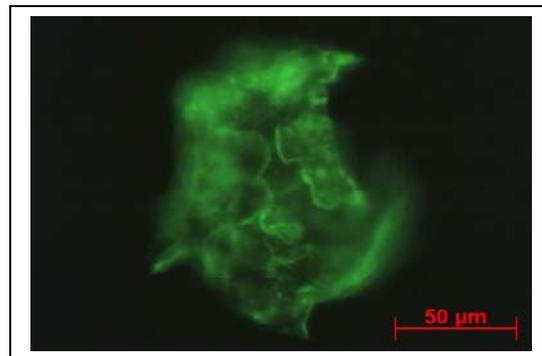
Kollagen X, wofür nur in der Pellet-Kultur eine Färbung durchgeführt wurde, war nach 7 und 14 Tagen, nicht jedoch in der Kultur nach 21 Tagen nachweisbar. Die Zellen stammten in diesem Fall von einem anderen Spender als die Zellen der Kulturen mit kürzerer Laufzeit, was möglicherweise einen Einfluß hatte, da ein aufgrund der großen Anfälligkeit von Periostgewebe im Rahem der Präparation (110) iatrogen bedingte Unterschiede der Zellqualität nicht auszuschliessen sind.

CD 34 war in keinem der Kultur-Ansätze positiv.

Tabelle 23: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung nach chondrogener Stimulation von Periostzellen; n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht beurteilbar

Nachweis	7 Tage		14 Tage		21 Tage	
	Pellet	Mono	Pellet	Mono	Pellet	Mono
Kollagen I	-	(+)	n.b.	+	n.b.	+
Kollagen II	+	+	+	+	+	+
Kollagen X	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.
CD 34	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.

Abb. 18: Pellet-Kultur von chondrogen differenzierten Periostzellen, immunhistochemische Färbung für Kollagen II; Kulturdauer 7 Tage



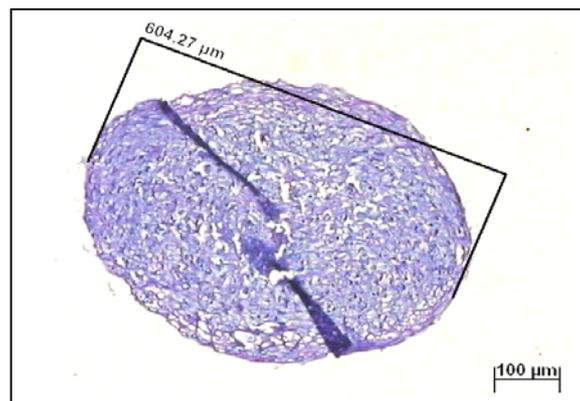
Die Ergebnisse zeigen auch für Periostzellen, dass unter den geschilderten Kulturbedingungen eine Synthese knorpeltypischer Matrixbestandteile vergleichbar den Knochenmarkstammzellen stattfindet.

4.2.1.3 Unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC)

Die Zellen für die Versuche wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf, Direktor Prof. Dr. Wernet, zur Verfügung gestellt.

In der Alzian-blau/PAS-Färbung war bereits nach 24h der Nachweis einer extrazellulären Matrixbildung sowohl in Pellet- als auch der Monolayer-Kultur möglich. Auch zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten waren jeweils beide Kulturen positiv.

Abb. 19: Pelletkultur von chondrogen differenzierten USSC, Kulturdauer 7 Tage, Alzian-blau/PAS-Färbung



Kollagen I war nach 7 und 21 Tagen lediglich in der Monolayer-Kultur schwach nachweisbar, nicht aber in der Pellet-Kultur. Die Ansätze mit 14-tägiger Kulturdauer waren alle negativ.

Kollagen II war nach 7, 14 und 21 Tagen jeweils sowohl im Monolayer als auch in der Pellet-Kultur positiv, wobei der Nachweis im Pellet nach 7 Tagen zunächst noch schwach war.

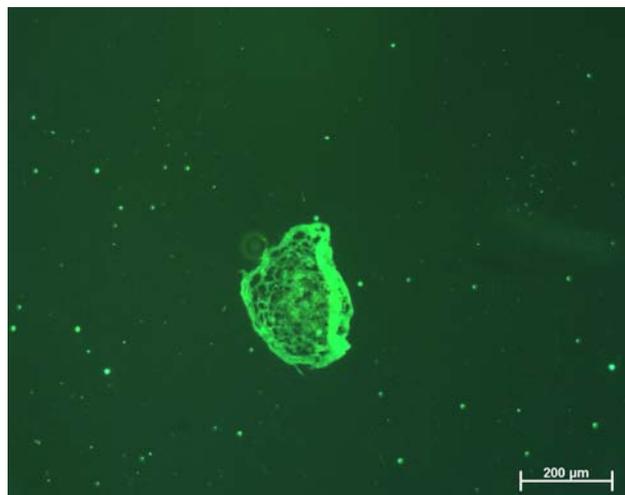
Kollagen X war nach 7 Tagen nicht nachweisbar, nach 14 Tagen schwach positiv und nach 21 Tagen positiv.

CD 34 war in keinem der Kultur-Ansätze positiv.

Tabelle 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung nach chondrogener Stimulation von USSC; n.u. = nicht untersucht

Nachweis	7 Tage		14 Tage		21 Tage	
	Pellet	Mono	Pellet	Mono	Pellet	Mono
Kollagen I	-	(+)	-	-	-	(+)
Kollagen II	(+) - +	+	+	+	+	+
Kollagen X	-	n.u.	(+)	n.u.	+	n.u.
CD 34	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.

Abb. 20: Pellet-Kultur von chondrogen differenzierten USSC, immunhistochemische Färbung für Kollagen II; Kulturdauer 14 Tage



Danach konnte, anders als für die Knochenmark- und die Periostzellen, sowohl für Kollagen II als auch für Kollagen X in der semiquantitativen mikroskopischen Auswertung eine zunehmende Expression bzw. Synthese mit längerer Kulturdauer nachgewiesen werden. Dabei trat Kollagen X im Vergleich zu Kollagen II verzögert auf. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen ein chondrogenes Differenzierungspotential von USSC in einem serumfreien chondrogen stimulierenden Medium.

4.2.2 Chondrogene Differenzierung von unrestringierten somatischen Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut (USSC) in serumfreiem und serumhaltigem Medium

In der Literatur liegen unterschiedliche Angaben zur Verwendung von fetalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) bei der chondrogenen Stimulierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark vor. Daher sollte nach dem unter 4.2.1.3 geführten Nachweis eines vorhandenen chondrogenen Differenzierungspotentials von USSC im serumfreien Medium der Einfluß von FCS im Medium bei der chondrogenen Stimulierung von unrestringierten Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut in Monolayer- und Pellet-Kulturen untersucht werden.

Um spenderabhängige Unterschiede auszuschließen, wurde der serumfreie Ansatz parallel zum serumhaltigen Ansatz wiederholt und für beide Versuche Zellen derselben Probe verwendet.

Es wurden die gleichen Untersuchungszeiträume wie in der vorangegangenen Untersuchung gewählt. Schon nach 24 Stunden war die Bildung einer extrazellulären Matrix durch positive Alzian-blau-Färbung nachweisbar. Dabei war der Nachweis in der semi-quantitativen Auswertung im serumfreien Medium schwach positiv, im serumhaltigen Medium stärker positiv. Im Verlauf waren die Charakteristika nach 7 Tagen unverändert. Nach 14 Tagen nahm die Färbung im serumfreien Ansatz zu, erreichte aber auch nach 21 Tagen nicht die Stärke der serumhaltigen Kultur.

Kollagen II konnte ebenfalls schon nach 24-stündiger Kultivierung in beiden Monolayer-Ansätzen nachgewiesen werden. In der serumfreien Kultur war die Intensität zunächst geringer, nahm aber mit zunehmender Kulturdauer zu und erreichte nach 21 Tagen das Niveau des serumhaltigen Mediums. Kollagen I war, anders als in dem unter 4.2.1.3 beschriebenen Versuch mit serumfreiem Medium, zu keinem Zeitpunkt in einem der beiden Medien nachweisbar. Ein Nachweis von Kollagen X wurde in den Monolayerkulturen nicht geführt.

Insgesamt war in den Monolayer-Kulturen bei Zugabe von 10% FCS zum Medium eine höhere Zelldichte zu beobachten.

Abb. 21 a+b: Monolayer-Kulturen von USSC : a = serumfrei, b = serumhaltig, immunhistochemische Färbung für Kollagen II, Kulturdauer 14 Tage

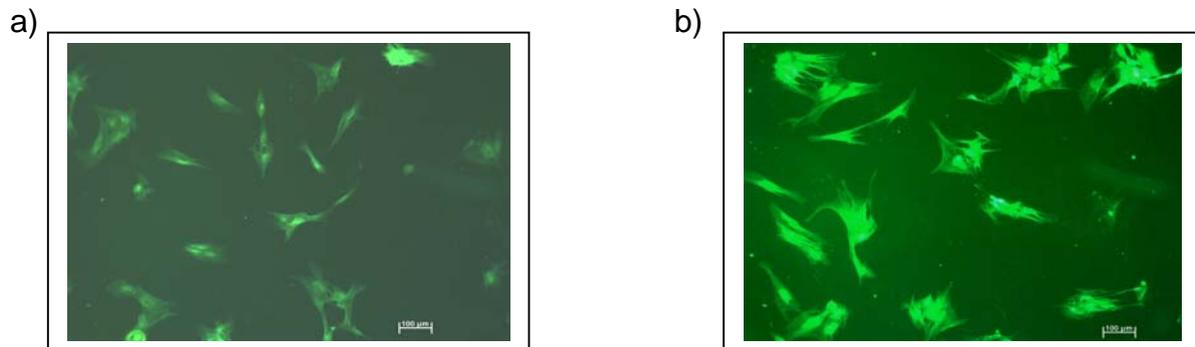


Tabelle 25 fasst die Ergebnisse der USSC-Monolayer-Kulturen in beiden Medien vergleichend zusammen :

Tabelle 25: Ergebnisse der Monolayer-Kulturen von USSC : x = serumfrei, xx = serumhaltig, semiquantitative Auswertung

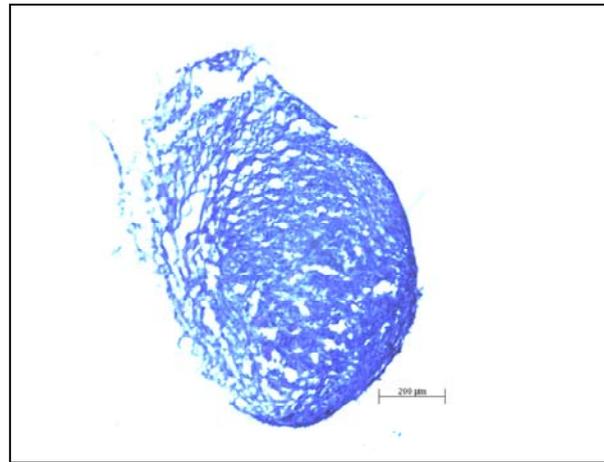
<u>Nachweis</u>	24 h	24 h	7 d	7 d	14 d	14 d	21 d	21 d
	x	xx	x	xx	x	xx	x	xx
Alzian/PAS	(+)	++	(+)	++	+	++	+	++
Kollagen I	-	-	-	-	-	-	-	-
Kollagen II	+	++	++++	++	++++	++	++	++

Die dreidimensionalen Pellet-Kulturen wurden nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturdauer (je 2 Pellets pro Zeitpunkt und Medium) untersucht. Dabei konnte, wie in den Monolayer-Kulturen, sowohl bei serumfreier als auch serumhaltiger Kultivierung nach 7 Tagen in der Alzian-blau/PAS-Färbung die Bildung einer extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Die Art und Intensität der Färbung blieb mit zunehmender

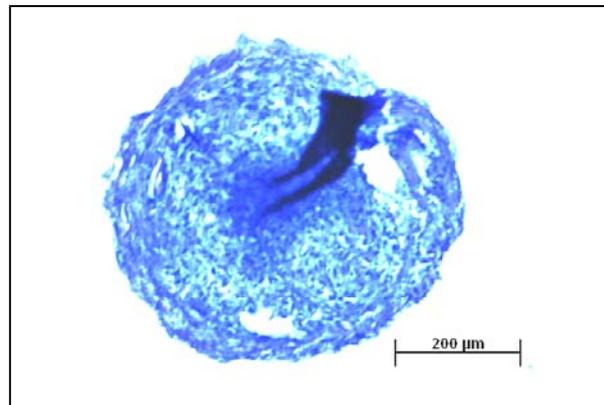
Kulturdauer unter mikroskopischen Gesichtspunkten im wesentlichen unverändert, jedoch erlaubt die hier verwendete Methode keinen direkten quantitativen Vergleich.

Abb. 22 a-c: Pellet-Kulturen von chondrogen differenzierten USSC; Alzian-blau-Färbung

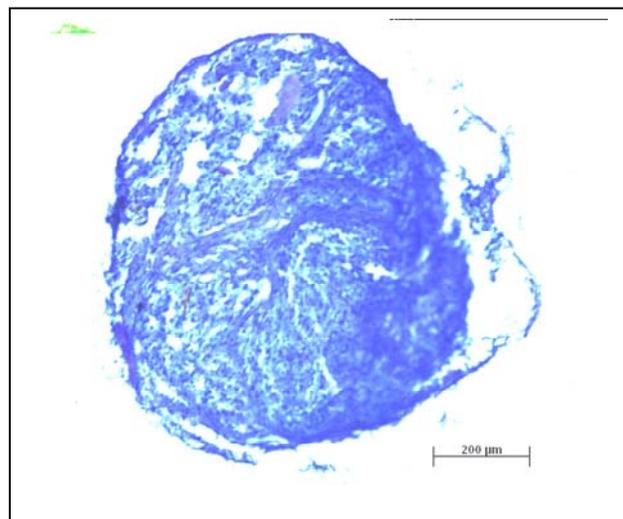
a) Kulturdauer 7 Tage,
Medium serumhaltig



b) Kulturdauer 14 Tage,
Medium serumfrei, Artefakt-
Bildung durch partielle Faltung



c) Kulturdauer 21 Tage,
Medium serumhaltig,

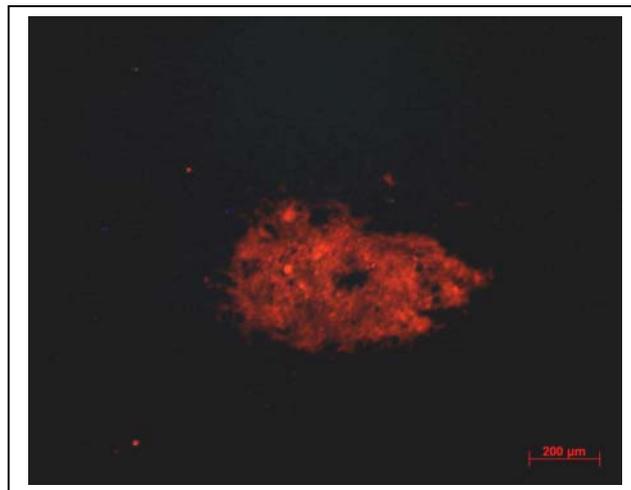


Auch Kollagen Typ II war nach 7 Tagen nachweisbar, wobei hier in der serumhaltigen Kultur eine intensivere immunhistochemische Anfärbung auftrat als in der serumfreien Kultur. Nach 14 Tagen war die Anfärbbarkeit gleich stark, nach 21 Tagen erneut in der serumhaltigen Kultur stärker. Kollagen Typ X, typisch für hypertrophe Chondrozyten, war in der serumfreien Kultur nach 7 Tagen nicht, nach 14 Tagen zunächst schwach positiv und nach 21 Tagen „normal“ positiv. Die Kollagene II und X waren verstärkt im Randbereich der Pellets nachweisbar, während zentral keine wesentliche Anfärbung stattfand. Insgesamt war in keinem Präparat eine vollständige oder homogene Anfärbbarkeit für Kollagen zu sehen. Kollagen Typ I war in beiden Kulturen zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Auch CD 34 als Marker hämatopoietischer Vorläuferzellen war in keiner Kultur zu den genannten Zeitpunkten nachweisbar.

Abb. 23 a+b: Pellet-Kulturen von chondrogen differenzierten USSC, Kulturdauer 7 Tage : a = serumfrei, b = serumhaltig, immunhistochemische Färbung für Kollagen II

a)

(leichte Faltung des Pellets)



b)

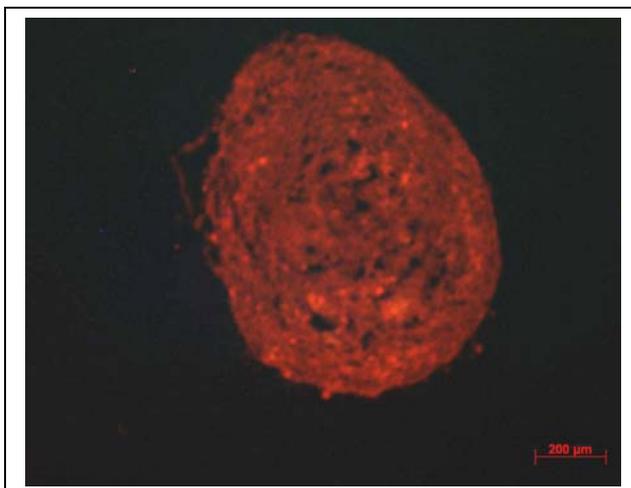


Abb. 24: Pellet-Kultur von USSC, Kulturdauer 21 Tage, Medium serumhaltig, immunhistochemische Färbung für Kollagen II; Artefaktbildung durch Faltung in der rechten Pellet-Hälfte

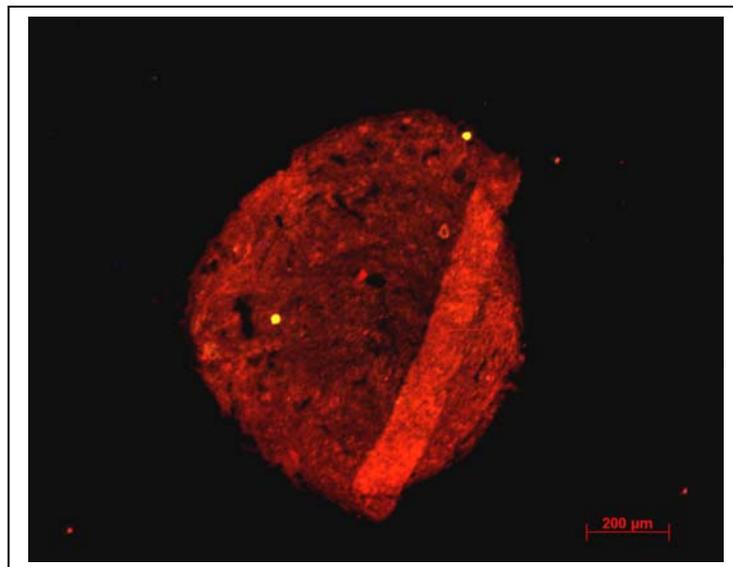


Tabelle 26: Ergebnisse der Pellet-Kulturen chondrogen differenzierter unrestringierter Stammzellen aus humanem Nabelschnurrestblut : x = serumfrei, xx = serumhaltig , semiquantitative Auswertung

Nachweis	7 d x	7 d xx	14 d x	14 d xx	21 d x	21 d xx
Alzian/PAS	+	+	+	+	+	+
Kollagen I	-	-	-	-	-	-
Kollagen II	(+) - +	+	+	+	+	+ - ++
Kollagen X	-	+	(+)	+	+	+
CD 34	-	-	-	-	-	-

Zusammenfassend kam es in beiden Kulturmedien zu einer chondrozytären Differenzierung der unrestringierten somatischen Nabelschnurstammzellen mit Synthese knorpeltypischer Matrix. Unter Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) zum Kulturmedium war eine höhere Zelldichte in der Monolayer-Kultur festzustellen, wobei die Relation zur Ausgangszellzahl nicht untersucht wurde. Die Produktion von extrazellulärer Matrix setzte in beiden Medien innerhalb von 24 h nach Kulturbeginn (Monolayer) ein. In der Monolayer- wie auch der Pellet-Kultur war bei semiquantitativer mikroskopischer Beurteilung ein Trend zur stärkeren Synthese von Kollagen II in der serumhaltigen Kultur im Vergleich zur serumfreien Kultur nachweisbar, während die Zugabe von FCS in der Pellet-Kultur zu einer früheren Synthese von Kollagen X im Vergleich zum serumfreien Medium führte. Nach 21 Tagen war jedoch im mikroskopischen Bild der immunhistochemischen Färbung kein Unterschied in der Quantität an Kollagen X sichtbar.

Die Zugabe von 10%-igem fetalem Kälberserum zum Kulturmedium führt nach den vorliegenden Ergebnissen, eventuell durch eine höhere Zelldichte, zu einer stärkeren Kollagensynthese für Typ II, gleichzeitig auch zu einer früheren Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten (Kollagen X). In den Monolayerkulturen kann im Vergleich zum serumfreien Medium auch eine höhere Syntheserate für extrazelluläre Matrixsubstanzen mittels der Alzian-blau-Färbung nachgewiesen werden.

4.2.3 Chondrogene Differenzierung von unrestringierten somatischen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in Bio-Matrix-Kulturen (Chondro-Gide®)

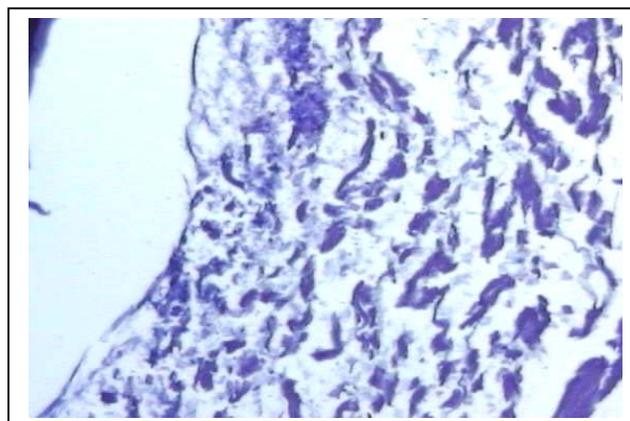
Aufgrund der unter 4.2.2 dargestellten Ergebnisse, die eine stärkere Kollagen II-Produktion bei Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) zum Kulturmedium zeigen, wurde für diese Versuchsreihe ebenfalls das serumhaltige Medium gewählt. Als Kontrollansatz diente das unter III.2.2 beschriebene FCS-haltige Standardmedium ohne chondrogen stimulierende Zusätze.

Die verwendeten Kollagenmembranen unterliegen aufgrund ihres tierischen Ursprunges in ihrer Struktur deutlichen Schwankungen. Diese betreffen in erster Linie die Dicke und die Anordnung der Kollagenfasern, was Auswirkungen auf die Beschaffenheit der fibrösen Oberfläche wie auf die Größe der intramembranösen Poren hat. Daher sind keine strukturell völlig identischen und somit exakt vergleichbaren Matrices für diesen Versuch verfügbar.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach 7 Tagen waren die Zellen hauptsächlich in der der geschlossenen Seite der Membran zugewandeten Zone zu finden. Dabei war vereinzelt eine Bildung von Zellhaufen (Clustern) zu beobachten.

Zu diesem Zeitpunkt konnte mit der Alzian-blau-Färbung bereits der Nachweis der Bildung einer extrazellulären Matrix in einzelnen Arealen der Chondro-Gide®-Membran geführt werden.

Abb. 25: Chondro-Gide® mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 7 Tage, Alzian/PAS-Färbung, (Ausschnitt, 400-fach vergrößert)



Dabei ist die Membran dunkel, die Areale mit neu gebildeter Matrix hell gefärbt.

Zur semiquantitativen Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurde erneut das folgende Schema herangezogen:

- = negativ	(+) = schwach positiv	+ = positiv	++ = stark positiv
-------------	-----------------------	-------------	--------------------

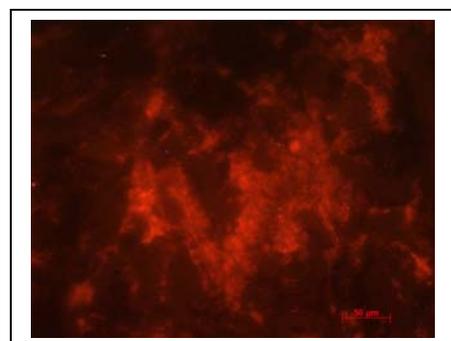
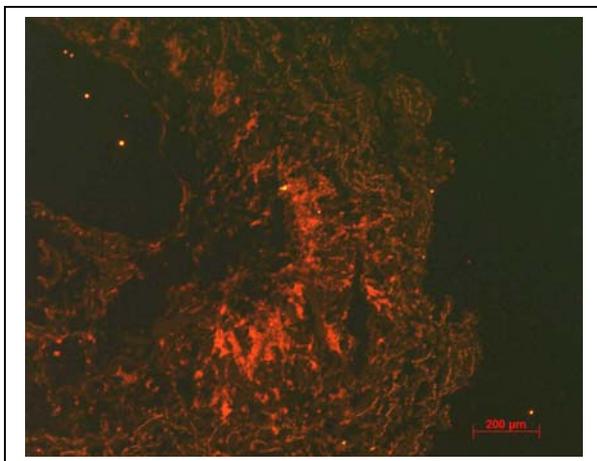
Danach war nach 7 Tagen der Nachweis von Kollagen II in allen drei chondrogen stimulierten Ansätzen positiv, während im Kontrollansatz mit Standardmedium der Nachweis als schwach positiv gewertet wurde. Jedoch war hier aufgrund einer Faltenbildung innerhalb der Membran ein Überlagerungsbedingter Artefakt nicht auszuschließen. Kollagen X wurde nur in einem von drei stimulierten Ansätzen als schwach positiv nachgewiesen, auch im Kontrollansatz war Kollagen X zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Kollagen I war in allen vier Ansätzen negativ. Vergleichbar der Lage der Alzian/PAS-positiven Areale innerhalb der Chondro-Gide[®]-Membran waren auch die Kollagen II- (und X-) positiven Bereiche verteilt.

In den parallel angesetzten Monolayer-Kulturen mit 4×10^4 Zellen pro Kammer war der Nachweis von Kollagen II und VEGF nach 7 Tagen positiv, COMP war schwach positiv. Für Kollagen I und X war keine Färbung durchgeführt worden. In dieser Versuchreihe war neben den Kollagennachweisen erstmals der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und das Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) untersucht worden.

Abb. 26 a + b: Chondro-Gide[®] mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 7 Tage, Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II

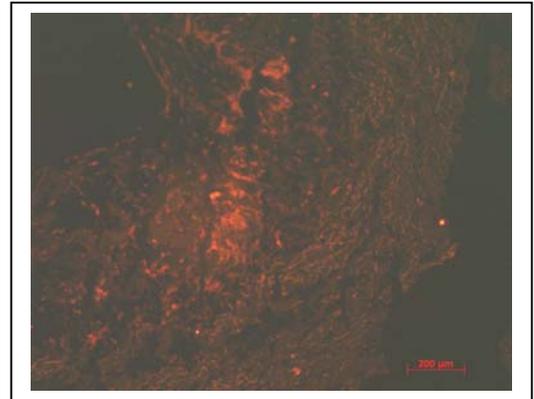
a: Übersicht

b: Ausschnitt



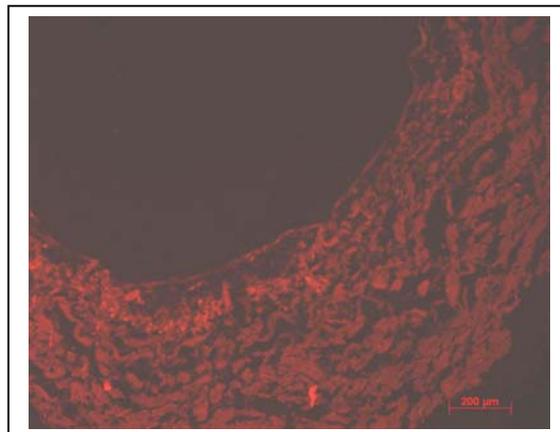
Positiv war auch der Nachweis des Angiogenesefaktors Vascular endothelial growth factor (VEGF) in allen stimulierten Ansätzen, während VEGF im Kontroll-Medium negativ war.

Abb. 27: Chondro-Gide[®] mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 7 Tage, Immunhistochemischer Nachweis von VEGF



Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) als knorpeltypischer Bestandteil der Extrazellulärmatrix konnte in allen drei stimulierten Ansätzen als schwach positiv, nicht aber im Kontroll-Ansatz nachgewiesen werden.

Abb. 28: Chondro-Gide[®] mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 7 Tage, Immunhistochemischer Nachweis von COMP (schwach positiv)



InTabelle 26 sind die Ergebnisse nach 7 Tagen Kulturdauer zusammengefaßt:

Tabelle 26 : Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen nach 7 Tagen

1-3 = Ansätze in chondrogen stimulierendem Medium

K = Kontroll-Ansatz in Standardmedium

M = Monolayer

	Kollagen I	Kollagen II	Kollagen X	COMP	VEGF
1	-	+	-	(+)	+
2	-	+	(+)	(+)	+
3	-	+	-	(+)	+
K	-	(+)	-	-	-
M	n.u.	+	n.u.	(+)	+

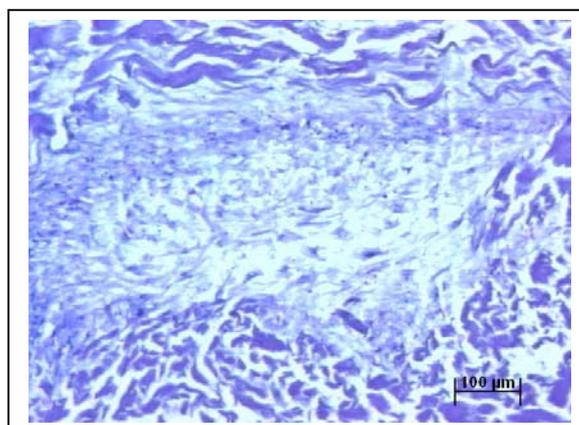
COMP = Cartilage oligomeric matrix protein

VEGF = Vascular endothelial growth factor

n.u. = nicht untersucht

Nach 14-tägiger Kulturdauer waren in der Alzian/PAS-Färbung der Membranen eine Zunahme der Größe und Dichte der positiven Areale im Sinne einer weiteren Synthese von Extrazellulärmatrix im Vergleich zu den Ergebnissen nach 7 Tagen festzustellen.

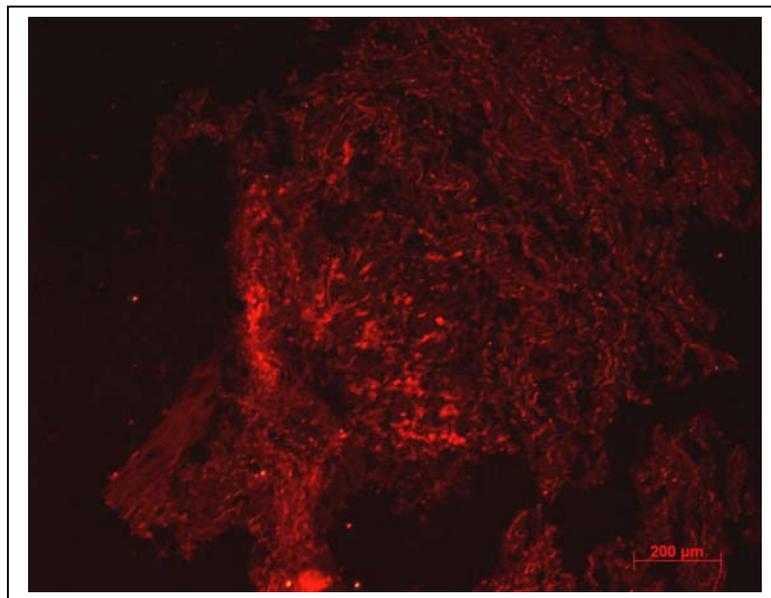
Abb. 29: Chondro-Gide® mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 14 Tage, Alzian/PAS-Färbung, Matrix U-förmig gebogen



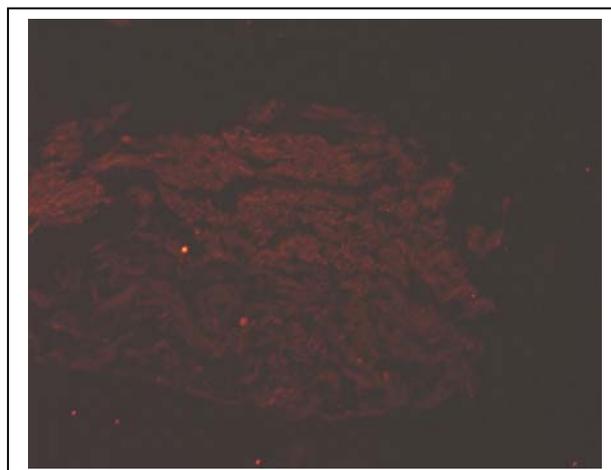
Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen II war in allen drei chondrogen stimulierten Ansätzen möglich, während im Kontrollansatz mit Standardmedium kein Kollagen II nachweisbar war. Kollagen X wurde in zwei von drei stimulierten Ansätzen als schwach positiv nachgewiesen, im Kontrollansatz war Kollagen X zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Kollagen I war in allen vier Ansätzen negativ.

Abb. 30 a + b: Chondro-Gide[®] mit unrestringierten somatischen Nabelschnurblutstammzellen in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 14Tage, Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II,

a: Übersicht,

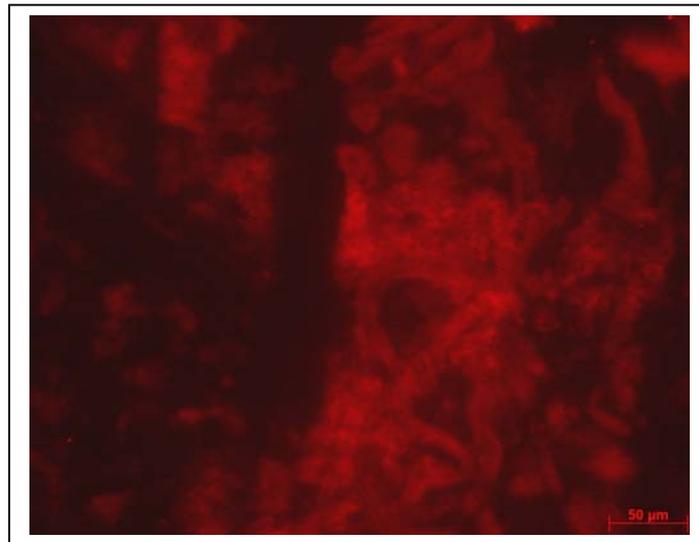


b : Negativkontrolle



Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) konnte in einem der stimulierten Ansätzen als positiv, in einem anderen als schwach positiv nachgewiesen werden, während in dem dritten stimulierten Ansatz und im Kontroll-Ansatz keine immunhistochemische Anfärbung möglich war.

Abb. 31: Chondro-Gide[®] mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 14Tage, Immunhistochemischer Nachweis von COMP (Wertung positiv)



Vascular endothelial growth factor (VEGF) war in allen stimulierten Ansätzen positiv, während die Färbung der Membran im Kontrollmedium negativ war.

In den parallelen Monolayer-Kulturen war der Nachweis von Kollagen II und VEGF unverändert positiv wie im Vergleich zur Kontrolle nach 7 Tagen. Dagegen war die Färbung für COMP nun intensiver positiv.

In Tabelle 27 sind die Ergebnisse nach 14 Tagen Kulturdauer zusammengefaßt:

Tabelle 27 : Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen nach 14 Tagen

1-3 = Ansätze in chondrogen stimulierendem Medium

K = Kontroll-Ansatz in Standardmedium

M = Monolayer

	Kollagen I	Kollagen II	Kollagen X	COMP	VEGF
1	-	+	-	-	+
2	-	+	(+)	(+)	+
3	-	+	(+)	+	+
K	-	-	-	-	-
M	n.u.	+	n.u.	+	+

COMP = Cartilage oligomeric matrix protein

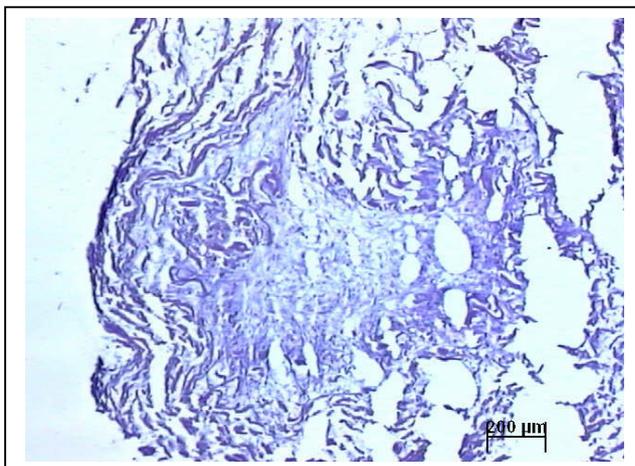
VEGF = Vascular endothelial growth factor

n.u. = nicht untersucht

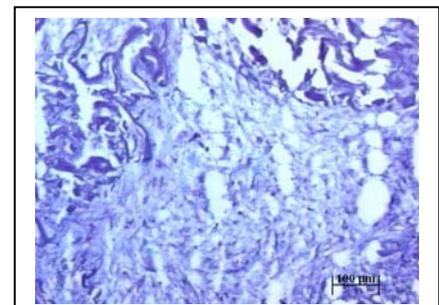
Nach 21-tägiger Kulturdauer war innerhalb der Membran anhand der Alzian/PAS-Färbung ein Zellwachstum und eine weitere Ausbreitung der Extrazellulärmatrix innerhalb der Membran nachzuweisen.

Abb. 32: Chondro-Gide[®] mit unrestringierten somatischen Nabelschnurblutstammzellen in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 21 Tage, Alzian/PAS-Färbung,

a) Übersicht



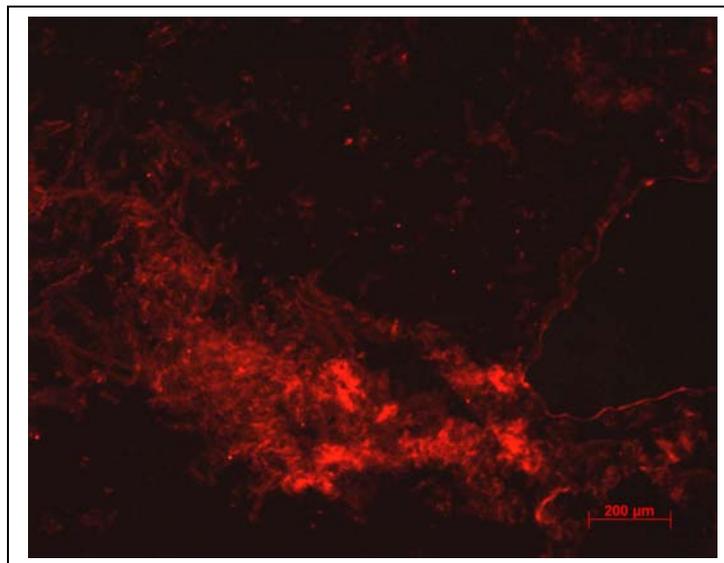
b) Ausschnitt



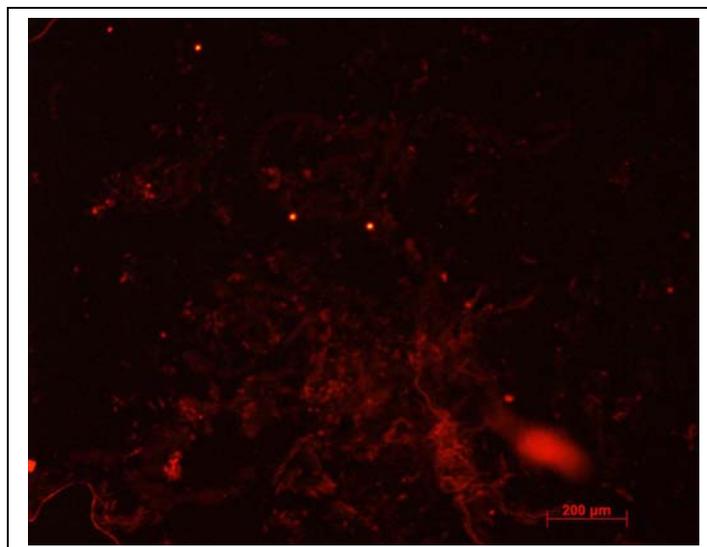
Kollagen II war erneut in allen drei chondrogen stimulierten Ansätzen nachweisbar, während im Kontrollansatz mit Standardmedium auch nach 3 Wochen keine Anfärbung möglich war. In einem der stimulierten Ansätze war verglichen zur 14-Tage-Kultur der Kollagen II-Nachweis stärker (++), während die beiden anderen etwa gleich stark anfärbbar waren. Kollagen X wurde in zwei von drei stimulierten Ansätzen als schwach positiv nachgewiesen, im Kontrollansatz war Kollagen X zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Kollagen I war erstmalig in einem von drei stimulierten Ansätzen schwach positiv.

Abb. 33 a: Chondro-Gide[®] (Ansatz 2) mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 21 Tage, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II;
b : Negativkontrolle

a)

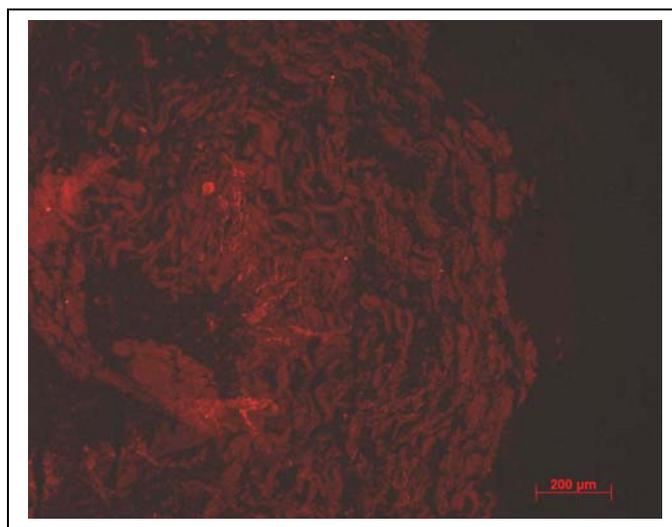


b)



Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) konnte in einem der stimulierten Ansätzen als positiv, in den beiden anderen als schwach positiv nachgewiesen werden, während im Kontroll-Ansatz keine immunhistochemische Anfärbung möglich war. Vascular endothelial growth factor (VEGF) war in allen stimulierten Ansätzen positiv bis stark positiv, während die Färbung der Membran im Kontrollmedium weiterhin negativ war.

Abb. 34: Chondro-Gide[®] mit USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 21 Tage, Immunhistochemischer Nachweis von COMP (schwach positiv)



In den parallelen Monolayer-Kulturen war Kollagen II im Vergleich zur Kontrolle nach 14 Tagen unverändert nachweisbar. Dagegen war die Färbung für COMP und VEGF nun intensiver positiv.

Abb. 35: Monolayer-Kultur von USSC in chondrogen stimulierendem Medium, Kulturdauer 21 Tage, Immunhistochemischer Nachweis von VEGF; Clusterbildung im linken oberen Bildausschnitt (400-fach vergrößert)

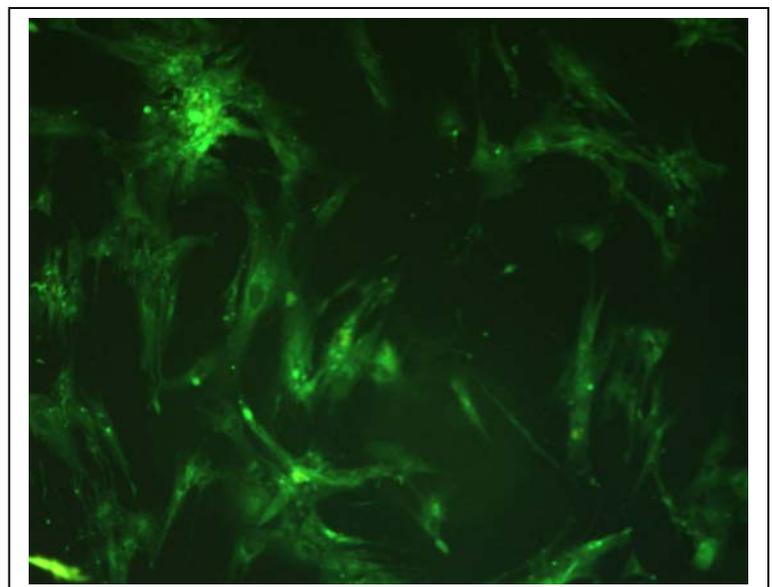


Tabelle 28 fasst die Ergebnisse nach 21 Tagen Kulturdauer zusammen :

Tabelle 28 : Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen nach 21 Tagen

1-3 = Ansätze in chondrogen stimulierendem Medium

K = Kontroll-Ansatz in Standardmedium

M = Monolayer

	Kollagen I	Kollagen II	Kollagen X	COMP	VEGF
1	-	+ - ++	-	+	+ - ++
2	-	+	(+)	(+)	+ - ++
3	(+)	+	(+)	(+)	+ - ++
K	-	-	-	-	-
M	n.u.	++	n.u.	(+)	++

COMP = Cartilage oligomeric matrix protein

VEGF = Vascular endothelial growth factor

n.u. = nicht untersucht

Zusammenfassend beweisen die Ergebnisse ein chondrogenes Differenzierungspotential der unrestringierten somatischen Nabelschnurblutstammzellen auch in der verwendeten Biomatrix. Die verwendeten Nachweismethoden lassen eine quantitative Auswertung nicht zu, in der semi-quantitativen Beurteilung nahm zumindest in einem von drei Ansätzen die Kollagen-II - Produktion vom 7. bis zum 21. Tag der Kultur zu. Entsprechendes gilt auch für den Nachweis des COMP. In der Alzian-blau/PAS-Färbung war eine Zunahme der Zelldichte und der Produktion von extrazellulärer Matrix in der Chondro-Gide[®]-Membran mit längerer Kulturdauer nachweisbar. Das für hypertrophe Chondrozyten typische Kollagen X war nach 14 und 21 Tagen in zwei von drei Ansätzen schwach positiv, im Unterschied zu den stärker positiven Ergebnissen der Pelletkulturen (s. 4.2.2). Kollagen I war in einem von drei Ansätzen am 21.Tag als schwach positiv nachweisbar. Die zunehmende Expression von VEGF spricht für eine Tendenz zu verstärkter Angiogenese. Die weitgehend parallele Expression von Kollagen II, COMP und VEGF in den chondrogen stimulierten Monolayerkulturen und die negativen Ergebnisse der Kontrollansätze der Zellen auf der Matrix in Standardmedium zeigen, dass die chondrogene Differenzierung von der Biomatrix selbst unabhängig ist.

V. Diskussion

„Wenn die Gesellschaft mobil bleiben will, muß sie sich um die Erforschung der Arthrose kümmern“ (200). Diese Kernaussage eines Editorials aus der *Zeitschrift für Orthopädie* (Organ der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie) im Jahre 2002 greift ein zentrales Problem bei Verletzungen und Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates auf, welches die medizinische Wissenschaft seit Jahrhunderten beschäftigt. Schon 1743 konstatierte Hunter (134), dass Gelenkknorpelschäden nicht heilen, was in der Folgezeit durch viele Autoren bis in die Gegenwart bestätigt wurde (53,176). Die epidemiologischen Daten zur Prävalenz von Gelenkknorpelschäden und manifester Arthrose unterstreichen die Notwendigkeit, grundlegende Erkenntnisse zu erforschen und für diese Erkrankungen bessere Therapieoptionen zu erarbeiten. Gelenkerkrankungen sind die häufigste chronische Erkrankung im Alter, so leiden z.B. über 40% der über 70-jährigen an einer Gonarthrose und 25% der Betroffenen sind in den Aktivitäten des täglichen Lebens dadurch stark behindert (200).

Symptomatische Knorpelschäden bzw. Arthrosen benötigen in der Regel eine operative Therapie. Die klinische Erfahrung lehrt, dass unbehandelte Knorpeldefekte, die einen größeren Gelenkbereich betreffen, zu einer fortschreitenden Degeneration des gesamten Gelenkes führen (53). Daraus läßt sich ableiten, dass solche Defekte möglichst früh erkannt und einer entsprechenden Therapie zugeführt werden sollten. Rein symptomatische Verfahren wie Gelenk-Lavage und Gelenk-Debridement können den Arthroseprozess nicht beeinflussen und führen lediglich kurzfristig zu einer Beschwerdebesserung (12,108,140,254).

Durch Anbohrung (196,233), Abrasion (147) oder Mikrofrakturierung (266) des subchondralen Knochens kommt es zu einer Eröffnung von intra-ossären Blutgefäßen mit der lokalen Bildung und Anlagerung eines Blutkoagels, dem sog. „super clot“. Darin enthaltene mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (307) und solche aus der Membrana synovialis (133) sollen zu einem Faserknorpel differenzieren und eine Defektheilung realisieren. Histologisch enthält dieser Knorpel vorwiegend Typ-I-Kollagen im Gegensatz zum Typ-II-Kollagen des hyalinen Knorpels. Biomechanische Testungen zeigen eine deutlich geringere Belastbarkeit eines solchen Regeneratgewebes im Vergleich zum hyalinen Knorpel (223). Längerfristig ist der gebildete Faserknorpel den mechanischen Anforderungen nicht

gewachsen, so dass bei entsprechender Defektgröße im Verlauf eine manifeste Arthrose entsteht (137). So sind auch die klinischen Ergebnisse dieser Therapieverfahren bis heute unsicher (12,56,93,147), die besten Resultate wurden dabei für die Mikrofrakturierung berichtet (217).

Das einzige Verfahren, mit dem heute ein Gelenkoberflächendefekt mit vollwertigem hyalinen Knorpel rekonstruiert werden kann, besteht in der Übertragung autologer oder allogener Knorpelknochen-Transplantate, wobei sich letztere aufgrund der Problematik der möglichen Infektübertragung und der Vitalität der Transplantate nicht durchgesetzt haben (72,99,210). In einer vergleichenden prospektiven, nicht-randomisierten Multicenterstudie verschiedener gelenkerhaltender Operationsverfahren (114) zeigten nach 5 Jahren nur die Mikrofrakturierung in 34% und die Knorpel-Knochen-Transplantation in Form der Mosaikplastik in 87% der Patienten eine bleibende Verbesserung. Die mit Ausnahme der Pridiebohrungen anfänglich gleichermaßen guten Ergebnisse der übrigen Therapieverfahren hatten keinen dauerhaften Bestand.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die Ergebnisse, aber auch eventuell verbleibende Beeinträchtigungen nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation zum einen bei multi-, zum anderen bei uni-lokulärem Knorpelschaden am Knie dargestellt werden. Die Erstbeschreibung dieses Verfahrens findet sich bei Wagner (292) zur Therapie der Osteochondrosis dissecans am Kniegelenk. In der Folgezeit wurde die Technik von verschiedenen Autoren (38,111-113,137,181,304,306) sowohl für erweiterte Indikationen am Kniegelenk, nämlich bei traumatischen oder umschriebenen degenerativen Knorpelschäden, als auch an anderen Gelenken für vergleichbare Indikationen angewendet (20,116,137,138,144).

1997 publizierten Hangody et al. (111,112) mehrere tierexperimentelle und klinische Studien zur Langzeitüberlebensrate des transplantierten hyalinen Gelenkknorpels nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation. Die längste Nachuntersuchungszeit betrug 6 Jahre. Die histologische Analyse des transplantierten Knorpels zeigte, dass 70 bis 80% des hyalinen Knorpels erhalten war. Andere Autoren untersuchten die Integration der Transplantate sowohl im Niveau des Knorpels als auch im Bereich des Knochens. Während unterhalb der sog. „tidemark“ als Grenzschicht zwischen Knorpel und dem Übergang zum subchondralem Knochen eine vollständige Osteointegration des Transplantates eintritt (77, 262), kommt es dagegen nicht zu einer Integration des transplantierten Knorpels in das angrenzende Knorpelgewebe

(18,111,138,260,262). Nach Browne (45) kann das gestörte Einheilungsverhalten der Transplantate zu einer Migration der Zylinder oder sogar zu einem Abbau derselben führen, was erneut die Kongruenz der Gelenkfläche zerstört. Siebert et al. (262) führten eine tierexperimentielle Arbeit an Schafen durch, die in Bezug auf Größe, Struktur und Regenerationsfähigkeit von Knorpel und Knochen im Bereich des Kniegelenkes gegenüber dem Menschen vergleichbar sind. Auch beim Schaf heilen Knorpel-Knochendefekte von 6 bis 7 mm Durchmesser nicht spontan aus. Die Autoren konnten zeigen, dass mit einer autologen Knorpel-Knochen transplantation keine dem normalen hyalinen Knorpel gleichwertige Gelenkflächenrekonstruktion möglich ist. Insbesondere die biomechanische Entkopplung der transplantierten Knorpeloberfläche mit lediglich faserknorpeliger Einheilung gegenüber der Umgebung lässt Fragen bezüglich der Langzeitergebnisse offen (260,262).

Klinische Ergebnisse für dieses Verfahren mit längerer Nachbeobachtungszeit liegen bisher nur für das Kniegelenk und das obere Sprunggelenk vor. Hangody et al. berichteten 2001 (116) über 126 Patienten nach Mosaikplastik an den Femurkondylen und der Patella mit einem Mindestnachuntersuchungszeitraum von 3 Jahren. Dabei erzielten 91% der Patienten gute und sehr gute Ergebnisse im modifizierten HSS-Knie-Score (Hospital of Special Surgery, New York). Patienten mit chondralen Läsionen zeigten bessere als solche mit osteochondralen Defekten, ebenso Patienten mit Defekten der Femurkondylen verglichen mit Patienten mit Schäden an der Patella. Wagner (293) berichtete über gute Resultate bei 20 von 26 Patienten nach bis zu 9 Jahren. Laprell und Petersen (158) untersuchten 29 Patienten mit einem follow-up von 6 bis 12 Jahren (Mittel 8,1 Jahre) nach autologer Knorpel-Knochen transplantation in der von Wagner angegebenen Technik nach. Nach dem Evaluationsbogen der International Cartilage Research Society ICRS (275) waren 12 Kniegelenke normal, 14 beinahe normal und 3 abnormal. Jakob et al. (144) fanden eine Verbesserung der Kniefunktion bei 92% von 52 Patienten nach 37 (24-56) Monaten. Burkart et al. (56) erhoben einen durchschnittlichen Lysholm Score von 91 Punkten bei 156 Patienten 12-52 Monate nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation mit der OATS[®]-Technik. Attmanspacher et al. (18) behandelten 27 Patienten mit dem gleichen System bei einer durchschnittlichen Defektgröße von 15 mm. Kurzfristige Ergebnisse führten zu einem durchschnittlichen Lysholm Score von 88 (78-93) Punkten. Imhoff et al. (137) erzielten mit der OATS-Technik bei 17 Patienten nach mindestens 12 Monaten Nachbeobachtungszeit subjektiv 9 sehr

gute, 7 gute und 1 befriedigendes Ergebnis. Andere Autoren berichten über ähnliche Ergebnisse während eines ebenfalls kurzen Beobachtungsintervalls von 24 Monaten (40). Die ersten klinischen Erfahrungen am Sprunggelenk bei allerdings niedrigen Fallzahlen zeigen vergleichbar gute Ergebnisse wie am Kniegelenk (20,116). Hangody (116) konnte über gute bis exzellente Ergebnisse nach 2 bis 7 Jahren bei 34 von 36 Patienten mit Osteochondrosis dissecans des Talus berichten. Al-Shaikh et al. (7) fanden einen AOFAS Ankle Score (American Association of Foot & Ankle Surgeons) von 88 Punkten (60-100) in einer Studie an 19 Patienten nach 18 (12-30) Monaten postoperativ.

Es existieren jedoch auch Arbeiten, die die Technik der (autologen) Knorpel-Knochen-Transplantation in Frage stellen: Bentley et al. (32) berichteten im Jahre 2001, dass nach zunächst guten Ergebnissen 1 Jahr nach Mosaikplastik am Knie in der Folge 26% ihrer Patienten erneut Beschwerden entwickelten mit einem Maximum 2 Jahre postoperativ. Wirth et al. (304) konnten zeigen, dass alle zwölf Patienten ihrer Studie nach der Behandlung mit autologen Transplantaten aus dem Kondylus, bei denen präoperativ keine oder nur eine leichte Arthrose diagnostiziert wurde, nach durchschnittlich 3,7 Jahren postoperativ eine beginnende oder sich verschlechternde Arthrose aufwiesen.

Die Evaluation von Ergebnissen nach Kniegelenksoperationen erfolgt mittels verschiedener Score-Systeme. Die zitierten Autoren verwendeten zur Beurteilung der Ergebnisse klinische Scores wie den HSS- oder den ICRS-Score, die größtenteils auf objektiven Parametern basieren. Der Einfluß der Gelenkschädigung auf das Allgemeinbefinden und die Fähigkeit, Tätigkeiten im Alltag zu verrichten, werden dagegen nicht oder wie z.B. bei der Tegner-Aktivitäts-Skala (274) nur in Ausschnitten erfaßt. Diese Parameter jedoch sind mit-entscheidend für die Beurteilung einer Behandlungsmethode. Eine weitere Problematik der verschiedenen Scores liegt darin, dass sie trotz unterschiedlicher Wichtung der Teilaspekte wie Schmerz oder Stabilität größtenteils die Wertung der Ergebnisse als „sehr gut“, „gut“ etc. bei gleicher bzw. ähnlicher Punktzahl vorgeben : 90-100 Punkte werden als „sehr gut“, 80-89 Punkte als „gut“ usw. eingestuft (108,120). Das erschwert eine Vergleichbarkeit von Studien, die verschiedene Scores verwenden. Heute werden zur Ergebniskontrolle zunehmend Bewertungen in Form von Patientenfragebögen eingesetzt, die sowohl subjektive Beschwerden des Patienten wie auch die

Veränderungen in dessen psychosozialer Konstellation, den sog. „distress“ berücksichtigen (25,26).

Als Instrument zur Dokumentation der subjektiven, die allgemeine Funktion des behandelten Gelenkes darstellenden Ergebnisse nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation am Knie wurde in der vorliegenden Arbeit der WOMAC-Arthrose-Index (25-28,270) gewählt. Dabei handelt es sich um einen Patientenfragebogen zur Erfassung der Symptome und der physischen Funktionseinschränkungen von Patienten mit Gon- oder Koxarthrose im Alltag. Das Ausfüllen benötigt nur wenige Minuten. Bei eingehender Prüfung der Reliabilität (25-28) sowie in pharmakologischen, chirurgischen und rehabilitativen Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass der Index ein valides, zuverlässiges und verlaufempfindliches Instrument zur Erfassung von klinisch relevanten Beeinträchtigungen im Hinblick auf Schmerz und Steifigkeit sowie der Einschränkung der physischen Funktionsfähigkeit von Arthrosepatienten ist (26,27,28,270). Es besteht eine gute Korrelation zu radiologischen Befunden und klinischer Gelenkbeweglichkeit in einem definierten „Signalgelenk“ (270). Der WOMAC-Index erscheint darüber hinaus anderen, vergleichbaren Indices wie dem Lequesne-Algofunctional Index und dem SF-36 überlegen (14,276).

Die funktionellen Ergebnisse nach Knorpel-Knochen-Transplantation im Vergleich zu einem kniegesunden Kollektiv, dargestellt in dieser Arbeit, zeigen, dass mit dieser Behandlungsmethode insbesondere bei multilokulären Knorpelschäden, jedoch auch bei umschriebenen Läsionen, keine vollständige Wiederherstellung der „Alltagstauglichkeit“ der betroffenen Gelenke, zumindest in Bezug auf das jeweilige Gesamtkollektiv, zu erzielen ist. Dies bestätigen auch die Arbeiten von Bentley (31), Laprell (158) und Wirth (304). Betrachtet man die einzelnen Gruppen für sich, so zeigte sich dass unter den Patienten mit unilokulärem Knorpelschaden (Gruppe 2) 3 von 12 Patienten (25%) völlig beschwerdefrei waren, in der Gruppe 1 mit multilokulärem Knorpelschaden jedoch nur 2 von 41 (4,9%). Möglicherweise beeinflusst aber neben der primären Diagnose auch die Fallzahldifferenz zwischen den von uns untersuchten Gruppen die Ergebnisse.

Für den Bereich Schmerz wie für die generelle Gelenkfunktion erreichten Patienten beider Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant schlechtere Ergebnisse. Zwar war die Funktionseinschränkung bei unilokulärer Läsion (Gruppe 2) wiederum

signifikant geringer als bei multilokulären Knorpelschäden (Gruppe 1), jedoch bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen den Patientengruppen beim Schmerz. Die Patienten der Gruppe 1 klagten gegenüber der Kontrollgruppe über eine signifikant schlechtere Beweglichkeit im Sinne der „Steifigkeit“. Diese war auch bei den Patienten der Gruppe 2 schlechter, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

Betrachtet man innerhalb des WOMAC-Index die Fragen zur Funktion bei kniebelastenden Tätigkeiten wie Treppensteigen, Aufstehen aus dem Sitzen, Stehen und Gehen, so zeigte sich, dass sich Patienten mit multilokulärem Knorpelschaden erwartungsgemäß auch in Bezug auf diese Funktionen in allen untersuchten Tätigkeiten signifikant von der Kontroll-Gruppe unterschieden, während zwischen Patienten mit unilokulärem Defekt und der Kontroll-Gruppe lediglich signifikante Unterschiede bestanden beim Treppabsteigen, Stehen und Gehen auf ebenem Boden. Dies ist möglicherweise dadurch zu interpretieren, dass die Defekte bei unilokulärer Läsion in der Regel die Hauptbelastungszonen der Femurkondylen betreffen, welche in Knie-Streckung belastet werden, während multilokuläre Defekte meist auch den femoro-patellaren Gelenkabschnitt erfassen, der wiederum in Beugung wie beim Treppaufsteigen und Aufstehen aus dem Sitzen belastet wird. Anders als bei der Betrachtung des Gesamtscore unterschieden sich die beiden Patientengruppen in dieser Detailanalyse nicht signifikant voneinander. Dies wird von uns durch die Differenz der Patientenzahlen in den beiden Gruppen erklärt, da die sich Zahlen bei einer Quote von 4,9% beschwerdefreien Patienten in Gruppe 1 im Vergleich zu 25% in Gruppe 2 bei gleich starken Gruppen verändern dürften.

Bei leichten Arbeiten hatten in der Gruppe 1 mit multilokulärem Schaden 22 von 41 Patienten (53,7%) Beschwerden, bei schweren Arbeiten dagegen 36 von 41 Patienten (87,8%). In der Gruppe 2 mit unilokulärem Schaden hatten nur 2 von 12 Patienten (16,7%) Beschwerden bei leichten, dagegen 6 von 12 Patienten (50%) bei schweren Arbeiten.

Mögliche Ursachen dafür sind die oben genannten biomechanischen Aspekte der insuffizienten Einheilung im Bereich der Knorpelzone, iatrogene Schäden durch die Transplantentnahme oder auch die Progression der Knorpelschädigung in den dem ursprünglichen Defekt benachbarten Arealen. In den zitierten Arbeiten zu klinischen Ergebnissen (38,40,137) werden neben allgemeinen Komplikationen wie Hämarthrosbildung und Gelenkergüssen Beschwerden im Bereich der Entnahmestelle bei Transplantatgewinnung aus den Femurkondylen genannt. In

einer neueren Arbeit von Hangody wird über anhaltende Beschwerden in der Entnahmeregion bei 3% der Patienten berichtet (116), Imhoff und Oetl (137) sahen dagegen bei etwa 20% der Patienten Probleme. Bös (40) konnte zeigen, dass 1 Jahr postoperativ in einer Kontrollkernspintomographie erhebliche Signalalterationen und Knorpeldefekte im Bereich des femoralen Gleitlagers nach Transplantatgewinnung bestanden. Ahmad et al. (2) entnahmen 1 Jahr nach Knorpel-Knochen-Transplantation eine Biopsie aus der Spenderregion und fanden mechanisch minderwertiges dichtes, heterogenes Fasergewebe. Nimmt man die Tatsache hinzu, dass die Integrität des subchondralen Knochens für den Erhalt einer Gelenkfläche notwendig ist, ist eine Sekundärdegeneration im Bereich der Entnahmestelle trotz der in der Literatur berichteten günstigen kurz- bis mittelfristigen klinischen Ergebnisse nicht auszuschließen.

Interessanterweise gaben bei der vorliegenden Erhebung des WOMAC-Scores auch 2 von 30 Befragten (6,7%) der Kontrollgruppe, die sich vor der Erhebung als kniegesund bezeichneten, Beschwerden bei leichten und sogar 16 von 30 Befragten (53,3%) Beschwerden bei schweren Arbeiten an. Dies lässt, wie auch die Gesamtzahlen des Score (Globalscore) für die Kontrollgruppe, den Schluß zu, dass hier die Ergebnisse trotz der Aussage von Stucki et al. (270), dass der Index nur die Symptomatik und Funktionseinschränkung in einem Zielgelenk erfasst, entweder von nicht-knie-assoziierten Faktoren beeinflusst werden oder die Beantwortung der Eingangsfrage zur Kontrollgruppe („kniegesund“) nicht korrekt beantwortet wurde.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier vorgestellten klinischen Studie, dass mit der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation bei multi- wie auch unilokulären Knorpelläsionen im Vergleich zu einem kniegesunden Kontroll-Kollektiv keine Normalisierung der physischen Funktion und Belastbarkeit des Kniegelenkes erzielt werden kann. Einschränkend muß bemerkt werden, dass in dieser Arbeit das Ausmaß einer möglichen Verbesserung der Beschwerden nicht erfaßt wurde. Die Ergebnisse zeigen dennoch Differenzen auf zu den meisten der oben zitierten Arbeiten, die hauptsächlich objektive Parameter bei der Gelenkuntersuchung berücksichtigten und nicht die Bewertung des Behandlungsergebnisses durch den Patienten selbst. Es muß hinterfragt werden, inwieweit Publikationen mit Scores, die nur rein oder überwiegend objektive Parameter berücksichtigen, geeignet sind, den Nutzen einer Operationsmethode im Hinblick auf die Wiederherstellung der Alltagsfunktionen zu beurteilen. Auch muß eine Mindestnachbeobachtungszeit von 2

Jahren gefordert werden, die bisher nur von wenigen Studien eingehalten wurde. Die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation ist aufgrund der zitierten basiswissenschaftlichen Daten, der möglichen methodenspezifischen Komplikationen und der dargestellten eigenen Ergebnisse nicht uneingeschränkt zu empfehlen. Chancen durch Erneuerung der Gelenkfläche im Bereich des primären Knorpelschadens müssen gegen die potentielle Morbidität durch die Transplantatgewinnung im Spenderareal abgewogen werden (2). Grundsätzlich stellt sich also daher die Frage nach anderen therapeutischen Optionen.

Eine solche Weiterentwicklung zur Therapie von Gelenkknorpelschäden stellt das „Tissue engineering“ als eine interdisziplinäre angewandte Wissenschaft zur Wiederherstellung einer defekten Organfunktion dar (157). Das Tissue engineering im Rahmen der Behandlung von Gelenkknorpeldefekten, erstmals von Cima et al. 1991 (63) publiziert, hat den Ersatz der defekten Knorpelareale zum Ziel. Im klinischen Einsatz ist heute als klassisches Verfahren die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) (42,43,224) mit oder ohne Einsatz von Trägermaterialien (250). Dabei steht die Vermehrung von bioptisch gewonnenen autologen Chondrozyten in-vitro, der Erhalt oder die Wiedererlangung des spezifischen Phänotyps der Zellen zum Zeitpunkt der Replantation und die Bildung einer belastungsfähigen Matrix einschließlich deren Integration in die Umgebung im Vordergrund (132).

Bereits 1968 führten Chesterman und Smith (62), später Bentley und Greer (31) allogene Chondrozytentransplantationen in Knorpeldefekte im Tierversuch durch. Schon diese Arbeiten zeigten, dass isolierte, in einen Knorpeldefekt transplantierte Chondrozyten proliferieren und Knorpelmatrix bilden können. Chondrozyten verlieren in der Standard-Monolayer-Kultur jedoch ihre typische Morphologie und entdifferenzieren zu fibroblastären Zellen (107) mit verminderter Synthese der knorpeltypischen Proteoglykane und vermehrter Synthese von faserknorpeltypischem Kollagen Typ I an Stelle von Kollagen Typ II (103,288,289) sowie dem Proteoglykan Versican statt dem knorpeltypischen Aggrekan (35). Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten zellulären Proliferationsrate (132). Unter geeigneten Bedingungen sind die ursprüngliche Morphologie und das spezifische Biosyntheseprofil reversibel (33). Von besonderer Bedeutung ist dabei eine dreidimensionale Umgebung sowie eine hohe Zelldichte, die die chondrozytäre (Re-) Differenzierung entscheidend beeinflussen (132). Ändert man die Kulturbedingungen

nach De-Differenzierung in der Monolayerkultur dahingehend, dass die Zellen in einer dreidimensionalen Struktur inkubiert werden, kommt es wieder zur Synthese von knorpeltypischem Kollagen Typ II, die Proliferation sistiert (267). Im Vergleich zu geringen Zelldichten von $5-16 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 (165) konnten Kuettner et al. (155) zeigen, dass bei einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro cm^2 knorpeltypische Extrazellulärmatrix weiter produziert wird. Rudert et al. (245) zeigten, dass für eine Biomatrix-Fläche von 3×3 mm eine initiale Zellzahl von 4×10^4 Chondrozyten ausreicht, um eine konstant hohe Endzellkonzentration zu erreichen.

Klinische Langzeit-Untersuchungen mit einem Follow-up bis zu 11 Jahren von Peterson et al. (223,224) konnten vor allen Dingen bei Transplantation im Bereich der Femurkondylen in etwa 90% gute bis sehr gute Ergebnisse mit dieser Methode zeigen. Bei der Osteochondrosis dissecans, aber auch bei retropatellaren Schäden sind die Ergebnisse nach ACT mit 74% bzw. 69% guten bis sehr guten klinischen Ergebnissen etwas schlechter. Minas (186,187) zeigte eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität der Patienten bei noch akzeptablen Kosten dieses Verfahrens.

Probleme dieser Methode sind Komplikationen wie Transplantatablösung, Hypertrophie des Transplantats, sekundäre Chondromalazie, Adhäsionen und Arthrofibrosen. Insgesamt treten in den zitierten Studien Komplikationen in einer Größenordnung von etwa 10% auf, wobei eher Komplikationen bei Transplantationen im Bereich der Trochlea femoris, der Patella und der Tibia zu erwarten sind. Außerdem zeigen die bioptischen Ergebnisse von Peterson et al. (223,224), dass eine Ausbildung von hyalinartigem Knorpel nicht garantiert ist: bei 14 von 19 Biopsien wurde von ihnen hyalinartiges Knorpelgewebe nachgewiesen, 5 Proben zeigten lediglich Faserknorpel oder Bindegewebe. In Biopsien 1 Jahr nach ACT sahen Richardson et al. (242) eine zonale Heterogenität im Reparaturgewebe mit hyalinartigem Knorpel in der Tiefe und Faserknorpel an der Oberfläche. Lee et al. (159) konnten darüber hinaus in einer Studie am Kaninchen nachweisen, dass allein die Knorpelentnahme an der Trochleakante („trochlea ridge“) in einem Gelenk bleibende Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften am übrigen Gelenkknorpel der Trochlea hinterläßt. Ob diese Befunde zu späteren arthrotischen Veränderungen führen, ist noch unklar. Der gewichtigste Nachteil des Verfahrens ist die notwendige zusätzliche Operation zur Entnahme des Knorpelgewebes mit den zu isolierenden Zellen (300). Dadurch wird der Patient gegenüber einem einzeitigen

Verfahren erneut den möglichen operativen und anästhesiologischen Komplikationen eines Kniegelenkeingriffs ausgesetzt. Es ist daher naheliegend, zur Regeneration des Knorpels Zellen oder Gewebe im Sinne des Tissue Engineering zu verwenden, die keine oder lediglich eine geringe Spendermorbidity bedingen.

Autologe Gewebe, die ohne Vorbehandlung direkt im Rahmen einer operativen Therapie als Zellquelle für den Knorpelersatz dienen können, sind Periost und Perichondrium. Beide Gewebe besitzen in ihrer Cambium-Schicht mesenchymale Vorläuferzellen, die nach der Transplantation entsprechender Gewebs-Lappen in der Defektzone zur Bildung eines Ersatzknorpels führen (49,127,139,205-208). Gleichzeitig konnten differenzierungsfördernde Wachstumsfaktoren zumindest im Periost gefunden werden (43). Osteochondrale Defekte, die mittels autologer Periostlappen bei Kaninchen gedeckt wurden, zeigten in der histologischen Untersuchung einen vornehmlich hyalinen Knorpel mit einem Kollagen-II-Gehalt von über 90% und normalem Gehalt an Wasser, Proteoglykanen, Chondroitin- und Keratansulfat (205, 206, 208).

Klinische Ergebnisse wurden von verschiedenen Autoren beschrieben. Hoikka et al. (123) berichteten über gute und zufriedenstellende Ergebnisse bei 12 von 13 Patienten nach Periostlappenplastik bei Patelladefekten. In einer Studie von Lorentzon (168) zur Behandlung von Patelladefekten hatten nach einem mittleren Follow-up von 42 Monaten 17 von 26 Patienten ein exzellentes Ergebnis, 8 ein gutes und lediglich 1 Patient ein schlechtes Ergebnis. O'Driscoll (206) berichtete über gute Ergebnisse in über 40 Patienten. Bouwmeester et al. (41) konnten 10 Jahre nach autologer Perichondrium-Transplantation in 78% eine Verbesserung nachweisen, jedoch keinen Unterschied zu einer Vergleichsgruppe mit subchondraler Anbohrung. Nachteil der Verwendung von Periost oder Perichondrium als Transplantat ist die geringe Verfügbarkeit sowie die mögliche enchondrale Ossifikation, die bei Perichondrium nach 2-5 Jahren bei bis zu 70% der Patienten nachweisbar war (127,186) und auch für das Periost beschrieben ist (207). Außerdem ist Periost sehr anfällig im Rahmen der Präparation (207,208). Eine Studie von Hall et al. (110) zeigte, dass bereits eine 10-minütige Exposition des Periost bei Raumtemperatur zu einer drastischen Abnahme des chondrogenen Potentials führt. Dies beeinträchtigt die intraoperative Anwendung erheblich. Auch erfordert die Gewinnung von Perichondrium zumeist im Bereich der Rippen einen hohen zusätzlichen operativen Aufwand bei begrenzter Verfügbarkeit (49,50), was zur

Belastung des Patienten führt. Diese relevanten Einschränkungen zeigen die Notwendigkeit, den Einsatz weiterer Gewebe oder Zellen mit chondrogenem Potential für den Einsatz in der Behandlung von Gelenkknorpelschäden zu überprüfen.

In jüngerer Zeit konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass auch im humanen Knochenmark wie im Periost mesenchymale Progenitorzellen existieren, die unter definierten Bedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* chondrogen differenzieren können mit Nachweis einer Expression von Kollagen Typ II und Bildung einer knorpeltypischen Extrazellulärmatrix (39,60,105,148,149,208,228,294,295,307). Diese im Gegensatz zu fibroblastischen Zellen aus Knochenmark oder hämatopoietischen Vorläuferzellen CD34-negativen Zellen (135,143,228) zeigen eine große Plastizität (60,135). Die ersten Arbeiten zur Charakterisierung multipotenter Stromazellen aus humanem Knochenmark stammen von Friedenstein und Mitarbeitern (90,91), die den Begriff der „Colony-forming units“ (CFU) prägten. Bereits zu dieser Zeit konnte ein breites Spektrum an differenzierten Geweben aus diesen Zellen kultiviert werden: Knorpel, Knochen, Adipozyten, Bindegewebe und myeloproliferatives Stroma (34,90,91). In den achtziger Jahren isolierten weitere Arbeitsgruppen ähnlich potente Vorläuferzellen auch aus Knochenmark von Kaninchen, Ratten und Mäusen (131,178,227). Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell, MSC) wurde Anfang der neunziger Jahre von Caplan (60) mit der Beschreibung von ersten Vorläuferzellen eines mesenchymalen Gewebes aus dem Knochenmark erneut popularisiert. Diese Zellpopulation findet sich im Knochenmark, Periost und Muskelgewebe und unterliegt einer stetigen Erneuerung. Ihre Subpopulationen differenzieren in mesenchymale Gewebezellen wie Osteoblasten, Chondroblasten, Myoblasten, Adipoblasten, Tenoblasten, dermale Fibroblasten und Stromazellen (51,249). Die einzelnen Differenzierungsschritte werden durch extrinsische (Umgebungs-) Signale und intrinsische Wachstumsfaktoren gesteuert (47,48,129,238).

Die Zellgewinnung mononukleärer Zellen aus Knochenmark wird in zahlreichen Versuchsprotokollen beschrieben (47,48,60,171,202). Böhm (39) fasste die dabei relevanten Charakteristika der Zellen, die zum Erhalt einer fast reinen Stammzell-Kultur führen zusammen: (1) sie lassen sich durch Dichtezentrifugation (1.073 - 1.077g) zusammen mit der mononukleären Zellfraktion des Knochenmarks isolieren,

(2) sie wachsen adhärent und (3) in chemisch definierten Medien, die das Wachstum anderer Zellarten supprimieren. Dabei beläuft sich der Anteil an mesenchymalen Stammzellen auf ca. 0.001 - 0.01% aus der gesamten gewonnenen Knochenmarkzellpopulation (202). Bei klonalen Wachstumsassays konnte gezeigt werden, dass aus 1 ml Beckenkammaspirat durchschnittlich 4,5 Stammzellkolonien zu erzeugen sind (39). Da diese schon primär geringe Population an mesenchymalen Vorläuferzellen mit dem Alter abnimmt (238) und eine große Variabilität in der Konzentration an nukleären Zellen bzw. Vorläuferzellen in Beckenkampunktaten besteht (226,307), ergibt sich die Notwendigkeit der ex-vivo-Vermehrung nach der Isolierung.

Auch für die Isolierung von Vorläuferzellen aus Periost sind verschiedene Protokolle beschrieben (201,294). Grundsätzlich erfolgt nach Kollagenase-Andauung eine mechanische Gewebszerkleinerung mit anschließender Filterung und Zentrifugation von aus dem Gewebe herausgelösten Zellen. Anschließend erfolgt die Kultivierung in Standard-Medien zur notwendigen weiteren Expansion der Zellzahl, bevor eine gewünschte Differenzierung der Zellen eingeleitet wird (294). Die Isolierung und Expansion der in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgten nach den oben zitierten Protokollen, um eine Vergleichbarkeit mit den Daten in der Literatur zu gewährleisten. Da die Definition von mesenchymalen Stammzellen auch in den oben zitierten Arbeiten nicht einheitlich erfolgt bzw. nach dem derzeitigen Wissensstand nicht erfolgen kann, wählten wir die von Böhm (39) zusammengefassten Kriterien sowie den Negativnachweis von CD-34 (135) in Übereinstimmung mit Pittenger et al. (228) als Parameter für mesenchymale Progenitorzellen.

Entsprechend den Angaben aus der Literatur ist die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus Knochenmark, Periost und Synovialgewebe von Mensch und Tier zumindest in vitro grundsätzlich etabliert. Johnstone (148,149), Diduch (75), Nishimura (201), Solchaga (265) und Wakitani (294) wiesen diese an MSC vom Kaninchen nach, Fortier (86) und Worster (305) an MSC vom Pferd. Auch für andere Tiermodelle wie Ziege und Maus ist die Differenzierung nachgewiesen (58,219). Barry (21,22), Yoo (307), Mackay (171), Majumdar (173) Sekiya (257) und Wakitani (295) stellten Ergebnisse mit humanen MSC vor. Als dritte Zell-Linie neben den Zellen aus Knochenmark und Periost wurden in dieser Arbeit erstmals humane unrestringierte Zellen aus Nabelschnur-Restblut (USSC) (298,299) untersucht und mit den Wachstums- und

Differenzierungscharakteristika mit Knochenmark- und Perioststammzellen verglichen. Dabei handelt es sich um eine vom Erscheinungsbild her zunächst fibroblastoide, CD-34-negative (nicht hämatopoietische) Zell-Population mit hohem Differenzierungspotential (298), die über mehr als 14 Passagen ohne Verlust der Plastizität kultivierbar ist. Die Zellen zeigen wie die mesenchymalen Vorläuferzellen aus anderen Geweben ein adhärentes Wachstum. Ein besonderes Merkmal ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark (228) keine Expression von HLA-1-Antigenen (HLA class 1) vorliegt. Daten zur chondrogenen Differenzierung dieser Zellen lagen bisher in der Literatur noch nicht vor.

Die oben zitierten Arbeiten zur chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen weisen eine Vielzahl von Unterschieden im Hinblick auf verwendete Zellzahlen, Kulturmedien und -formen, eingesetzte Wachstumsfaktoren und Nachweismethoden der knorpeltypischen Merkmale auf.

Zur Identifizierung der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen kann grundsätzlich eine Vielzahl von Parametern und Nachweismethoden genutzt werden. Im folgenden sollen daher nur die am häufigsten in der Literatur genannten Methoden besprochen werden. Die meisten Autoren verwenden den Nachweis des knorpel-spezifischen Kollagen II (13,22,148,149,228,305), der nach einer Kulturdauer von 7 - 10 Tagen entweder immunhistochemisch oder mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geführt werden kann (148,149,228). Auch Kollagen IX (309) und X kann nachgewiesen werden, jedoch in der Regel etwas später als der Typ II (22,228,257). Die Alzian-blau-Färbung zur Darstellung saurer Mukosubstanzen in der Matrix ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden für den Nachweis von knorpeltypischer Extrazellulär-Matrix (58,203,245,246). Das Ausmaß der Anfärbung der Präparate korreliert mit dem Gehalt an Glykosaminoglykanen (58). Aggrekan und Keratan-Sulfat können als typische Matrixbestandteile auch isoliert nachgewiesen werden (58,257,307). Als weiterer Marker einer chondrogenen Differenzierung dient das „Cartilage Oligomeric Matrix Protein“ (COMP) (22,80,257,309). Das COMP, ein Glykoprotein aus der Familie der Thrombospondine, ist in allen Knorpel-Geweben nachweisbar und spielt eine Rolle in der Vernetzung der Kollagenfibrillen. Ekman et al. (80) wiesen COMP immunhistochemisch im Bereich wachsenden Knorpels nach und bezeichneten das Protein als Marker für eine normale Differenzierung in proliferierende Chondrozyten.

Auch Chondroadherin als Protein der territorialen Knorpel-Matrix (177,261) und das Cartilage Homeoprotein (CART-1) als selektiv in Chondrozyten und deren Vorläuferzellen exprimiertes Protein (311,312) dienen in der Literatur als Nachweise der chondrozytären Differenzierung. Die Sequenz der Expression knorpeltypischer Marker während der Chondrogenese von humanen Knochenmark-Stammzellen in vitro (Pellet-Kulturen mit 2×10^5 Zellen) ist von Sekiya und Mitarbeitern detailliert beschrieben worden (257): danach kommt es gegenüber dem Tag „null“ nach einem Tag zu einer Verdoppelung des Kollagen II mit einem weiteren Anstieg nach 7 Tagen auf das 49-fache, nach 14 Tagen auf das 360-fache und nach 21 Tagen auf das 530-fache. Kollagen X verhält sich ähnlich, erreicht allerdings nach 21 Tagen lediglich das 116-fache des Ausgangswertes. COMP steigt am ersten Tag 2-fach, nach 7 Tagen 103-fach, nach 14 Tagen 230-fach und bleibt dann plateauartig unverändert. Interessant ist weiterhin die Feststellung der Arbeitsgruppe, dass RNA für Kollagen X nachweisbar ist, bevor die Zellen eine signifikante Hypertrophie aufweisen. Entsprechend der genannten Daten zum Nachweis von chondrogener Differenzierung wählten wir zur Vergleichbarkeit für unsere Versuche die Alzian-blau-Färbung, den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen I,II und X sowie in einem Teil der Experimente auch den Nachweis für COMP und den vascular endothelial growth factor (VEGF) (s.u.).

Die meisten Versuchsprotokolle empfehlen zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung die Kultivierung der gewonnenen Zellen in einer dreidimensionalen Struktur bei 37°C und 5% CO_2 (88,89,249). Die dreidimensionale Anordnung der Zellen kann durch Zentrifugation bei niedrigen Umdrehungen zu einem sogenannten Pellet (89) oder durch Kultivierung in Agarose- (81,201) und Alginat-Gelen (75,173) erreicht werden. Hierdurch wird die lokale Ausbildung von Interzellulär-Kontakten gefördert und die zur chondrogenen Differenzierung notwendige kritische Zelldichte erreicht (89). Butnario-Ephrat et al. (58) verwendeten eine sogenannte „Micromass-Culture“-Technik in Kulturschalen mit initialen Zellzahlen von $> 1 \times 10^6$ Zellen, die dann spontan Zellaggregate bildeten. Caplan (60) nannte eine Zellzahl von $5-6 \times 10^6$ pro 35mm-Platte. Andere Autoren konnten eine chondrogene Differenzierung auch in Monolayer-Kulturen mit niedrigeren Zellzahlen zeigen (86). Gemäß diesen Empfehlungen wurden für die Versuche in dieser Arbeit sowohl Monolayer- als auch dreidimensionale Pellet-Kulturen für die verschiedenen Zelltypen verwendet. Die

dabei von uns eingesetzten Zellzahlen für die Pellet-Kulturen entsprechen denen von Nishimura et al. (201), Sekiya et al. (257) und Yoo et al. (307). Wie die genannten Autoren konnten auch wir im System der Pellet-Kultur in allen untersuchten Zell-Linien eine chondrogene Differenzierung zeigen und die Eignung dieses Systems bestätigen und die Methode in unserem Labor standardisiert einführen. Die Monolayer-Kulturen in unserer Versuchsreihe wurden dagegen mit deutlich geringeren Zellzahlen von 4×10^4 pro Kammer angesetzt im Vergleich zu den Angaben von Yoo et al. (307) mit 2×10^5 Zellen oder von Butnariu-Ephrat et al. (58) zur „Micro-Mass-Culture“-Technik mit $> 1 \times 10^6$ Zellen in primären Monolayer-Kulturen. Anders als Yoo (307) konnten wir bereits mit diesen vergleichsweise geringen Zellzahlen den Nachweis chondrozytärer Differenzierung führen. Möglicherweise ist dies auf die Verwendung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren bei ansonsten vergleichbaren Kulturbedingungen zurückzuführen. Während Yoo (307) TGF- β 1 (Transforming growth factor β 1) verwendete, wurde in der vorliegenden Arbeit TGF- β 3 eingesetzt.

Die Wachstumsfaktoren der TGF-Beta-Familie, TGF- β 3 (22,171,173,257), TGF- β 1 (13,148,305,307), Insulin-like-growth-factor (37,284), Basic fibroblast growth factor (b-FGF) (16, 122), Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) (167) und Bone morphogenetic proteins (BMP) (154,257) scheinen bei der chondrozytären Zell-Differenzierung und der Induktion eines hyalinen Knorpelgewebes eine Rolle zu spielen. Dabei ist die Antwort auf die jeweiligen Faktoren verschieden (37). Die natürliche Sequenz dieser Faktoren im Rahmen der normalen Entwicklung ist bisher nicht bekannt. Verschiedene Isoformen von TGF- β induzieren unabhängig vom Differenzierungszustand der Chondrozyten die Synthese von Extrazellulär-Matrix in Chondrozytenkulturen (283,278). Jedoch erscheint der Einfluß auf differenzierte Zellen stärker als auf de-differenzierte Chondrozyten nach Monolayer-Kultur (283). Van Osch et al. (283) schlossen aus diesen Ergebnissen auf die Rolle der perizellulären Matrix für die Effekte von TGF- β auf die Proteoglykansynthese. In der vorliegenden Arbeit wurde TGF- β 3 verwendet, da in der Literatur für diese Isoform die meisten Daten im Zusammenhang mit einer chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen existieren. Barry et al. (21,22) konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark unter Zugabe von TGF- β 3 oder TGF- β 2 eine Differenzierung zu Chondrozyten mit sequentieller Expression von knorpeltypischen Matrix-Komponenten durchmachen. Majumdar et al. (173) fanden

nach 2-wöchiger Kultivierung von humanen MSC unter Gabe von TGF- β 3 eine Expression von Kollagen II. Gleichzeitig wiesen die Autoren darauf hin, dass humane mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark einen Typ-III-Rezeptor der TGF- β -Familie exprimieren. Thorp und Jakowlew (278) konnten zeigen, dass TGF- β 3 sowohl in Chondrozyten der transitionellen wie der hypertrophen Phase exprimiert wird. Außerdem wiesen sie nach, dass eine Reduktion von TGF- β 3 bei Erkrankungen auftritt, die mit einer Differenzierungsstörung von Chondrozyten der Wachstumsfuge einhergeht. Sie schlossen daraus auf eine Rolle von TGF- β 3 für die Differenzierung von Chondrozyten der Wachstumsfuge. Andere Arbeitsgruppen verwendeten TGF- β 1 (13,148,149,305,307) und konnten auch hier eine chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen erzielen. Der genaue Einfluß der verschiedenen TGF- β -Isoformen auf den Zellmetabolismus ist bis heute nicht bekannt, es bestehen jedoch verschiedene Regelmechanismen mit wechselseitigem Einfluß. So reguliert TGF- β 3 die Synthese von TGF- β 1 hoch (288). Das Zytokin Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induziert die Synthese von TGF- β 3, IL-6 dagegen die Synthese von TGF- β 1. Beide Mechanismen werden als protektive Maßnahmen gegen den Zytokin-induzierten Knorpelkatabolismus gewertet (289). Auch van Osch (283) wies auf die Rolle von TGF- β für die Knorpelregeneration hin. Mechanische Kompression führt zur chondrozytären Differenzierung von Vorläuferzellen, gleichzeitig aber auch zur Synthese von mindestens einem Mitglied der TGF- β -Familie (81). Einschränkend im Hinblick auf die Daten zu TGF- β wie auch zu den anderen Wachstumsfaktoren und deren Diskussion im Zusammenhang mit mesenchymalen Stammzellen ist die Tatsache, dass die meisten Untersuchungen an kultivierten Chondrozyten erfolgten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen jedoch den Effekt von TGF- β 3 bei der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkszellen und Vorläuferzellen aus Periost. Erstmals wurde hier eine vergleichbare Rolle des TGF- β 3 auch für unrestringierte somatische Nabelschnurblutstammzellen (USSC) gezeigt.

Unterschiedliche Empfehlungen bestehen zur Verwendung von Serum während der chondrogenen Zelldifferenzierung (75,81,148,149,173,307). Das Argument für eine serumfreie Kultivierung besteht darin, dass eine nachgewiesene chondrogene Differenzierung in diesem Fall zellabhängig sein muß (81), was für die

Charakterisierung der Fähigkeiten von Zell-Linien von Bedeutung ist (257). Johnstone et al. (148) konnten bei der Kultivierung von Knochenmarkzellen vom Kanichen nach Kondensation zu Pellets diese später nur in serumfreiem Kulturmedium nachweisen, nicht aber in serumhaltigem Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS). Entsprechend ist eine chondrogene Differenzierung von Vorläuferzellen nicht primär serumabhängig. Sekiya et al. (257) konnten die sequentielle Abfolge von knorpeltypischen zellulären und molekularen Veränderungen in serumfreiem Medium darstellen (s.o.). Daher wurde im ersten experimentellen Abschnitt dieser Arbeit ein serumfreies Kulturmedium verwendet. Die gezeigten Ergebnisse belegen die Daten aus der Literatur für Zellen aus Knochenmark und Periost und zeigen erstmalig Charakteristika und Differenzierung für unrestringierte Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC).

Elder (81) fand jedoch, dass eine Steigerung der Serumkonzentration im Kulturmedium die Chondrogenese aus Vorläuferzellen von Hühnern verstärkte. Von der Mark (291) beschrieb die Einleitung einer chondrozytären Differenzierung embryonaler mesenchymaler Hühnerzellen durch FCS. Van Susante et al. (284) konnten, allerdings an bovinen Chondrozyten, zeigen, dass die Proteoglykan-Syntheserate und der Effekt von Wachstumsfaktoren, hier TGF- β 2 und Insulin-like-Growth-Factor, am höchsten war, wenn das Kulturmedium 10% FCS enthielt im Vergleich zur serumfreien Kultivierung oder geringeren FCS-Konzentrationen. Auch Reindel (241) fand höhere Proteoglykan-Syntheseraten und höheren DNA-Gehalt in Knorpelimplantaten, die in 20% fetalem Rinderserum kultiviert worden waren im Vergleich zur serumfreien Kultur. Interessant war, dass durch die Kultivierung in serumhaltigem Medium eine festere Integration zwischen co-kultivierten Knorpelblöcken stattfand als im serumfreien Medium. Auf den positiven Effekt von humanem Serum auf Chondrozytenkulturen wiesen Anderer und Libera (11) hin. Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die vergleichende Untersuchung mit serumfreiem und serumhaltigem Medium mit 10%-igem fetalem Kälberserum im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit. Da die grundsätzliche Eignung von USSC als chondrogene Progenitoren im Rahmen des Tissue Engineering im Vordergrund der Fragestellung stand, erfolgte keine statistisch vergleichende Untersuchung. Jedoch konnte zumindest semiquantitativ ein positiver Effekt von 10% FCS auf die Synthese von Matrix-typischen Kollagenen und auf die Zelldichte in den Kulturen mit unrestringierten somatischen Nabelschnurblutzellen (USSC) nachgewiesen werden.

Somit lassen sich die oben zitierten Ergebnisse der Literatur bezüglich MSCs aus Knochenmark auf USSCs übertragen, so dass für weitere Untersuchungen mit USSCs zur therapeutischen Anwendung bei Gelenkknorpelschäden ein serumhaltiges Kulturmedium empfohlen werden kann.

In den Protokollen zur chondrogenen Stimulation von mesenchymalen Stammzellen von Johnstone (148,149), Yoo et al. (307) und Pittenger et al. (228) weisen diese auf die Zugabe von Dexamethason im Medium hin. Johnstone (149) konnte ohne Zugabe von Dexamethason kein Kollagen II nachweisen. Entsprechend verwendeten auch wir die von den Autoren angegebene Dosis von Dexamethason in den verschiedenen Kulturen. Zumindest bei Chondrozyten aus Gelenkknorpel von Ratten konnten Miyazaki et al. (185) jedoch zeigen, dass Dexamethason hemmenden Einfluß auf die Expression und Wirkung von TGF- β hat. Mackay (171) reduzierte eine anfängliche Menge von 100 nmol Dexamethason im Medium bei der Kultivierung von humanen MSC nach 2 Wochen auf 1 nmol und sah eine weitere Zelldifferenzierung in Richtung hypertropher Chondrozyten. Gleichzeitig wurde jedoch auch der zunächst in einer Dosis von 10 ng/ml zugegebene Wachstumsfaktor TGF- β 3 komplett weggelassen, so dass eine differenzierte Aussage zum isolierten Einfluß von Dexamethason anhand dieser Daten nicht gemacht werden kann.

Die in den beiden ersten Abschnitten dieser Arbeit verwendeten zellkulturellen Methoden sind durch Daten aus der Literatur hinreichend als suffizient für eine Induktion einer chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark und Periost gesichert. Die mit den Literaturdaten übereinstimmenden Ergebnisse für diese Zell-Linien zeigen, dass die von uns adaptierte Methodik erfolgreich etabliert wurde. Der Nachweis und die zeitliche Abfolge des Auftretens von Alzian-blau-positiver extrazellulärer Matrix, Kollagen I, II und X in unseren Kulturen aus Knochenmark- und Periostzellen entsprechen den Daten anderer Autoren. Auch Kramer et al. (154) fanden bereits nach 24-stündiger Kultivierung chondrogen stimulierter Vorläuferzellen alzian-blau positive Matrixareale. Yoo et al. (307) konnten Kollagen II ab dem 5.Tag in der neu gebildeten Matrix von stimulierten MSC nachweisen. Die rasche Folge des Auftretens von Kollagen X in unseren Kulturen und damit eine Differenzierung zum hypertrophen Chondrozyten bestätigt die Ergebnisse von Johnstone (148,149) und Sekiya (257). Im wesentlichen entspricht diese Abfolge derjenigen in der natürlichen Entwicklung der chondrogenen

Zellreihe von MSC über Chondroprogenitorzellen, Chondroblasten, Chondrozyt 1 und Chondrozyt 2 hin zu hypertrophen Chondrozyten (60). Kollagen I wurde von Yoo (307) und Fortier (86) anders als in dieser Arbeit zu Beginn der Kultivierung nachgewiesen mit einem späteren Abfall der Expression. Insgesamt existieren in der Literatur zum Nachweis von Kollagen I, typisch für Fibroblasten und knochenbildende Zellen, nur sehr wenig Daten. Da Kollagen I von uns nur bei Zellen aus Knochenmark und Periost, nicht aber bei USSC nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass eine „Verunreinigung“ der primären Kulturen dieser Zell-Linien mit entsprechend prädifferentierten bzw. nicht chondrogen stimulierbaren Zellen vorlag.

Vergleichbare Daten zu dem von uns erstmals nachgewiesenen chondrogenen Potential von USSC und einer entsprechenden Expression von knorpeltypischen Markern existieren bisher nicht. Aufgrund des vergleichbaren Musters in der Synthese von knorpeltypischer Extrazellulär-Matrix, insbesondere von Kollagen II, konnte in der vorliegenden Arbeit für die USSCs eine besonders günstige chondrogene Potenz verglichen mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark und Periost unter den hier verwendeten standardisierten Kulturbedingungen bewiesen werden. Im Vergleich mit den beiden anderen Zell-Linien lag sogar eine konstantere und, wenn auch nicht quantitativ statistisch untersuchte, höhere Syntheserate von Kollagen II vor, was die potentielle Eignung dieser Zellen für einen Einsatz im Tissue Engineering für die Therapie von Knorpeldefekten unterstreicht.

Obwohl eine annähernd gleichmäßige Expression der von uns nachgewiesenen knorpeltypischen Substanzen in den verschiedenen Ansätzen vorlag, waren Schwankungen zwischen den einzelnen Kulturen insbesondere bei den Zellen aus Knochenmark und Periost nachweisbar. Dies kann dadurch erklärt werden, dass von einer gewissen Heterogenität der Zellpräparate ausgegangen werden muß. Phinney et al. (226) zeigten, dass humane MSC-Kulturen aus Beckenkammaspiraten verschiedener gesunder Spender zwischen 19 und 45 Jahren bis zu 12-fach unterschiedliche Wachstumsraten und bis zu 40-fache Unterschiede in der Aktivität der alkalischen Phosphatase aufwiesen. Die Daten konnten in mehrfachen Punktionen über 6 Monate verifiziert werden, so dass von einer bedeutsamen Heterogenität bei Beckenkammaspiraten verschiedener Individuen auszugehen ist. Butnariu-Ephrat (58) konnte nur aus 30% aller Knochenmarkaspirate von Ziegen Kulturen gewinnen, die eine chondrogene Differenzierung durchliefen. Solchaga

(265) wies auf die hohe Variabilität in MSC-Präparationen aus Knochenmark beim Kaninchen hin, so dass dieser Faktor auch bei der Bewertung von Experimenten mit tierischen Zellen berücksichtigt werden muß. Da die von uns verwendeten Periostpräparate im Rahmen von offenen Gelenkoperationen gewonnen wurden und erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung weiter bearbeitet wurden, kann hier der von Hall (110) beschriebene negative Lagerungseffekt bei Raumluft schon nach 10 Minuten auf das chondrogene Potential bei einigen unserer Präparate nicht ausgeschlossen werden. Ob das fehlende Auftreten von Kollagen I und die trendmäßig stärkere Synthese von knorpeltypischen Matrixbestandteilen eine Überlegenheit von USSCs gegenüber Zellen aus Knochenmark oder Periost bedeutet oder ob dies auf die Zusammensetzung der primären Kulturen zurückzuführen ist, kann derzeit noch nicht beantwortet werden und muß in weiteren vergleichenden Experimenten untersucht werden. Zumindest ist der in Düsseldorf entwickelte Ansatz vielversprechend und soll weiter verfolgt werden.

Eine Erhöhung der phänotypischen Stabilität chondrogener Zellen kann durch Aussaat der expandierten Zellen (69,88,89,105,106,245,246) auf einer geeigneten dreidimensionalen Matrix erreicht werden. In der Literatur wird eine große Zahl verschiedener Trägermaterialien beschrieben, wobei synthetisch hergestellte, degradable Trägerwerkstoffe von den natürlich vorkommenden resorbierbaren Biomaterialien unterschieden werden können. Freed et al. (88) charakterisierten die ideale Matrix für ein Tissue Engineering wie folgt : 1. sie sollte Zell-Adhäsion und –Wachstum ermöglichen, 2. weder das Primärmaterial noch die Abbauprodukte sollten toxisch sein, 3. das Material sollte reproduzierbar sein, 4. die Porosität sollte mindestens 90% betragen zum Erhalt einer großen Oberfläche für Zell-Matrixkontakte, 5. die Matrix sollte resorbierbar und 6. diese Resorption steuerbar sein. Die im folgenden aufgeführten Merkmale zeigen jedoch, dass diese „ideale“ Matrix bisher nicht identifiziert ist. Zu den synthetisch hergestellten, biodegradablen Werkstoffen zählen die Polyglykol-Säure PGA (Polyglycolic acid) und ihre Derivate PLGA (Polylactid-co-glycolic acid) und PLG (Poly-D/L-Lactid-Glycolid). Der Nachteil von PGA liegt in der deutlichen Volumenveränderung während der Kultivierung i. S. eines Kollapses (78), so dass für die in-vivo-Anwendung als Trägermaterial die passgenaue Defektauffüllung schwierig erscheint. Obwohl zellkulturell ein gutes Wachstum von mononukleären Zellen (Knochenmark) auf PLGA und PLG gezeigt

werden konnte, besteht der Nachteil dieser Materialien in einer Erniedrigung des lokalen pH-Wertes, welche für eine inflammatorische Gewebereaktion verantwortlich gemacht wird (302). Gute Ergebnisse als Trägermaterial für Chondrozyten in vitro zeigen PLLA (Poly-L-Lactid acid) und ein Kompositivlies aus Polydioxanon und Polyglactin (245,246), wobei auch hier Volumenschwankungen verkommen.

Zu den verbreitetsten Biomaterialien natürlicher Herkunft zählt das Alginat. Es handelt sich hierbei um ein lineares Copolymer aus β -D-Mannosesäure und α -L-Guluronsäure, welches aus Braunalgen gewonnen wird. Die Vorteile dieses Biomaterials liegen in einer Syntheseförderung knorpelspezifischer Extrazellulärmatrix wie z.B. die Kollagen-Typen II, IX und XI (255). Durch den Zusatz von Calciumchelatoren (EDTA, Na-Citrat) kann dieser Werkstoff verflüssigt werden und die ehemals adherenten Zellen einer Charakterisierung oder Passagierung zugeführt werden (142). Velikonja und Mitarbeiter (285) beschreiben eine Redifferenzierung von dedifferenzierten Monolayerkulturen nach Resuspension in einer Agarose-Matrix. Nixon (202) und Fortier und Mitarbeiter (86) konnten tier- und zellexperimentell zeigen, dass sich Fibrin-Matrices in Kombination mit Insulin-Like-Growth-Faktor (ILF) als zellulärer Träger für Chondrozyten und deren Progenitoren eignen. Hyaluronsäure verhält sich biologisch in vivo und in vitro weitgehend inert (21,142,239). Es konnte sowohl an Fibroblasten, Chondrozyten als auch an mesenchymalen Progenitoren aus dem Knochenmark gezeigt werden, dass dieser Werkstoff ein dreidimensionales Wachstum der genannten Zellpopulationen zulässt (13,142). Derzeit findet ein Flies aus Hyaluronat Anwendung als Matrix für die autologe Chondrozytentransplantation (250). Für Kollagen-Matrices (z. B. TissuVlies[®], Immuno[®], BioGide[®], Pancogene S[®]) konnte gezeigt werden, dass sich aus hyalinem Gelenknorpel gewonnene Chondrozyten in Bezug auf ihre biochemische Syntheseleistung von Kollagen II auf einer 3-D-Kollagen I/III-Matrix in vitro stabil verhalten, jedoch morphologisch keine einheitliche Population bilden (79,96). Primäre humane Chondrozyten synthetisierten in Kollagenvliesen eine neue Knorpelmatrix aus Kollagen II und bildeten im ektopen Tiermodell Knorpelgewebe. Auch weitere tierexperimentelle Daten sprechen für die Vorteile kollagener Carrier. So konnten Wakitani und Mitarbeiter (294) die phänotypische Stabilität von chondrozytären Zellen verschiedener Ursprungsgewebe (Periost, Knochenmark) nach femoraler Transplantation am Hasenmodell (New Zeland White Rabbit) zeigen. Kollagen verbindet Biodegradibilität und eine schwache Antigenität mit einer im

Vergleich zu anderen natürlich vorkommenden Polymeren wie Albumin oder Gelatine besseren Biokompatibilität (172). Aus diesen Gründen wurde für unsere Versuche eine Biomatrix aus Kollagen I/III (Chondro-Gide[®], Fa. Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) gewählt, welche sich bereits im klinischen Einsatz befindet. Diese Membran unterliegt einer nachgewiesenen natürlichen Resorption: nach Spaltung durch Kollagenasen werden die temperaturempfindlichen Fragmente bei 37° C zu Gelatine denaturiert, anschließend erfolgt der weitere Abbau zu Oligopeptiden und schliesslich zu Aminosäuren (Herstellerangabe).

Im dritten experimentellen Abschnitt dieser Arbeit wurde die beschriebene Membran mit USSCs beimpft und in chondrogen stimulierendem Medium kultiviert, nachdem zuvor ein chondrogenes Potential dieser Zellen, wie oben ausgeführt, nachgewiesen worden war. Die Nachteile einer Aussaat von Zellen auf einer Biomaterialienmatrix sind eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber mechanischem Stress, demgegenüber liegen die Nachteile einer Aussaat ohne Biomatrix in einem raschen, lokalen Wegdiffundieren der Zellen aus dem Bereich des Knorpeldefektes bei mangelnder *in vivo*-Adhärenz. (142). Die Anwendung einer Matrix im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpelgewebe erscheint daher sinnvoll. Ziel der Untersuchung war es, die grundsätzliche Eignung der klinisch bereits erfolgreich für die Transplantation von Chondrozyten genutzten und somit für weitere klinische Versuche verwendbaren Membran für ein Tissue Engineering mit USSCs zu beurteilen. Die von uns verwendete Zellzahl von ca. 6×10^5 Zellen auf einer Matrixfläche von 5x5mm wurde in bisher nicht publizierten Vorversuchen als geeignet ermittelt, um ein sicheres Anwachsen der Zellen innerhalb der Matrix zu gewährleisten. Im Vergleich zu Rudert et al. (245), die für eine Biomaterial-Fläche von 3x3mm bei vergleichbarer Höhe der Matrices lediglich 4×10^4 Zellen verwendeten, ist die von uns gewählte Zahl relativ hoch. Jedoch untersuchten die Autoren reife Chondrozyten und dabei lediglich das Wachstumsverhalten, nicht jedoch die Qualität und Quantität des gebildeten Gewebes. Frenkel et al. (90a) untersuchten eine zweilagige Kollagen-Matrix und beimpften eine Fläche von 4mm im Durchmesser mit $8,5 \times 10^5$ Chondrozyten. In einer tierexperimentellen Studie an Kaninchen konnte von den Autoren nach 6 Monaten ein normaler Kollagen II-Gehalt in den Implantaten nachgewiesen werden. Da innerhalb der von uns untersuchten Matrix nur einzelne Bereiche neugebildete Knorpelsubstanz aufwies, erscheint die Zellzahl von ca. 6×10^5 für eine Fläche von 5x5mm zu gering für die komplette Deckung eines eventuellen Defektes mit

neugebildetem Knorpel. Die Ergebnisse beweisen jedoch eine chondrogene Differenzierung von USSCs mit Produktion einer eigenen, alzian-blau positiven extrazellulären Matrix auch innerhalb der Membran. Die Synthese der knorpeltypischen Kollagene II und X konnte wie in den dreidimensionalen Pellet-Kulturen auch auf der Matrix gezeigt werden. Der Nachweis des Matrix-Proteins COMP entspricht den Angaben von Barry (21,22) und Sekiya (257). Zaucke (309) konnte zeigen, dass COMP bei der De-Differenzierung von Chondrozyten abrupt herunterreguliert wurde und nach Re-Differenzierung in dreidimensionalen Kulturen wieder anstieg, so dass die von uns nachgewiesene Expression von COMP in Übereinstimmung mit Ekman (80) als weiteres Merkmal einer chondrozytären Differenzierung angesehen werden kann.

Erstmalig konnte in dieser Arbeit sowohl in der Monolayer- als auch der dreidimensionalen Matrix-Zellkultur chondrogen stimulierter unrestringierter humaner Nabelschnurblutstammzellen auf Chondro-Gide[®] immunhistochemisch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) nachgewiesen werden. VEGF ist der bedeutendste Mediator für die Bildung von Blutgefäßen während der Embryogenese, bei der Wundheilung, in malignen Neubildungen und bei Entzündungen (235,236). VEGF ist ein homodimeres, stark glykosiliertes Protein und wirkt über die Rezeptoren VEGF-1 und VEGF-2 auf die den Rezeptor tragenden Zielzellen (24). Außer der proliferationssteigernden Wirkung auf Gefäßendothelien besitzt VEGF auch eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten (24). Sekiya et al. (257) fanden eine zwischen dem 1. und dem 7. Tag rasch ansteigende Expression von VEGF in chondrogen stimulierten Pellet-Kulturen von humanen adulten Knochenmark-Stammzellen, die dann aber bis zum 21.Tag gleich blieb. Verschiedene Arbeitsgruppen (60a,100,130,221) wiesen VEGF-Isoformen in hypertrophen Chondrozyten der Epiphysenfuge nach. Sie sahen eine Rolle des VEGF bei der enchondralen Ossifikation hypertropher Knorpelzonen. Carlevaro et al. (60a) vermuteten zusätzlich einen Einfluß auf die Differenzierung von Zellen mesodermaler Herkunft. Durch eine Inhibition von VEGF konnten Gerber et al. (100) eine Suppression trabekulärer Knochenformation und eine Ausbreitung der hypertrophen Knorpelzone zeigen. Nach Unterbrechung der Inhibition kam es zu einer Normalisierung der Ossifikation und einer Restitution der Wachstumsplatte mit Resorption des hypertrophen Knorpels. Sie werteten dies als Zeichen für eine essentielle Rolle von VEGF für den Chondrozytenabbau, Remodellierung der

Extrazellulärmatrix, Angiogenese und Knochenformation in der Wachstumsplatte. Auch Horner et al. (130) fanden VEGF bei Chondrozyten in neonatalen Wachstumsplatten, nicht aber bei Chondrozyten der Ruhezone und nur spärlich bei solchen der Proliferationszone. Pfander et al. (225) konnten eine VEGF-Expression immunhistochemisch sowohl in gesundem wie arthrotisch verändertem Gelenkknorpel nachweisen. Dabei waren in normalem Knorpel etwa 56% der Chondrozyten immuno-positiv, während es im osteoarthrotischen Knorpel zu einem deutlichen Anstieg auf 82% kam. Schnabel et al. (253) verglichen frisch extrahierte, primäre humane Chondrozyten und solche, die in Monolayern kultiviert worden waren. Im Rahmen der Dedifferenzierung der Zellen in der Kultur verloren diese auch die Expressionsfähigkeit für VEGF, während die differenzierten Chondrozyten VEGF exprimierten. Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Nachweis von VEGF in Zellkulturen von unrestringierten humanen Nabelschnurblutstammzellen nach chondrogener Stimulation läßt sich daher unter der Annahme einer tatsächlichen chondrozytären Differenzierung mit den genannten Daten in der Literatur, insbesondere von Sekiya et al. (257) in Einklang bringen. Da ein direkter Vergleich der Expressionsmuster der stimulierten Vorläuferzellen mit reifen humanen Chondrozyten nicht vorliegt, kann derzeit nicht beurteilt werden, ob bei den Vorläuferzellen ein erhöhtes Potential zur (sekundären) enchondralen Ossifikation des gebildeten Knorpels vorliegt. Auch wurde kein Nachweis von Anti-Angiogenese-Faktoren geführt. Die Vaskularisation eines Gewebes aber, und damit auch die enchondrale Ossifikation, ist vom Gleichgewicht angio- und antiangiogenetischer Stimuli abhängig (24). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass der in dieser Arbeit zur chondrogenen Stimulierung eingesetzte Wachstumsfaktor TGF- β ein Antiangiogenesefaktor ist, während z.B. die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Faktoren bFGF (basic fibroblast growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor) (s.o.) zu den Angiogenese-stimulierenden Faktoren gezählt werden (24). Weitere Untersuchungen müssen den Einfluß auf eine mögliche Ossifikation des Regeneratknorpels in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsfaktor und/oder dem Einsatz anti-angiogenetischer Faktoren überprüfen.

Autologe mesenchymale Stammzellen erscheinen aus verschiedenen Gründen vorteilhaft gegenüber Chondrozyten für ein Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Die operative Entnahme von gesundem Gelenkknorpel und die notwendige in-vitro-

Vermehrung der Zellen erfordern einen hohen technischen und finanziellen Aufwand und stellen insbesondere für den Patienten eine größere Belastung dar. Knochenmarkszellen dagegen können durch eine Punktion von Beckenkamm oder Sternum ohne wesentliche Langzeitrisiken des Patienten gewonnen werden. Aufgrund ihrer proliferativen Kapazität können MSCs auch als zelluläres Vehikel für gentherapeutisch induzierte Produkte wie Wachstumsfaktoren, z.B. TGF- β , eingesetzt werden (105,106,203). Widersprüchlich sind Aussagen zu einer Kalzifizierung innerhalb des Regeneratgewebes die von einigen Autoren bei Chondrozyten (89a,106), von anderen bei mesenchymalen Zellen gesehen wurde (296). Grundsätzlich ist diese Gefahr bei beiden Zell-Linien gegeben, da MSC zu hypertrophen und daher zur enchondralen Ossifikation neigenden Chondrozyten differenzieren können, andererseits die Kultivierungstechnik bei autologen Chondrozyten auch die hypertrophen Zellen der tiefen Zone einschließt. USSCs aus Nabelschnurrestblut haben gegenüber den mesenchymalen Zellen aus Knochenmark und Periost den Vorteil, dass sie im Rahmen einer Zellbank primär in ausreichender Zahl verfügbar sind. Insbesondere besteht bei fehlender bis geringer Immunogenität (162,298) der Vorteil gegenüber den anderen Zell-Linien einschließlich allogener Chondrozyten (89a), dass sie bei einer klinischen Anwendung auch als Allograft verwendbar sind. Ob eine vorherige chondrogene Stimulation bessere Ergebnisse erzielt als die Transplantation nicht-stimulierter Zellen, muß in weiteren Versuchen gezeigt werden. Angele et al. (13) fanden einen höheren Anteil an osteochondralem Gewebe in MSC-beladenen Kompositen aus Hyaluronsäure und Gelatin, wenn die Zellen zuvor in vitro in einem chondrogenen Medium stimuliert worden waren. Die Arbeitsgruppen von Wakitani (294) und Im (136) dagegen erzielten in Tierversuchen gute histologische Ergebnisse durch Transplantation mesenchymaler Knochenmarkszellen ohne vorangegangene Stimulation, was dafür spricht, dass intrinsische Stimuli durch Wachstumsfaktoren und weitere lokale oder systemische Faktoren eine chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Zellen in situ einleiten können.

In einer akuten Arbeit belegten schließlich Wakitani et al. (295) erstmals in einer klinischen Anwendung den Stellenwert des Einsatzes humaner autologer mesenchymaler Knochenmarkszellen nach in-vitro-Expansion an 24 Patienten. Bei 12 Patienten wurde eine Transplantation der Zellen in einem Kollagen-I-Gel mit Deckung durch einen Periostlappen in einen Defekt der medialen Femurkondyle

vorgenommen, bei einer gleich starken Kontrollgruppe wurde lediglich das Kollagengel und der Periostlappen transplantiert. Alle Patienten hatten zusätzlich eine valgusierende Tibiakopfoosteotomie erhalten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zelltransplantation war der arthroskopische und der histologische Befund in der zelltherapierten Gruppe nach durchschnittlich 42 Wochen besser, im histologischen Score nach Wakitani (294) war der Unterschied signifikant.

Die bisher in klinischer Anwendung befindlichen Methoden zur Behandlung von Gelenknorpeldefekten führen zwar in der Mehrzahl der Fälle zu einer (vorübergehenden) Beschwerdebesserung, können aber keine Restitutio ad integrum bewirken. Die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation als derzeit einzige Methode zur Deckung eines Gelenknorpeldefektes mit hyalinem Knorpel bedingt immer einen Entnahmedefekt und ist in ihren Langzeitergebnissen unsicher. Die autologe Chondrozytentransplantation ist durch die Notwendigkeit von zwei operativen Eingriffen für den Patienten belastend und stellt ein technisch wie ökonomisch aufwendiges Verfahren dar. Die Weiterentwicklung von Verfahren im Rahmen des Tissue Engineering mit Herstellung von Gewebe-Produkten erfordert das Verständnis der physiologischen Regenerationsprozesse sowie aufgrund der Komplexität der Materie eine interdisziplinäre Kooperation der beteiligten Spezialisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen Untersuchungen anderer Autoren zur chondrogenen Differenzierung von Vorläuferzellen aus Knochenmark und Periostgewebe und erschließen durch den erstmalig geführten Nachweis eines solchen Differenzierungspotentials bei unrestringierten Stammzellen aus Nabelschnurrestblut eine neue Quelle von Zellen für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Weitere Versuche sind durchzuführen, um die Ergebnisse dieser in-vitro-Versuche im Tiermodell und später in der klinischen Anwendung am Patienten zu bestätigen. Schließlich soll das von Coutts (69) definierte Ziel einer „biologisch akzeptablen“ Defektreparation erreicht werden: eine Füllung des Defekts mit Knorpel, eine Wiederherstellung der Gelenkkontur, eine Einbindung des Regenerates in seine Umgebung und eine sichere Haltbarkeit, um die bisher eingeschränkte therapeutische Perspektive bei Gelenknorpelschäden grundlegend zu verbessern.

VI. Zusammenfassung

Schon 1743 konstatierte Hunter (134), dass Gelenkknorpelschäden nicht heilen. Dieses ist in der Folgezeit durch viele Autoren bis in die Gegenwart bestätigt worden (53,176). Die epidemiologischen Daten zur Prävalenz von Gelenkknorpelschäden und manifester Arthrose unterstreichen die Notwendigkeit, für diese Erkrankungen bessere Therapieoptionen zu erarbeiten. Gelenkerkrankungen sind die häufigste chronische Erkrankung im Alter, über 40% der über 70-jährigen leiden an einer Gonarthrose und 25% der Betroffenen sind in den Aktivitäten des täglichen Lebens dadurch stark behindert (200).

Symptomatische Knorpelschäden bzw. Arthrosen benötigen in der Regel eine operative Therapie. Die klinische Erfahrung lehrt, dass unbehandelte Knorpeldefekte, die einen größeren Gelenkbereich betreffen, zu einer fortschreitenden Degeneration führen (53). Daraus lässt sich ableiten, dass solche Defekte möglichst früh erkannt und einer entsprechenden Therapie zugeführt werden sollten. Rein symptomatische Verfahren wie Gelenk-Lavage und Gelenk-Debridement können den Arthroseprozess nicht beeinflussen und führen lediglich kurzfristig zu einer Befundverbesserung (12,108,140,254). Andere Verfahren wie Anbohrungen oder Mikrofrakturierungen induzieren über die Freisetzung von mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark eine faserknorpelige Defektdeckung. Längerfristig ist aber der gebildete Faserknorpel den mechanischen Anforderungen nicht gewachsen, so dass es bei entsprechender Defektgröße zur nachfolgenden Arthrose kommt (137). So sind auch die klinischen Ergebnisse dieser Therapieverfahren unsicher (12,56,93,147).

Das einzige Verfahren, mit dem heute ein Gelenkoberflächendefekt mit vollwertigem hyalinem Knorpel rekonstruiert werden kann, besteht in der Übertragung autologer oder allogener Knorpelknochen transplantate, wobei sich letztere aufgrund der Problematik der möglichen Infektübertragung und der Vitalität der Transplantate nicht durchgesetzt haben (72,99,210). Klinische Ergebnisse für dieses Verfahren mit längerer Nachbeobachtungszeit liegen bisher nur für das Kniegelenk und das obere Sprunggelenk vor. Dabei werden zunächst recht gute klinische Resultate erzielt. Ungeklärt ist jedoch bisher das Schicksal des Entnahmedefektes. Ahmad et al. (2) konnten 1 Jahr nach Knorpel-Knochen-Transplantation eine Biopsie aus der Spenderregion entnehmen und fanden mechanisch minderwertiges dichtes, heterogenes Fasergewebe. Nimmt man die Tatsache hinzu, dass die Integrität des subchondralen Knochens für den Erhalt einer Gelenkfläche notwendig ist, ist eine

Sekundärdegeneration im Bereich der Entnahmestelle trotz der in der Literatur berichteten kurz- bis mittelfristig günstigen klinischen Ergebnisse nicht auszuschließen.

Heute werden zur Ergebniskontrolle zunehmend Bewertungen in Form von Patientenfragebögen eingesetzt, die sowohl subjektive Beschwerden des Patienten auch die Veränderungen in dessen psychosozialer Konstellation, den sog. „distress“ berücksichtigen (25,26). Als Instrument zur Dokumentation der subjektiven, die allgemeine Funktion des behandelten Gelenkes darstellenden Ergebnisse nach autologer Knorpel-Knochen-Transplantation am Knie wurde in der vorliegenden Arbeit der WOMAC-Arthrose-Index (25-28,270) gewählt. Dabei handelt es sich um einen Patientenfragebogen zur Erfassung der Symptome und der physischen Funktionseinschränkungen von Patienten mit Gon- oder Koxarthrose im Alltag.

Die funktionellen Ergebnisse nach Knorpel-Knochen-Transplantation im Vergleich zu einem kniegesunden Kollektiv in dieser Arbeit zeigen, dass die Methode insbesondere bei multilokulären Knorpelschäden, jedoch auch bei umschriebenen Läsionen, keine vollständige Wiederherstellung der „Alltagstauglichkeit“ der betroffenen Gelenke in Bezug auf die Gesamtkollektive zulässt, wie dies auch die Arbeiten von Bentley (31), Laprell (158) und Wirth (304) bestätigen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier vorgestellten klinischen Studie, dass die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation bei multi- wie auch unilokulären Knorpelläsionen im Vergleich zu einem knie-gesunden Kontroll-Kollektiv keine Normalisierung der physischen Funktion und Belastbarkeit des Kniegelenkes ermöglicht. Einschränkend muß bemerkt werden, dass in dieser Arbeit das Ausmaß einer möglichen Verbesserung der Beschwerden nicht erfasst wurde. Die Ergebnisse stehen dennoch im Widerspruch zu den meisten der oben zitierten Arbeiten, die hauptsächlich objektive Parameter bei der Gelenkuntersuchung berücksichtigten und zu einer optimistischen Bewertung der Knorpel-Knochen-Transplantation kommen. Es muß hinterfragt werden, inwieweit Publikationen mit Scores mit rein oder überwiegend objektiven Parametern allein geeignet sind, den Nutzen einer Operationsmethode im Hinblick auf die Wiederherstellung der Alltagsfunktionen zu beurteilen. Auch muß eine Mindestnachbeobachtungszeit von 2 Jahren gefordert werden, die bisher nur von wenigen Studien eingehalten wurde. Die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation ist aufgrund der zitierten basis-wissenschaftlichen Daten, der möglichen methodenspezifischen Komplikationen und der dargestellten

Ergebnisse unserer Patienten nicht uneingeschränkt zu empfehlen. Chancen durch Erneuerung der Gelenkfläche im Bereich des Knorpelschadens müssen gegen die potentielle Morbidität durch die Transplantatgewinnung im Spenderareal abgewogen werden

Eine solche Option zur Therapie von Gelenkknorpelschäden stellt das „Tissue engineering“ als eine interdisziplinäre angewandte Wissenschaft zur Wiederherstellung einer defekten Organfunktion dar (157). Das Tissue engineering im Rahmen der Behandlung von Gelenkknorpeldefekten hat den Ersatz der defekten Knorpelareale zum Ziel. Im klinischen Einsatz ist heute die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) (42,43,224) mit oder ohne Einsatz von Trägermaterialien (250). Dabei steht die Vermehrung von im Rahmen einer Biopsie gewonnen autologen Chondrozyten in-vitro, der Erhalt oder die Wiedererlangung des spezifischen Phänotyps zum Zeitpunkt der Replantation und die Bildung einer belastungsfähigen Matrix sowie deren Integration in die Umgebung im Vordergrund (132). Der gewichtigste Nachteil des Verfahrens ist die notwendige zusätzliche Operation zur Entnahme des Knorpelgewebes mit den zu isolierenden Zellen (300). Dadurch wird der Patient gegenüber einem einzeitigen Verfahren erneut den möglichen operativen und anästhesiologischen Komplikationen eines Kniegelenkeingriffs ausgesetzt. Es ist daher naheliegend, zur Regeneration des Knorpels Zellen oder Gewebe zu applizieren, die keine oder lediglich eine geringe Spendermorbidity bedingen

In jüngerer Zeit konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass auch im humanen Knochenmark wie im Periost mesenchymale Progenitorzellen existieren, die unter definierten Bedingungen sowohl in vitro als auch in vivo chondrogen differenzieren können im Sinne einer Expression von Kollagen Typ II und Bildung einer knorpeltypischen Extrazellulärmatrix. Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell, MSC) wurde Anfang der neunziger Jahre von Caplan (60) mit der Beschreibung von ersten Vorläuferzellen eines mesenchymalen Gewebes aus dem Knochenmark erneut popularisiert. Die einzelnen Differenzierungsschritte werden durch extrinsische (Umgebungs-) Signale und intrinsische Wachstumsfaktoren gesteuert (47,48,129,238). Die oben zitierten Arbeiten zur chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen weisen jedoch eine Vielzahl von Unterschieden im Hinblick auf verwendete Zellzahlen, Kulturmedien und -formen, eingesetzte Wachstumsfaktoren und Nachweismethoden

der knorpeltypischen Merkmale auf. In dieser Arbeit wurden sowohl verschiedene Stammzellreihen wie verschiedene Kulturbedingungen untersucht. Wie die meisten anderen Autoren konnten auch wir im System der Pellet-Kultur in allen untersuchten Zell-Linien eine chondrogene Differenzierung zeigen und die Eignung dieses Systems bestätigen. In den Monolayer-Kulturen unserer Versuchsreihe konnten wir bereits mit im Vergleich zur Literatur geringen Zellzahlen den Nachweis chondrozytärer Differenzierung führen.

Die gezeigten Ergebnisse belegen die Daten aus der Literatur für Zellen aus Knochenmark und Periost und zeigen erstmalig die Gültigkeit für unrestringierte Zellen aus Nabelschnurblut (USSC). Sie unterstreichen den Effekt von TGF- β 3 bei der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkzellen und Vorläuferzellen aus Periost. Erstmals wurde hier eine vergleichbare Rolle des TGF- β 3 auch für unrestringierte somatische Nabelschnurblutzellen (USSC) gezeigt.

Da die grundsätzliche Eignung von USSCs als chondrogene Progenitoren im Rahmen des Tissue Engineering im Vordergrund der Fragestellung stand, erfolgte keine statistisch vergleichende Untersuchung. Jedoch konnte zumindest semiquantitativ ein positiver Effekt von 10% FCS auf die Synthese von Matrix-typischen Kollagenen und auf die Zelldichte in den Kulturen mit USSC nachgewiesen werden. Somit lassen sich die oben zitierten Ergebnisse der Literatur betreffs MSC aus Knochenmark auf USSC übertragen, so dass für weitere Untersuchungen mit USSCs zur Therapie von Gelenkknorpelschäden ein serumhaltiges Kulturmedium empfohlen werden kann.

Vergleichbare Daten zu einem möglichen chondrogenen Potential von USSCs und einer entsprechenden Expression von knorpeltypischen Markern existieren bisher nicht. Aufgrund des vergleichbaren Musters in der Synthese von knorpeltypischer Extrazellulär-Matrix, insbesondere von Kollagen II, konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der dargestellten Ergebnisse eine ähnliche chondrogene Potenz der USSC verglichen mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark und Periost unter den hier verwendeten Kulturbedingungen bewiesen werden. Im Vergleich mit den beiden anderen Zell-Linien lag sogar eine konstantere und, wenn auch nicht statistisch untersuchte, höhere Syntheserate von Kollagen II vor, was die potentielle Eignung dieser Zellen für einen Einsatz im Tissue Engineering von Knorpelgewebe zusätzlich unterstreicht.

Da sich resorbierbare Biomaterialien als Träger für zu transplantierende Zellen in verschiedenen Arbeiten als sinnvoll erwiesen haben, wurde in dieser Arbeit auch eine chondrogene Differenzierung von USSC auf einer solchen untersucht. Die Ergebnisse beweisen eine solche chondrogene Differenzierung von USSC mit Produktion einer eigenen, alzian-blau positiven extrazellulären Matrix auch innerhalb der Membran.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen Untersuchungen anderer Autoren zur chondrogenen Differenzierung von Vorläuferzellen aus Knochenmark und Periostgewebe und erschließen durch den erstmalig geführten Nachweis eines solchen Differenzierungspotentials bei unrestringierten Stammzellen aus Nabelschnurrestblut eine neue zelluläre Quelle für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Erstmalig konnte in dieser Arbeit sowohl in der Monolayer- als auch der dreidimensionalen Matrix-Zellkultur chondrogen stimulierter unrestringierter humaner Nabelschnurblutzellen auf Chondro-Gide[®] immunhistochemisch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) nachgewiesen werden. Hier bieten sich neue Ansätze zur Klärung der Frage, ob eine eventuelle sekundäre Ossifikation des gebildeten Gewebes, wie es von anderen Autoren gesehen wurde, durch Anti-Angiogenetische Faktoren positiv beeinflusst werden kann. Weitere Versuche müssen durchgeführt werden, um die Ergebnisse dieser in-vitro-Versuche im Tiermodell und später in der klinischen Anwendung am Patienten zu bestätigen.

VII. Literatur

1. Agneskirchner JD, Brucker P, Burkart A, Imhoff AB (2002) Large osteochondral defects of the femoral condyle : press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 10: 160-168
2. Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater CJ (2002) Evaluation of donor site intrinsic healing rearing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy* 18: 95-98
3. Aigner T, Stöß H, Weseloh G, Zeiler G, Mark K von der (1992) Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B* 62 : 337-345
4. Aigner T, Bertling W, Stöß H, Weseloh G, Mark K von der (1993) Independent expression of fibrill-forming collagens I, II and III in chondrocytes in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 91 : 829-837
5. Aigner T, Vornehm SI, Zeiler G, Dudhia J, Mark K von der, Bayliss MT (1997) Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 40 : 562-569
6. Akizuki S., Mow V.C., Muller F., et al.: Tensile properties of human knee joint cartilage: The influence of ionic conditions, weight bearing and fibrillation on the tensile modulus; *J Orthop Res* 4: 379-392, 1986.
7. Al-Shaikh RA, Chou LB, Mann JA, Dreeben SM, Prieskorn D (2002) Autologous osteochondral grafting for talar cartilage defects. *Foot Ankle Int* 23: 381-389
8. Altman R, Asch E, Bloch D et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29 : 1039-1049
9. Altman RD, Fries JF, Bloch DA et al. (1987) Radiographic assessment of progression in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 30 : 1214-1225
10. Altman R, Alacron G, Appelrouth D et al. (1990) The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 33 : 1601-1610
11. Anderer U, Libera J (2002) In vitro Engineering of Human Autogenous Cartilage. *J Bone Mineral Res* 17: 1420-1429
12. Anders S, Schaumburger J, Grifka J (2001) Intraartikuläre operative Maßnahmen bei Arthrose. *Orthopäde* 30 : 866-880
13. Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B (1999) Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng* 5: 545-554

14. Angst F, Aeschlimann A, Steiner W, Stucki G (2001) Responsiveness of the WOMAC osteoarthritis index as compared with the SF-36 in patients with osteoarthritis of the legs undergoing a comprehensive rehabilitation intervention. *Ann Rheum Dis* 60: 834-840
15. Arbeitsgemeinschaft „Autologe Chondrozytentransplantation ACT und Tissue Engineering“ (2002) *Z Orthop* 140 : 132-137
16. Arevalo-Silva CA, Cao Y, Wenig Y, Vacanti M, Rodriguez A, Vacanti CA, Eavey RD (2001) The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Eng* 7: 81-88
17. Athanasiou KA, Fischer R, Niederauer GG, Puhl W (1995) Effects of excimer laser on healing of articular in rabbits. *J Orthop Res* 13 : 483-494
18. Attmanspacher W, Dittrich V, Stedtfeld HW (2000) Klinische Erfahrungen und kurzfristige Ergebnisse mit OATS. *Arthroskopie* 13 : 103-108
19. Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE (1992) Heterogeneity of articular chondrocytes. In : *Articular cartilage and Osteoarthritis*. Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC. (Hrsg.) Raven Press, New York : 237-249
20. Baltzer AW, Becker C, Liebau C, Krauspe R, Merk HR (2000) Knorpel-Knochen-Transplantation am oberen Sprunggelenk. *Arthroskopie* 13 : 109-112
21. Barry FP, McIntosh A, Murphy JM (1998) Chondrogenic constructs of mesenchymal stem cells on Hyaff-11, a hyaluronan ester, as implants for repair of osteochondral lesions. *Tran Orthop Res Soc* 1998; 23: 799
22. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow : differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 15-268 : 189-200
23. Bauer M, Jackson RW (1988) Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy* 4 : 97-102
24. Becker R, Pufe T, Giessmann N, Kuhlow S, Mentlein R, Petersen W (2002) Die role des Angiogenesfaktors VEGF bei der Heilung von Meniskusläsionen. *Arthroskopie* 15: 190-195
25. Bellamy N, Buchanan WW (1986) A preliminary evaluation of the dimensionality and clinical importance of pain and disability in osteoarthritis of the hip and knee. *Clin Rheumatol* 5: 231-241
26. Bellamy N (1989) Pain assessment in osteoarthritis : Experience with the WOMAC osteoarthritis index. *Semin Arthritis and Rheum* 18(Suppl 2) 14-17
27. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW (1988) Validation study of WOMAC : a health status instrument for measuring clinically important

patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. J Rheumatol 15 : 1833-1840

28. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Duku E (1990) Signal measurement strategies: are they feasible and do they offer any advantage and outcome measurement in osteoarthritis ? Arthritis Rheumat 33: 739-745

29. Benedetto KP (1992) The knee ligament standard evaluation form. Arthroskopie 5

30. Benninghoff A (1925) Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion : II. Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. Z Zellforsch 2 : 783-862

31. Bentley G, Greer RB (1971) Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. Nature 230: 385-388

32. Bentley G, Biant LC, Hunter M, Williams A, Skinner J, Carrington RW, Pringle J (2001) Articular cartilage repair in the young adult knee – a prospective randomised controlled trial : autologous chondrocyte transplantation versus mosaicplasty. Präsentiert auf den Jahreskongreß der British Orthopaedic Association, 2001

33. Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 30 : 215-224
Bianco P, Geron Robey P (2000) Marrow stromal cells. J Clin Invest 105 : 1663-1668

34. Bianco P, Robey P (2000) Marrow stromal cells. J Clin Invest 105: 1663-1668

35. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R (1998) Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes *in vitro*. J Orthop Res 16 : 207-216

36. Blaschke U.K., Eikenberry E.F., Hulmes D.J.S., et al: Collagen IX nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils; J Biol Chem 275: 10370-10378, 2000

37. Blunk T, Sieminski AI, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002) Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. Tissue Eng 8: 73-84

38. Bobic V (1999) Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen. Orthopäde 28 : 19-25

39. Böhm HJ, Könings P (2001) Adulte Stammzellen. Trauma Berufskrankh 3: 375-377

40. Bös L, Ellermann A, Aus dem Spring ES (2000) Ergebnisse und Komplikationen mit dem OATS-Instrumentarium. Arthroskopie 13 : 99-103

41. Bouwmeester S, Beckers J, Kuijjer R, Linden A, Bulstra S (1997) Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 21: 313- 317
42. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895
43. Brittberg M, Faber B, Sjögren-Jansson E, Tarkowski A, Peterson L, Lindahl A (1996) Clonal growth of human articular cartilage and role of periosteum in chondrogenesis. In : Brittberg M (Hrsg.) *Cartilage Repair*. Vasastadens Bokbinderi, Göteborg, III: 1-21
44. Brown TD, Pope DF, Hale JE, Buckwalter JA, Brand RA (1991) Effects of osteochondral defect size on cartilage contact stress. *J Orthop Res* 9 : 559-567
45. Browne J, Branch TP (2000) Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Acad Orthop Surg* 8: 180-189
46. Bruder SP, Find DJ, Caplan AI (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56: 283-294
47. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64: 278-294
48. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP (1998) Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 13: 655-563
49. Bruns J, Behrens P, Silbermann M (1997) Das Prinzip der Transplantation autogenen Rippenperichondriums zur Behandlung von tiefen Gelenkknorpeldefekten. *Z Orthop* 135: 138-144
50. Bruns J, Steinhagen J (1999) Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpelschäden. *Orthopäde* 28 : 52-60
51. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1995) Bone biology, part II. Formation, modelling, remodelling and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg Am* 77 : 1276
52. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage. Part I : Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 79A : 600-611
53. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage. Part II : Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 79A : 612-632

54. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41 : 1331-1342
55. Buddecke E (1984) *Grundriss der Biochemie*. 7.Auflage, De Gruyter, Berlin, New York
56. Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB (2001) Operative Therapiemöglichkeiten des Knorpelschadens. *Unfallchirurg* 104 : 798-807
57. Buschman M.D., Grodzinsky A.J.: A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage; *J Biomech Eng* 117: 179-192, 1995
58. Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes D, Halperin N, Nevo Z (1996) Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop* 330: 234-243
59. Camper L, Heinegard D, Lundgren-Akerlund E (1997) Integrin alpha 2 beta 1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *J Cell Biol* 138: 1159-1167
60. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* : 641-650
- 60a. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113: 59-69
61. Chakravarti S., Magnuson T., Lass J.H., et al: Lumican regulates collagen fibril assembly: Skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican; *J Cell Biol* 141: 1277-1286, 1998
62. Chesterman PJ und Smith AU (1968) Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg* 50: 184-197
63. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R (1991) Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 113 : 143-151
64. Clark JM (1991) Variation of collagen fiber alignment in a joint surface : a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit and man. *J Orthop Res* 9 : 246-257
65. Collier MA, Haugland LM, Bellamy J, Johnson LL, Rohrer MD, Walls RC, Bartels KE (1993) Effects of holmium:YAG laser on equine articular cartilage and subchondral bone adjacent to traumatic lesions : a histopathological assessment. *Arthroscopy* 9 : 536-545
66. Constant CR, Murley AH (1997) A clinical method of functional assessment of the shoulder. *Clin Orthop* 214: 160-164

67. Convery FR, Akeson WH, Keown G (1972) The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. Clin Orthop 82 : 253-262
68. Costell M., Gustafsson E., Aszodi A., et al (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes; J Cell Biol 147:1109-1122,
69. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D (2001) Matrices for cartilage repair. Clin Orthop 391S : S271-S279
70. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. Arthroscopy 13 : 456-460
71. Cremer MA, Rosloniec E, kang AH (1998) The cartilage collagens : a review of their structure, organization and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. J Mol Med 76 : 275-288
72. Czitrom AA, Keating S, Gross AE (1990) The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. J Bone Joint Surg (Am) 72 : 574-581
73. Dardzinski BJ, Mosher TJ, Li S, Van Slyke MA, Smith MB (1997) Spatial variation of T₂ in human articular cartilage. Radiology 205: 546-550
74. Diab M., Wu J., Eyre D.R. (1996) Collagen type IX from human cartilage: a structural profile or intermolecular cross-linking sites. J Biochem 314: 327-332
75. Diduch D, Jordan L, Mierisch C, Balian G (2000) Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. Arthroscopy 16 : 571-577
76. Douglas S.P., Jenkins J.M., Kadle K.E. (1997) Collagen IX: evidence for a structural association between NC4 domains in cartilage and a novel cleavage site in the α 1(IX) chain. Matrix Biol 16: 497-505,
77. Draenert K, Draenert Y (1988) A new procedure for bone biopsies and cartilage and bone transplantation. Sandorama III / IV : 33-40
78. Einhorn TA. Clinically Applied Models of Bone Regeneration in Tissue Engineering Research (1999) Clinical Orthop 367S: 59-67
79. Ehlers E, Fuss M et al. (1999) Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light, scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen I/III sponge. Anat Ann 181: 513-518
80. Ekman S, Reinholt FP, Hultenby k, Heinegard D (1997) Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in porcine growth cartilage. Calcif Tissue Int 60: 547-553
81. Elder SH (2002) Conditioned medium of mechanically compressed chick limb bud cells promotes chondrocyte differentiation. J Orthop Sci 7:538-543

82. Eyre DR, Wu JJ, Apone S (1987) A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types; *J Rheumatol* 14: 25-27
83. Eyre DR, Dickson IR, van Ness K (1988) Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxyypyridinium residues; *J Biochem* 252: 495-500
84. Eyre DR, Wu JJ (1995) Collagen structure and cartilage matrix integrity; *J Rheumatol* 22 Suppl. 43: 82-88
85. Felson DT (1998) Epidemiology of osteoarthritis. In : Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS (Hrsg.) *Osteoarthritis*. Oxford University press, Oxford, New York, Tokio: 13-22
86. Fortier, LA, Balkman CE, Sandell LJ, Ratcliffe A, Nixon AJ (2001) Insulin-like growth factor-I gene expression patterns during spontaneous healing of acute articular cartilage injury. *J Orthop Res* 19: 720-728
87. Frank LR, Brossmann J, Buxton RB, Resnick D (1997) MR imaging truncation artifacts can create a false laminar appearance in cartilage. *AJR* 168: 547-554
88. Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28: 891-899
89. Freed LE, Martin I, Vunjak-Novakovic G (1999) Frontiers in tissue engineering- in vitro modulation of chondrogenesis. *Clin Orthop* 367 S, S46-S58
- 89a. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman D, Pachence J (1997) Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg* 79-Br : 831-836
90. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6 : 230-247
91. Friedenstein AJ (1974) Precursors of fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2 : 83-92
92. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ (1999) Long-term follow up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 30 : 583-588
93. Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD (1984) Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop* 182 : 200- 205
94. Fritsch KG, Josimovic´-Alasvic´O (1999) Chondroneogenese durch autologe Chondrozytentransplantation (ACT). *Arthroskopie* 12 : 43-49

95. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) : Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62: 79-89
96. Fuss M, Ehlers E, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P (2000) Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Anat Ann* 182: 303-310
97. Garnero P, Piperno M, Ginetys E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E (2001) Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* 60: 619-626
98. Garrett JC (1986) Treatment of osteochondral defects of the distal femur with fresh osteochondral allografts : a preliminary report. *Arthroscopy* 2 : 222-226
99. Ghazavi MT, Pritzker KP, Davis AM, Gross AE (1997) Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 79 : 1008-1013
100. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5 : 623-628
101. Gesundheitsbericht für Deutschland : Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (Hrsg.Statistisches Bundesamt) (1998). Metzeler-Poeschel, Stuttgart
102. Gillquist J, Messner K (1999) Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports Med* 27 : 143-156
103. Glowacki J, Trepman E, Folkman J (1983) Cell shape and phenotype expression in chondrocytes. *Proc Soc Biol Med* 172: 93-98
104. Goymann V (1999) Abrasionsarthroplastik. *Orthopäde* 28 : 11-18
105. Grande DA, Lucas PA, Manji R, Schwartz RE, Southerland SS (1995) repair of articular cartilage defects using mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 4 : 345-353
106. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE (1999) Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop* 367S : S176-S185
107. Green W (1977) Articular cartilage repair: behaviour of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop* 124: 237-250
108. Grifka J, Kalteis T, Plitz W, Knaup C, Anders S, Philippou S (1999) Möglichkeiten der gelenkerhaltenden Gonarthrosetherapie mittels Arthroskopie und ergänzender intra-artikulärer Verfahren. *Arthroskopie* 12: 9-16

109. Hall FM, Wyshak G (1980) Thickness of articular cartilage in the normal knee. *J Bone Joint Surg Am* 62: 408-413
110. Hall P, Fitzsimmons J, O'Driscoll S (1998) The effect of an exposure on periosteal chondrogenesis in tissue culture. *Trans Orthop Res Soc* 23: 926
111. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I, Toth J, Dioszegi Z, Kendik Z (1997) Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects. *Orthop Intern* 5 : 175-181
112. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I (1997) Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 5: 262-267
113. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M (1998) Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 21 : 751-756
114. Hangody L, Kish G, Karpati Z (1998) Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty: a multicentric, comparative, prospective study. *Index Traumat Sport* 5: 3-9
115. Hangody L, Kish G, Modis L, Szerb I, Gaspar L, Dioszegi Z, Kendik Z (2001) Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients. *Foot Ankle Int* 22: 552-558
116. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G (2001) Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* 391 (Suppl): 328-336
117. Hardaker WT Jr, Garrett WE Jr, Bassett FH 3rd (1990) Evaluation of acute traumatic hemarthrosis of the knee joint. *South Med J* 83 : 640-644
118. Harris WH, Maloney WJ (1989) Hybrid total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 249: 21-29
119. Hedbom I, Heinegard D (1993) Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens; *J Biol Chem* 268: 27307-27312
120. Hefti F, Müller W (1993) Heutiger Stand der Evaluation von Kniebandläsionen. *Orthopäde* 22: 351-362
121. Herman JH, Khosla RC (1988) In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism. *J Rheumatol* 15 : 1818-1826
122. Hiraki Y, Shukunami C, Iyama K, Mizuta H (2001) Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage Suppl A* : 102-108
123. Hoikka VE, Jaroma HJ, Ritsilä VA (1990) Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 61 : 36-39

124. Hochberg MC (1991) Epidemiology and genetics of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 3: 662-668
125. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S (1960) The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 1533
126. Homandberg GA, Davis G, Maniglia C, Shrikhande A (1997) Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments causes cleavage of aggrecan at the same site as found in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cart* 5: 450-453
127. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Van der Linden AJ (1990) Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg* 72B : 1003-1007
128. Hopkinson W, Mitchell W (1985) Chondral fractures of the knee. *Am J Sports Med* 13 : 309-312
129. Horch RE, Bannasch H, Kopp J, Andree C, Stark GB (1998) Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant* 7 : 309-318
130. Horner A, Bishop NJ, Bord S, Beton C, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE (1999) Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat* 194: 519-524
131. Howlett CR, Cave J, Williamson M, Framer J, Ali SY, Bab I, Owen ME (1986) Mineralization of in -vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. *Clin Orthop* 213 : 251-263
132. Huch K, Stöve J, Puhl W, Günther KP (2002) Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. *Z Orthop* 140: 145-152
133. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial thickness defects in articular cartilage : cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 78A : 721
134. Hunter W (1743) On the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos Trans R Soc* 42B: 514-521
135. Huss R (2000) Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 9: 783-793
136. Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH (2001) Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg* 83Br : 289-294
137. Imhoff AB, Öttl GM, Burkart A, Traub S (1999) Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde* 28 : 33-44

138. Imhoff AB, Burkart A, Öttl GM (1999) Der posteriore Kondylentransfer. Erste Erfahrungen mit einer Salvageoperation. *Orthopäde* 28 : 45-52
139. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Maukherjee N, O'Driscoll SW (2001) Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 9 : 215-223
140. Jackson RW, Silver R, Marans H (1986) Arthroscopic treatment of degenerative joint disease. *Arthroscopy* 2: 114
141. Jaeger M (1999) Biokompatibilitäts-Testung von PMMA und PMMA-HA-Knochenzement mit der Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur in vitro. Dissertationsschrift, Universität Marburg , Verlag Görlich u. Weiershäuser, Marburg
142. Jaeger M, Wild A, Fuss M, Werner A, Krauspe R (2002) Vorteile von Biomatrices bei der Chondrogenese von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. *Z Orthop* 140: 681-689
143. Jaeger M , Wild A, Krauspe R (2002) Pluripotente mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (I) : Grundlagen. *Osteologie* 11 : 55-77
144. Jakob RP, Franz T, Gaultier E, Mainil-Varlet P (2002) Autologous osteochondral grafting in the knee : indication, results and reflections. *Clin Orthop* 401: 170-184
145. Jay GD, Tantravahi U, Britt DE, Barrach HJ, Cha C (2001) Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *J Orthop Res* 19: 677-687
146. Jenkins RN, Osborne-Lawrence SL, Sinclair AK, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, DUBY AD (1990) Structure and chromosomal location of the human gene encoding cartilage matrix protein. *J Biol Chem* 265: 19624-19631
147. Johnson LL (1991) Arthroscopic abrasion arthroplasty. In: McGinty JB (ed) *Operative Arthroscopy*. Raven Press, New York, 319-323
148. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VC, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research* 238 : 265-272
149. Johnstone B, Yoo JU (1999) Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop* 367 : 156-162
150. Keene D.R., Jordon C.D., Reinhardt D.P., et al.: Fibrillin-1 in human cartilage: developmental expression and formation of special banded fibers; *J Histochem Cytochem* 45:1069-1082, 1997
151. Kellgren JH (1963) The epidemiology of chronic rheumatism. Vol II: Atlas of standard radiographs of arthritis. Blackwell, Oxford

152. Kempson G.E., Muir H., Pollard C., Tuke M.: The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycan; *Biochem Biophys Acta* 297: 465-472, 1973
153. Klagsbrun M (1979) Large scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58: 560-564
154. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Mueller PK, Rohwedel J (2000) Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro : activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92 : 193-205
155. Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ-MA, Daniel JC (1982) Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro (II). Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 93: 751-757
156. Lang P, Bergman G, Bobic V (1998) Stanford protocol for MRI of articular cartilage: state of the art 1998. *ICRS newsletter* 11
157. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260 : 920
158. Laprell H , Petersen W (2001) Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS) : 6-12 years´follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 121 : 248-253
159. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M (2000) Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the knee. *J Orthop Res* 18 : 790-799
160. Lequesne MG, Mery C, Samson M, Gerard P (1987) Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests. *Scand J Rheumatol* 65 (Suppl): 85-89
161. Liebau C, Krämer R, Haak H, Baltzer A, Arnold J, Merk H, Krauspe R (2000) Technik der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation. *Arthroskopie* 13 : 94-98
162. Liechty K, MacKenzie T, Shaaban A, Radu A, Moseley A, Deans R, Marshak D, Flake A (2000) Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nature Medicine*, 6: 1282-1286
163. Lindhorst E, Vail TP, Guilak F, Wang H, Setton LA, Vilim V, Kraus VB (2000) Longitudinal characterization of synovial fluid biomarkers in the canine meniscectomy model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 18: 269-280
164. Lippiello L, Chakkalakal D, Connolly JF (1990) Pulsing direct current-induced repair of articular cartilage in rabbit osteochondral defects. *J Orthop Res* 8 : 266-275
165. Liu H, Lee YW, Dean MF (1998) Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochem Biophys Acta* 1425: 505-515

166. Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK (1994) Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 53: 8-13
167. Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Boyan BD (2000) Der Differenzierungsgrad von Chondrozyten und ihre Vorbehandlung mit „platelet-derived-growth-factor“. *Orthopäde* 29 : 120-128
168. Lorentzon R, Alfredson H, Hildingsson C (1998) Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 6 : 202-208
169. Luo G., Ducey P., McKee M.D., et al: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein; *Nature* 6:78-81, 1997
170. Lysholm J, Gilchrist J (1982) Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring system. *Am J Sports Med* 10: 150-154
171. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FY (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Tissue Eng* 4 : 415
172. Maeda M, Tani S, Sano A, Fujioka K. (1999) Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release* 12/6, 62(3), 313 - 324
173. Majumdar MK, Wang E, Morris EA (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189 : 275-84
174. Maletius W, Aigner T (1999) Morphologie und Molekularpathologie der Osteoarthrose. *Arthroskopie* 12 : 3-8
175. Malinin TI, Mnaymneh W, Lo HK, Hinkle DK (1994) Cryopreservation of articular cartilage. Ultrastructural observations and long-term results of experimental distal femoral transplantation. *Clin Orthop* 303 : 18-32
176. Mankin HJ (1982) The reponse of articular cartilage to mechanical injury. *Journal Bone Joint Surg Am* 64 : 460-66
177. Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D (2001) Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem* 276: 32883-32888
178. Mardon HJ, Bee J, van der Mark K, Owen ME (1987) Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats. *Cell Tissue Res* 250 : 157-165
179. Maroudas A., Mizrahi J., Katz E.P., et al: Physicochemical properties and functional behavior of normal and osteoarthritic human cartilage. In: K.E. Kuettner et al. (Hrsg.): *Articular Cartilage Biochemistry*. Raven Press, New York 311-329, 1986

180. Maroudas A., Schneidermann R., Popper O.: The role of water, proteoglycan and collagen in solute transport in cartilage. In: K.E. Kuettner et al. (Hrsg.): Articular Cartilage and Osteoarthritis. Raven Press, New York 355-371, 1992
181. Matsusue Y, Yamamuro T, Hma H (1993) Case report : Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with cruciate ligament disruption. Arthroscopy 9 : 318-321
182. Mayne R, Brewton R, Mayne P, Baker J (1993) Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. J Biol Chem 268 : 9381-9386
183. Mandler M., Eich-Bender S.G., Vaughan L., et al (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI; J Cell Biol 108: 191-197, 1989
184. Messner K, Maletius W (1996) The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. Acta Orthop Scand 67 : 165-168
185. Miyazaki Y, Tsukazaki T, Hirota Y, Yonekura A, Osaki M, Shindo H, Yamashita S (2000) Dexamethasone inhibition of TGF beta-induced cell growth and type II collagen mRNA expression through ERK-integrated AP-1 activity in cultured rat articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 8 : 378-385
186. Minas T (1998) Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: Economics and quality of life. Am J Orthop 27: 739-744
187. Minas T, Nehrer ST (1997) Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. Orthopedics 20 : 525-538
188. Moeller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, Georgescu HJ, Robbins PD, Evans CH (2000) TGFβ-1-Gentransfer in Gelenkknorpelzellen. Stimulierende Wirkung in der extrazellulären Matrixsynthese. Orthopäde 29 : 75-79
189. Mohr W (1984) Gelenkkrankheiten. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
190. Mohr W (1986) Pathomorphologische Aspekte zur konservativen Therapie der Arthrose. Orthopäde 15 : 366-378
191. Mohr W (1998) Morphogenese der Osteoarthrose. Arthroskopie 6 : 195-200
192. Morrone G, Guzzardella GA, Tigani D, Torricelli P, Fini M, Giardino R (2000) Biostimulation of human chondrocytes with GA-Al-As diode laser : in vitro research. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 28 : 193-201
193. Mow VC, Holmes MH, Lai WM (1984) Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review; J Biomech 17:377-394
194. Mow VC, Zhu W, Ratcliffe A (1991) Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: V.C. Mow, W.C. Hayes (Hrsg.): Basic Orthopaedic Biomechanics. Raven Press, New York 143-198

195. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR (1992): Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical material and structures; *Biomaterials* 13:67-97
196. Mueller B, Kohn D (1999) Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochenanbohrung nach Pridie. *Orthopäde* 28 : 4-10
197. Mueller W, Biedert R, Hefti F (1988) OAK knee evaluation. *Clin Orthop* 232: 37-50
198. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 : 1161
199. Neyret P, Donnell ST, Dejour P, Dejour H (1993) Partial meniscectomy and anterior cruciate ligament rupture in soccer players. A study with a minimum 20-year follow up. *Am J Sports Med* 21: 455-460
200. Niethard FU (2002) Knorpelersatz – Arthroreseforschung tut not ! *Z Orthop* 140: 143-144
201. Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B (1999) Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 42: 2631-2637
202. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H (1999) Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 17: 475-87
203. Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS (2002) In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8 : 131-143
204. Odorico JS, Kaufman DS, Thompson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 19 : 193-204
205. O`Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1986) The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 68 : 1017-1035
206. O`Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1988) Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 70 : 595-606
207. O`Driscoll SW (1998) Current concepts review : The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80 : 1795-1812
208. O`Driscoll SW, Fitzsimmons JS (2001) The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop* 391S : 190-207

209. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S (1990) Marrow cell induced osteogenesis and chondrogenesis in porous calcium phosphate ceramics. Clinical implant materials. In: Heimke G, Soltesz U, Lee AJC (Hrsg.) Advances in Biomaterials. Elsevier Science, Amsterdam, 225-230
210. Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ (1996) Chondrocyte Survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. J Orthop Res, 14 : 413-416
211. Okimura A, Okada Y, Makihira S, Pan H, Yu L, Tanne K, Imai K, Yamada H, Kawamoto T, Noshiro M, Yan W, Kato Y (1997) Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. Arthritis Rheum 40: 1029-1036
212. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Lorillo PA, Walker AM (1995) Incidence of symptomatic hand, hip and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. Arthritis Rheum 38: 1134-1141
213. Otte P (2001) Der Arthrose-Prozeß. Teil 1 : Osteochondrale Strukturen. Novartis Pharma Verlag, Nürnberg, 13-66
214. Otterness IG, Weiner E, Swindell AC, Zimmerer RO, Ionescu M, Poole AR (2001) An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis. Relationship of the markers to clinical end-points. Osteoarthritis Cartilage 9 : 224-231
215. Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE (1995) The use of lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. J Bone Joint Surg Am 77 : 65-72
216. Outerbridge RE (1961) The etiology of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg Br 43 : 752-757
217. Pässler HH (2000) Die Mikrofrakturierung zur Behandlung von Knorpeldefekten. Zentralbl Chir 125 : 500-504
218. Pelinkovic D, Horas U, Engelhard M, Lee JY, Huard J, Fu FH (2002) Getherapie von Knorpelgewebe. Z Orthop 140 : 153-159
219. Pereira R, Halford K, O'Hara M, Leeper D, Sokolov B, Pollard M, Bagasra O, Prockop D (1995) Cultured adherent cells from bone marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 4857-4861
220. Perka C, Schultz O, Sittlinger M, Zippel H (2000) Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. Orthopäde 29 : 112-119
221. Petersen W, Tsokos M, Pufe T (2002) Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth plate and epiphyseal cartilage. J Anat 201: 153-157
223. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A (2002) Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. Am J Sports Med 30: 2-12

224. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A (2000) Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374: 212-235
225. Pfander D, Kortje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, Swoboda B (2001) Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Ann Rheum Dis* 60: 1070-1073
226. Phinney D, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop D (1999) Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75: 424-436
227. Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG (1983) Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol* 54 : 285-290
228. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147
229. Poole A.R., Webber C., Pidoux I., et al (1986) Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage, and the presence of an immunologically related species in other tissues; *J Histochem Cytochem* 34: 619-625
230. Poole A.R., Rosenberg L.C., Reiner A., et al (1996): Contents and distribution of the proteoglycan decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage; *J Orthop Res* 14:681-689
231. Poole CA (1997) Articular cartilage chondrons : form, function and failure. *J Anat* 191: 1-13
232. Poole A.R.: Cartilage in health and disease (2001) In: Koopman W (ed.): *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*. Ed 14, Vol 1 New York, Lippincott Williams and Wilkins, 2260-2284
233. Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* 41 : 618-619
234. Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA (1994) Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 15 : 774-778
235. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R (2001) Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 1482-1485
236. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R (2001) Splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 44: 1082-1088

237. Pullig O, Pfander D, Swoboda B (2001) Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und –progression. *Der Orthopäde* 30: 825-833
238. Quarto R, Thomas D, Liang D (1995) Bone progenitor cells deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 56: 123-128
239. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluron-based biopolymers als delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors (2000) *J Biomed Mater Res* 50: 101-109
240. Radin EL, EhrlichMG, Chernakc R, Abernethy P, Paul IL, Rose RM (1978) Effect of repetitive impulse loading on the knee joints of rabbits. *Clin Orthop* 131 : 288-293
241. Reindel ES, Ayroso AM, Chen Ac, Chun DM, Schinagl RM, Sah RL (1995) Integrative repair of articular cartilage in vitro: adhesive strength of the interface region. *J Orthop Res* 13: 751-760
242. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S (1999) Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 81 : 1064-1068
243. Roughley PJ (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* 3: 342-347
244. Rowe CR (1988) *The Shoulder*. Churchill Livingstone, New York
245. Rudert M, Hirschmann F, Wirth CJ (1999) Wachstumsverhalten von Chondrozyten auf unterschiedlichen Trägersubstanzen. *Orthopäde* 28 : 68-75
246. Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ (2000) Bioartificial cartilage. *Cell Tissues Organs* 167: 95-105
247. Saase J von, Romunde J von, Cats L , Vandenbroucke J, Valkenburg H (1989) Epidemiology of osteoarthritis. Zoetemeer survey : comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 48 : 271-280
248. Sammarco VJ, Gorab R, Miller R, Brooks PJ (1997) Human articular cartilage storage in cell culture medium : guidelines for storage of fresh osteochondral allografts. *Orthopedics* 20 : 497-500
249. Schaefer DJ, Klemt C, Zhang XH, Stark GB (2000) Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung. *Chirurg* 71 : 1001-1008
250. Schatz KD (2001) Erste Erfahrungen mit matrixassistierter Knorpelzell-transplantation. *arthritis + rheuma* 21 : 262-268

251. Schenk RC, Goodnight JM (1996) Current concepts review : Osteochondrosis dissecans. J Bone Joint Surg Am 78 : 439 - 456
252. Schmid T, Popp R, Linsemayer T (1990) Hypertrophic cartilage matrix : type X collagen, supramolecular assembly and calcification. Ann NY Acad Sci 580 : 64-73
253. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J (2002) Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis cartilage 10: 62-70
254. Schneider T, Liebau C, Krämer R, Merk H (1999) 10-Jahres-Analyse nach arthroskopischem Kniegelenkdébridement bei Gonarthrose. Arthroskopie 12: 17-21
255. Schultze M, Kuettner KE, Cole AA (2000) Adulte humane Chondrozyten in Alginatkultur. Beibehaltung des Phänotyps für die weitere Anwendung in Transplantationsmodellen. Orthopäde 29 : 100-107
256. Schumacher B.L., Hughes C.E., Kuettner K.E., et al: Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial gene protein synthesized by cells lining synovial joints; J Orthop Res 17: 110-120, 1999
257. Sekiya I, Jussi TV, Larson BL, Prockop DJ (2002) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. Developmental Biology 99: 4397-4402
258. Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ (2002) Chondral injuries. Curr Opin Rheumatol 14 : 134-141
259. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg 79-A : 1452-1463
260. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg 75A : 532-553
261. Shen Z, Gantcheva S, Mansson B, Heinegard D, Sommarin Y (1998) Chondroadherin expression changes in skeletal development. Biochem J 15-330 : 549-557
262. Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C (2001) Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten – Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafmodell. Z Orthop 139 : 382-386
263. Simonian PT, Sussmann PS, Wickiewicz TL, Paletta GA, Warren RF (1998) Contact pressures at osteochondral donor sites at the knee. Am J Sports Med 26 : 491-494
264. Smith G.N.Jr., Brandt K.D.: Hypothesis: can type IX collagen „glue“ together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism; J Rheumatol 19:14-17, 1992

265. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI (2001) Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. Clin Orthop 391S : S161-S170
266. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. Orthopäde 28 : 26-32
267. Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Gohlke-Steinwachs U (1999) Klinische und zellbiologische Aspekte der autologen Chondrozytenimplantation. Unfallchirurg 102 : 855-860
268. Stevenson S, Danucci GA, Sharkey NA, Pool RR (1989) The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. J Bone Joint Surg Am 71 : 1297-1307
270. Stucki G, Meyer D, Stucki S, Michel BA, Thyndall AG, Dick W, Theiler R (1996) Evaluation einer deutschen Version des WOMAC-Arthroseindex. Z Rheumatol 55: 40-49
271. Swiontkowski MF, Engelberg R, Martin DP, Agel J (1999) Short musculoskeletal function assessment questionnaire: reliability, validity and responsiveness. J Bone Joint Surg Am 81 : 1245-1260
272. Swoboda B, Pullig O, Kirsch T, Kladny B, Steinhäuser B, Weseloh G (1998) Increased content of type VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage. Quantitation by inhibition-ELISA. J Orthop Res 16: 96-99
273. Swoboda B (2001) Aspekte der epidemiologischen Arthroseforschung. Orthopäde 30: 834-840
274. Tegner Y, Lysholm J (1985) Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. Clin Orthop 198: 43-49
275. The cartilage standard evaluation form / knee and cartilage repair assessment (1998) Newsletter ICRS (Issue Spring 98) : 5-8
276. Theiler R, Sangha O, Schaeren S, Michel BA, Tyndall A, Dick W, Stucki G (1999) Superior responsiveness of the pain and function sections of the WOMAC index as compared to the Lequesne-Algofunctional Index in patients with osteoarthritis of the lower extremities. Osteoarthritis Cartilage 7: 515-519
277. Thompson RC jr (1975) An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint. Clin Orthop 107 : 239-248
278. Thorp BH, Anderson I, Jakowlew SB (1992) Transforming growth factor-beta1, -beta 2 and -beta 3 in cartilage and bone cells during enchondral ossification in the chick limb. Development 114: 907-911
279. Thorp BH, Jakowlew SB (1994) Altered localisation of transforming growth factor- beta 3 during endochondral ossification in rachitic chicks. Bone 15: 59-64

280. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, et al (2001) Mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX; *J Biol Chem* 276: 6083-6092
281. Treppo S, Koepp H, Quan EC, Cole AA, Kuettner KE, Grodzinsky AJ (2000) Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res* 18: 739-748
282. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM (1983) Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220 : 680
283. Van Osch GJ, van der Veen SW, Buma P, Verwoerd HL (1998) Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. *Matrix Biol* 17: 413-424
284. Van Susante J, Buma P, van Beuningen H, van den berg W, Veth R (2000) Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. *J orthop Res* 18: 68-77
285. Velikonja NK, Wozniak G, Malicev E, Knezevic M, Jeras M (2001) Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured in vitro for autologous transplantation. *Pflugers Arch* 442: 169-170
286. Venn M.F.: Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage; *Ann Rheum Dis* 37: 168-174, 1979
287. Vilim V, Vytasek R, Olejarova M, Machacek S, Gatterova J, Prochazka B, Kraus VB, Pavelka K (2001) Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects the presence of clinically diagnosed synovitis in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 612-618
288. Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller PK (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes loose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267: 531-532
289. Von der Mark K, Conrad G (1979) Cartilage cell differentiation. *Clin Orthop* 139:185-205
290. Villiger PM, Lotz M (1992) Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. *J Cell Physiol* 151: 318-325
291. Villiger PM, Kusari AB, ten Dijke P, Lotz M (1993) IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes. *J Immunol* 151 : 3337-3344
292. Wagner H (1964) Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop* 98 : 333-355

293. Wagner H (1972) Möglichkeiten und Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. Z Orthop 110 : 708-715
294. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am76 : 579-592
295. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M (2002) Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis and Cartilage 10 : 199-206
296. Wakitani S, Yamamoto T (2002) Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. Microsc Res Tech 58: 14-18
297. Warman M.L.: Human genetic insights into skeletal development, growth and homeostasis; Clin Orthop 379 (Suppl):40-54, 2000
298. Wernet P, Callejas J, Enczmann J, Koegler G, Knipper A, Derra E, Röher HD, Jonas M (1999) Osteoblast precursor cells derived from human umbilical cord blood. Exp Hematol 27: 117 (Abstract)
299. Wernet P (2000) Patent WO 02/36751 A2, World Intellectual Property Organization
300. Wildner M, Sangha O, Behrend C (2000) Wirtschaftlichkeitsuntersuchung zur autologen Chondrozytentransplantation. Arthroskopie 13 : 123-131
301. Wildner M, Sangha O (1999) Epidemiologic and economic aspects of osteoarthrosis. In : Grifka J, Oglivie-Harris DJ (Hrsg) Osteoarthrosis - fundamentals and strategies for joint-preserving treatment. Springer, Berlin – Heidelberg –New York
302. Wilke A, Heil F, Jäger M, Kienapfel H, Griss P, Franke RP, Jones D (1997) Biocompatibility of testing bioresorbable polymers Poly (L-Lactid-CO D. L-Lactid) 90:19 and 70:30. 7th Annual Conference of European Orthopaedic Research Society (EORS), Barcelona 1997
303. Williams DF (1988) Consensus and definitions in biomaterials. In : DePutter C, DeLange G, DeGroot K, Lee AJ (Hrsg.) Advances in Biomaterials. Elsevier Science, Amsterdam, 11-16
304. Wirth T, Rauch G, Schuler P, Griss P (1991) Das autologe Knorpel-Knochen-Transplantat zur Therapie der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. Z Orthop 129: 80-84
305. Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J (2000) Effect of transforming growth factor beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 61: 1003-1010

306. Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S (1985) The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. Clin Orthop 201 : 43-50
307. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B (1998) The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. J Bone Joint Surg 80-A: 1745-1757.
308. Zacher J, Gursche A (2001) Diagnostik der Arthrose. Orthopäde 30 : 841-847
309. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M (2001) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes.
311. Zhao GQ, Zhou X, Eberspaecher H, Solursh M, de Crombughe B (1993) Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8633-8637
312. Zhao GQ, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombughe B (1994) The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development. Mech Dev 48: 245-254

VIII. Abkürzungsverzeichnis

ACDA	Anitcoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
AOFAS	American Association of Foot and Ankle Surgeons
ARC	American College of Rheumatology
BFGF	Basic Fibroblast Growth factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CD-RAP	Cartilage Derived Retinoic Acid Sensitive Protein
CFU	Colony Forming Unit
CILP	Cartilage Intermediate Layer Protein
CMP	Cartilage Matrix Protein
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CPM	Continous Passive Motion
DMEM	Dulbecco´s Minimal Essential Medium
FCS	Fetal Calf Serum
IGF	Insulin-like Growth factor
IKDC	International Knee Documentation Comittee
KKT	Knorpel-Knochen-Transplantation
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MPG	Matrix-gla Protein
MSC	Mesenchymal Stem Cell
OAK	Orthopädische Arbeitsgemeinschaft Knie (Schweiz)
OAT	Osteochondral Autograft Transfer
OATS	Osteochondral Autograft Transfer
OCT	Osteochondrale Transplantation
OD	Ostechondrosis dissecans
PARP	Proline-and-Arginine-Rich Protein
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGA	Polyglycolic Acid
PGLA	Polyglycolic-L-Acid
PLA	Polylactid Acid
PRELP	Proline-and-Arginin- rich end Leucin-rich Repeat Protein
SF-36	Short_form 36
SMFA	Short Musculo-Skeletal Function Assessment Questionnaire
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TGF	Transforming Growth Factor
USSC	Unrestricted Somatic Stem Cell
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WOMAC	Western Ontario McMasters University (-Score)

IX Danksagung

Die Voraussetzungen zu erfolgreichem wissenschaftlichem Arbeiten liegen in einem stimulierenden Arbeitsumfeld und einem ausgleichenden sozialen Gefüge.

Zunächst möchte ich meiner Frau Susann und meinen Kindern Carolin und Mark danken, die während der Phase, in der diese Arbeit entstand, oft auf Ehemann und Vater verzichten mussten und mich dennoch nach bestem Vermögen unterstützt und motiviert haben.

Herrn Professor Dr. R. Krauspe danke ich für die stetige Förderung und Anregung. Viele themenbezogene Diskussionen stellten die Basis für die Thematik und Ausarbeitung dieser Arbeit dar.

Meinen Lehrern der Vergangenheit, insbesondere Herrn Prof. Dr. J. Eulert und Herrn Prof. Dr. P. Habermeyer, gilt mein Dank für eine engagierte fachliche Ausbildung mit steter Anregung zu wissenschaftlichem Denken.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen, die zu Zeiten der Laborarbeit und Ausarbeitung einen Teil meiner klinischen Verpflichtungen übernommen haben. Für die technische Assistenz sei Frau S. Lensing-Höhn gedankt, Frau Prof. Dr. Koldovsky für die freundliche Überlassung von Labor-Arbeitsplätzen.

Ohne das große Engagement von Herrn cand. med. U. Beuser und Herrn cand. med. St. Röder hätte die Etablierung der Kulturen nicht erfolgen können, auch Ihnen sei herzlich gedankt.

Womac-D Arthroseindex Knie und Hüftgelenk

 T

Datum:

Anleitung für Patienten

Sie werden nun gebeten, nach diesem Muster die Stärke Ihrer Schmerzen, Ihrer Steifigkeit oder Behinderung anzugeben. Bitte vergessen Sie nicht, je weiter rechts Sie das "X" ankreuzen, umso mehr Schmerzen, Steifigkeit oder Behinderung haben Sie.

A. Schmerzfragen

Die folgenden Fragen beziehen sich auf die Stärke der Schmerzen in dem Gelenk, das behandelt werden soll. Bitte geben Sie für jede Frage die Stärke der Schmerzen an, die Sie in den letzten 2 Tagen verspürt haben. (Bitte kreuzen Sie die zutreffenden Kästchen an)

Wie starke Schmerzen haben Sie beim

1. Gehen auf ebenem Boden

Keine Schmerzen

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schmerzen

2. Treppen hinauf- oder hinuntersteigen

Keine Schmerzen

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schmerzen

3. Nachts im Bett

Keine Schmerzen

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schmerzen

4. Sitzen oder Liegen

Keine Schmerzen

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schmerzen

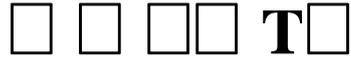
5. Aufrecht stehen

Keine Schmerzen

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schmerzen

B. Fragen zur Steifigkeit



Die folgenden Fragen beziehen sich auf die Steifigkeit (nicht die Schmerzen) in dem Gelenk, das behandelt werden soll. Steifigkeit ist ein Gefühl von Einschränkung oder Langsamkeit in der Beweglichkeit, wenn Sie Ihre Gelenke bewegen. Bitte geben Sie für jede Frage die Stärke der Steifigkeit an, die Sie in den letzten 2 Tagen verspürt haben. (Bitte kreuzen Sie die zutreffenden Kästchen an).

1. Wie stark ist die Steifigkeit gerade nach dem Erwachen am Morgen?

Keine Steifigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Steifigkeit

2. Wie stark ist Ihre Steifigkeit nach Sitzen, Liegen oder Ausruhen im späteren Verlauf des Tages?

Keine Steifigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Steifigkeit

C. Fragen zur körperlichen Tätigkeit

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihre körperliche Tätigkeit. Damit ist Ihre Fähigkeit gemeint, sich im Alltag zu bewegen und sich um sich selbst zu kümmern. Bitte geben Sie für jede der folgenden Aktivitäten den Schwierigkeitsgrad an, den Sie in den letzten 2 Tagen wegen Beschwerden in dem zu behandelnden Gelenk gehabt haben. (Bitte kreuzen Sie die zutreffenden Kästchen an).

1. Treppen hinuntersteigen

Keine Schwierigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schwierigkeit

2. Treppen hinaufsteigen

Keine Schwierigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schwierigkeit

3. Aufstehen vom Sitzen

Keine Schwierigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schwierigkeit

4. Stehen

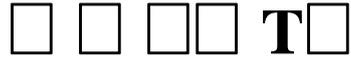
Keine Schwierigkeit

<input type="checkbox"/>										
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Extreme Schwierigkeit

	□ □ □ □ T □	
5. Sich zum Boden bücken		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
6. Gehen auf ebenem Boden		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
7. Einsteigen ins Auto/Aussteigen aus dem Auto		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
8. Einkaufen gehen		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
9. Socken/Strümpfe anziehen		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
10. Aufstehen vom Bett		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
11. Socken/Strümpfe ausziehen		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
12. Liegen im Bett		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit
13. In die Badewanne/ aus dem Bad zu steigen		
Keine Schwierigkeit	<input type="checkbox"/>	Extreme Schwierigkeit

14. Sitzen



Keine Schwierigkeit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Extreme Schwierigkeit

15. Sich auf die Toilette setzen/Aufstehen von der Toilette

Keine Schwierigkeit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Extreme Schwierigkeit

16. Anstrengende Hausarbeiten

Keine Schwierigkeit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Extreme Schwierigkeit

17. Leichte Hausarbeiten

Keine Schwierigkeit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Extreme Schwierigkeit