



Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J. Windolf

**Bedeutung von Knochenmarkkonzentrat und Platelet  
Rich Plasma in der Behandlung von osteochondralen  
Defekten beim Mini-Pig**

**- Eine tierexperimentelle Studie -**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Simon Thuns

Düsseldorf 2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Michael Wild

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rotem Shlomo Lanzman



Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

“Bone Marrow Aspiration Concentrate and Platelet Rich Plasma for Osteochondral Repair in a Porcine Osteochondral Defect Model“

Betsch M, Schneppendahl J, **Thuns S**, Herten M, Sager M, Jungbluth P, Hakimi M, Wild M

PLOS ONE. 2013;8:e71602.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Knorpelgewebe .....	2
1.2	Traumatische Knorpeldefekte.....	5
1.3	Aktuelle Therapieverfahren zur Behandlung von chondralen und osteochondralen Defekten.....	7
1.3.1	Lavage und Débridements .....	7
1.3.2	Mikrofrakturierung .....	7
1.3.3	Autologe osteochondrale Transplantation .....	8
1.3.4	Autologe Chondrozyten Transplantation.....	9
1.3.5	Synthetische Scaffolds .....	10
1.3.6	Platelet-Rich Plasma .....	11
1.3.7	Mesenchymale Stammzellen .....	14
1.3.8	Knochenmarkaspiratkonzentrat.....	15
1.4	Ziel der Arbeit .....	16
2	Material und Methoden .....	17
2.1	Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung.....	17
2.2	TruFit®-Plug.....	18
2.3	Versuchstiere .....	19
2.4	Vorbereitung und Narkose.....	19
2.5	Herstellung von Platelet Rich Plasma.....	20
2.6	Analyse der Wachstumsfaktoren in Serum und PRP .....	22
2.7	Colony Forming Unit-Assay .....	23
2.8	Herstellung von Knochenmarkkonzentrat .....	23
2.9	Generierung der osteochondralen Defekte .....	25
2.10	Defekttherapie.....	26
2.10.1	Therapie mit TruFit®-Plug als Kontrollgruppe.....	26
2.10.2	Therapie mit TruFit®-Plug und Platelet Rich Plasma.....	27
2.10.3	Therapie mit TruFit®-Plug und Knochenmarkkonzentrat .....	28
2.10.4	Therapie mit TruFit®-Plug, PRP und Knochenmarkkonzentrat.....	28
2.11	Euthanasierung und Präparatgewinnung.....	28
2.12	Histomorphometrische Färbung .....	29
2.12.1	Probenaufarbeitung.....	29
2.12.2	Immunhistologische Färbungen .....	30
2.12.3	Histologische Färbungen.....	31

2.13	FACS-Analyse .....	32
2.14	Auswertung und Statistik .....	33
3	Ergebnisse .....	36
3.1	In Vitro Analyse .....	36
3.1.1	MNZ- Konzentration in BM und BMAC .....	36
3.1.2	CFU in BM und BMAC .....	37
3.1.3	Auswertung der Oberflächenantigene .....	38
3.1.4	Thrombozytenkonzentration im PRP .....	38
3.1.5	Analyse der Wachstumsfaktoren .....	39
3.2	Makroskopische Ergebnisse .....	40
3.3	Histologische Ergebnisse .....	43
3.3.1	Ergebnisse nach O`Driscoll .....	45
4	Diskussion .....	46
4.1	Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen .....	46
4.2	PRP .....	47
4.3	BMAC .....	52
4.4	TruFit®-Plug .....	55
4.5	Zusammenfassung .....	58
5	Literaturverzeichnis .....	60
6	Abbildungsverzeichnis .....	75
7	Tabellenverzeichnis .....	75

## Abkürzungen

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACT</b>	Autologe Chondrozyten Transplantation
<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethylcarbazol
<b>ALP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>BM</b>	Bone Marrow
<b>BMAC</b>	Bone Marrow Aspirate Concentrate
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>ca.</b>	Circa
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>CFU-F</b>	Colony Forming Unit- fibroblast-like cells
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratzenimeter
<b>CPP</b>	Cell Poor Plasma
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>et al.</b>	et alia
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>g</b>	Gramm
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>ICRS</b>	International Cartilage Repair Society
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>Lig.</b>	Ligamentum
<b>L-PRP</b>	Leukozytenreiches-PRP
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MNZ</b>	Mononukleäre Zellen

<b>MSZ</b>	Mesenchymale Stammzellen
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>PBS</b>	Phosphate buffered Saline
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PG</b>	Proteoglykane
<b>PLGA</b>	DL-Polylactid-co-Glycolide
<b>PMMA</b>	Polymethylmethacrylat
<b>PPP</b>	Platelet Poor Plasma
<b>P-PRP</b>	Leukozytenarmes-PRP
<b>PRP</b>	Platelet Rich Plasma
<b>rpm</b>	Revolutions Per Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Strept-HRP</b>	Streptavidin-Horseraddish-Peroxidase
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TVA</b>	Tierversuchsanlage
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WBC</b>	White Blood Cell
<b>z. B.</b>	Zum Beispiel

# 1 Einleitung

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel und bedeckt unter anderem die Enden von Röhrenknochen und bildet so die Gelenkflächen. Durch seine speziellen visko-elastischen Eigenschaften vermindert er Druck- wie auch Reibungsbelastungen und gewährleistet so eine schonende Artikulation. Die Knorpelintegrität ist somit maßgeblich an einer beschwerdefreien Beweglichkeit aller Gelenke beteiligt. Eine Schädigung der Gelenkflächen, unabhängig ob degenerativ, traumatisch oder postinfektiös, hat einen erheblichen Einfluss auf die Mobilität und Lebensqualität der Patienten [1].

Mit einer Prävalenz von 8 % im Alter von 50 - 70 Jahren und einer Inzidenz von mindestens 1 % pro Jahr, ist die Arthrose die häufigste Gelenkerkrankung in Westeuropa [2]. Die Häufigkeit dieser Erkrankung spiegelt die Dringlichkeit nach einer effektiven Therapie wieder. Abgesehen von der individuellen Belastung für den Patienten, wurde in einer länderübergreifenden Studie gezeigt, dass sich die ökonomische Belastung durch Erkrankungen des Bewegungsapparates auf 1 - 2,5 % des Bruttosozialprodukts beläuft [2].

Chondrale und osteochondrale Defekte spielen als Risikofaktoren, insbesondere bei jungen Patienten, eine große Rolle für die Entstehung einer Arthrose [3].

Die Behandlung von chondralen und osteochondralen Defekten stellt bis heute eine besondere Herausforderung dar. Die schlechte Vaskularisierung, die Abwesenheit von Lymphgefäßen und ein Mangel an mesenchymalen Stammzellen resultiert in einer mangelhaften Regenerationspotenz des Gewebes. Dies führt dazu, dass entstandene Defekte nicht durch hyalinen Knorpel, sondern durch minderwertiges Regeneratgewebe ersetzt werden [4, 5].

Für die Defektheilung ist außerdem die Größe des Schadens ausschlaggebend. Läsionen mit einer Größe von bis zu drei Millimetern können spontan ausheilen, größere Defekte bleiben jedoch bestehen [6]. Das Ausheilen beschränkt sich allerdings auch bei kleinen Knorpelschäden auf das Auffüllen durch Faserknorpel, welcher sich als Hybridgewebe aus Kollagen vom Typ I und II zusammensetzt. Dieser ist jedoch, aufgrund seines unterschiedlichen Aufbaus, in seiner mechanischen Belastbarkeit und Langlebigkeit dem hyalinen Gelenkknorpel weit unterlegen, so dass dieser oft nach kurzer Zeit zerstört wird [7]. Alle aktuell verfügbaren Therapieoptionen von chondralen und osteochondralen Defekten führen lediglich zur Bildung von hyalin-artigem oder Faserknorpel [8]. Es kommt

daher nach einem osteochondralen Schaden häufig zu einem Fortschreiten der Gelenkzerstörung im Rahmen einer nachfolgenden Arthritis, welche oftmals als letzte Therapieoption nur noch durch einen Gelenkersatz behandelt werden kann.

## **1.1 Knorpelgewebe**

Knorpelgewebe gehört zu den Bindegeweben und ist somit mesenchymalen Ursprungs. Man unterteilt Knorpelgewebe in elastischen Knorpel, Faserknorpel und den am weitesten verbreiteten hyalinen Knorpel.

Elastischer Knorpel enthält eine hohe Anzahl von elastischen Fasern und ist beispielsweise in der Ohrmuschel, der Epiglottis und dem *Meatus acusticus externus* zu finden.

Der Faserknorpel, welcher durch einen hohen Anteil an Kollagenfasern gekennzeichnet ist, findet sich beispielsweise im *Anulus fibrosus* der *Disci intervertebrales*, den *Menisci* oder der *Symphysis pubica*.

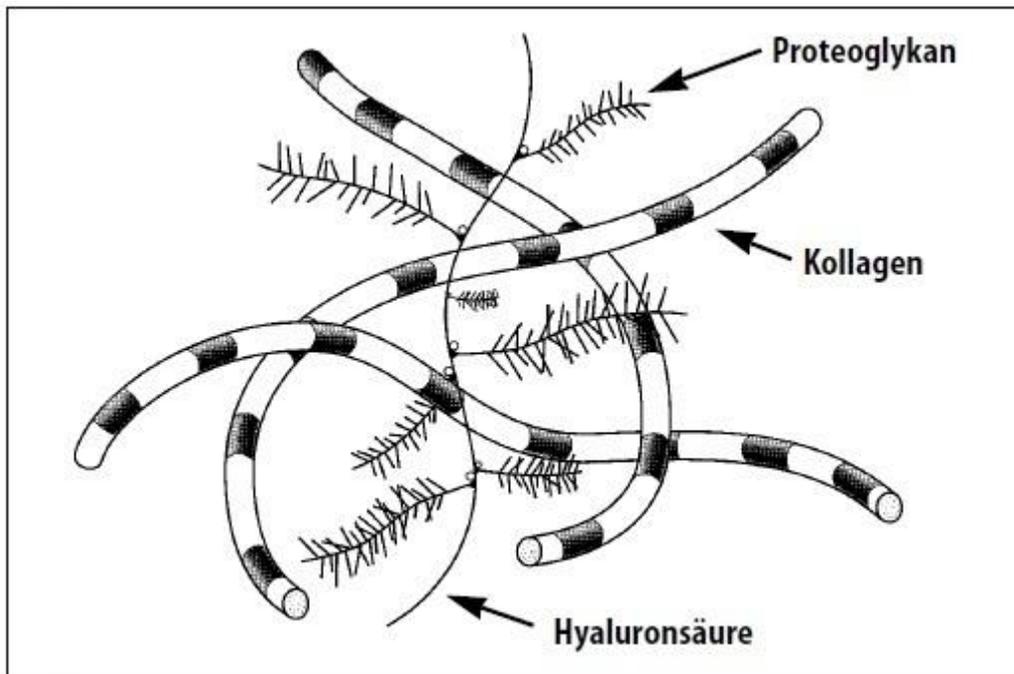
Neben dem Vorkommen im sternalen Rippenanteil sowie als Bestandteil der Trachealspangen und des Nasenseptums, bildet der hyaline Knorpel die Gelenkflächen artikulierender Knochen [9]. Hier dient der Gelenkknorpel der Reduktion von Stoß- sowie Reibungskräften wodurch der subchondrale Knochen geschützt und eine schonende, schmerzfreie Bewegung ermöglicht wird. Histologisch ist der Knorpel aus drei Hauptbestandteilen aufgebaut: den Chondrozyten und der die Chondrozyten umgebenden Extrazellulärmatrix, welche wiederum Kollagenfibrillen sowie Proteoglykane enthält. Diese sind verantwortlich für die mechanischen Eigenschaften des Gewebes [10].

Die Chondrozyten machen einen Anteil von 1 – 10 % des Knorpelvolumens aus und sind für die Produktion der Extrazellulärmatrix und deren ständige Erneuerung verantwortlich [11]. Die 10 – 20 µm großen Zellen sind rund bis oval geformt und befinden sich in der Extrazellulärmatrix, wo sie in Gruppen von 2 - 8 Zellen in sogenannten Chondronen vorliegen. Die Chondrone haben keinerlei Kontakt zum Gefäßsystem und werden per Diffusion aus der Synovia ernährt [12]. Durch Gelenkbewegung wird die Synovia in den Knorpel gedrückt und gleichzeitig nährstoffarme Gelenkflüssigkeit herausgepresst. Auf diesem Weg werden Stoffwechselprodukte abtransportiert und die Nährstoffversorgung des Gewebes gesichert. Um ein intaktes Gewebe zu erhalten ist daher eine intermittierende Belastung des Knorpels nötig.

Eine Besonderheit des hyalinen Knorpels ist die Abwesenheit von vaskulärer, nervaler und lymphatischer Versorgung. Aufgrund der mangelnden Gefäßversorgung ist die Regenerationsfähigkeit des Gewebes stark begrenzt. Eine weitere Ursache für die ungenügende Selbstheilungspotenz des Gelenkknorpels ist die Tatsache, dass dieser im Unterschied zum restlichen hyalinen Knorpel nicht von Perichondrium umgeben ist. Das Perichondrium besteht aus straffem Bindegewebe (Kollagen I) und beheimatet Chondroblasten, welche als mesenchymale Vorläuferzellen zu Chondrozyten differenzieren können, und so die Heilung des Gewebes unterstützen [13].

Die Extrazellulärmatrix, welche die Chondrozyten umgibt, beinhaltet vor allem Kollagenfibrillen und Proteoglykane.

Die Kollagenfibrillen bestehen aus Kollagen Typ II, beinhalten aber auch Kollagen vom Typ IX bzw. XI und sind ca. 15 – 20 nm groß. An der Gelenkoberfläche verlaufen sie tangential und gehen am Knochen-Knorpel-Übergang in einen senkrechten Verlauf über. Diese Fibrillen sind wichtig für die Zugfestigkeit des Knorpels und bewirken eine gleichmäßige Kraftübertragung auf den Knochen [11]. Proteoglykane (PG) sind Glykoproteine und bestehen im hyalinen Knorpel hauptsächlich aus Chondrotin- und Keratansulfat, welche an Hyaluronsäuremoleküle gebunden sind (siehe Abbildung 1). Aggrekan, das am häufigsten vorkommende PG, besteht aus mehr als 100 Chondrotinsulfat- und Keratansulfatketten [11]. Die negativ geladenen Seitenketten der PG binden Wassermoleküle und sind somit für den hohen Wassergehalt des Knorpels, welcher zusammen mit Aggrekan für die dämpfenden Eigenschaften maßgeblich ist, verantwortlich [13].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteoglykanstruktur (nach Rudert et al. [11])**

Innerhalb des Gelenkknorpels werden vier Zonen unterschieden, Tangentialfaserzone, Transitionalzone, Radiärzone und die Zone des mineralisierten Knorpels (siehe Abbildung 2).

Die Tangentialfaserzone stellt die oberflächlichste Schicht des Knorpels dar. Hier sind die Chondrozyten spindelförmig angeordnet, und es finden sich viele geordnet vorliegende Kollagenfasern und wenige Proteoglykane.

Die Übergangszone enthält vermehrt PG sowie teilweise in kleinen Chondronen angeordnete Chondrozyten. Die Form der Chondrozyten verändert sich von der spindelartigen Form in der Tangentialfaserzone zu einer rundlichen Konfiguration.

Die Radiärzone ist die breiteste Zone des hyalinen Knorpels. Hier liegen die Zellen in Säulen angeordnet vor, die Kollagenfibrillen haben hier ihren größten Durchmesser. Weiterhin sind hier die höchste Konzentration an PG und der niedrigste Wassergehalt im Gelenkknorpel zu finden [11].

Die Zone des mineralisierten Knorpels enthält innerhalb der Extrazellulärmatrix Kalziumkristalle sowie häufig untergehende Zellen.

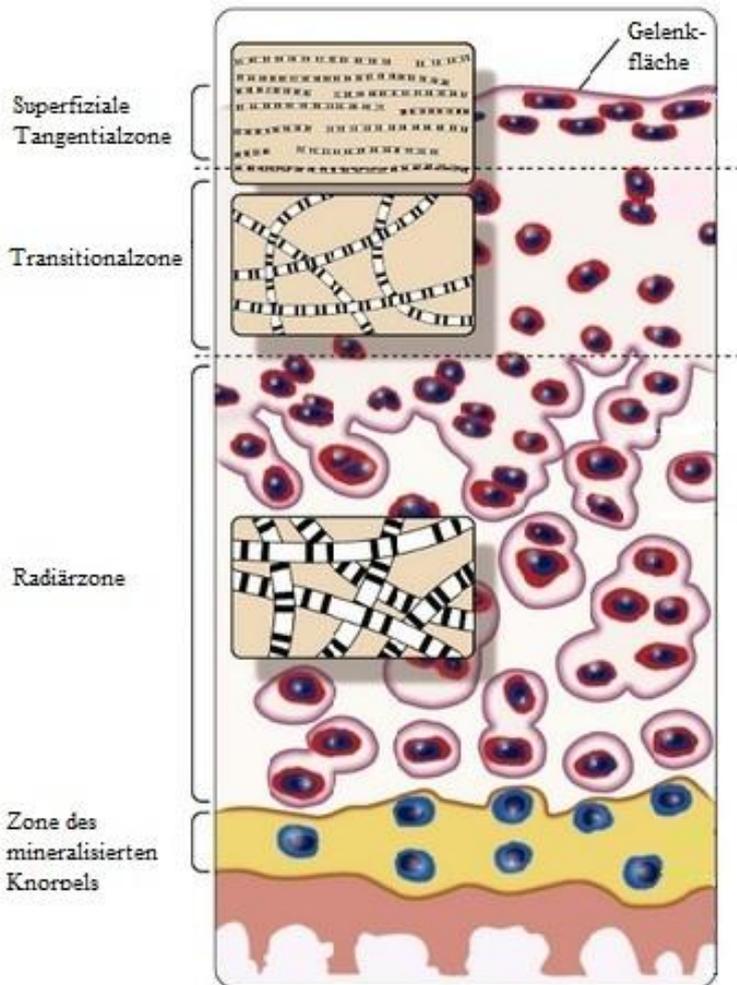


Abbildung 2: Schematische Darstellung des hyalinen Knorpels (modifiziert nach Firestein et al. [14])

## 1.2 Traumatische Knorpeldefekte

Traumatische Knorpeldefekte können durch direkte oder indirekte Krafteinwirkung auf das Gelenk entstehen. Für die Entstehung der Verletzung von Bedeutung ist zum einen die auf das Gelenk einwirkende Kraft, zum anderen die Geschwindigkeit, mit der diese auftritt [15].

Der Knorpel reagiert auf Krafteinwirkung zunächst durch Umverteilung des im Gewebe enthaltenen Wassers. Die bei Krafteinwirkung entstehende Strömung kann bei zu schnellem Auftreten die feste Knorpelphase (z. B. Kollagenfibrillen, Knorpelzellen) schädigen. Der Gelenkknorpel kann so seine dämpfende Funktion nicht wahrnehmen, weswegen auch der subchondral liegende Knochen Schaden nehmen kann.

Weiterhin kann es durch repetitives Auftreten von Überlastungen und damit verbundenen Mikrotraumata zu einem Ungleichgewicht zwischen Knorpelaufbau

und -abbau kommen. Hierbei übersteigt der Abbau von Matrixmolekülen die Synthetisierungspotenz der Chondrozyten. Dies führt zu einer Abnahme der Proteoglykankonzentration und zu einem geringeren Anteil fibrillärer Strukturen in der Extrazellulärmatrix. Auch hierbei kommt es zur Schädigung des Gelenkknorpels und zu einem Verlust der schützenden Eigenschaften [16].

Zur Klassifikation von Knorpeldefekten hat sich das 2003 von der *International Cartilage Research Society* eingeführte „ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System“ durchgesetzt. Hiernach werden chondrale Defekte wie folgt eingeteilt (siehe Tabelle 1):

ICRS-Grad	Definition
0	Keine Defekte
1a	Oberfläche intakt, Fibrillationen und/ leichte Erweichung
1b	Zusätzliche Risse/ Fissuren
2	Tiefere Defekte < 50% der Knorpeldicke
3a	Tiefere Defekte >50% der Knorpeldicke, kalzifizierende Schicht nicht betroffen
3b	Tiefere Defekte >50% der Knorpeldicke, kalzifizierende Schicht betroffen
3c	Tiefere Defekte >50 % der Knorpeldicke, bis zur subchondrale Platte
3d	Tiefere Defekte >50 % der Knorpeldicke, mit Blasenbildung
4a/b	Knorpeldefekt mit Einbeziehung der subchondralen Platte (osteocondraler Defekt)

**Tabelle 1: ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System [17]**

## **1.3 Aktuelle Therapieverfahren zur Behandlung von chondralen und osteochondralen Defekten**

### **1.3.1 Lavage und Débridements**

*Lavage* und *Débridements* dienen der symptomatischen Behandlung von Gelenkbeschwerden. Bei diesem arthroskopischen Eingriff können freie Gelenkkörper oder Knorpellappen entfernt, das Gelenk gespült und die mechanische Beweglichkeit verbessert werden. Beide Behandlungsmöglichkeiten können eine kurzfristige Symptomverbesserung erreichen [18].

In Studien konnte allerdings weder für die *Lavage* noch für das *Débridements* eine langfristige Besserung der Symptome nachgewiesen werden [19]. In einer 2002 von Moseley et al. durchgeführten Studie wurde der Nutzen von *Débridements* und *Lavage* gegen eine Placebo-Operation untersucht. Auch hier konnte keine Überlegenheit der Gelenksäuberung gegenüber der Schein-Operation festgestellt werden [20]. Aus diesem Grund werden diese Eingriffe heute nur noch selten durchgeführt.

### **1.3.2 Mikrofrakturierung**

Die Mikrofrakturierung nach Steadman ist ein minimalinvasives, arthroskopisches Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten. Anwendung findet diese Therapiemöglichkeit bei durchgreifenden Knorpelläsionen mit einer Größe von bis zu 40 mm<sup>2</sup> [21]. Die Mikrofrakturierung stellt auch heute noch den Goldstandard bei der Behandlung chondraler Defekte dar und führt zu klinisch guten Kurzzeit-Ergebnissen [22,23].

In einem einzeitigen Eingriff wird die Defektzone per *Débridement* von Knorpel- und Geweberesten befreit und die oftmals reaktiv entstandene subchondrale Sklerose abgetragen. Anschließend wird mit Hilfe einer gebogenen Aale die subchondrale Knochenplatte perforiert. Die Mikrofrakturierungen werden hierbei orthogonal zur Gelenkfläche gesetzt, die Penetrationstiefe liegt bei ungefähr 2 - 4 mm und soll den Markraum eröffnen. Der Abstand der gesetzten Löcher sollte 3 – 4 mm nicht unterschreiten, um ein Einbrechen des subchondralen Knochens zu verhindern [21]. Den aus dem Markraum in den chondralen Defekt einwandernden Zellen wird so ein optimales Milieu für den Heilungsprozess geboten [24].

Langzeitergebnisse zu diesem Verfahren zeigen, dass eine initial eingetretene Verbesserung im ICRS-Score (*International Cartilage Repair Society*) nicht von Dauer ist und nach 18 Monaten bereits mit einer signifikanten Verschlechterung zu rechnen ist [25,26].

### 1.3.3 **Autologe osteochondrale Transplantation**

Die autologe osteochondrale Mosaikplastik ist ein Verfahren zur Behandlung von osteochondralen Defekten in der Haupt-Belastungszone eines Gelenkes. Geeignet ist diese Methode für Defekte mit einem Durchmesser von bis zu 22 mm und einer Tiefe von bis zu 10 mm [27].

Die Mosaikplastik kann arthroskopisch oder auch per Arthrotomie durchgeführt werden. Die Entnahme des Spendermaterials sowie die Deckung der Defekte mit den Knochen-Knorpel-Zylindern werden einzeitig durchgeführt.

Es werden zunächst mit Hilfe eines Rundmeißels Knorpel-Knochen-Zylinder aus wenig belasteten Arealen (lateraler oder distaler Trochlearand) des Gelenkes entnommen. Die Vorbereitung der Defektzone erfolgt ebenfalls mit einem Rundmeißel, wobei dieser einen kleineren Durchmesser als der Rundmeißel zur Entnahme hat. Die Transplantate werden dann mit einem Kunststoffstößel in die Defekte eingebracht, die Fixierung erfolgt durch die *press-fit* Technik. Wichtig bei Entnahme und Implantation ist, dass die Tiefe der Defekte übereinstimmt und die Gelenkflächen kongruent sind.

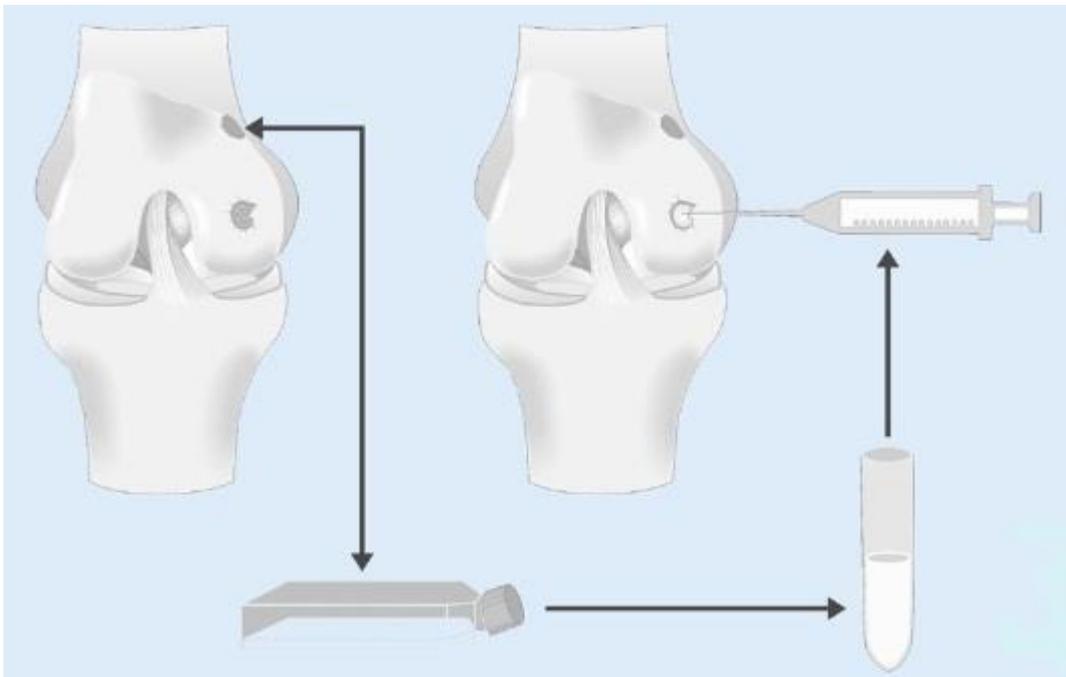
Auf diese Weise können Knorpeldefekte wieder mit hyalinem Knorpel bedeckt werden. Es wird allerdings kein neuer hyaliner Knorpel generiert, sondern nur die schon vorhandenen Zellen umverteilt. Dies ist auch gleichzeitig der wichtigste Nachteil dieser Methode. Limitiert wird die Transplantation von autologem Knorpel durch das begrenzte Vorhandensein von intaktem Knorpel in den weniger belasteten Zonen des Gelenkes. Eine weitere Schwäche dieser Technik stellen die durch die Entnahme verursachten Defekte dar. Die Entnahmestellen werden, wie unbehandelte osteochondrale Defekte, nicht durch hyalinen Knorpel sondern, durch Faserknorpel aufgefüllt [28]. Hieraus wiederum entsteht neben einer mangelnden mechanischen Belastbarkeit oft auch eine langanhaltende Schmerzsymptomatik.

### 1.3.4 Autologe Chondrozyten Transplantation

Bei der autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) handelt es sich um einen zweizeitigen operativen Eingriff, welcher 1987 durch Britberg et al. erstmalig beschrieben wurde [29].

In einer arthroskopischen Operation werden dem Patienten aus einem wenig belasteten Gelenkabschnitt ca. 200 mg Knorpelgewebe entnommen [30]. Die Chondrozyten werden dann enzymatisch aus der Knorpelmatrix herausgelöst und in vitro mittels einer Monolayerkultur um den Faktor 10 - 15 vermehrt.

In einem zweiten Eingriff wird das Gelenk per Arthrotomie eröffnet und die Läsion von degenerierten Knorpelresten befreit sowie die Knorpelränder geglättet. Um das Verbleiben der Chondrozyten im Defekt zu sichern, wird Periost von Tibia oder Femur auf den Defekt aufgenäht. Die Chondrozytensuspension wird dann unter das Periost gespritzt und der Defekt mit Fibrinkleber verschlossen (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Prinzip der klassischen ACT (modifiziert nach Marlovits et al. [31])**

Die Weiterentwicklung der ACT ist die matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation. Behrens et al. beschrieben 1999 als erste die Kultivierung von Chondrozyten in einer 3D-Kollagen-Matrix [32]. In diese dreidimensionalen Trägersysteme werden die Knorpelzellen während der letzten Kultivierungsphase eingebettet.

In Studien konnte das Überleben der Knorpelzellen nach der Retransplantation und die Entstehung von hyalin-artigem Knorpel nachgewiesen werden [33]. Dieser erreicht eine Festigkeit von bis zu 90 % der Festigkeit des gesunden hyalinen Knorpels und ist dem Faserknorpel damit biomechanisch überlegen [34]. Nachteile dieser Technik sind das zweizeitige operative Vorgehen und die damit verbundenen Risiken, sowie die aufgrund der Entnahmemorbidity nur begrenzt verfügbaren Knorpelzellen. Hierdurch wird auch die behandelbare Defektgröße limitiert.

### 1.3.5 Synthetische Scaffolds

Aufgrund der Häufigkeit von chondralen und osteochondralen Defekten und der mit vielen Therapieoptionen verbundenen Entnahmemorbidity gewinnt die Verwendung von synthetischen Trägermaterialien zunehmend an Bedeutung.

Die Anforderungen an diese *Scaffolds* sind allerdings hoch. Das verwendete Material muss biokompatibel sein, um ein Einwachsen des Trägermaterials zu ermöglichen und es sollte keine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen hervorrufen [35]. Um die Durchblutung und damit ein Einwandern von Zellen in die Matrix zu gewährleisten, muss das Transplantat offenporig sein. Durch den porösen Aufbau des Implantates wird weiterhin die Zelladhärenz im Sinne einer Oberflächenvergrößerung unterstützt [36]. Da der implantierte *Scaffold* als Platzhalter für einwachsendes Gewebe dient, muss er initial über eine ausreichende strukturelle Stabilität verfügen, damit den im Gelenk herrschenden Kräften widerstanden werden kann. In der späteren Heilungsphase sollte der *Scaffold* möglichst komplett biodegradierbar sein, wobei bei der Resorption keinerlei Schadstoffe entstehen dürfen [37]. Die strukturellen Eigenschaften der Matrices, wie Porengröße oder Oberfläche, haben direkten Einfluss auf Zelladhäsion und Matrixexpression [38].

Zur Herstellung von Implantaten werden biologische wie auch synthetische Materialien verwendet.

Als natürliche Grundlage werden z. B. Kollagen, Fibrin, Alginat, Chitosan oder Hyaluronan verwendet. Diese könnten den Vorteil haben, dass sie über eine natürliche Oberfläche verfügen und so die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung unterstützen könnten [39,40]. Der große Nachteil biologischer Implantate ist ihre fehlende mechanische Stabilität und die nicht kontrollierbare

Biodegradation [41]. Bei den synthetischen *Scaffolds* finden vor allem Polylaktide, Polyglykoxide und Polycaprolaktone Verwendung [37]. Der Vorteil synthetischer Materialien wiederum liegt in der besseren biomechanischen Festigkeit, einer leichteren Anpassung an den Defekt sowie modulierbarer struktureller Eigenschaften wie beispielsweise der Porengröße. Weiterhin lässt sich die Biodegradierbarkeit durch das Mischungsverhältnis von Polylaktiden zu Polyglykoxiden beeinflussen [42].

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung von *Scaffolds* in der Therapie von osteochondralen Defekten einen positiven Einfluss auf die Heilung und das klinische Ergebnis der Patienten hat [43]. Ein weiterer Fortschritt hinsichtlich des Ergebnisses bei der *Scaffold*-Therapie konnte durch das Anpassen der Implantate an die biphasische Beschaffenheit der osteochondralen Defekte erreicht werden. Durch diese strukturelle Abstimmung konnte eine verbesserte Integration des Fremdmaterials in das umliegende Gewebe erreicht werden [44,45].

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze sind die Langzeitergebnisse jedoch noch nicht überzeugend. So konnten Dhollander et al. nur eine leichte Verbesserung der Symptome nach Implantation eines *TruFit®-Plugs* feststellen [46]. Weiterhin hatten 20 % der Patienten persistierende Beschwerden, so dass eine weitere Operation mit Entfernung des Implantates durchgeführt werden musste.

### 1.3.6 **Platelet-Rich Plasma**

Neben den zahlreichen operativen und konservativen Behandlungsverfahren für osteochondrale Defekte, versucht man derzeit, über den Einsatz von Wachstumsfaktoren regulatorisch in den Heilungsprozess einzugreifen. Einen vielversprechenden Ansatz stellt hierbei das *Platelet Rich Plasma* dar.

*Platelet Rich Plasma* wird aus autologem Vollblut gewonnen und ist durch eine Konzentration von über 1.000.000 Thrombozyten pro Mikroliter definiert [47].

Thrombozyten enthalten Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und bei Verletzungen durch Degranulation freigesetzt werden [48,49]. In den Granulae der Zellen sind unter anderem für die Knochen- und Knorpeldefektheilung wichtige Faktoren wie TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived*

*Growth Factor*) und IGF (*Insulin-like Growth Factor*) enthalten. Bei diesen Wachstumsfaktoren handelt es sich um Polypeptide, welche unter anderem chemotaktisch wirken und so eine Zellmigration von Entzündungszellen (z. B. Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten) zum Ort der Verletzung veranlassen. Weiterhin binden sie über membrangebundene Rezeptoren an Zellen und stimulieren so deren Proliferation [50].

Für die Gewebsregeneration sind unter anderem folgende im PRP enthaltene Faktoren von Bedeutung:

*Transforming Growth Factor- $\beta$*

*Platelet Derived Growth Factor*

*Vascular Endothelial Growth Factor*

*Insulin-like Growth Factor-I*

*Transforming Growth Factor- $\beta$*

Bei TGF- $\beta$  handelt es sich um ein Polypeptid aus der Gruppe der BMPs, welches aus drei Proteinen besteht. TGF- $\beta$  konnte in vielen Zellen, wie z. B. Osteoblasten, Fibroblasten und Thrombozyten, nachgewiesen werden. Auch die Rezeptoren für TGF- $\beta$  sind weit verbreitet [51]. Die Funktion von Wachstumsfaktoren aus dieser Familie ist vielfältig. So konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation von Epithel-, Endothel- sowie hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. Ein stimulierender Effekt konnte auf Fibroblasten gefunden werden, welche nach Gabe von TGF- $\beta$  Kollagen und Fibronectin sezernierten. Eine weitere Funktion erfüllt TGF- $\beta$  beim Knochenremodelling und somit bei der Frakturheilung, indem es chemotaktisch und regulatorisch auf Osteoblasten, Osteoklasten und mesenchymale Zellen wirkt [51].

*Platelet Derived Growth Factor*

PDGF ist ein Glycoprotein, welches als Dimer aus zwei Polypeptiden, einer A- und einer B-Kette, aufgebaut ist. Der Wachstumsfaktor kann in drei Isoformen sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer vorliegen, wobei die Konfiguration als Heterodimer überwiegt [52].

PDGF befindet sich in den Alpha-Granulae von Thrombozyten, von denen der Wachstumsfaktor überwiegend ausgeschüttet wird. Aber auch andere Zellen wie Makrophagen und Endothelzellen produzieren PDGF.

*Platelet Derived Growth Factor* hat auf Osteoblasten und Präosteoblasten einen proliferationssteigernden Effekt, außerdem konnte eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen nachgewiesen werden [53].

#### *Insulin-like Growth Factor*

Bei den *Insulin-like Growth Factors* unterscheidet man zwei Formen, IGF-I und IGF-II. Beides sind Peptide, welche strukturell dem Insulin ähneln. Die IGFs bestehen aus einer A- und einer B-Domäne, welche homolog zu den A und B Domänen des Insulins sind. Im Unterschied zu Insulin beinhalten die IGFs außerdem eine C-Domäne, welche beim Insulin während der Prozessierung des Prohormons abgespalten wird.

IGF-I stimuliert die Synthese von Proteoglycanen im Knorpel sowie die Proliferation von Chondrozyten. Weiterhin wirkt es regulatorisch auf die Synthese von Aggrekan und Kollagen II während der Chondrogenese [54,55]. Eine weitere Funktion kommt IGF-I bei der Heilung von Frakturen zu. Hier stimuliert es die Bildung von Kollagen und Knochen [56].

#### *Vascular Endothelial Growth Factor*

Bei *Vascular Endothelial Growth Factor* handelt es sich um ein Protein, welches eine wichtige Rolle in der Angiogenese und der enchondralen Knochenbildung spielt. VEGF wirkt mitogen auf Endothelzellen und erhöht die Gefäßpermeabilität kleiner Gefäße, um diese so für Makromoleküle passierbar zu machen [57].

VEGF wirkt außerdem protektiv auf Endothelzellen, indem es sie vor Apoptose schützt. Auch konnte ein chemotaktischer Effekt auf Monozyten gefunden werden [58].

*In vivo* konnten bei vorausgegangenem Knochendefekt eine verbesserte Gefäßneubildung und Ossifikation nach Applikation von VEGF nachgewiesen werden [58].

Hergestellt wird PRP aus autologem Vollblut und ist somit weder toxisch noch immunogen. Das abgenommene Blut wird zunächst mit Citrat behandelt, um ein Gerinnen zu verhindern, anschließend wird es durch Zentrifugation aufgetrennt in PRP (enthält Thrombozyten und Leukozyten) und PPP (enthält Plasma und Erythrozyten). Die Thrombozytenkonzentration sollte nach dem Zentrifugieren im Durchschnitt mindestens 1 - 2,5 Millionen Thrombozyten/ $\mu$ l Plasma betragen, in

Einzelfällen wurde eine Konzentrationssteigerung auf bis zu vier Millionen beobachtet [59]. Das PRP kann vor Verabreichung mit Kalzium oder patienteneigenem Thrombin aktiviert werden. Durch das Verwenden von aktiviertem PRP wird die Freisetzung der Wachstumsfaktoren gesteigert, weiterhin konnte eine verstärkte Zellteilung unter der Verwendung von aktiviertem PRP beobachtet werden [60].

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass PRP den Kollageneinbau sowie die Vaskularisierung von Sehnen begünstigt [61–63]. So konnten Randelli et al. bei der arthroskopischen Therapie der Rotatorenmanschettenruptur einen schneller verlaufenden Heilungsprozess und weniger postoperative Schmerzen bei mit PRP behandelten Patienten gegenüber einer Placebo-Gruppe feststellen [64]. Patienten mit beginnender Osteoarthrose profitieren von einer intraartikulären PRP-Injektion, hierdurch konnte eine Verbesserung der Beweglichkeit sowie eine Reduktion des Schmerzlevels erreicht werden [65].

Ein weiterer Anwendungsbereich für PRP ist die Frakturheilung. Hier kann durch die Applikation des PRP und der enthaltenen Wachstumsfaktoren der Heilungsprozess gefördert und die Belastbarkeit verbessert werden [66]. Bei der Behandlung schlecht heilender Frakturen kann PRP außerdem in Kombination mit einem Knochenersatzmaterial die Knochenregeneration unterstützen und die Knochenheilung begünstigen [67].

### 1.3.7 Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen sind multipotente Zellen mit einem niedrigen Differenzierungsgrad. Bei den adulten Stammzellen unterscheidet man hämatopoetische, mesenchymale und gewebständige Stammzellen. Mesenchymalen Stammzellen wurden erstmals 1968 von Friedenstein et. al. beschrieben [68]. Aus diesen Zellen entwickeln sich sämtliche Binde- und Stützgewebe, Herz- und Skelettmuskulatur sowie die glatte Muskulatur.

Stammzellen besitzen die Fähigkeit der Autoreproduktion. Bei der Zellteilung entstehen durch asymmetrische Teilung zwei unterschiedliche Tochterzellen, wobei eine der Zellen die Eigenschaften der Mutterzelle erbt und zur Stammzelle wird. Die andere Zelle wird zu einer Vorläuferzelle (Progenitorzelle), welche sich in

ein bestimmtes Gewebe differenziert und die Eigenschaften der Stammzelle verliert.

Adulte mesenchymale Stammzellen sind multipotent und können sich daher z. B. zu Chondrozyten, Adipozyten, Osteozyten, Fibrozyten oder Myozyten entwickeln. Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich in Chondrozyten und Osteoblasten zu entwickeln, sind mesenchymale Stammzellen ein vielversprechender Zelltyp bei der Therapie von osteochondralen Defekten [69].

Die für die therapeutische Anwendung benötigten Zellen können dem Patienten in einem ersten operativen Eingriff entnommen, anschließend *in vitro* vermehrt und in einer zweiten Operation transplantiert werden. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass absolut steril gearbeitet werden muss, durch die lange Kultivierungszeit der Stammzellen ein zweizeitiges operatives Vorgehen notwendig wird und die Prozedur mit hohen Kosten verbunden ist [70].

Eine Alternative zur *in vitro* Vermehrung der Zellen ist das intraoperative Aufbereiten von Knochenmarkaspirat, welches beispielsweise durch die Punktion des Beckenkamms gewonnen werden kann. Knochenmark enthält allerdings nur eine geringe Konzentration an mesenchymalen Stammzellen, die aber durch Zentrifugation des gewonnenen Aspirats erhöht werden kann [71].

Ein positiver Effekt von BMAC auf die Knochenheilung konnte bereits in experimentellen Studien nachgewiesen werden [72,73]. *In vitro* kultivierte Stammzellen werden bereits mit Erfolg klinisch zur Therapie chondraler Defekte eingesetzt [74,75].

### 1.3.8 **Knochenmarkaspiratkonzentrat**

Knochenmarkaspiratkonzentrat *oder Bone Marrow Aspirate Concentrate* ist ein autologes Blutprodukt, welches durch Punktion beispielsweise des Beckenkamms gewonnen und durch anschließende Zentrifugation hergestellt werden kann. Es enthält mesenchymaler Stammzellen, welche nachweislich die Heilung von Knorpel- und Knochendefekten positiv beeinflussen können [76]. Da es sich um körpereigenes Material handelt, ist es weder immunogen noch infektiös. Hernigou et al. konnten zeigen, dass die Effektivität der BMAC-Applikation mit der Zahl der transplantierten Stammzellen zunimmt [77].

Der positive Effekt von Knochenmarkkonzentrat konnte schon bei der Therapie schlecht heilender Frakturen, aber auch bei der Therapie osteochondraler Defekte in Kombination mit einer Mikrofrakturierung nachgewiesen werden [78,79].

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Die Behandlung von osteochondralen Defekten stellt für die Medizin noch immer eine große, oftmals nicht befriedigend zu behandelnde Problematik dar. Es existieren zahlreiche Behandlungsmethoden, welche aber oft mit ausgedehnten, mehrzeitigen operativen Eingriffen, postoperativer Entnahmemorbidität und nicht zufriedenstellenden Langzeitergebnissen verbunden sind.

Eine mögliche neue Therapie von osteochondralen Defekten stellen synthetische, biphasische Matrices dar. Diese sind ohne Entnahmemorbidität verfügbar, bieten dem Gelenk initial eine ausreichende Stabilität und sollen durch das Einwandern von mesenchymalen Stammzellen zur Neubildung von hyalinartigem Knorpelgewebe beitragen.

In ersten klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Implantation biphasischer Matrices einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess osteochondraler Defekte und das Wohlbefinden der Patienten hat [43,45].

Ein weiterer Ansatz zur Therapie von Knorpel-, Knochen- und Sehndefekten ist die Verwendung von in Thrombozyten enthaltenen Wachstumsfaktoren und konzentrierten mesenchymalen Stammzellen in Form von BMAC. Die Wirksamkeit dieser Verfahren wurde bereits in zahlreichen Studien belegt.

Mit dieser wissenschaftlichen Untersuchung soll im Tiermodell geklärt werden, ob sich die Heilung osteochondraler Defekte durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren wie PRP oder BMAC zu einem synthetischen biphasischen Scaffold verbessern lässt.

## **2 Material und Methoden**

Die Arbeitsgruppe wurde durch PD Dr. med. Michael Wild und Dr. med. Marcel Betsch geleitet. Die Operationen, die Nachbetreuung der Versuchstiere und die Euthanasierung wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie wurden von mir folgende wissenschaftliche Aufgaben übernommen:

- Operation der Mini-Pigs, sowie Assistenz bei der Durchführung der Operationen
- Herstellung von PRP und BMAC
- Evaluierung der Thrombozytenzahl in Vollblut, PRP und BMAC
- Explantation der Präparate und Vorbereitung für die weitere Verarbeitung
- Mikroskopische Evaluierung der histologischen Schnitte
- Auswertung der Ergebnisse nach Anleitung durch die Betreuer

### **2.1 Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung**

In dieser Studie wurde ein in vivo Großtierversuch durchgeführt. Für die Versuche wurden 14 Göttinger *Mini-Pigs*, welche zum Zeitpunkt der Experimente zwei Jahre alt waren (Gewicht 25 – 35 kg), mit insgesamt 28 osteochondralen Defekten therapiert. Die Versuche und Operationen wurden nach Genehmigung durch die Bezirksregierung Düsseldorf (Protokollnummer: 87-51.04.2010.A140) in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Ebenso erfolgte hier die prä- und postoperative Unterbringung der Versuchstiere. Beide Hinterläufe der Versuchstiere wurden im Rahmen einer Operation mit einem 6 x 10 mm großen osteochondralen Defekt an den medialen Femurkondylen beider Kniegelenke versehen, so dass insgesamt 28 Läsionen therapiert wurden. Die Hinterläufe der 14 Versuchstiere wurden randomisiert in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 2).

Die Defekte der Gruppe 1 hatten die Funktion eines Kontrolldefektes und wurden nur mit dem TruFit®-Plug behandelt.

Die sieben Defekte aus Gruppe 2 wurden mit TruFit®-Plug und *Platelet Rich Plasma* therapiert.

Defekt-Gruppe 3 wurde mit TruFit®-Plug und BMAC behandelt.

Die Versuchs-Defekte aus Gruppe 4 wurden mit TruFit®-Plug und einer Kombination aus PRP und BMAC behandelt.

Gruppe 1	TruFit®-Plug
Gruppe 2	TruFit®-Plug + PRP
Gruppe 3	TruFit®-Plug + BMAC
Gruppe 4	TruFit®-Plug + PRP + BMAC

**Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen**

## **2.2 TruFit®-Plug**

Bei dem in dieser Studie verwendeten biphasischen Scaffold handelte es sich um einen TruFit®-Plug (Smith & Nephew, San Antonio, TX). Das biphasisch aufgebaute zylindrische Implantat besteht aus einer Knochen- und einer Knorpelphase.

Die Grundlage beider Anteile ist das amorphe Copolymer Poly-DL-Lactid-co-Glycolid, welches synthetisch hergestellt und vom Körper vollständig resorbiert wird. Die zwei Phasen unterscheiden sich darin, dass in der Knochenphase zusätzlich 10 % Calcium-Sulfat verarbeitet ist, welches sich positiv auf die Knochenheilung auswirken soll. Die Oberfläche des verwendeten *Scaffold* ist wasserdicht versiegelt, um das Austreten von Blut und Zellen aus dem Defekt zu verhindern. Weiterhin ist der poröse *Scaffold* hydrophil und soll so Blut und Stammzellen ansaugen, um so nach Differenzierung eine erhöhte Konzentration an Chondrozyten und Osteoblasten im Defektgebiet zu erreichen.

Wir haben diesen *Scaffold* für unsere Studie ausgewählt, da frühere Studien zeigen konnten, dass dieses Implantat das Wirtsgewebe nicht schädigt und keine immunologischen Reaktionen hervorgerufen werden [80]. Auch erste klinische Studien mit arthroskopisch eingesetzten TruFit®-Plugs zeigten positive Ergebnisse hinsichtlich Schmerzreduktion und immunologischer Verträglichkeit [81].

### **2.3 Versuchstiere**

Die Pflege, Behandlung und Haltung wurde entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Der Versuch wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Leibnitzstraße 10, 45659 Recklinghausen) genehmigt (Protokollnummer: 87-51.04.2010.A140).

Für die Experimente wurden insgesamt 14 Göttinger *Mini-Pigs* verwendet, deren Haltung über den gesamten Versuchszeitraum einheitlich war. Die Tiere wurden in der TVA-Düsseldorf geboren und hier auch postoperativ bis zu ihrer Euthanasierung gehalten. Präoperativ konnte so der Allgemein- und Ernährungszustand der Tiere sowie die Gesundheit des Bewegungsapparates fachtierärztlich kontrolliert werden.

### **2.4 Vorbereitung und Narkose**

Vor der Operation wurden die jeweiligen Versuchstiere zwölf Stunden nüchtern gelassen, um das Aspirationsrisiko während der Narkose zu verringern. Nachdem das Gewicht des jeweiligen Schweins ermittelt wurde, wurden die Tiere zunächst durch eine intramuskuläre Injektion von 10 mg Ketamin analgesiert und sediert. Sobald eine ausreichende Sedierung vorhanden war, wurde ein Zugang in die *Vena auricularis* gelegt, bei schwierigen Venenverhältnissen am Ohr diente die *Vena femoralis* als Alternative. Über die periphere Venenverweilkanüle wurde zunächst Blut abgenommen. Dieses wurde in EDTA-, und Plasma-Röhrchen aufgefangen und später zur Erstellung eines Blutbilds sowie zur Herstellung von PRP verwendet. Über den Zugang wurde dann durch eine intravenöse Injektion von Thiopental 8 – 15 mg/kg die Narkose eingeleitet. Es folgte die oropharyngeale Intubation mit einem Trachealtubus.

Anschließend wurden die beiden Hinterläufe des Versuchstiers geschoren und mit einer Seifenlösung abgewaschen. Bei geplanter Knochenmarkentnahme wurde zusätzlich die Haut über den Beckenkämmen großzügig geschoren und ebenfalls gewaschen. Das Versuchstier wurde dann in Rückenlage, bei Knochenmarkentnahme zunächst in Bauchlage, auf den Op-Tisch gelagert und die Vorderläufe mit Mullbinden am Tisch fixiert (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Op-Lagerung**

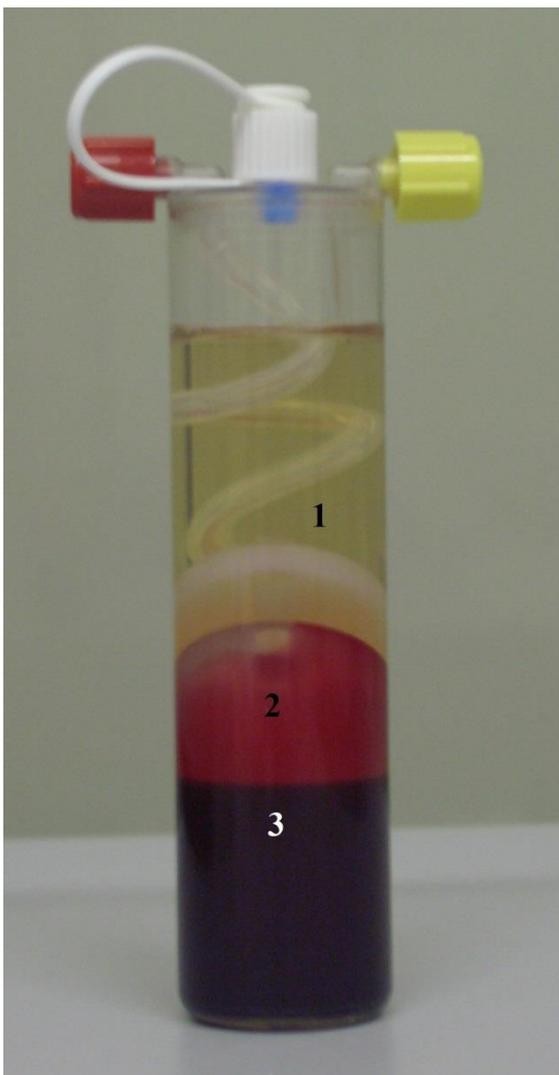
Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere mit Isofluran (1 - 2,0 Vol.%) und Sauerstoff beatmet. Um intraoperativ eine Analgesie zu erreichen, wurden Fentanyl (0.01 - 0.03 mg/kg) sowie Piritramid (0,1 mg/ kg) intravenös verabreicht. Herzfrequenz und -rhythmus wurden perioperativ per EKG überwacht, wofür Elektroden an den entsprechenden Stellen angebracht wurden. Die für die Operation notwendigen Instrumente wurden steril auf extra abgedeckten Op-Tischen vorbereitet. Anschließend wurden die Hinterläufe mit Hautdesinfektionsmittel eingesprüht und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

## **2.5 Herstellung von Platelet Rich Plasma**

In den Versuchsgruppen, in welchen PRP verwendet wurde, wurde dieses mit Hilfe des "GPS® II Platelet Separation System" (Biomet Biologics, Warsaw, USA) standardisiert hergestellt. Zur Anfertigung des *Platelet Rich Plasma* wurde aus der *Vena auricularis* 27 ml Vollblut entnommen. Dieses wurde mit einer 30 ml Spritze,

welche vorher mit 3 ml 3,13 % Natrium-Citratlösung benetzt wurde, aufgefangen. Außerdem wurden mehrere Serum- und EDTA- Röhren mit Blut gefüllt, um die Anreicherung der Wachstumsfaktoren überprüfen zu können.

Die 30 ml Citrat-Vollblut wurden nun in ein im Set enthaltenes Separationsröhrchen eingespritzt. Dieses wurde gewogen und ein Gegengewicht für den Zentrifugationsvorgang erstellt. Das Separationsröhrchen und das Gegengewicht wurden anschließend einander gegenüber in eine Zentrifuge gestellt und für 12 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Vollblut separiert in PPP, *Buffy Coat* und PRP (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Boje mit 1. *Platelet Poor Plasma*, 2. *Buffy Coat*, 3. *Platelet Rich Plasma***

Nach Beendigung des Zentrifugationsvorgangs wurde zunächst das *Platelet Poor Plasma* abgezogen. Anschließend konnte das PRP bei senkrecht stehender Boje mit einer 10 ml Spritze aufgezogen werden. Das für die Aktivierung des PRP erforderliche Thrombin wurde durch Zentrifugation von 7 ml Vollblut gewonnen

und mit 2 ml 10 % Calciumchlorid versetzt.

Die Analyse des Blutes erfolgte mit einem "Vet abc" (scil, Illinois, USA), einem für Schweine geeichten Zellzähler, welcher vor und nach Zentrifugation ein Blutbild zur Kontrolle der Thrombozytenanreicherung erstellte.

## 2.6 Analyse der Wachstumsfaktoren in Serum und PRP

Es wurde die Konzentration der Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP-7, VEGF, TGF- $\beta$  und PDGF im Serum sowie im PRP quantitativ erfasst. Hierfür wurden kommerziell erhältliche ELISA Kits (Quantikine<sup>®</sup>, ELISA KITS, R&S Systems, Minneapolis, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Beispielhaft soll hier der Nachweis von VEGF beschrieben werden.

Verwendet wurde das Human VEGF Kit der Firma R&S Systems. Die Reagenzien wurden zunächst alle auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde ein Waschpuffer (20 ml Konzentrat + 480 ml aqua dest.) sowie die Substrat-Lösung (Color Reagent A+B im Verhältnis 1:1) angemischt und 200  $\mu$ l Substrat in jedes Well gegeben. Nun wurden sieben Eppendorf-Cups beschriftet und mit je 200  $\mu$ l Calibrator Diluent RD6U beimpft. Danach wurde Cup eins mit 200  $\mu$ l VEGF-Standard behandelt und eine 1:1 Verdünnungsreihe mit jeweils 200  $\mu$ l durchgeführt, bis eine Konzentration von 15,6 pg/ml erreicht war (siehe Abbildung 6).

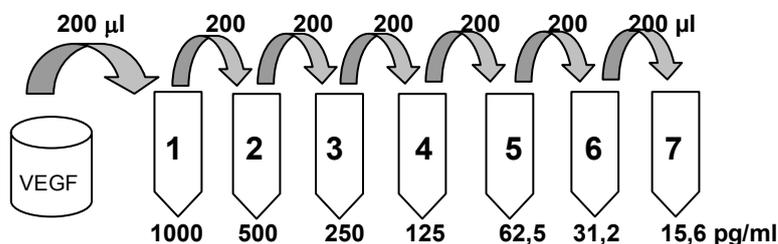


Abbildung 6: Verdünnungsreihe

Hiernach wurden 100  $\mu$ l Assay Diluent RD1W und 100  $\mu$ l Plasma in die Wells pipettiert, die Wellplatte abgeklebt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Wellplatte dreimal mit 400  $\mu$ l/Well Waschpuffer gewaschen und mit 200  $\mu$ l VEGF-Konjugat/Well behandelt. Die Proben wurden nun erneut abgeklebt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit je

400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 200 µl Substrat pipettiert und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden 25 µl Stopplösung in jedes Well gegeben und die Proben kurz geschüttelt, bis sich ein Farbumschlag von blau nach gelb zeigte. Es wurde dann eine photometrische Messung bei 450 nm durchgeführt und eine Standardkurve erstellt, so dass die Messwerte abgelesen werden konnten.

## **2.7 Colony Forming Unit-Assay**

Zur Analyse des Proliferationspotentials des BM (Bone Marrow) und des BMAC wurden die *Colony forming Unit* (CFU) herangezogen. Hierfür wurden gleiche Konzentrationen von mononukleären Zellen aus dem BM wie aus dem BMAC aspiriert und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  in 24-Well Platten (Nunc, Wiesbaden) eingebettet. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurden die Wells mit einem Medium aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (PAA Laboratories, Cölbe), 20 % Rinderserum (PAA Laboratories, Cölbe), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe) versehen. Anschließend wurden die Wells bei Raumtemperatur für 14 Tage kultiviert. Das Ernährungsmedium wurde alle drei Tage erneuert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen in Formalin 4 % fixiert und mit *Phosphate buffered Saline* (PBS) gespült. Zur Bestimmung der CFU-F wurden die Zellen für 60 min bei Raumtemperatur in Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) angefärbt.

## **2.8 Herstellung von Knochenmarkkonzentrat**

In den Versuchsgruppen, in denen BMAC verwendet wurde, wurde zur Herstellung des Knochenmarkkonzentrats das "Marrowstim™ Mini Kit" (Biomet Biologics, Warsaw, USA) benutzt.

Im OP wurde das Versuchstier in Bauchlage auf den Operationstisch gelegt und das Operationsgebiet mit Hautdesinfektionsmittel eingesprüht sowie steril abgedeckt. Nun wurde ein ca. 2-3 Zentimeter langer Hautschnitt entlang des vorher getasteten Beckenkamms gemacht. Sobald die Haut eröffnet war, wurde mit einer chirurgischen Schere stumpf bis auf den Beckenkamm präpariert. Anschließend wurde die Knochenmarkpunktkanüle vorbereitet, indem 6 ml

3,13 % Natrium-Citratlösung (ACD-A, Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, Biomet Biologics) in eine 30 ml Spritze aufgezogen wurden. Die Natrium-Citratlösung wurde gründlich in der Spritze verteilt und 3 ml durch die vorher aufgeschraubte Punktionsnadel auslaufen gelassen, um auch diese mit dem Antikoagulans zu benetzen.

Zur Punktion wurde die Nadel möglichst senkrecht auf den Beckenkamm aufgesetzt und unter Drehbewegungen in den Knochen bewegt. Nun wurde die Nadel so im Beckenkamm positioniert, dass sich Knochenmark aspirieren ließ. Es wurden pro Beckenkamm ca. 13,5 ml Knochenmark aspiriert, so dass sich in der Spritze nach dem Punktieren beider Seiten 27 ml BM + 3 ml Natrium-Citratlösung befanden. Die Wunde wurde anschließend mit Vicryl 2,0 Nähten subkutan vernäht. Hiernach wurde die Haut ebenfalls mit Vicryl 2,0 Fäden durch eine Einzelstichnaht verschlossen. Zur Infektionsprävention wurden Aluminium-Spray und Sprühverband aufgebracht. Um später die Anreicherung überprüfen zu können, wurde von dem erhaltenen Bone Marrow vor der Konzentrierung ein Blutbild mit Hilfe des "Vet abc" (scil, Illinois, USA) angefertigt.

Das gewonnene Knochenmark wurde in die Zentrifugationsboje injiziert und bei 3200 rpm für 15 min zentrifugiert, hierbei separieren sich die korpuskulären Strukturen aufgrund des Dichtegradienten. Es wurden auf diese Weise aus 30 ml BM-Citrat-Gemisch ca. 3 ml *Bone Marrow Aspirate Concentrate* hergestellt. Nach Beendigung des Zentrifugationsvorgangs wurde eine 30 ml Spritze an die Boje angeschlossen und die Boje auf den Kopf gedreht. Nun wurde das CPP komplett abgezogen und verworfen. Die Zentrifugationsboje wurde anschließend in aufrechter Position für 30 Sekunden vorsichtig geschüttelt, um so sicherzustellen, dass es nicht zur Ablagerung zellulärer Bestandteile am Boden der Boje kommt. Nun wurde eine sterile 30 ml Spritze verwendet, um das BMAC aufzuziehen. Abschließend wurde erneut ein Blutbild angefertigt, die *White Blood Cell (WBC)*-Konzentration gemessen und durch Vergleich mit der WBC-Konzentration im Vollblut der Konzentrationsfaktor bestimmt.

Zur Überprüfung der Qualität des BMAC sowie der Anreicherung nach Zentrifugation, wurde die Anzahl der mononukleären Zellen (MNZ) sowie die der CFU herangezogen.

## 2.9 Generierung der osteochondralen Defekte

Nachdem das Versuchstier mit sterilen Tüchern abgedeckt und der Hinterlauf mit Folie beklebt war, wurde das Kniegelenk chirurgisch eröffnet. Hierfür wurde ein längsverlaufender Hautschnitt ca. einen Zentimeter medial des Lig. patellae vom Gelenkspalt ausgehend durchgeführt. Danach wurde subkutan ein Wundspreizer eingesetzt und mit einem spitzen Skalpell die Capsula articularis eröffnet. Sobald die Gelenkkapsel eröffnet war, wurde der Wundspreizer vorsichtig unterhalb der Kapsel positioniert. Das Gelenk wurde weiter freipräpariert, bis eine gute Sicht auf den *Condylus medialis* möglich war. Um die Darstellung der medialen Femurkondyle zu optimieren, wurde das Kniegelenk maximal flektiert und nach außen rotiert. Zur Defektsetzung wurde ein zylindrischer Hohlmeißel verwendet. Die Knochenstanze wurde zentral und senkrecht auf die mediale Kondyle aufgesetzt und mit vorsichtigen Hammerschlägen 10 mm in den Knochen getrieben (siehe Abbildung 7).

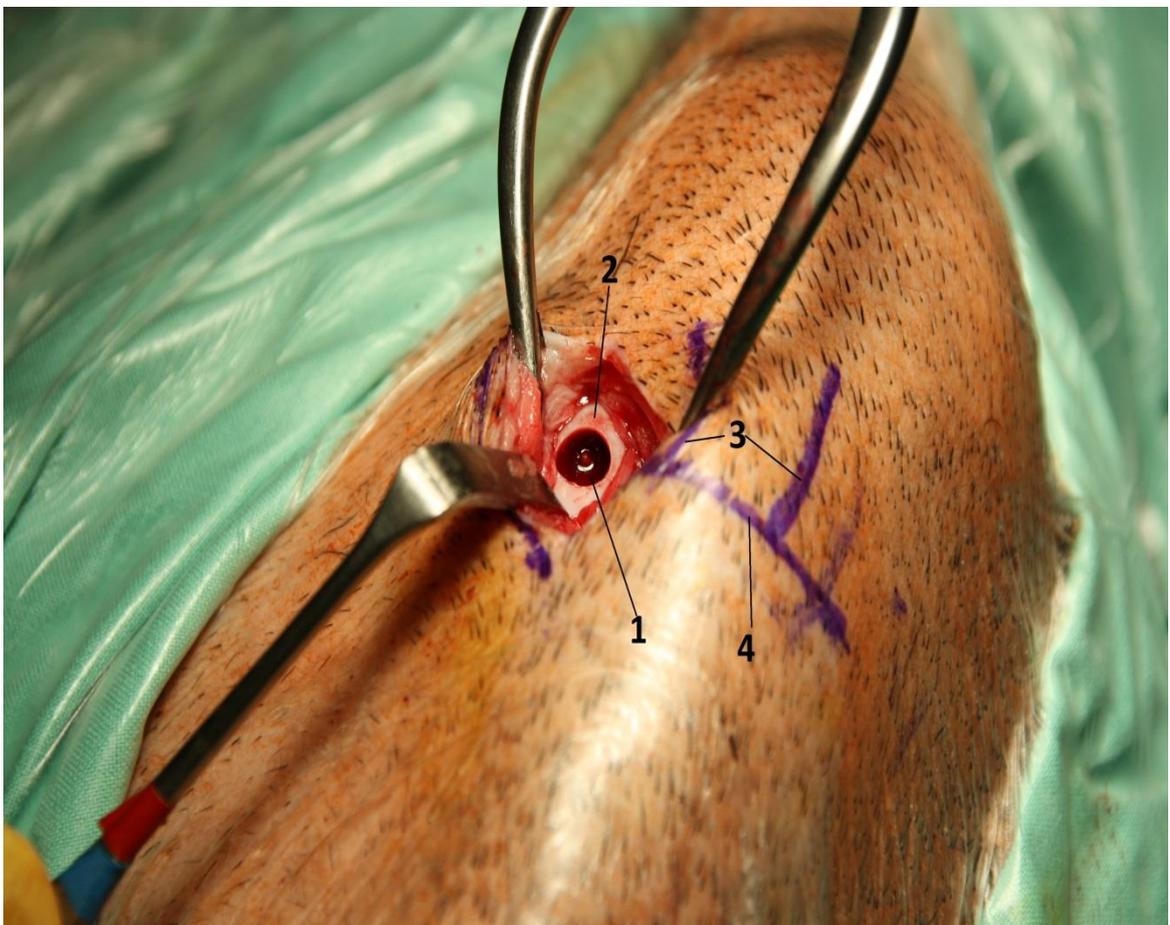


Abbildung 7: 1. Osteochondraler Defekt, 2. Mediale Kondyle, 3. Markierungen des Lig. patellae, 4. Markierung Gelenkspalt

Beim Setzen des Defektes wurde die Eindringtiefe der Stanze durch Markierungen an der selbigen überprüft. Der entstandene Knochen-Knorpel-Zylinder wurde hiernach, unter leichten Drehbewegungen, zusammen mit der Stanze aus dem Kniegelenk entfernt (siehe Abbildung 8).

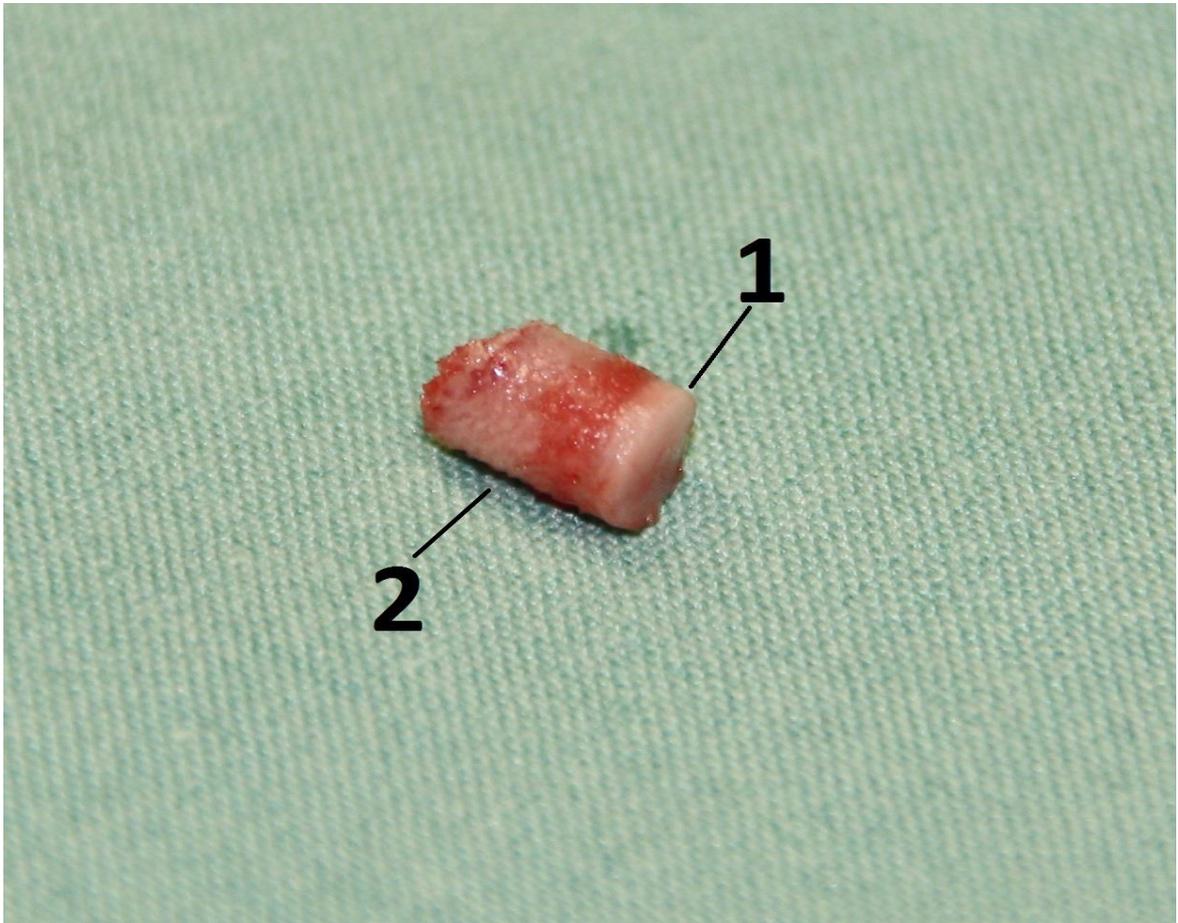


Abbildung 8: Stanzzylinder mit 1. chondraler Phase, 2. knöcherner Phase

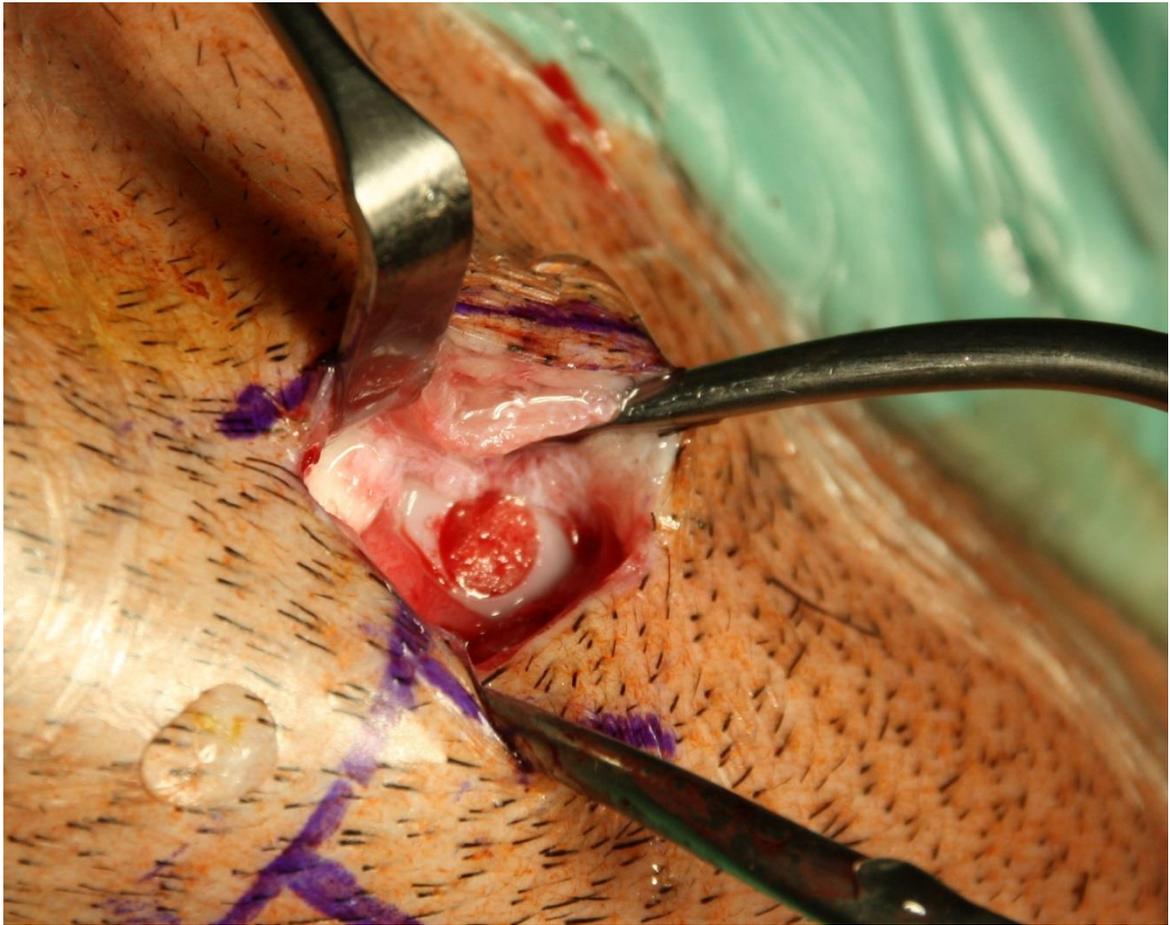
## 2.10 Defekttherapie

### 2.10.1 Therapie mit TruFit®-Plug als Kontrollgruppe

Bei den Tieren, die nach der Defektsetzung mit dem *Scaffold* therapiert wurden, wurde nach dem Reinigen des Stanzkanals der entfernte Knochen- Knorpel-Zylinder vermessen. Er diente in Länge und Form als Vorlage für den *Scaffold*, welcher nach dessen Vorbild zugeschnitten wurde.

Der zugeschnittene *Scaffold* wurde im osteochondralen Defekt platziert und mit einem Kunststoffstößel soweit wie möglich manuell in den Defektkanal geschoben. Unter leichten Hammerschlägen wurde das Implantat dann mit Hilfe des Stößels weiter in den Knochen eingebracht, so dass die Oberfläche des *Scaffolds* und die

Knorpeloberfläche eine möglichst glatte, kantenfreie Gelenkfläche bildeten (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Scaffold im Defekt**

Der verwendete *Scaffold* wurde in *Press-Fit* Technik im Defekt verankert. Die Wunde wurde nun mit Vicryl 2,0 Nähten subkutan vernäht und die Haut mittels Vicryl 2,0 Fäden durch eine Einzelstichnaht verschlossen.

### 2.10.2 Therapie mit TruFit®-Plug und Platelet Rich Plasma

Der *Scaffold* wurde bei dieser Therapieart, analog zum oben beschriebenen Vorgehen, an den Defekt angepasst und zugeschnitten. Um die Freisetzung der im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren zu steigern, wurde die Gerinnungskaskade mit Hilfe von Calcium und Thrombin aktiviert. Die vorher durch das Natrium- Citrat entzogenen Calcium Ionen wurden durch die Zugabe von 2 ml 10 % Calciumchlorid ersetzt. Weiterhin wurde das PRP mit Thrombin versetzt und durch Umrühren vermengt, um so die Gerinnung einzuleiten.

Zur Erreichung einer optimalen Durchtränkung des Materials, wurden zunächst 2 ml PRP mit einer Spritze injiziert und der *Scaffold* für fünf Minuten in dem ausgetretenen PRP eingelegt. Der *Scaffold* wurde anschließend so lange in dem Gemisch umher geschwenkt, bis das PRP einen geleeartigen Koagel um das Implantat bildete. Beide Komponenten wurden jetzt, wie in vorangegangenen Abschnitten erklärt, in den Defekt eingebracht.

### **2.10.3 Therapie mit TruFit®-Plug und Knochenmarkkonzentrat**

Bei der Therapie mit *Scaffold* und Knochenmarkkonzentrat wurde das Implantat, analog zu dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Vorgehen, passgenau zugeschnitten. Vor dem Einbringen wurde dieser mit 2 ml BMAC beimpft. Hierfür wurde das Knochenmarkkonzentrat in eine sterile Spritze gefüllt, welche mit einer dünnen Nadel versehen wurde. Die Nadel wurde anschließend an mehreren Stellen in den *Scaffold* eingestochen und das Knochenmarkkonzentrat in die Matrix eingespritzt. Das austretende Stammzellkonzentrat wurde in einer kleinen Metallschale aufgefangen und der *Scaffold* für fünf Minuten hierin eingelegt, bis dieser die komplette Menge der Flüssigkeit aufgenommen hatte. Der mit BMAC getränkte TruFit®-Plug wurde nun wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben in den Defekt eingebracht.

### **2.10.4 Therapie mit TruFit®-Plug, PRP und Knochenmarkkonzentrat**

Nach dem passgenauen Zuschneiden des *Scaffold* wurde jeweils 1 ml PRP und 1 ml BMAC miteinander vermischt und das PRP durch Zugeben von Thrombin aktiviert. Dieses Gemisch wurde anschließend in eine sterile 2 ml Spritze gefüllt und an mehreren Stellen in das Implantat injiziert. Der *Scaffold* wurde dann für fünf Minuten in der austretenden Flüssigkeit eingelegt.

## **2.11 Euthanasierung und Präparatgewinnung**

Nach sechs Monaten wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion von 10 mg Ketamin sediert. Nachdem ein Zugang in die *Vena auricularis* gelegt wurde, wurden die Versuchstiere durch das Verabreichen einer Überdosis von 3 % Pentobarbital (Eutha 77®, Essex Pharma GmbH, Germany) euthanasiert. Der Tod wurde auskultatorisch durch Abhören der Herztöne bis zum Herzstillstand sowie

anhand der entrundeten Pupillen festgestellt.

In der Pathologie der TVA wurde mit Hilfe von Skalpell und Präparierschere die Haut eröffnet und die Weichteile so weit entfernt, dass das distale Femur sowie die proximale Tibia und Fibula gut zugänglich waren. Nach Präparation der knöchernen Strukturen wurden diese mit einer oszillierenden Säge durchtrennt. Das Femur wurde ca. fünf Zentimeter proximal des Kniegelenkspaltes abgesetzt, Tibia und Fibula ca. fünf Zentimeter distal des Gelenkspaltes. Verbliebenes Muskelgewebe und Patella wurden, abseits vom Versuchstier, knochennah entfernt, die Seitenbänder sowie die Gelenkkapsel wurden durchtrennt. Nach Ablösung der *Ligamenta cruciata* konnten die Femurkondylen vom Tibiaplateau separiert werden. Diese wurden fotografisch dokumentiert und es erfolgte eine erste makroskopische Beurteilung. Das Präparat wurde anschließend mit einer Bandsäge (Proxxon, Niersbach) von überflüssigem Femur-Knochen befreit, so dass es nur noch die Kondylen umfasste. Diese wurden umgehend in Plastikbehälter gegeben und in 0,9 % NaCl-Lösung bei -18 °C eingefroren.

## 2.12 **Histomorphometrische Färbung**

### 2.12.1 **Probenaufarbeitung**

Die einzelnen Präparate wurden sechs bis zehn Tage in gepuffertem Formalin 4 % bei Raumtemperatur fixiert. Nach intensivem Wässern (2 Stunden), um die Fixierlösung zu entfernen, wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Tabelle 3).

Hiernach wurden die Knochenpräparate zur Entfettung in Xylol eingelegt. Das Xylol wurde nach einer Woche erneuert und die Präparate für eine weitere Woche eingelegt. Anschließend wurden sie in Polymethylmethacrylat (Technovit 9100 NEU, Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet.

Substanz	Behandlungszeit in Tagen
Ethanol 70%	7
Ethanol 80%	7
Ethanol 90%	7
Ethanol 96%	7
Ethanol 99%	7
Ethanol 100%	7
Ethanol 100%	7

**Tabelle 3: Schema der aufsteigenden Alkoholreihe**

Die Proben wurden hierfür eine Woche lang in stabilisiertem Technovit mit Härter 1 (1 g Härter auf 200 ml Technovit) bei Raumtemperatur, für eine weitere Woche in

entstabilisiertem (die Entstabilisierung erfolgte in einer Chromatographiesäule mit 50 g AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Technovit mit Härter 1 (1 g Härter 1 auf 200 ml) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Präparate für 1 Woche im Kühlschrank in Infiltrationslösung, bestehend aus Polymethylmethacrylat, entstabilisiertem Technovit und Härter 1 (60 g PMMA / 750 ml Basislösung / 3 g Härter 1) inkubiert, bevor sie mit der Polymerisationslösung, bestehend aus 14,4 g PMMA, 0,5 mg Härter 1, 0,9 ml Härter 2, 0,5 ml Polymerisationsregler pro 100 ml entstabilisiertem Technovit, bei - 4 °C im Gefrierschrank in Kunststoff-Formen unter Luftausschluss für 48 Stunden polymerisiert wurden.

Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Kunststoffblöcke mit einem Gipstrimmer (Wassermann HSS 99, Lohbrügge) getrimmt und mittels eines Acrylzements (Technovit 7210 VLC, Heraeus-Kulzer) auf opake Plexiglas-Objektträger geklebt.

Die Herstellung der Serienschnitte erfolgte in Trenn-Dünnschlifftechnik, hierbei wurden die Blöcke zunächst mit einem 0,1 µm dicken Diamanttrennblatt auf eine Dicke von 200 µm gesägt (Exakt Apparatebau, Norderstedt) und anschließend auf die finale Dicke von 20 - 30 µm (Exakt Apparatebau, Norderstedt). Pro Block wurden auf diese Weise drei Schnitte medial durch die Defektzone angefertigt.

### 2.12.2 Immunhistologische Färbungen

Um Informationen über die Qualität des neugebildeten Knorpels zu erhalten, wurde eine immunhistologische Färbung zur Darstellung von Kollagen II angefertigt. Die in PMMA eingebetteten Proben wurden zunächst für 2 x 10 min in Xylol entplastet, anschließend für 2 x 10 min mit 2-Methoxyethylacetat und für 2 x 5 min mit Aceton behandelt. Nachdem die Proben in PBS rehydriert wurden, erfolgte die Antigen-Demaskierung durch 15-minütige Inkubation mit Proteinase K (DakoCytomation, Hamburg) bei 37 °C. Hiernach wurden die Schnittproben in PBS + 0,1 % Triton X 100 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gewaschen und die Aktivität der endogenen Peroxidase durch 30-minütiges Eintauchen in eine Lösung aus 1 % Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) und PBS ausgeschaltet. Anschließend wurden die Proben erneut gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 30 Minuten mit Blockierungslösung (DakoCytomation) behandelt. Die Schnitte wurden dann mit dem primären monoklonalen Mausantikörper (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen) in einer

Verdünnung von 1 : 1200 und einem unspezifischen Antikörper (Maus-IgG1, Vector, Burlington, CA, USA) als Negativkontrolle über 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und mit einem biotinylierten Anti-Maus Antikörper (Vector) in einer Verdünnung von 1 : 1200 für 45 min bei RT inkubiert. Um die Anlagerung der Antikörper-Antigen-Komplexe nachzuweisen, wurden die Proben mit einer Strept-HRP-Lösung (Dako) mit einer Verdünnung von 1 : 200 für 15 min bei RT gewaschen und mit AEC (Dako) als Chromogen sichtbar gemacht [82].

## 2.12.3 Histologische Färbungen

### 2.12.3.1 Toluidinblau

Die Toluidinblau-Färbung dient dem Nachweis von Kollagenfasern (blau angefärbt) und der Knorpelmatrix (rot-violett angefärbt). Zur Anfärbung wurden die entplasteteten Proben für jeweils 60 Sekunden mit 0,1 % Toluidinblau gefärbt. Anschließend wurden die Präparate für 30 min in Leitungswasser gewässert und an der Luft getrocknet. Die Präparate wurden zunächst für 60 Sekunden mit 4 % Ameisensäure behandelt, 20 min gewässert und erst hiernach mit Toluidinblau angefärbt. Es konnte so ein optimales Farbe-Ergebnis erzielt werden.

### 2.12.3.2 Safranin O

Die Safranin O-Färbung dient der Darstellung von Glykosaminoglykane im Knorpelgewebe und ermöglicht eine semiquantitative Erfassung von GAGs. Für die Safranin O-Färbung wurden die Proben für zehn Minuten mit Safranin O 0,01 % behandelt und anschließend für zehn Minuten in Leitungswasser gewässert. Danach wurden sie mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und mit Depex eingedeckt. Auf die oftmals mit der Safranin O-Färbung kombinierte Lichtgrün-Färbung wurde nach anfänglichen Versuchen verzichtet, da die Proben sich hierbei dunkelgrün-schwärzlich verfärbten und unbeurteilbar wurden.

### **2.13 FACS-Analyse**

Zur Überprüfung der Qualität der im BMAC enthaltenen MSCs wurden die Zellen per Durchflusszytometrie (Cytomics FC 500 FACS; Beckman Coulter, Germany) auf für mesenchymale Progenitorzellen typische Oberflächenmerkmale untersucht.

Es wurden hierfür Antikörper gegen CD14, CD44 und CD90 sowie als Negativkontrolle gegen die für die hämatopoetische Zellreihe typischen Strukturen CD45 und CD34 verwendet [83].

Die FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie und dient dem Nachweis von Oberflächenstrukturen auf Zellen, sowie der Sortierung der Zellen anhand der entsprechenden Merkmale.

Die Zellen werden zunächst mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen eine bestimmte Struktur (z. B. CD44) markiert. Anschließend wird die Probe im Zuge der FACS durch einen Vibrator in kleine nur wenige Zellen enthaltende Tropfen separiert. Dies führt zu einer Zellvereinzelung, so dass die Zellen nun einzeln einen Laserstrahl passieren. Die hierbei entstehende Fluoreszenz wird über einen Detektor erkannt und lässt somit Rückschlüsse auf die Oberflächenmerkmale zu. Um die Probe anschließend in markierte bzw. unmarkierte Zellen zu sortieren, werden diese an einer Elektrode gegensätzlich polarisiert und mithilfe von Elektromagneten elektrostatisch in unterschiedliche Küvetten aufgeteilt.

## 2.14 Auswertung und Statistik

Die quantitative makroskopische Beurteilung der Knorpelregeneration erfolgte durch Verwendung eines von Rudert 2005 vorgestellten Scores, bei dem eine maximale Punktzahl von 8 erreicht werden kann (siehe Tabelle 4)[84].

Kriterium	Punkte	Makroskopische Charakteristika
Defektauffüllung	1	Deutlich unterhalb des umgebenden Knorpels
	2	Auf Höhe des umgebenden Knorpels, zentrale Vertiefung
	3	Bündig mit dem umgebenden Knorpel
Farbe	1	Braun oder gelb
	2	Weiß
	3	Knorpelfarben, entsprechend dem umgebenden Knorpel
Oberfläche	1	Rau
	2	Glatt
Max. Score	8	

**Tabelle 4: Makroskopischer Score (modifiziert nach Rudert et al. [84].)**

Die histologische Auswertung erfolgte mit Hilfe des nach Rudert modifizierten O'Driscoll Score, welcher als validiertes Verfahren zur Beurteilung der Knorpelqualität genutzt wird [85, 86]. Bei diesem Score kann eine Maximalpunktzahl von 24 Punkten erreicht werden. Morphologische und strukturelle Abweichungen vom hyalinen Gewebe in der histologischen Untersuchung, resultieren in einem niedrigeren Score (siehe Tabelle 5).

<b>Art des vorherrschenden Gewebes</b>	
<i>Zelluläre Morphologie</i>	
Hyaliner Gelenkknorpel	4
Inkomplett differenziertes Mesenchym	2
Fibröses Gewebe	0
<i>Safranin-O Färbung des Gewebes</i>	
Normal oder fast normal	3
Mäßig	2
Gering	1
Keine	0
<b>Strukturelle Merkmale</b>	
<i>Oberflächenbeschaffenheit</i>	
Glatt und intakt	3
Oberflächliche horizontale Schichtung	2
Fissuren: 25-100% der Dicke	1
Starke Unterbrechungen, Aufsplitterungen	0
<i>Strukturelle Integrität</i>	
Normal	2
Leichte Unterbrechungen, auch Zysten	1
Starke Zertrümmerung	0
<i>Dicke</i>	
100% des normalen angrenzenden Knorpels	2
50-100% des normalen Knorpels	1
< 50% des normalen Knorpels	0
<i>Verbindung mit dem umliegenden Knorpel</i>	
An beiden Seiten mit dem Transplantat verbunden	2
An einer Seite oder an beiden Seiten partiell verbunden	1
Nicht verbunden	0
<b>Abwesenheit von zellulären Veränderungen und Degeneration</b>	
Normale Zellularität	3
Leichte Hypozellularität	2
Mäßige Hypozellularität	1
Schwere Hypozellularität	0
<i>Chondrozytencluster</i>	
Keine Cluster	2
< 25% der Zellen	1
5-100% der Zellen	0
<i>Abwesenheit von degenerativen Veränderungen im angrenzenden Knorpel</i>	
Normale Zellularität, keine Kluster, normale Anfärbbarkeit	3
Normale Zellularität, geringe Clusterbildung, mäßige Anfärbbarkeit	2
Geringe oder mäßige Hypozellularität, geringe Anfärbbarkeit	1
Schwere Hypozellularität, schwache oder keine Anfärbbarkeit	0
<b>Total</b>	<b>24</b>

**Tabelle 5: Nach Rudert modifizierter O`Driscoll Score [86]**

Um die histologischen Ergebnisse der vier Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren wurden mittels eines t-Tests miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde hierfür auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 In Vitro Analyse

#### 3.1.1 MNZ- Konzentration in BM und BMAC

Der Mittelwert der mononukleären Zellen im BM der Gruppen, welche mit *Scaffold* und BMAC behandelt wurden, betrug  $23,08 \times 10^6$  Zellen/ml  $\pm 24,12$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Bei der Gruppe, die mit *Scaffold* und BMAC plus PRP behandelt wurde, betrug der Mittelwert der mononukleären Zellen  $43,85 \times 10^6$  Zellen/ml  $\pm 43,00$ . Nach dem Zentrifugieren und Aufbereiten des BMAC betrug die MNZ-Konzentration in der BMAC- Gruppe  $73,23 \times 10^6$  Zellen/ml  $\pm 64,75$  und in der BMAC+PRP- Gruppe  $106,07 \times 10^6$  Zellen/ml  $\pm 83,27$  (siehe Abbildung 10).

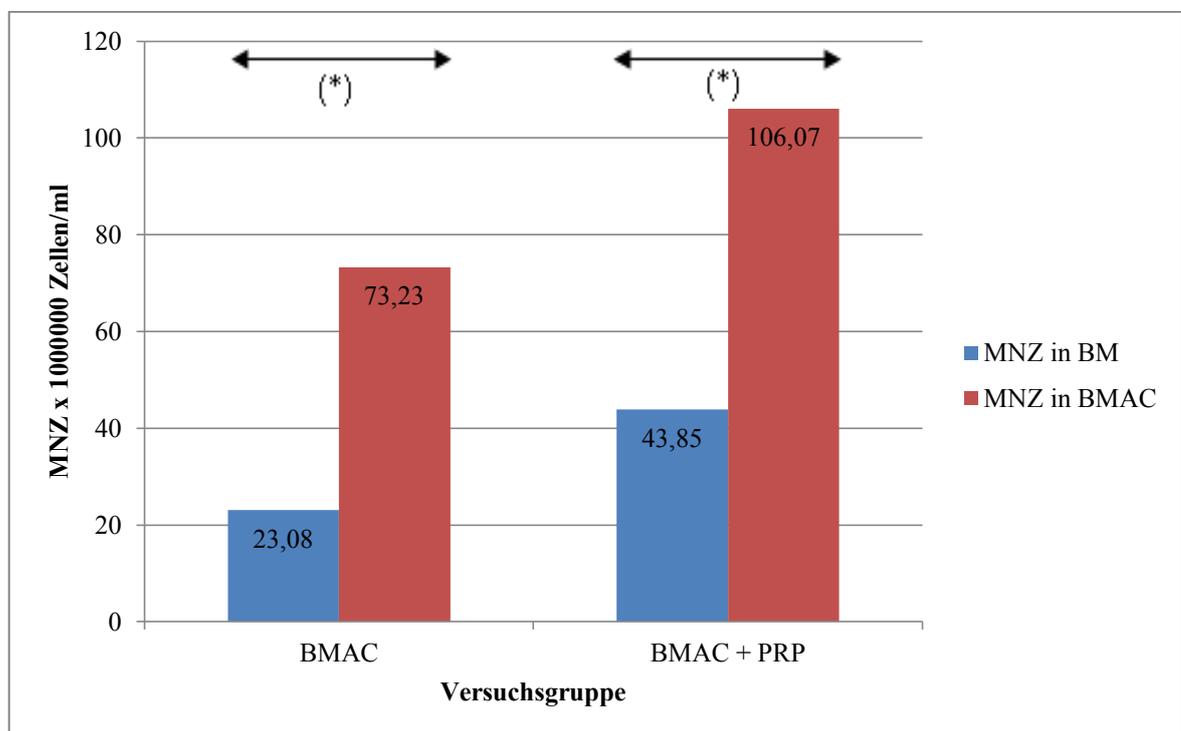


Abbildung 100: Durchschnittliche Anzahl mononukleäre Zellen

Hieraus ergibt sich ein Konzentrationsfaktor von 3,17 ( $p= 0,021$ ) für die BMAC-Gruppe und ein Konzentrationsfaktor von 2,42 ( $p= 0,006$ ) für die PRP- und BMAC-Gruppe. Durch Zentrifugation des Knochenmarkspirates konnte somit in beiden Gruppen (BMAC und BMAC+PRP) eine signifikante Anreicherung der MNZ im Konzentrat erreicht werden.

### 3.1.2 CFU in BM und BMAC

Als weiterer Test zur Quantifizierung der MNZ wurde die Anzahl der CFU vor und nach dem Konzentrationsvorgang bestimmt. Eine CFU wurde definiert als eine Zellkolonie ab einer Anzahl von 40 Zellen mit einem definierten Zentrum.

Nach sieben Tagen Inkubation haben wir einen Wert von  $0,3 \pm 0,69$  in  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> im BM, sowie einen Wert von  $1,9 \pm 2,5$  in  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ( $p=0,144$ ) im BMAC gemessen. Eine zweite Überprüfung der CFU wurde nach 14 Tagen durchgeführt, hierbei ergab sich für BM ein Wert von  $3,21 \pm 3,55$  in  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>, was einer Anreicherung um den Faktor 10,7 entspricht, und für BMAC  $5,09 \pm 5,21$  in  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ( $p=0,456$ ) was einen Faktor von 2,68 ergibt.

Es konnte in der BM-Gruppe keine statistisch signifikante Anreicherung der CFU-Anzahl nach 14 Tagen ( $p=0,078$ ) nachgewiesen werden, wohingegen sich in der BMAC-Gruppe eine signifikante Zunahme der CFU ergab ( $p=0,035$ ) (siehe Abbildung 11).

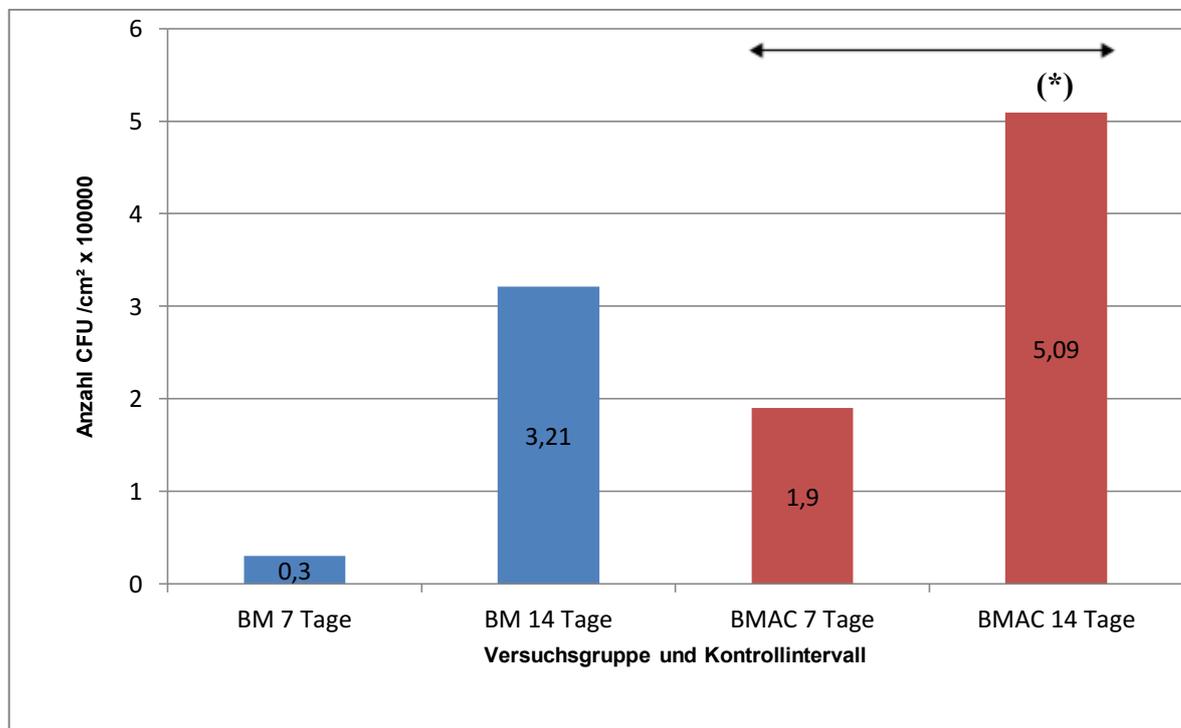


Abbildung 11: Anzahl CFU ( $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in BM und BMAC

### 3.1.3 Auswertung der Oberflächenantigene

Die im BMAC enthaltenen Zellen wurden per Durchflusszytometrie auf für Stammzellen typische Oberflächenmarker untersucht [83]. Hierbei ergab sich eine positive Anfärbbarkeit für CD44 in 90 %  $\pm$  8,3 aller lebensfähigen Zellen, für CD14 in 91,2 %  $\pm$  7,6, für CD90 in 89 %  $\pm$  11,3. Im Gegensatz zu den auf den meisten Zellen nachweisbaren stammzelltypischen Oberflächenstrukturen, konnten Oberflächenantigene der hämatopoetischen Zellreihen nur selten nachgewiesen werden. Hier stellte sich CD45 auf 5,9 %  $\pm$  1,70 und CD34 auf 2,5 %  $\pm$  0,9 der Zellen dar. Es zeigte sich also ein deutliches Überwiegen der MSC spezifischen Marker (siehe Tabelle 6).

Oberflächenstruktur	Prozent
CD44	90 $\pm$ 8,3
CD14	91,2 $\pm$ 7,6
CD90	89 $\pm$ 11,3
CD45	5,9 $\pm$ 1,7
CD34	2,5 $\pm$ 0,9

Tabelle 6: Vergleich mesenchymaler und hämatopoetischer Oberflächenmarker

### 3.1.4 Thrombozytenkonzentration im PRP

Zur Kontrolle der PRP-Qualität wurde die Thrombozytenzahl im Vollblut sowie nach dem Zentrifugationsvorgang im PRP bestimmt und die Anreicherung kontrolliert. Im Vollblut der PRP-Gruppe ergab sich eine Thrombozytenzahl von  $0,426 \pm 0,06 \times 10^6$  Zellen, nach Zentrifugation wurde eine Zahl von  $2,2 \pm 0,57 \times 10^6$  ( $p= 0,049$ ) Zellen im PRP erreicht. Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 5,24.

In der PRP-BMAC Gruppe konnten wir ebenfalls eine signifikante ( $p<0,001$ ) Anreicherung verzeichnen. Im Vollblut dieser Gruppe fanden wir eine Thrombozytenzahl von  $0,38 \pm 0,09 \times 10^6$  Zellen und im PRP eine Thrombozytenzahl von  $1,6 \pm 0,42 \times 10^6$  Zellen nach dem Zentrifugationsvorgang, was einer Konzentrierung um den Faktor 4,29 entspricht (siehe Abbildung 12).

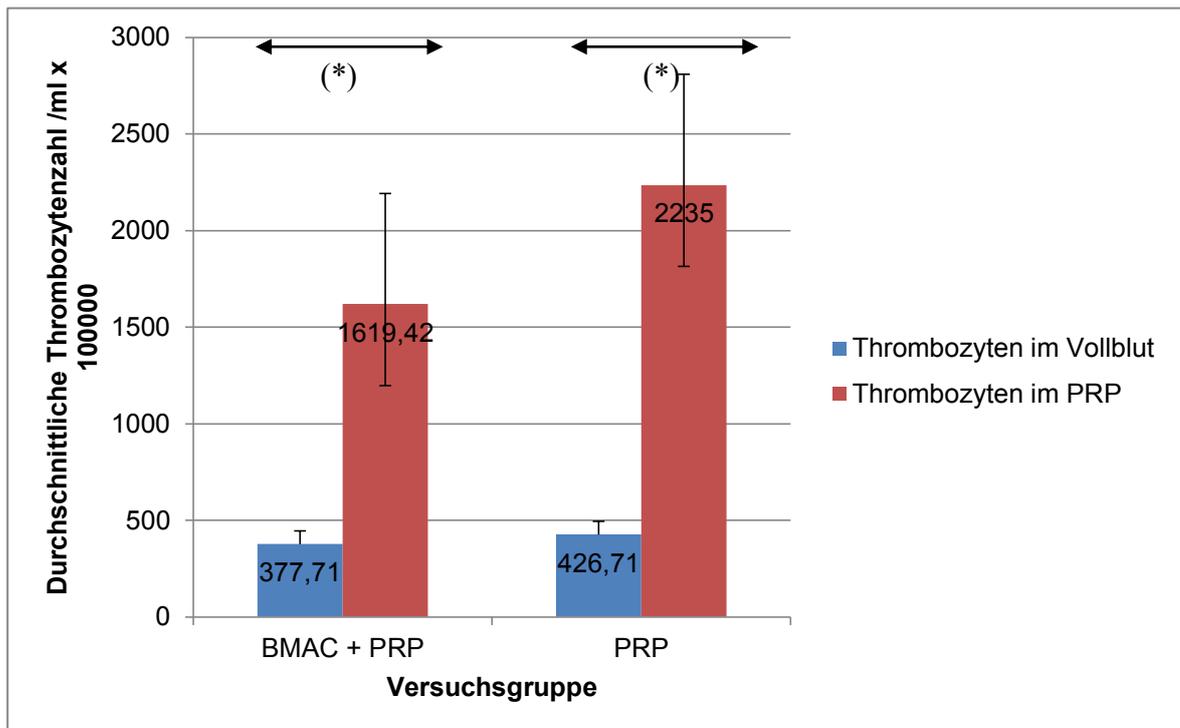


Abbildung 12: Thrombozyten im Vollblut und PRP

### 3.1.5 Analyse der Wachstumsfaktoren

Die Konzentration von den für die Chondro- und Osteogenese wichtigen Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP7, PDGF, VEGF und TGF-  $\beta$ 1 wurde quantitativ mittels ELISA Tests im Plasma bzw. im PRP bestimmt.

Für BMP-2 ergab sich eine durchschnittliche Konzentration von  $12,87 \pm 2,06$  pg/ml im Plasma und  $167,7 \pm 83,42$  pg/ml im PRP ( $p=0,001$ ).

BMP-7 konnte mit einer Durchschnittskonzentration von  $95,85 \pm 37,28$  pg/ml im Plasma und  $178,86 \pm 128,98$  pg/ml in PRP ( $p=0,003$ ) nachgewiesen werden.

VEGF mit  $11,97 \pm 3,6$  pg/ml im Plasma und  $77,35 \pm 3,6$  pg/ml im PRP ( $p=0,001$ ).

Die Plasmakonzentration von TGF- $\beta$ 1 betrug  $2899,71 \pm 855,50$  pg/ml, die PRP-Konzentration hingegen  $40904,84 \pm 5468,71$  pg/ml ( $p<0,001$ ).

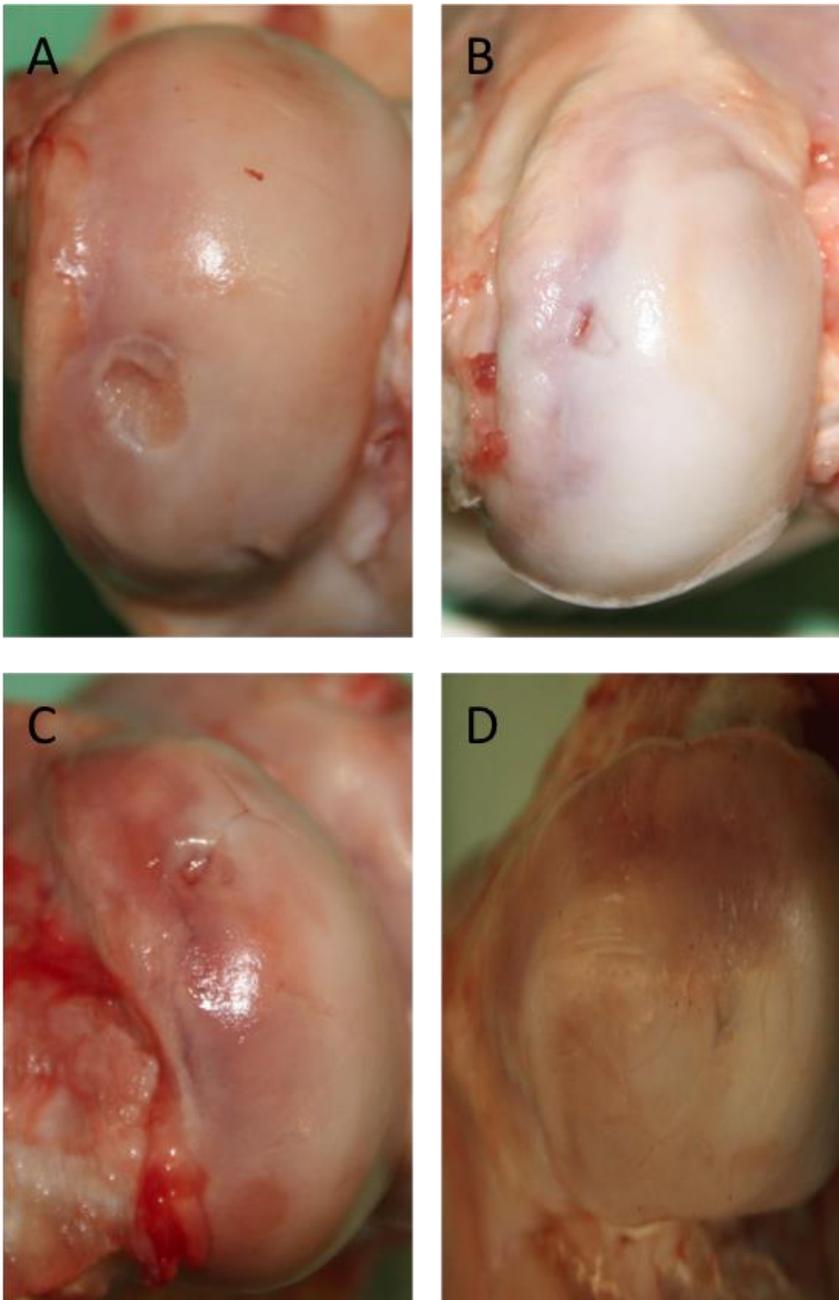
Für PDGF fanden wir einen Plasmawert von  $107,69 \pm 194,45$  pg/ml und einen PRP-Wert von  $13962,29 \pm 5127,81$  pg/ml ( $p<0,001$ ) (siehe Tabelle 7).

Wachstumsfaktor	Konzentration im Plasma (pg/ml)	Konzentration im PRP (pg/ml)	Konzentrationsfaktor
BMP-2	12,87	167,7	13,03
BMP-7	95,85	178,86	1,86
VEGF	11,97	77,35	6,46
TGF- $\beta$ 1	2899,71	40904,84	14,11
PDGF	107,69	13962,29	129,65

**Tabelle 7: Wachstumsfaktoren in Plasma und PRP**

### **3.2 Makroskopische Ergebnisse**

Nach Eröffnung der Gelenkkapsel und Explantation der Kniegelenke erfolgte eine orientierende makroskopische Untersuchung der Präparate. Alle 28 implantierten *Scaffolds* befanden sich noch an der Implantationsposition ohne Anzeichen einer Dislokation. Die Oberfläche der Implantate schloss bei allen Defekten bündig mit der umliegenden Knorpeloberfläche ab, eine Stufenbildung oder andere Defekte wurden nicht festgestellt (siehe Abbildung 13).

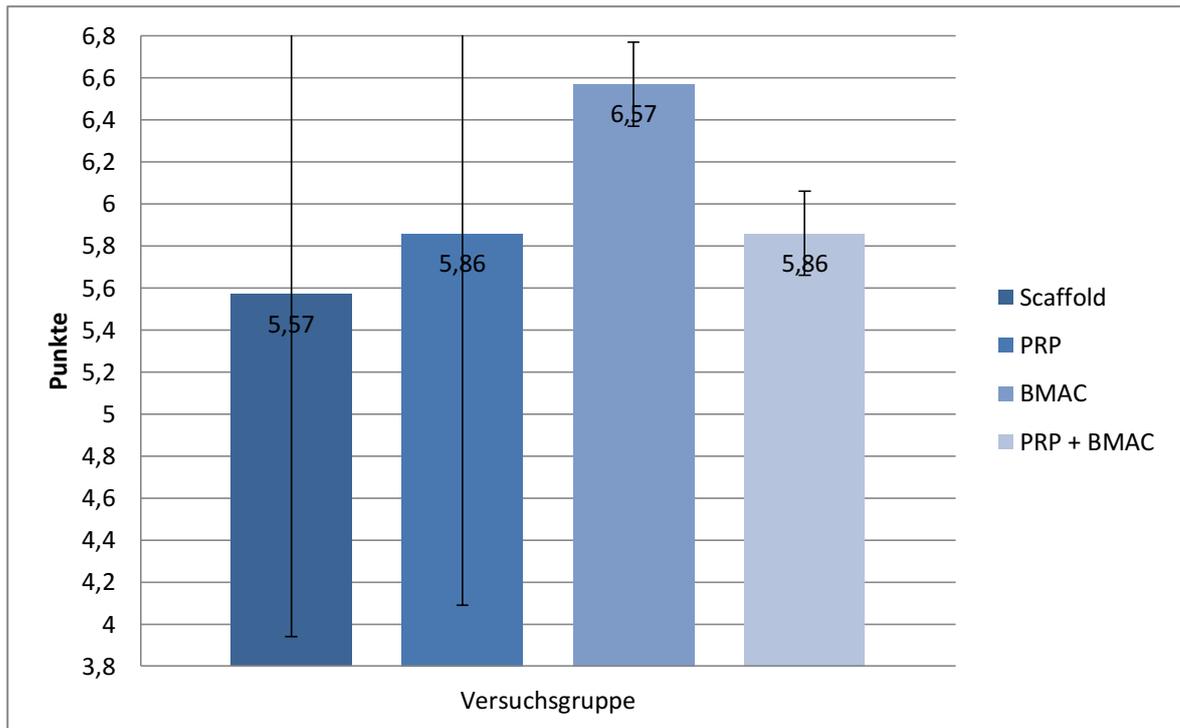


**Abbildung 13: Makroskopische Defektdarstellung mit teilweise nicht kompletter Defektheilung in A) Kontroll-Gruppe, B) PRP-Gruppe, C) BMAC-Gruppe, D) BMAC+PRP-Gruppe**

Die Oberflächen der korrespondierenden Gelenkflächen zeigten sich ohne Abrieb oder andere Zeichen für eine Degeneration. Ebenso stellte sich die *Membrana synovialis* und das umliegende Gewebe reizlos dar, so dass sich makroskopisch keine Hinweise auf eine Entzündungsreaktion ergaben.

Bei der Auswertung der Präparate zeigte sich für die Kontrollgruppe ein durchschnittlicher Wert von  $5,57 \pm 1,62$ , die PRP-Gruppe erreichte einen Wert von  $5,86 \pm 1,77$ , bei der BMAC-Gruppe verzeichneten wir einen Wert von  $6,57 \pm 1,13$

und bei der Gruppe, die mit BMAC und PRP behandelt wurde, ein Wert von  $5,86 \pm 1,35$  (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Ergebnisse Makroskopischer Score nach Rudert (modifiziert nach Rudert et al. [84].)**

Nach statistischer Auswertung zeigten sich im makroskopischen Score bei den Therapiegruppen zwar ein Trend zu höheren Scores im Vergleich zur Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant ( $p > 0.05$ ).

### 3.3 *Histologische Ergebnisse*

Das Regeneratgewebe ließ sich mittels Toluidinblau-Färbung blau anfärben als Hinweis auf vorhandene Kollagenfasern und Glykosaminoglykane (siehe Abbildung 15,16).

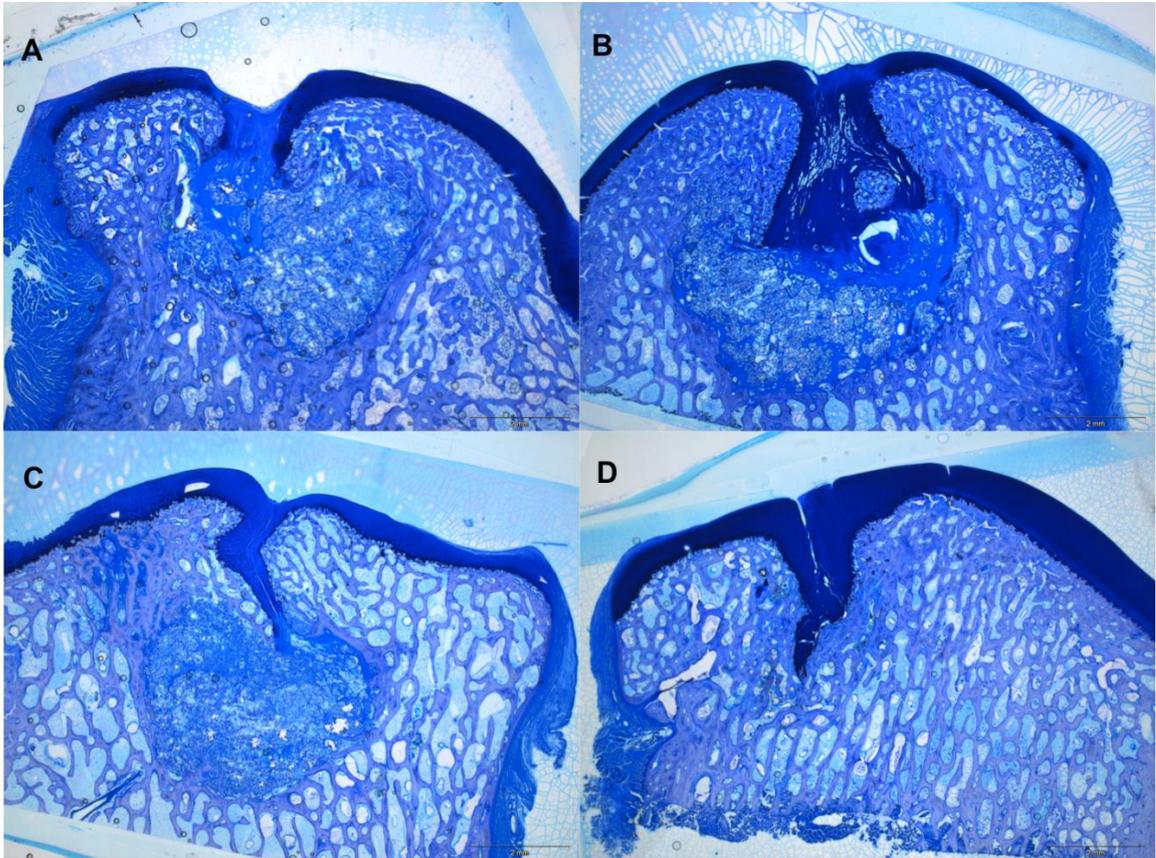
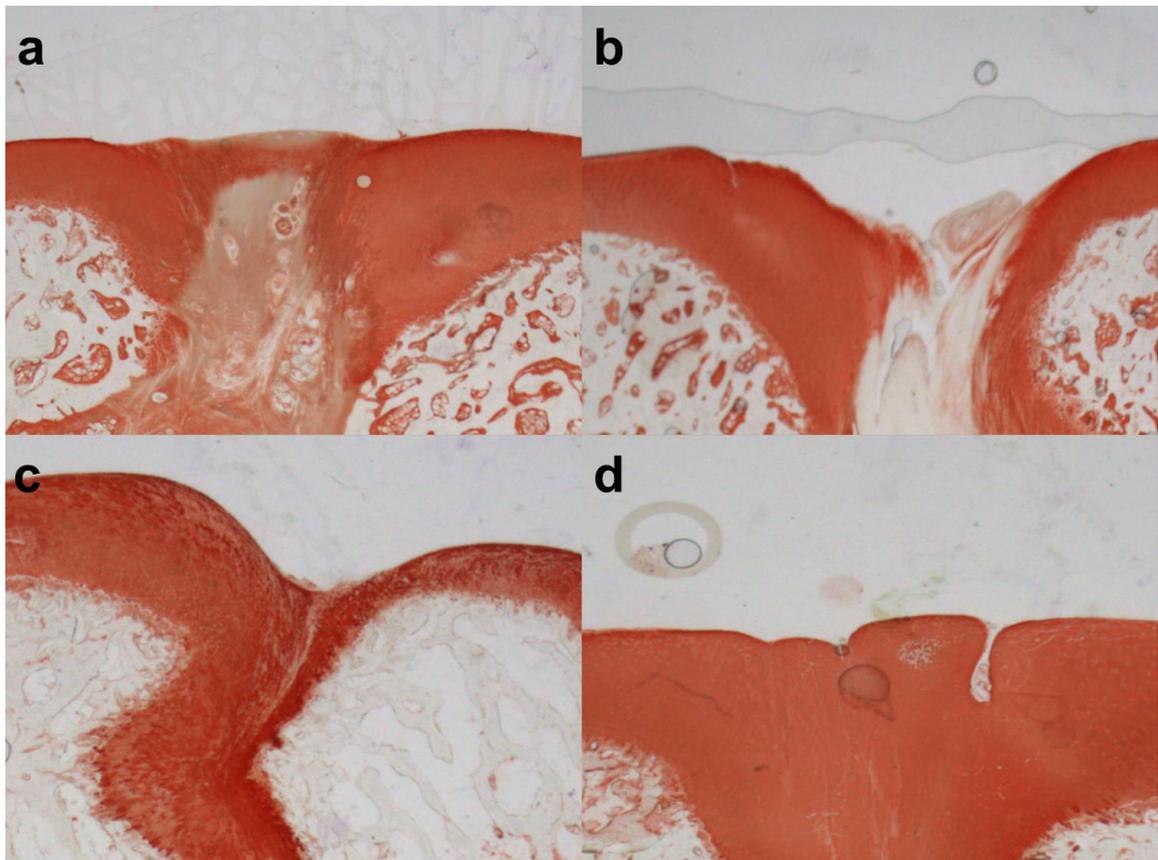


Abbildung 15: Toluidinblau-Färbung der verschiedenen Versuchsgruppen  
A) Kontroll-Gruppe, B) PRP-Gruppe, C) BMAC-Gruppe, D) BMAC + PRP-Gruppe



**Abbildung 16: Immunhistochemie für Kollagen II der verschiedenen Versuchsgruppen**  
a) Kontroll-Gruppe, b) PRP-Gruppe, c) BMAC-Gruppe, d) BMAC + PRP-Gruppe

In der nur mit dem *Scaffold* behandelten Kontrollgruppe war die Anfärbbarkeit gegenüber Toluidinblau und Kollagen II Antikörpern im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen gering ausgeprägt. Hier zeigte sich vermehrt fibröses Gewebe.

Bei allen Präparaten zeigten sich im knöchernen Anteil der Defekte Überreste der *Scaffolds*, der knorpelige Anteil hingegen war nach 26 Wochen komplett resorbiert. Das Regenerationsgewebe in der knöchernen Phase des Defekts bestand zum Teil aus fibrösem Gewebe, welches in einigen Fällen vaskularisiert war. Weiterhin fanden sich hier Riesenzellen als Zeichen eines noch stattfindenden, aber nicht abgeschlossenen Degradationsprozesses. Die normale Struktur der Spongiosa war nach 26 Wochen noch nicht wiederhergestellt. In 10 der 28 Defekte fanden wir subchondrale Zysten.

### 3.3.1 Ergebnisse nach O`Driscoll

Das niedrigste Ergebnis nach O`Driscoll fanden wir in der Kontrollgruppe. Die mit dem *Scaffold* alleine behandelte Gruppe erreichte einen Wert von  $12.86 \pm 3.24$  Punkten. Im Gegensatz hierzu erreichte die BMAC-Gruppe  $16.86 \pm 2.67$  ( $p=0,03$ ) und die PRP-Gruppe  $17.43 \pm 3.05$  ( $p=0,02$ ) Punkte. Die Kombination aus dem biphasischen Scaffold, PRP und BMAC zeigte einen Score von  $17.43 \pm 2.44$  ( $p=0,01$ ) Punkten. Alle Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Werte im O`Driscoll Score. Durch die Kombination aus PRP und BMAC konnte keine weitere Verbesserung erreicht werden (siehe Abbildung 17).

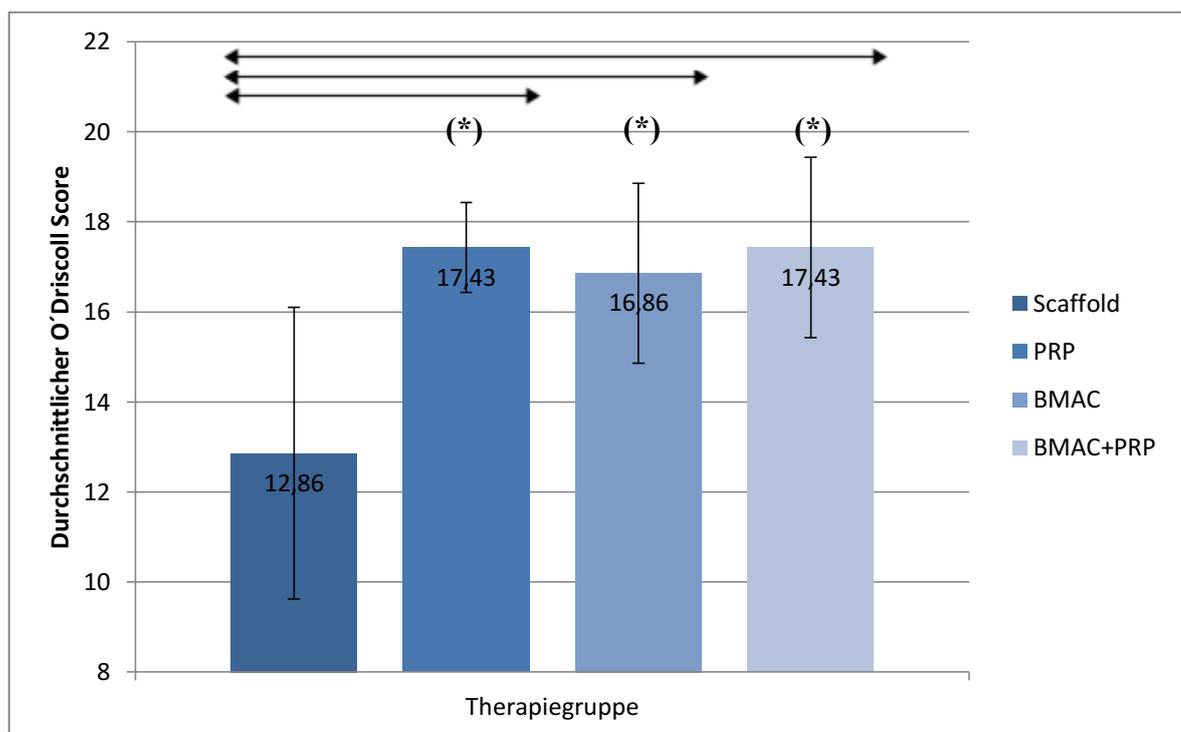


Abbildung 147: Punkte nach O`Driscoll Score

## 4 Diskussion

### 4.1 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen

Bei der hier durchgeführten Großtierstudie wurde das Göttinger *Mini-Pig* als Versuchstier gewählt.

Das Kniegelenk dieser Tiere ähnelt dem menschlichen Kniegelenk zum einen anatomisch und in seinen Dimensionen und hat zum anderen eine 1,5 mm – 2 mm dicke Knorpeloberfläche, so dass *Mini-Pigs* ein sinnvolles Vergleichsmodell für Knorpelstudien darstellen [91,92]. Auch das Regenerationspotential im Bezug auf Knorpeldefekte ähnelt bei diesen Tieren dem des Menschen [93]

Es wurde ein bilaterales Defektmodell gewählt, wobei beide Hinterläufe mit einem osteochondralen Schaden versehen und anschließend therapiert wurden, so dass die Anzahl der Versuchstiere reduziert werden konnte. Der Knorpeldefekt wurde mit einem standardisierten Durchmesser von 6 mm und einer standardisierten Tiefe von 10 mm gesetzt. Als kritische Defektgröße ist bei dieser Spezies eine Defektbreite von 5,4 mm und eine Defekttiefe von 10 mm anzusehen [94].

Studien mit Kleintieren, wie zum Beispiel mit Nagetieren oder Kaninchen, haben den Nachteil, dass es bei osteochondralen Defekten zu einer spontanen Knorpelregeneration kommen kann, welche beim Menschen so nicht möglich ist [95].

Das Kniegelenk des Schafes ähnelt in seinem anatomischen Aufbau dem des Menschen. Allerdings variiert die Dicke der Knorpelschicht bei diesen Tieren interindividuell sehr stark. Lu et al. fanden in einer 2000 veröffentlichten Studie eine Knorpeldicke von 0,4 mm bis 1 mm in 36 Schafen [96]. Eine Standardisierung der Defekte im Bezug auf die Beteiligung des subchondralen Knochens ist daher in diesem Modell sehr schwierig und schränkt die Vergleichbarkeit dieses Tiermodells ein.

Neben den Schafen werden auch Ziegen in Großtiermodellen zur Untersuchung von osteochondralen Defekten genutzt. Auch hier zeigen sich allerdings große interindividuelle Differenzen (0,8 mm- 2 mm) in der Knorpeldicke [97].

## **4.2 PRP**

Das von uns genutzte PRP wurde intraoperativ aus autologem Vollblut des jeweiligen Versuchstiers mittels eines standardisierten kommerziell erhältlichen Systems zur Dichtegradientenzentrifugation hergestellt.

In der Literatur ist eine Zentrifugationsdauer von weniger als fünf Minuten als ineffektiv beschrieben [98]. Der Zentrifugationsvorgang erfolgte in unserer Studie daher über 15 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 3200 U/min.

Die Thrombozytenkonzentration im PRP ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal, da die Plättchenkonzentration als ein Indikator für z. B. die osteogene Potenz gilt [99].

In einer Studie zur Wirksamkeit von PRP wurde 2004 von Marx festgestellt, dass die Thrombozytenkonzentration im PRP ungefähr viermal höher sein sollte als die Konzentration im Vollblut [100]. Creaney et al. hingegen beschreiben den Bereich einer vier- bis achtfachen Anreicherung bei der Therapie von Muskel- und Sehnenverletzungen als therapeutisch wirksam [101]. Weibrich et al. veröffentlichten 2002 eine Studie, in der sie eine optimale Thrombozytenkonzentration vom 5 - 6-fachen der Plasmakonzentration mit ungefähr 1.000.000 / $\mu$ l Thrombozyten angeben [102].

2004 führten Weibrich et al. eine Untersuchung zu der Wirksamkeit verschiedener PRP-Formulierungen mit differierenden Thrombozytenkonzentrationen durch. Hierbei zeigte sich, dass eine Thrombozytenkonzentration von ungefähr 1.000.000 / $\mu$ l einen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat. Eine Anreicherung deutlich ober- bzw. unterhalb dieses Grenzwertes hingegen wirkte sich in dieser Studie als nachteilig auf die Knochenregeneration aus. Sehr hohe Konzentrationen von Thrombozyten (bis zu 3.200.000 / $\mu$ l) hatten einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoblastenaktivität in deren Studie. Die Autoren begründeten dies mit einem zytotoxischen und inhibitorischen Effekt der Wachstumsfaktoren bei zu hohen Konzentrationen [102].

Ebenso scheint TGF-  $\beta$  einen konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt zu haben [103].

Ein Problem bei der Produktion des PRPs ist, dass es keine standardisierten Protokolle mit Herstellungsparametern gibt. So kann es zu Diskrepanzen in den Zentrifugationsparametern, der verwendeten Blutmenge sowie der erhaltenen PRP-Menge kommen. Dies führt zu Unterschieden in der PRP-Qualität hinsichtlich der Thrombozyten- und Wachstumsfaktorkonzentration und erschwert somit die

Vergleichbarkeit der durchgeführten Studien [104,105].

Durch das von uns durchgeführte Zentrifugationsprotokoll konnten wir eine durchschnittliche Thrombozytenanreicherung um den Faktor 5,24 in der PRP- bzw. 4,29 in der PRP und BMAC-Gruppe erreichen.

Nach aktueller Studienlage kann somit bei den in unserer Studie erreichten Konzentrationen von einem positiven Effekt des PRPs auf die Heilung der osteochondralen Defekte ausgegangen werden [100–102].

Zusätzlich zur Thrombozytenkonzentration haben wir als weiteres Qualitätsmerkmal die Anreicherung der Wachstumsfaktoren im PRP im Vergleich zum verwendeten Vollblut gemessen. Auch die Wachstumsfaktoranalyse zeigte signifikant höhere Konzentrationen für BMP-2, BMP-7, VEGF, TGF- $\beta$ 1 und PDGF im PRP im Vergleich zum Vollblut.

In der ELISA-Untersuchung ergab sich für BMP-2 eine durchschnittliche Konzentration von  $12.87 \pm 2,06$  pg/ml im Plasma und  $167,7 \pm 83,42$  pg/ml im PRP ( $p= 0,001$ ) dies entspricht einem Konzentrationsfaktor von 13,03.

In einer 2013 von Krüger et al durchgeführten Studie, welche die in PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren untersuchte, wurde im PRP eine niedrigere Konzentration von 31 pg/ml BMP-2 gefunden. Diese Differenz in der Konzentration des Wachstumsfaktors ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Autoren mit menschlichem Blut arbeiteten und ein anderes Protokoll zur Herstellung des PRPs nutzten [106].

BMPs regulieren die Differenzierung in Knochen- und Knorpelgewebe [107]. BMP-2 hat hierbei *in vivo* die stärkste osteoinduktive Wirkung der BMPs und ist somit ein wichtiger Faktor bei der Knochenneubildung [108]. Außerdem kann BMP-2 die VEGF-Produktion in Osteoblasten steigern und somit die Angiogenese während der Geweberegeneration verbessern [109].

Lin et al. veröffentlichten 2013 eine Studie, in der sie BMP-2 mit mesenchymalen Stammzellen (MSZ) kombinierten. Sie fanden hierbei heraus, dass die mit BMP-2 und MSZ behandelten Tiere eine bessere Knochenheilung aufwiesen als die Ratten, welche nur mit mesenchymalen Stammzellen behandelt wurden [110].

Eine von Reyes et al. veröffentlichte Studie befasste sich mit der Behandlung von osteochondralen Defekten mittels BMP-2 und einem Alginat-Scaffold. Hierbei zeigte sich, dass die mit BMP-2 behandelten Tiere eine bessere Knorpel-Qualität, eine bessere Integration des Implantats in das umliegende Gewebe und eine vermehrte Kollagen-2 sowie Aggrecansynthese aufwiesen [87].

Für BMP-7 konnten wir im Plasma eine Konzentration von  $95,85 \pm 37,28$  pg/ml und  $178,86 \pm 128,98$  pg/ml ( $p=0,003$ ) im PRP messen. Die entspricht einer Anreicherung um den Faktor 1,39.

BMP-7 gilt in der Literatur als Induktor einer Reaktionskaskade, bei welcher weitere osteoinduktive Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, welche die Knochenheilung unterstützen. Außerdem erhöht es die lokale Aktivität von Osteoblasten sowie die Infiltration durch Stammzellen und deren Differenzierung [111]. In einer Kleintierstudie mit Ratten fanden Ozeki et al. eine durch BMP-7 verbesserte Meniskusheilung, außerdem wurde eine Schädigung des Gelenkknorpels bei den mit dem Wachstumsfaktor behandelten Versuchstieren vermindert [112]. BMP-7 findet klinisch bereits Anwendung in der Therapie schlecht heilender Frakturen [113,114]. Erste Studien belegen, dass wöchentliche intraartikuläre Injektion von BMP-7 den degenerativen Knorpelveränderungen bei Osteoarthritis vorbeugen bzw. diese verlangsamen können [115,116].

VEGF wurde im Plasma mit  $11,97 \pm 3,6$  pg/ml und im PRP mit  $77,35 \pm 3,6$  pg/ml ( $p=0,001$ ) gemessen. Hier hat eine Konzentrierung um den Faktor 6,46 stattgefunden. VEGF ist ein wichtiger Bestandteil beim Aufbau der Extrazellulärmatrix, der Angiogenese, aber auch bei der Knochenheilung [93]. Weiterhin ist dieser Faktor wichtig für die Aufrechterhaltung der Knochen-Homöostase. VEGF stimuliert hierbei die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und unterdrückt deren Entwicklung zu Adipozyten. Zusätzlich stimuliert VEGF die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten [117]. In einer von Geiger et al. durchgeführten Studie mit Kaninchen zu Pseudarthrosen von Röhrenknochen zeigte sich, dass die mit VEGF behandelten Tiere eine deutlich bessere Knochenheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Die Autoren begründen dies mit einer verbesserten Angiogenese in der Versuchsgruppe und der daraus resultierenden besseren Versorgung des neu gebildeten Knorpels [118]. VEGF kann jedoch auch negative Auswirkungen auf Gelenkknorpel haben. Ludin et al. führten 2013 eine Studie zu Osteoarthritis bei Mäusen durch. Hier kam es nach intraartikulärer Injektion zur Hyperplasie der Synovia, Knorpel-Kalzifizierung und zur subchondralen Sklerosierung. Die Autoren deuteten dies als Zeichen einer möglichen Beteiligung von VEGF bei der Entstehung der Osteoarthrose und der damit verbundenen Knorpeldegeneration

[119]. Chen et al. untersuchten 2011 im Rahmen einer *in vitro* Studie die Wirkung von VEGF auf Aggrecan und Kollagen Typ II. Hier zeigte sich, dass VEGF einen inhibitorischen Effekt auf Chondrozyten hat und somit die Synthese von Aggrecan und Kollagen hemmt. Die Autoren vermuten außerdem, dass der Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Arthrose spielt [120]. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien entdeckten Kolostova et al. 2012, dass eine mittels Gen-Transfer gesteigerte VEGF-Produktion in Mäusen zu einer signifikant besseren Regenerationpotenz des Ohrknorpelgewebes im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führt [121].

Die Elisa-Messung erbrachte für TGF- $\beta$  im Plasma einen Wert von  $2899,71 \pm 855,50$  pg/ml und im PRP einen Wert von  $40904,84 \pm 5468,71$  pg/ml ( $p < 0,001$ ). Somit wurde eine Anreicherung um den Faktor 14,1 erreicht. TGF- $\beta$  wird genutzt, um die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten anzuregen [122]. Jakobsen et al. veröffentlichten 2014 eine Studie, in der sie den Einfluss des Faktors auf die Ausprägung chondrogenetischer Marker auf mesenchymalen Stammzellen untersuchten. Hier fanden sie heraus, dass die Anzahl der Marker durch die Zugabe von TGF- $\beta$  deutlich erhöht wird [123]. Thorpe et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von MSZ mit TGF- $\beta$  zu einer verstärkten Synthese von Typ II Kollagen sowie Glykosaminoglykanen (GAG) führt [124]. Venkatesan et al. führten 2013 eine *in vitro* Studie durch und stimulierten die TGF- $\beta$  Synthese in Chondrozyten durch einen Vector mittels Gen-Transfer. Hierbei fanden sie heraus, dass höhere TGF- $\beta$  Konzentrationen einen positiven Effekt auf Chondrozytenproliferation, -lebensdauer und Synthese-Aktivität haben [125].

In einer 2013 von Ying et al. durchgeführten *in vivo* Studie wurden die Kniegelenke von 36 Kaninchen mit einem standardisierten Knorpelschaden versehen und so eine Arthrose induziert. Anschließend injizierten die Autoren TGF- $\beta$  in die Gelenke und evaluierten nach zwölf Wochen den Effekt des Wachstumsfaktors. Sie fanden heraus, dass die Gelenke der Therapiegruppen deutlich weniger geschädigt waren als die der Kontrollgruppe [126]. Auch Marmotti et al. fanden in einer 2013 durchgeführten *in vitro* Studie einen positiven Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Proliferation und Reifung von Chondrozyten [127].

Für PDGF konnten wir im Plasma durchschnittliche Werte von  $107,69 \pm 194,45$  pg/ml und im PRP von  $13962,29 \pm 5127,81$  pg/ml ( $p < 0,001$ ) erzielen, was einer

Konzentrierung des Wachstumsfaktors um den Faktor 2,72 entspricht.

PDGF initiiert die Kollagen- und Proteinsynthese im Rahmen der Wund- und Knochenheilung. Weiterhin wirkt dieser Faktor mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten, Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen [128]. Außerdem wirkt PDGF antiapoptotisch auf Chondrozyten [129]. Fortier et al. gehen aufgrund dieser Eigenschaften davon aus, dass PDGF auch bei der Therapie osteochondraler Defekte einen positiven Effekt hat [130]. Eine von Chung et al. durchgeführte Studie mit Ratten, untersuchte den Effekt des PDGF-Inhibitors Imatinib auf die Heilung von Knochendefekten. Hier zeigte sich eine deutlich verzögerte Gewebsregeneration mit reduziertem Knorpel- und Knochenwiederaufbau in der Versuchsgruppe. Die Autoren begründen dies mit der signifikant reduzierten Infiltration von mesenchymalen Stammzellen bei den mit Imatinib behandelten Tieren [131].

In der aktuellen Literatur wird die Rolle der im PRP enthaltenen Leukozyten kontrovers diskutiert. Hierbei werden vor allem ein leukozytenreiches und ein leukozytenarmes PRP unterschieden. McCarrel et al. erklären, dass die im PRP enthaltenen Leukozyten aufgrund der durch sie freigesetzten Proteasen und Sauerstoffradikale schädlich und somit ungünstig für die Wundheilung sein können [132]. In einer Studie von Boswell et al. wurde festgestellt, dass bei der Therapie von Tendopathien mit PRP eine niedrige Leukozytenkonzentration in einer höheren Kollagensynthese resultiert [133]. Portela et al. behandelten in einer aktuellen Studie Knochendefekte in der Schädeldecke mit leukozytenreichem-PRP (L-PRP) und fanden heraus, dass die Qualität des neu entstandenen Knochens minderwertig im Vergleich zu den Defekten der Kontrollgruppe war [134]. In einer von Bielecki et al. durchgeführten Studie wurden sechs Patienten mit Knochenzysten des proximalen Femurs mit L-PRP und allogem Knochenmaterial behandelt. Die Verlaufskontrolle erfolgte radiologisch mittels Röntgenaufnahmen. Hier zeigte sich eine mit der Zeit zunehmende Demineralisierung des Implantates, so dass keine weiteren Patienten in die Studie aufgenommen wurden. Vermutet werden von Bielecki et al. noch unbekannte Interaktionen zwischen dem Implantat und den im L-PRP enthaltenen proinflammatorischen Substanzen [135,136]. Bei der Verwendung von L-PRP mit autologem Knochenmaterial konnten Thorwarth et al. hingegen eine Verbesserung der Knochenheilung feststellen [137]. Cavallo et al. führten 2014 eine *in vitro*

Studie zur Evaluation verschiedener PRP-Formulierungen durch. Sie untersuchten die Wirkung von L-PRP und leukozytenarmem-PRP (P-PRP) auf humane Chondrozyten. Sie stellten in der L-PRP-Gruppe eine höhere Expression des Hyaluronsäure-Synthase-2-Gens sowie eine größere Menge der von den Chondrozyten sezernierten Hyaluronsäure fest. Die Autoren werteten dies als einen für die Heilung von Knorpelgewebe günstigen Effekt und sprechen sich für eine Therapie mit L-PRP aus [138].

Zusammenfassend gibt es in der aktuellen Literatur keinen Konsensus im Hinblick auf den optimalen Leukozytenanteil im PRP. Die Leukozytenkonzentration in dem von uns genutzten PRP wurde in dieser Studie nicht gemessen. Aufgrund des Konzentrationsvorganges kann vermutet werden, dass neben der Thrombozytenkonzentration auch die Leukozytenkonzentration erhöht wurde. Das hiermit verbundene proinflammatorische Potential und die Kombination mit einem allogenen Implantat machen das Auftreten einer immunologischen Reaktion gegen den *Scaffold* denkbar. Dies könnte auch die Infiltration der Defekte durch die gefundenen mononukleären Zellen und Plasmazellen erklären. Ebenfalls ein Hinweis auf eine immunologische Reaktion könnten die in zehn der 28 Defekte aufgetretenen subchondralen Zysten sein.

### **4.3 BMAC**

Die im BM enthaltenen MSZ haben lediglich einen Anteil 0,001 % - 0,01 % [139]. Durch Hernigou et al. konnte gezeigt werden, dass die osteo- und chondrogene Potenz der Stammzellbehandlung deutlich von der Zahl der transplantierten Zellen abhängt [77]. Aus diesem Grund haben wir in unserer Studie versucht diese mittels Dichtegradientenzentrifugation zu erhöhen.

Als Qualitätskriterium für das BMAC dienten in dieser Studie die CFU, welche nachgewiesenermaßen Aufschluss auf die transplantierten Vorläuferzellen geben [77]. Nach Dichtegradientenzentrifugation konnten wir so eine signifikante Erhöhung der MNZ-Dichte im BMAC im Vergleich zum BM nachweisen. In den BMAC-Gruppen belief sich der relative Anreicherungsfaktor auf 2,42 (0,006) bzw. 3,17 (p=0,021). Obwohl hier eine statistisch signifikante Konzentrationssteigerung stattgefunden hat, ist dieses Ergebnis im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen relativ niedrig. So konnten bei Verwendung des gleichen Anreicherungsverfahrens Jäger et al. eine 5,2 fache und Hermann et al. eine 4,4 fache Anreicherung

feststellen [140,141]. Eine Untersuchung von Thoesen et al. verzeichnete in einer Untersuchung an Hunden sogar eine MNZ-Anreicherung um den Faktor 7 [142]. Die schwächere Anreicherung in unserer Studie könnte durch Unterschiede in der Zellgröße und -dichte zwischen Mensch und Schwein begründet sein. Unterstützt wird diese These durch die Ergebnisse einer von Jungbluth et al. durchgeführten Studie, in welcher ebenfalls *Mini-Pigs* verwendet wurden. Hier konnte eine unseren Werten ähnliche Anreicherung um den Faktor 3,5 verzeichnet werden [143].

Die histologischen Ergebnisse der BMAC-Gruppen waren in unserer Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant besser. Der positive Einfluss auf die Knochenregeneration von BMAC in Kombination mit einem synthetischen Implantat wurde ebenso in einer von Hisatome et al. publizierten Studie gezeigt [144]. Hier wurden Knochendefekte des Femurs in einem Kaninchen-Tiermodell mit MSZs aus BM in Kombination mit einem Kollagen-Gel Implantat behandelt [144]. Auch die Therapie von großen Knorpeldefekten profitiert von einer Behandlung mit BMAC. Gobbi et al. konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie 25 Patienten mit schweren Knorpelschäden des Knies erfolgreich durch BMAC-Applikation in Verbindung mit einem Implantat auf Kollagenbasis behandeln [145]. Petri et al. behandelten langstreckige Knochendefekte in fünf Patienten erfolgreich mit BMAC in Kombination mit einem xenogenen Scaffold [146]. Fortier et al. veröffentlichten 2010 eine Studie, in der sie die Behandlung von Knorpeldefekten mit BMAC in einem Pferde-Tiermodell untersuchten. Hierbei wurde die Therapie mit alleiniger Mikrofrakturierung gegen Mikrofrakturierung in Kombination mit BMAC untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass die Versuchsgruppe eine bessere Defektauffüllung aufwies und dass das Regeneratgewebe signifikant mehr Kollagen II und Glykosaminoglykane enthielt [79]. Eine ähnliche Studie führten Saw et al. 2009 an Schafen durch. Auch diese Arbeitsgruppe untersuchte die Therapie von Knorpeldefekten mittels Mikrofrakturierung und BMAC. Hier konnte gezeigt werden, dass die mit BMAC behandelten Tiere eine signifikant bessere Knorpelregeneration aufwiesen. Weiterhin wies die Versuchsgruppe nach 24 Wochen hyalin-artigen Knorpel auf, während in der Kontrollgruppe hauptsächlich fibröses Gewebe gefunden wurde [147].

In unserer Studie haben wir zur Therapie der osteochondralen Defekte zusätzlich eine Kombination aus *Scaffold*, PRP und BMAC evaluiert. Es konnte hierdurch keine weitere Verbesserung in den makroskopischen und histologischen Scores im Vergleich zu den Gruppen, welche mit PRP oder BMAC therapiert wurden, festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass zu hohe Wachstumsfaktorkonzentrationen einen negativen Effekt auf die Regenerationspotenz des Wirtsgewebes haben [148]. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Dosierung der verwendeten PRP- bzw BMAC-Formulierungen. In den Monotherapie-Gruppen verwendeten wir jeweils 2 ml PRP oder 2 ml BMAC, in der BMAC + PRP-Gruppe jedoch nur jeweils einen Milliliter, um ein gleichbleibendes Volumen im Scaffold zu erzielen. Dies könnte zu einer geringeren übertragenen Zellzahl geführt haben. Lee et al. führten 2014 eine klinische Studie mit 20 Patienten durch, welche im Rahmen einer Distractionsosteogenese der Tibia BMAC in Kombination mit PRP erhielten. Die Patienten wurden durchschnittlich 28 Monate lang begleitet, die Auswertung der Studie erfolgte radiologisch. Hier zeigte sich, dass die Versuchsgruppe eine signifikant beschleunigte Knochenheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies. Unterschiede in der Qualität des Regeneratgewebes wurden hierbei nicht festgestellt [149]. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden von Lee et al. jeweils 3 ml PRP und 3ml BMAC verwendet. Auch dies könnte ein Hinweis sein, dass die von uns verwendete Menge an BMAC und PRP möglicherweise zu gering war. Auf der anderen Seite fanden Giovanini et al. 2013 in einem Model mit 20 Kaninchen heraus, dass eine zu hohe Konzentration von TGF- $\beta$  einen negativen Effekt auf die Heilung von Knochendefekten haben kann [150]. Diese Ergebnisse werden durch eine 2008 von de Oliveira et al durchgeführte Studie gestützt. Hier wurde eine verminderte Expression der alkalischen Phosphatase unter Therapie mit hoch dosiertem TGF- $\beta$  festgestellt [151]. In einer 2013 durchgeführten *in vitro* Studie von Lin et al. wurde der Effekt von BMP2 in Kombination mit VEGF auf die Knochenregeneration untersucht. Hierbei zeigte sich, dass hoch konzentriertes VEGF die Expression von BMP2 mRNA, Proteinproduktion und MSZ-Differenzierung inhibiert und somit zu einer verminderten Osteogenese führt [109]. Diese Voruntersuchungen stützen die These, dass eine genaue Abstimmung der in PRP und BMAC enthaltenen Wachstumsfaktoren aufeinander unerlässlich für einen optimalen chondro- und osteogenetischen Effekt bei der Therapie von Knorpel- und Knochendefekten ist.

In der von uns durchgeführten Studie wurden die Wachstumsfaktoren zwar gemessen, allerdings nicht aufeinander eingestellt. Die genaue Justierung der Faktoren untereinander könnte somit einen weiteren positiven Effekt im Bezug auf die Regeneration von osteochondralen Defekten haben.

#### **4.4 TruFit®-Plug**

Der in dieser Studie verwendete TruFit®-Plug ist ein biphasischer Träger, welcher sich an die anatomischen Beschaffenheiten des Kniegelenks anpassen soll. Aufgrund dessen imitiert das Implantat die Knorpel- und aber auch die Knochenkomponente des Gelenkes. Der *Scaffold* ist weiterhin darauf ausgelegt, komplett resorbiert zu werden und so die Defektauffüllung durch Regeneratgewebe zu ermöglichen [152].

In unserer Studie wurde das Einheilungsverhalten des Implantates nach einer Zeit von 26 Wochen evaluiert. Wir konnten in allen Präparaten ein gutes Einwachsen des *Scaffolds* in das umliegende Gewebe beobachten. Manifeste immunologische Reaktionen, Abstoßungsreaktionen oder sonstige degenerative Veränderungen des umliegende Knochen- und Knorpelgewebes konnten wir nicht feststellen. Ähnliche Ergebnisse erhielten Bekkers et al. in einer MRT-kontrollierten Studie zur Verträglichkeit des TruFit®-Plugs. Hierbei wurden 13 Patienten mit einer osteochondralen Läsion ein Jahr nach Implantation des *Scaffold* mittels Gadolinium-gestützter MRT untersucht. Unverträglichkeitsreaktionen wurden hier auch nicht festgestellt [80].

Der Knorpel-Anteil des *Scaffold* war in allen Fällen in unserer Studie nach 26 Wochen komplett abgebaut und durch Regeneratgewebe ersetzt. Wir fanden jedoch in den 28 Defekten Überreste des Knochenanteils des Implantats. Dies lässt vermuten, dass die Resorption des knöchernen *Scaffold*-Anteils noch nicht abgeschlossen war und somit deutlich länger dauert als 26 Wochen. In einer Studie von Dhollander et al. wurde ebenfalls eine deutlich langsamere Degradation der knöchernen *Scaffold*-Phase festgestellt [46]. Hier zeigten sich im MRT auch nach einem Jahr noch Reste des *Scaffolds*, sowie ödematöse Veränderungen im Bereich der Übergangszone zwischen Implantat und Knochen. Die Autoren werteten dies als Zeichen für den noch nicht abgeschlossenen Abbauprozess des *Scaffolds* [46]. In einem von Carmont et al. veröffentlichten Case-Report beschreiben die Autoren die Therapie eines 18 jähriger Sportlers,

dessen osteochondraler Defekt des Knies mit insgesamt drei TruFit®-Plugs behandelt wurde. Hier stellte sich erst nach 24 Monaten eine deutliche Verbesserung der Symptome dar, die MRT-Kontrolle zeigte allerdings auch noch zu diesem Zeitpunkt Reste des Implantates [153]. Yang et al. publizierten 2014 eine Studie, welche den Einfluss verschiedener Trägermaterialien auf die Regeneration osteochondraler Defekte untersuchte. Die Autoren fanden heraus, dass auch hier der Einsatz von PLGA-Scaffolds nach acht Wochen zu einer geringeren Knochenregeneration im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien führte [154]. In der aktuellen Literatur gibt es somit Hinweise, dass die Degradationszeit von PLGA-Scaffolds 26 Wochen überschreitet und der Abbau der Scaffolds in unserer Studie daher zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht vollständig abgeschlossen war.

In 10 der 28 Präparate fanden sich subchondrale Zysten im Bereich des Implantates. Obwohl wir keine manifesten immunologischen Reaktionen fanden, könnte dies auf eine Fremdkörperreaktion hinweisen. Allerdings ist es auch möglich, dass die Zysten Teil des Degenerationsprozesses sind und dies somit ein Hinweis dafür ist, dass die Umbauvorgänge im Bereich des Scaffolds noch nicht abgeschlossen waren. In einer von Getgood et al. durchgeführten Studie zur Therapie osteochondraler Defekte mit PLGA-Scaffolds, traten ebenfalls subchondrale Zysten bei einer Versuchsgruppe auf. Die Autoren werteten dies als normalen Verlauf der Heilung osteochondraler Defekte und schrieben dies dem nach 26 Wochen noch nicht abgeschlossenen Regenerationsprozesses zu [155]. In einer 2001 durchgeführten Großtier-Studie von Akens et al. wurde der Einfluss einer Vorbehandlung mittels Photo-Oxidation auf das Regenerationspotential xenogener Scaffolds in der Behandlung osteochondraler Defekte an Schafen untersucht. Als Kontrollgruppen dienten hier unbehandelte xenogene- bzw. autologe Implantate. Auch in dieser Studie wurde in allen Versuchsgruppen das Auftreten von subchondralen Zysten verzeichnet. Die Arbeitsgruppe erklärte dies durch Stufenbildung bei der Scaffold-Implantation und daraus folgender Undichtigkeit der Tidemark, was zu einem Einstrom von Synovial-Flüssigkeit in den Knochen führt [156]. Diese Annahme bestätigten Untersuchungen von Jackson et al.. Diese Arbeitsgruppe führte 2000 eine Studie an zehn Pferden durch, in der die Behandlung subchondraler Knochendefekte des Kniegelenks evaluiert wurde. Die Therapie erfolgte hierbei mit autologem aus dem Sternum

gewonnenem spongiösem Knochen. Nach sechs Monaten fanden die Autoren bei vier der zehn Versuchstiere subchondrale Zysten. Auch Jackson et al. erklärten die Zystenentstehung durch den Einstrom von Synovialflüssigkeit, welche nachfolgend die Vaskularisierung und das Einwachsen des Transplantats verhindert haben könnten [157].

Eine weitere mögliche Erklärung der Zystenentstehung ist in der Art des Degradationsvorgangs des Materials zu finden. Dieser vollzieht sich durch hydrolytische Spaltung von Esterbindungen, wodurch Milch- und Glycolsäure freigesetzt werden [158]. Durch Anreicherung dieser Stoffe im Bereich des *Scaffolds* könnte es zu negativen Auswirkungen auf die umliegenden Zellen und auf das säureempfindliche Calcium-Phosphat gekommen sein [155]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Meyer et al. in einer 2011 durchgeführten *in vitro* Studie. Die Autoren untersuchten die Auswirkung der bei der Degradation von PLGA-*Scaffolds* frei werdenden Milch- und Glycolsäure auf humane Osteoblasten. Hierbei stellten sie fest, dass die Osteoblastenproliferation sowie die Mineralisierung des Knochens durch die anfallenden Stoffe gestört wird. Die Autoren erklären diesen Effekt mit einem Abfall des pH-Wertes durch die freigesetzten Substanzen. Als weiteren möglichen Effekt führt die Arbeitsgruppe die Wirkung der Säuren als Chelatoren an, die durch das Binden von Calcium- oder Eisenionen die Mineralisierung des Knochens bzw. die Proliferation der Osteoblasten stört [159].

Die aktuelle Lage der Literatur und die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass von einer Degradationszeit des *Scaffolds* von deutlich über 26 Wochen auszugehen ist. Des Weiteren kam es in unserer Studie zu der Ausbildung von Knochenzysten, welche auf die Implantation des Fremdmaterials zurückzuführen sein könnten. Diese werden auch in der aktuellen Literatur unter Verwendung von PLGA-*Scaffolds* aber auch anderer Materialien beschrieben, so dass ein kausaler Zusammenhang zu dem hier verwendeten Materialien nicht sicher gefunden werden kann. Hier sind weitere Studien nötig, um eine optimale Matrix zur Therapie osteochondraler Defekte zu erstellen.

## 4.5 Zusammenfassung

Die Therapie osteochondraler Defekte stellt für die Medizin noch immer ein großes, nicht ausreichend gelöstes Problem dar. Unbefriedigende Langzeitergebnisse und mit einer erheblichen Entnahmemorbidität verbundene Therapieverfahren haben in den letzten Jahren den möglichen Einsatz synthetischer Implantate in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. Erste experimentelle wie auch klinische Studien ergaben zunächst vielversprechende Ergebnisse, wurden aber von mäßigen Langzeitergebnissen überschattet [44–46]. Ein limitierender Faktor dieser Träger ist deren begrenzte Bioaktivität, welche zu einer reduzierten Zelladhäsion, Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung führen kann [87–90]. Um dieses Problem zu lösen und die osteo- sowie chondrogenetischen Eigenschaften synthetischer Implantate zu verbessern, stellen Biologica wie PRP und BMAC vielversprechende Möglichkeiten dar [87,88].

Ziel dieser Studie war es daher, die Bioaktivität eines kommerziell erhältlichen Trägers durch den Einsatz von PRP und BMAC zu verbessern. Beide Methoden haben bereits in Studien separat für sich gezeigt, dass sie einen positiven Einfluss auf die Knorpel- bzw. Knochenheilung haben können [65,67,72,74].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Großtierversuch mit 14 Göttinger *Mini-Pigs* durchgeführt und dabei 28 standardisierte osteochondralen Defekte in der Hauptbelastungszone der Kniegelenke generiert. Diese wurden mit dem *Scaffold* als Monotherapie, mit *Scaffold* und PRP, mit *Scaffold* und BMAC oder *Scaffold* mit PRP und BMAC behandelt. Nach sechs Monaten wurden die Versuchstiere euthanasiert und die Kniegelenke makroskopisch, histologisch und immunhistochemisch evaluiert.

In dieser Studie haben wir herausgefunden, dass die Behandlung osteochondraler Defekte mit einem TruFit®-Plug in Kombination mit PRP oder BMAC eine sichere und kostengünstige Therapiemöglichkeit darstellt. Die Kontrollgruppe wies nach Monotherapie mit dem *Scaffold* zum Teil fibröses Regeneratgewebe auf, was nur als mäßiger Therapieerfolg gewertet werden kann. Durch den Zusatz von PRP oder BMAC wurde die Regeneration der Defekte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert. Die Kombination aus PRP und BMAC mit dem Implantat konnte jedoch keine weitere Verbesserung des histologischen Ergebnisses bewirken.

Für zukünftige Studien empfehlen wir die Evaluation von in Material und Struktur differierenden Implantaten. Möglicherweise können die in unserer Untersuchung erhaltenen Resultate durch den Einsatz anders aufgebauter Scaffolds weiter verbessert werden. Aufgrund der nach 26 Wochen verbliebenden Scaffold-Reste sollte in Folgestudien eine längere Beobachtungszeit untersucht werden, um so dem Gewebe mehr Zeit zur Regeneration und Scaffold-Resorption zu geben. Anhand der aktuellen Studienlage zur zum Teil besseren Wirksamkeit von leukozytendepletiertem PRP, empfehlen wir zusätzlich die Untersuchung von L-PRP in weiteren Studien.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Halle M. Sporttherapie in der Medizin: Evidenzbasierte Prävention und Therapie. Stuttgart: Schattauer; 2008.
2. Engelhardt M. Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin;2003; 6:171–75.
3. Günther KP, Stürmer T. Häufigkeit gelenkspezifischer Risikofaktoren bei Patienten mit fortgeschrittenen Cox- und Gonarthrosen in der Dimer Osteoarthrose-Studie. Zeitung für Orthopädie und Unfallchirurgie;1999:468–74.
4. Perdisa F, Filardo G, Di Matteo B, Marcacci M, Kon E. Platelet rich plasma: A valid augmentation for cartilage scaffolds? A systematic review. Histol Histopathol. 2014.
5. Yang Q PJ. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. Chinese Medical Journal;2011:3930–38.
6. Mankin HJ. The Response of Cartilage to Mechanical Injury. The Journal of Bone and Joint Surgery;1982:460–66.
7. Shapiro F, Koide S. Cell Origin and Differentiation in the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. The Journal of Bone and Joint Surgery;1993:532–53.
8. Falah M, Nierenberg G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. International Orthopaedics;2010:621–30.
9. Histologie. Springer-Lehrbuch: Springer Berlin Heidelberg; 1991.
10. Bader D, Kempson G. The effects of selective matrix degradation on the short-term compressive properties of adult human articular cartilage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1992;1116:147–54.
11. Rudert M, Wirth CJ. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. Orthopäde;1998:309–21.
12. Lüllmann-Rauch R. Histologie: Verstehen- Lernen- Nachschlagen: Thieme; 2003.
13. Junqueira, Carneiro K. Histologie. 5 ed.: Springer; 2002.
14. Firestein GS, Kelley WN. Kelley's textbook of rheumatology. 9 ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; op. 2013.

15. Lahm A, Uhl M. An experimental canine model for subchondral lesions of the knee joint. *The Knee*;2005.
16. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol.* 2000;35:581–88.
17. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am*;2003;85:58-69
18. Edelson R, Burks RT, Bloebaum RD. Short-term effects of knee washout for osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 1995;23:345–49.
19. Laupattarakasem W, Laopaiboon M, Laupattarakasem P, Sumananont C. Arthroscopic debridement for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008:CD005118.
20. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2002;347:81–88.
21. Braun S, Steadman JR. Die spezifische Rehabilitation nach Mikrofrakturierung bei Arthrose des Kniegelenkes: Indikationsstellung, operative Technik und Rehabilitationsprotokoll. *Z Rheumatol*;2009:811–18.
22. Gobbi A, Karnatzikos G, Kumar A. Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013.
23. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003;19:477–84.
24. Frisbie D, Morisset S. Effects of Calcified Cartilage on Healing of Chondral Defects Treated With Microfracture in Horses. *The American Journal of Sports Medicine*:1824–31.
25. Kreuz PC, Steinwachs MR. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2006;14:1119–25.
26. Goyal D, Keyhani S, Lee EH, Hui JHP. Evidence-Based Status of Microfracture Technique: A Systematic Review of Level I and II Studies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery.* 2013;29:1579–88.

27. Kellett CF, Boscainos PJ. Surgical options for articular defects of the knee. *Expert Review of Medical Devices*;2006:585–93.
28. Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*;2003:25–32.
29. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2010;38:1117–24.
30. Gaissmaier C, Fritz J. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks: Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion. *Deutsches Ärzteblatt*;2003:2448–53.
31. Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, et al. Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results. *Radiologe.* 2004;44:763–72.
32. Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plotz W. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. *MMW Fortschr Med.* 1999;141:49–51.
33. Dell'Accio F, Vanlauwe J. Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *Journal of Orthopaedic Research*;2003:123–31.
34. Peterson L, Brittberg M. Autologous Chondrocyte Transplantation: Biomechanics and Long-Term Durability. *The American Journal of Sports Medicine*;2002:2–12.
35. Gaissmaier C, Fritz J, Benz K, Stoop R, Schewe B, Weise K. Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *SFA-Arthroskopie Aktuell.* 2003;16:4-14.
36. Gong S, Dong J, editors. *A Novel Porous Natural Polymer Scaffold for Tissue Engineering*; 2005.
37. Lynn AK, Brooks RA. Repair of defects in articular joints. *The Journal of Bone and Joint Surgery*;2004:1093–99.
38. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126:677–89.

39. Tan W, Twomey J, Guo D, Madhavan K, Li M. Evaluation of nanostructural, mechanical, and biological properties of collagen-nanotube composites. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2010;9:111–20.
40. Hsu F, Hung Y, Liou H, Shen C. Electrospun hyaluronate-collagen nanofibrous matrix and the effects of varying the concentration of hyaluronate on the characteristics of foreskin fibroblast cells. *Acta Biomater*. 2010;6:2140–47.
41. Noeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med*. 2012;16:2247–70.
42. Kim S, Ahn K, Park MS, Lee J, Choi CY, Kim B. A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80:206–15.
43. Kon E, Delcogliano M. Novel Nano-composite Multilayered Biomaterial for Osteochondral Regeneration: A Pilot Clinical Trial. *The American Journal of Sports Medicine*. 2011;39:1180–90.
44. Yang Q, Peng J, Lu S, Guo Q, Zhao B, Zhang L, et al. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:3930–38.
45. Xue D, Zheng Q, Zong C, Li Q, Li H, Qian S, et al. Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94:259–70.
46. Dhollander AA, Liekens K. A Pilot Study of the Use of an Osteochondral Scaffold Plug for Cartilage Repair in the Knee and How to Deal With Early Clinical Failures. *Arthroscopy*. 2011.
47. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225–28.
48. Veillette CJH, McKee MD. Growth factors — BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them? *Scientific basis of fracture healing: an update*. 2007;38:S38.
49. Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A. Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones. *Unfallchirurg*. 2006;109:528–37.

50. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of Growth Factors in Cutaneous Wound Healing: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*;1993:729–60.
51. Iqbal Jameel, Pepkowitz SH. Platelet-Rich Plasma for the Replenishment of Bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9:258–63.
52. Bywater M, Rorsman F. Expression of recombinant platelet-derived growth factor A- and B-chain homodimers in rat-1 cells and human fibroblasts reveals differences in protein processing and autocrine effects. *Molecular and Cellular Biology*.;1988:2753–62.
53. Hughes FJ, Aubin JE. Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone and Mineral*;1992:63–74.
54. Patil AS, Sable R B. Role of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and genetic regulation in the chondrogenesis and growth of the mandibular condylar cartilage. *J. Cell. Physiol*. 2011.
55. Munirah S, Samsudin O. Expansion of human articular chondrocytes and formation of tissue-engineered cartilage: A step towards exploring a potential use of matrix-induced cell therapy. *Tissue and Cell*. 2010;42:282–92.
56. Lynch SE, Williams RC. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*;1989:545–48.
57. Petersen W, Pufe T. Locally applied angiogenic factors – a new therapeutic tool for meniscal repair. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2005;187:509–19.
58. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*. 2004;25:581–611.
59. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002;31:615–19.
60. Roussy Y, Bertrand Duchesne. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clin. Oral Impl*.;2007:639–48.
61. Bosch G, van Schie HTM, Groot MW de, Cadby JA, van de Lest CHA, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res*. 2010;28:211–17.

62. Mos M de, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HTM, Weinans H, Verhaar JAN, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med.* 2008;36:1171–78.
63. Gerber C, Fuchs B, Hodler J. The Results of Repair of Massive Tears of the Rotator Cuff\*†. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2000;82:505.
64. Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil.* 2008;30:1584–89.
65. Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* 2013;41:356–64.
66. Guzel Y, Karalezli N, Bilge O, Kacira BK, Esen H, Karadag H, et al. The biomechanical and histological effects of platelet-rich plasma on fracture healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013.
67. Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DSK, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury.* 2011;42:782–89.
68. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230–47.
69. Yoo JU, BARTHEL TS, NISHIMURA K, SOLCHAGA L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The Chondrogenic Potential of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells\*. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 1998;80:1745–57.
70. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials.* 2008;29:3973–82.
71. Hatzokos I, Stavridis SI, Iosifidou E, Karataglis D, Christodoulou A. Autologous Bone Marrow Grafting Combined with Demineralized Bone Matrix Improves Consolidation of Docking Site After Distraction Osteogenesis. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2011;93:671–78.
72. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 1:111–19.

73. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;102–18.
74. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:455–64.
75. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. Arthroscopic Second-Generation Autologous Chondrocyte Implantation Compared With Microfracture for Chondral Lesions of the Knee: Prospective Nonrandomized Study at 5 Years. *The American Journal of Sports Medicine.* 2008;37:33–41.
76. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop.* 2009;29:643–49.
77. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:1430–37.
78. Garg NK, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand.* 1993;64:671–72.
79. Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, Schnabel LV, Foo LF, Chong LR, et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92:1927–37.
80. Bekkers JEJ, Bartels LW, Vincken KL, Dhert WJA, Creemers LB, Saris DBF. Articular Cartilage Evaluation After TruFit Plug Implantation Analyzed by Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC). *The American Journal of Sports Medicine.* 2013;41:1290–95.
81. Vundelinckx B, Mulder K de, Schepper J de. Osteochondral defect in femoral head: TruFit implantation under fluoroscopic and arthroscopic control. *Acta Orthop Belg.* 2012;78:796–99.
82. Schwarz F, Herten M. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early subepithelial connective tissue attachment at chemically modified and conventional SLA<sup>®</sup> titanium implants. A pilot study in dogs. *Clin Oral Invest.* 2007;11:245–55.

83. Bayati V, Hashemitabar M, Gazor R, Nejatbakhsh R, Bijannejad D. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study. *Anat Cell Biol.* 2013;46:113.
84. Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth CJ. Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005;125:598–608.
85. Rutgers M, van Pelt M, Dhert W, Creemers L, Saris D. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*;18:12–23.
86. Rudert M. Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods. *Cells Tissues Organs*;2002:229–40.
87. Reyes R, Delgado A, Sanchez E, Fernandez A, Hernandez A, Evora C. Repair of an osteochondral defect by sustained delivery of BMP-2 or TGFbeta1 from a bilayered alginate-PLGA scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012.
88. Reyes R, Delgado A, Solis R, Sanchez E, Hernandez A, Roman JS, et al. Cartilage repair by local delivery of transforming growth factor-beta1 or bone morphogenetic protein-2 from a novel, segmented polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) bilayered scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2013.
89. Shafiee A, Soleimani M, Chamheidari GA, Seyedjafari E, Dodel M, Atashi A, et al. Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2011;99:467–78.
90. Pena J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Serrano MC, Portoles MT, Pagani R, et al. Alkaline-treated poly(epsilon-caprolactone) films: degradation in the presence or absence of fibroblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76:788–97.
91. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:705–13.
92. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 2010;16:105–15.
93. Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Farr J, Kuroki K, et al. Evaluation of small intestinal submucosa grafts for meniscal regeneration in a

- clinically relevant posterior meniscectomy model in dogs. *J Knee Surg.* 2006;19:159–67.
94. Jung M, Breusch S, Daecke W, Gotterbarm T. The effect of defect localization on spontaneous repair of osteochondral defects in a Gottingen minipig model: a retrospective analysis of the medial patellar groove versus the medial femoral condyle. *Laboratory Animals.* 2009;43:191–97.
  95. Dawson AB. The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat. *Anat. Rec.* 1925;31:1–17.
  96. Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton GS, Thabit G3, Cooley AJ, et al. The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. *Arthroscopy.* 2000;16:527–36.
  97. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trub T, Jakob RP, et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:1214–26.
  98. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:297-300; discussion 300-1.
  99. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:357–62.
  100. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489–96.
  101. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med.* 2008;42:314–20.
  102. Weibrich G, Gnoth SH, Otto M, Reichert TE, Wagner W. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002;6:168–74.
  103. Pollard JW. Tumour-stromal interactions. Transforming growth factor-beta isoforms and hepatocyte growth factor/scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 2001;3:230–37.
  104. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion.* 2005;45:1759–67.

105. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006;91:135–39.
106. Kruger JP, Freymannx U, Vetterlein S, Neumann K, Endres M, Kaps C. Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis. *Transfus Med Hemother.* 2013;40:432–40.
107. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:737–44.
108. Kiyozuka Y, Miyazaki H, Yoshizawa K, Senzaki H, Yamamoto D, Inoue K, et al. An autopsy case of malignant mesothelioma with osseous and cartilaginous differentiation: bone morphogenetic protein-2 in mesothelial cells and its tumor. *Dig Dis Sci.* 1999;44:1626–31.
109. Deckers MML, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002;143:1545–53.
110. Lin Z, Wang J, Lin L, Zhang J, Liu Y, Shuai M, et al. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med.* 2014;7:625–29.
111. White AP, Weinstein MA, Patel TC, Horowitz MC, Friedlaender GE. The 2002 Marshall Urist Young Investigator Award Paper. Lumbar arthrodesis gene expression: a comparison of autograft with osteogenic protein-1. *Clin Orthop Relat Res.* 2004:330–37.
112. Ozeki N, Muneta T, Koga H, Katagiri H, Otabe K, Okuno M, et al. Transplantation of Achilles tendon treated with bone morphogenetic protein 7 promotes meniscus regeneration in a rat model of massive meniscal defect. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2876–86.
113. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1:S151-8.
114. Cook SD. Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites. *Orthopedics.* 1999;22:669–71.
115. Hayashi M, Muneta T, Ju Y, Mochizuki T, Sekiya I. Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R118.

116. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju Y, Mochizuki T, et al. Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *J Orthop Res.* 2009;27:1088–92.
117. Liu Y, Olsen BR. Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014.
118. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res.* 2005;20:2028–35.
119. Ludin A, Sela JJ, Schroeder A, Samuni Y, Nitzan DW, Amir G. Injection of vascular endothelial growth factor into knee joints induces osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:491–97.
120. Chen X, Hao Y, Wang Z, Zhou J, Jia Q, Qiu B. The effect of vascular endothelial growth factor on aggrecan and type II collagen expression in rat articular chondrocytes. *Rheumatol Int.* 2012;32:3359–64.
121. Kolostova K, Taltyov O, Pinterova D, Cegan M, Ceganova L, Jirkovska M, et al. Tissue repair driven by two different mechanisms of growth factor plasmids VEGF and NGF in mice auricular cartilage: regeneration mediated by administering growth factor plasmids. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269:1763–70.
122. Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional In Vitro Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 2010;16:435–44.
123. Jakobsen RB, Østrup E, Zhang X, Mikkelsen TS, Brinchmann JE, Li W. Analysis of the Effects of Five Factors Relevant to In Vitro Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells Using Factorial Design and High Throughput mRNA-Profiling. *PLoS ONE.* 2014;9:e96615.
124. Thorpe SD, Buckley CT, Vinardell T, O'Brien FJ, Campbell VA, Kelly DJ. The Response of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Dynamic Compression Following TGF- $\beta$ 3 Induced Chondrogenic Differentiation. *Ann Biomed Eng.* 2010;38:2896–909.
125. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Wezel A, Madry H, Cucchiari M. rAAV-mediated overexpression of TGF-beta stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *J Transl Med.* 2013;11:211.

126. Ying B, Chen K, Hu J, Man C, Feng G, Zhang B, et al. Effect of different doses of transforming growth factor-beta(1) on cartilage and subchondral bone in osteoarthritic temporomandibular joints. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51:241–46.
127. Marmotti A, Bonasia DE, Bruzzone M, Rossi R, Castoldi F, Collo G, et al. Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-beta1 and G-CSF. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21:1819–33.
128. Civinini R, Nistri L, Martini C, Redl B, Ristori G, Innocenti M. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2013;10:26–29.
129. Montaseri A, Busch F, Mobasheri A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, et al. IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 $\beta$ -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- $\kappa$ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway. *PLoS ONE.* 2011;6:e28663.
130. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469:2706–15.
131. Chung R, Foster BK, Zannettino AC, Xian CJ. Potential roles of growth factor PDGF-BB in the bony repair of injured growth plate. *Bone.* 2009;44:878–85.
132. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:e143(1-8).
133. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med.* 2014;42:42–49.
134. Portela GS, Cerci DX, Pedrotti G, Araujo MR, Deliberador TM, Zielak JC, et al. L-PRP diminishes bone matrix formation around autogenous bone grafts associated with changes in osteocalcin and PPAR-gamma immunoexpression. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43:261–68.
135. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM, Everts PA, Wiczowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1153–62.

136. Bielecki T, Cieslik-Bielecka A, Zelawski M, Mikusek W. A side-effect induced by the combination of a demineralized freeze-dried bone allograft and leucocyte and platelet-rich plasma during treatment for large bone cysts: a 4-year follow-up clinical study. *Transfus Apher Sci.* 2012;47:133–38.
137. Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone.* 2006;38:30–40.
138. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Pereira Ruiz MT, et al. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96:423–29.
139. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.* 2005;9:72–84.
140. Jager M, Herten M, Fochtmann U, Fischer J, Hernigou P, Zilkens C, et al. Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res.* 2011;29:173–80.
141. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Hesler C von, Andrassy J, Kevy SV, et al. Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *cell transplant.* 2008;16:1059–69.
142. Thoesen MS, Berg-Foels WSV, Stokol T, Rassnick KM, Jacobson MS, Kevy SV, et al. Use of a centrifugation-based, point-of-care device for production of canine autologous bone marrow and platelet concentrates. *Am J Vet Res.* 2006;67:1655–61.
143. Jungbluth P, Hakimi AR, Grassmann JP, Schneppendahl J, Betsch M, Kropil P, et al. The early phase influence of bone marrow concentrate on metaphyseal bone healing. *Injury.* 2013;44:1285–94.
144. Hisatome T, Yasunaga Y, Yanada S, Tabata Y, Ikada Y, Ochi M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials.* 2005;26:4550–56.
145. Gobbi A, Karnatzikos G, Sankineani SR. One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee. *Am J Sports Med.* 2014;42:648–57.
146. Petri M, Namazian A, Wilke F, Ettinger M, Stubig T, Brand S, et al. Repair of segmental long-bone defects by stem cell concentrate augmented scaffolds:

- a clinical and positron emission tomography--computed tomography analysis. *Int Orthop*. 2013;37:2231–37.
147. Saw K, Hussin P, Loke S, Azam M, Chen H, Tay Y, et al. Articular Cartilage Regeneration With Autologous Marrow Aspirate and Hyaluronic Acid: An Experimental Study in a Goat Model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2009;25:1391–400.
  148. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:357–62.
  149. Lee DH, Ryu KJ, Kim JW, Kang KC, Choi YR. Bone Marrow Aspirate Concentrate and Platelet-rich Plasma Enhanced Bone Healing in Distraction Osteogenesis of the Tibia. *Clin Orthop Relat Res*. 2014.
  150. Giovanini AF, Deliberador TM, Tannuri Nemeth JE, Crivellaro VR, Portela GS, Oliveira Filho MA de, et al. Leukocyte-platelet-rich plasma (L-PRP) impairs the osteoconductive capacity of the autograft associated to changes in the immunolocalization of TGF- $\beta$ 1 and its co-expression with Wnt10b and CD34 cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2013;41:e180.
  151. Oliveira PT de, Oliva MA de, Maximiano WMA, Sebastiao KEV, Crippa GE, Ciancaglini P, et al. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2008;56:629–38.
  152. Slivka MA, Leatherbury NC, Kieswetter K, Niederauer GG. Porous, Resorbable, Fiber-Reinforced Scaffolds Tailored for Articular Cartilage Repair. *Tissue Engineering*. 2001;7:767–80.
  153. Carmont MR, Carey-Smith R, Saithna A, Dhillon M, Thompson P, Spalding T. Delayed Incorporation of a TruFit Plug: Perseverance Is Recommended. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2009;25:810–14.
  154. Yang W, Both SK, van Osch GJ, Wang Y, Jansen JA, Yang F. Performance of different three-dimensional scaffolds for in vivo endochondral bone generation. *Eur Cell Mater*. 2014;27:350–64.
  155. Getgood AMJ, Kew SJ, Brooks R, Aberman H, Simon T, Lynn AK, et al. Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic

- scaffold based on a collagen–glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model. *Knee*. 2012;19:422–30.
156. Akens MK, Rechenberg B von, Bittmann P, Nadler D, Zlinszky K, Auer JA. Long term in-vivo studies of a photo-oxidized bovine osteochondral transplant in sheep. *BMC Musculoskelet Disord*. 2001;2:9.
  157. Jackson WA, Stick JA, Arnoczky SP, Nickels FA. The effect of compacted cancellous bone grafting on the healing of subchondral bone defects of the medial femoral condyle in horses. *Vet Surg*. 2000;29:8–16.
  158. Antheunis H, van der Meer J, Geus M de, Heise A, Koning CE. Autocatalytic Equation Describing the Change in Molecular Weight during Hydrolytic Degradation of Aliphatic Polyesters. *Biomacromolecules*. 2010;11:1118–24.
  159. Meyer F, Wardale J, Best S, Cameron R, Rushton N, Brooks R. Effects of lactic acid and glycolic acid on human osteoblasts: a way to understand PLGA involvement in PLGA/calcium phosphate composite failure. *J Orthop Res*. 2012;30:864–71.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteoglykanstruktur.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des hyalinen Knorpels .....	5
Abbildung 3: Prinzip der klassischen ACT .....	9
Abbildung 4: Op-Lagerung .....	20
Abbildung 5: Boje.....	21
Abbildung 6: Verdünnungsreihe.....	22
Abbildung 7: Osteochondraler Defekt.....	25
Abbildung 8: Stanzzylinder.....	26
Abbildung 9: Scaffold im Defekt.....	27
Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl mononukleäre Zellen.....	36
Abbildung 11: Anzahl CFU in BM und BMAC.....	37
Abbildung 12: Thrombozyten im Vollblut und PRP.....	39
Abbildung 13: Makroskopische Defektdarstellung.....	41
Abbildung 14: Ergebnisse Makroskopischer Score.....	42
Abbildung 15: Toluidinblau-Färbung.....	43
Abbildung 16: Immunhistochemie.....	44
Abbildung 17: Punkte nach O`Driscoll Score.....	45

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System.....	6
Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen.....	18
Tabelle 3: Schema der aufsteigenden Alkoholreihe.....	29
Tabelle 4: Makroskopischer Score.....	33
Tabelle 5: Nach Rudert modifizierter O`Driscoll Score .....	34
Tabelle 6: Vergleich mesenchymaler und hämatopoetischer Oberflächenmarker.....	38
Tabelle 7: Wachstumsfaktoren in Plasma und PR.....	40

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Michael Wild, für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die persönliche und fachliche Unterstützung beim Anfertigen der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marcel Betsch für die freundschaftliche und kompetente Betreuung der Dissertation sowie die wissenschaftliche und strukturelle Förderung.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

23.04.2016, Simon Thuns

Unterschrift