

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR UNFALLCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. VOLKER ALT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PHYSIOXISCH KULTIVIERTE MESENCHYMALE STAMMZELLEN VERBESSERN
DIE REPARATUR DES KNORPELS IN EINEM FOKALEN FRÜHARTHROTISCHEN
DEFEKTMODELL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jonas Isaac Lucas Ilhan Krüchel

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR UNFALLCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. VOLKER ALT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PHYSIOXISCH KULTIVIERTE MESENCHYMALE STAMMZELLEN VERBESSERN
DIE REPARATUR DES KNORPELS IN EINEM FOKALEN FRÜHARTHROTISCHEN
DEFEKTMODELL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jonas Isaac Lucas Ilhan Krüchel

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Peter Angele

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius

Tag der mündlichen Prüfung

21.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Histologie und Funktion des Gelenkknorpels	4
1.2	Definition der (frühen) Osteoarthrose	7
1.3	Ätiologie der (frühen) Osteoarthrose	8
1.4	Pathophysiologie der (frühen) Osteoarthrose	8
1.5	Behandlungsmöglichkeiten von Knorpeldefekten und (früher) Osteoarthrose	10
1.6	Potential von vorkonditionierten MSCs	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Antikörper und Enzyme	17
2.1.2	Biomaterialien	17
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Proteine	18
2.1.4	Geräte und Hilfsmittel	19
2.1.5	Medien, Seren und Zusätze	20
2.1.6	Medikamente	21
2.1.7	Puffer und Lösungen	21
2.1.8	Tiere	23
2.1.9	Verbrauchsmaterial	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Modellaufbau	26
2.2.2	Chirurgische Behandlung	28
2.2.2.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung	28
2.2.2.2	Entnahme von Knochenmark	29
2.2.2.3	Erzeugung des osteochondralen Defekts	29

2.2.2.4	Implementierung des Hydrogels	29
2.2.2.5	Nachsorge und Gewebeentnahme	30
2.2.3	Zellkultur und Zellaufbereitung	30
2.2.3.1	Extraktion von MSCs aus Knochenmark	31
2.2.3.2	Zellkultur von MSCs	31
2.2.3.3	Pelletzellkultur von MSCs	32
2.2.3.4	Herstellung und Funktion des zellbeladenen TETEC-Albumin-Hyaluronsäuregels	32
2.2.3.5	Zellkultur des zellbeladenen HSA-HA-Hydrogels	34
2.2.4	Histologische Methoden	34
2.2.4.1	Gewebeaufbereitung und Anfertigung von Gefrierschnitten	34
2.2.4.2	Safranin-O/ Fast-Green Färbung	35
2.2.4.3	DMMB (1,9-Dimethyl-Methylenblau) Färbung	35
2.2.4.4	Kollagen Typ I und II Färbungen	36
2.2.5	Nano-CT Untersuchung	37
2.2.6	Analytik	39
2.2.6.1	Evaluation gefärbter Gefrierschnitte	39
2.2.6.1.1	OARSI-Grade	39
2.2.6.1.2	Sellers-Score	40
2.2.6.2	Quantitativer GAG-Assay	41
2.2.6.3	Quantitativer DNA-Assay	42
2.2.6.4	Messung von MSCs	42
2.2.6.5	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	In Vitro	44
3.1.1	Auswirkung der Sauerstoffkonzentration auf Differenzierung der MSCs	44
3.1.2	Analyse der Pelletzellkultur	47
3.1.2.1	Makroskopische Auswertung	47
3.1.2.2	Histologische Auswertung	48
3.1.2.3	Glykosaminoglykangehalt und Nassgewicht	51
3.1.2.4	DNA-Gehalt	52

3.1.3	Analyse kultivierter Hydrogele	53
3.1.3.1	Histologische Auswertung	53
3.2	In Vivo	55
3.2.1	Makroskopische Auswertung	55
3.2.2	Analyse osteoarthrotischer Veränderungen	56
3.2.3	Analyse von neugebildetem Gewebe	61
3.2.3.1	Post Trauma	61
3.2.3.2	Early OA	67
3.2.4	Darstellung der Kollagenkomposition	73
3.2.4.1	Post Trauma	73
3.2.4.2	Early OA	76
3.2.5	Auswertung Nano-CT	79
4	Diskussion	81
4.1	Verhalten Mesenchymaler Stammzellen unter Physioxia in vitro	82
4.2	Effekt physioxischer MSCs auf die Reparatur des Knorpels	85
4.3	Schlussfolgerungen und Blick in die Zukunft	88
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	90
7	Anhang	102
7.1	Abkürzungsverzeichnis	102
7.2	Veröffentlichung	104
7.3	Selbstständigkeitserklärung	105
7.4	Danksagung	106

1 Einleitung

Osteoarthrose ist ohne weiters als globale Volkskrankheit zu bezeichnen. Als häufigste Gelenkserkrankung weltweit, ist die Osteoarthrose nicht nur eine Belastung für betroffene Patienten, sondern auch für die Gesellschaft [1]. In westlichen Ländern verursacht die Krankheit Kosten in Höhe von 1 bis 2,5% des Bruttonationaleinkommens [2,3]. Bezogen auf das Bruttoeinkommen Deutschlands des Jahres 2019 wären dies Kosten zwischen 35 Milliarden bis 88 Milliarden Euro [4]. An einer Arthrose des Knies leiden weltweit rund 250 Millionen Menschen und damit ca. 3,64% der Weltbevölkerung [5].

Für betroffene Patienten bedeuten die Leiden der Kniearthrose eine erhebliche Einschränkung Ihrer Lebensqualität. Beachtlich sind dabei nicht nur die Schmerzsymptomatik oder die zu erwartende Minderung der körperlichen Funktionsfähigkeit als rein physische Beschwerden. Als kausale Folge sind vielmehr auch eine Abnahme des psychischen Wohlbefindens und der Vitalität zu erwarten [6]. Damit ist eine deutliche Abnahme der gesundheitsbezogenen Lebensqualität gegenüber Gesunden festzustellen.

Vorstehende Auswirkungen der Osteoarthrose als materieller Schaden für die Gesellschaft und als immaterielles Leid für Betroffene macht deutlich, wie wichtig die Erforschung der Krankheit und die Weiter- und Neuentwicklung von adäquaten Therapieformen ist. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auf der Früherkennung der Erkrankung und auf der Verhinderung deren Progression liegen.

1.1 Histologie und Funktion des Gelenkknorpels

Die Gelenkoberflächen der Knochenenden aller Diarthrosen sind von Gelenkknorpel überzogen. Als stark spezialisiertes Gewebe sorgt der Knorpel für die nötigen biomechanischen Eigenschaften, um die auf die Gelenke einwirkende Stoßkräfte weiterzuleiten und gleichmäßig zu verteilen. Durch seine glatte, von einem Flüssigkeitsfilm bedeckte Oberfläche ermöglicht er außerdem den reibungsarmen Ablauf von Gleitbewegungen zwischen den Gelenkpartnern [7].

Die besondere Beschaffenheit verdankt der Knorpel seiner Organisation aus Chondrozyten, der einzigen dort vorkommenden Zellart, und der von ihnen produzierten extrazellulärer Matrix. Diese besteht neben Wasser hauptsächlich aus Proteoglykanen und einem Netzwerk von Kollagenfibrillen, das die Form und Zugfestigkeit des Gelenkknorpels gewährleistet. Mit 90-95% aller im Knorpel vorhandenen Kollagenen, machen Typ II Kollagenfibrillen deren Hauptteil aus [8]. Eine Einteilung der Matrix erfolgt in die perizelluläre-, territoriale- und interterritoriale Matrix, wobei jede dieser Regionen Aufgaben erfüllt, die für den Erhalt der speziellen Eigenschaften des Knorpels von Bedeutung sind [9]. Verschiedene Ankerproteine (z.B. Kollagen Typ IX und XI) sorgen für die Integration zwischen dem Kollagenetzwerk und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix mit den Chondrozyten. So ist der Makromolekülkomplex Aggrecan, eine Einheit aus mehreren an einem Kernprotein gebundenen GAGs, mithilfe dieser Proteine über ein Hyaluronsäuremolekül mit dem CD44-Rezeptor der Chondrozyten verbunden. Komplexe wie diese ermöglichen durch ihre Vielzahl an negativen Ladungen die Bindung von Wasser, wodurch sie für den Gewebsflüssigkeitshaushalt und die hohe Druckfestigkeit des Gelenkknorpels verantwortlich sind (Abb.1B) [10]. Beobachtet man die Struktur des Gewebes, findet man ausgehend von der Knorpeloberfläche bis zum subchondralen Knochen eine Aufteilung in Zonen (Abb. 1A). Diese Zonen unterscheiden sich in ihrer Zell-, Protein- und Kollagenfilamentkomposition und sind spielen eine wichtige Rolle für die Funktion und mechanischen Eigenschaften des Gewebes (Abb. 1A) [9].

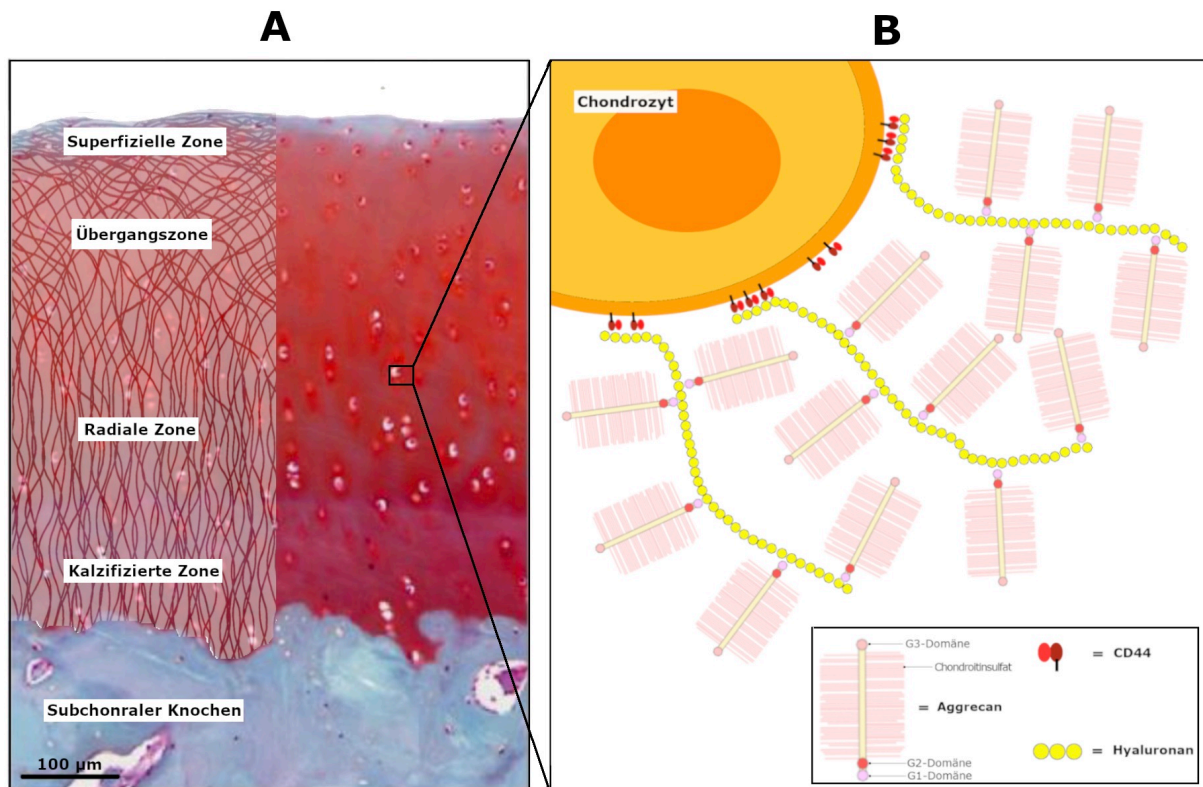


Abbildung 1: Histologische und schematische Darstellung artikulären Knorpels. A: Zonale Aufteilung des Knorpels und Skizze der Fibrillenkonfiguration; Safranin-O/ Fast Green Färbung (modifiziert nach Broom et al., 2018 [11] und Thielen et al., 2019 [12]). B: Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix

Als nicht innerviertes, alymphatisches und avaskuläres Gewebe hat Gelenkknorpel nur begrenzte Regenerationsmöglichkeiten [13]. Dennoch müssen ständig anabolische und katabolische Prozesse für die Aufrechterhaltung und Anpassung der Struktur ablaufen. Auf ihn einwirkende mechanische Belastung wird vom Knorpel nicht nur toleriert, sondern kann sogar bis zu einer bestimmten Schwelle zur Aufrechterhaltung der Qualität des Gewebes beitragen [14].

Wenn diese Schwelle jedoch durch chronische Überbelastung oder ein Trauma überschritten wird oder gealterte Chondrozyten ihren metabolischen Anforderungen nicht mehr nachkommen können, kann es zu degenerativen Veränderungen kommen [15].

1.2 Definition der (frühen) Osteoarthrose

Osteoarthrose ist eine multifaktorielle Gelenkerkrankung. Charakteristisch ist die Degeneration des Gelenkknorpels, eine intraartikuläre Entzündungsreaktion inklusive Synovitis sowie Veränderungen im subchondralen Knochen und im umliegenden Gewebe [15]. Die Vielzahl der betroffenen Gewebearten verdeutlicht dabei, dass die Arthrose als Krankheit des gesamten Gelenks verstanden werden muss [16]. Für den Patienten geht die Erkrankung mit den Kardinalsymptomen Schmerz, Morgensteifigkeit und Krepitationen bei Bewegung des betroffenen Gelenks einher [17]. Schreitet die Arthrose fort, kann es zu irreversiblen Verlusten von Funktion und Gewebe kommen. Um die Progression der Erkrankung und auftretende Folgeschäden zu verhindern, ist es nötig, die Osteoarthrose frühzeitig zu erkennen. Im Anfangsstadium können womöglich noch regenerative Prozesse ablaufen, die den Verlust des Knorpels verhindern können. Diese Phase der Krankheit wird auch als „early Osteoarthritis“ (frühe Osteoarthrose) bezeichnet. Unterschieden werden dabei eine diffuse Form der frühen Arthrose, bei der mindestens zwei Kompartimente des Kniegelenks von leichtgradigen Degenerationen betroffen sind, ohne das Vorhandensein einer abgrenzbaren Läsion und eine fokale Form mit umschriebenem Knorpeldefekt, bei der zusätzlich Degenerationen in direkter Umgebung des Defekts auftreten können [18]. Besonders bei dieser fokalen Form der frühen Osteoarthrose ist bei der Anwendung zellbasierter Behandlungsformen wie der MACT mit einer erhöhten Komplikationsrate im Vergleich zu traumatischen Defekten zu rechnen [19,20]. Diese Arbeit widmet sich daher größtenteils der Untersuchung eben dieser anspruchsvollen klinischen Situation.

1.3 Ätiologie der (frühen) Osteoarthrose

Die Ursachen für die Entstehung der Krankheit sind bisher nicht vollständig geklärt. Vermutet werden metabolische Fehlsteuerungen, entzündliche Prozesse und übermäßige mechanische Belastungen als Ursprung der Osteoarthrose [21,22]. Genetische Faktoren und Einflüsse aus der Umwelt spielen bei der Krankheitsentstehung ebenfalls eine Rolle. So sind bis jetzt mehr als 20 verschiedene Genloci bekannt, die mit der Entwicklung von Arthrose im Zusammenhang stehen [23]. Ebenfalls von Bedeutung sind die mit der Krankheit assoziierten Risikofaktoren, da durch deren Identifikation präventive Maßnahmen getroffen werden können. Dazu zählen das Alter, das Geschlecht, Übergewicht, Verletzungen und Fehlstellungen [24]. Von besonderer Relevanz für die Kniearthrose sind dabei Knieverletzungen und Übergewicht (BMI > 25), die mit einer Odds Ratio von 2,83, bzw. 2,1 im starken Zusammenhang mit der Entstehung von Osteoarthrose stehen [25]. Fokale Knorpeldefekte können so ursächlich für die frühzeitige Entwicklung einer manifesten, periläsionären Arthrose sein, die sekundär zur Beeinträchtigung des gesamten Kompartiments führen kann [18,26].

1.4 Pathophysiologie der (frühen) Osteoarthrose

Veränderungen im betroffenen Gelenk können entweder als langsam fortschreitender degenerativer Prozess oder direkt im Anschluss an eine Verletzung stattfinden. Die stark eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Chondrozyten unter physiologischen Bedingungen trägt in beiden Fällen zum Fortschreiten der Krankheit bei [8,27].

Zu den ersten sichtbaren strukturellen Zeichen der Osteoarthrose gehören Fibrillationen der oberflächlichen Knorpelschicht. Im Verlauf der Erkrankung können sich diese zu Fissuren ausweiten, die bis zum kalzifizierten Knorpel reichen. In der Endphase der Arthrose erscheint die Oberfläche delaminiert [17]. In stark betroffenen Arealen ist es möglich, dass der subchondrale Knochen durch den kompletten Verlust von Gelenkknorpel sichtbar wird. Der subchondrale Knochen selbst ist ebenfalls von Veränderungen betroffen. Schon früh entstehen Mikrorisse im Bereich der Grenze zwischen Knochen und kalzifiziertem Knorpel, durch die kleinste Blutgefäße und

sensorische sowie sympathische Nerven eindringen. Im Bereich dieser neuentstandenen Kanäle beginnt die enchondrale Formation von neuem Knochen [28]. Weitere typische Veränderungen sind die Zunahme des Knochenvolumens, der Knochendicke und der Knochenkontur, während die Mineralstoffdichte und damit die Steifheit des Knochens abnimmt [29]. Durch die veränderte Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, die für den Knochenauf- und -umbau zuständig sind, kommt es zur Entstehung von Knochenzysten, Knochenmarksläsionen und Osteophyten. Diese Zeichen des Knochenumbaus stehen in enger Beziehung mit einer pathologisch erhöhten Belastung des Knochens [30].

Neben Veränderungen im Bereich des subchondralen Knochens, kommt es auch zu Funktionseinschränkungen in der metabolischen Aktivität der Chondrozyten. Die Chondrozyten produzieren und sezernieren im erkrankten Knorpel eine Reihe von Proteinen, die mit der Entstehung der Arthrose assoziiert sind. Durch deren weitreichende Wirkungen kommt es zur Störung des Gleichgewichts zwischen anabolisch und katabolisch ablaufenden Prozessen. Diese müssen exakt aufeinander abgestimmt sein, da sonst die Instandhaltung funktionstüchtigen Gelenkknorpels nicht mehr gewährleistet ist. Deutlich wird die Störung dieses Equilibriums unter anderem durch das vermehrte Auftreten von matrixdestruierenden Metalloproteinasen und Aggrecanasen [31]. So ist der Gehalt der katabolen Collagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 im arthrotischen Knorpel ebenso erhöht wie die Aggrecanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 [32]. Beide Gruppen von Proteinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Arthrose. Sie sind neben anderen Enzymen für den Abbau von Proteoglykanen verantwortlich [33]. Die Folge der Dysregulation des Matrixmetabolismus und dem vermehrten Auftreten katabol aktiver Proteine ist die Auflösung des Kollagennetzwerks und der Verlust von GAGs.

Die von den Proteinasen erzeugten Spaltprodukte sorgen in den Chondrozyten für eine Hochregulation der Gene, die für die Kodierung von inflammatorisch wirkenden Proteinen verantwortlich sind [34]. Dazu gehören Entzündungsmediatoren wie Chemokine (bspw. CCL2/3/4/5, CXCL12 oder CXCR4) und Cytokine (bspw. IL-1 β , TNF α oder IL-6/15/17/18) [35,36]. Eine ihrer Hauptaufgaben ist die Regulation katabolischer Prozesse. Auffällig ist ein erhöhter Gehalt dieser Mediatoren im Knorpel und der Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten im Vergleich zu Gesunden [37]. Außerdem kommt es durch ihre autokrine und parakrine Aktivität zur verstärkten Dysregulation der Chondrozytenfunktion und damit zum weiteren Fortschreiten der

Osteoarthrose [17]. Eine mögliche Ursache all dieser Funktionsänderungen, ist eine Störung der perizellulären Matrix im Knorpel. Sie umgibt die Chondrozyten unmittelbar und ist reich an Kollagen Typ VI. Kommt es hier zu degenerativen Schäden, kann es zum Kontakt zwischen Chondrozyten und der interterritorialen Matrix kommen. Über Integrine, die wichtige Zell-Matrix-Interaktionen regulieren, können anschließend Signale vermittelt werden, die zu Veränderungen in den Chondrozyten führen. Hiervon betroffen sind die Differenzierungsfähigkeit der Zellen, die Zellproliferation, die Matrixproduktion und das Überleben der Zellen [38].

Insgesamt führen alle angesprochenen Umwandlungen im Gelenkknorpel und umliegenden Gewebe zur Veränderung seiner einzigartigen Eigenschaften und damit zum zumindest teilweisen Verlust seiner Funktion.

1.5 Behandlungsmöglichkeiten von Knorpeldefekten und (früher) Osteoarthrose

Das Ziel einer Therapie für die Osteoarthrose des Knies sollte sowohl die Linderung von Schmerzen als auch die Wiederherstellung der Funktion des Gelenks sein. Momentan finden hierfür mehrere Behandlungsverfahren Einsatz. Neben operativen Ansätzen kommen auch nicht operative Alternativen in Frage. Dazu zählen die Physiotherapie, Änderungen des Lebensstils, die Behandlung mit Orthesen oder Bandagen und die pharmakologische Therapie [39]. Sollten konservative Methoden nicht zum gewünschten Erfolg führen und die Lebensqualität des Patienten weiter beeinträchtigt werden, stellen operative Behandlungen eine weitere Option dar [40].

In den letzten Jahren sind Therapien zur gelenkerhaltenden Reparatur des Knorpels und des subchondralen Knochens immer mehr in den Fokus gerückt. Einsatz finden diese vor allem bei der Behandlung von fokalen Knorpeldefekten. Die matrixgestützte autologe Knorpelzelltransplantation (MACT) stellt eines dieser Verfahren dar (Abb.2). Als Weiterentwicklung der seit 1987 angewandten Autologen Chondrozytentransplantation (ACT), werden bei dieser Technik im Labor kultivierte Chondrozyten mit einer dreidimensionalen Trägersubstanz versehen und anschließend implantiert. Die verwendeten Zellen werden meist von einer nicht belasteten Zone des betroffenen Gelenks gewonnen. Durch die Verwendung des Trägermaterials soll für die Zellen eine Umgebung geschaffen werden, in der sie

optimale Wachstumsbedingungen finden. Dadurch soll im Heilungsverlauf die Bildung von funktionstüchtigem Gewebe im Gelenk unterstützt werden [20,41]. Zur Zeit kommt die MACT hauptsächlich bei der Behandlung von isolierten, fokalen Knorpeldefekten zum Einsatz, eine bestehende fortgeschrittene Osteoarthrose stellt dabei in den meisten klinischen Situationen eine Kontraindikation dar [42,43]. Einer der Gründe hierfür ist der negative Einfluss, den im degenerativ geschädigtem Knie vorkommende Entzündungsmediatoren wie IL-1 β auf das klinische Ergebnis nach der Operation haben [44]. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass die Komplikationsraten bei der zellbasierten Therapie degenerativer Läsionen höher sind als bei traumatischen Defekten. Dennoch machen laut dem deutschen Knorpelregister der DGOU degenerative Knorpeldefekte den Großteil der mit MACT behandelten Knorpelopathologien des Kniegelenks aus [19,45].

Breite Anwendung in der Klinik bei der Behandlung von fokalen Knorpeldefekten findet ebenfalls die Mikrofrakturierung (Abb. 2). Nach Abtragung des beschädigten Knorpels bis auf den subchondralen Knochen wird dieser perforiert, um den dort befindlichen Stammzellen den Übertritt in die Defektzone zu ermöglichen. Der Rückgriff auf diese Technik erfolgt vor allem bei Defekten, die zu klein für den Einsatz zellbasierter Verfahren sind. Als weitere, allerdings seltener eingesetzte Therapieoptionen stehen osteochondrale Grafftransplantationen und zellfreie Implantate zur Verfügung [46,47].

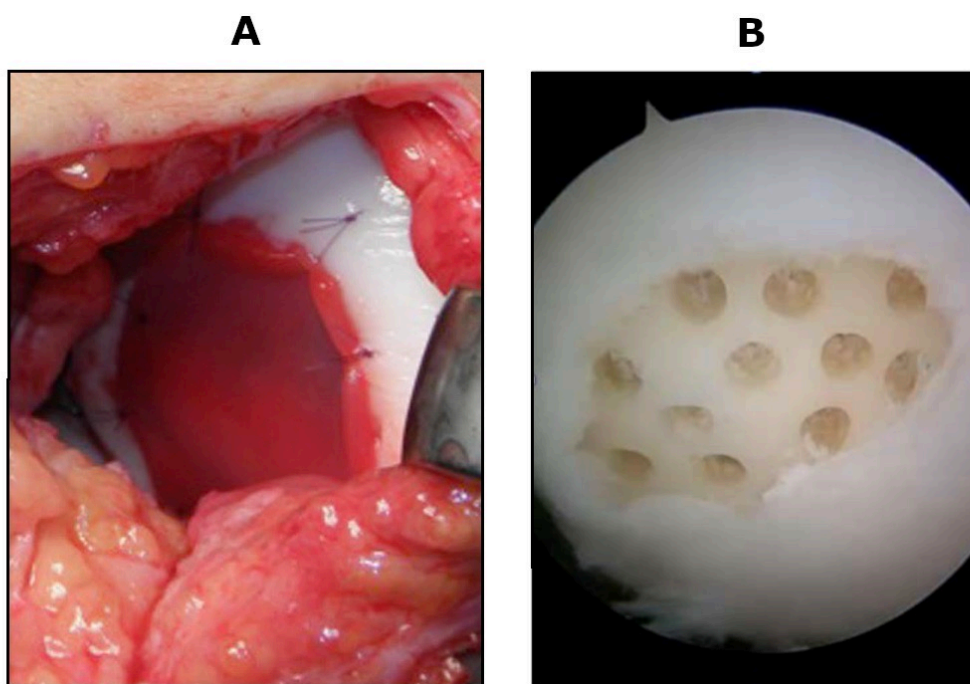


Abbildung 2: A: MACT der lateralen Femurkondyle (Angele et al., 2016).[19] B: Mittels Mikrofrakturierung behandelte Läsion (Case et al., 2016) [48].

Für Patienten mit einer fortgeschrittenen Kniearthrose und hohem Leidensdruck stellt derzeit oft der Einsatz einer Knieendoprothese die Therapie der Wahl dar. Obwohl durch diese Intervention bei einem Großteil der Betroffenen eine Besserung der Gelenkfunktion und eine Abnahme der Schmerzen erzielt werden können, steigt die Revisionsrate mit der Dauer des Verbleibs der Prothese an [49–51]. Vor allem bei jüngeren Patienten, die aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung länger auf die Prothese angewiesen sind, können im Verlauf Komplikationen auftreten. Am häufigsten zur erneuten Operation führen dabei in abnehmender Reihenfolge die aseptische Lockerung der Prothese, Infektionen und Instabilität [49]. Diese Beeinträchtigungen machen deutlich, dass das Unterbinden der Progression der Arthrose ein elementares Behandlungsziel darstellen sollte. Während es für das Endstadium der Erkrankung und für fokale traumatische Knorpelverletzungen angemessene Therapieverfahren gibt, fehlt es derzeit an zufriedenstellenden Behandlungsoptionen für frühe arthrotische Degenerationen und periläsionäre Veränderungen. Geschlossen werden könnte diese Behandlungslücke zukünftig durch den Einsatz neuer zellbasierten Methoden der regenerativen Medizin sowie der Weiterentwicklung von bekannten Verfahren [19].

1.6 Potential von vorkonditionierten MSCs

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind multipotente Stammzellen, die in nahezu jeder Art von Bindegewebe vorkommen [52]. Sie besitzen die Fähigkeit, sich in vom Mesoderm abstammende Zellen zu differenzieren. Dazu gehören unter anderem Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten [53]. Da die plastikadhärenten MSCs ohne große Schwierigkeit aus Knochenmark, Synovium und Fettgewebe extrahiert werden können und sie ihr Differenzierungspotential auch nach mehreren Passagen beibehalten, stellen sie eine interessante Basis für stammzellbasierte Therapieformen dar [54–56]. Des Weiteren stellen sie bei von Arthrose betroffenen Patienten im Gegensatz zu Chondrozyten eine Quelle von Zellen dar, die dem negativen Einfluss von Entzündungsmediatoren nicht direkt ausgesetzt sind. Gerade im von der Anwesenheit von katabolen Enzymen geprägten arthrotischen Gelenk könnten MSCs so für eine adäquate Reparatur des Knorpels sorgen. Aus dem Knochenmarkt entnommene MSCs könnten außerdem ohne vorherige in vitro Kultivierung genutzt

werden, was die Behandlungskosten stark reduzieren würde. Die Extraktion und Verwendung der Zellen ließen sich so in einem einzigen Eingriff durchführen [57].

Einer der Hauptgründe für das große Interesse an MSCs, ist ihr Potential, durch bestimmte Stimuli einen chondrozytenähnlichen Phänotyp anzunehmen und die damit verbundene Hoffnung funktionstüchtigen Gelenkknorpel bilden zu können [58]. Die in der herkömmlichen Kultur gezüchteten Zellen zeigen zwar viele Gemeinsamkeiten mit Chondrozyten, sie ähneln allerdings eher osteoarthrotisch veränderten Chondrozyten, bzw. hypertrophen Chondrozyten [59]. Häufig findet die Expansion dieser kultivierten MSCs unter atmosphärischem Sauerstoffgehalt statt, obwohl der physiologische Sauerstoffgehalt im Gelenkknorpel des Menschen nur zwischen 2-5% liegt [60,61]. In dieser Arbeit werden deshalb die Begriffe Physioxia (2% Sauerstoff; physiologischer Sauerstoffgehalt) und Hyperoxia (20% Sauerstoff; nicht physiologischer, zu hoher Sauerstoffgehalt) verwendet. Eine Vorkonditionierung, wie die Kultivierung unter physioxischen Bedingungen, könnte dabei helfen, den Differenzierungsprozess der MSCs zu hypertrophen Chondrozyten zu verhindern. So findet beispielsweise ein Großteil der durchgeführten Studien eine verminderte Expression des mit Hypertrophie assoziierten Gens COL10A1 unter physioxischen Bedingungen. Ebenfalls beobachtet werden konnte eine Verlangsamung des Alterungsprozesses der Zellen in Langzeitkulturen [62]. Gesteuert werden die Veränderungen des Knorpelstoffwechsels und des Verhaltens der Chondrozyten durch Vorgänge, die auf molekularer Ebene ablaufen. Als essenziell hat sich die Aktivierung des Hypoxia-inducible factors 1 alpha (HIF-1 α) erwiesen. Über eine Reihe von ablaufenden Prozessen sorgt der niedrige Sauerstoffgehalt im Gewebe so für die Hochregulation von responsiven Genen, die unter anderem für das Überleben und das Wachstum der Zellen relevant sind (Abb.3) [63,64]. Die genannten Merkmale sind ausschlaggebend dafür, dass vorkonditionierte MSCs eine interessante Zellquelle für regenerative Knorpelbehandlungen darstellen. Besonders unter biochemisch ungünstigen Bedingungen für anabole Prozesse, wie man sie im von früher Osteoarthrose betroffenen Gelenk findet, könnten MSCs durch ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber katabolen Enzymen von Nutzen sein.

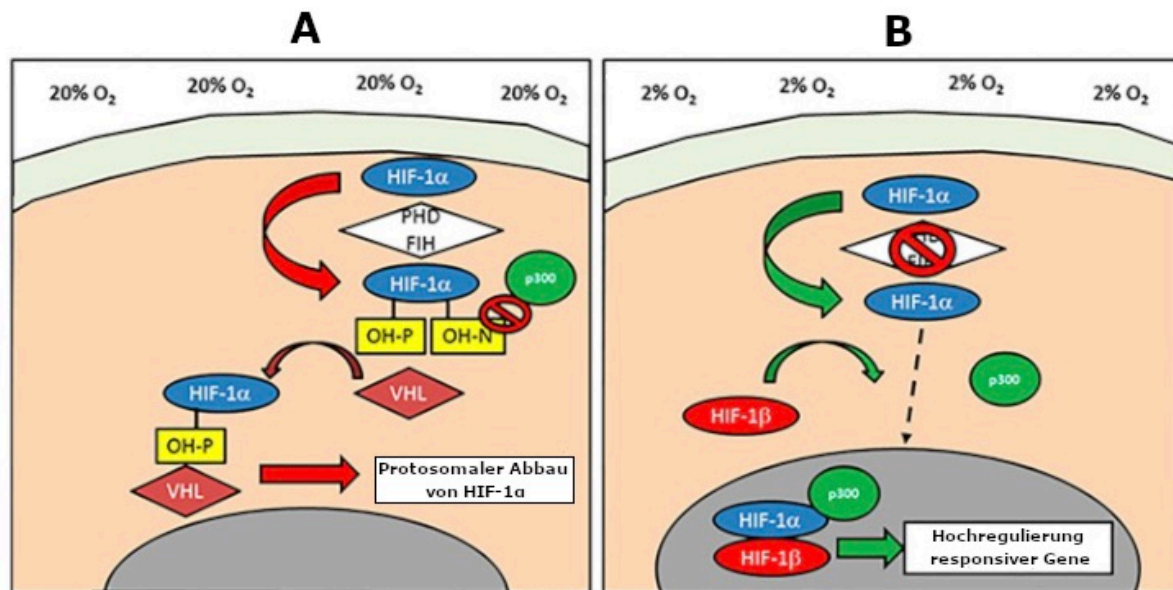


Abbildung 3: Schema der Aktivierung des HIF-1 α . A: Unter hyperoxischen Bedingungen wird HIF-1 α nach Hydroxylierung durch Prolylhydroxylasen (PHD) und den HIF inhibierenden Faktor (FIH) durch den Von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Komplex (VHL) proteasomal abgebaut (modifiziert nach Pattappa et al., 2019) [62]. B: Unter physioxischen Bedingungen werden PHD und FIH inhibiert. Nach Komplexbildung mit dem Cofaktor p300 und mit HIF-1 β erfolgt die Hochregulierung responsiver Gene (modifiziert nach Pattappa et al., 2019) [62].

Erstmals für die Behandlung eines chondralen Defekts genutzt wurden MSCs von Wakitani et al. Im Jahr 2002 [65]. Bis Anfang 2019 wurden mehr als 50 Studien zur Evaluation der Effektivität von Mesenchymalen Stammzellen in der Behandlung von Osteoarthritis im Menschen durchgeführt [66]. Dabei zeigten einige Studien positive Ergebnisse bei der Therapie von Arthritis im Knie, die unter Standardbehandlungsmethoden keine Besserung der Symptomatik bewirkte [66–68]. Ebenfalls untersucht wurden mögliche Risiken, die bei der Behandlung mit den Zellen entstehen könnten. So konnten Emadedin et al. keine signifikanten Nebenwirkungen einer einmaligen Injektion von aus dem Knochenmark stammenden MSCs bis zu sechs Wochen nach der Intervention finden [69].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für Patienten mit frühen arthrotischen Veränderungen des Kniegelenks gibt es momentan keine ausreichend zufriedenstellende Therapie. Gelenkerhaltende, zellbasierte Methoden der Knorpelreparatur finden zwar Anwendung in der Behandlung von Knorpeldefekten, im degenerativ geschädigten und von Arthrose betroffenen Gelenk ist deren Effizienz jedoch eingeschränkt. In dieser klinischen Situation bedarf es neuen Therapieoptionen. Als eine vielversprechende, alternative Zellquelle für Tissue Engineering Ansätze werden Mesenchymale Stammzellen gesehen. Mit ihren antiinflammatorischen und immunomodulierenden Eigenschaften stellen sie im von Entzündung geprägten Milieu des arthrotischen Gelenks womöglich einen geeigneten Kandidaten für bessere und effektivere Behandlungsmethoden dar. Um die Differenzierung der MSCs in einen möglichst stabilen und artikulären Chondrozyten ähnelndem Phänotyp zu gewährleisten, wurden die Zellen unter verschiedenen externen Bedingungen kultiviert. Ein niedriger Sauerstoffgehalt hat sich hierbei als potentiell günstig für die Behandlung von Knorpelschäden erwiesen, da so die Chondrogenese der MSCs unterstützt wird [62]. Für die Einbringung der Zellen wird ein bereits in klinischen Studien eingesetztes [70] albumin- und hyaluronatbasiertes Hydrogel der Firma TETEC AG verwendet (NOVOCART® Inject). Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von unter physioxischen Bedingungen vorkonditionierten mesenchymalen Stammzellen auf die Reparatur von fokalen früharthrotischen Knorpelläsionen und traumatischen Knorpeldefekten in einem dafür eigens geschaffenen Tiermodell zu untersuchen. Das Modell eignet sich hierfür in besonderer Weise, da durch die Kreation eines fokalen Defekts eine Situation entsteht, in der die Biomechanik des Gelenks weitestgehend unbeeinträchtigt bleibt. So können die eingesetzten zellbasierten Behandlungsmethoden angemessen evaluiert werden. Zusätzlich sollen bestimmte Eigenschaften der MSCs wie Wachstums- und Expansionsverhalten und Proteinproduktion unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen in vitro bestimmt werden.

Hypothese 1: Physioxische (2%) Kultivierungsbedingungen unterstützen die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen.

Hypothese 2: Physioxisch vorkonditionierte mesenchymale Stammzellen verbessern fokale früharthrotische und traumatische Knorpeldefekte in vivo.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper und Enzyme

Bezeichnung	Unterklasse	Hersteller
Biotin-SP Affinipure Anti-Maus-Antikörper	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch Europe, Ely, UK
Monoklonaler Anti-Kollagen-Typ 1-Antikörper	Maus, IgG	Sigma Aldrich, Steinheim
Monoklonaler Anti-Kollagen-Typ 2-Antikörper	Maus, IgG	Merck KGaA, Darmstadt
Pepsin		Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

2.1.2 Biomaterialien

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Hyaluronat (1%)	Ostenil	TRB Chemedica AG, München

Mesenchymale Stammzellen wurden aus den Beckenkämmen von New-Zealand-White-Rabbits gewonnen (für eine Beschreibung der Entnahme siehe Kapitel 2.2.2.1).

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Albumin (Rind)	Sigma Aldrich, Steinheim
Biotin	Jackson, West Grove, USA
Chromalaun	Sigma Aldrich, Steinheim
Chondroitinsulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
Cystein	Merck, Darmstadt
D(+)-Sacharose	Roth, Karlsruhe
Depex-Eindeckmedium	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMMB (Dimethyl-Methylenblau 1,9)	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Eindeckmedium (Tissue-Tek)	Sakura Finetek Europe, Umkirch
Ethanol 99%; 70%	Roth, Karlsruhe
Fast Green FCF	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gelatine	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin nach GILL-III	Merck, Darmstadt
Lambda DNA Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Braun, Melsungen
NiCl ₂	Sigma Aldrich, Steinheim
CoCl ₂	Sigma Aldrich, Steinheim
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma Aldrich, Steinheim
Propanol	Merck, Darmstadt

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stickstoff	Linde, München
Safranin-O	Merck, Darmstadt
TRIS-Base	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Autoklav	Melatronik 23	Melag, Berlin
Inkubatoren	Heracell 150i Heracell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryostaten	Leica CM 1950 Microm HM 500 OM	Leica Biosystems, Wetzlar Microm Laborgeräte, Berlin
Mikro-CT	Scanco μ CT	Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz
Mikroskope	Dialux 20 EB Fluovert FU Olympus BX 61 Eclipse TE 2000 U	Leitz, Stuttgart Olympus, Shinjuku, Japan Nikon, Minato, Japan
OP-Instrumente		Aesculap Braun, Tuttlingen
OP-Lichtquelle	KL 1500 LED	Schott, Mainz

PH-Meter	Digital PH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Pipetten	Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Falcon	Corning, New York, USA
Schüttelgeräte	Polymax 2040 REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Spektralphotometer	Tecan GENios	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Tiefkühltruhe		Heraeus, Hanau
Tierhaarschneidemaschine	Moser 1400	Wahl, Unterkirnach
Waagen	Kern 770	Kern & Sohn, Balingen
Wärmeplatten	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	GFL 1003	GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer-Improved	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
Zahnbohrer	SurgicPro	NSK Europe, Eschborn
Zentrifugen	Multifuge 3 SR Plus	Heraeus, Hanau

2.1.5 Medien, Seren und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Ascorbat	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose	Gibco, Karlsruhe

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Fetal bovine serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fibroblast growth factor (FGF)	Peptotech, Rocky Hill, USA
Hepes-Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin-transferrin-sodium (ITS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)	R+D Systems, Wiesbaden

2.1.6 Medikamente

Bezeichnung	Hersteller
Betaisodona Salbe	Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn
Heparin	Rotexmedica GmbH, Trittau
Ketaminhydrochlorid (10%)	WDT, Garbsen
Pentobarbital	CP-Pharma GmbH, Burgdorf
Xylazinhydrochlorid (2%)	Serumwerk Bernburg, Bernburg

2.1.7 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetoxylsäure (1%)	10ml Acetoxylsäure (100%), 990ml Aqua destillata

Acid-Alkohol (0,5%)	10ml HCL (32%), 900ml Ethanol (70%)
Avidin-Biotin-Komplex	10ml TRIS-Puffer, 100µl Reagent A, 100µl Reagent B
Blocking-Puffer	120 ml TRIS-Puffer, 2400 mg NaCl (0,8%), 60 ml Aqua destillata, 1 ml FBS, 1 ml Ziegenserum
DAB-Lösung	9000 µl m-PBS-Puffer, 1000 µl DAB/BSA, 240 µl Ni/Co Stammlösung, 6 µl H ₂ O ₂ (30%)
Dekalzifizierungslösung	800 ml PBS 1x, 35 ml NaOH 10M, 100 g EDTA; pH 8
DMMB-Lösung	18 mg DMMB, 950 ml Aqua destillata, 5 ml Ethanol, 2 g Natriumformat, 2 ml Formalinsäure; pH 3
Mcllavaine-Puffer	Lösung A: 21 g Zitronensäure 0,1M, 1000ml Aqua destillata Lösung B: 35,6 g Na ₂ HPO ₄ 0,2M, 1000ml Aqua destillata 1/3 Lösung A + 2/3 Lösung B; pH 3,6
Ni/Co-Stammlösung	500mg NiCl ₂ , 25 mg CoCl ₂ , 50mg BSA, 50ml Aqua destillata
Papain-Verdau	100ml PBS, 0,0363g L-Cystein, 0,1117g EDTA, 15mg Papain; pH 6
PBS 10x	80 g NaCl, 4 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 800ml H ₂ O Millipore
Pepsinlösung	1 mg Pepsin, 1 ml Mcllavaine- Puffer
Phosphatpuffer	Lösung A: 35,6 g Na ₂ HPO ₄ , 1000ml aqua destillata Lösung B: 13,8 g KH ₂ PO ₄ , 500ml aqua

	destillata 4/5 Lösung A + 1/5 Lösung B; pH 7,4
Standardfixans (PFA 8%)	80g Paraformaldehyd, 500ml Phosphatpuffer, 400ml H ₂ O Millipore
TE-Puffer	200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5
TRIS-Puffer	24,228g TRIS Base, 900 ml aqua destillata; pH 7
Waschpuffer	1560 ml TRIS-Puffer, 4400 aqua destillata, 49,92 g NaCl, 1,2 ml Triton X100 4%

2.1.8 Tiere

Bezeichnung	Hersteller
New-Zealand-White-Rabbits, männlich, Alter zwischen 6-8 Monate	Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln

Die Kaninchen wurden einzeln untergebracht in einem Tierstall der Universitätsklinik Regensburg gehalten. Die Tiere durften sich zu jeder Zeit vor und nach der Operation frei bewegen. Die Antragsnummer des Versuchsvorhabens lautet 55.2 2532-2-300 und wurde am 23.12.2016 gestellt.

2.1.9 Verbrauchsmaterial

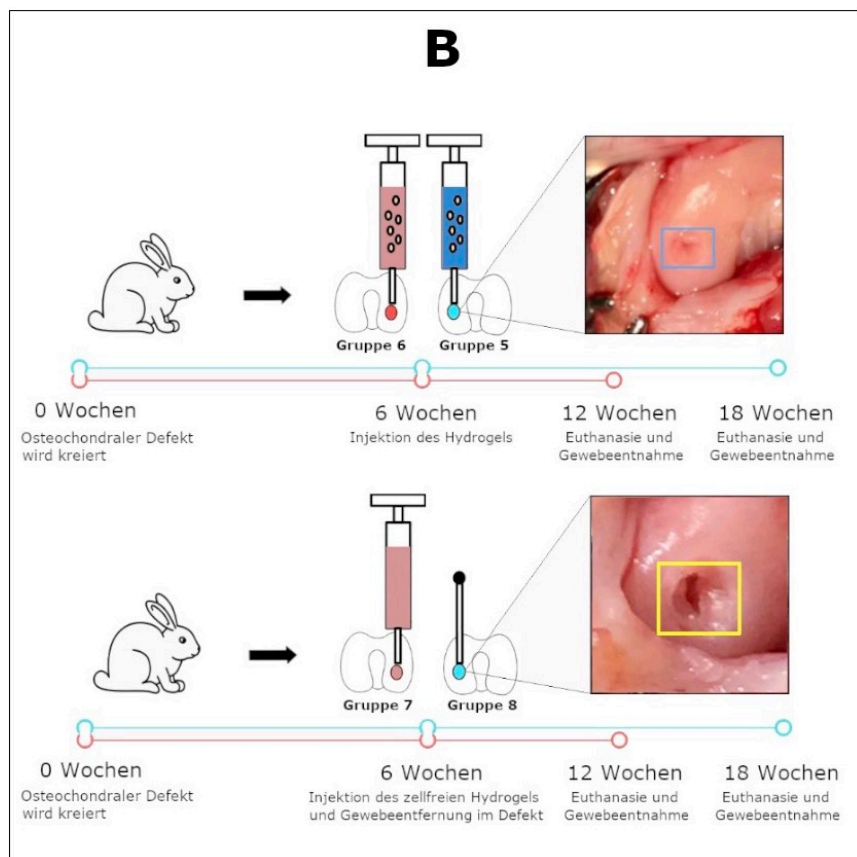
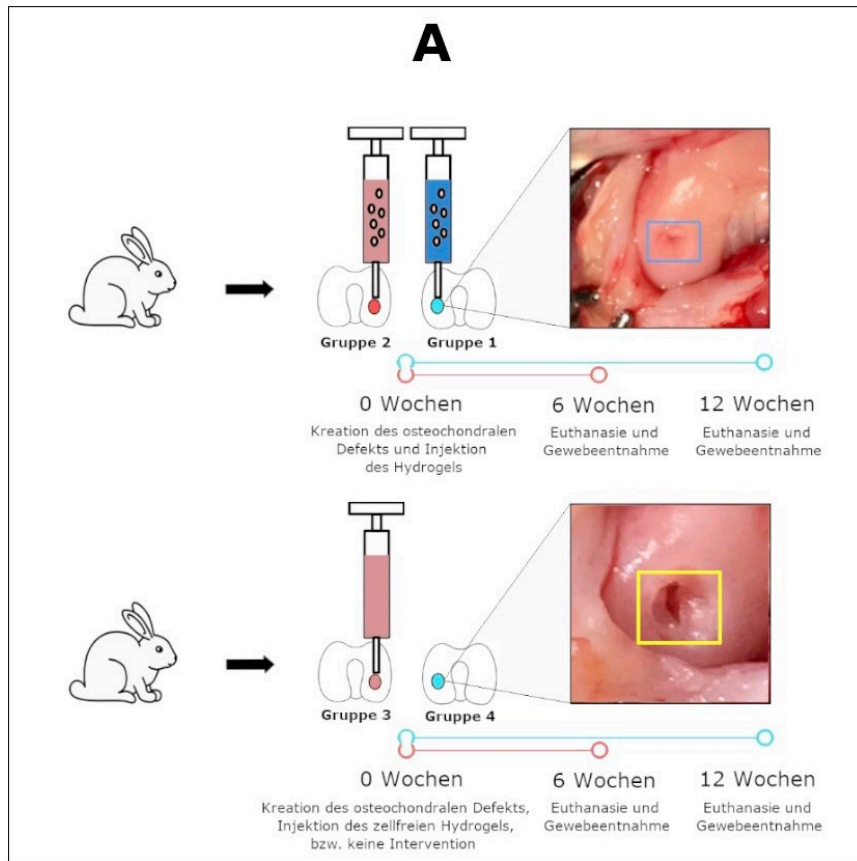
Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Abdecktücher	Lochtuch (75 x 90cm)	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf
Carbonstahlklingen	Rasierklinge GEM	American Safety Razor Company, Verona, USA
Deckgläser	Stärke 1, 24 x 50mm Stärke 1, 24 x 60mm	Roth, Karlsruhe
Desinfektionsmittel	Ethanol Softasept	Roth, Karlsruhe Braun, Melsungen
Doppelkammerspritzen	Novocart Inject	TETEC Tissue Engineering Technologies AG, Reutlingen
Dreieckstupfer	Sugi Sponge Points 17 x 8 mm	Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg
Fäden	Vicryl 3.0 Vicryl 4.0	Ethicon, Norderstedt
Handschuhe	Peha soft Peha soft nitrile Sempermed steril	Hartmann, Heidenheim Semperit AG, Wien
Kanülen	Butterfly G20 Butterfly G21 Sterican G20 Sterican G21	Braun, Melsungen
Kompressen (steril)	10 x 10cm	Hartmann, Heidenheim
Kühlschlauch		NSK, Eschborn

Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Starfrost, 26 x 76mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Pipetten Spitzen	10µl 100µl 1000 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen
Skalpelle	Feather #11 Feather #12 Feather #15	pfm medical ag, Köln
Spritzen	Inject solo 2ml Inject solo 10ml	Braun, Melsungen
Sprühplaster	Hansaplast	Beiersdorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen	T75 T175	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	24 Well 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Falcon 15ml Falcon 50ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.2 Methoden

2.2.1 Modellaufbau

Um den Einfluss von vorkonditionierten MSCs auf die Reparatur von Knorpeldefekten zu untersuchen, wurde ein passendes Tiermodell entwickelt. Hierfür wurden 6-8 Monate alte, ausgewachsene Weiße Neuseeländer Kaninchen in zwei Hauptgruppen (Early OA und Post Trauma) mit jeweils vier Untergruppen eingeteilt (Abb. 4). Bei allen Gruppen wurde ein osteochondraler Defekt an der medialen Femurkondyle erzeugt. Während die jeweilige Intervention bei den Post Trauma Gruppen direkt im Anschluss an die Defektkreation erfolgte, fand diese bei den Early OA Gruppen erst bei einer zweiten Operation nach 6 Wochen statt. Der Zeitpunkt der zweiten Operation bei den Early OA Gruppen wurde dabei so gewählt, dass bereits frühe arthrotische Veränderungen periläsionär vorhanden waren. Vor der eigentlichen Behandlung wurde Knochenmark zur Extraktion und Expansion der für die Injektion benötigten Stammzellen entnommen (Abb. 4). Bei den Post Trauma Gruppen wurde entweder Hydrogel mit physioxisch (Gruppe 1) oder hyperoxisch (Gruppe 2) vorkonditionierten MSCs in den Defekt injiziert. Als Kontrolle fungierte eine zellfreie Hydrogelinjektion (Gruppe 3) und das Belassen des Defekts ohne Intervention (Gruppe 4). Bei den Early OA Gruppen wurde ebenfalls entweder Hydrogel mit physioxisch (Gruppe 5) oder hyperoxisch (Gruppe 6) vorkonditionierten MSCs injiziert. Neben einer zellfreien Hydrogelinjektion (Gruppe 7) diente das vorsichtige Auskratzen des neugebildeten Gewebes aus dem Defekt (Gruppe 8) als Kontrolle. Das Ergebnis einer jeden Gruppe wurde an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert, 6 Wochen und 12 Wochen nach der zuletzt stattgefundenen Intervention. Die Euthanasie der Versuchstiere und die Gewebeentnahme fand damit gruppenspezifisch 6-, 12-, oder 18 Wochen nach Versuchsbeginn statt (Abb. 4).



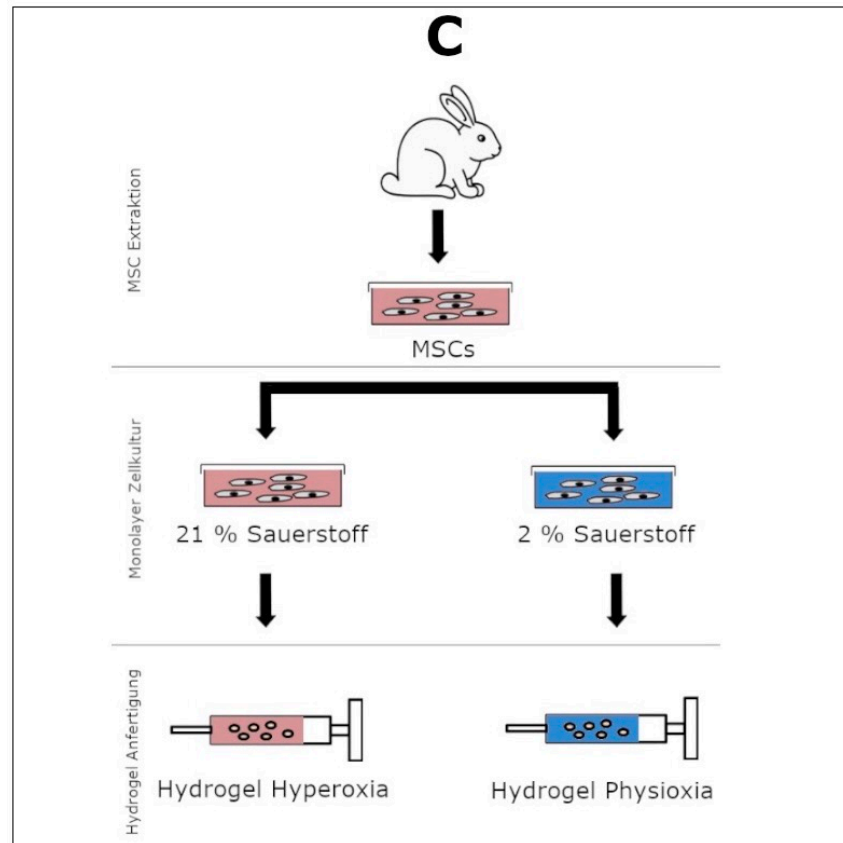


Abbildung 4: Darstellung des Versuchsaufbaus für A: das Post Trauma Modell B: das Early OA Modell C: Gewinnung von MSCs und Herstellung der Hydrogele. Das blaue Rechteck zeigt das in den Defekt eingebrachte Hydrogel. Das gelbe Rechteck zeigt einen leeren Defekt.

2.2.2 Chirurgische Behandlung

2.2.2.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Die Anästhesie der Weißen Neuseeländer Kaninchen erfolgte durch eine intragluteale Injektion von einem Gemisch aus 0,6ml/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (2%) und Ketaminhydrochlorid (10%). Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurden die Kaninchen mit einer Haarschneidemaschine ventral an beiden Knien und dorsal beidseits im Bereich der Beckenkämme rasiert. Für die Entnahme des Knochenmarks wurden die Kaninchen in Bauchlage auf dem Operationstisch positioniert. Für die folgenden Eingriffe am Kniegelenk befanden sich die Kaninchen in Rückenlage mit flektiertem Knie- und Hüftgelenk. Nach der Desinfektion des Operationsbereichs mit Ethanol erfolgte das sterile Abdecken mithilfe eines Lochtuchs.

2.2.2.2 Entnahme von Knochenmark

Die Inzision der Haut erfolgte unmittelbar über der Spina iliaca posterior superior. Die Präparation wurde anschließend bis zur Darstellung des Periosts des Darmbeinstachels fortgesetzt. Mit einer Kanüle wurde nun die Kompakta durchstoßen, sodass die Kanülenspitze für die Knochenmarksaspiration in der Markhöhle des Knochens zum Liegen kam. Danach wurde eine mit 0,5 mL Heparin befüllte 5mL Spritze auf die Kanüle gesetzt, um damit das Knochenmark zu aspirieren. Das Endvolumen des gesamten Aspirats betrug im Schnitt ca. 4mL. Für den Transport und die Weiterverarbeitung wurden die Spritzen steril versiegelt und auf Eis gelagert.

2.2.2.3 Erzeugung des osteochondralen Defekts

Der osteochondrale Defekt wurde mithilfe eines Zahnbohrers an der medialen Femurkondyle erzeugt. Hierfür wurde die Haut mittig über der Patella inzidiert, beginnend ca. 2cm proximal, bis ca. 2cm distal der Patella. Die darauffolgende mediale parapatellare Präparation erfolgte bei flektiertem Knie. Nach der Inzision der Gelenkkapsel sowie der Luxation der Patella nach lateral, erfolgte die Darstellung der medialen Femurkondyle. Der Bohrer wurde anschließend an der am weitesten posterior gelegenen, noch sichtbaren Stelle des Knorpels angesetzt. Der Durchmesser des Bohrkopfes betrug 2,3mm. Mit einer vorher angebrachten Markierung am Bohrkopf konnte die vorher festgelegte Bohrtiefe von 2mm eingehalten werden. Gebohrt wurde bei maximaler Drehzahl unter Zuhilfenahme der Kühlfunktion des Bohrers.

2.2.2.4 Implementierung des Hydrogels

In den osteochondralen Bohrdefekt wurde je nach Versuchsform, entweder sofort oder 6 Wochen nach der initialen Operation das mit mesenchymalen Stammzellen beladene HSA-HA-Hydrogel implantiert (im Falle der Kontrollgruppen wurde zellfreies Hydrogel verwendet). Das Gel befindet sich bereits für die Therapie von umschriebenen Knorpelläsionen des Kniegelenks mittels MACT unter Studienbedingungen in klinischer Anwendung (NOVOCART® Inject). Für die Implantation wurde eine sterile Kanüle auf die vorher befüllte Doppelkammerspritze aufgesetzt. Der Defekt wurde nun komplett mit Hydrogel befüllt. Überschüssiges Gel

wurde, falls erforderlich, mithilfe eines Dreieckstupfers entfernt. Nachdem das Aushärten des Gels abgewartet wurde, wurde das Kniegelenk des Kaninchens bewegt, um die Stabilität und Festigkeit des Transplantats im Defekt zu testen. Falls das Hydrogel im Gelenk nicht die gewünschte Festigkeit aufwies und somit nicht ausreichend im Defekt haftete, wurden die einzelnen Komponenten in einer 96-Well-Platte zum gelieren gebracht. Ein aus dieser gelierten Masse abgetrenntes Stück konnte dann mit einer Pinzette in den Defekt eingebracht werden. Nach der Naht der Gelenkkapsel und der Faszie wurde die Wunde mit resorbierbaren Fäden verschlossen.

2.2.2.5 Nachsorge und Gewebeentnahme

Direkt im Anschluss an die Operation wurden die Wunden der Tiere mit Sprühpflaster und Betaisodonasalbe versorgt. Tierpfleger überwachten die Kaninchen täglich. Falls notwendig wurden die Wunden erneut mit Betaisodonasalbe versorgt. 6, bzw. 12 Wochen nach der Hydrogelimplantation wurden die Versuchstiere mit einer intravenösen Injektion von Pentobarbital (0,5g/kg) beendet. Nach vorsichtiger Präparation der Femurkondylen erfolgte beidseits deren Entnahme. Anschließend wurde der Fixationsprozess mit 4%igem PFA gestartet.

2.2.3 Zellkultur und Zellaufbereitung

Folgende Bezeichnungen werden in diesem Kapitel verwendet:

- Kulturmedium: Gemisch aus 500ml DMEM (low glucose), 50ml bovines Serum, 5ml HEPES-Puffer, 5ml Pen-Strep und 100µl FGF
- Chondrogenes Medium: Gemisch aus 47,5ml DMEM (high glucose), 500µl Dexamethason, 500µl Ascorbat, 500µl ITS+3, 500µl Natriumpyruvat, 250µl TGF-β1
- Physiologische Sauerstoffbedingung: Bedingungen innerhalb des Heracell 150i Inkubators; 37°C, 5% CO₂, 2% O₂, 93% N₂
- Hyperoxische/ atmosphärische Sauerstoffbedingung: Bedingungen innerhalb des Heracell 240 Inkubators; 37°C, 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂

2.2.3.1 Extraktion von MSCs aus Knochenmark

Das in den sterilen Spritzen befindliche Gemisch aus Heparin und Knochenmark wurde mit 20G Kanülen in 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von jeweils 15ml Kulturmediums, wurde der gesamte Inhalt der Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 1700rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und das verbleibende Pellet mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 25µl der Zellsuspension, 100µl Essigsäure (4%) und 75µl des vorher verwendeten Kulturmediums in ein 500µl Eppendorf Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Auszählung erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren auf einer Zählkammer (Neubauer-improved). Je 40 Mio. Zellen wurden nun in 30ml Kulturmedium suspendiert und in 150cm² Kulturflaschen gegeben. Pro Spender wurden zwei solche Kulturflaschen präpariert. Somit konnte je eine Flasche unter physioxischen, und eine unter hyperoxischen Sauerstoffbedingungen gelagert werden.

2.2.3.2 Zellkultur von MSCs

Der erste Medienwechsel erfolgte nach 5 Tagen. Im Anschluss wurde das Medium dreimal pro Woche gewechselt, bis die Kolonien eine 90%ige Konfluenz erreicht hatten. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und in Abhängigkeit von der Zellzahl und des geplanten Versuchs in 1-5 neue 150cm² Kulturflaschen überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe von Tulloidinblau und anschließendem Auszählen auf einer Zählkammer (Neubauer-improved).

Expansion von MSCs

Ziel der Expansion war die Bestimmung der Auswirkungen, den unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen im Inkubator auf die Differenzierung von MSCs haben. Die anfängliche Zelldichte in den neuen Kulturflaschen betrug immer 3333 MSCs pro cm². Die Zellkultur wurde bis zur 4. Passage (P4) fortgeführt. Zwei 150cm² Kulturflaschen pro Spender wurden hierbei unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen bebrütet, zwei Weitere unter physioxischen Bedingungen. Zwischen den einzelnen Passagen erfolgte die Zellzahlbestimmung. Fotografien der Kulturen wurden jeweils zwei Tage nach der Überführung in neue Kulturflaschen angefertigt.

Zellzüchtung für Hydrogelanfertigung

Da für die Anfertigung des HSA-HA-Hydrogels pro ml 50 Mio. MSCs benötigt wurden, stand die Vervielfachung der vorhandenen preconditionierten Zellen im Vordergrund. Deshalb wurde, falls nötig, die Zellzahl pro cm² reduziert, während die Gesamtzahl der Kulturflaschen erhöht wurde. Die für die Operation benötigten Zellen entstammten den Passagen 1 und 2 und wurden ebenfalls entweder unter atmosphärischen, oder unter physioxischen Sauerstoffbedingungen kultiviert. Am Tag des Eingriffs wurden die MSCs trypsinisiert, zentrifugiert und anschließend mit DMEM (high glucose) resuspendiert. Die Zentrifugenröhrchen mit dem Medium-Zell-Gemisch wurden vor der Herstellung des Hydrogels auf Eis gelegt. Die Zellkonzentration im Gel betrug 50×10^6 Zellen/mL.

2.2.3.3 Pelletzellkultur von MSCs

Im Anschluss an die erste Passage (P0) wurden MSCs für die Expansion in einer Pelletzellkultur trypsinisiert und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und das verbleibende Pellet mit DMEM (high glucose) resuspendiert. 20µl des Gemischs wurden genutzt, um mithilfe von Trypan Blau die Zellzahl zu bestimmen. Basierend auf der absoluten Zellzahl wurden mit einer Verdrängerpipette je 400.000 MSCs in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Die Platte samt Inhalt wurde anschließend für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde erneut abpipettiert und 300µl chondrogenes Medium pro Well auf jedes Pellet gegeben. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche, bis die Pellets vier Wochen nach Beginn der Kultur für Fotografien und Analytik weiterverarbeitet wurden. Gelagert wurden die Kulturplatten in Inkubatoren unter physioxischen und hyperoxischen Sauerstoffbedingungen.

2.2.3.4 Herstellung und Funktion des zellbeladenen TETEC-Albumin-Hyaluronsäuregels

Herstellung:

Mithilfe eines Schüttelgeräts wurden 80µL/mL humanes Maleoylalbumin (HSA), 200µL/mL Hyaluronsäure und 400µL/mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (High

Glucose) in einem Zentrifugenröhrchen vermengt und bei 4°C in einem Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden 50×10^6 vorkonditionierte MSCs/mL mit 120µL/mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose) resuspendiert. Die Zellsuspension und das vorher angefertigte Hyaluronsäuregemisch wurden nun vermengt und in die dafür vorgesehene Kammer der Doppelkammerspritze gefüllt. Danach erfolgte die Befüllung der zweiten Kammer 200µL/mL Thiopolyethylenglykol (SH-PEG). Erneut wurde auf eine gründliche Durchmischung der beiden Komponenten vor der Befüllung der Spritze geachtet. Damit war die Herstellung abgeschlossen und das zellbeladene HSA-HA-Hydrogel bereit für die Injektion.

Funktion:

Die speziellen Eigenschaften der verwendeten Komponenten ermöglichen eine einfache Handhabung des Hydrogels. Durch eine chemische Verbindung zwischen dem aktivierten humanen Albumin und dem Polyethylenglykol formt sich aus den anfangs flüssigen Bestandteilen eine gelartige Masse, die sich in das umliegende Gewebe integriert (Abb. 5). Die Zellen bleiben durch die Quervernetzung der Komponenten im Gel und sollen gleichzeitig bei der Beibehaltung ihres Phänotyps unterstützt werden [71].

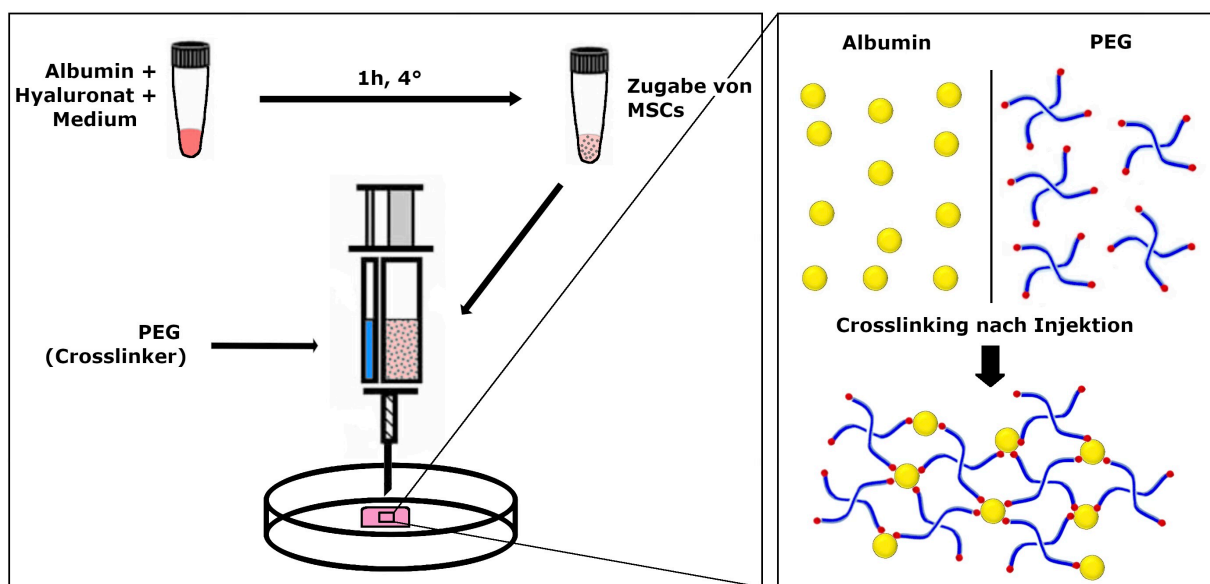


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hydrogelformation (modifiziert nach Benz et al., 2010) [71].

2.2.3.5 Zellkultur des zellbeladenen HSA-HA-Hydrogels

Überreste von Hydrogelen, die bei den Operationen verwendet wurden, wurden unter sterilen Bedingungen gesammelt und auf Eis gelagert. Nach Abschluss der OP begann die Kultivierung der mit MSCs beladenen Gele. Hierfür wurde eine in etwa gleiche Menge an Hydrogel in jeweils ein Well von zwei 24-Well-Platten gegeben. Nach Zugabe von chondrogenem Medium erfolgte die Lagerung der zwei Zellkulturplatten in unterschiedlichen Inkubatoren. Somit konnten die vom selben Spender stammenden zellbeladenen Hydrogele unter hyperoxischen und physioxischen Sauerstoffbedingungen bebrütet werden. Der Wechsel des Mediums erfolgte dreimal pro Woche. 4 Wochen nach Beginn der Kultur wurde diese beendet und die Hydrogele für die Auswertung weiterverarbeitet.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Gewebeaufbereitung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Femurkondylen

Die entnommenen Kondylen wurden umgehend in 4%igem PFA fixiert. Nach zweitägigem Verbleib in PFA und Lagerung bei 4°C wurde das Gewebe dreimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend folgte der Start der Dekalzifizierung der Proben mithilfe einer EDTA-Lösung. Die Lösung wurde dreimal pro Woche ausgetauscht. Nach zwei Wochen wurden überflüssige Knochenreste reseziert, um den Dekalzifizierungsvorgang zu beschleunigen. Sechs Wochen nach Beginn der Dekalzifizierung erfolgte nach 24 stündigem Verbleib in 0,1M Phosphatpuffer die Entwässerung der Kondylen. Hierfür durchliefen die Proben eine aufsteigende Saccharosereihe (10% Saccharose, 20% Saccharose, 30% Saccharose, 1:1 Gemisch aus gleichen Teilen 30% Saccharose und Einbettmedium, 100% Einbettmedium). Die Proben verblieben in jeder der angegebenen Konzentrationen für 24h.

Mithilfe von flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert. In einem Kryostaten wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 8µm angefertigt. Das geschnittene Gewebe wurde auf beschichtete Objektträger aufgedrückt und trocken aufbewahrt. Das auf den Objektträgern befindliche Adhäsiv bestand aus ca. 98% H₂O, 1,5% Gelatine, 0,375% Chromalaun und 0,125% Glutaraldehyd.

Pellets und zellbesetzte Hydrogele

Die Aufbereitung der Pellets und der zellbesetzten Hydrogelen unterschied sich nur unwesentlich von der der Femurkondylen. Sie verblieben kürzer in PFA und den Lösungen der Saccharosereihe. Statt 24h verweilten sowohl die Pellets, als auch das zellbesetzte Hydrogel nur jeweils eine Stunde in den einzelnen Fixansmitteln. Die Anfertigung der Gefrierschnitte unterschied sich dabei nicht.

2.2.4.2 Safranin-O/ Fast-Green Färbung

Als kationische Färbung bindet Safranin-O an Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Diese Eigenschaft resultiert in einer Rotfärbung des basophilen Gelenkknorpels. Die Gegenfärbung mit Fast Green sorgt dabei für einen guten Kontrast zwischen Knorpel und dem eosinophilen, subchondralen Knochen, da dieser sich durch seinen Reichtum an Kollagen Typ I grün färbt [72]. Für die Anfertigung der Färbung durchliefen die Gefrierschnitte mehrere Schritte. Nach dem Verbleib der Schnitte in destilliertem Wasser für eine Minute, wurden sie für 6 Minuten in einer Hämatoxilin-Lösung belassen und anschließend in Acid Alkohol getaucht. Daraufhin verblieben die Schnitte 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser und danach 4 Minuten in einer 0,02%igen Fast Green Lösung. Nach dreimaligem Eintauchen in 1%iger Essigsäure und 6 Minuten in einer 1%igen Safranin-O Lösung wurden die nun gefärbten Gefrierschnitte mit Propanol entwässert. Mithilfe eines Eindeckmediums wurden das frisch gefärbte Gewebe eingedeckt.

2.2.4.3 DMMB (1,9-Dimethyl-Methylenblau) Färbung

Für die Darstellung von sulfatierten Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix des Knorpels, wurde eine DMMB-Färbung verwendet. Bei der Bindung des Farbstoffs an die negativ geladenen Sulfatgruppen kommt es zur Anreicherung der Farbmoleküle und damit zur Verschiebung des Absorptionsmaximums [73,74]. Das Gewebe erscheint nun an glykosaminoglykanreichen Stellen purpurfarben. Die restlichen Anteile der Gefrierschnitte sind blau gefärbt. Für die Färbung wurde das Gewebe fünf Minuten in destilliertem Wasser- und anschließend für 10 Minuten in einer 0,1%igen DMMB Lösung belassen. Nach zweimaligem Eintauchen der Schnitte in destilliertem

Wasser wurden sie mithilfe von Propanol entwässert. Zum Eindecken des frisch gefärbten Gewebes wurde ein Eindeckmedium verwendet.

2.2.4.4 Kollagen Typ I und II Färbungen

Zum qualitativen Nachweis der Kollagen Typen I und II im Bereich des osteochondralen Defekts, wurde eine immunohistochemische Färbung verwendet. Für eine Verstärkung der Färbeintensität kam zusätzlich eine Avidin-Biotin-Komplex-Technik zum Einsatz. Die Affinität des Proteins Avidin zum Vitamin Biotin wird genutzt, um die Bindung zwischen Primär- und Sekundärantikörper leichter sichtbar zu machen. Die Oxidation des Substrats für den zugegebenen ABC-Komplex, der an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet, sorgt hierbei für eine intensivere Färbung [75].

Für die Anfertigung der Färbung durchliefen die Schnitte der Femurkondylen mehrere Schritte. Nachdem die Schnitte mit Waschpuffer rehydriert wurden, erfolgte die Blockierung endogener Peroxidasen. Hierfür verweilten die Schnitte in einer Lösung aus 80% PBS, 10% H₂O₂ und 10% Methanol für 30 Minuten. Nach der Zugabe von 150µl Pepsinlösung wurden die Proben erneut mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten in Blockingpuffer belassen, woraufhin 200µl des Primärantikörpers pro Objektträger zugegeben wurde. Für die Detektion von Kollagen Typ 1 wurde eine 1:200 Verdünnung eines monoklonalen Kollagen-I-Mausantikörpers in Blockingpuffer verwendet, während für die Detektion von Kollagen Typ 2 eine 1:100 Verdünnung eines monoklonalen Kollagen-II-Mausantikörpers in Blockingpuffer zum Einsatz kam. Kein Primärantikörper wurde zu den Negativkontrollen hinzugegeben. Die Schnitte wurden daraufhin über Nacht inkubiert. Nach der Entfernung von Primärantikörperrückständen mit Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper für 60 Minuten zu den Proben gegeben. Hierbei handelte es sich um einen mit Biotin konjugierten polyklonalen Anti-Maus-IgG-Ziegen-Antikörper. Anschließend blieben die Schnitte für 90 Minuten in einer ABC-Lösung, wurden mit Waschpuffer abgespült und mit einer DAB-Lösung entwickelt. Nachdem ein grau-brauner Farbumschlag makroskopisch sichtbar wurde, wurde die Reaktion mithilfe von Waschpuffer gestoppt. Die Schnitte wurden dann mit Propanol entwässert und mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.5 Nano-CT Untersuchung

12 Wochen nach der jeweiligen Intervention wurden die Kondylen des Early OA Modells entnommen und für 2 Tage in 4%igem PFA fixiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Proben in eine 70%ige Ethanollösung. Mittels eines Scanco μ CT Geräts wurden die behandelten medialen und die als intakte Kontrolle fungierenden lateralen Kondylen in zwei unterschiedlichen Auflösungen untersucht. Für die dreidimensionale Rekonstruktion der Proben und die Messung der Knorpeldicke wurde eine Röhrenspannung von 90kVp, eine Voxelgröße von 20 μ m, eine Integrationszeit von 1000ms und ein Röntgenstrom von 88 μ A als Einstellung verwendet. Für die Untersuchung der Knochenformation wurde eine höhere Auflösung mit 90 kVp, 3 μ m, 1500ms und 88 μ A genutzt.

Um die Dicke des regenerierten Knorpels zu quantifizieren, wurden 60 Messpunkte im geometrischen Zentrum des Defekts ausgewertet. Zur Segmentierung des Knorpels wurde anhand des Histogramms die untere Graustufenschwelle auf -162,2 und die obere Graustufenschwelle auf 106,5 gesetzt (Gauß-Filter: Sigma: 1,5, Support: 3). Anschließend wurden drei parallele, zweidimensionale Schnittbilder mittels ImageJ zur Messung der Dicke herangezogen. Zur Analyse wurde ein 2 x 5 x 5mm großer, den Defekt einschließender Bereich ausgewählt. Als Kontrolle fungierte Knorpel im gesunden Bereich der Kondyle (Abb. 6A).

Für die Messung der Knochendichte und dem Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen, wurde ein Bereich im Defekt direkt unterhalb der ehemaligen Knochen-Knorpel-Grenze mit einem Volumen von ca. 15.000 μ m³ analysiert (Abb. 7). Die Datenerhebung erfolgte mittels des Spongiosa Morphometrie Skripts von Scanco. Als Kontrolle diente die seitengleiche laterale Femurkondyle [76].

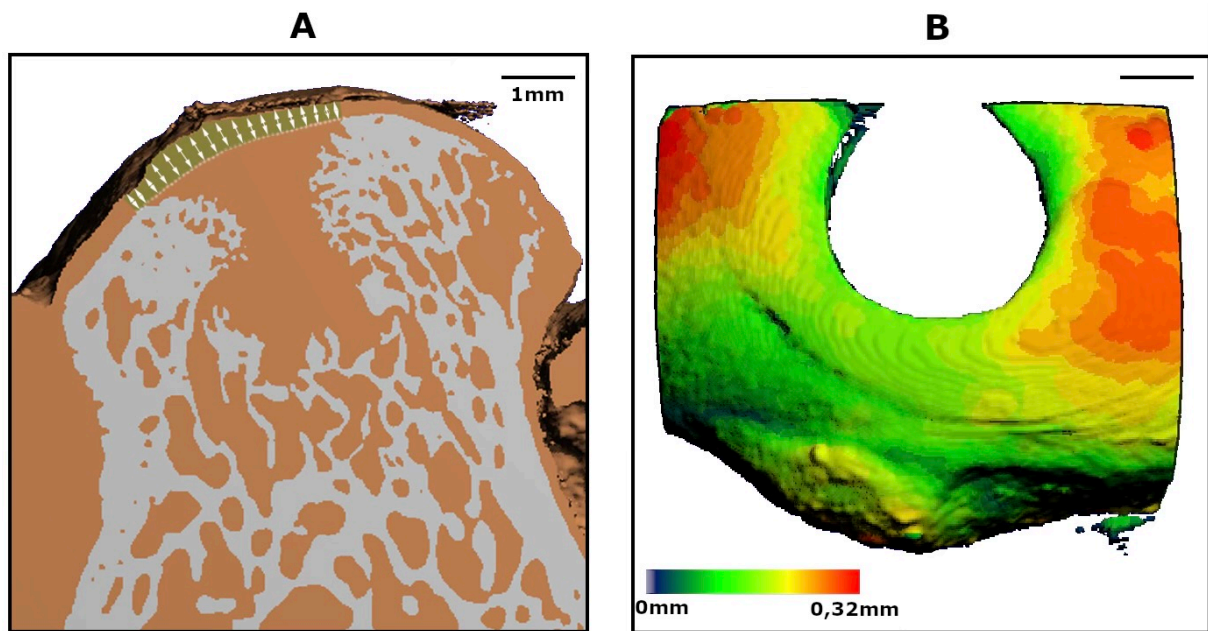


Abbildung 6: A: Coronare Rekonstruktion der medialen Femurkondyle mit Markierung der Knorpeldicke im Zentrum des Defekts (grüne Fläche)
 B: Kraniale Sicht auf die Oberfläche der Femurkondyle mit Höhenrelief.

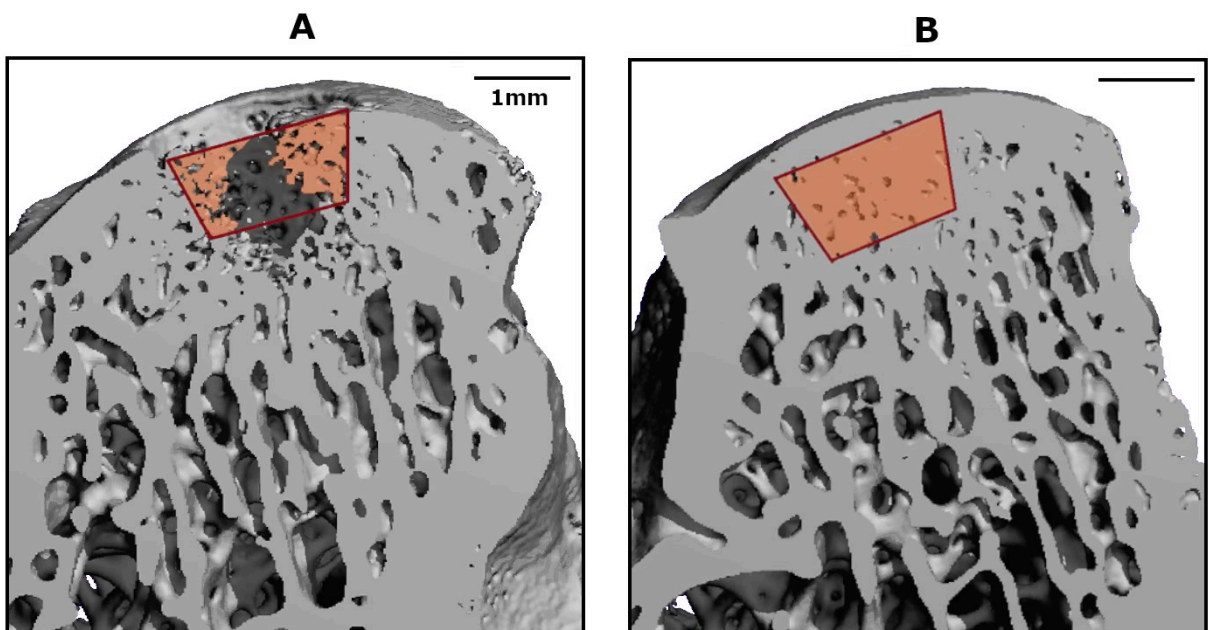


Abbildung 7: Coronare Rekonstruktion der medialen Femurkondyle mit Markierung zur Messung der Knochendichte im Defektbereich in einer Interventionsgruppe (A) und Kontrollgruppe (B).

2.2.6 Analytik

2.2.6.1 Evaluation gefärbter Gefrierschnitte

Für die Generierung von quantitativen Daten, wurden zwei Bewertungssysteme für die unterschiedlichen Interventionsgruppen verwendet. Die hierfür genutzten Gefrierschnitte waren mit Safranin-O/ Fast Green gefärbt. Um für unparteiische und objektive Bedingungen zu sorgen, wurde jede einzelne Probe verblindet und von drei unterschiedlichen Analysten bewertet. Pro Kondyle wurden fünf gefärbte Gefrierschnitte angefertigt, die in die jeweilige Beurteilung eingingen. Die Auswertung erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop.

2.2.6.1.1 OARSI-Grade

Um frühauftretende osteoarthrotische Degenerationen zu bewerten, die sich periläsionär, also direkt an den osteochondralen Defekt grenzend, entwickelt haben, wurde die OARSI-Grade verwendet. Die Note reicht von 0 bis 6, wobei eine höhere Note einen höheren Grad an Arthrose anzeigt (Abb. 8) [77]. Wichtig für die Beurteilung ist hierbei, dass nicht die Knorpelstruktur unmittelbar im Defekt, sondern an dessen Grenze bewertet wurde.

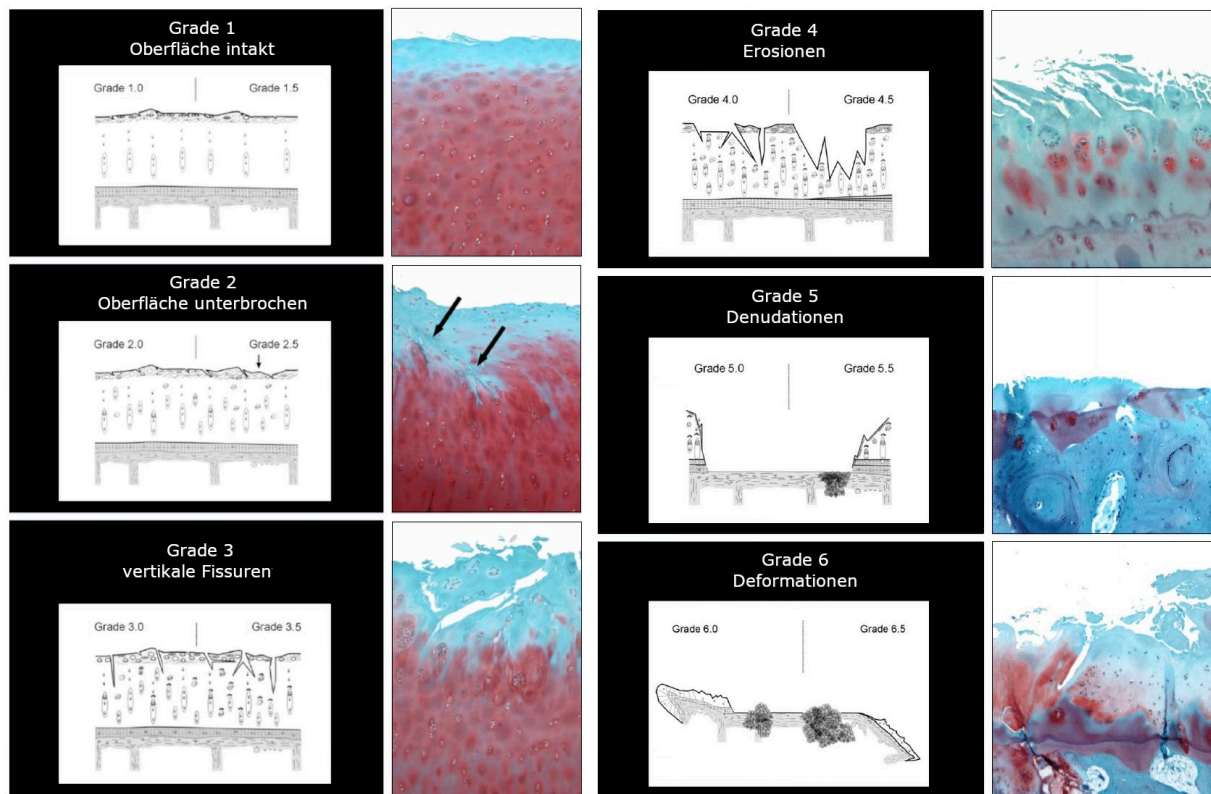


Abbildung 8: OARSI-Grade mit zugehörigem Safranin-O/ Fast Green gefärbtem Beispielbild (modifiziert nach Pritzker et al., 2006) [77].

2.2.6.1.2 Sellers-Score

Für die Bewertung des neugebildeten Gewebes innerhalb des osteochondralen Defekts, wurde eine Punktzahl nach Sellers verwendet (Abb. 9). Viele relevante Aspekte des Reparaturvorgangs werden in dem Score berücksichtigt. Darunter die Füllung des Defekts relativ zur Knorpeloberfläche, die Integration des neugebildeten Gewebes mit dem umgebenden Knorpel, die Färbung der Matrix mit Safranin-O, Die zelluläre Morphologie, die Architektur im gesamten Defekt, die Architektur der Oberfläche, die Neubildung des subchondralen Knochens und die Formation der Tidemark. So konnten sowohl die Gesamtpunktzahl, als auch die Teilfaktoren der Reparatur aller Proben miteinander verglichen werden. Die OARSI Grade reicht somit von 0 (gesunder hyaliner Gelenkknorpel) bis zu 31 (kein relevantes neugebildetes Gewebe) [78].

	1	0	1	2	3	4			
Filling of defect relative to surface of normal adjacent cartilage	125-111%	110-91%	90-76%	75-51%	50-26%	<25%			
	0	1	2	3					
Integration of repair tissue with surrounding articular cartilage	Normal continuity	Decreased cellularity	Lack of continuity on one side	Lack of continuity on both side					
	0	1	2	3	4				
Matrix staining Safranin-O	Normal	Slightly reduced	Moderately reduced	Substantially reduced	None				
	0	0	1	2	2	3	4	5	
Cellular morphology (above the tidemark)	Normal	Mostly round cells >75% of tissue with columns in radial zone	25-75% of tissue with columns in radial zone	<25% of tissue with columns in radial zone	50% round cells >75% of tissue with columns in radial zone	25-75% of tissue with columns in radial zone	<25% of tissue with columns in radial zone	Mostly spindle-shape cells (Fibroblast like)	
	0	1	2	3	4				
Architecture within entire defect (not including margins)	Normal	1-3 small voids	1-3 large voids	>3 large voids	Clefts or fibrillation				
	0	1	2	3					
Architecture of surface	Normal	Slight fibrillation	Moderate fibrillation	Severe fibrillation					
	0	1	2	3	4				
Percentage of new subchondral bone (New bone below tidemark) ¹	100-90%	89-75%	74-50%	49-25%	<25%				
New bone above tidemark (average percent of original thickness of repair cartilage) ²	100-90%	89-75%	74-50%	49-25%	<25%				
	0	1	2	3	4				
Formation of tidemark	complete	99-75%	74-50%	49-25%	<25%				

Abbildung 9: Für die Berechnung der Gesamtpunktzahl verwendete Tabelle mit Auführung der genauen Punktvergabe.

2.2.6.2 Quantitativer GAG-Assay

Der Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen der kultivierten Pellets, der Hydrogele und des Zellkulturüberstands konnte mit einem DMMB-Assay bestimmt werden. Ein Photometer ermittelte hierbei die metachromatischen Änderungen, die bei der Bindung des kationischen Farbstoffs an Sulfatgruppen auftraten. Dadurch war es möglich die Konzentration an GAGs in den jeweiligen Proben zu berechnen [73]. Um Fehler bei der Messung zu eliminieren und sonstige Proteine zu denaturieren, wurden die Proben am Tag vor dem Versuchsstart bei 60°C mit einem Papainverdaupuffer inkubiert. Eine Standardreihe mit Chondroitinsulfat wurde ebenfalls vorbereitet, der Puffer enthielt hier kein Papain. Zur Messung selbst wurden 25µl jedes Standards, bzw. jeder Probenverdünnung in eine 96 Wellplatte vorgelegt. Nach der Zugabe von 200µl DMMB erfolgte die Messung unmittelbar bei 575nm in einem Photometer.

2.2.6.3 Quantitativer DNA-Assay

Der DNA-Gehalt der kultivierten Pellets, der Hydrogele und des Zellkulturüberstands wurde mit einem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit bestimmt. Durch die Bindung von Picogreen an doppelsträngige DNA entsteht ein intensiv fluoreszierender Komplex aus Farbstoff und Nukleinsäure [79]. Mithilfe einer DNA-Standard-Reihe und eines Photometers konnten die DNA-Konzentrationen der jeweiligen Proben gemessen werden. Hierfür wurde ein TE-Puffer 20-fach mit sterilem, DNase-freiem Wasser verdünnt. Mit dem verdünnten TE-Puffer konnte anschließend eine 200-fache Verdünnung des PicoGreen dsDNA Reagenz hergestellt werden. Mithilfe eines Lambda-DNA-Standards konnte eine DNA-Standardkurve erstellt werden. Dafür wurden je 100µl der Standard-Reihe in eine 96-Well-Platte in den Konzentrationen 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 und 0 µg/ml vorgelegt. Die zu messenden DNA-Proben wurden mit Papain verdaut und mit dem verdünnten TE-Puffer 30-fach verdünnt. 100µl der Probenverdünnung wurden dann in eine 96-Well-Platte vorgelegt und jeweils 100µl des verdünnten PicoGreen dsDNA Reagenz zu jedem befüllten Well zugegeben. Nach dreiminütiger Inkubation in Dunkelheit erfolgte die Messung im Photometer bei einer Exzitation von 480nm und einer Emission von 520nm.

2.2.6.4 Messung von MSCs

Mithilfe des Programms ImageJ konnten die Länge, die Breite, der Durchmesser und der Flächeninhalt der Mesenchymalen Stammzellen bestimmt werden. Analysiert wurden Bilder der jeweiligen Stammzellpopulationen, die zwei Tage nach der Überführung in neue Kulturflaschen aufgenommen wurden. Der Zeitpunkt der Aufnahmen wurde so gewählt, dass die einzelnen Zellen klar zueinander abgrenzbar waren. Pro Spender wurden dabei 20 Zellen ausgewertet. Die Hälfte dieser Zellen wurde unter physioxischen, die andere Hälfte unter hyperoxischen Kulturbedingungen gelagert

2.2.6.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 7 (GraphPad, LaJolla, USA). Eine Normalverteilung wurde aufgrund des Ergebnisses des Shapiro-Wilk-Tests für $p < 0,05$ nicht angenommen und daher auf nicht parametrische statistische Tests für die Signifikanzbeurteilung zurückgegriffen. Für die Auswertung der Pellet GAG-, DNA- Nassgewichtdaten wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit Turkey Post-Hoc Test verwendet. Für die Auswertung der Sellers Score Parameter wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post-Hoc Test verwendet. Für den Vergleich zwischen physioxisch und hyperoxisch behandelten Defekten im Kaninchenmodell wurde ein gepaarter T-Test verwendet. Der Signifikanzwert p wurde mit $< 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 In Vitro

3.1.1 Auswirkung der Sauerstoffkonzentration auf Differenzierung der MSCs

Die typische spindelförmige, fibroblastische Morphologie der MSCs konnte unter beiden Sauerstoffkonzentrationen beobachtet werden (Abb. 10). Allerdings erschienen die physioxisch vorkonditionierten MSCs kleiner als MSCs, die unter hyperoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Eine Messung der Zellen bestätigte den Eindruck, wobei sich eine signifikant verkleinerte Zellfläche bei unter Physioxia vorkonditionierten MSCs im Vergleich zu hyperoxischen MSCs fand (Abb. 11). Der Größenunterschied wurde dabei umso deutlicher, je weiter fortgeschritten die Passage der kultivierten Zellen war (Abb. 10, P3 und P4).

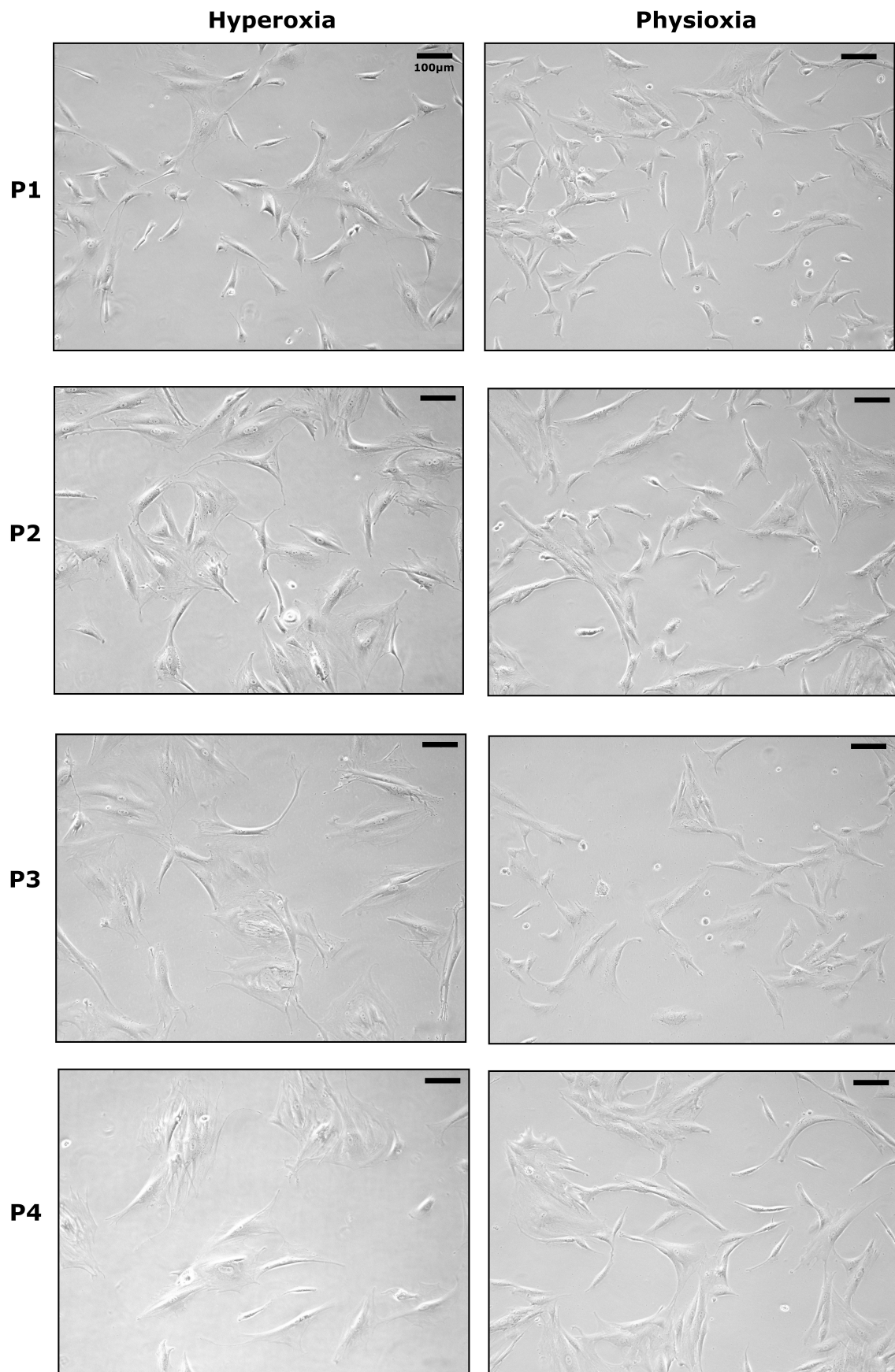


Abbildung 10: Repräsentative Bilder MSCs von unter Hyperoxia (linke Reihe) und Physioxia (rechte Reihe) vorkonditionierten MSCs; Passagen 1-4; Spender #62.

Des Weiteren resultiert die physioxische Vorkonditionierung in einer erhöhten Zellzahl über vier Passagen hinweg. Die Verdopplungszeit zwischen den Passagen war dabei im Vergleich zu den unter Hyperoxia kultivierten Zellen signifikant erniedrigt, während die kumulativen Populationsverdopplungen erhöht waren (Abb. 12). Ebenfalls zu beobachten war ein Sistieren des Wachstums der hyperoxischen MSCs in den meisten Populationen nach ungefähr 30 Tagen. Die Wachstumsrate der physioxischen MSCs unterlag dahingegen einem weniger starken Einfluss durch eine verlängerte Expansionszeit. Deutlich wird dies besonders in späteren Passagen. Als Ausdruck dessen zeigt sich in Abbildung 12 eine nahezu gleichbleibende Steigung der Kurve nach der zweiten Passage unter Physioxia. Unter Hyperoxia nahm die Verdopplungszeit hingegen kontinuierlich zu, bis sie schließlich stagnierte.

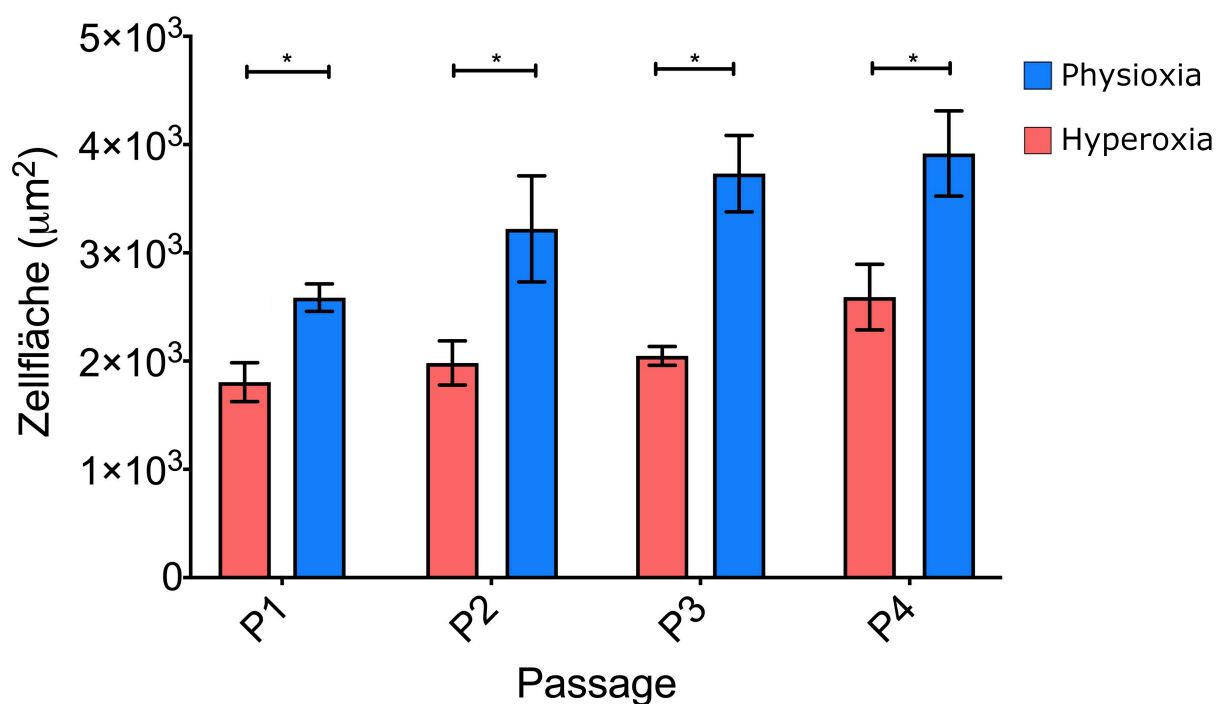


Abbildung 11: Zellfläche einzelner MSCs in Mikrophotographien; Passagen 1-4. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; $p < 0,05$; $n = 5$.

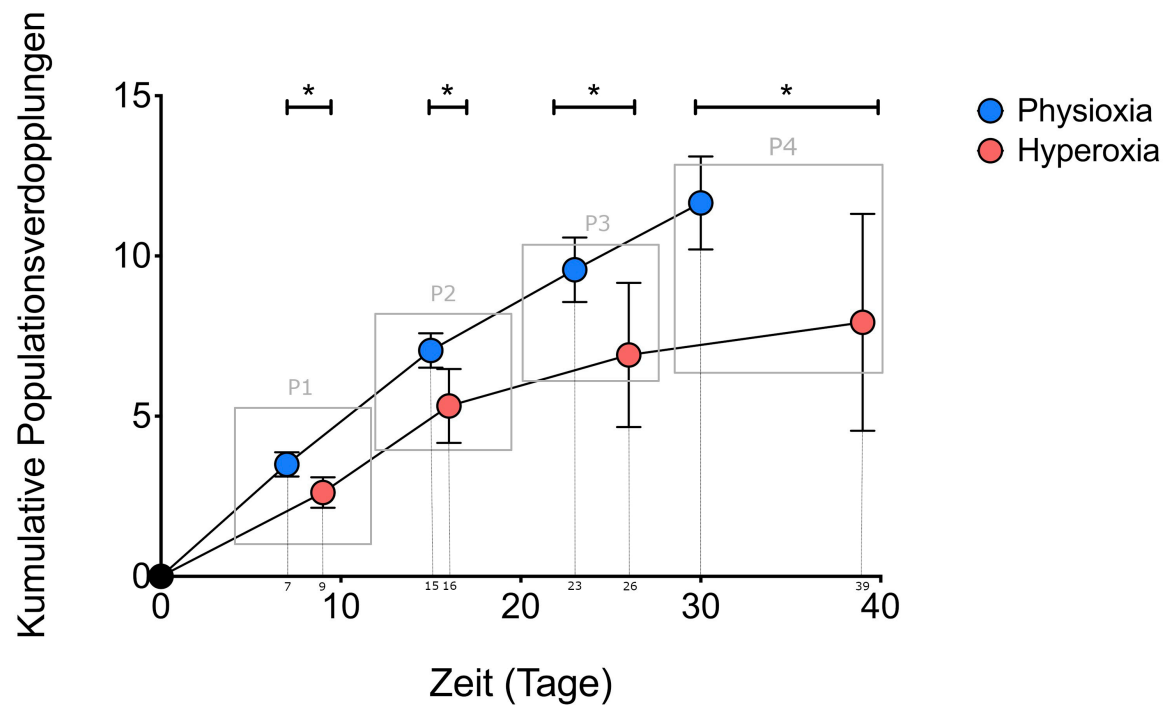


Abbildung 12: Kumulative Verdopplungen der MSC-Populationen unter Physioxia und Hyperoxia; Passagen 1-4 markiert durch graue Quadrate. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; $p < 0,05$; $n = 9$.

3.1.2 Analyse der Pelletzellkultur

3.1.2.1 Makroskopische Auswertung

Nach der Beseitigung des überschüssigen chondrogenen Mediums wurden die Pellets unter 4-facher Vergrößerung fotografiert. Hierbei zeigten sich Unterschiede beim Vergleich zwischen physioxisch- und hyperoxisch kultivierten Pellets, die aus den Zellen des gleichen Spenders gezüchtet wurden. Festgestellt werden konnte dabei eine Größenzunahme bei physioxischen- im Vergleich zu hyperoxischen Pellets (Abb. 13). Die makroskopischen Unterschiede zwischen hyperoxischen- und physioxischen Pellets waren dabei umso größer, je größer die Abweichung zwischen dem später gemessenen GAG-Gehalt der Pellets war.

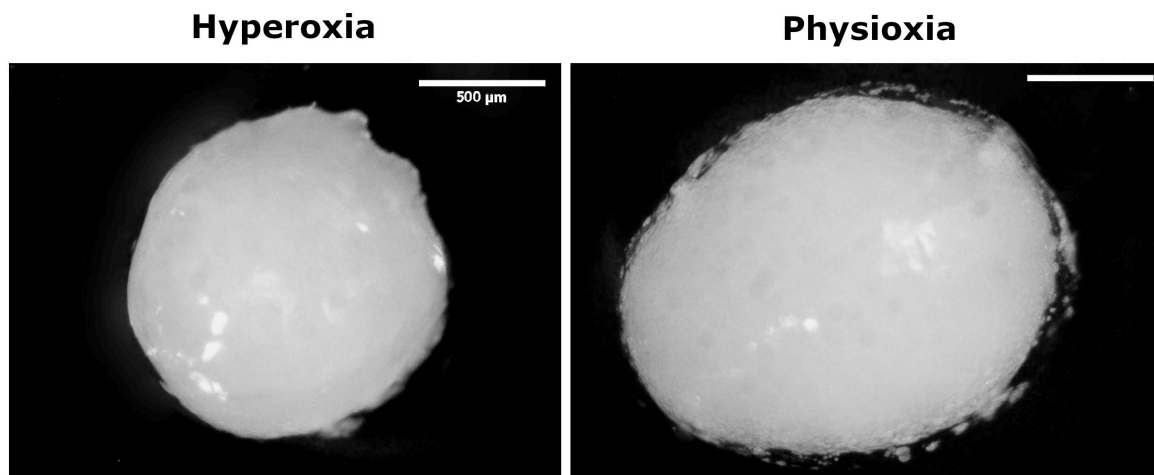


Abbildung 13: Repräsentative makroskopische Bilder chondrogener Pellets; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

3.1.2.2 Histologische Auswertung

Für die histologische Evaluation wurden unter anderem mit DMMB gefärbte Gefrierschnitte der Pellets verwendet. Somit konnte das Vorhandensein von sulfatierter Glykosaminoglykane und deren Verteilung in den Proben untersucht werden. SGAGs färben sich hier purpurfarben. Auffällig war dabei, dass vor allem physioxisch vorkonditionierte Pellets einen hohen Anteil und eine gleichmäßige Verteilung von sGAGs zeigten. Eine Größenzunahme konnte ähnlich wie bei der makroskopischen Beurteilung ebenfalls gefunden werden. Außerdem erschien der Abstand zwischen den einzelnen Zellen vermindert zu sein, was auf eine vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix schließen lässt (Abb. 14). Bei physioxischen Pellets, die in der darauffolgenden quantitativen Bestimmung der Glykosaminoglykane keinen bedeutenden Unterschied zu ihrer hyperoxischen Vergleichsgruppe fanden, konnten allerdings keine eindeutig sichtbaren Unterschiede gefunden werden.

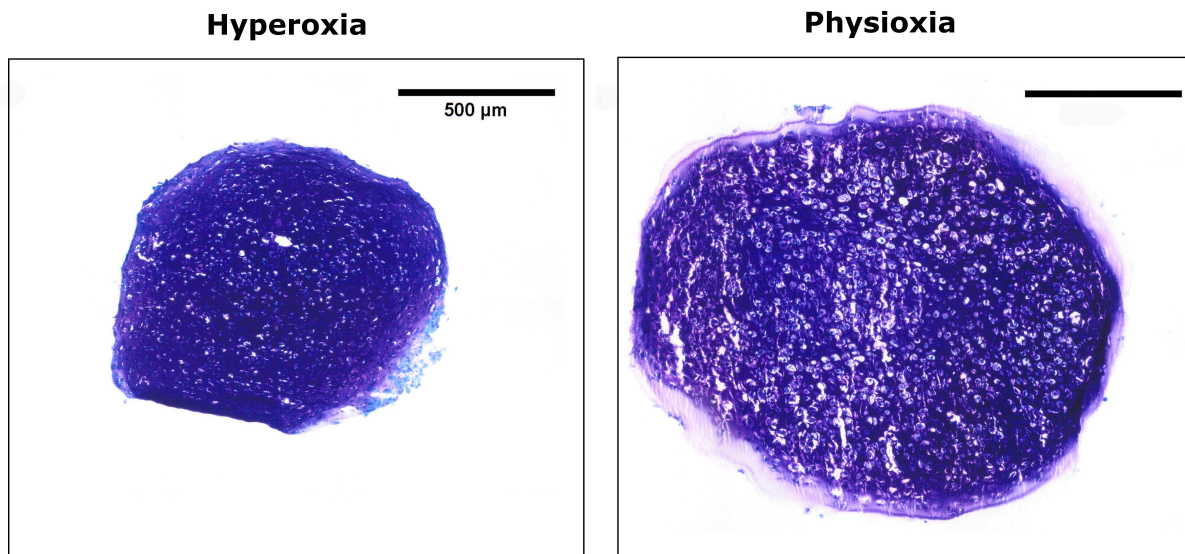


Abbildung 14: Repräsentative Bilder DMMB gefärbter chondrogener Pellets; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

Neben klassischen Färbemethoden fanden auch immunhistochemische Nachweise von Kollagen I und Kollagen II Anwendung. Der Gehalt an Kollagen I und Kollagen II gibt dabei Aufschluss darüber, ob es sich bei dem gebildeten Gewebe um hyalinen Knorpel oder um Faserknorpel handelt. Ein hoher Anteil an Kollagen II in der Färbung spricht dabei für hyalinen Knorpel, während es sich beim Vorhandensein von Kollagen I und Kollagen II eher um Faserknorpel handelt.

Bei der Bestimmung von Kollagen II fand sich sowohl bei unter Hyperoxia- als auch bei unter Physioxia kultivierten Pellets eine typische bräunliche Graufärbung des Gewebes. Unter Hyperoxia fand sich eine diffusere Verteilung von Kollagen II. Insgesamt erschien die Färbung bei physioxischen Pellets intensiver, weshalb von einer verstärkten Bildung von Kollagen Typ II ausgegangen werden kann (Abb. 15).

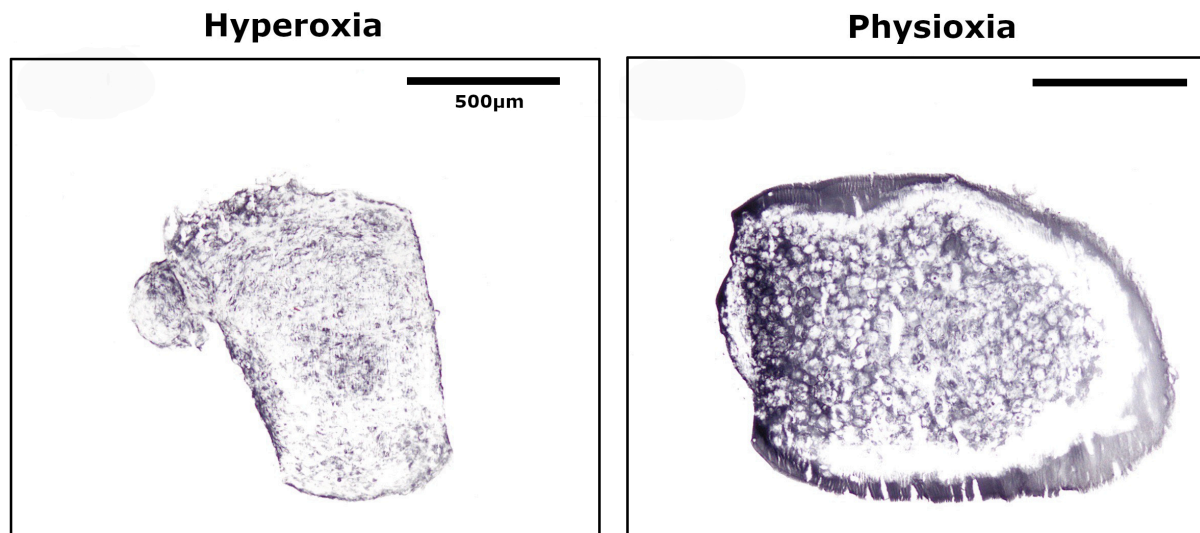


Abbildung 15: Repräsentative Bilder immunhistologisch nach Kollagen II gefärbter chondrogener Pellets; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

Im Vergleich zum reichlich im Gewebe vorhandenem Kollagen II findet sich unter beiden Sauerstoffbedingungen kaum Kollagen I. Es zeigten sich hier nur vereinzelt bräunliche Graufärbungen. Die sichtbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen waren vernachlässigbar klein (Abb. 16).

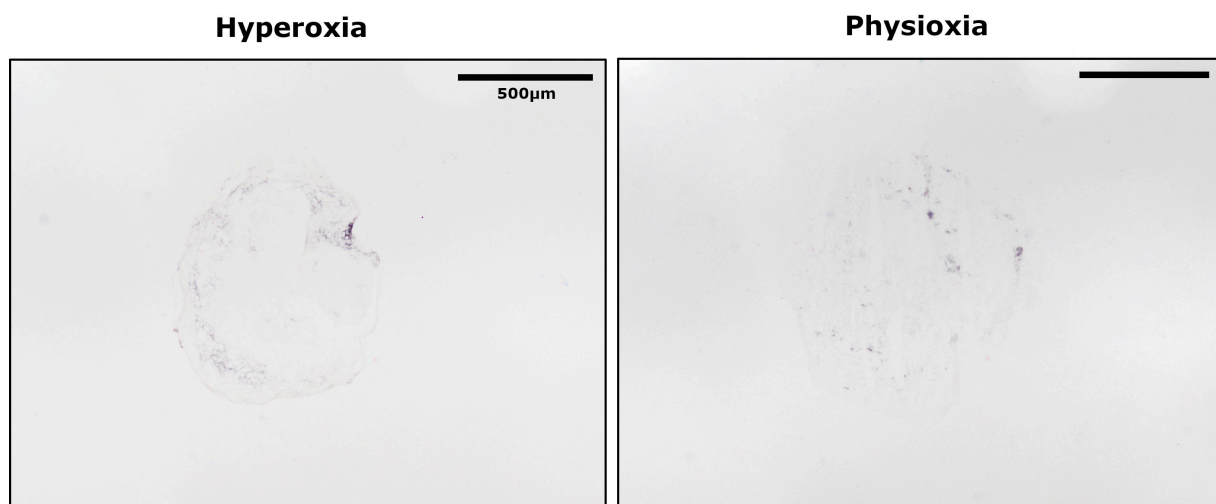


Abbildung 16: Repräsentative Bilder immunhistologisch nach Kollagen I gefärbter chondrogener Pellets; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

3.1.2.3 Glykosaminoglykangehalt und Nassgewicht

Der Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAGs) wurde mittels eines DMMB-Assays für die Pellets des jeweiligen Spenders gemessen. Dabei zeigten die physioxischen Zellkulturen im Durchschnitt einen leicht erhöhten, jedoch nicht signifikant veränderten sGAG-Gehalt pro Pellet. In Bezug auf das gemessene Nassgewicht fanden sich mit dem Glykosaminoglykangehalt im Einklang stehend ebenfalls höhere Werte für physioxisch gezüchtete MSCs im Vergleich zu hyperoxischen Bedingungen. Auffällig bei Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Proben war, dass sich die Reaktion auf den niedrigen Sauerstoffgehalt besonders bei Zellpopulationen des gleichen Spenders (paarige Proben) nachvollziehen ließ (Abb. 17 B und 18B). Hier zeigte sich die verstärkt ablaufende sGAG-Produktion und der Anstieg des Nassgewichts deutlicher als beim Vergleich mit den von unterschiedlichen Spendern stammenden unpaarigen Proben (Abb. 17 A und 18 A). Dennoch ließen sich Populationen finden, die gar nicht oder nur kaum auf die physioxischen Bedingungen ansprachen.

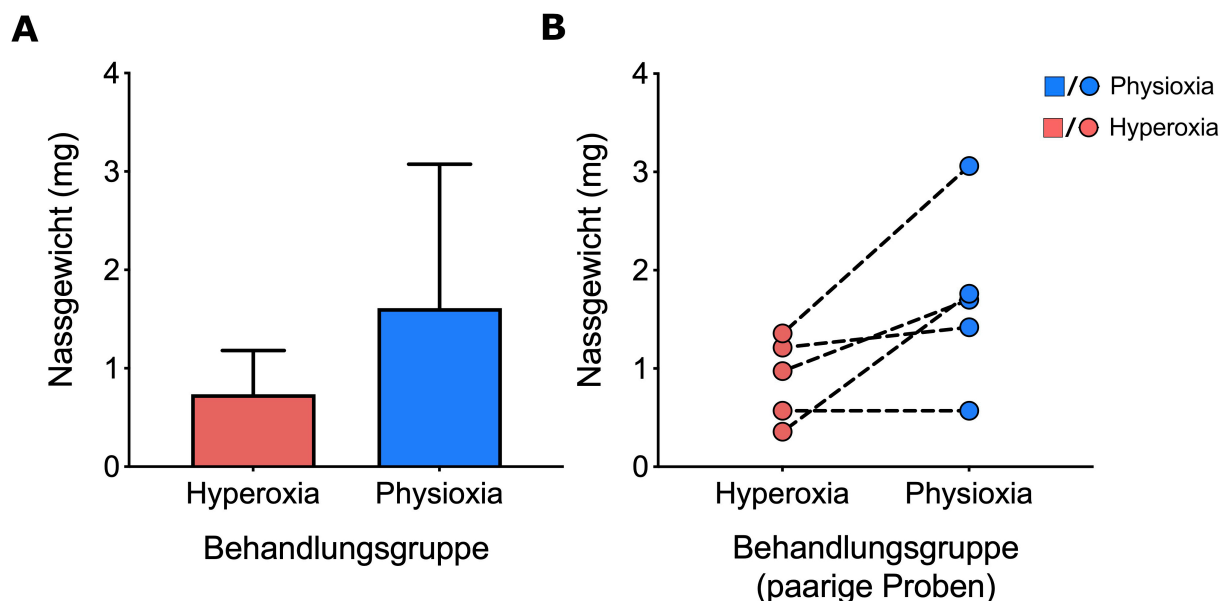


Abbildung 17: A: Nassgewicht einzelner Pellets in mg. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 7$ für Hyperoxia, bzw. $n = 12$ für Physioxia. B: Nassgewicht einzelner Pellets in mg; Pellets kultiviert aus Zellen des gleichen Spenders (paarige Proben mit Strichlinie verbunden); Werte repräsentieren Mittelwert; $n = 5$.

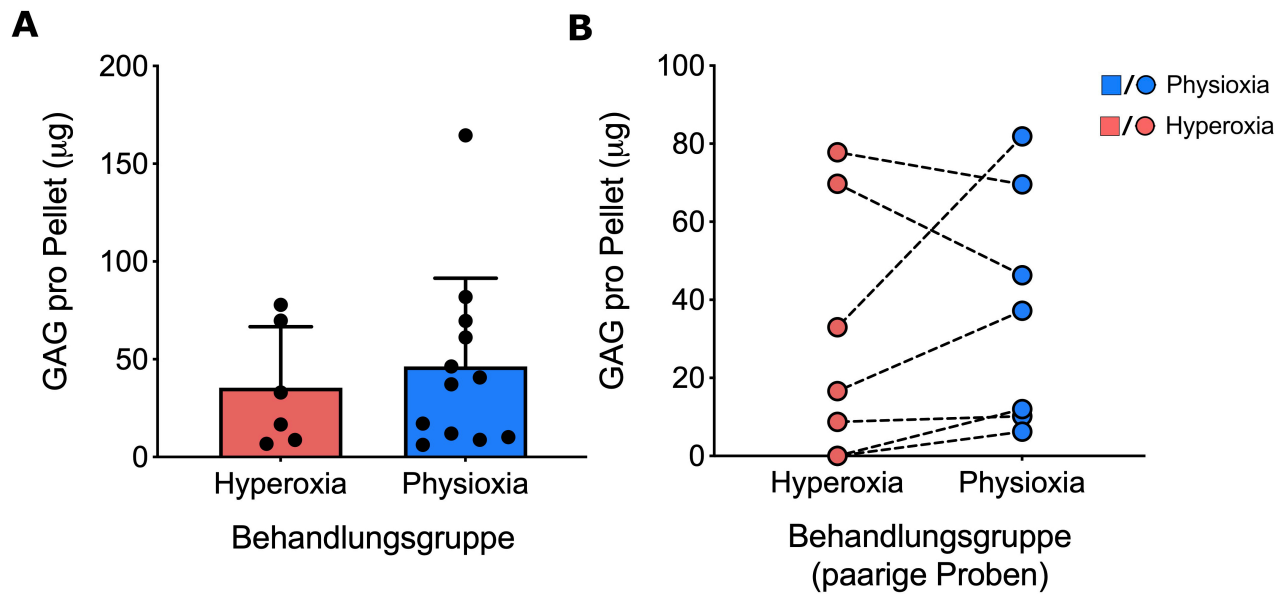


Abbildung 18: A: Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen pro Pellet in μg . Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung, bzw. Einzelwerte (schwarze Punkte); $n = 6$ für Hyperoxia, bzw. $n = 12$ für Physioxia.
 B: Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen pro Pellet in μg ; Pellets kultiviert aus Zellen des gleichen Spenders (paarige Proben mit Strichlinie verbunden); Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 7$.

3.1.2.4 DNA-Gehalt

Um den DNA-Gehalt der chondrogenen Pellets zu messen und die sGAG-Produktion in Relation zur Zellzahl zu setzen, wurde ein dsDNA-Assay eingesetzt. Verglichen mit hyperoxischen Pellets zeigte sich dabei ein mehr als doppelt so hoher DNA-Gehalt pro Pellet bei physioxischen Pellets (Abb. 14).

Bei der Betrachtung des GAG/DNA Wertes wird deutlich, dass das Verhältnis von Produktion der MSCs von Glykosaminoglykanen pro μg DNA in hyperoxischen Kulturen größer war als in physioxischen Kulturen. Dennoch zeigten hyperoxische Pellets eine weniger intensive Färbung mit DMMB. Die hier erhobenen GAG/DNA Werte entsprechen damit nicht den Ergebnissen der histologischen Auswertung.

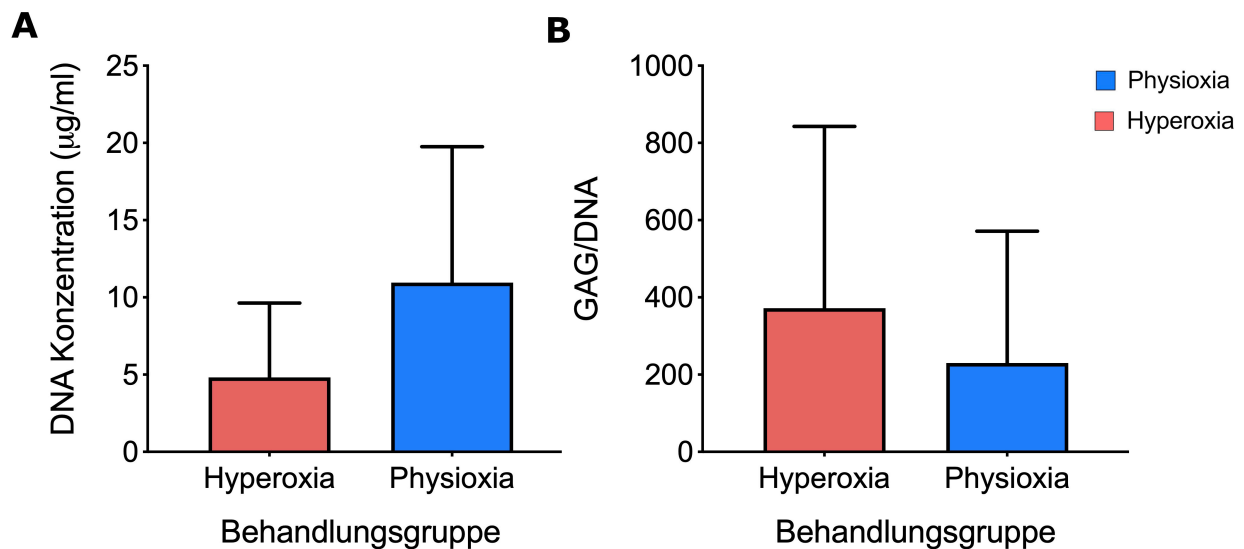


Abbildung 19 A: DNA-Konzentration pro Pellet in µg/ml. Werte repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6 für Hyperoxia, bzw. n = 12 für Physioxia. B: GAG/ DNA); Werte repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6 für Hyperoxia, bzw. n = 12 für Physioxia.

3.1.3 Analyse kultivierter Hydrogele

3.1.3.1 Histologische Auswertung

Analysiert wurden die Gefrierschnitte der Hydrogele unter anderem mittels einer DMMB-Färbung. Dadurch konnte neben der Verteilung der Zellen im jeweiligen Hydrogel auch das Vorhandensein von sulfatierten Glykosaminoglykanen untersucht werden. SGAGs färben sich hier purpurfarben. Die MSCs verteilten sich größtenteils gleichmäßig in den unterschiedlich kultivierten Hydrogelen. Dabei bildeten die meisten Zellen ein purpurn gefärbtes Territorium, das sich besonders in der Peripherie des Gels gut zur Umgebung abgrenzen lässt. In den physioxischen Hydrogelen war außerdem eine vermehrte Anordnung der MSCs zu Zellclustern zu beobachten. Zudem zeigte sich hier eine intensivere Purpurfärbung des Hydrogels (Abb. 20).

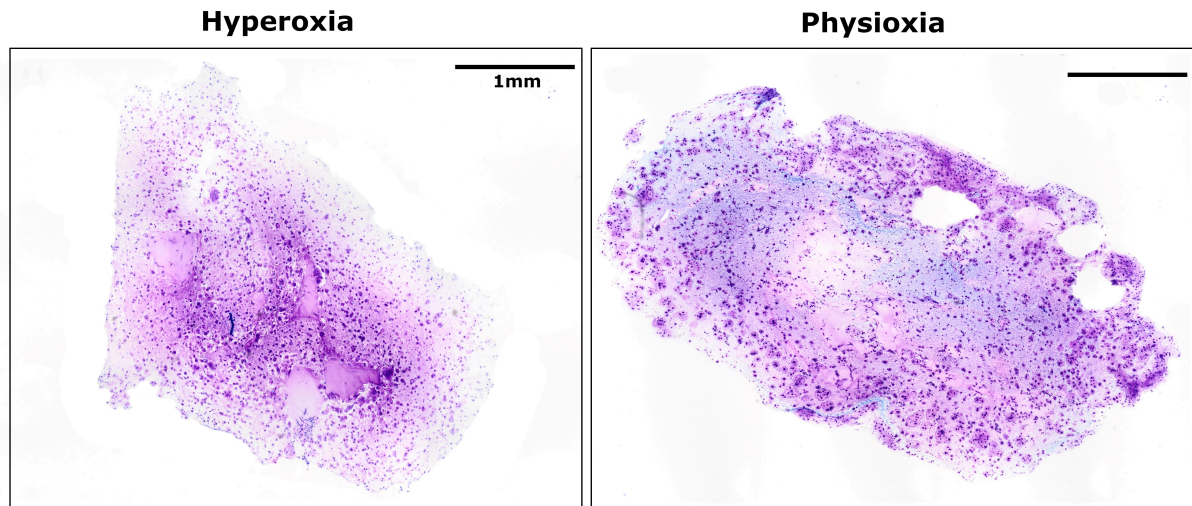


Abbildung 20: Repräsentative Bilder DMMB gefärbter Hydrogele; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

Der Nachweis von Kollagen II in den Hydrogelen erfolgte durch eine immunhistochemische Färbemethode. Unter beiden Sauerstoffbedingungen wurde Kollagen II exprimiert, das sich bräunlich grau gefärbt darstellte. Besonders in der Peripherie der Hydrogele ließ sich Kollagen II erkennen, wobei sich die höchste Konzentration in direkter Nachbarschaft der MSCs zeigte (Abb.21).

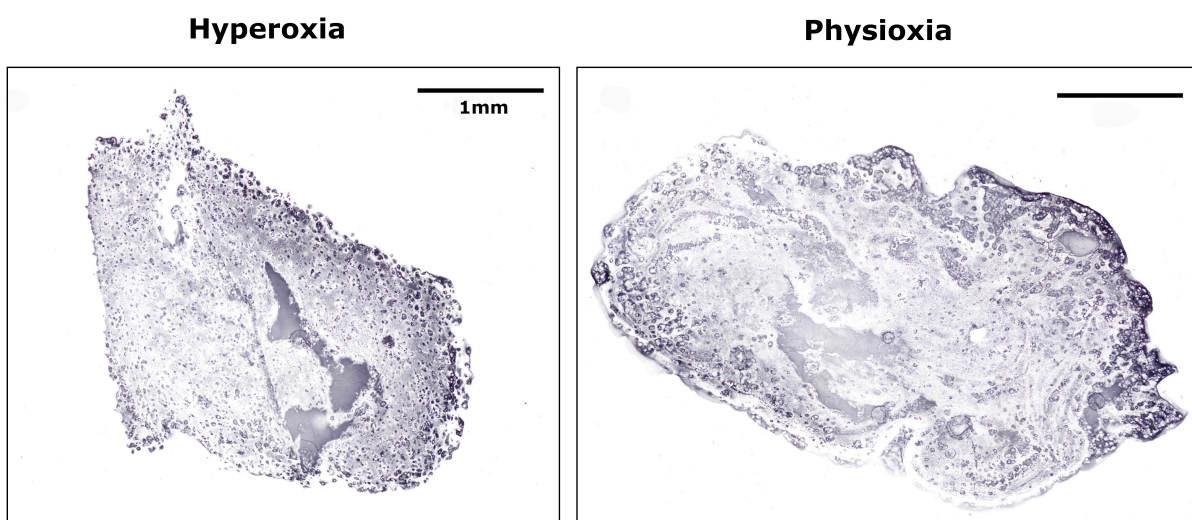


Abbildung 21: Repräsentative Bilder immunhistologisch nach Kollagen II gefärbter Hydrogele; kultiviert unter Hyperoxia (links) und Physioxia (rechts); Spender #62.

3.2 In Vivo

3.2.1 Makroskopische Auswertung

Bei der makroskopischen Betrachtung der mit MSC-Injektion behandelten medialen Femurkondylen zeigte sich sowohl bei den Post Trauma Gruppen als auch bei den Early OA Gruppen ein runder Defekt in der posterioren Hälfte der Kondyle. Der Durchmesser des Defekts betrug ca. 2,5mm. Das sich darin befindliche Reparaturgewebe war hier im Unterschied zu den Kontrollgruppen weißlich gefärbt. Das Regenerat und der umliegende Knorpel schienen lückenlos ineinander überzugehen, wobei die Füllung des Defekts meist auf dem gleichen Niveau des angrenzenden Gewebes lag (Abb. 22).

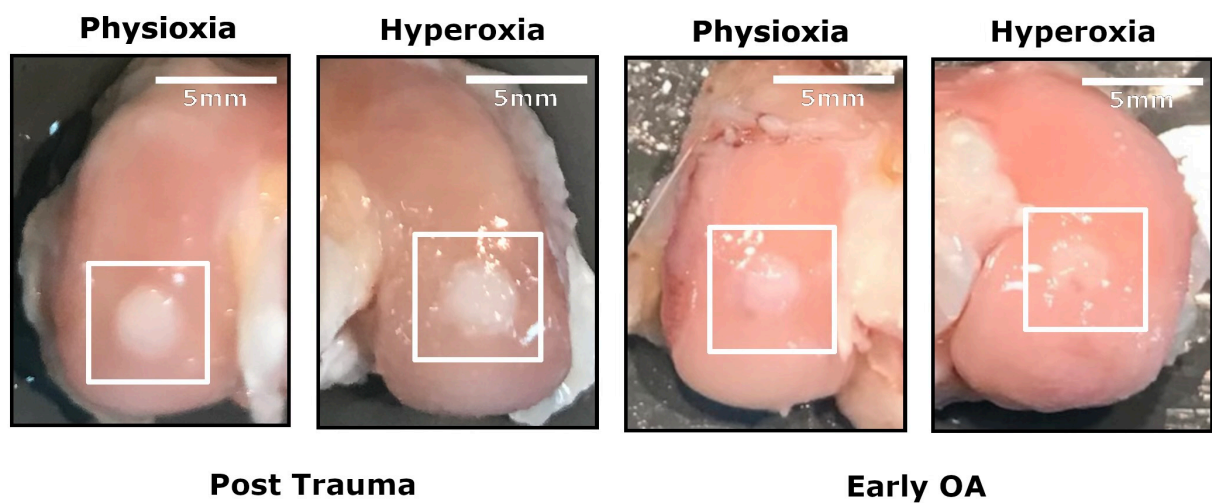


Abbildung 22: Makroskopische Bilder von mit Mesenchymalen Stammzellen behandelten osteochondralen Defekten der medialen Femurkondyle 12 Wochen post-OP; links: Post Trauma Gruppe unter Physioxia und Hyperoxia; rechts: Early OA Gruppe unter Physioxia und Hyperoxia; das weiße Quadrat markiert den Defekt.

In den Kontrollgruppen, die mit zellfreiem Hydrogel behandelten Kondylen und mit leerem Defekt, zeigte sich ein anderes Ergebnis. Die Färbung des Gewebes innerhalb des Defekts entsprach bei der ausgekratzten, leeren Kontrolle der Farbe des umliegenden Knorpels, während das zellfreie Hydrogel einen dunkleren Farbton hinterließ. Die Füllung der beiden Kontrolldefekte erreichte das Niveau des angrenzenden Gewebes meist nicht vollständig (Abb. 23).

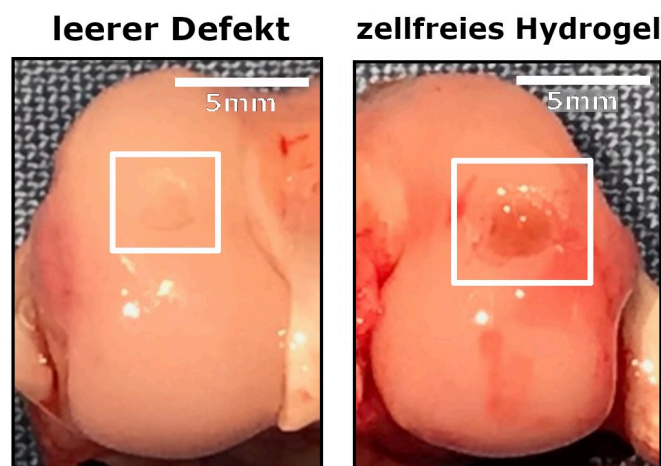


Abbildung 23: Makroskopische Bilder von osteochondralen Defekten der medialen Femurkondyle 6 Wochen post-OP; Post Trauma Kontrollgruppe; links: ausgekratzter, leerer Defekt; rechts: Injektion des zellfreien Hydrogels; das weiße Quadrat markiert den Defekt.

Unterschiede zwischen den 6- und 12 Wochen Proben ließen sich bei keinen der Interventionsgruppen finden.

3.2.2 Analyse osteoarthrotischer Veränderungen

Am posterioren Teil der medialen Femurkondyle der Versuchstiere wurden fokale osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von 2,3mm und einer Tiefe von 2mm kreiert. In der unmittelbaren Umgebung des Defekts fanden sich sowohl nach 6 als auch 12 Wochen nach der Intervention degenerative Veränderungen in Form von Fibrillationen des Knorpels, Anordnung der Zellen zu Clustern und Zellproliferation, Bildung von Fissuren und Zelltod (Abb. 24). Die auftretenden frühen arthrotischen Veränderungen wurden mithilfe der OARSI Grade bewertet. 6 und 12 Wochen post-

OP zeigte sich dabei ein durchschnittlicher Wert zwischen 3 und 4. Der Unterschied zu gesundem Knorpel war dabei signifikant (Abb. 25).

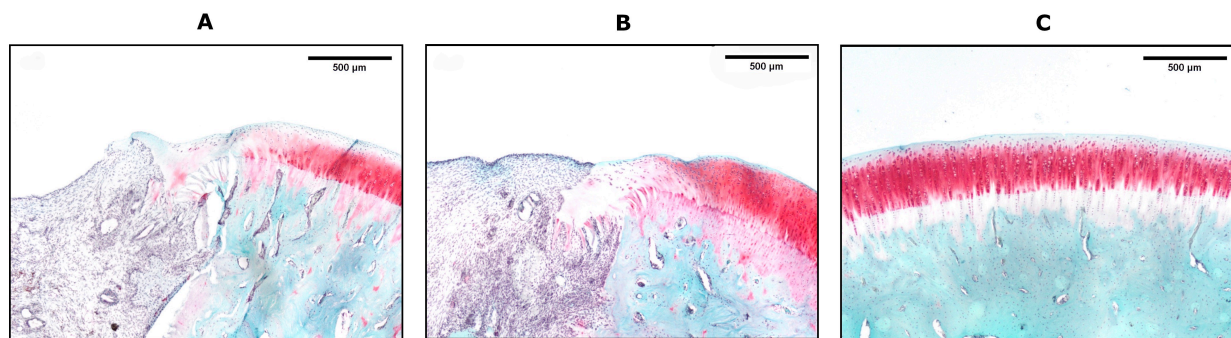


Abbildung 24: Repräsentative Safranin-O/ Fast Green gefärbte Gefrierschnitte der Randregion des Defekts 6 Wochen nach Defektkreation (A), 12 Wochen nach Defektkreation (B) und von gesundem Knorpel (C).

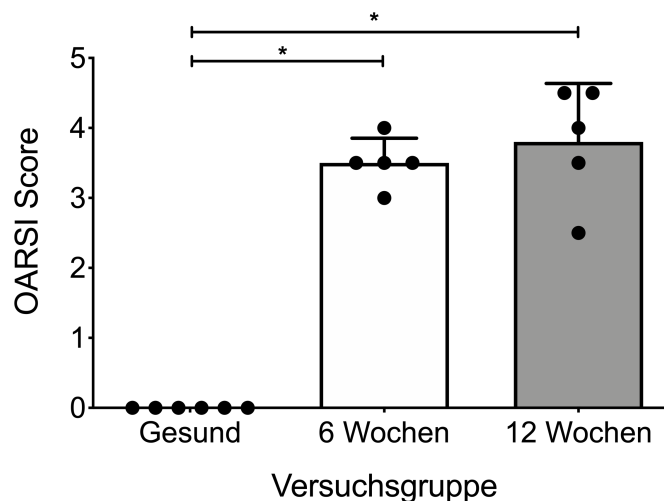


Abbildung 25: OARSI Score für Gesunden Knorpel und Defekte 6-, bzw. 12 Wochen nach Defektkreation im Post Trauma Aufbau. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 5$; $p < 0,05$.

Aufgrund der erhobenen Daten wurde das beschriebene Modell für die Evaluation der periläsionären, frühen arthrotischen Veränderungen in den verschiedenen Interventions- und Kontrollgruppen verwendet (siehe Kapitel 2.1). Da sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den degenerativen Veränderung 6 oder 12 Wochen nach Bohren des Defekts zeigte (Abb. 24 A und B; Abb. 25), wurde die kürzere Zeitspanne von 6 Wochen zwischen Defektkreation und MSC-Injektion für die darauffolgenden Experimente in den Early OA Gruppen gewählt. Bei den Post Trauma Gruppen erfolgte die Injektion hingegen ohne Zeitverzug direkt nach der Defektkreation.

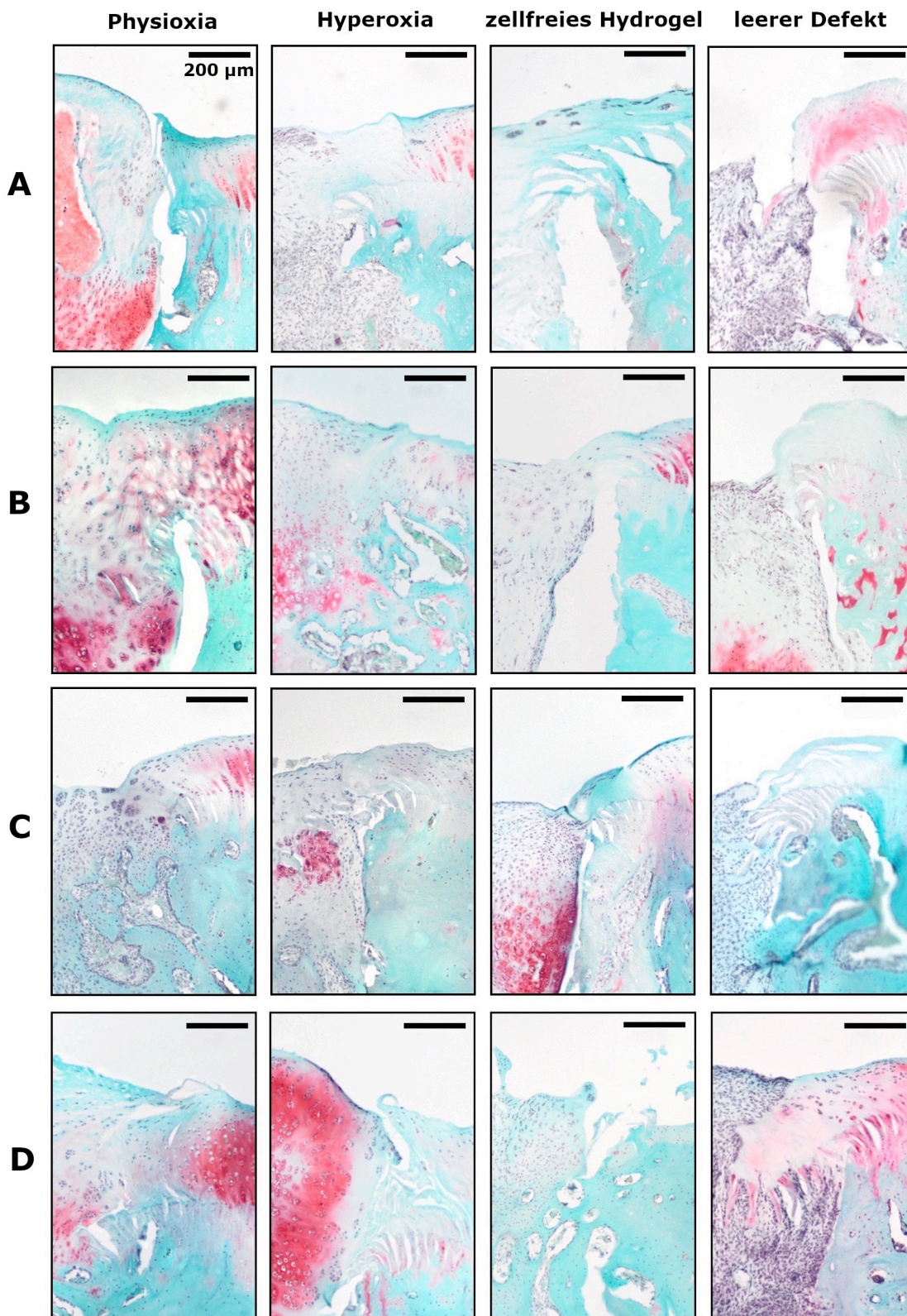


Abbildung 26: Repräsentative Safranin-O/ Fast Green gefärbte Gefrierschnitte der Randregion des kreierten Defekts. In der linken Bildhälfte neugeneriertes Gewebe, in der rechten Bildhälfte Übergang zum angrenzenden Knorpel und Knochen.
 A: Post Trauma 6 Wochen B: Post Trauma 12 Wochen C: Early OA 6 Wochen
 D: Early OA 12 Wochen.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen war auffällig, dass die mit MSCs behandelten Defekte nach 12 Wochen im Early-OA und Post Trauma Versuch eine niedrigere OARSI Grade und damit einen niedrigeren Grad an früher Arthrose aufwiesen als deren mit zellfreiem Hydrogel therapierten Kontrollgruppen. Kondylen mit ausgekratztem, leerem Defekt zeigten 12 Wochen nach dem Eingriff eine annähernd ähnliche OARSI Grade wie die Gruppen, die eine zellfreie Hydrogelinjektion erhielten.

Signifikante Unterschiede ließen sich dabei ausschließlich in den Post-Trauma Gruppen finden. Mit physioxischen MSCs behandelte Defekte zeigten hier eine signifikant niedrigere OARSI Grade verglichen mit den Kontrollgruppen 12 Wochen post-OP. Mit hyperoxischen MSCs behandelte Defekte unterschieden sich lediglich von leeren Defekten signifikant. 6 Wochen post-OP ließ sich bei mit zellfreiem Hydrogel behandelten Defekten eine signifikant erhöhte OARSI Grade im Vergleich zu den restlichen Gruppen finden.

Insgesamt ließ sich mit Vergrößerung der Zeitspanne zwischen Hydrogelinjektion und Gewebeentnahme von 6 auf 12 Wochen eine Erniedrigung der OARSI Grade und damit eine Abnahme der periläsionären, früharthrotischen Degenerationen bei allen mit mesenchymalen Stammzellen behandelten Defekten finden. Diese Tendenz zeigte sich sowohl im Early OA als auch im Post Trauma Versuch (Abb. 26).

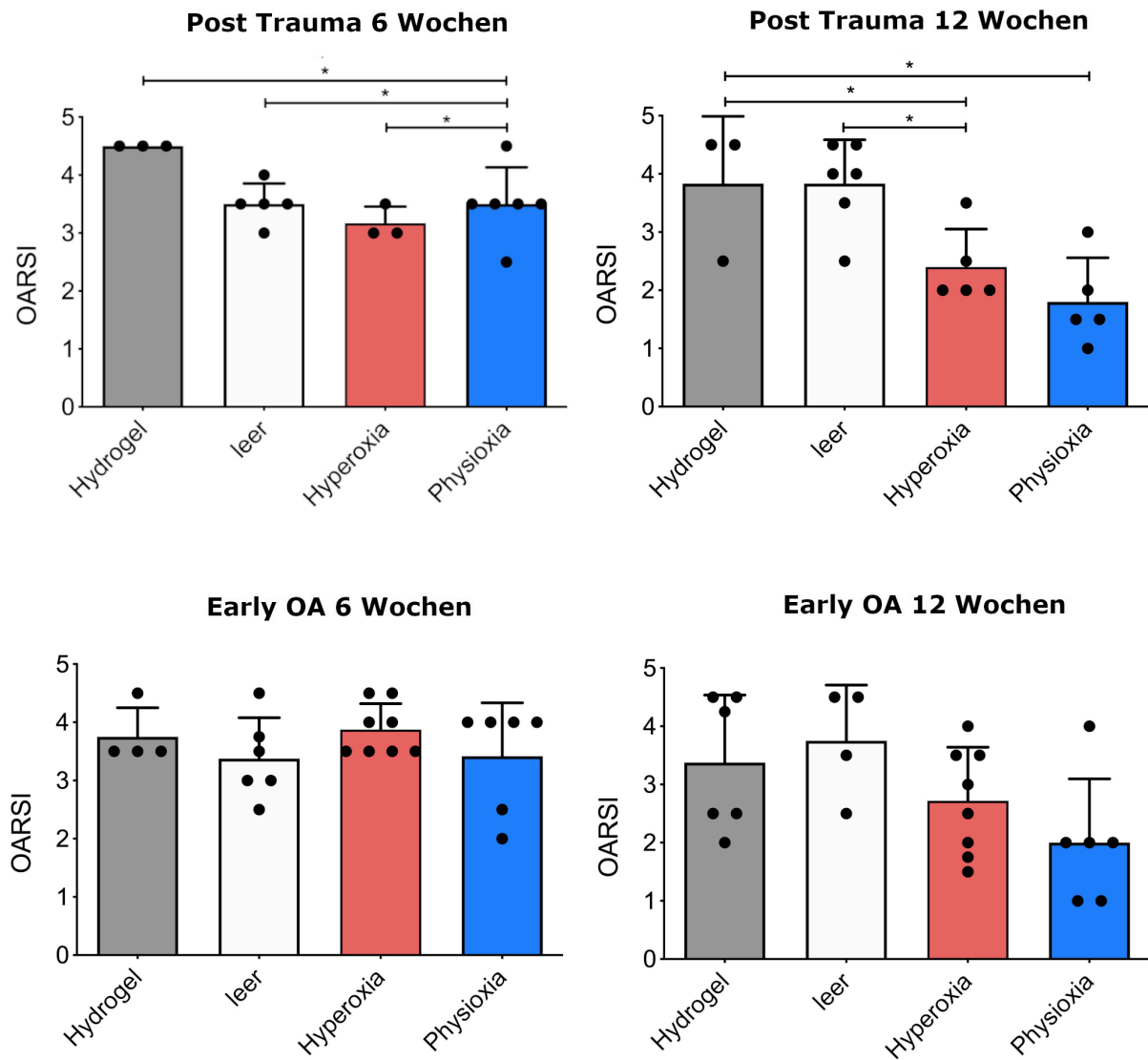


Abbildung 27: OARS I Scores der jeweiligen Vergleichsgruppen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$.

3.2.3 Analyse von neugebildetem Gewebe

3.2.3.1 Post Trauma

Versuchstiere, die mit mesenchymalen Stammzellen behandelt wurden, zeigten im Post Trauma Modell 12 Wochen nach der Zelinjektion eine Neuformation knorpelähnlichen Gewebes innerhalb des Defekts, das außerdem eine intensive Färbung mit Safranin-O vorwies. Im Gegensatz dazu zeigten mit zellfreiem Hydrogel behandelte und leere Defekte nach 12 Wochen faserknorpelartiges Gewebe und eine deutlich geminderte Färbintensität mit Safranin-O (Abb. 28). 6 Wochen postoperativ konnte zwar bei vereinzelt, mit Zellen behandelten Versuchsgruppen neugebildetes Gewebe gefunden werden, das bei Betrachtung der Zellmorphologie hyalinem Knorpel gleicht, insgesamt lassen sich die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu diesem Betrachtungszeitpunkt allerdings als minimal bezeichnen (Abb. 29).

Post Trauma 12 Wochen

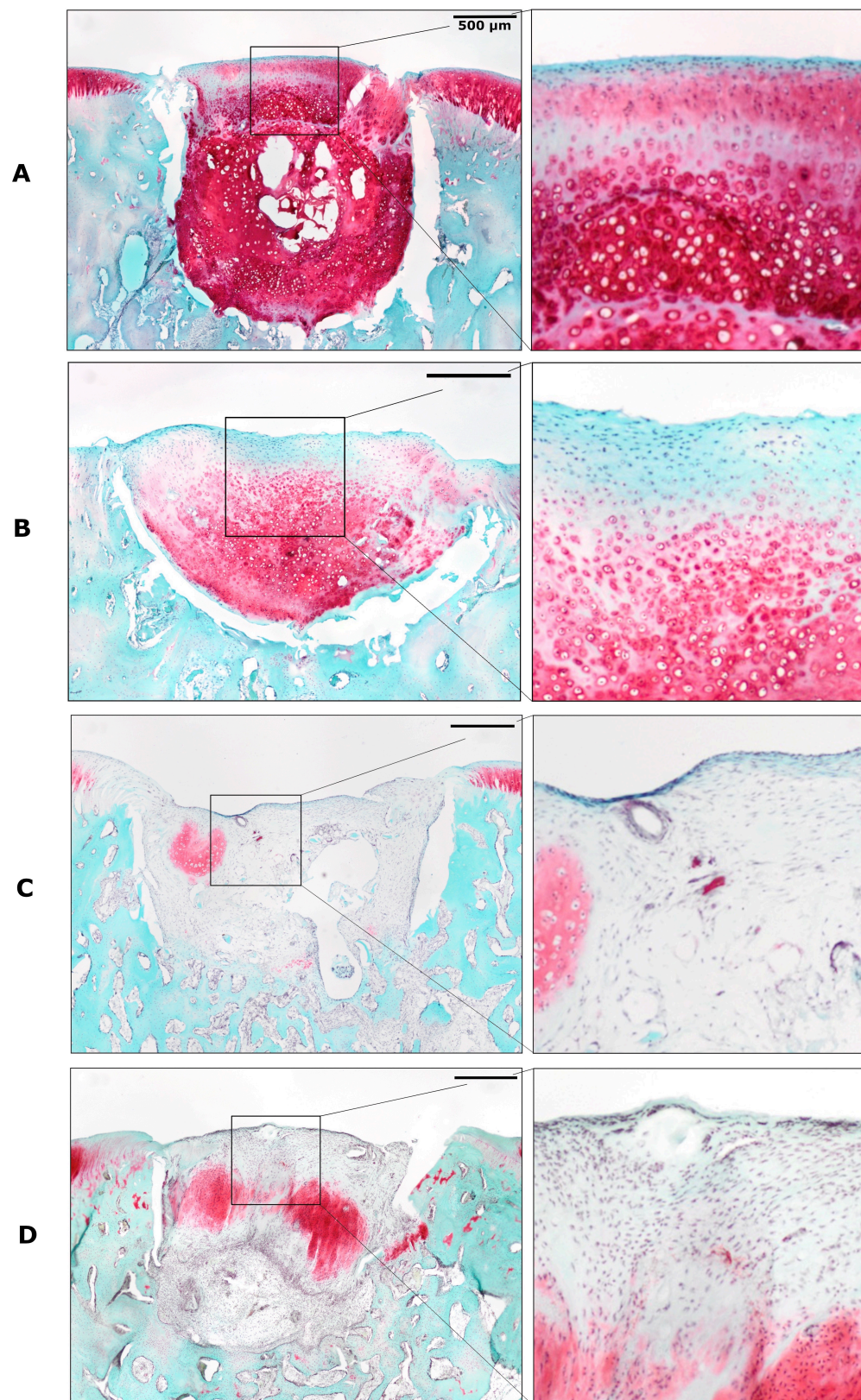


Abbildung 28: repräsentative Bilder Safranin-O/ Fast Green gefärbter Gefrierschnitte der Post Trauma Gruppe 12 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion (linke Reihe); Vergrößerung des mit einem schwarzen Quadrat markierten Bereichs (rechte Reihe).
 A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 1 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 2 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 3 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 4 im Versuchsaufbau).

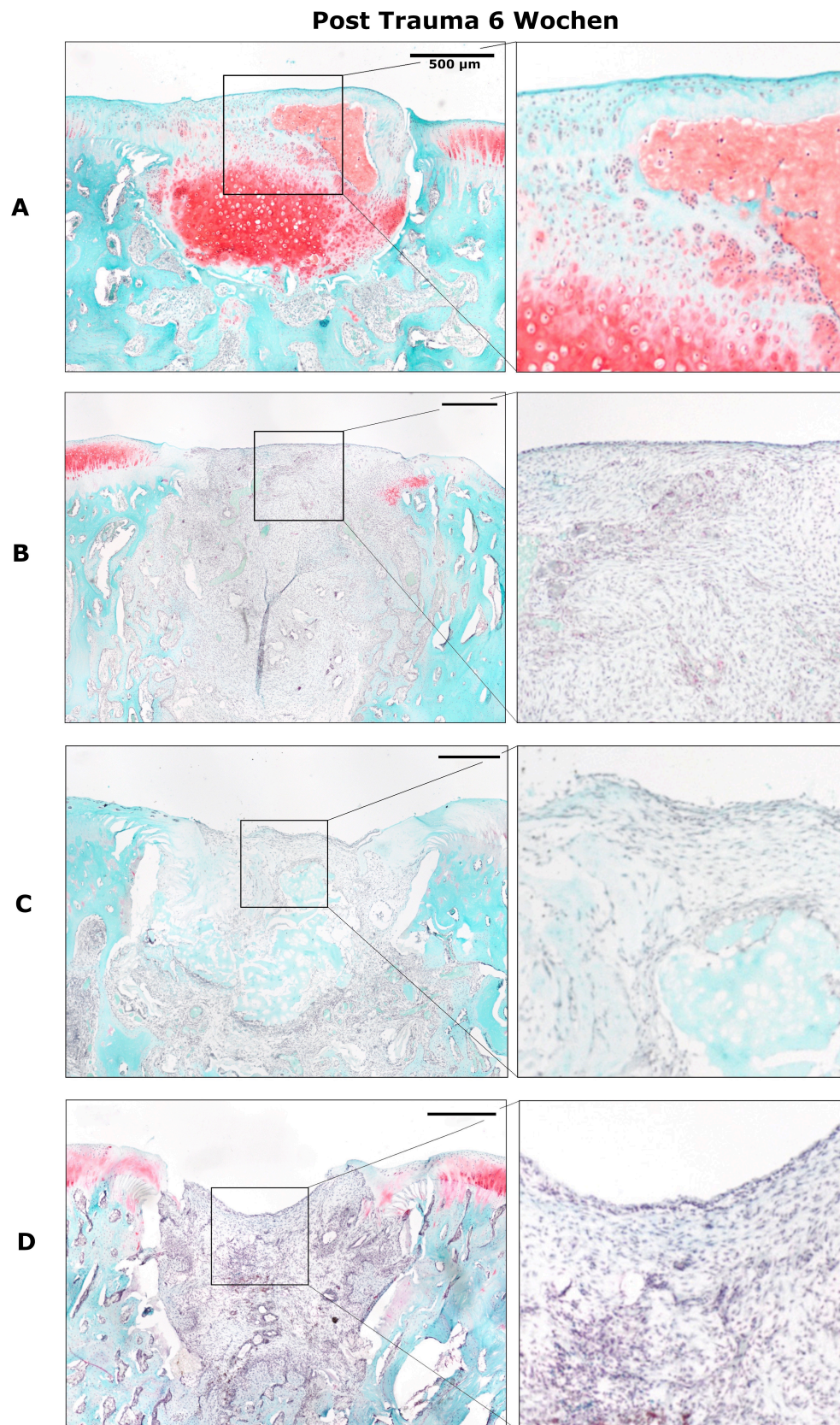


Abbildung 29: repräsentative Bilder Safranin-O/ Fast Green gefärbter Gefrierschnitte der Post Trauma Gruppe 6 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion (linke Reihe); Vergrößerung des mit einem schwarzen Quadrat markierten Bereichs (rechte Reihe).
 A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 1 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 2 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 3 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 4 im Versuchsaufbau).

Insgesamt zeigte sich nach 12 Wochen ein niedrigerer Sellers Score des neugebildeten Gewebes der mit MSC behandelten Defekte. Ein signifikanter Unterschied ließ sich beim Vergleich zwischen den mit physioxischen MSCs behandelten Gruppen und den ausgekratzen, bzw. mit zellfreiem Hydrogel behandelten Gruppen finden. Die Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs resultierte in der Regeneration des osteochondralen Defekts mit qualitativ hochwertigerem Knorpel. Die Resultate bei der Behandlung mit hyperoxisch- bzw. physioxisch vorkonditionierten Stammzellen wichen zwar voneinander ab, allerdings zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 30).

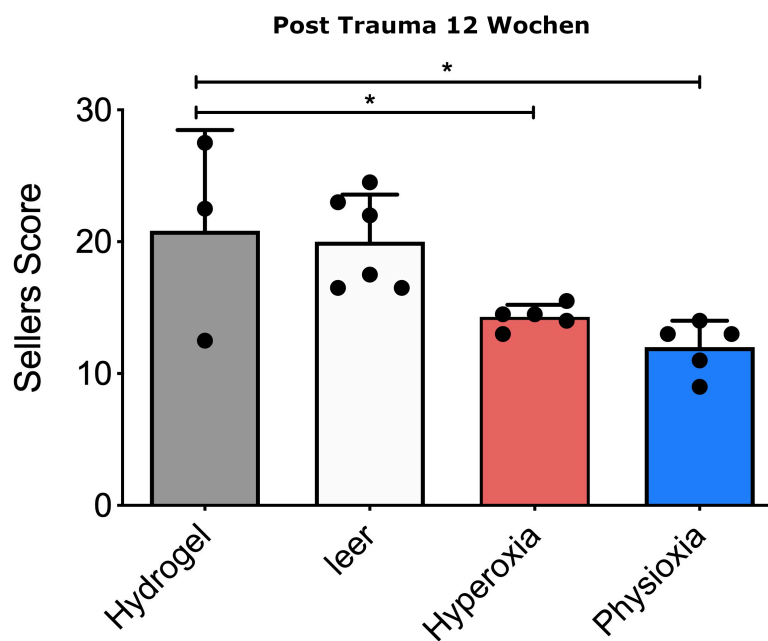


Abbildung 28: Sellers Scores der Post Trauma Gruppe 12 Wochen post-OP. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$.

6 Wochen post-OP ließen sich weniger starke Abweichungen zwischen den Gruppen und insgesamt höhere Scores finden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Vergleich zwischen den mit physioxischen MSCs behandelten- und den mit zellfreiem Hydrogel behandelten Defekten (Abb. 31).

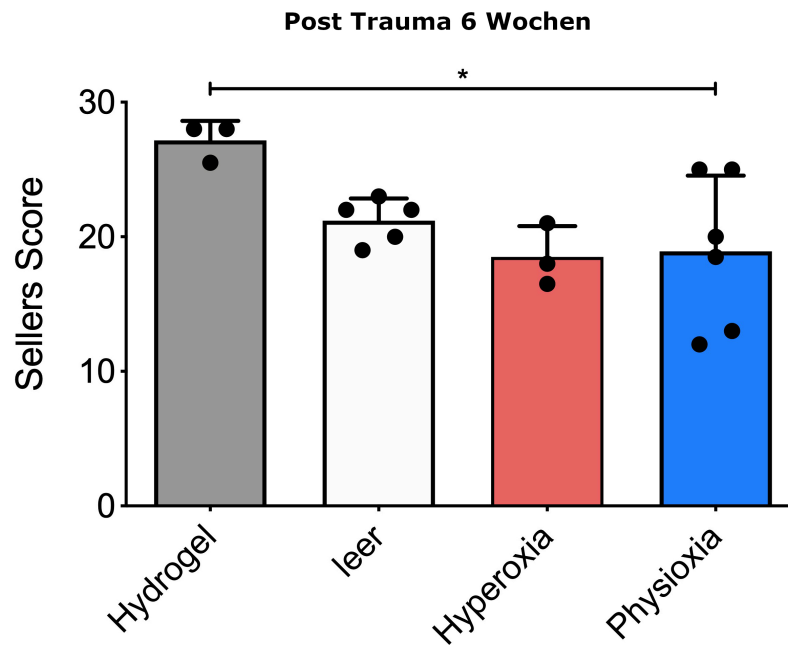


Abbildung 29: Sellers Scores der Post Trauma Gruppe 6 Wochen post-OP. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$.

Bei der Analyse einzelner Parameter des Sellers Scores zeigten sich bei der Integration des Gewebes und der Architektur des Defekts signifikante niedrigere Werte in den Physioxia Gruppe, verglichen mit leeren Defekten nach 12 Wochen. Auch bei der Füllung, Färbung, Zellmorphologie, Architektur der Oberfläche und Neubildung subchondralen Knochens ließen sich unter Physioxia niedrigere Werte finden als bei den Kontrollgruppen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich hier jedoch nicht (Abb. 32).

6 Wochen postoperativ zeigte sich bei der Neubildung subchondralen Knochens ein signifikant niedrigerer Wert bei der Physioxia Gruppe, verglichen mit Defekten, die mit zellfreiem Hydrogel behandelt wurden. Bei der Füllung, Färbung und Architektur der Oberfläche und des Defekts ließen sich im Vergleich mit den Kontrollgruppen ebenfalls erniedrigte, allerdings nicht statistisch signifikante Werte finden (Abb. 33).

Post Trauma 12 Wochen

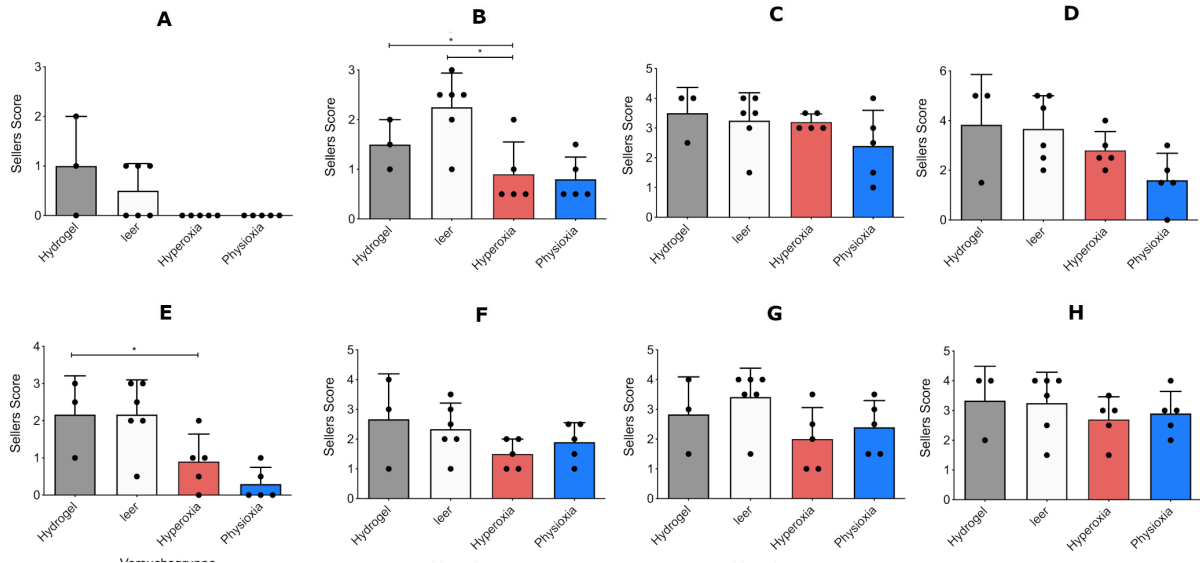


Abbildung 30: Einzelparameter des Sellers Scores der Post Trauma Gruppe 12 Wochen post-OP. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test. A: Füllung, B: Integration, C: Färbung, D: Zellmorphologie, E: Architektur der Oberfläche, F: Architektur des Defekts, G: Subchondraler Knochen, H: Reformierung der Tidemark.

Post Trauma 6 Wochen

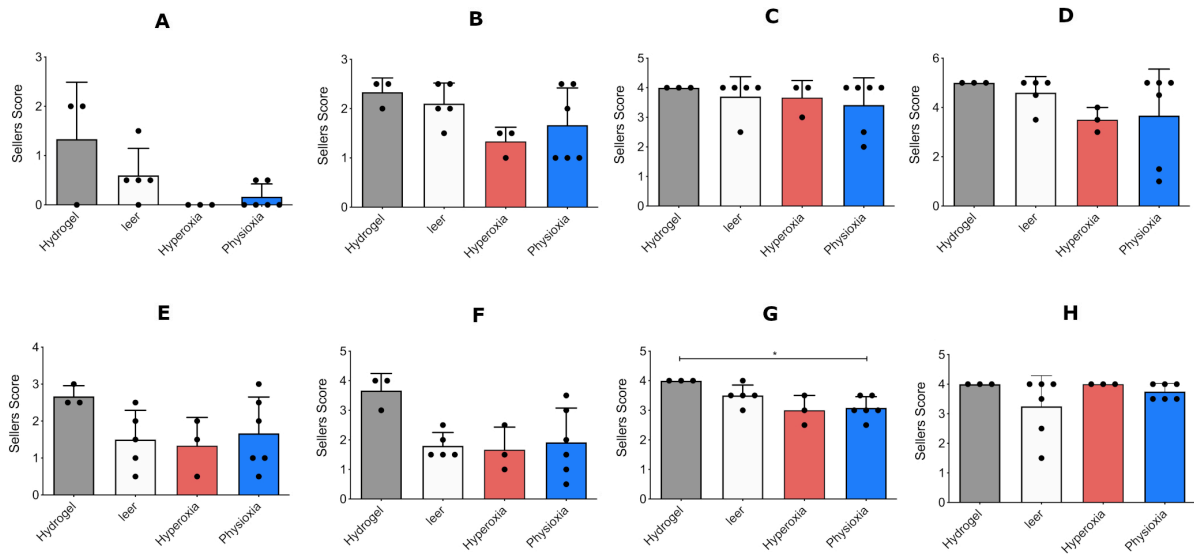


Abbildung 31: Einzelparameter des Sellers Scores der Post Trauma Gruppe 6 Wochen post-OP. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test. A: Füllung, B: Integration, C: Färbung, D: Zellmorphologie, E: Architektur der Oberfläche, F: Architektur des Defekts, G: Subchondraler Knochen, H: Reformierung der Tidemark.

3.2.3.2 Early OA

Mit mesenchymalen Stammzellen behandelte Defekte zeigten im Early OA Modell 12 Wochen nach der Zellinjektion eine Neuformation von hyalinem Knorpel ähnelndem Gewebe. Verglichen mit den Kontrollgruppen, zeigte sich eine intensivere Färbung mit Safranin-O im Regenerat. Bei mit zellfreiem Hydrogel und ausgekratzttem Defekt behandelten Gruppen ließ sich vermehrt faserknorpelartiges Gewebe mit spindelförmigen Zellen finden (Abb. 34). 6 Wochen nach der jeweiligen Intervention stellte sich der zellmorphologische und strukturelle Unterschied zwischen den Gruppen nur bedingt dar. Dennoch ließen sich bei den mit MSCs behandelten Defekten vereinzelt neugeneriertes Gewebe finden, dessen Phänotyp dem des Gelenkknorpels ähnelt. (Abb. 35).

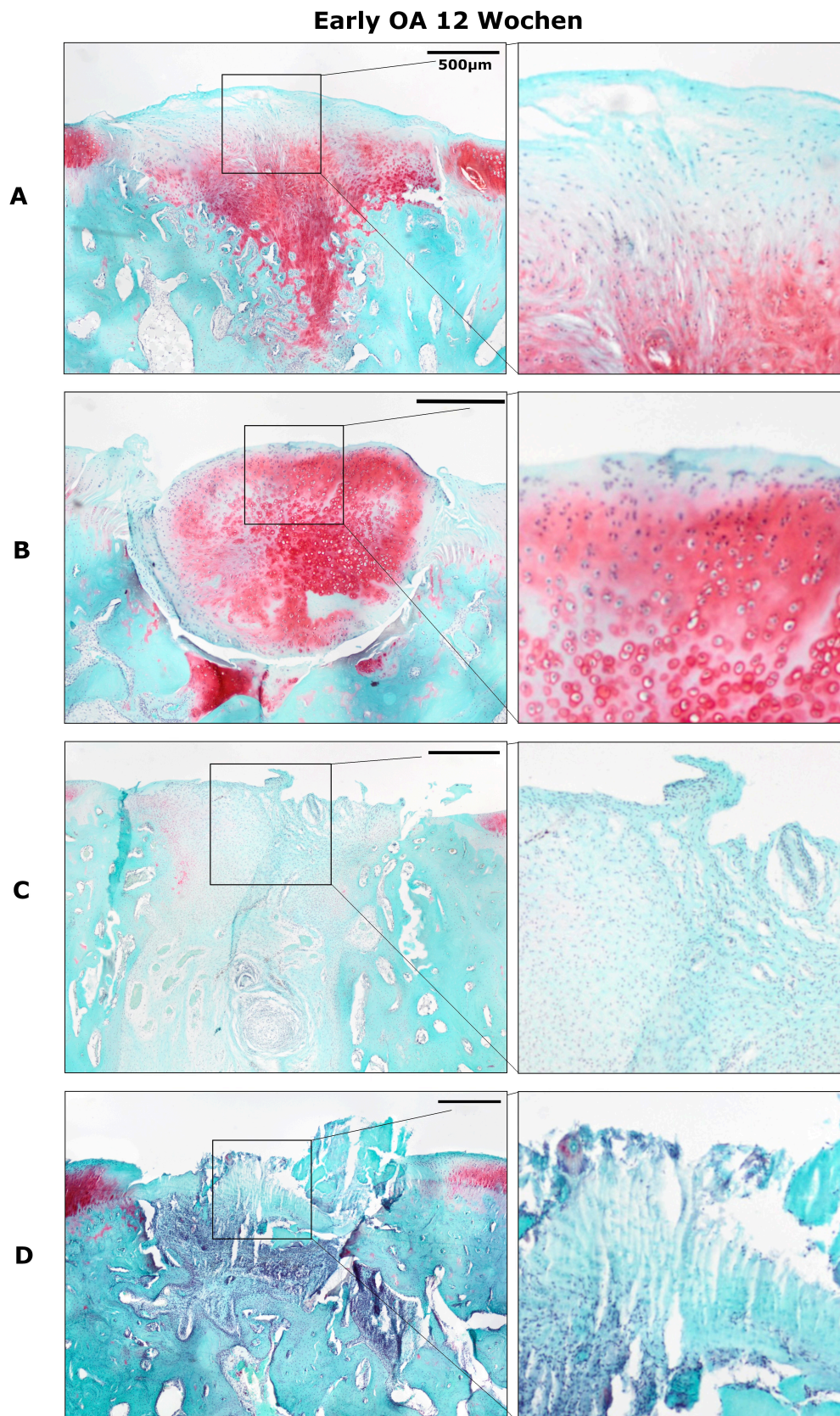


Abbildung 34: repräsentative Bilder Safranin-O/ Fast Green gefärbter Gefrierschnitte der Early OA Gruppe 12 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion (linke Reihe); Vergrößerung des mit einem schwarzen Quadrat markierten Bereichs (rechte Reihe).
 A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 5 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 6 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 7 im Versuchsaufbau)
 D: Auskratzen des neugebildeten Gewebes aus Defekt (Gruppe 8 im Versuchsaufbau).

Early OA 6 Wochen

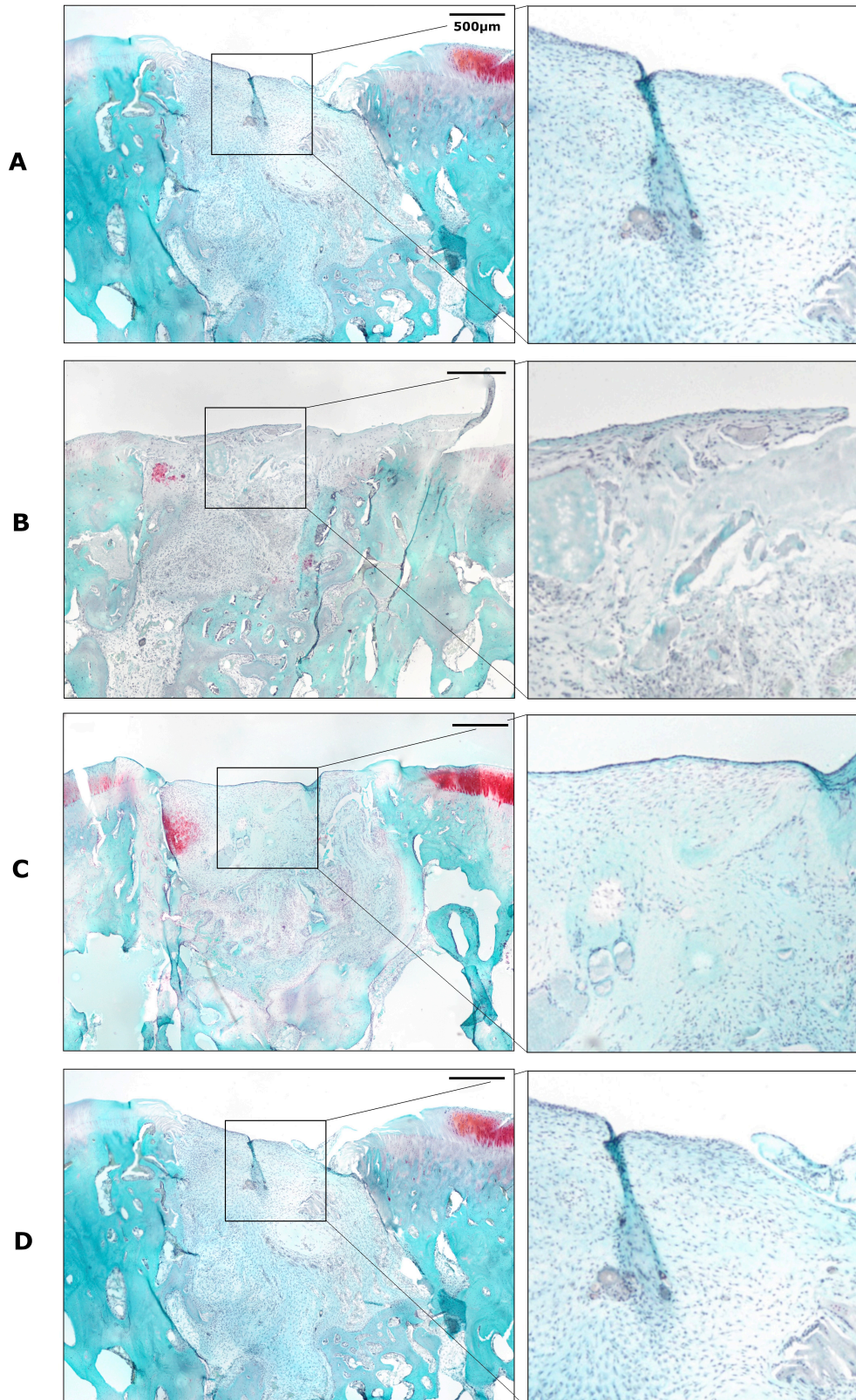


Abbildung 35: repräsentative Bilder Safranin-O/ Fast Green gefärbter Gefrierschnitte der Early OA Gruppe 6 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion (linke Reihe); Vergrößerung des mit einem schwarzen Quadrat markierten Bereichs (rechte Reihe).
 A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 5 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 6 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 7 im Versuchsaufbau)
 D: Auskratzen des neugebildeten Gewebes aus Defekt (Gruppe 8 im Versuchsaufbau).

12 Wochen nach der Hydrogelinjektion zeigte sich ein niedrigerer Sellers Score bei mit mesenchymalen Stammzellen behandelten Defekten. Beim Vergleich zwischen den Kontrollgruppen mit den Hyperoxia und Physioxia Gruppen ließen sich signifikante Unterschiede finden. Die Behandlung sowohl mit physioxisch als auch mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs resultierte in der Regeneration des fokalen osteochondralen Defekts mit qualitativ hochwertigerem Knorpel. Nicht signifikant waren die Unterschiede zwischen den Physioxia und Hyperoxia Gruppen (Abb. 36).

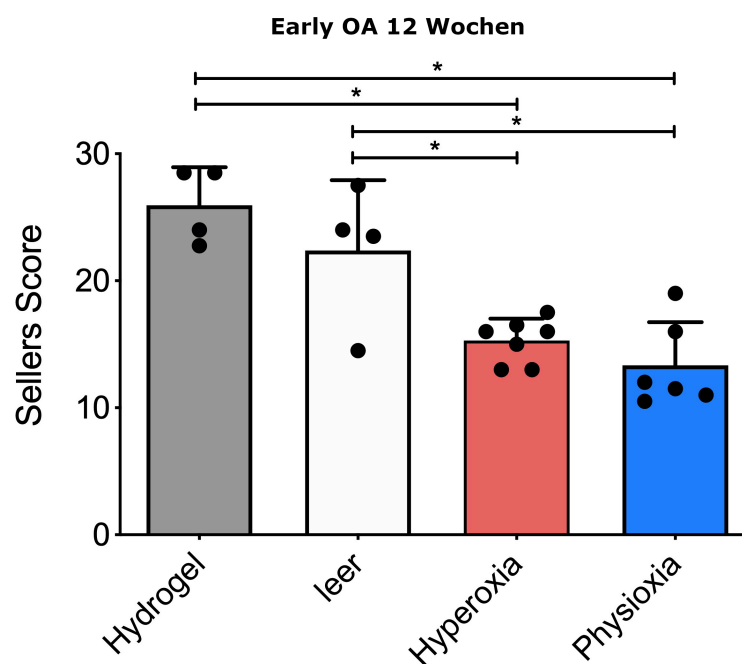


Abbildung 36: Sellers Scores der Early OA Gruppe 12 Wochen nach zweitem Eingriff. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test.

6 Wochen nach der jeweiligen Intervention ließ sich ein insgesamt höhere Werte des Sellers Score finden. Die nach 12 Wochen bestehenden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich zu diesem früheren Betrachtungszeitpunkt nicht (Abb. 37).

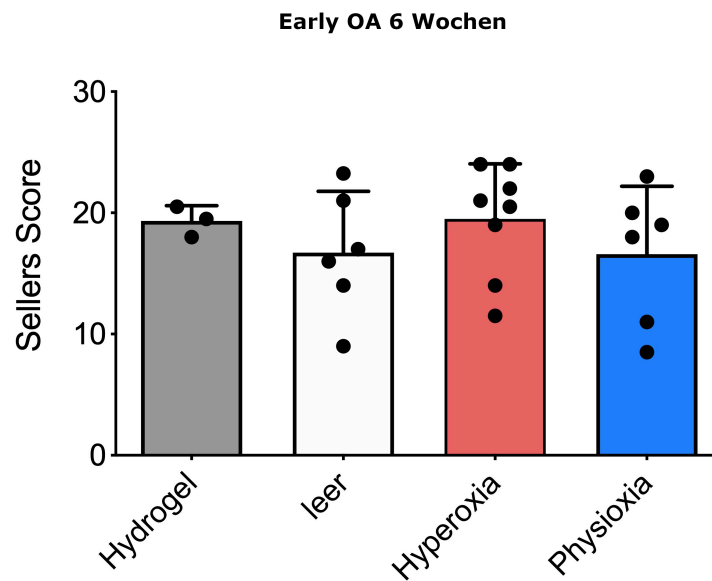


Abbildung 37: Sellers Scores der Early OA Gruppe 6 Wochen nach zweitem Eingriff. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test.

Bei der Betrachtung einzelner Parameter des Sellers Scores ließen sich im Early OA Versuchsaufbau weder nach 6 noch nach 12 Wochen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen finden. 12 Wochen nach der jeweiligen Intervention zeigten sich jedoch bei den mit Stammzellen behandelten Defekte deutlich niedrigere Werte bei der Füllung, Zellmorphologie, Architektur der Oberfläche und Neubildung subchondralen Knochens verglichen mit den Kontrollgruppen (Abb. 38).

6 Wochen postoperativ konnten, ähnlich wie bei der Analyse des Gesamtscores, keine wesentlichen Unterschiede bei den verschiedenen Interventionsformen gefunden werden (Abb. 39).

Early OA 12 Wochen

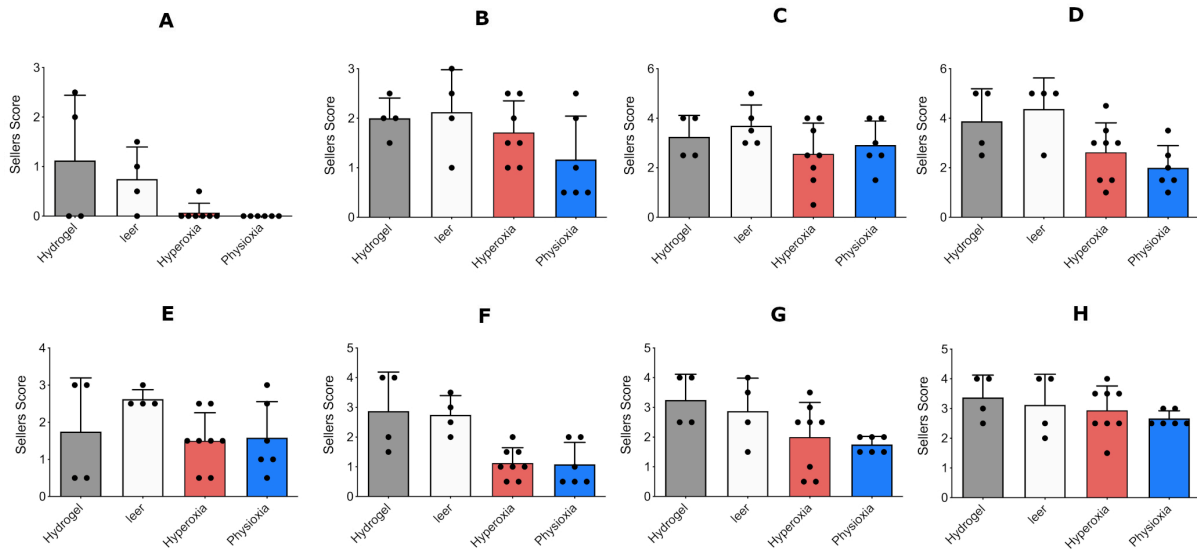


Abbildung 32: Sellers Scores der Early OA Gruppe 12 Wochen nach zweitem Eingriff. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test.
A: Füllung, B: Integration, C: Färbung, D: Zellmorphologie, E: Architektur der Oberfläche, F: Architektur des Defekts, G: Subchondraler Knochen, H: Reformierung der Tidemark.

Early OA 6 Wochen

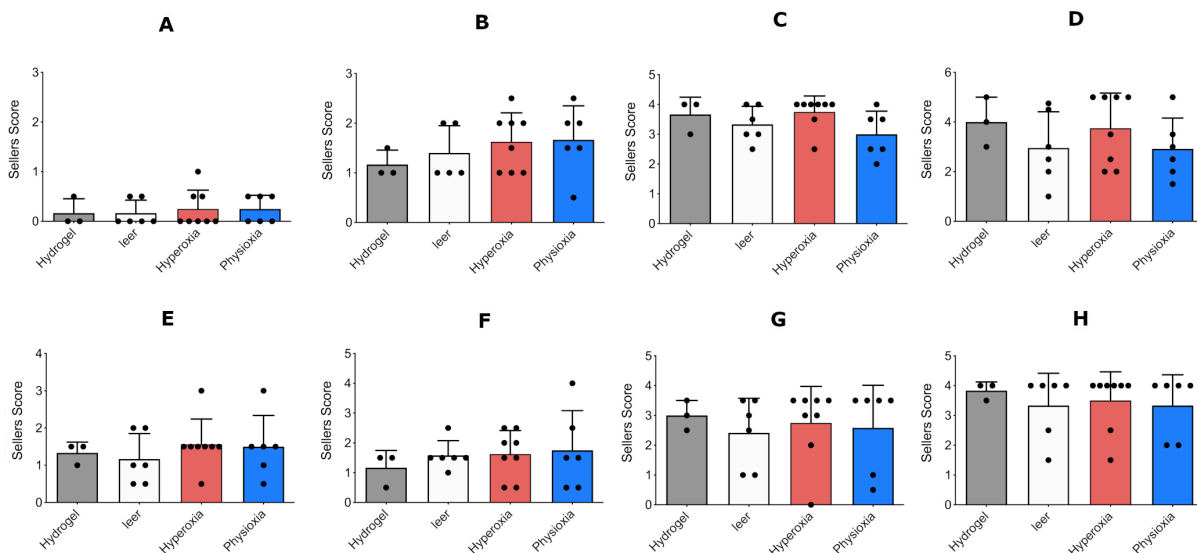


Abbildung 39: Sellers Scores der Early OA Gruppe 6 Wochen nach zweitem Eingriff. Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung; Punkte zeigen jeweilige Einzelwerte; * = $p < 0,05$, getestet durch Kruskal Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test.
A: Füllung, B: Integration, C: Färbung, D: Zellmorphologie, E: Architektur der Oberfläche, F: Architektur des Defekts, G: Subchondraler Knochen, H: Reformierung der Tidemark.

3.2.4 Darstellung der Kollagenkomposition

3.2.4.1 Post Trauma

Bei den mit physioxischen MSCs behandelten Defekten zeigte sich nach 12 Wochen eine gleichmäßige Färbung des gesamten neugebildeten Gewebes mit Kollagen Typ II. Die Färbeintensität glich dabei der des angrenzenden Knorpels. Im Bereich unterhalb der Tidemark ließ sich vermehrt Kollagen Typ I finden, wobei eine deutliche Zweischichtung des Regenerats zu erkennen war. Eine ähnliche Kollagenkomposition trat unter Hyperoxia zum Vorschein. Lediglich die Verteilung des Kollagen Typ I erschien diffuser als unter Physioxia (Abb. 40 A und B).

Bei Betrachtung der Kontrollgruppen zeigten sich nur vereinzelte umschriebene Anfärbungen durch Kollagen Typ II. Im Vergleich zu den mit MSCs behandelten Gruppen, ließ sich eine verminderte Färbeintensität und damit eine Verminderung des Gehalts an Kollagen Typ II finden. Bei mit zellfreiem Hydrogel behandelten Gruppen war zudem eine intensivere Kollagen Typ I Färbung wahrzunehmen, wohingegen diese bei ausgekratzten Defekten eher verblasst erschien (Abb. 40 C und D).

6 Wochen postoperativ findet sich in den mit Zellen behandelten Interventionsgruppen ein vermehrtes Angebot von Kollagen Typ I im Bereich des Defekts. Die Präsenz von Kollagen Typ II im regenerierten Gewebe war vermehrt bei mit physioxischen MSCs behandelten Kondylen nachweisbar, besonders in den Kontrollgruppen ließ sich kaum Kollagen Typ II darstellen (Abb. 41).

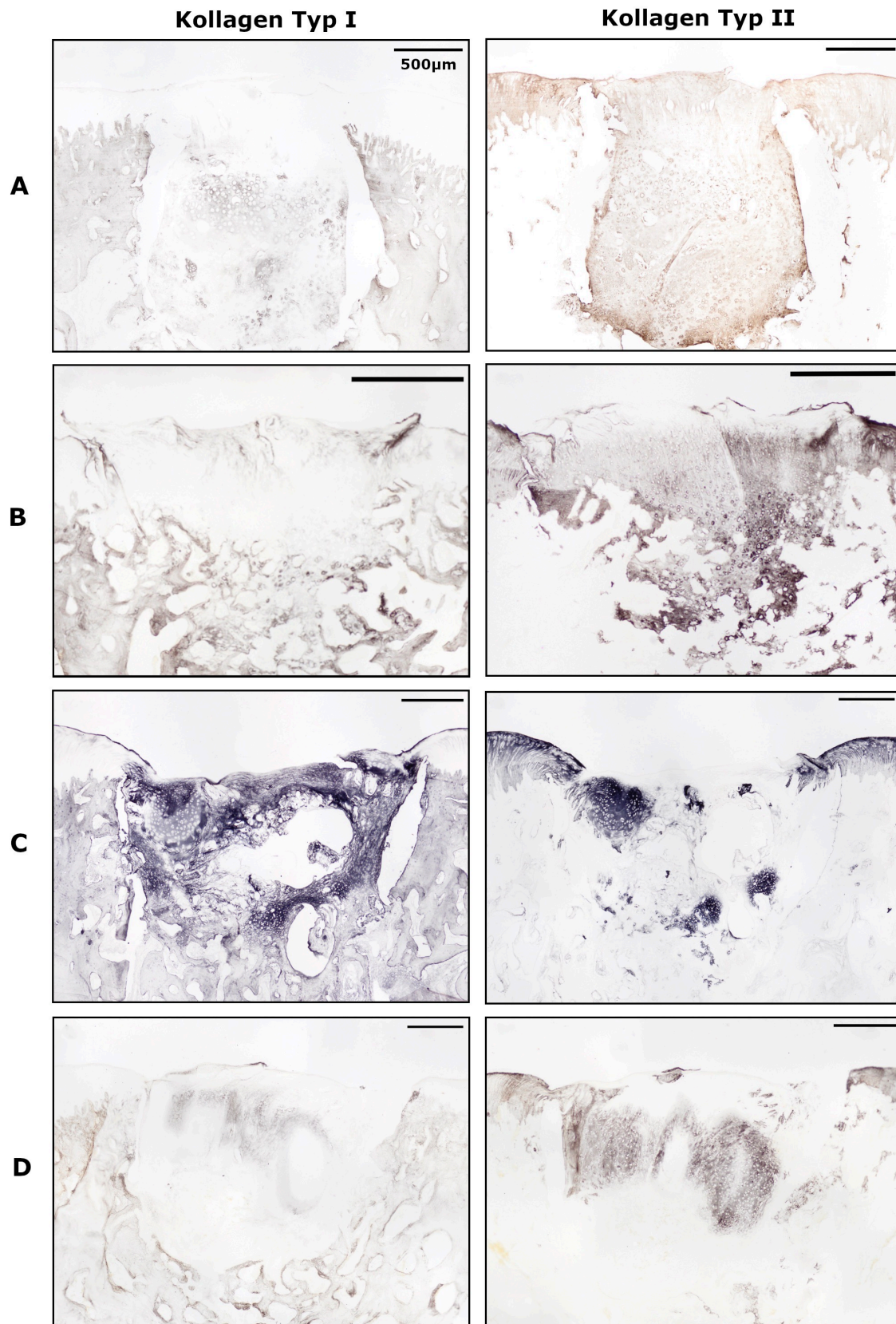


Abbildung 40: repräsentative Bilder immunohistochemisch nach Kollagen Typ I (linke Reihe), bzw. Kollagen Typ II (rechte Reihe) gefärbter Gefrierschnitte der Post Trauma Gruppe 12 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion.

A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 1 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 2 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 3 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 4 im Versuchsaufbau).

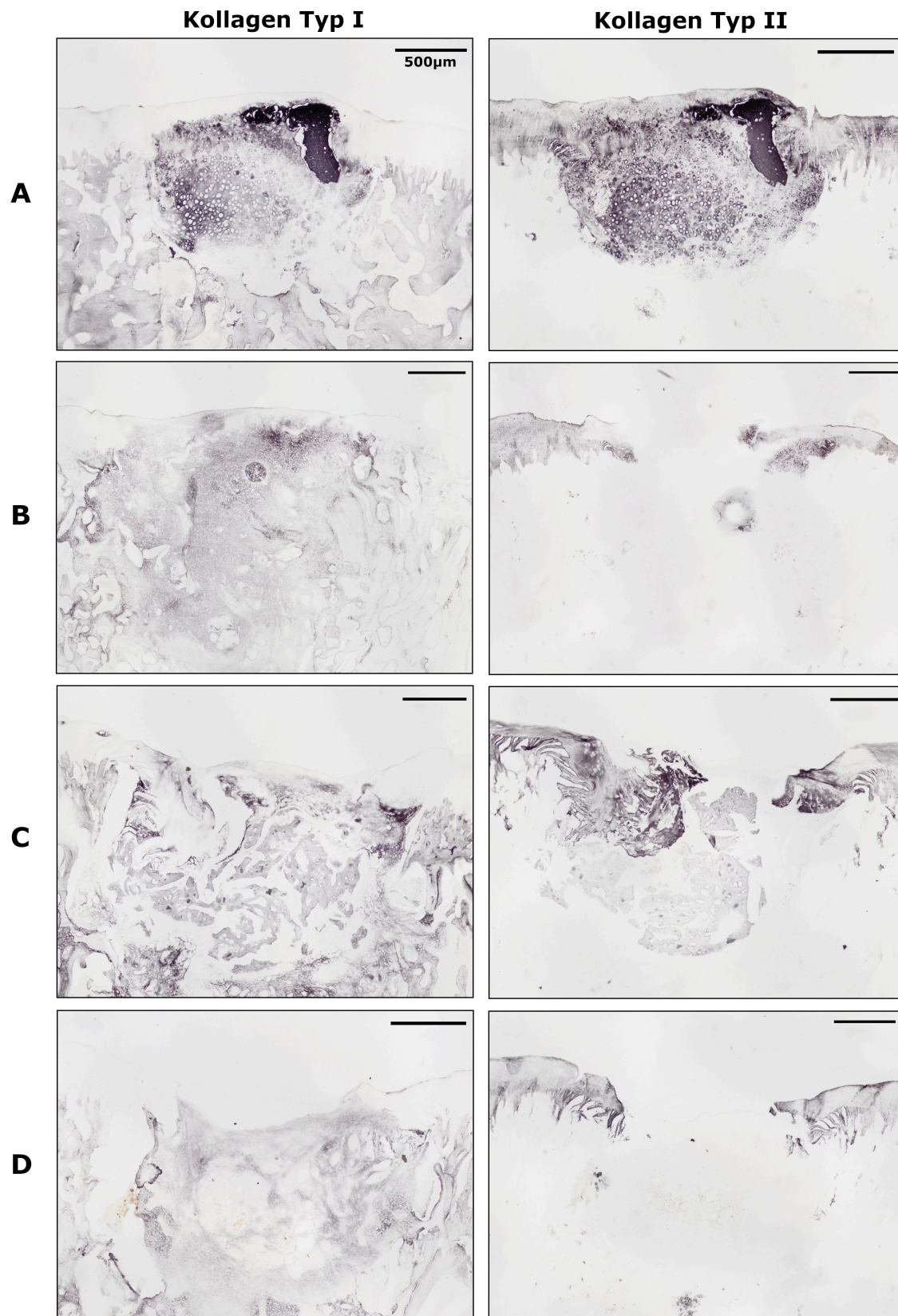


Abbildung 41: repräsentative Bilder immunohistochemisch nach Kollagen Typ I (linke Reihe), bzw. Kollagen Typ II (rechte Reihe) gefärbter Gefrierschnitte der Post Trauma Gruppe 6 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion.
 A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 1 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 2 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 3 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 4 im Versuchsaufbau).

3.2.4.2 Early OA

Im Early OA Versuchsaufbau kam bei den mit MSCs behandelten Gruppen nach 12 Wochen eine einheitliche Färbung mit Kollagen Typ II im Bereich des Defekts zur Darstellung. Die Färbeintensität glich dabei der des angrenzenden Knorpels. Unter Physioxia zeigte sich eine oberflächliche Anreicherung mit Kollagen Typ I, während die Verteilung unter Hyperoxia, ähnlich wie im Post Trauma Versuchsaufbau, diffuser erschien (Abb. 42 A und B).

Bei Betrachtung der Kontrollgruppen zeigten sich erneut lediglich vereinzelt Anfärbungen durch Kollagen Typ II im Defektbereich. Insgesamt erschien der Gehalt an Kollagen Typ II im Vergleich zu den mit Zellen behandelten Gruppen vermindert. Der Gehalt an Kollagen Typ I glich annähernd dem des angrenzenden Knochens (Abb. 42 C und D).

6 Wochen postoperativ ließ sich vermehrt Kollagen Typ I unter Physioxia und Hyperoxia sowie bei den ausgekratzten, leeren Defekten finden. Die Produktion von Kollagen Typ II haltigem Gewebe blieb weitestgehend aus (Abb. 43).

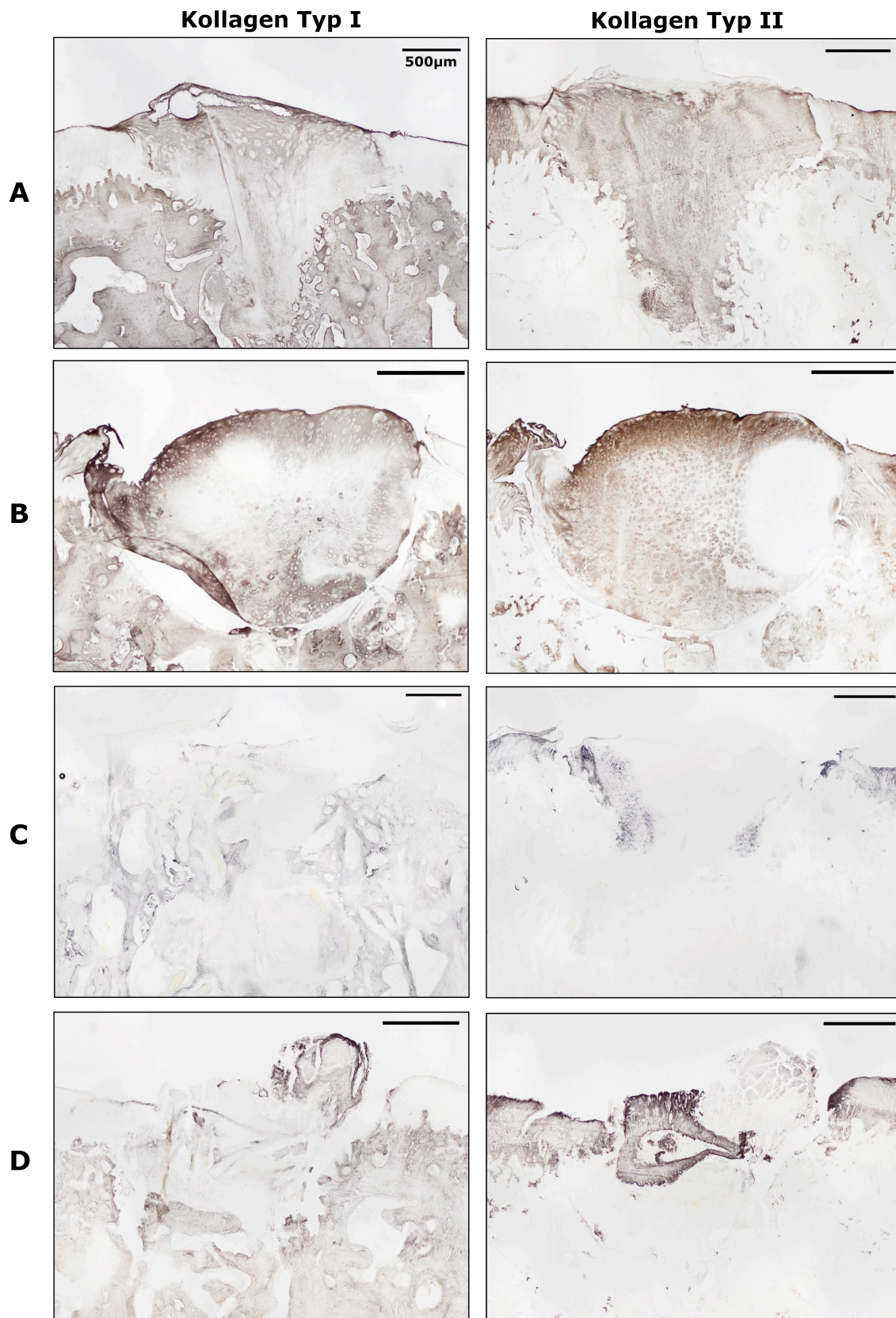


Abbildung 42: repräsentative Bilder immunohistochemisch nach Kollagen Typ I (linke Reihe), bzw. Kollagen Typ II (rechte Reihe) gefärbter Gefrierschnitte der Early OA Gruppe 12 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion.

A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 5 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 6 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 7 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 8 im Versuchsaufbau).

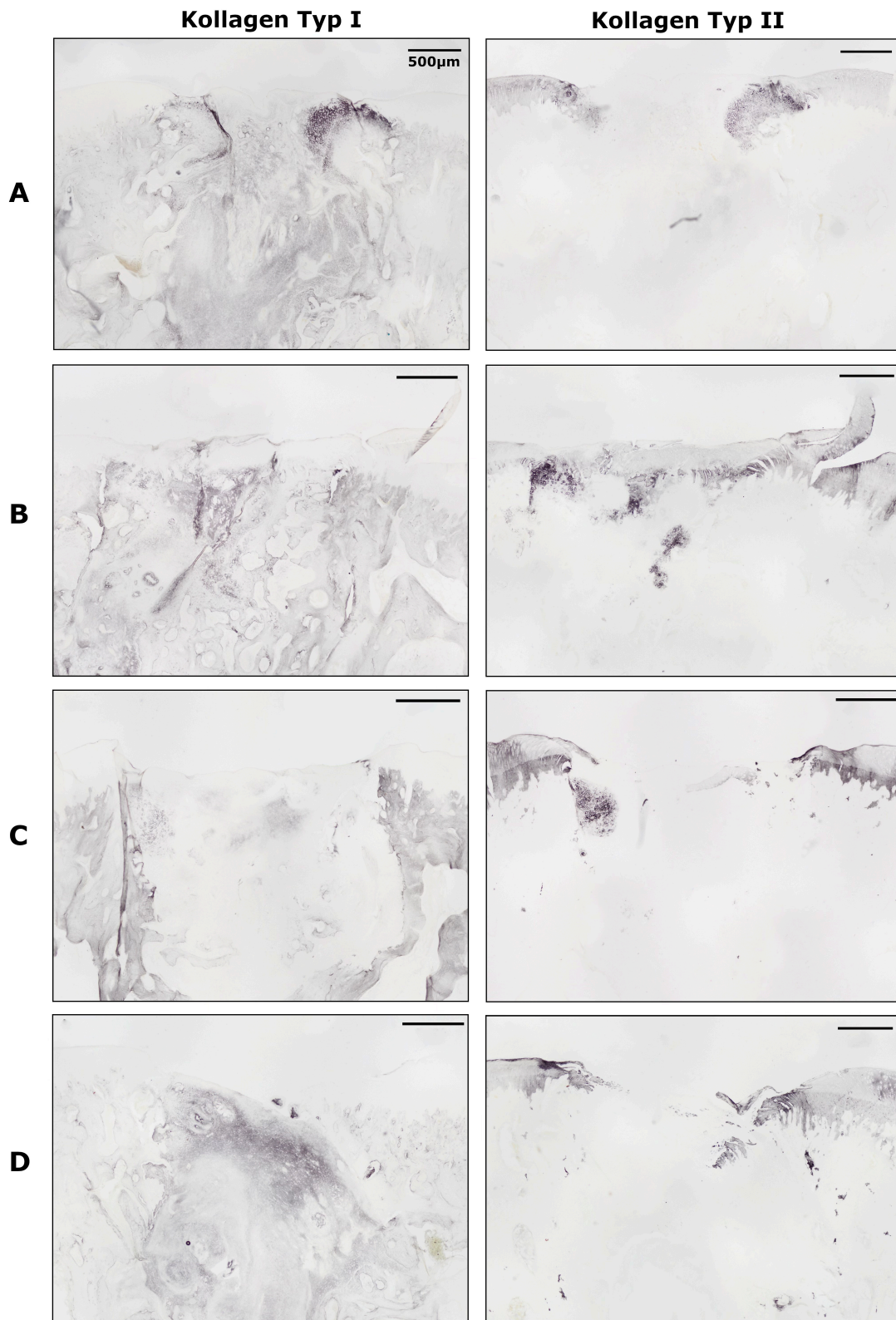


Abbildung 43: repräsentative Bilder immunohistochemisch nach Kollagen Typ I (linke Reihe), bzw. Kollagen Typ II (rechte Reihe) gefärbter Gefrierschnitte der Early OA Gruppe 6 Wochen nach Defektkreation. 4x Vergrößerung der Defektregion.

A: Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 1 im Versuchsaufbau)
 B: Behandlung mit hyperoxisch vorkonditionierten MSCs (Gruppe 2 im Versuchsaufbau)
 C: Behandlung mit zellfreiem Hydrogel (Gruppe 3 im Versuchsaufbau)
 D: Keine Intervention nach Defektkreation (Gruppe 4 im Versuchsaufbau).

3.2.5 Auswertung Nano-CT

Makroskopisch zeigte sich bei den dreidimensionalen CT-Rekonstruktionen eine unbeschädigte Oberfläche der nicht behandelten, gesunden lateralen Kondylen und ein im posterioren Drittel erkennbarer Knochendefekt der medialen Femurkondyle bei den Interventionsgruppen. Im Defekt selbst kam die typische spongiöse Architektur des Knochen zum Vorschein. Des Weiteren ließen sich in der direkten Umgebung des Defekts vereinzelt, diffus versprengte kleine Knochenläsionen darstellen (Abb. 44 A-E).

Die im Defekt gemessene Knochendichte im Bereich des subchondralen Knochens nahm bei allen Gruppen im Vergleich zur intakten kontralateralen Kondyle ab. Besonders ausgeprägt zeigte sich diese Differenz bei der mit zellfreiem Hydrogel behandelten Gruppe, die den niedrigsten Gehalt an Hydroxylapatit pro ccm^3 aufwies. Ein deutlich quantifizierbarer Unterschied zwischen den restlichen Interventionsmethoden ließ sich nicht finden (Abb. 44 F).

Der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen war bei den gesunden Kontrollproben am höchsten. Ein Unterschied zwischen Physioxia und Hyperoxia trat nicht in Erscheinung. Allerdings zeigten sich bei den ausgekratzen, leeren Defekten höhere Werte als bei den mit zellfreiem Hydrogel behandelten Gruppen (Abb. 44 G).

Mit Werten zwischen $220 \mu\text{m}$ und $260 \mu\text{m}$ lag die Knorpeldicke für die intakten Kontrollgruppen im zu erwartenden Bereich. Eine leichte Zunahme der Dicke war bei den mit hyperoxischen MSCs behandelten Defekten verzeichnen. Die Behandlung mit zellfreiem Hydrogel führte zu einer Abnahme der Knorpeldicke im Vergleich zum kontralateralen, gesunden Gewebe (Abb. 45 H).

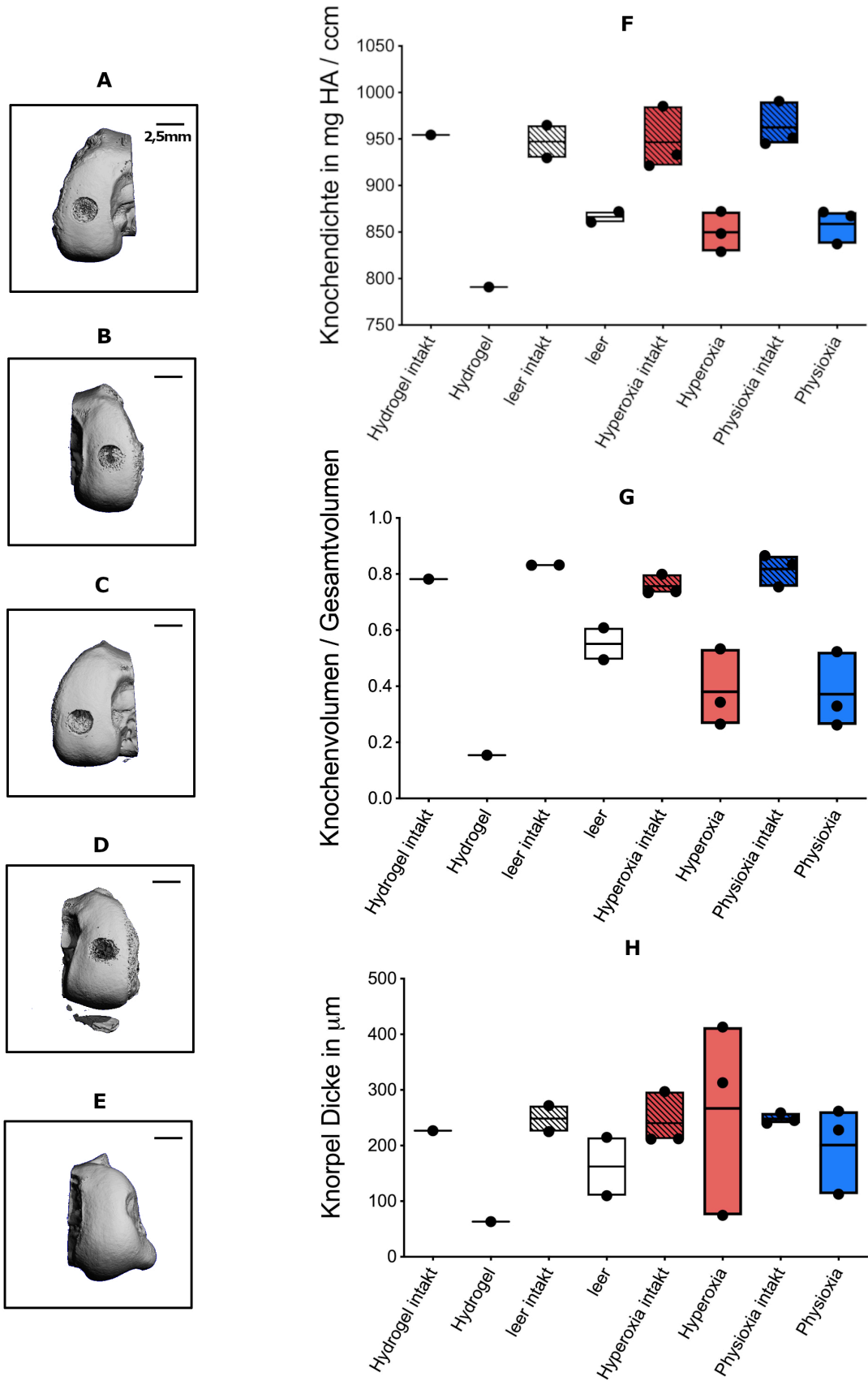


Abbildung 44: Links: Nano-CT Bilder der Early OA Gruppe 12 Wochen nach Hydrogelimplantation von Physioxia (A), Hyperoxia (B), ausgekratzt Defekt (C), zellfreiem Hydrogel (D) und gesunder Kondyle (E). Rechts: Knochendichte (A), Knochenvolumen im Defektbereich (B) und Knorpeldicke (C).

4 Diskussion

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, den Einfluss physioxischer mesenchymaler Stammzellen auf die Reparatur von fokalen früharthrotischen- und traumatischen Knorpelschäden zu charakterisieren und quantifizieren. In einem eigens hierfür konzipierten in vivo Modell konnten mithilfe eines Bohrdefekts die für diesen Zweck nötigen Bedingungen geschaffen werden. Durch die Kreation der ca. 2,3 mm x 2 mm messenden osteochondralen Läsion entstand eine Situation, in der die Biomechanik des Gelenks möglichst unbeeinträchtigt bleiben konnte. Anstatt eine diffuse Knorpeldegenerationen zu induzieren, wurde ein lokal begrenzter Defekt erzeugt. Dadurch ließen sich zwei unterschiedliche klinische Situationen nachbilden, in der eine weitestgehend unverfälschte Evaluation der Zellbehandlung möglich war. Zum einen konnte so die Behandlung des unmittelbar posttraumatischen Schadens untersucht werden, zum anderen die 6 Wochen nach der Defektkreation entstehende perifokale, früharthrotische Degeneration des Knorpels. Der vielfach beschriebene Effekt von physioxischen Kultivierungsbedingungen auf die Differenzierung von MSCs sollte sich dabei positiv auf die Reparatur des geschädigten Gewebes auswirken und gleichzeitig genauer durch in vitro Experimente analysiert werden.

4.1 Verhalten Mesenchymaler Stammzellen unter Physioxia in vitro

Das Kultivieren der MSCs unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt hatte verschiedene Auswirkungen auf die Zellen. Im Vergleich zu atmosphärischen O₂-Bedingungen zeigten die physioxischen MSCs zu allen Messzeitpunkten eine deutlich verminderte Zellfläche. Die in dieser Arbeit beobachtete Größenzunahme unter herkömmlichen Expansionsbedingungen wurde bereits mehrfach beschrieben und gilt als Zeichen der vorzeitigen Zellalterung von Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen sowie als Ausdruck der Hypertrophie [79–81].

Ebenfalls zu verzeichnen war eine Zunahme der Expansionsgeschwindigkeit, gemessen in kumulativen Populationsverdopplungen, sowie der absoluten Zellzahl unter Physioxia. Physioxische MSCs zeigen demnach höhere Teilungsraten und damit eine schnellere Proliferation als hyperoxische MSCs. Vergleichbare Resultate ließen sich bei humanen mesenchymalen Stammzellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben finden. So reagierten aus Knochenmark und Fettgewebe gewonnene MSCs bereits in früheren Arbeiten mit einem beschleunigten Proliferationsverhalten auf einen niedrigen Sauerstoffgehalt [82–84].

Die Auswirkungen der Reduktion des Sauerstoffgehalts ließen sich auch in der dreidimensionalen Pellet-Zellkultur nachvollziehen. Das Nassgewicht der Pellets unter Physioxia war größer als unter Hyperoxia. Passend zu diesen Ergebnissen und zur Zunahme der Zellzahl in der herkömmlichen zweidimensionalen Zellkultur, konnte ein erhöhter DNA-Gehalt unter physioxischen O₂-Bedingungen gemessen werden. Es fand sich zudem ein nur niedrig erhöhter Gehalt an sulfatierten GAGs bei physioxischen Pellets im Vergleich zu hyperoxischen Pellets. Diese nur geringe Differenz der Matrixproduktion und damit des chondrogenen Potentials könnte durch das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen Zellspender auf den niedrigen Sauerstoffgehalt begründet sein, das bereits von Anderson et Al. (2016) [85] und Pattappa et Al. (2019) [86] beschrieben wurde. So kam es vermehrt bei hyperoxisch vorkonditionierten MSCs zu einer unzureichenden Formation von Pellets, wodurch besonders Proben mit vermutlich geringem GAG-Gehalt nicht in die Statistik einfließen. Zellpopulationen, die für die Bildung von Aggregaten besonders auf einen niedrigen Sauerstoffgehalt angewiesen waren, flossen so nicht in die Berechnung des Ergebnisses ein. Daraus resultierte eine verminderten Probenzahl unter Hyperoxia mit

einem durch die Exklusion bedingten relativ zu hohem Gehalt an GAGs. Des Weiteren konnte bei hyperoxischen Pellets ein höherer GAG-Gehalt im Verhältnis zur in der Probe vorhandenen DNA gemessen werden. Zu möglichen Verzerrungen kann es hierbei durch den vermehrt im Pelletinneren ablaufenden Zelltod gekommen sein, der besonders bei den größeren physioxischen Pellets durch eine Minderversorgung der am weitesten vom Nährmedium entfernten Zellen auftritt. Eine tatsächliche vorhandene Mehrproduktion von Glykosaminoglykanen im Verhältnis zur DNA unter Hyperoxia kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt stehen die in dieser Arbeit erhobenen in vitro Ergebnisse im Einklang mit bisherigen Untersuchungen. Die Verwendung eines niedrigen Sauerstoffgehalts während der Kultivierung der MSCs begründet sich durch drei wesentliche Vorteile: Das Vermeiden der vorzeitigen Zellalterung, den Erhalt der Multipotenz und eine beständigere chondrogene Differenzierung. Die mit der Zellalterung und dem Verlust der Multipotenz in Verbindung stehenden morphologischen Veränderungen konnten durch den Einsatz von Physioxia deutlich reduziert werden (Abb. 10 und 11). Auch die Zahl der kumulativen Populationsverdopplungen war unter physioxischen Bedingungen höher, während hyperoxisch vorkonditionierte Populationen häufig einen verfrühten Wachstumsstillstand zeigten (Abb. 12). Zu ähnlichen Resultaten sind in der Vergangenheit Untersuchungen mit Fokus auf humane [85], porcine [83] und vom Schaf stammende [86] mesenchymale Stammzellen gekommen.

Ebenfalls konnte der unter anderem von Pattappa et al. beschriebene anabolische Effekt auf die Chondrogenese bestätigt werden [62]. Dieser geht mit einer erhöhten Matrixproduktion und Aggregatwachstum einher (Abb. 14 und 17). Die insbesondere unter hyperoxischen Bedingungen stattfindende Hypertrophie der MSCs war in der zweidimensionalen Zellkultur unter Physioxia deutlich reduziert. In der Auswertung der Nano-CT-Aufnahmen zeigte sich ebenfalls vornehmlich unter Hyperoxia eine Hypertrophie der Knorpelschicht. Aufgrund der geringen Probenzahl lässt sich hierzu allerdings keine abschließende Aussage treffen, obwohl erste Ergebnisse auf eine Suppression jener Hypertrophie durch physioxische Bedingungen hinweisen könnten (Abb.44). Von Relevanz ist die Unterdrückung der Hypertrophie aufgrund der mit ihr im Zusammenhang stehenden enchondralen Ossifikation, die gehäuft nach der in vivo Implantation der Stammzellen abläuft und so die Entstehung von stabilem Knorpelgewebe aus mesenchymalen Stammzellen behindert. Statt der Differenzierung zu ständigem hyalinem Knorpel kommt es im klassischen Modell der

enchondralen Ossifikation zur Bildung von hypertrophen Chondrozyten aus MSCs. Nach der Apoptose der hypertrophen Chondrozyten und der Vaskularisierung des Gewebes folgt die Migration neuer Zellen, die für eine Kalzifizierung der Matrix sorgen und schlussendlich für die Ossifikation verantwortlich sind [86,87]. Forschungsgruppen um Leijten et al. [88] und Duval et al. [89] konnten so in einem Mausmodell zeigen, dass sich nach der subkutanen Implantation von hyperoxisch vorkonditionierten MSCs eine Knochenformation beobachten ließ, während physioxisch vorkonditionierte MSCs im Untersuchungszeitraum ausschließlich knorpelartiges Gewebe bildeten. Zusätzlich findet sich auf molekularbiologischer Ebene eine Herabregulierung der Expression von mit Hypertrophie assoziierten Genen COL10A1 und MMP13 unter Physioxia [90–93]. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse in Kombination mit der einschlägigen Literatur unterstützen dabei die These, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt während der MSC-Expansion einen Beitrag zur Bildung eines stabilen chondrozytenähnlichen Phänotyps in vitro leisten kann.

Dennoch sind für das genaue Verständnis der beobachteten Effekte weitere Untersuchungen nötig. Beachtung finden muss zukünftig unter anderem die beschriebene Abhängigkeit des chondrogenen Potentials von der Auswahl des Spenders. Anderson et al. fordern hierfür eine genauere molekulare Charakterisierung der für das jeweilige Experiment ausgewählten Stammzellen, um so eine mögliche selektionsbedingte Beeinflussung der Ergebnisse zu minimieren [95]. Des Weiteren gilt es zu erforschen, ob die Verwendung zusätzlicher externer Stimuli während der MSC-Expansion eine noch größere positive Auswirkung auf die Ausbildung von stabilem hyalinen Gelenkknorpel hat.

4.2 Effekt physioxischer MSCs auf die Reparatur des Knorpels

Der Fokus der meisten Studien, die zellbasierte Behandlungsmethoden für die Knorpelreparatur untersuchen, lag bisher hauptsächlich auf der Evaluation posttraumatischer Defekte oder arthrotischer Degenerationen im Spätstadium. Die klinische Situation, in der diese Therapieformen zum Einsatz kommen, werden dadurch allerdings nur unzureichend nachgebildet. Die derzeitig verwendeten Tiermodelle erzeugen entweder einen zu milden fokalen osteoarthrotischen Defekt mittels unterschiedlicher Impaktierungsvorrichtungen, oder sie induzieren eine diffuse Gelenkdegeneration unter Verwendung von intraartikulären Enzyminjektionen, bzw. durch die Resektion von anatomischen Strukturen wie den Kreuzbändern oder Menisci [95–97]. Für die Bewertung unterschiedlicher biologischer Ersatzgewebe ist allerdings ein Modell notwendig, bei dem die Funktion des zu untersuchenden Gelenks erhalten bleibt. Zusätzlich sollte sich die klinische Praxis, in der zellbasierte Produkte hauptsächlich bei der Behandlung fokaler Defekte Anwendung finden, in den jeweiligen Versuchen widerspiegeln. Durch das in dieser Arbeit beschriebene Tiermodell wird eine Situation geschaffen, bei der in der unmittelbaren Umgebung eines osteochondralen Bohrdefekts eine mit der Zeit fortschreitende früharthrotische Degeneration entsteht. So können Ergebnisse konsistent erhoben werden, ohne dass eine das ganze Gelenk betreffende Funktionseinschränkung induziert wird.

6- und 12 Wochen nach der Kreation des Defekts zeigte die Bestimmung der OARSI Grade eine frühe Osteoarthrose der periläsionären Region nach der Definition von Madry et al. (Abb. 24 und 25) [18]. Während sich 6 Wochen nach der jeweiligen Intervention kein merklicher Unterschied zwischen den Kontroll- und Interventionsgruppen fand, war die OARSI Grade nach 12 Wochen bei den mit MSCs behandelten Proben erniedrigt. Im posttraumatischen Versuchsaufbau war diese Abweichung der OARSI Grade unter Physioxia signifikant vermindert im Vergleich zu leeren- und mit zellfreiem Hydrogel behandelten Defekten (Abb. 25). Die Verwendung von vorkonditionierten mesenchymalen Stammzellen hat demnach einen positiven Effekt auf periläsionär auftretende, früharthrotische Degenerationen.

Die qualitative Evaluation des neugebildeten Gewebes erfolgte mittels eines von Sellers et al. beschriebenen Scores zur Bewertung von Knorpeldefekten [78]. Bei den mit Stammzellen behandelten Defekten ließ sich sowohl im Early OA- als auch im Post

Trauma Versuchsaufbau ein im Vergleich zu den Kontrollgruppen reduzierter Sellers Score nach 12 Wochen finden (Abb. 30 und 36). Während sich in der Post Trauma Gruppe nach 12 Wochen nur bei physioxisch vorkonditionierten MSCs signifikante Erniedrigungen des Werts verglichen mit leeren Defekten und zellfreien Hydrogelimplantaten zeigten, war der Sellers Score in der Early OA Gruppe unter Physioxia und Hyperoxia signifikant tiefer als in den Kontrollgruppen (Abb. 30 und 36). Bemerkenswerterweise ließen sich nach 6 Wochen kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen in beiden Versuchsaufbauten beobachten (Abb. 31 und 37). Lediglich im Post Trauma Ansatz zeigte sich eine leichte Reduktion des Scores unter Physioxia im Vergleich zu zellfreiem Hydrogel (Abb. 31). Die Auswahl des Zeitpunktes für die Analyse des Gewebes ist demzufolge von großer Bedeutung. In weiteren Untersuchungen gilt es zu eruieren, ob eine Verlängerung der postoperativen Zeitspanne bis zur Bewertung der Qualität des Regenerats Aufschlüsse über die Beständigkeit des neugebildeten Knorpels bringt.

Die Kollagenkomposition in der Defektzone, und damit die gesamte Architektur des Gewebes, weist in den verschiedenen Interventionsgruppen deutliche Unterschiede auf. Bei mit mesenchymalen Stammzellen behandelten Kondylen zeigte sich ein deutlicher und uniform verteilter Gehalt an Kollagen Typ 2, während bei ausgekratzten- und mit zellfreiem Hydrogel therapierten Defekten großflächige Areale ohne Kollagen Typ 2 zu erkennen waren. Die Distribution des Kollagen Typ 1 zeigte vor allem bei physioxisch vorkonditionierten Proben eine knorpeltypische Zonierung, die bei anderen Versuchsgruppen nicht zu finden war (Abb. 40-43). Als zellmorphologische Besonderheiten ließen sich säulenförmig angeordnete Chondrozyten und eine vermehrte, wenn auch im betreffenden Sellers Teilscore sich nicht signifikant unterscheidende, Färbung mit Safranin-O bei zellbehandelten Läsionen beobachten (Abb. 28 A). In den Kontrollgruppen ließen sich hauptsächlich spindelförmige, fibroblastenartige Zellen im Bereich des Defekts finden. So zeigten einige der ausgekratzten, leeren Defekte eine Neuformation von faserknorpelartigem Gewebe (Abb. 29 D).

Diese intrinsische Fähigkeit der Regeneration des Knorpels im Kaninchen stellt eine Limitation des Modells dar, die nicht zuletzt auch durch die im Vergleich zum Menschen erhöhte Dichte an Chondrozyten ermöglicht wird. Des Weiteren unterscheidet sich die biomechanische Beschaffenheit des Kniegelenks sowie die Gangart der Kaninchen [95,98]. Aufgrund der geringen Dicke des Knorpels erfolgte die

Kreation eines osteochondralen Defekts. Dennoch wurde für die Bewertung des Regenerats der für die Evaluation von chondralen Defekten entwickelte Sellers Score verwendet. Etwaige dadurch zustande kommende Verzerrungen in der Gewichtung der einzelnen Scoringparameter können deshalb nicht ausgeschlossen werden. Für zukünftige Untersuchungen wären Versuche am Großtiermodell, beispielsweise im Schwein oder Schaf, eine Möglichkeit, die genannten Limitationen zu umgehen. In beiden Tieren findet sich eine für die experimentellen Bedingungen ausreichend dicke Knorpelschicht sowie biochemisch Verhältnisse, die dem Menschen ähneln [100].

4.3 Schlussfolgerungen und Blick in die Zukunft

Das für diese Untersuchung entwickelte Tiermodell ermöglicht die Bewertung von stammzellbasierten Therapieformen bei der Behandlung von posttraumatischen und früharthrotischen osteochondralen Defekten. Die Verwendung von physioxisch vorkonditionierten mesenchymalen Stammzellen verbessert dabei die Reparatur des Knorpels im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant in beiden experimentellen Situationen. Im Vergleich zu hyperoxisch vorkonditionierten MSCs zeigen die Zellen unter Physioxia ein größeres chondrogenes Potential mit einem schnelleren Wachstumsverhalten. Um eine weitreichendere Übersicht über die ablaufenden Prozesse zu gewinnen, bedarf es zukünftig Untersuchungen in größeren Tiermodellen. Ob das neu entstandene Gewebe auch langfristig die hohen mechanischen und biochemischen Anforderungen im Gelenk erfüllen kann, gilt es mit längeren Beobachtungszeiträumen zu erforschen. Dadurch könnte auch geklärt werden, inwiefern eine Umwandlung des chondrozytären Regenerats in knöchernes Gewebe erfolgt.

Studien mit Fokus auf die ablaufenden chemischen Mechanismen bei der Verwendung von mesenchymale Stammzellen für die Reparatur von Knorpel fanden Hinweise dafür, dass nicht die Zellen selbst, sondern deren parakrinen Sekretionen für die beobachteten positiven Effekte verantwortlich sind [101]. Unter anderem deshalb gibt es Überlegungen, ob es trotz der vielversprechenden Ergebnisse mit physioxischen MSCs einen geeigneteren Zelltyp für die Behandlung von Knorpelschäden gibt. Dowthwaite et al. beschrieben 2004 erstmals eine Population von Vorläuferzellen aus der superfiziellen Zone artikulären Knorpels, auch genannt Articular Cartilage Progenitor Cells (ACPs) [102]. ACPs reagieren ähnlich wie MSCs mit einem deutlichen Anstieg des chondrogenen Potentials unter physioxischen Bedingungen [95]. Anders als normale Chondrozyten, verlieren ACPs ihren Phänotyp auch nach extensiver in vitro Kultivierung nicht [103]. Ob diese oder andere Zellpopulationen den gewünschten Effekt in fokalen früharthrotischen Defekten erzielen, bleibt abzuwarten. Ebenfalls sollte die Untersuchung des antiinflammatorisch wirksamen Sekretoms physioxisch vorkonditionierter mesenchymaler Stammzellen und dessen genaue Funktion in vivo Gegenstand zukünftiger Forschung sein [104].

5 Zusammenfassung

Ein Großteil der derzeit behandelten Knorpeldefekte ist degenerativer oder früharthrotischer Natur. Trotz des Fortschritts in der Entwicklung von zellbasierten Behandlungsmethoden, zeigen derartige degenerative Läsionen eine im Vergleich zu traumatischen Defekten erhöhte Komplikationsrate. Für die Erforschung geeigneter Therapieansätze und einem besseren Verständnis der ablaufenden Mechanismen im arthrotisch veränderten Gelenk bedarf es eines passenden Tiermodells. In dem in dieser Arbeit verwendeten Kaninchenmodell erfolgte hierfür die Kreation eines osteochondralen Defekts mittels eines Zahnbohrers. Zeichen früharthrotischer Veränderungen konnten 6 Wochen nach der Erzeugung der Läsion gefunden werden. Dadurch war sowohl die Untersuchung posttraumatischer als auch früharthrotischer fokaler Knorpeldefekte möglich.

Eine Alternative zur zellbasierten Behandlung von früharthrotischen Defekten stellen mesenchymale Stammzellen dar. Im Gegensatz zu Chondrozyten müssen MSCs nicht aus dem vorgeschädigten Gelenkknorpel gewonnen werden, sondern können aus einfacher zugänglicherem Gewebe wie Knochenmark extrahiert werden. Ihr bemerkenswertes chondrogenes Potential könnte zudem helfen, entstandene Knorpelschäden zu reparieren. Als Unterstützung für die Regeneration könnte dabei die Verwendung eines niedrigen Sauerstoffgehalts während der Kultivierung der Zellen dienen. Dieser niedrige O₂-Gehalt, oder Physioxia, konnte in vergangenen Studien die Produktion chondrogener Matrix fördern. Ob eine solche Vorkonditionierung zu einer verbesserten Reparatur traumatisch- und früharthrotisch geschädigter Knorpeldefekte führt, galt es in dieser Studie zu untersuchen.

Hier fand sich sowohl im posttraumatischen als auch im früharthrotischem Versuchsaufbau 12 Wochen nach der Behandlung mit physioxisch vorkonditionierten mesenchymalen Stammzellen eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikante Verbesserung des zur Bewertung des neugebildeten Knorpels verwendeten Sellers Scores. Zudem ließ sich unter Physioxia *in vitro* ein größeres chondrogenes Potential mit einem schnelleren Wachstumsverhalten finden. So lässt sich abschließend schlussfolgern, dass die Injektion eines mit hypoxisch kultivierten MSCs beladenen hyaluronsäurebasierten Hydrogels in einen osteochondralen Defekt zu einer Verbesserung der Reparatur des Knorpels in dem verwendeten *in vivo* Modell führt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. Litwic, M. H. Edwards, E. M. Dennison, and C. Cooper. **Epidemiology and burden of osteoarthritis**, *Br. Med. Bull.*, 2013;105:185–199, doi: 10.1093/bmb/lds038.
- [2] L. M. March and C. J. M. Bachmeier. **10 Economics of osteoarthritis : a global perspective**, 1997;11:817–834.
- [3] M. Hilgsmann, C. Cooper, F. Guillemin, *et al.* **A reference case for economic evaluations in osteoarthritis: An expert consensus article from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)**, *Semin. Arthritis Rheum.*, 2014;44:271–282, doi: 10.1016/j.semarthrit.2014.06.005.
- [4] The World Bank. **GDP (current US\$) Germany**, , 2017. <https://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.MKTP.CD?locations=DE> (accessed Apr. 03, 2019).
- [5] T. Vos, A. D. Flaxman, M. Naghavi, *et al.* **Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990 – 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010**, 2014;2163–2196, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61729-2.
- [6] B. M. Alkan, F. Fidan, A. Tosun, and Ö. Ardic,og̃lu. **Quality of life and self-reported disability in patients with knee osteoarthritis**, *Mod. Rheumatol.*, 2014;7595:166–171, doi: 10.3109/14397595.2013.854046.
- [7] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo. **The Basic Science of Articular Cartilage :**, *Orthopaedics*, 2009;1:461–468, doi: 10.1177/1941738109350438.
- [8] J. A. Buckwalter, H. J. Mankin, and A. J. Grodzinsky. **Articular Cartilage and Osteoarthritis**, *AAOS Instr. Course Lect.*, 2005;54:465–480.
- [9] J. Buckwalter, L. Rosenberg, and E. Hunziker. **Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitation Repair.**, *Ewing JW (ed). Articul. Cartil. Knee Jt. Funct. Basic Sci. Arthrosc. New York, Raven Press*, 1990;19–56.
- [10] H. Madry, F. P. Luyten, and A. Facchini. **Biological aspects of early**

- osteoarthritis**, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, 2012;20:407–422, doi: 10.1007/s00167-011-1705-8.
- [11] N. Broom and A. Thambyah. **The Osteochondral Junction. In The Soft–Hard Tissue Junction: Structure, Mechanics and Function**, Cambridge Cambridge Univ. Press., 2018;42–83.
- [12] N. G. M. Thielen, P. M. Van Der Kraan, and A. P. M. Van Caam. **TGF β / BMP Signaling Pathway in**, *cells*, 2019;8:.
- [13] R. A. Oldershaw. **Cell sources for the regeneration of articular cartilage : the past , the horizon and the future**, *Int. J. Exp. Pathol.*, 2012;93:389–400, doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00837.x.
- [14] A. E. M. Jørgensen, M. Kjær, and K. M. Heinemeier. **The Effect of Aging and Mechanical Loading on the Metabolism of Articular Cartilage**, *J. Rheumatol.*, 2017;44:., doi: 10.3899/jrheum.160226.
- [15] M. B. Goldring and S. R. Goldring. **Osteoarthritis**, *J. Cell. Physiol.*, 2007;626–634, doi: 10.1002/JCP.
- [16] R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, and M. B. Goldring. **Osteoarthritis - A Disease of the Joint as an Organ** Richard, *Arthritis Rheum.*, 2012;64:1697–1707, doi: 10.1002/art.34453.
- [17] J. Martel-Pelletier, A. J. Barr, F. M. Cicuttini, P. G. Conaghan, C. Cooper, M. B. Goldring, S. R. Goldring, G. Jones, and J. Pelletier. **Osteoarthritis**, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 2016;2:1–18, doi: 10.1038/nrdp.2016.72.
- [18] H. Madry, E. Kon, V. Condello, *et al.* **Early osteoarthritis of the knee**, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, 2016;24:1753–1762, doi: 10.1007/s00167-016-4068-3.
- [19] P. Angele, P. Niemeyer, M. Steinwachs, G. Filardo, A. H. Gomoll, E. Kon, J. Zellner, H. Madry, and P. Angele. **Chondral and osteochondral operative treatment in early osteoarthritis**, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, 2016;., doi: 10.1007/s00167-016-4047-8.
- [20] P. Angele, J. Fritz, D. Albrecht, J. Koh, and J. Zellner. **Defect type , localization and marker gene expression determines early adverse events of matrix-associated autologous chondrocyte implantation**, *Injury*,

- 2015;46:S2–S9, doi: 10.1016/S0020-1383(15)30012-7.
- [21] A. Tukker, T. L. S. Visscher, and H. S. J. Picavet. **Overweight and health problems of the lower extremities : osteoarthritis , pain and disability**, *Public Health Nutr.*, 2008;12:359–368, doi: 10.1017/S1368980008002103.
- [22] G. Sakalauskienė and D. Jauniškienė. **Osteoarthritis: etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management**, *Med.*, 2010;46:790–797.
- [23] E. Cibria, J. M. Wilkinson, L. Southam, and E. Zeggini. **Pathways to understanding the genomic aetiology of osteoarthritis**, *Hum. Mol. Genet.*, 2017;26:193–201, doi: 10.1093/hmg/ddx302.
- [24] C. Palazzo, C. Nguyen, M.-M. Lefevre-Colau, and S. Poiraudau. **Risk factors and burden of osteoarthritis**, *Ann. Physical Rehabil. Med.*, 2016;59:134–138, doi: 10.1016/j.rehab.2016.01.006.
- [25] V. Silverwood, C. Jinks, J. L. Jordan, J. Protheroe, and K. P. Jordan. **Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults : a systematic review and meta-analysis**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2015;23:507–515, doi: 10.1016/j.joca.2014.11.019.
- [26] M. R. Steinwachs, L. Engebretsen, and R. H. Brophy. **Scientific Evidence Base for Cartilage Injury and Repair in the Athlete**, *Cartilage*, 2012;3:11–17, doi: 10.1177/1947603511415841.
- [27] R. S. Tuan, A. F. Chen, and B. A. Klatt. **Cartilage Regeneration**, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2013;21:303–311, doi: 10.5435/JAAOS-21-05-303.Cartilage.
- [28] H. Imhof, I. Sulzbacher, S. Grampp, C. Czerny, and S. Youssefzadeh. **Subchondral Bone and Cartilage Disease: A Rediscovered Functional Unit**, *Invest. Radiol.*, 2000;35:581–588.
- [29] J. S. Day, M. Ding, J. C. Van Der Linden, D. R. Sumner, and H. Weinans. **A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage**, *J. Orthop. Res.*, 2001;19:914–918.
- [30] T. Hügle and J. Geurts. **What drives osteoarthritis ?— synovial versus subchondral bone pathology**, *Rheumatology*, 2016;1–11, doi:

- 10.1093/rheumatology/kew389.
- [31] M. B. Goldring and K. B. Marcu. **Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases**, *Arthritis Res. Ther.*, 2009;11:, doi: 10.1186/ar2592.
- [32] G. Murphy and H. Nagase. **Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis : destruction or repair ?**, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2008;4:128–135, doi: 10.1038/ncprheum0727.
- [33] J. Bondeson, S. Wainwright, C. Hughes, B. Caterson, and E. X. R. Heumatology. **The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis : a review**, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2008;26:139–145.
- [34] X. Houard, M. B. Goldring, and F. Berenbaum. **Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis**, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2013;1–10, doi: 10.1007/s11926-013-0375-6.
- [35] P. Wojdasiewicz, A. A. Poniatowski, and D. Szukiewicz. **The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis**, 2014;2014:.
- [36] C. R. Scanzello. **Chemokines and Inflammation in Osteoarthritis : Insights From Patients and Animal Models**, *J. Orthop. Res.*, 2017;735–739, doi: 10.1002/jor.23471.
- [37] C. R. Scanzello, E. Umoh, F. Pessler, *et al.* **Local cytokine profiles in knee osteoarthritis : elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2009;17:1040–1048, doi: 10.1016/j.joca.2009.02.011.
- [38] R. F. Loeser. **Integrins and chondrocyte – matrix interactions in articular cartilage**, *Matrix Biol.*, 2014;39:11–16, doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.007.
- [39] S. M. Hussain, D. W. Neilly, S. Baliga, S. Patil, and R. M. D. Meek. **Knee osteoarthritis : a review of management options**, *Scott. Med. J.*, 2016;, doi: 10.1177/0036933015619588.
- [40] M. J. Lespasio, N. S. Piuze, M. E. Husni, G. F. Muschler, A. J. Guarino, and M. A. Mont. **Knee Osteoarthritis : A Primer**, *Perm. J.*, 2017;21:1–7.
- [41] S. Marlovits, P. Zeller, P. Singer, C. Resinger, and V. Vilmos. **Cartilage**

- repair : Generations of autologous chondrocyte transplantation**, *Eur. J. Radiol.*, 2006;57:24–31, doi: 10.1016/j.ejrad.2005.08.009.
- [42] G. Filardo, L. Andriolo, P. Angele, *et al.* **Scaffolds for Knee Chondral and Osteochondral Defects : Indications for Different Clinical Scenarios . A Consensus Statement**, *Cartilage*, 2020;00:1–11, doi: 10.1177/1947603519894729.
- [43] L. Andriolo, D. Reale, A. Di Martino, S. Zaffagnini, F. Vannini, A. Ferruzzi, and G. Filardo. **High Rate of Failure After Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation in Osteoarthritic Knees at 15 Years of Follow-up**, *Am. J. Sports Med.*, 2019;47:2116–2122, doi: 10.1177/0363546519855029.
- [44] C. Albrecht, B. Tichy, L. Zak, S. Aldrian, S. Nürnberger, and S. Marlovits. **Influence of Cell Differentiation and IL-1 b Expression on Clinical Outcomes**, *Am. J. Sports Med.*, 2014;42:, doi: 10.1177/0363546513507543.
- [45] P. Niemeyer, M. J. Feucht, J. Fritz, D. Albrecht, G. Spahn, and P. Angele. **Cartilage repair surgery for full-thickness defects of the knee in Germany : indications and epidemiological data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU)**, *Arch Orthop Trauma Surg*, 2016;, doi: 10.1007/s00402-016-2453-5.
- [46] J. C. Riboh, G. L. Cvetanovich, B. J. Cole, A. B. Yanke, and B. J. Cole. **Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee : a network meta - analysis**, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, 2016;, doi: 10.1007/s00167-016-4300-1.
- [47] L. Andriolo, D. Reale, A. Di Martino, A. Boffa, S. Zaffagnini, and G. Filardo. **Cell-Free Scaffolds in Cartilage Knee Surgery : A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Evidence**, *Cartilage*, 2019;00:1–16, doi: 10.1177/1947603519852406.
- [48] J. M. Case and J. M. Scopp. **Treatment of Articular Cartilage Defects of the Knee With Microfracture and Enhanced Microfracture Techniques**, *Sport. Med Arthrosc Rev*, 2016;24:63–68.
- [49] P. F. Sharkey, P. M. Lichstein, C. Shen, A. T. Tokarski, and J. Parvizi. **Why Are Total Knee Arthroplasties Failing Today — Has Anything Changed**

- After 10 Years ?**, *J. Arthroplasty*, 2014;29:1774–1778, doi: 10.1016/j.arth.2013.07.024.
- [50] P. Cram, X. Lu, S. L. Kates, J. A. Singh, Y. Li, and B. R. Wolf. **Total Knee Arthroplasty Volume, Utilization, and Outcomes Among Medicare Beneficiaries, 1991-2010** Peter, *J. Am. Med. Assoc.*, 2012;308:1227–1236.
- [51] A. J. Price, A. Alvand, A. Troelsen, J. N. Katz, G. Hooper, A. Gray, A. Carr, and D. Beard. **Hip and knee replacement 2 Knee replacement**, *Lancet*, 2018;392:1672–1682, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32344-4.
- [52] L. S. Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues**, *J. Cell Sci.*, 2006;2204–2213, doi: 10.1242/jcs.02932.
- [53] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia. **Mesenchymal stem cells in health and disease**, *Nat. Rev. Immunol.*, 2008;8:726–736, doi: 10.1038/nri2395.
- [54] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, *et al.* **Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells**, *Science (80-.)*, 1999;284:143–148.
- [55] J. M. Gimble and F. Guilak. **Adipose-derived adult stem cells : isolation , characterization , and differentiation potential**, *Cytotherapy*, 2003;5:362–369, doi: 10.1080/14653240310003026.
- [56] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, and T. Muneta. **Comparison of Human Stem Cells Derived From Various Mesenchymal Tissues Superiority of Synovium as a Cell Source**, *Arthritis Rheum.*, 2005;52:2521–2529, doi: 10.1002/art.21212.
- [57] M. Chimutengwende-gordon, J. Donaldson, and G. Bentley. **Current solutions for the treatment of chronic articular cartilage defects in the knee**, *Efort open Rev.*, 2020;5:156–163, doi: 10.1302/2058-5241.5.190031.
- [58] A. Winter, S. Breit, D. Parsch, K. Benz, E. Steck, H. Hauner, R. M. Weber, V. Ewerbeck, and W. Richter. **Cartilage-Like Gene Expression in Differentiated Human Stem Cell Spheroids A Comparison of Bone Marrow – Derived and Adipose Tissue – Derived Stromal Cells**, *Arthritis Rheum.*, 2003;48:418–429, doi: 10.1002/art.10767.
- [59] S. Boeuf, E. Steck, K. Pelttari, T. Hennig, A. Buneß, and K. Benz. **Subtractive**

- gene expression profiling of articular cartilage and mesenchymal stem cells : serpins as cartilage-relevant differentiation markers**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2008;16:48–60, doi: 10.1016/j.joca.2007.05.008.
- [60] J. Lafont. **Lack of oxygen in articular cartilage : consequences for chondrocyte biology**, *Int. J. Exp. Pathol.*, 2010;91:99–106, doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00707.x.
- [61] S. Zhou, Z. Cui, and J. P. G. Urban. **Factors Influencing the Oxygen Concentration Gradient From the Synovial Surface of Articular Cartilage to the Cartilage – Bone Interface A Modeling Study**, *Arthritis Rheum.*, 2004;50:3915–3924, doi: 10.1002/art.20675.
- [62] G. Pattappa, B. Johnstone, J. Zellner, and D. Docheva. **The Importance of Physioxia in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis and the Mechanisms Controlling Its Response**, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019;20:1–28, doi: 10.3390/ijms20030484.
- [63] E. Schipani, H. E. Ryan, S. Didrickson, T. Kobayashi, M. Knight, and R. S. Johnson. **Hypoxia in cartilage : HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival**, *Genes Dev.*, 2001;15:2865–2876, doi: 10.1101/gad.934301.ticular.
- [64] E. Schipani. **Hypoxia and HIF-1 in Chondrogenesis**, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006;73:66–73, doi: 10.1196/annals.1346.009.
- [65] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda. **Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2002;10:199–206, doi: 10.1053/joca.2001.0504.
- [66] C. R. Harrell, B. Simovic, C. Fellabaum, and A. Arsenijevic. **Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis : Current knowledge and future perspectives**, *Biomed. Pharmacother.*, 2019;109:2318–2326, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.099.
- [67] F. Davatchi, B. S. Abdollahi, M. Mohyeddin, and B. Nikbin. **Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis : 5 years follow-up of three patients**, *Int. J. Rheum. Dis.*, 2016;19:219–225.
- [68] L. Orozco, A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, A. Sa, J. Garcí,

- and J. Senti. **Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Mesenchymal Stem Cells : A Pilot Study**, *Transplantation*, 2013;95:1–7, doi: 10.1097/TP.0b013e318291a2da.
- [69] M. Emadedin, N. Labibzadeh, M. Lisastani, A. Karimi, N. Jaroughi, and T. Bolurieh. **Intra-articular implantation of autologous bone marrow À derived mesenchymal stromal cells to treat knee osteoarthritis : a randomized** , *Cytotherapy*, 2018;1–9, doi: 10.1016/j.jcyt.2018.08.005.
- [70] H. Madry. **Tissue-engineered cartilage products** , in *Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition)*, 2020, 1499–1509.
- [71] K. Benz, C. Freudigmann, J. Müller, H. Wurst, D. Albrecht, A. Badke, C. Gaissmaier, and J. Mollenhauer. **A Polyethylene Glycol-Crosslinked Serum Albumin/Hyaluronan Hydrogel for the Cultivation of Chondrogenic Cell Types**, *Adv. Eng. Mater.*, 2010;12:B539–B551, doi: 10.1002/adem.201080028.
- [72] H. Ji, J. Li, J. Shao, D. He, Y. Liu, W. Fei, and E. Luo. **Histopathological Comparison of Condylar Hyperplasia and Condylar Osteochondroma Using Different Staining Methods**, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 2016;;, doi: 10.1016/j.oooo.2016.10.027.
- [73] H. Hempstead, L. Technologies, B. O. Enobakhare, and D. A. Lee. **Quantification of Sulfated Glycosaminoglycans in Chondrocyte / Alginate Cultures , by Use of**, 1996;191:189–191.
- [74] J. E. Stone, N. Akhtar, S. Botchway, and C. A. Pennock. **Interaction of 1 , 9-dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans**, 1994;147–152.
- [75] S. M. Hsu, L. Raine, and H. Fanger. **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.**, *J. Histochem. Cytochem.*, 1981;;, doi: 10.1177/29.4.6166661.
- [76] D. Muschter, L. Fleischhauer, S. Taheri, A. F. Schilling, H. Clausen-Schaumann, and S. Grassel. **Sensory neuropeptides are required for bone and cartilage homeostasis in a murine destabilization-induced osteoarthritis model**, *Bone*, 2020;133:115181, doi: 10.1016/j.bone.2019.115181.
- [77] K. P. H. Pritzker, S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J. P. Pelletier, K.

- Revell, D. Salter, and W. B. van den Berg. **Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2006;14:13–29, doi: 10.1016/j.joca.2005.07.014.
- [78] R. S. Sellers, R. Zhang, S. S. Glasson, H. D. Kim, D. Peluso, D. A. D'Augusta, K. Beckwith, and E. A. Morris. **Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)**, *J. bone Jt. Surg. Am. Vol.*, 2000;82:151–160, [Online]. Available: papers3://publication/uuid/67EFD060-D342-4335-8E26-42A27D6A5D7C
- [79] V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue, and R. P. Haugland. **Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation**, 1997;238:228–238.
- [80] F. Moussavi-Harami, Y. Duwayri, J. A. Martin, F. Moussavi-Harami, and J. A. Buckwalter. **Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering.**, *Iowa Orthop. J.*, 2004;24:15–20, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1888421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [81] W. L. Grayson, F. Zhao, R. Izadpanah, B. Bunnell, and T. Ma. **Effects of Hypoxia on Human Mesenchymal Stem Cell Expansion and Plasticity in 3D Constructs**, *J. Cell. Physiol.*, 2006;339:331–339, doi: 10.1002/jcp.
- [82] W. L. Grayson, F. Zhao, and B. Bunnell. **Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells q**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007;358:948–953, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.054.
- [83] E. J. Sheehy, C. T. Buckley, and D. J. Kelly. **Oxygen tension regulates the osteogenic , chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012;417:305–310, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.105.
- [84] E. Weijers, L. Van Den Broek, T. Waajman, and V. Van Hinsbergh. **The Influence of Hypoxia and Fibrinogen Variants on the Expansion and Differentiation of Adipose Reverse primer**, *Tissue Eng. Part A*, 2011;17:2675–2685, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0661.
- [85] L. B. Boyette, O. A. Creasey, L. Guzik, T. Lozito, and R. S. Tuan. **Human**

- Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Display Enhanced Clonogenicity but Impaired Differentiation With Hypoxic Preconditioning**, *Stem Cells Transl. Med.*, 2014;3:241–254.
- [86] T. D. Bornes, N. M. Jomha, A. Mulet-sierra, and A. B. Adesida. **Hypoxic culture of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells differentially enhances in vitro chondrogenesis within cell-seeded collagen and hyaluronic acid porous scaffolds**, *Stem Cell Res. Ther.*, 2015;6:, doi: 10.1186/s13287-015-0075-4.
- [87] E. J. Mackie, Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. Chen, and M. Mirams. **Endochondral ossification : How cartilage is converted into bone in the developing skeleton**, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008;40:46–62, doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.009.
- [88] E. J. Mackie, L. Tatarczuch, and M. Mirams. **The skeleton : a multi-functional complex organ . The growth plate chondrocyte and endochondral ossification**, *J. Endocrinol.*, 2011;211:109–121, doi: 10.1530/JOE-11-0048.
- [89] J. Leijten, N. Georgi, L. Moreira, C. A. Van Blitterswijk, J. N. Post, and M. Karperien. **Metabolic programming of mesenchymal stromal cells by oxygen tension directs chondrogenic cell fate**, *PNAS*, 2014;111:13954–13959, doi: 10.1073/pnas.1410977111.
- [90] E. Duval, C. Baugé, R. Andriamanalijaona, H. Bénateau, S. Leclercq, S. Dutoit, L. Poulain, P. Galéra, and K. Boumédiène. **Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering**, *Biomaterials*, 2012;33:6042–6051, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.061.
- [91] M. Zhu, Q. Feng, and L. Bian. **Differential effect of hypoxia on human mesenchymal stem cell chondrogenesis and hypertrophy in hyaluronic acid hydrogels**, *Acta Biomater.*, 2014;10:1333–1340, doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.015.
- [92] M. C. Ronzière, E. Perrier, and A. Freyria. **Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells**, *Biomed. Mater. Eng.*, 2010;20:145–158, doi: 10.3233/BME-2010-0626.
- [93] S. Munir, C. B. Foldager, M. Lind, V. Zachar, K. Søballe, and T. G. Koch.

- Hypoxia enhances chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in scaffold-free and scaffold systems**, *Cell Tissue Res*, 2013;, doi: 10.1007/s00441-013-1732-5.
- [94] T. Gómez-Leduc, M. Desancé, M. Hervieu, and L. Florence. **Hypoxia Is a Critical Parameter for Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Type I / III Collagen Sponges**, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017;18:1–23, doi: 10.3390/ijms18091933.
- [95] D. E. Anderson, B. D. Markway, D. Bond, H. E. McCarthy, and B. Johnstone. **Responses to altered oxygen tension are distinct between human stem cells of high and low chondrogenic capacity**, *Stem Cell Res. Ther.*, 2016;7:1–12, doi: 10.1186/s13287-016-0419-8.
- [96] P. J. Cope, K. Ourradi, Y. Li, and M. Sharif. **Models of osteoarthritis : the good , the bad and the promising**, *Osteoarthr. Cartil.*, 2019;27:230–239, doi: 10.1016/j.joca.2018.09.016.
- [97] J. E. Kim, D. Song, S. H. Kim, Y. Jung, and J. Kim. **Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering**, *PLoS One*, 2018;13:1–15.
- [98] P. G. Alexander, J. A. McCarron, M. J. Levine, G. M. Melvin, P. J. Murray, P. A. Manner, and R. S. Tuan. **An In Vivo Lapine Model for Impact-Induced Injury and Osteoarthritic Degeneration of Articular Cartilage**, *Cartilage*, 2012;3:323–333, doi: 10.1177/1947603512447301.
- [99] C. R. Chu, M. Szczodry, and S. Bruno. **Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair**, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2010;16:105–115, doi: 10.1089/ten.teb.2009.0452.
- [100] C. J. Moran, A. Ramesh, P. A. J. Brama, J. M. O’Byrne, F. J. O’Brien, and T. J. Levingstone. **The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair**, *J. Exp. Orthop.*, 2016;3:1, doi: 10.1186/s40634-015-0037-x.
- [101] L. A. Vonk, S. F. J. Van Dooremalen, N. Liv, J. Klumperman, P. J. Coffey, D. B. F. Saris, and M. J. Lorenowicz. **Mesenchymal Stromal / stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro**, *Theranostics*, 2018;8:, doi: 10.7150/thno.20746.

- [102] G. P. Dowthwaite, J. C. Bishop, S. N. Redman, *et al.* **The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population**, *J. Cell Sci.*, 2004;117:889–897, doi: 10.1242/jcs.00912.
- [103] R. Williams, I. M. Khan, K. Richardson, *et al.* **Identification and Clonal Characterisation of a Progenitor Cell Sub-Population in Normal Human Articular Cartilage**, *PLoS One*, 2010;5:, doi: 10.1371/journal.pone.0013246.
- [104] A. De Luna, A. Otahal, and S. Nehrer. **Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles – Silver Linings for Cartilage Regeneration?**, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020;8:, doi: 10.3389/fcell.2020.593386.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-	Avidin-Biotin-Komplex-
ACP	Articular Cartilage Progenitor Cells
ACT	Autologe Knorpelzelltransplantation
ADAMTS-	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-
BMI	Body-Mass-Index
CCL-	CC-chemokine ligand-
COL-	Collagen-
CT	Computertomographie
CXCL-	CXC-chemokine ligand-
CXR	CXR-chemokine ligand-
d	Tag
DGOU	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMMB	1,9-Dimethyl-methylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIH	HIF inhibierender Faktor
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast growth factor
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronsäure
HIF-	Hypoxia inducible factor
HSA	Humanes Serumalbumin
IL-	Interleukin-
IgG	Immunglobulin-G
MACT	Matrixassoziierte Autologe Knorpelzelltransplantation
MMP-	matrix Metalloproteinase-
MSC	Mesenchymale Stammzelle
OA	Osteoarthrose/ Osteoarthritis

OARSI	Osteoarthritis Research Society International
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylasen
RPM	revolutions per minute
sGAG	sulfatierte Glykosaminoglykane
TNF-	Tumornekrosefaktor-
VHL	Von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Komplex

7.2 Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Pattappa, G*.; Krueckel, J*.; Schewior, R.; Franke, D.; Mench, A.; Koch, M.; Weber, J.; Lang, S.; Pfeifer, C.G.; Johnstone, B.; Docheva, D.; Alt, V.; Angele, P.; Zellner, J.
Physioxia Expanded Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Have Improved Cartilage Repair in an Early Osteoarthritic Focal Defect Model.
Biology 2020, 9, 230. PMID: 32824442

* These authors contributed equally to this work

7.3 Selbstständigkeitserklärung

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Peter Angele und Dr. Girish Pattappa angeregt. Die Überwachung der Ausarbeitung der Dissertation erfolgte durch Prof. Dr. Peter Angele und Dr. Girish Pattappa.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

7.4 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei all jenen, die mich auf dem Weg zur Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt danke ich, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, in seiner Abteilung zu promovieren.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Angele, danke ich besonders für die Einblicke in dieses höchst interessante Gebiet sowie für die Unterstützung und Anregungen während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Herrn Dr. Girish Pattappa danke ich für die bestmögliche Betreuung und für die zahllosen Anmerkungen und Vorschläge, die unabdingbar für das Erstellen dieser Arbeit waren. Ebenso anerkennen möchte ich den uneigennütigen Einsatz bei zahlreichen Versuchen sowie die exzellente Zusammenarbeit in allen Bereichen und die stets problemlose Kommunikation.

Frau Prof. Dr. Denitsa Docheva danke ich für die Schaffung einer produktiven und äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre sowie für Ihre zahlreichen Verbesserungsvorschläge und Förderung.

Herrn Prof. Dr. Johannes Zellner danke ich für die praktischen und fachlichen Empfehlungen. Ebenso bin ich für den zeitlichen Einsatz, der für die Durchführung der Experimente notwendig war, äußerst dankbar.

Herrn Dr. Johannes Weber, Dr. Siegmund Lang und Dr. Matthias Koch danke ich herzlich für die unzähligen Stunden, die Sie diesem Projekt gewidmet haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Daniela Drenkard, Ruth Schewior und Swetlana Stryhskowa für die geduldige Unterstützung im Labor und wertvollen Tipps und Anleitungen.

Zu guter Letzt gebührt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Dank. Danke für Euren unermüdlichen Einsatz, ohne Euch wäre ich nicht dort, wo ich bin.