

## 2 STAND DER WISSENSCHAFT

### 2.1 Wachstumshormon

#### 2.1.1 Geschichtlicher Überblick

Der Zusammenhang zwischen Hypophyse und Wachstum wurde entdeckt, als man feststellte, daß Patienten mit Akromegalie Hypophysentumoren aufwiesen, so z.B. auch Robert Wadlow, der 1928 geborene „Riese von Alton“, der mit einer Größe von 2,72 m noch heute als einer der größten Menschen der Welt gilt. 1909 wird die erste gelungene Hypophysektomie bei Hunden durch Aschner beschrieben, wobei er beobachtet, daß es nicht nur zum Wachstumsstillstand, sondern auch zu massiven Fetteinlagerungen im Körper der Tiere kommt (Aschner 1909). Anfang der zwanziger Jahre züchten Evans und Long Riesenratten, indem sie normalen Ratten ein Extrakt aus Rinderhypophysen injizieren (Evans und Long 1921). In den vierziger Jahren stellt man fest, daß Extrakte aus Rinder- und Schweinehypophysen zwar bei niederen Tieren in diesem Sinne wirksam sind, nicht aber beim Menschen: 1945 zeigen Wilhelmi und Pickford, daß Präparate aus Fischhypophysen bei Fischen wirksam sind, nicht jedoch bei Ratten (Wilhelmi 1955; Wilhelmi 1968). 1959 legen Knobil und Greep in einem Experiment an Affen dar, daß bei diesen Präparate aus Schweine- und Rinderhypophysen nicht wirken, jedoch solche aus Affenhypophysen (Knobil und Greep 1959). Damit war endgültig eine Speziespezifität für Wachstumshormon bewiesen, d.h. Wachstumshormonpräparate von Spezies unterhalb der Primaten sind bei Menschen unwirksam, jedoch scheinen Präparate höherer Säugetiere bei niederen Säugetieren und auch Amphibien oder Fischen wirksam zu sein. Bereits 1951 entwickelte Raben eine Methode, um Wachstumshormon aus den Hypophysen Verstorbener zu isolieren und wies im Anschluß nach, daß dieses bei einem zwerghenwüchsigen Patienten das Wachstum förderte (Raben und Westermeyer 1951). Daraufhin wurde in den USA die *National Pituitary Agency* gegründet, die in ganz Nordamerika menschliche Hypophysen sammelte, und die lange Zeit die einzige Quelle für menschliches Wachstumshormon darstellte, um Kinder mit Wachstumsstörungen behandeln zu können.

Heute ist allgemein bekannt, daß ein Überschuß an Wachstumshormon im Kindesalter zu einem proportioniertem Riesenwuchs, dem sogenannten Gigantismus führt, ein Mangel hemmt das Längenwachstum, die betroffenen Kinder bleiben zwerghenwüchsig. Ein Zwerghenwuchs kann jedoch auf einen genetisch bedingten Defekt der Wachstumshormonrezeptoren und damit einen zu geringen Wachstumsfaktorenspiegel zurückzuführen sein, das erklärt die Rückschläge, die man bei der Therapie von

zwerghenwüchsigen Kindern mit Wachstumshormon erlitt. Ein Überschuß an Wachstumshormon im Erwachsenenalter führt zur Ausbildung einer Akromegalie. Infolge vermehrten Wachstums insbesondere von Gesichtsteilen und –skelett sowie der Extremitäten kommt es bei den Betroffenen zu einer selektiven Vergrößerung der Akren. Anfang der siebziger Jahre gelang es dann schließlich, die Struktur von Wachstumshormon aufzuklären (Li, Dixon *et al.* 1969; Li und Dixon 1971; Niall 1971; Wilhelmi 1974).

### 2.1.2 Struktur und Wirkungsweise

Das Wachstumshormon (auch: somatotropes Hormon, Somatotropin,  $GH^1$ ) von Mensch und anderen Säugetieren ist ein aus 191 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und wird in der Adenohypophyse gebildet, es gibt verschiedene physiologische Varianten, die sich in ihrer Länge unterscheiden, inwiefern diese sich in ihrer Wirkung unterscheiden, gilt es noch zu klären. Das menschliche Wachstumshormon weist zwei Disulfidbrücken auf, dadurch ist die Aminosäurenkette des Hormons in zwei Schleifen gelegt (Li, Dixon *et al.* 1969; Li und Dixon 1971; Niall 1971; Wilhelmi 1974).

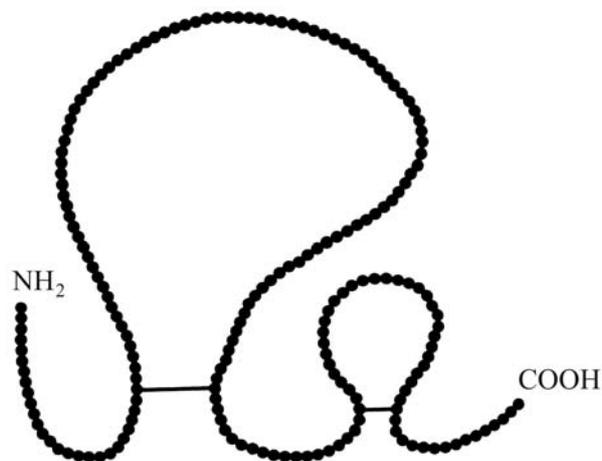


Abbildung 2.1-1: Struktur des humanen Wachstumshormons (Crapo 1986)

<sup>1</sup> Die der Entdeckungsgeschichte zuzuschreibenden Nomenklaturen sind noch nicht vereinheitlicht: STH = somatotropes Hormon, Somatotropin;  $GH$  = *growth hormone*. Speziesangaben, wie z.B. b = bovin, h = human, p = porcin. werden vorangestellt, ebenso die Herkunft aus gentechnologischer Produktion, die mit einem r = rekombinant gekennzeichnet wird.

Heute wird Wachstumshormon gentechnologisch mit Hilfe von *E. coli* Bakterien hergestellt, dazu wird die Gensequenz, in der Wachstumshormon kodiert ist, isoliert und in das Bakterium eingebracht. Das von den Bakterien produzierte Wachstumshormon wird gereinigt und lyophilisiert (Schröter, Korschewitz *et al.* 1977; Abdel-Meguid, Smith *et al.* 1986; Abdel-Meguid, Shieh *et al.* 1987).

Die Heterogenität zwischen humanem und porcinem Wachstumshormon liegt bei 61 Aminosäuren (Ottaway 1959; Papkoff, Li *et al.* 1962; Chen, Wilhelmi *et al.* 1970; Wilhelmi und Mills 1972).

Die Sekretion des Wachstumshormons durch die Adenohypophyse erfolgt über eine pulsatile Freisetzung in einem diurnalen Rhythmus, die Hauptfreisetzung findet während der Nacht statt, bzw. während des Schlafens, d.h. in dieser Zeit erfolgen die Freisetzungspulse in einer höheren Frequenz, nicht unbedingt mit höherer Amplitude (Willoughby, Martin *et al.* 1976).

Viele physiologische Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Entwicklungsstadium, Ernährungszustand, Körperzusammensetzung, Trainingszustand, Streß und auch andere Hormone haben einen Einfluß auf die Amplitude und Frequenz der Wachstumshormonsekretion.

Die Kontrolle der Wachstumshormonfreisetzung durch die Adenohypophyse erfolgt vor allem über zwei im Hypothalamus gebildete Peptide, das Wachstumshormon-Releasing Hormon und das Somatostatin (Burgus, Ling *et al.* 1973; Wehrenberg, Ling *et al.* 1982; Bohlen, Esch *et al.* 1983; Guillemin, Brazeau *et al.* 1984; Guillemin, Zeytin *et al.* 1984; Tannenbaum und Ling 1984; Gelato und Merriam 1986).

Das Wachstumshormon-Releasing Hormon (GHRH=*growth hormone releasing hormone*), das im *Nucleus arcuatus* und *Nucleus ventromedialis* synthetisiert wird, stimuliert sowohl die Synthese als auch die Freisetzung von Wachstumshormon. GHRH ist ein Polypeptid bestehend aus 44 Aminosäuren, inzwischen sind aber auch synthetische Analoga mit 24, 29 oder 45 Aminosäuren bekannt. Porcines GHRH unterscheidet sich von humanem in drei Aminosäuren (Bohlen, Esch *et al.* 1983; Guillemin, Brazeau *et al.* 1984; Guillemin, Zeytin *et al.* 1984; Gelato und Merriam 1986).

Das Somatostatin, gebildet in den *Nuclei peri- et paraventricularis*, hemmt die Freisetzung von Wachstumshormon, ohne jedoch dessen Synthese zu beeinflussen. Es ist ein relativ kurzkettiges Polypeptid zusammengesetzt aus 14 Aminosäuren (Burgus, Ling *et al.* 1973).

GHRH und Somatostatin gelangen dann über die Blutbahn des hypophysären Pfortaderkreislaufs zur Hypophyse und beeinflussen dort die Sekretion von Wachstumshormon.

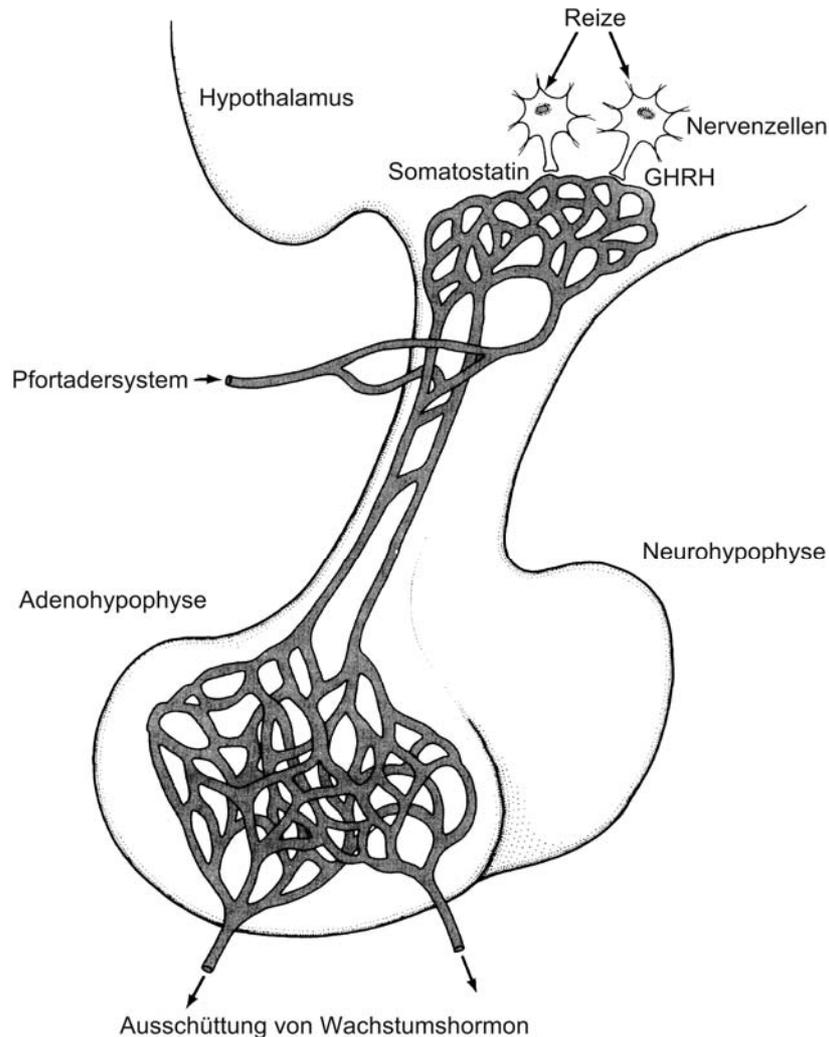


Abbildung 2.1-2: Die Abgabe von Wachstumshormon aus der Adenohypophyse wird über Hypothalamusneuronen gesteuert, die auf Reize hin GHRH und Somatostatin in das Pfortadersystem ausschütten (Crapo 1986).

Die Produktion und Abgabe von GHRH in den Hypothalamusneuronen wird über neurale und humorale Mechanismen kontrolliert. Hyperglykämie, Glukagon, Vasopressin,  $\alpha_2$ -Agonisten und Glukokortikoide steigern die GHRH- und damit auch die Wachstumshormonfreisetzung, während hypoglykämische Stoffwechselzustände diese hemmen. Ein zusätzlicher Regelmechanismus besteht durch den Schlaf-Wach-Rhythmus über das limbische System. Während GHRH anscheinend für die Initiierung und damit auch die Frequenz der Wachstumshormonpulse verantwortlich ist, beeinflusst Somatostatin die Pulsamplitude. Werden Ratten oder Menschen mit einem GHRH-Antagonisten immunisiert und damit die

Wirkung von GHRH unterbunden, ist gleichzeitig auch ein Ausbleiben der pulsatischen Freisetzung des Wachstumshormons zu beobachten (Wehrenberg, Ling *et al.* 1982). Eine Immunisierung mit Somatostatin-Antiserum führte bei Ratten dazu, daß die Wachstumshormonsekretionen durch die Hypophyse als Antwort auf eine erfolgte GHRH-Sekretion weniger variabel ausfielen (Tannenbaum und Ling 1984). Dies führte zu der Annahme, daß GHRH und Somatostatin abhängig voneinander freigesetzt werden. Wenn die Sekretion von GHRH gerade ein Maximum aufweist, dann sollte die von Somatostatin entsprechend bei einem Minimum liegen, dieser Zusammenhang ließ sich aber aufgrund mehrerer Versuche mit gegenläufigen Ergebnissen nicht beweisen.

Die Sekretion von Wachstumshormon bleibt auch während einer kontinuierlichen hochdosierten Infusion von GHRH pulsatil (Vance, Kaiser, Evans, Furlanetto *et al.* 1985; Vance, Kaiser, Evans, Thorner *et al.* 1985). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß eine intermittierende Somatostatinausschüttung für eine zeitliche Steuerung der Wachstumshormonpulse wichtig ist (Kasting, Martin *et al.* 1981). Durch den Einsatz von Pharmaka, so z.B. Pyridostigmin, einem Cholinesterase-Inhibitor, der die Wirkung oder Freisetzung von Somatostatin verhindert, konnte eine verstärkte Antwort auf eine GHRH-Ausschüttung in Form von erhöhter Wachstumshormonfreisetzung beobachtet werden (Massara, Ghigo *et al.* 1986). Auch gibt es Anhaltspunkte dafür, daß GHRH und Somatostatin produzierende Neurone im Hypothalamus interagieren: auf GHRH-synthetisierenden Neuronen im Hypothalamus wurden Somatostatinrezeptoren gefunden (McCarthy, Beaudet *et al.* 1992).

Möglicherweise ist die Interaktion dieser zwei im Hypothalamus gebildeten Neuropeptide das Geheimnis der Regulation der pulsatischen Freisetzung von Wachstumshormon.

Der pulsatile Charakter der Wachstumshormonwirkung wird durch Nahrungskomponenten und Metaboliten tagsüber verdeckt. Glukosegaben führen zunächst zu einem deutlichen Abfall des Wachstumshormonspiegels, dem nach 3-5 Stunden ein deutlicher Anstieg folgt. Arginin, wie auch andere Aminosäuren, führt vermutlich über eine Hemmung der Somatostatinausschüttung zu einem Anstieg des Wachstumshormonspiegels (Hertelendy, Takahashi *et al.* 1970). Freie Fettsäuren dagegen hemmen die Wachstumshormonausschüttung (Fineberg, Horland *et al.* 1972).

Wachstumshormon wird von der Adenohypophyse in den Blutkreislauf abgegeben. Im Blut wurden bisher zwei verschiedene Wachstumshormon-Bindungsproteine (GHBPs=*growth hormone-binding proteins*) identifiziert, ein 60kDa Protein, das identisch ist mit dem extrazellulären Teil des Wachstumshormon-Rezeptors der Zellen und eine hohe Affinität für

die vorherrschende 22kDa Variante des Wachstumshormons besitzt aber eine geringe Kapazität und ein 100-170kDa GHBP mit geringer Affinität zu diesem aber einer hohen Kapazität.

Die Konzentrationen der GHBP sind über den Tag konstant, d.h. sie werden nicht von der Wachstumshormonsekretion beeinflusst. Die Bindung des Wachstumshormons an ein Bindungsprotein erhöht seine Halbwertszeit, die durchschnittliche Halbwertszeit von Wachstumshormon beträgt frei 9, an ein Bindungsprotein gebunden 29 Minuten.

Mit diesen Bindungsproteinen oder auch frei gelangt das Wachstumshormon zu seinen Zielzellen, diese besitzen membranständige Glykoproteinrezeptoren für Wachstumshormon. Wachstumshormonrezeptoren wurden bisher in verschiedensten Geweben nachgewiesen, so z.B. in der Muskulatur, im Fettgewebe, im Herz, in der Leber, den Ovarien, auf Fibroblasten, Osteoblasten und Lymphozyten (Roupas und Herington 1989).

### **2.1.3 Wachstumsfaktoren**

#### *Insulin-like growth factors = IGF*

Mit der direkten Wirkung von Wachstumshormon auf seine Zielzelle lassen sich jedoch nicht alle Beobachtungen zufriedenstellend erklären. So stellte man z.B. bereits 1957 fest, daß Blutserum den Einbau von Sulfat ins Knorpelgewebe fördert, das Serum von hypophysectomierten Ratten löste diesen Effekt nicht aus, auch dann nicht, wenn man dem Serum Wachstumshormon hinzufügt. Wurden jedoch hypophysectomierte Ratten mit Wachstumshormon behandelt, so konnte mit deren Serum der oben genannte Effekt wieder erzielt werden (Döcke 1994). Dies führte zu der Theorie, daß nicht Wachstumshormon selbst diesen Prozeß auslöst sondern Mediatoren, die man zunächst aufgrund ihrer Wirkung „*Sulfation factors*“ später Somatomedine nannte. 1972 wurden aus Serum Faktoren isoliert, die die Zellteilung stimulierten, und als deren Produktionsstätte man die Leber identifizierte, sie wurden „*MSA- Multiplication-stimulating activity*“ genannt. Dann fand man heraus, daß Serum auf Muskel- und Fettgewebe eine insulinähnliche Wirkung ausübt, was durch Hinzufügen von anti-Insulin-Antikörpern nicht verhindert werden konnte. Die dafür verantwortlichen Substanzen nannte man „*NSILA-no suppressible insulin-like activity*“. Es zeigte sich, daß all diese Substanzen identisch sind, heute werden sie Insulin-like growth factors (IGFs) genannt (Froesch 1979).

IGF-I und IGF-II sind annähernd identisch in ihrem Aufbau und ihre dreidimensionale Struktur hat Ähnlichkeit mit der von Insulin und Proinsulin (Rinderknecht und Humbel 1978). IGF-I ist ein Peptid bestehend aus 70 Aminosäuren, IGF-II besteht aus 67 Aminosäuren (Humbel, Rinderknecht *et al.* 1978; Rinderknecht und Humbel 1978). IGF-I und II sind bei den verschiedenen Spezies weitgehend strukturhomolog; humaner und porciner IGF-I sind strukturidentisch. IGF-II unterscheidet sich bei Mensch und Schwein in einer Aminosäure, statt Serin beim Menschen befindet sich beim Schwein Asparagin an Position 36.

IGF-I wird vor allem in der Leber gebildet (Bestetti, Blum *et al.* 1992; Binoux 1995), seine Produktion unterliegt dort ganz dem Einfluß von Wachstumshormon. Während der Blutspiegel des Wachstumshormons aufgrund seiner pulsatilen Freisetzung und seiner geringen Halbwertszeit schwankt, ist der Blutspiegel des aus der Leber freigesetzten IGF-I relativ konstant, seine Halbwertszeit liegt bei etwa 8 Stunden, die Stabilität wird vor allem durch Bindungsproteine gewährleistet.

Aber auch diverse andere Zellen sind in der Lage, IGF-I zu synthetisieren, so z.B. die Zellen des Knochenmarks, Osteoblasten und Chondrozyten (Andrew, Hoyland *et al.* 1993; Hayden, Mohan *et al.* 1995).

IGF-II spielt beim erwachsenen Individuum eine eher untergeordnete Rolle, während der fetalen Entwicklung und möglicherweise auch bei reparativen Prozessen wird ihm jedoch wichtiger Einfluß zugesprochen; IGF-II wird sowohl in der Leber gebildet, als auch von diversen Zellen, z.B. von Mesenchymzellen und Osteoblasten.

Die IGFs zirkulieren im Blut gebunden an Bindungsproteine (IGFBP = *insulin-like growth factor binding protein*), die Plasmahalbwertszeit der Aggregate wird mit 4-18 Stunden angegeben. Es sind sechs verschiedene IGFBPs bekannt (IGFBP1-6), deren Funktion bisher nur teilweise entschlüsselt ist. 80-85% des zirkulierenden IGF-I sind an IGFBP-3 gebunden, IGFBP-1 scheint als Inhibitor von IGF-I zu wirken. IGFBP-2 bindet IGF-II, sein Spiegel steigt bei Streßzuständen an. Die Bindungsproteine werden vor allem in der Leber und im Knochenmark gebildet (Minuto, Barreca *et al.* 1991; Bestetti, Blum *et al.* 1992; Binoux 1995; Schmid 1995; Rosen und Pollak 1999).

Die Zielzellen besitzen IGF-Rezeptoren: Zwei in ihrer Struktur unterschiedliche IGF-Rezeptoren sind beschrieben, der Typ I-Rezeptor, ein Rezeptor vom Tyrosinkinase Typ und der Typ II-Rezeptor, der keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Mit diesem äußerlichen Unterschied geht ein Unterschied in deren Bindungsspezifität einher. Der Typ I-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für IGF-I und IGF-II und eine hundertmal geringere für Insulin. Der Typ II-Rezeptor hat eine hohe Affinität für IGF-II, eine geringe für IGF-I und bindet kein

Insulin. Aufgrund der Beobachtung, daß ein gegen den Typ I-Rezeptor gerichteter Antikörper annähernd alle endogenen Effekte beider IGFs verhindert, vermutet man, daß der Typ I-Rezeptor bei den biologischen Antworten auf IGFs die wichtigere Rolle spielt. Der Typ II-Rezeptor ist möglicherweise bedeutsam, um lokale IGF-II Konzentrationen auszugleichen, indem er IGF-II bindet (Rosen und Thies 1995).

Wachstumshormon ist also in der Lage, sowohl auf dem direkten Wege auf Zielzellen Einfluß zu nehmen, als auch auf indirektem Wege, via IGF-I, dies wird die duale Effektor Theorie genannt (Green, Morikawa *et al.* 1985).

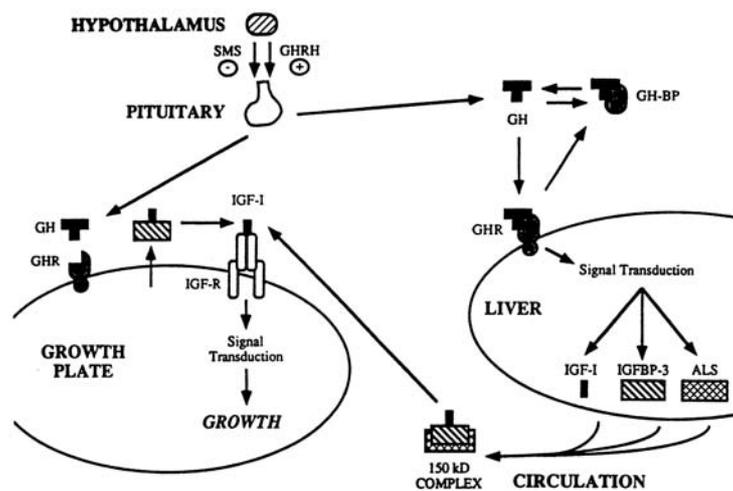


Abbildung 2.1-3: Schema der Wachstumshormon-IGF-I-Achse bei der Regulation des Knochenwachstums (Trippel, Ehrlich *et al.* 1980)

Osteoblasten besitzen sowohl Wachstumshormonrezeptoren, als auch solche für IGF-I und IGF-II und sind zudem noch in der Lage, selbst IGF-I und IGF-II zu synthetisieren (Zheng, Wood *et al.* 1992; Baylink, Finkelman *et al.* 1993; Kassem, Brixen *et al.* 1994; Hill, Reynolds *et al.* 1995). *In vivo* Daten von Mäusen, Hunden und Menschen, lassen vermuten, daß auch Osteoklasten Wachstumshormonrezeptoren besitzen (Zheng, Nicholson *et al.* 1991; Kassem, Brixen *et al.* 1994; Nishiyama, Sugimoto *et al.* 1996; Chihara und Sugimoto 1997; Reddy und Roodman 1998). Neben diesem endokrinen Weg sind die Zellen auch in der Lage sich gegenseitig auf dem parakrinem Weg zu beeinflussen, was die direkte Einflußnahme einer Zelle auf ihre Nachbarzellen bedeutet. Sogar die autokrine Beeinflussung ist möglich, d.h. die Zelle beeinflusst sich mit den ausgeschütteten IGFs selbst (Trippel 1997).

Neben den IGFs gibt es eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren, deren Funktionen und Wirkungsweisen zum Teil noch nicht genau bekannt sind. Die Anzahl der neu entdeckten Wachstumsfaktoren wächst beständig. Ihnen allen ist gemeinsam, daß sie nicht in einem zentralen Organ, wie die IGFs in der Leber, gebildet werden und dann mit dem Blut zu den Zielorganen gelangen, sondern nur von den Zellen vor Ort. Wie bei den IGFs handelt es sich auch bei ihnen um Proteine.

Folgende vier Gruppen von Wachstumsfaktoren scheinen bei den lokalen Regelmechanismen, der Knorpel- und Knochenformation sowie –reparation neben den IGFs eine wichtige Rolle zu spielen (Mohan, Linkhart *et al.* 1984; Joyce, Jingushi *et al.* 1991; Mohan und Baylink 1991; Bolander 1992; Baylink, Finkelman *et al.* 1993; Bourque, Gross *et al.* 1993; Sandberg, Aro *et al.* 1993; Linkhart, Mohan *et al.* 1996; Trippel 1997; Lind 1998; Solheim 1998; Bostrom, Saleh *et al.* 1999):

- *platelet-derived growth factor* = PDGF
- *fibroblast growth factor* = FGF
- *transforming growth factor*  $\beta$  = TGF- $\beta$
- *bone morphogenetic protein* = BMP.

Vertreter aus jeder dieser Gruppen spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der embryonalen Osteogenese.

#### *Platelet derived growth factor* = PDGF

PDGF ist ein 30 kDa-Dimer und wird von den Thrombozyten gebildet. Das Dimer besteht aus zwei verschiedenen Proteinketten: PDGF A und PDGF B. Während das aus Blutplättchen isolierte PDGF ein Dimer ist, scheinen auch Monomere aus den beiden Einheiten natürlicherweise zu existieren. Die Wirkung von PDGF wird durch einen spezifischen Rezeptor vom Tyrosinkinasetyp vermittelt. PDGF-Rezeptoren findet man auf Zellen des Skelettstoffwechsels, sowohl während der embryonalen Skelettbildung, als auch bei Reparationsvorgängen nach Frakturen beim erwachsenen Individuum (Andrew, Hoyland *et al.* 1995).

### Fibroblast growth factors = FGFs

Die FGF-Familie besteht aus 9 verwandten Proteinen, FGF-1-9. FGF-1 und FGF-2 waren die ersten, die man entdeckte, sie werden auch saurer und basischer FGF genannt und weisen eine Homologie von etwa 50% auf. Bisher hat man vier FGF-Rezeptorgene isoliert, die multiple Isoformen eines FGF-Rezeptors vom Tyrosinkinasetyp kodieren. FGFs scheinen während der Frakturheilung von Bedeutung zu sein (Baird und Walicke 1989; Radomsky, Thompson *et al.* 1998).

### Transforming growth factors $\beta$ = TGFs- $\beta$

Zur Zeit sind fünf verschiedene TGFs- $\beta$  bekannt, die TGFs- $\beta$  1-5 genannt werden, wobei TGF- $\beta$ 4 und TGF- $\beta$ 5 bisher nur bei Nichtsäugetieren nachgewiesen wurden. Die TGFs- $\beta$ 1-3 besitzen jeweils 112 Aminosäuren.

Die verschiedenen TGFs- $\beta$  sind, sowohl innerhalb einer Spezies als auch beim Vergleich verschiedener Spezies, untereinander sehr ähnlich. Humaner TGF- $\beta$ 2 ist zu 71% identisch mit humanem TGF- $\beta$ 1, humaner TGF- $\beta$ 1 ist zu 99% identisch mit murinem, während humaner TGF- $\beta$ 2 zu 97% mit murinem TGF- $\beta$ 2 identisch ist. TGF- $\beta$ 3 ist zu 76% identisch mit TGF- $\beta$ 1 und zu 80% mit TGF- $\beta$ 2.

Die drei TGF- $\beta$ -Rezeptortypen I-III findet man auf vielen unterschiedlichen Zelltypen, so auch auf Zellen des Skelettsystems. Der Typ I TGF- $\beta$  Rezeptor scheint nur TGF- $\beta$  binden zu können, wenn er neben einem Typ II TGF- $\beta$  Rezeptor liegt, TGF- $\beta$  bindet dann zunächst an den Typ II TGF- $\beta$  Rezeptor und veranlaßt damit den Typ I TGF- $\beta$  Rezeptor mit ihm in Verbindung zu treten. Der Typ III TGF- $\beta$  Rezeptor bindet TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 mit der gleichen Affinität, möglicherweise bindet TGF- $\beta$  erst an den Typ III TGF- $\beta$  Rezeptor, der dann den TGF- $\beta$  dem Typ II TGF- $\beta$  Rezeptor präsentiert. Eine lösliche Form des Typ III TGF- $\beta$  Rezeptors wurde im Serum gefunden und fungiert damit vielleicht als TGF- $\beta$  Bindungsprotein. TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 sind in der Lage das Heterodimer TGF- $\beta$ 1.2 zu bilden (Rosen und Thies 1995).

Die Expression von TGF- $\beta$  1 und 2 während der Frakturheilung ist in den letzten Jahren eingehend untersucht worden (Celeste, Iannazzi *et al.* 1990; Joyce, Jingushi *et al.* 1990; Joyce, Roberts *et al.* 1990; Joyce, Terek *et al.* 1990; Kim und Ballock 1993; Chang, Hoang *et al.* 1994; Matsumoto, Matsunaga *et al.* 1994; Hosoi, Asaka *et al.* 1996; Si, Jin *et al.* 1997; Bostrom und Asnis 1998; Fukumura, Matsunaga *et al.* 1998; Li, Zhou *et al.* 1998; Rosier, O'Keefe *et al.* 1998; Frenkel, Saadeh *et al.* 2000; Steinbrech, Mehrara *et al.* 2000).

### Bone morphogenetic proteins = BMPs

BMPs wurden zunächst in demineralisiertem Knochen nachgewiesen. Sie sind in der Lage, die Bildung von ektoem Knorpel- und Knochengewebe zu induzieren, wenn man sie subkutan oder intramuskulär appliziert. Da man BMPs in vielen unterschiedlichen Gewebetypen nachgewiesen hat, so z.B. im Gehirn (BMP-6), in der Placenta (BMP-7), in den Nieren (BMP-3,4 und 7), in der Lunge (BMP-3, 4, 5 und 6), im Dünndarm (BMP-3 und 7), im Herz (BMP-2, 4, 6 und 7), in den Extremitätenknospen (BMP-2, 4, 5 und 7) sowie in den Zähnen (BMP-3, 4 und 7), liegt die Vermutung nahe, daß BMPs noch andere Aufgaben bei Wachstum und Differenzierung besitzen, als nur die der Knocheninduktion.

Bis auf BMP-1 sind alle BMPs zusammen mit den Wachstums/Differenzierungsfaktoren (*growth/differentiation factors* = GDFs) und der Müller-Inhibitorischen Substanz (MIS) Teile der TGF- $\beta$  Superfamilie<sup>2</sup>. BMP-2 und BMP-4 sind untereinander zu 86% identisch und zu 33-35% identisch mit TGF- $\beta$ . BMP-5, BMP-6, BMP-7 und BMP-8 bilden eine andere Untergruppe, sie sind untereinander zu 73-83% identisch und mit TGFs- $\beta$  zu 33-37%. BMP-3 und BMP-3b bilden eine eigene Untergruppe, ebenso BMP-9 und BMP-10, BMP-12, 13 und 14 und schließlich BMP-11 mit GDF-8.

BMPs sind 30-38 kDa Homodimere und obwohl dies die Standardform zu sein scheint, gibt es natürlicherweise auch Heterodimere mit identischer, wenn nicht sogar gesteigerter Bioaktivität.

BMPs haben eine Länge zwischen 100 und 140 Aminosäuren, sie sind ebenfalls sowohl innerhalb einer Spezies, als auch bei verschiedenen Spezies untereinander sehr ähnlich, so sind z.B. humanes, murines und ratines BMP-2 zu 100% identisch. Humanes, murines und ratines BMP-4 zu 98% und humanes und murines BMP-6 zu 96%. Da auch mit den bereits getesteten bovinen BMPs eine hohe Homologie besteht, so sind humanes und bovines BMP-10 und BMP-11 zu 100% identisch, liegt die Vermutung nahe, daß auch porcine und humane BMPs vergleichbare Homogenitätsgrade besitzen.

BMPs haben vielfältige Aufgaben während der Embryogenese und im adulten Organismus. Vor allem BMP-2 und 4 werden bei der enchondralen Ossifikation während der postnatalen Knochenformation und der Frakturheilung gefunden (Celeste, Iannazzi *et al.* 1990; Sandberg, Aro *et al.* 1993; Wozney 1993; Jin, Yang *et al.* 1994; Nakase, Nomura *et al.* 1994; Bostrom,

---

<sup>2</sup> BMP-1 gehört nicht zur TGF- $\beta$  Superfamilie und ist technisch gesehen kein BMP. Es erhielt diesen Namen, weil ein Bioassay, der dem Nachweis von BMP-2, 3 und 4 diente, falsch gelesen wurde, eigentlich ist BMP-1 eine Peptidase, die Prokollagen I, II und III spaltet, damit aus den Fragmenten Kollagenfibrillen entstehen können.

Lane *et al.* 1995; Kaplan und Shore 1996; Si, Jin *et al.* 1997; Bostrom 1998; Bostrom und Camacho 1998; Wozney und Rosen 1998; Bostrom, Saleh *et al.* 1999; Sanyal, Sarkar *et al.* 1999; Schmitt, Hwang *et al.* 1999; Frenkel, Saadeh *et al.* 2000). BMPs scheinen auch eine Rolle bei pathologischen Knochenbildungsprozessen zu spielen, so z.B. bei ektopischen Ossifikationen und Knochentumoren (Gitelman, Kobrin *et al.* 1994).

#### **2.1.4 Wirkung von Wachstumshormon**

Die Hauptaufgabe des Wachstumshormons ist es, das Körperwachstum zu stimulieren, indem es die Leber und andere Gewebe anregt, IGF-I auszuschütten. Via IGF-I wird die Proliferation von Chondrozyten angeregt, was ein Längenwachstum der Knochen zur Folge hat. In direkter Wirkung induziert Wachstumshormon die Differenzierung der Chondrozyten. IGF-I besitzt auch eine Schlüsselfunktion beim Muskelwachstum, es stimuliert sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Myoblasten, was einen direkten Anstieg der Muskelmasse zur Folge hat. Unter einer Behandlung mit Wachstumshormon kommt es außerdem zu einer Gewichtszunahme der inneren Organe, die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinsynthese im Muskel und anderen Geweben wird angeregt, damit hat Wachstumshormon einen anabolen Effekt auf den Proteinmetabolismus. IGF-I reduziert zusätzlich die Proteolyse und die Oxidation von Proteinen und steigert die Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen. Auf den Fettstoffwechsel wirkt Wachstumshormon katabol, die Lipogenese ist unter seinem Einfluß herabgesetzt, daraus resultieren ein erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren und ein reduzierter Cholesterinspiegel im Blut. IGF-I hingegen wirkt auf den Fettstoffwechsel insulinähnlich, es steigert den Transport von Glukose in die Zellen, hemmt die Lipolyse und unterstützt die Lipogenese. Die Wirkung von Wachstumshormon auf den Kohlenhydratstoffwechsel ist komplex, eine einmalige Verabreichung von exogenem Wachstumshormon bewirkt eine kurze insulinähnliche Senkung des Blutzuckers, eine Wirkung, die bei einem Anstieg der Wachstumshormonsekretion im physiologischen Bereich nicht beobachtet wird.

Während Wachstumshormon aber einerseits die Glukoseaufnahme in peripheren Geweben durch eine herabgesetzte Insulinempfindlichkeit vermindert und auch die Glukoneogenese in der Leber hemmt, stimuliert es andererseits paradoxerweise die Insulinsekretion der B-Zellen des Pankreas, die Folge sind sowohl ein erhöhter Glukose- als auch Insulinspiegel im Blut. Wachstumshormon senkt also insgesamt die Glukosetoleranz, was bei häufigen Gaben

exogenen Wachstumshormons zu einer Hyperglykämie führen kann, bedingt durch die erhöhte Insulinresistenz.

In der Niere fördert der Einfluß von Wachstumshormon die Retention von Natrium und Wasser sowie die Reabsorption von Phosphat (Isaksson, Lindahl *et al.* 1988; Edén, Bengtsson *et al.* 1990; Butenandt 1994; Neely und Rosenfeld 1994; Bengtsson 1996; Kaplowitz, Rundle *et al.* 1998).

### **2.1.5 Einsatz in der Medizin**

Wachstumshormon wird schon seit längerer Zeit in der Medizin therapeutisch eingesetzt bei Kindern mit Wachstumshormonmangel, Turnersyndrom und chronischem Nierenversagen. Auch bei Erwachsenen mit einem Wachstumshormondefizit, z.B. nach Hypophysektomie oder Traumatisierung der Hypophyse ist die Gabe von Wachstumshormon angezeigt. Unter der Therapie kommt es zu einer Zunahme an Muskelmasse und zu der Ausbildung eines günstigeren Verhältnis von Muskelmasse zu Fett, weshalb Wachstumshormon auch zunehmend im Sport als Dopingmittel Verwendung findet (Neely und Rosenfeld 1994). Der anabole Effekt von Wachstumshormon kann aber auch bei kachektischen Zuständen, z.B. nach großen Operationen, infolge von Polytraumata schweren Brandverletzungen oder bei Krebspatienten ausgenutzt werden (Belcher und Ellis 1990; Herndon, Barrow *et al.* 1990; Raff und Germann 1997).

Bei Frauen gibt es erste Ansätze, durch die Gabe von Wachstumshormon die Laktation zu verbessern (Milsom, Breier *et al.* 1992). Auch scheint eine Wachstumshormongabe bei manchen Frauen mit Subfertilität, die Ovulation unter Gonadotropin-Therapie positiv zu beeinflussen. Die benötigten Gonadotropingaben waren geringer (Homburg, West *et al.* 1990; Homburg, West *et al.* 1990).

Die positive Beeinflussung von Wundheilungsstörungen oder Knochenbruchheilungen durch die Gabe von Wachstumshormon ist bereits beschrieben, ebenso ist ein experimenteller Einsatz bei Osteoporose erwähnt (Aloia, Vaswani *et al.* 1987).

In der Veterinärmedizin gibt es vor allem in den USA Ansätze, durch die Gabe von Wachstumshormon bei Kühen die Milchproduktion zu erhöhen (Bauman 1999; Bauman, Everett *et al.* 1999). In der Schweinemast gibt es Bestrebungen, durch Wachstumshormongaben eine schnellere Gewichtszunahme und einen höheren Muskelfleischanteil bzw. einen geringeren Fettanteil am Schlachtkörper zu erzielen (Chung,

Etherton *et al.* 1985; Etherton, Wiggins *et al.* 1986; Etherton, Wiggins *et al.* 1987; Evock, Etherton *et al.* 1988).

In den USA ist bovines Wachstumshormon in der Milchproduktion zugelassen, in Australien porcines Wachstumshormon in der Schweinemast, desweiteren equines Wachstumshormon zur Verbesserung der Stickstoffbalanz bei alternden Pferden. In der Europäischen Union ist Wachstumshormon zur Zeit für diese Einsatzzwecke nicht zugelassen.

### **2.1.6 Mögliche Nebenwirkungen einer Wachstumshormonbehandlung**

Als mögliche Nebenwirkungen einer Therapie mit Wachstumshormon sind diskutiert worden: Manifestierung latenter Hypothyreosen, Epiphyseolyse des Femurkopfes, die Bildung von Antikörpern gegen Wachstumshormon, das Entstehen einer Insulinresistenz, die Retention von Wasser, Hypertension, Arthralgie, Auslösung eines Karpaltunnelsyndroms, die Ausbildung akromegalieähnlicher Erscheinungsbilder sowie die Entstehung von Malignomen oder Leukämie (Hintz 1992; Inzucchi 1997).

Eine Femurkopfeipiphyseolyse tritt im allgemeinen bei schnellwachsenden Kindern auf, unter einer Wachstumshormontherapie von Kindern mit einem Wachstumshormonmangel ist keine gesteigerte Häufung dieser Erkrankung feststellbar (Butenandt 1992; Blethen 1995).

Patienten mit einem genetisch bedingten Mangel an Wachstumshormon bilden oft spezifische Antikörper gegen das Hormon, das als Fremdeiweiß erkannt wird und damit antigen wirkt. Als die verwendeten Wachstumshormonpräparate noch nicht die heutige Reinheit aufwiesen, trat dieses Problem auch bei anderen Patienten mit Wachstumshormonmangel häufiger auf; die ersten Präparate biosynthetisch hergestellten Wachstumshormons wiesen noch einen hohen Anteil an Peptidbestandteilen der zur Produktion verwendeten *E. coli*-Bakterien auf, dieser führte ebenfalls zu Antikörperbildung (van Herpen, Rijnberk *et al.* 1994; Blethen, Allen *et al.* 1996).

Bei dem aus Hypophysen Verstorbener gewonnenen Wachstumshormon kam es möglicherweise zur Übertragung von Krankheitskeimen, vor allem das Auftreten der Creutzfeld-Jakob-Krankheit wird auf die Verwendung von infizierten Präparaten zurückgeführt.

Ein weiterer Diskussionspunkt war, ob eine Therapie mit Wachstumshormon zum Auftreten von Malignomen oder Leukämie führt, dies ließ sich nicht bestätigen. Patienten mit Wachstumshormonmangel weisen auch ohne eine Therapie mit diesem Hormon ein erhöhtes Risiko auf, an Leukämie zu erkranken. Bei Patienten, die an einem Wachstumshormonmangel

leiden und ein Malignom oder Leukämie überstanden haben, weisen die mit Wachstumshormon behandelten nicht häufiger ein Rezidiv auf als die ohne Therapie (Stahnke und Zeisel 1989; Allen, Rundle *et al.* 1997; Blethen 1998).

Weit wichtiger ist ein möglicher diabetogener Effekt des Wachstumshormons bei einer Langzeittherapie. Es wird über Patienten berichtet, die unter Wachstumshormongaben eine insulinpflichtige Hyperglykämie entwickelten (Gore, Honeycutt *et al.* 1991).

Kurz nach einer einmaligen Gabe von Wachstumshormon fällt der Blutzucker ab, steigt dann aber deutlich an. Es kommt zu einer vermehrten Insulinausschüttung, um den erhöhten Blutzuckerspiegel zu kompensieren, dies führt zu einer Insulinresistenz, bzw. möglicherweise zu einer Erschöpfung der insulinproduzierenden Zellen im Pankreas und damit zu einem Diabetes, der allerdings nach Absetzen der Wachstumshormontherapie meist reversibel ist. Eine Insulinresistenz wie auch die Ausbildung von akromegalieähnlichen Erscheinungsbildern sind eindeutig dosisabhängig bzw. abhängig von der Dauer der Therapie.

Dieser diabetogene Effekt von chronischen Wachstumshormongaben wurde ebenfalls in Tierversuchen mit Schweinen beobachtet (Gopinath und Etherton 1989; Gopinath und Etherton 1989).

Die Tendenz bei Erwachsenen mit einem Wachstumshormonmangel oder auch bei gesunden älteren Erwachsenen, unter einer Wachstumshormontherapie eine Kohlehydratintoleranz und eine Flüssigkeitsimbilanz, Hyperkalziämie sowie Bluthochdruck, Arthralgie oder häufiger ein Karpaltunnelsyndrom zu entwickeln, sollte genau beobachtet werden und schränkt den Einsatz an gesunden Erwachsenen ein. Jedoch konnten bisher keine schlüssigen Mechanismen für die Pathogenese dieser Probleme aufgezeigt werden.

Daten, die zu mit bovinem Wachstumshormon behandelten Kühen vorliegen, deuten auf das Risiko von vermehrten Zwillingsgeburten sowie ein drastisches Absinken der Fruchtbarkeitsrate hin. Auch traten bis zu 79% mehr Mastitiden und bis zu 50% mehr Klauenerkrankungen auf (White, Madsen *et al.* 1994). Zudem scheint die Verabreichung von Wachstumshormon die Konzentration von IGF-I in der Milch zu erhöhen (Daxenberger, Breier *et al.* 1998).

Beim Menschen wird ein erhöhter Blutspiegel an IGF-I mit der Entstehung von Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen, Prostata- und Lungenkrebs sowie der Entstehung von kolorektalen Tumoren in Verbindung gebracht (Chan, Giovannucci *et al.* 1998; Hankinson, Willett *et al.* 1998; Giovannucci 1999; Ma, Pollak *et al.* 1999; Shim und Cohen 1999; Grimberg und Cohen 2000; Khandwala, McCutcheon *et al.* 2000; Wu, Yu *et al.* 2000).

### 2.1.7 Ausblick

Heutzutage etablierte Indikationen für eine Wachstumshormontherapie sind der hypophysäre Minderwuchs, das Turnersyndrom und andere Formen des Minderwuchses. Ebenso ist ein Einsatz sinnvoll bei renaler Insuffizienz im Kindesalter und als Substitutionstherapie bei Erwachsenen mit Wachstumshormonmangel.

Die Ergebnisse der klinischen Studien an Patienten mit hoher metabolischer Belastung, wie es bei Verbrennungsoptionen, Polytraumapatienten und Patienten mit einer Sepsis der Fall ist, sind widersprüchlich. Die Wachstumshormongaben scheinen hier vor allem Substrate zu mobilisieren und sich nicht positiv auf den Proteinhaushalt auszuwirken (Belcher und Ellis 1990; Chwals und Bistran 1991). Bei diesen stark katabolen Patienten gilt es, neue Strategien der Hormontherapie zu entwickeln, möglicherweise, indem man die systemische Wachstumshormongabe mit der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren, z.B. IGF-I kombiniert. Bei Patienten mit geringer bis mäßiger metabolischer Belastung jedoch beweisen die vorliegenden Studien überzeugend, daß die Gabe von Wachstumshormon sich positiv auf die Wiederherstellung der Patienten auswirkt. Bei dieser doch sehr großen Patientengruppe muß aber auf die hohen Kosten einer Therapie mit Wachstumshormon hingewiesen werden.

Experimentelle Studien zur Heilung von Knochendefekten weisen auf eine Anwendungsmöglichkeit bei Patienten mit großen Verlusten an Knochensubstanz, wie z.B. nach Knochentumorresektionen oder Osteomyelitiden, oder Patienten mit Pseudarthrosen oder nicht heilenden Frakturen hin. Hier gilt es, ebenso wie beim möglichen Einsatz bei Osteoporose, weitere Studien durchzuführen.

Auch der Einsatz bei Frauen mit Subfertilität oder Hypogalaktie muß aufgrund der möglichen Nebenwirkungen überdacht werden.

Bei der Verabreichung von Wachstumshormon an Tiere, die der menschlichen Ernährung dienen, sollte eine besonders strenge Prüfung des Hormoneinsatzes erfolgen, wie sie die Europäische Union zur Zeit betreibt, da nicht geklärt ist, wie sich mögliche Rückstände einer Wachstumshormonbehandlung im Schlachtkörper bzw. in der Milch auf den menschlichen Organismus auswirken.

## 2.2 Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches, aneurales, bradytrophes Gewebe, das durch Diffusion ernährt wird (Buckwalter 1983; Horký 1993).

Knorpel besteht aus Chondrozyten, die in eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kollagen, Proteoglykanen und nicht kollagenen Proteinen, eingebunden sind. Diese Substanzen binden einen beträchtlichen Anteil an Wasser in der Knorpelmatrix und geben damit dem Knorpel die ihm eigenen Materialeigenschaften.

Hyaliner Knorpel enthält etwa 60-80% Wasser, ein Teil davon diffundiert frei durch die Matrix und dient damit der Ernährung der Chondrozyten via Diffusion.

### 2.2.1 Chondrozyten

Die Chondrozyten sind verantwortlich für die Synthese der Matrix, und die Beschaffenheit der Matrix wiederum ist für die Aufrechterhaltung des Chondrozytenstoffwechsels verantwortlich. Die Aktivität der Chondrozyten und ihre Fähigkeit, auf äußere Einflüsse zu reagieren, sind altersabhängig. In jungen Organismen proliferieren die Chondrozyten schnell, teilen sich häufig und synthetisieren viel Matrixsubstanz. Ist der Organismus ausgewachsen und damit seine Skelettreifung abgeschlossen, reduzieren die Chondrozyten ihren Stoffwechsel, ihre Anzahl verringert sich, und sie teilen sich nur noch selten. Auch differieren die Chondrozyten in Aktivität, Form und Größe abhängig von ihrer räumlichen Lage in dem Knorpelgeflecht (Trippel, Ehrlich *et al.* 1980; Nakano, Thompson *et al.* 1985; Eggli, Hunziker *et al.* 1988): Die superfizielle Zone ist am dünnsten, sie bildet die gleitende Gelenkoberfläche und besteht aus feinen, parallel zur Oberfläche ausgerichteten Kollagenfibrillen mit eingewebten, elongierten, inaktiven Chondrozyten. Die darunterliegende mittlere Zone ist bedeutend dicker, die Kollagenfibrillen sind hier größer und arkadenartig angeordnet, die Chondrozyten sind sphäroid. In der tiefen Zone sind die Chondrozyten sphäroid bis kubisch und in Säulen senkrecht zum darunterliegenden Knochen und zur Gelenkfläche orientiert, die Kollagenfibrillen verlaufen zwischen den Knorpelzellsäulen und parallel zu diesen. In der anschließenden Zone des kalzifizierten Knorpels finden diese Kollagenfibrillen eine stabile Insertion. Damit bewirken sie eine feste Verankerung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen, was eine Kraftaufnahme einer auf den Knorpel einwirkenden Kraft durch den Knochen gewährleistet.

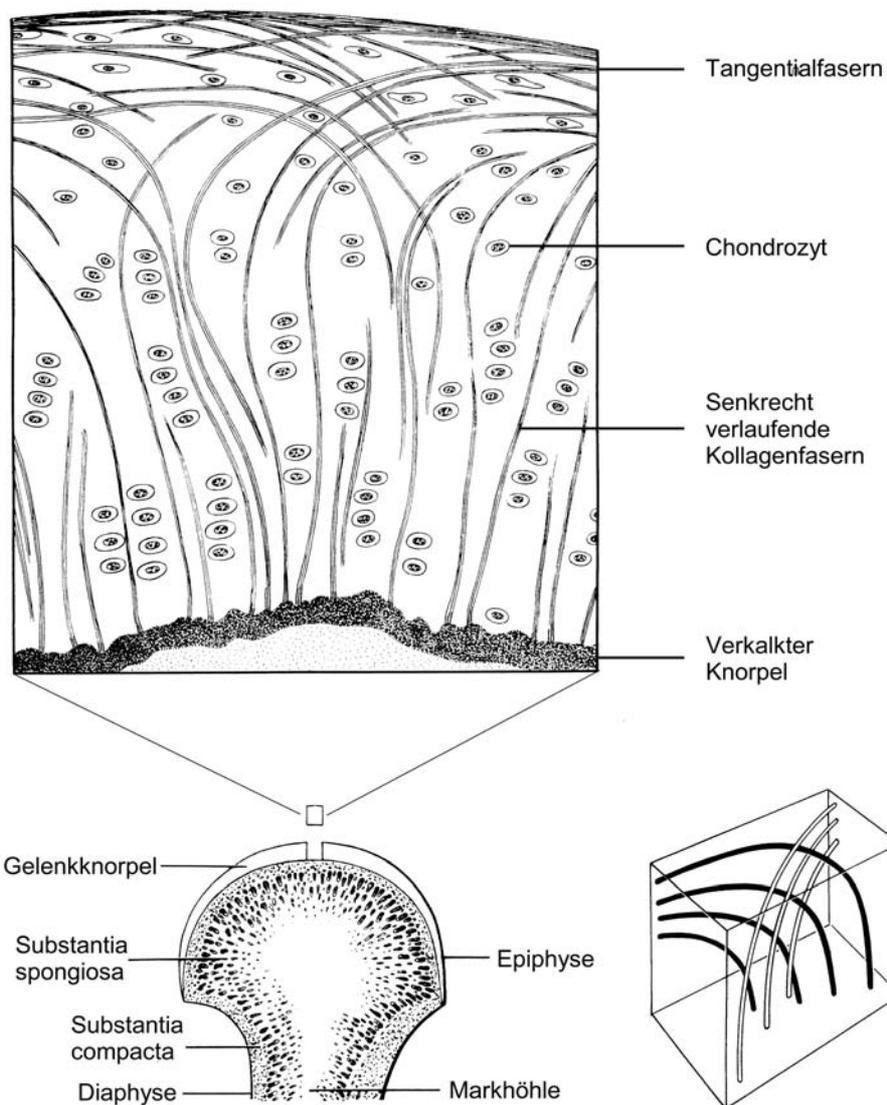


Abbildung 2.2-1 Aufbau des Gelenkknorpels (Junqueira und Carneiro 1996)

### 2.2.2 Extrazelluläre Substanz

Die extrazelluläre Matrix besteht zum einen aus den Kollagenfasern, zum anderen aus der amorphen Grundsubstanz, die die Räume zwischen den geformten Bestandteilen des Knorpels – den Knorpelzellen und den Kollagenfasern – ausfüllt (Poole, Matsui *et al.* 1989). Diese Grundsubstanz enthält Wasser, Salze, niedermolekulare Bestandteile und geringe Mengen an Proteinen, vor allem aber makromolekulare Protein-Polysaccharid-Komplexe – die Proteoglykane (Buckwalter, Kuettner *et al.* 1985; Buckwalter und Rosenberg 1988; Ekman

1990; Ekman, Heinegard *et al.* 1990; Ekman und Heinegard 1992; Buckwalter und Mankin 1998).

In jeder der zuvor beschriebenen vier Zonen des Gelenkknorpels ist auch ein Unterschied im Aufbau und in der Zusammensetzung der Extrazellulärsubstanz festzustellen: Der Ausrichtung, Größe und Zusammensetzung der Fibrillen, dem Gehalt an Kollagen, Proteoglykanen und Wasser. In der den Chondrozyten direkt anliegenden perizellulären Matrix ist fast kein Kollagen, dafür sind um so mehr Proteoglykane und Hyaluronsäure vorhanden. Dies ist der im Lichtmikroskop gut sichtbare Hof der Knorpelzellen. Ein Knorpelhof umgibt in der Regel mehrere isogene Knorpelzellen. Diesem direkt anliegend befindet sich die Knorpelkapsel, ein Netzwerk aus dünnen Kollagenfibrillen, das die Knorpelzellen vor mechanischen Einflüssen schützt. Knorpelhof, Knorpelkapsel und die darin liegenden Knorpelzellen werden als Territorien oder Chondrone bezeichnet. In der interterritorialen Matrix sind die Kollagenfibrillen entsprechend der mechanischen Anforderungen und der Entfernung von der Gelenkfläche wie oben beschrieben orientiert.

90-95% des im Gelenkknorpel enthaltenen Kollagens ist vom Typ II. Kollagen Typ II ist verantwortlich für die speziellen Materialeigenschaften des Gelenkknorpels. Der restliche Anteil besteht aus einem Gemisch von Typ I, VI, IX, X und XI Kollagen.

Die Chondrozyten synthetisieren Prokollagen, außerhalb der Zellen werden durch eine Peptidase die terminalen Peptidgruppen abgespalten und somit Tropokollagen gebildet. Das Tropokollagen besteht im Falle von Kollagen Typ II aus drei gleichen alpha-1 Typ II-Ketten die zu einer Tripelhelix formiert sind.

Kollagen Typ II besitzt einen hohen Anteil an Hydroxylysin, einer Aminosäure, die eine Verknüpfung der Tropokollagenmoleküle der Fibrillen untereinander ermöglicht und auch Polysaccharide bindet.

Kollagen Typ I hat einen hohen Anteil an gebundenen Kohlehydraten.

Kollagen Typ VI konnte in der oberflächlichen Gelenkknorpelschicht nachgewiesen werden.

Kollagen Typ IX beinhaltet eine Chondroitinsulfatkette und wirkt möglicherweise als Regulator für den Fibrillendurchmesser der Kollagen Typ II-Fibrillen.

Kollagen Typ X ist ein kurzkettiges Kollagen, das in den oberflächlichen Zonen des Gelenkknorpels gefunden wird, seine Funktion ist noch ungeklärt. Zunächst wurde davon ausgegangen, daß Kollagen Typ X nur bei einer Arthrose in der Nähe von hypertrophen Chondrozyten auftritt. Neuerdings vermutet man, daß es, in stark beanspruchten

Knorpelarealen auftretend, einen zusätzlichen Schutz für den Knorpel bietet (Poole und Pidoux 1989; Rucklidge, Milne *et al.* 1996).

Kollagen Typ XI interagiert mit Kollagen Typ II und bildet mit diesem gemischte Fibrillen.

Wie zuvor bereits erwähnt, besteht die amorphe Grundsubstanz des Knorpels vor allem aus Proteoglykanen, die wiederum aus zahlreichen Proteoglykanuntereinheiten aufgebaut sind. Proteoglykanuntereinheiten besitzen einen Proteinkern, von dem zahlreiche unverzweigte sulfatierte Polysaccharidketten, wie Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat und Heparansulfat ausgehen. Sie sind hydrophil und polyanionisch und damit in der Lage, große Mengen an Wasser zu binden. Die Polysaccharidketten werden Glukosaminoglykane genannt (früher sprach man von Mukopolysacchariden), sie bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die ein Derivat eines Aminozuckers (Glukosamin/Galaktosamin) enthalten. Mindestens einer der Zucker enthält eine negativ geladene Carboxyl- oder Sulfatgruppe. Mit Ausnahme der Hyaluronsäure sind alle Glukosaminoglykane sulfatiert.

Hyaluronsäure kommt in vielen Bindegewebsarten in nur geringer Menge vor, ist aber für den Aufbau der Proteoglykanaggregate unerlässlich. Ihre Disaccharideinheit ist eine Verbindung von N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure. Ein kleines am Ende der Polysaccharidkette liegendes Peptid bildet die Proteinkomponente, es macht aber nur 1-2% des Gesamtmoleküls aus. Jedes Molekül Hyaluronsäure besitzt eine Länge von etwa 2,5  $\mu\text{m}$  und ein Gewicht in der Größenordnung von  $10^6$  Dalton. Neben ihrer Aufgabe als Grundbaustein der Proteoglykane stellt sie den Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit dar.

Chondroitinsulfate sind aus Disaccharideinheiten, die N-Acetylgalaktosamin und Glukuronsäure enthalten, aufgebaut. Die Sulfatesterbindung befindet sich entweder an der 4- oder 6-Hydroxylgruppe, daher spricht man von Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat. Ihr Molekulargewicht liegt bei 30.000 Dalton. Beide kommen in hohem Anteil in der Grundsubstanz des Knorpels vor.

Keratansulfat besteht aus Disaccharideinheiten, die aus N-Acetylglukosamin-6-sulfat und Galaktose gebildet werden. Es besitzt ein geringes Molekulargewicht und wurde bisher aus Knochen, Knorpel und Hornhaut isoliert.

Heparansulfat besitzt eine Disaccharideinheit aus N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure, manchmal auch L-Iduronsäure. Sein Molekulargewicht liegt bei etwa 15.000 Dalton.

Zum besseren Verständnis der sehr komplex aufgebauten Proteoglykane dient folgende Modellvorstellung: Ketten verschiedener Glukosaminoglykane, z.B. Chondroitinsulfat und Keratansulfat sind mit kovalenten Bindungen an ein Proteinrückgrat geknüpft. Dieses Kernprotein mit angekoppelten Glukosaminoglykanen bildet eine Proteoglykanuntereinheit. Viele Proteoglykanuntereinheiten lagern sich mit Hilfe von Bindungsproteinen an ein langes Hyaluronsäurefilament, was dem Gesamtkonstrukt ein flaschenbürstenartiges Aussehen verleiht. Die längeren der unverzweigten Polysaccharidketten neigen zu einer willkürlichen Spiralisierung. Dies gilt vor allem für Hyaluronsäure.

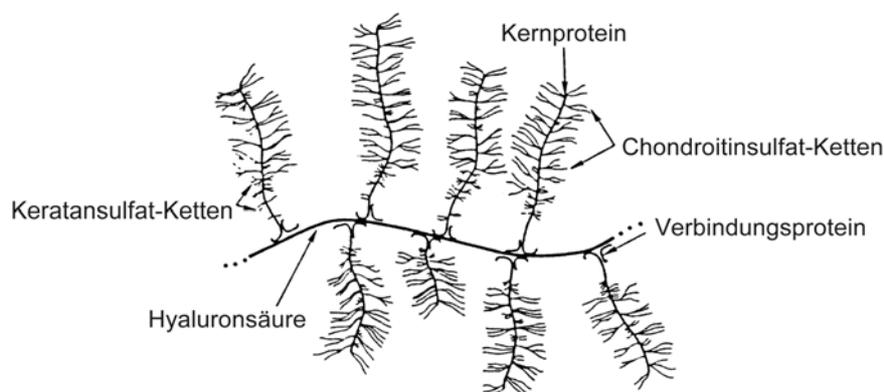


Abbildung 2.2-2: „Flaschenbürste“ aus einem zentralen Hyaluronsäurefilament und mit Hilfe von Verbindungsproteinen angelagerten Proteoglykanuntereinheiten (Junqueira und Carneiro 1996)

Durch partielle Überlappung nebeneinanderliegender Proteoglykanaggregate entsteht ein kontinuierliches dreidimensionales Netzwerk, in das Wasser und darin gelöste Elektrolyte, vor allem  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{++}$ , eingelagert sind.

Verschiedene Proteoglykane sind im Gelenkknorpel vorhanden: Aggrecan, das häufigste große Proteoglykan scheint den Knorpel in stark beanspruchten Bereichen zu verstärken. Aggrecan hat einen hohen Anteil an Chondroitinsulfat- und Heparansulfatseitenketten. Mehr als einhundert Aggrecanmoleküle sind über Bindungsproteine an einen Hyaluronsäurestrang gebunden.

Außerdem werden kleinere Proteoglykane und nicht kollagene Proteine beschrieben, die im Knorpel nachgewiesen wurden:

Biglycan und Decorin, sie sind nicht knorpelspezifisch und enthalten entweder Chondroitin- oder Dermatansulfat. Die Kernproteine der beiden sind annähernd homolog, jedoch besitzt Biglycan zwei Glucosaminoglykane und Decorin nur eines. Über die genaue Funktion von

Biglycan ist wenig bekannt, Decorin jedoch bindet sich an Kollagen Typ I und II und vermag dadurch möglicherweise Mineralisationen entlang der Kollagenfibrillen zu verhindern, *in vitro* wirkt es inhibierend auf die Fibrillogenese (Hedbom und Heinegard 1989; Hedbom und Heinegard 1993).

Fibromodulin, ein 59kDa Protein, ist homolog zu Decorin und Biglycan. Es wirkt modulierend auf die kollagene Fibrillenformation und vermag möglicherweise, Mineralisationsvorgänge entlang der Kollagenfibrillen zu verhindern (Hedbom und Heinegard 1993).

C-Propeptid II (Carboxyl-terminal Propeptid des Kollagen Typ II), früher Chondrocalcin genannt, wird in mineralisiertem Knorpel und Gelenkknorpel gefunden (Kujawa, Weitzhandler *et al.* 1989; Poole, Matsui *et al.* 1989).

Fibronectin, ein Glykoprotein, findet man im Stütz- und Bindegewebe, also auch im Knorpel. Es interagiert mit Kollagenen und Proteoglykanen und unterstützt den Zellzusammenhalt.

Chondronectin ist möglicherweise ein Kittfaktor zwischen Chondrozyten und Kollagen Typ II in Gegenwart von Proteoglykanen (Hewitt, Varner, Silver, Dessau *et al.* 1982; Hewitt, Varner, Silver und Martin 1982).

Anchorin CII ist ein Protein, das aus der Zellmembran von Hühnerchondrozyten isoliert wurde, wo es als Rezeptor für Kollagen zu fungieren scheint. Es ist zu beobachten, daß in den unterschiedlichen Zonen des Gelenkknorpels unterschiedliche Mengen und unterschiedliche Qualitäten an Proteoglykanen gebildet werden (Pfaffle, Ruggiero *et al.* 1988; Pfaffle, Borchert *et al.* 1990).

Diverse andere Proteine wurden bereits im Knorpel nachgewiesen, ihre Funktion ist aber noch unklar.

Während in den oberflächennahen Schichten ein höherer Anteil an kurzkettigen und nichtaggregierten Proteoglykanen zu finden ist, weisen die tieferen Schichten eine hohe Anzahl an großen Proteoglykanaggregaten auf, die von den großen blasenförmigen Chondrozyten im knochennahen Bereich des Gelenkknorpels gebildet werden. Insgesamt sind aber in den oberflächlichen Schichten weniger Proteoglykane nachzuweisen. Dieser Befund wird auch durch die Feststellung gestützt, daß der Gehalt an Keratansulfat von der Gelenkoberfläche zum Knochen hin zunimmt.

### **2.2.3 Kalkknorpel**

Die verkalkte Knorpelzone bildet die Verbindung zwischen dem hyalinen Knorpel und dem darunterliegenden Knochen (Norrdin, Kawcak *et al.* 1999). Während der Übergang von

unverkalktem zum verkalkten Knorpel eine annähernd gleichförmige, schwach gewellte Linie darstellt, ist diese an der Grenze zwischen Kalkknorpel und Knochen stark gewellt. Am Übergang von kalzifiziertem zu nicht kalzifiziertem Knorpel läßt sich mit Hilfe der Hämatoxylin-Eisen-Färbung eine dünne Linie nachweisen, die sogenannte „*blue line*“ oder „*tidemark*“, die oft auch mehrfach vorhanden sein kann. Die Stärke dieser *tidemark* beträgt zwischen 2 und 5 µm. Sie stellt einen Ort der aktiven Mineralisation dar, dies geschieht entweder allmählich oder aber auch periodisch, was ihre hin und wieder auftretende mehrfache Anlage erklärt. Die Kalkknorpelzone ist arm an Chondrozyten, die rundlich imponieren und häufig nekrotisch erscheinen. Die Kalkknorpelzone macht etwa 5-10% der Gesamtknorpeldicke aus. In ihr gibt es zellfreie Lakunen und vertikale Kanäle, die als fingerförmige Ausläufer des subchondralen Knochens in den Kalkknorpel hineinragen. Darin können sich Gefäße befinden, die teilweise Kontakt zu Zellclustern des hyalinen Knorpels haben, jedoch niemals die *tidemark* durchdringen.

#### **2.2.4 Subchondraler Knochen**

An der Knochen-Kalkknorpel-Grenze besteht eine enge Vernetzung zwischen beiden Geweben. Die kollagenen Fasern des kalzifizierten Knorpels sind senkrecht fest mit dem darunterliegenden Knochen verzahnt. Der Kalkknorpel gleicht damit die Unebenheiten des darunterliegenden Knochens aus. Während die Fasern des hyalinen Knorpels ohne Unterbrechung in den verkalkten Knorpel übergehen, strahlen sie jedoch nicht in den subchondralen Knochen ein. Auch ohne eine derartige Verankerung hält die Verbindung zwischen Kalkknorpel und Knochen aufgrund einer ähnlichen Steifigkeit der beiden Gewebe. Der subchondrale Knochen bildet damit ein verstärktes Widerlager, das die Kräfte, die auf den darüberliegenden Knorpel einwirken, abfängt. Er ist reich an Gefäßen, und das Knochenmark bietet ein großes Reservoir an pluripotenten Stammzellen.

#### **2.2.5 Biomechanische Grundlagen des Gelenkknorpels**

Belastungsmessungen an Knorpel geben Aufschluß über die biomechanischen Eigenschaften von gesundem und erkranktem Knorpel sowie von bei der Knorpelheilung entstehendem Reparationsgewebe.

Die primäre Belastung des Knorpels im Gelenk ist eine Druckbelastung infolge der Kompression des Gelenks. Daher erfolgt die biomechanische Testung von Knorpel in der Regel in Form einer definierten Druckbelastung. Die Steifigkeit, angegeben in Kraft pro

Fläche, gibt die Widerstandsfähigkeit des belasteten Knorpels bis zu seinem Versagen (Festigkeit) oder seine zuvor meßbare Deformierbarkeit (Dehnung) an. Die Steifigkeit des Knorpels wird mit 1 bis 15 MPa angegeben, die Festigkeit und Dehnung mit 10 bis 25 MPa, bzw. 0,24 bis 1,20 MPa.

Die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels stehen in engem Zusammenhang mit der Menge, Ausrichtung und Vernetzung der kollagenen Fasern. In unbelastetem Zustand wird das Kollagenetzwerk in einem prall gespannten Zustand gehalten, bedingt durch die Fähigkeit der Proteoglykane, große Mengen an Flüssigkeit zu binden.

Kempson et al. stellten einen Bezug der Steifigkeit zur Tiefe des Knorpels fest. Präparate aus der superfiziellen Zone wiesen eine Festigkeit von 25 MPa auf, in den tieferen Zonen reduzierte sich diese auf etwa 15 MPa. Desweiteren bemerkten sie, daß die Steifigkeit des Knorpels proportional mit seinem Kollagengehalt zunahm (Kempson, Freeman *et al.* 1968; Kempson 1972; Kempson, Tuke *et al.* 1976; Bader, Kempson *et al.* 1992; Bader und Kempson 1994). Broom *et al.* berichteten über eine Abnahme der Steifigkeit nach Verlust der Proteoglykane (Broom und Poole 1982; Broom und Poole 1983). Die Steifigkeit des Knorpels steht in engem Zusammenhang mit dem Alter. Die Steifigkeit und Druckfestigkeit der superfiziellen Zone nehmen bis zum dreißigsten Lebensjahr zu, um dann wieder zurückzugehen. Die tieferen Zonen zeigen keine Zunahme in den jüngeren Jahren, verlieren dann aber mit dem Alter auch an Drucksteifigkeit und -festigkeit (Kempson 1982).

Auch ist von Bedeutung, ob es sich um einen Bereich geringer oder hoher Belastung handelt. Der Vergleich der mittleren Zonen von Bereichen mit geringer und hoher Belastung zeigt, daß es bei einer Zunahme der Belastung zu einem Rückgang der Zellzahl bei einer Zunahme ihres Volumens kommt. Eine Zunahme des Zellvolumens bedeutet eine Zunahme der Syntheseleistung von Matrixkomponenten. Dies zeigt, daß Gelenkknorpel in der Lage ist, sich der auf ihn einwirkenden Belastung anzupassen (Eggl, Hunziker *et al.* 1988).

Die Anzahl der zugrunde gehenden Chondrozyten steigt linear mit der Schwere des Traumas. Folge des Zelltods von Chondrozyten ist eine verminderte Syntheseleistung im betroffenen Areal und damit ein Verlust an Matrixkomponenten (Jeffrey, Gregory *et al.* 1995; Jeffrey, Thomson *et al.* 1997).

Die Ergebnisse zeigen, daß jeder Schädigungs- und Reparatursprozeß eine Veränderung der Menge an oder Ausrichtung von Kollagenen und Proteoglykanen bedingt und damit das biomechanische Verhalten und somit die Funktion des Gelenkknorpels beeinflusst.

## 2.3 Heilung eines osteochondralen Defekts

### 2.3.1 Rahmenbedingungen

In Studien mit experimentell gesetzten osteochondralen Defekten und deren Heilungsverhalten finden vor allem Ratten und Kaninchen Verwendung (Calandruccio und Gilmer 1962; Kettunen und Rokkanen 1973; Sadiq, Rao *et al.* 1973; Salter, Simmonds *et al.* 1980; Shapiro, Koide *et al.* 1993; Wakitani, Goto *et al.* 1994; Caplan, Elyaderani *et al.* 1997; Kaar, Fraher *et al.* 1998). Nur selten werden Großtiere, wie z.B. Hunde (DePalma, McKeever *et al.* 1966) oder Ziegen (Butnariu-Ephrat, Robinson *et al.* 1996) für solche Modelle herangezogen.

Die gesetzten Defekte sind in ihrer Form und Lokalisation sehr unterschiedlich und die einzelnen Studien dadurch schwer zu vergleichen. Die meisten Untersucher wählen für die von ihnen gesetzten Knorpeldefekte das Kniegelenk. In diesem können Defekte in der Patella, den Femurkondylen, der Trochlea zwischen den beiden Kondylen oder dem Tibiaplateau gesetzt werden. Mit der Lokalisation des Defekts wird zugleich auch die Belastung des neugebildeten Gewebes festgesetzt. Während die Patella, die Rollfurche und der laterale Femurkondylus geringen Druckbelastungen und dafür höheren Scherkräften ausgesetzt sind, wirken auf den medialen Femurkondylus und das Tibiaplateau im hauptlastaufnehmenden Bereich hohe Druckbelastungen. Der Struktur und Zusammensetzung des Gelenkknorpels und der darunterliegenden subchondralen Knochenplatte ist dem jeweiligen Belastungsmuster angepaßt. Damit ist das Heilungsverhalten in unterschiedlichen Gelenkknorpelbereichen schwer zu vergleichen.

Die Heilung eines Knorpeldefekts ist abhängig davon, ob es sich um einen oberflächlichen, nur den Gelenkknorpel verletzenden Defekt handelt, wie er beim sogenannten Knorpel-*shaving* (Minas und Nehler 1997) gesetzt wird, oder ob der Defekt bis in den subchondralen Knochen hineinreicht. Handelt sich um einen osteochondralen Defekt, so ist vorwiegend seine oberflächliche Ausdehnung von Bedeutung (Convery, Akeson *et al.* 1972), nicht die Defekttiefe im subchondralen Knochen. In tierexperimentellen Untersuchungen wird ein osteochondraler Defekt zumeist durch eine einzelne Bohrung mit größerem Durchmesser oder dem Einbringen von multiplen kleineren Bohrlöchern geschaffen, einige Untersucher scarifizieren die Gelenkoberfläche (Mitchell und Shepard 1976; Cheung, Cottrell *et al.* 1978). Desweiteren ist es von Bedeutung, ob das betroffene Gelenk ruhiggestellt oder sofort nach der Operation belastet wird. Eine sofortige Belastung scheint sich im Vergleich zu kontrollierter intermittierender Belastung oder völliger Immobilisation des betroffenen Gelenks positiv auf

die Defektheilung auszuwirken (Salter, Simmonds *et al.* 1980; Shimizu, Videman *et al.* 1987; Moran, Kim *et al.* 1992; Murray, Zhu *et al.* 1999).

Schließlich ist das Alter des betroffenen Individuums zu berücksichtigen. Jüngere Patienten zeigen eine deutlich schnellere Heilung von osteochondralen Defekten, und das neugebildete Gewebe scheint eine bessere Qualität zu besitzen. Als Faustregel gilt, je jünger das Individuum und je kleiner die Defektoberfläche, desto besser die Heilungschancen, bzw. desto haltbarer das Regenerat (Calandruccio und Gilmer 1962; Kettunen und Rokkanen 1973; Dustmann und Puhl 1976; Dustmann und Puhl 1977; Buckwalter, Kuettner *et al.* 1985; Wei, Gao *et al.* 1997; Wei, Rasanen *et al.* 1998; Wei und Messner 1999).

### **2.3.2 Mikroskopische Beobachtungen**

Prinzipiell reagiert jedes Gewebe identisch auf eine Verletzung. Diese Antwort auf ein Trauma kann man in drei Phasen unterteilen: Nekrose, Inflammation und Reparatur. Auch Knorpel reagiert in dieser Weise auf eine Verletzung, jedoch können je nach Art und vor allem Tiefe des entstandenen Defekts Variationen dieses allgemeingültigen Grundschemas auftreten.

Die erste Phase der Nekrose beginnt sofort und ist, abhängig von der Art und Schwere der Verletzung und von der lokalen Blutversorgung, charakterisiert durch ein Absterben mehr oder weniger großer Gewebsareale.

Eine Entzündungsreaktion folgt sofort auf die Nekrose, bzw. geht mit dieser parallel. Während immer noch Zellen infolge des Traumas absterben, ist der entsprechende Bereich bereits entzündlich verändert. Diese zweite Phase ist charakterisiert durch eine massive Hyperämie des geschädigten Areals. Durch beschädigte Gefäße, erhöhten Blutfluß, Gefäßdilatation, Transsudation und Exsudation von Entzündungszellen entsteht ein Hämatom. In dem geschädigten Bereich bildet sich ein dichtes Fibrinnetz. In diesem ist eine große Anzahl an Entzündungszellen und undifferenzierten mesenchymalen Zellen eingeschlossen. Mit der Zeit werden diese Strukturen organisiert, sie bilden einen „Leimfilm“, der die Wundränder zusammenhält.

Die dritte Phase, die Reparatur, beginnt mit einem Einsprossen von Blutgefäßen in die Fibrinmassen. Die undifferenzierten mesenchymalen Zellen im Fibrin differenzieren zu Fibroblasten, die zunächst ein lockeres gefäßreiches Granulationsgewebe bilden, dann eine fibröse Matrix und schließlich Narbengewebe, das die Wundränder zusammenzieht. Einige

Gewebe im Körper sind zu einer Regeneration in der Lage, d.h. das verlorengegangene Gewebe wird durch gleichartiges Gewebe ersetzt, so zum Beispiel bei der Knochenheilung.

Hyaliner Knorpel ist nicht in der Lage zu regenerieren, bei einer Verletzung wird immer minderwertiges Narbengewebe in Form von fibrösem Knorpel gebildet.

Aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften und vor allem seiner Avaskularität reagiert Gelenkknorpel ein wenig abweichend von diesem allgemeinen Schema auf eine Verletzung.

(Überblick über die Heilung von Knorpeldefekten siehe Calandruccio und Gilmer 1962; DePalma, McKeever *et al.* 1966; Crawford und Campbell 1969; Convery, Akeson *et al.* 1972; Kettunen und Rokkanen 1973; Sadiq, Rao *et al.* 1973; Dustmann und Puhl 1976; Dustmann und Puhl 1977; Frost 1979; Mankin 1982; Kawabe und Yoshinao 1991; Klompaker, Jansen *et al.* 1992; Moran, Kim *et al.* 1992; Shapiro, Koide *et al.* 1993; Wakitani, Goto *et al.* 1994; Silver und Glasgold 1995; Hunziker und Rosenberg 1996; Klompaker, Veth *et al.* 1996; Caplan, Elyaderani *et al.* 1997; Hunziker und Rosenberg 1997; Nakajima, Goto *et al.* 1998; O'Driscoll 1998; Hunziker 1999)

Nach einem Trauma wird Knorpel ebenfalls nekrotisch, Knorpelzellen sterben ab, zerstörte Knorpelmatrix geht zugrunde. Da Knorpelzellen jedoch relativ unempfindlich gegenüber Hypoxie sind, sterben im avaskulären Knorpel weniger Zellen ab als in gut durchblutetem Gewebe mit einer hohen Sauerstoffspannung. Eine Inflammation findet nur statt, wenn es sich um einen osteochondralen Knorpeldefekt handelt, d.h. ein zusätzlicher Schaden im subchondralen Knochen besteht.

Bei einem oberflächlichen Knorpeldefekt fehlt diese zweite Phase. Da keine Blutgefäße bei der Verletzung zerstört werden, können kein Hämatom und kein Fibrinnetz entstehen. Somit gelangen keine Zellen über einsprossende Gefäße an den Ort der Verletzung, um dort zu Fibroblasten oder Makrophagen zu differenzieren. Die gesamte Last des Reparationsvorganges fällt der Synovialmembran und den verbliebenen Chondrozyten zu, die nur begrenzt in der Lage sind, mehr Knorpelmatrix zu synthetisieren und sich zu teilen. (Hunziker und Rosenberg 1996). Das Ergebnis ist immer ein zellarmes Regenerat von minderwertiger Matrixqualität.

Ist der subchondrale Knochen ebenfalls verletzt, findet die Phase der Inflammation statt. Der stark vaskularisierte Knochen liefert zudem noch pluripotente Stammzellen aus seinen Markräumen, die in der Lage sind, zu Fibroblasten und Chondroblasten zu differenzieren.

Diesen positiven Effekt macht man sich in der Klinik zunutze, indem man bewußt die subchondrale Knochenplatte unter einem vorhandenen Knorpeldefekt verletzt, um so die Heilungschancen des Knorpels zu verbessern, zu nennen sind hier die „Pridie-Bohrung“

(multiple Bohrungen kleinen Durchmessers bis in die subchondrale Knochenlamelle, benannt nach dem Entwickler dieser Technik) und die Technik der Mikrofrakturen (Minas und Nehler 1997; Steadman, Rodkey *et al.* 2001). Im Defektbereich bildet sich ein Pfropf aus Blutgerinnsel und Fragmenten des zerstörten Gewebes. Der Fibrinpfropf verspannt die anliegenden gesunden Knorpel-Knochen-Areale miteinander und schafft Leitbahnen für aus dem Knochenmark einsprossende Gefäße. Die dem Defektbereich direkt anliegenden Chondrone des gesunden Knorpels teilen sich zunächst massiv und bilden sogenannte Cluster, die dann meist zugrundegehen. Es bleiben leere *Geisterhöfe* zurück. Die den Defektbereich umgebende Knorpelmatrix verändert ihre Viskosität und „fließt“ über den Defektrand, was eine teilweise Abdeckung und damit Verkleinerung der Defektfläche zur Folge hat (Calandruccio und Gilmer 1962; Ghadially und Ghadially 1975; Bruns, Kersten *et al.* 1997). Mit dem Blut gelangen auch Entzündungszellen in den Defekt, die sich, im Hämatom eingeschlossen, in spindelförmige Fibroblasten und Makrophagen umwandeln, zerstörte Fragmente beseitigen und ein neues Stützgerüst aus Kollagen synthetisieren. An diesem Gerüst entlang sprossen aus dem Knochenmarkraum Gefäße in den Defekt ein. Gleichzeitig bilden sich Endothelzellen aus. Schließlich ist der Defektbereich mit lockerem Bindegewebe, das zahlreiche Gefäße enthält, gefüllt. An der Defektoberfläche, im Kontaktbereich mit der Synovia kommt es teilweise zur Ausbildung einer Synovialmembran (Nakajima, Goto *et al.* 1998).

Die Fibroblasten im unteren Defektbereich nehmen ein polymorphes Erscheinungsbild an, sie wandeln sich zu Chondroblasten- und Osteoblastenvorläufern und schließlich in Chondro- und Osteoblasten um. Am Rand des Defekts, der Knochen-Knorpel-Grenze, entstehen Knorpelinseln, die beständig wachsen und sich dann im Zentrum des Defekts zusammenschließen. An der Knorpel-Knochen-Grenze kommt es zur Ausbildung von Säulenknorpel. Dieser wird von Chondroklasten abgebaut und von lockerem Geflechtknochen ersetzt. An der oberflächennahen Seite der Knorpelinseln werden weiter Fibroblasten in Chondroblasten umgewandelt. Die zellreichen Knorpelinseln breiten sich kontinuierlich in Richtung der Defektoberfläche aus. Der lockere Geflechtknochen wird durch permanentes Remodellieren umgewandelt in stabilen Lamellenknochen. Die Knochenbälkchen richten sich dabei nach der Belastung aus. Der neugebildete Knochen erreicht schließlich das Niveau der ehemaligen Knochen-Knorpelgrenze oder überragt diese zunächst noch etwas. Der darüberliegende neugebildete Knorpel füllt den Defektbereich bis zur Gelenkoberfläche oder darüber hinaus. Er wird mit der Zeit zellärmer und es bilden sich Chondrone aus. Insgesamt ist der neugebildete Knorpel aber immer noch deutlich zellreicher als der anliegende alte

Knorpel. Je nach Betrachtungsweise des Untersuchers wird der neugebildete Knorpel als fibrös oder als „hyalinartig“ bezeichnet.

Obwohl makroskopisch zu diesem Zeitpunkt der ehemalige Defektbereich kaum mehr sichtbar und die Oberfläche glatt und elfenbeinfarben, vergleichbar mit dem umliegenden Knorpel, ist, erscheinen regelhaft die ersten Verschleißerscheinungen. Spalten entstehen an der Grenze von neuem und altem Knorpel, was darauf hindeutet, daß die Vernetzung zwischen den Rändern nicht ausreichend ist. Der neue Knorpel scheint auch weniger belastbar als der alte, er fasert auf und degeneriert, was auf ein minderwertiges fibröses Konstrukt hindeutet.

## **2.4 Möglichkeiten zur Verbesserung der Knorpelheilung**

Knorpelschäden werden zur Zeit auf chirurgischem Wege zu einer Heilungsbeschleunigung angeregt. Bei größeren Defekten werden Transplantate in den Defektbereich eingesetzt. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit dem Einsatz von Substanzen wie Hormonen und Wachstumsfaktoren, die die Knorpelheilung zusätzlich stimulieren sollen. (Überblick siehe Buckwalter, Mow *et al.* 1994; Messner und Gillquist 1996; Wirth und Rudert 1996; Hunziker und Rosenberg 1997; Buckwalter und Mankin 1998; Newman 1998; Hangody, Sukosd *et al.* 1999)

### **2.4.1 Chirurgische Intervention**

Bei einer traumatisch bedingten Schädigung der knorpeligen Gelenkfläche wird versucht, die geschädigte Fläche zu sanieren. Neben der Versorgung von begleitenden Meniskus- oder Kreuzbandschäden geschieht dies über ein Auffrischen der unter dem Knorpeldefekt liegenden subchondralen Knochenplatte. Dieses Verfahren wird Abrasionsarthroplastik bzw. Abrasionschondroplastik genannt. Über Bohrungen oder Fräsungen werden Gefäße und Markräume eröffnet. Durch die somit verbesserte Durchblutungssituation soll die Bildung einer Faserknorpelnarbe forciert werden. In der Regel werden dafür multiple Bohrlöcher (*Pridie-Bohrungen*) oder Mikrofrakturen (*Microfractures nach Steadman*) in den subchondralen Knochen gesetzt (Minas und Nehler 1997; Steadman, Rodkey *et al.* 2001). Empfohlen wird diese Methode bei Knorpelschäden mit einer Ausdehnung von 2-3 cm im Durchmesser und nur kleinen Bereichen mit freiliegendem Knochen. (Überblick über gängige operative Verfahren siehe Klosterman 1978; Glowacki 1986; Zamber, Teitz *et al.* 1989;

Trippel 1990; Buckwalter, Mow *et al.* 1994; Chen, Frenkel *et al.* 1997; Hauselmann und Hunziker 1997; Minas und Nehrer 1997; Buckwalter und Mankin 1998; Buckwalter und Mankin 1998; Newman 1998; Rudert und Wirth 1998; Buckwalter 1999)

### **2.4.2 Transplantate**

Es wird zwischen autologen (vom gleichen Spender) und heterologen (von einem Fremdspender) Transplantaten unterschieden.

Bei Knorpeldefekten bis zu 4 cm<sup>2</sup> kann die Technik der Mosaikplastik (direkte Knorpeltransplantation) angewendet werden (Hangody, Feczko *et al.* 2001). Vom Rand des Femurknorpels werden stiftförmige Knorpel-Knochen-Bioptate entnommen und an der geschädigten Stelle eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die Transplantation von gesundem hyalinen Knorpel.

Desweiteren werden Periostlappen über den Knorpeldefekt transplantiert, damit sich unter diesen neuer Knorpel bildet (O'Driscoll, Keeley *et al.* 1988). Periostlappen können mit einer Knorpelzelltransplantation kombiniert werden. In einem ersten arthroskopischen Eingriff werden gesunde Knorpelzellen aus dem Knie entnommen. Diese werden außerhalb des Körpers vermehrt und in einem zweiten Eingriff in den Knorpeldefekt verbracht. Geeignet sind auch mesenchymalen Stammzellen, die bei einer Knochenmarkspunktion gewonnen werden. Ein weiterer Ansatz ist die Transplantation von Matrixpräparaten. Hierbei handelt es sich um heterologe Transplantate auf der Basis von Kollagenen oder Fibrinogen. Diese können allein, in Kombination mit den oben genannten Zellen (Kawamura, Wakitani *et al.* 1998; Wakitani, Goto *et al.* 1998; van Susante, Buma *et al.* 1999; van Susante, Buma *et al.* 2000) oder mit Wachstumsfaktoren verwendet werden (Grgic, Jelic *et al.* 1997; Sellers, Peluso *et al.* 1997; Nixon, Fortier *et al.* 1999; Sellers, Zhang *et al.* 2000). Synthetische biodegradierbare Materialien wie Polylaktide und Polyglykoside bieten neue Möglichkeiten, befinden sich aber noch nicht im klinischen Einsatz.

### 2.4.3 Hormone

Zu den das Wachstum beeinflussenden Hormonen gehören neben dem Wachstumshormon das thyreotrope Hormon (TSH), sowie Thyroxin (T4), das Parathormon (PTH), Kortison und die Geschlechtshormone.

Ein Mangel an TSH bewirkte eine Verzögerung der enchondralen Ossifikation bei Ratten (Urabe, Hotokebuchi *et al.* 1999). Thyroxin führte bei hypophysectomierten Ratten mit einer Radiusfraktur zu einer Erhöhung der Knochen- und Knorpelformation in der Frakturzone, lag aber in seiner Wirkung unter der von Wachstumshormon (Udupa und Gupta 1965; Tylkowski, Wezeman *et al.* 1976). PTH ist bei Ratten in der Lage, bei täglicher parenteraler Verabreichung die Frakturheilung zu beschleunigen. Holzer *et al.* fanden einen signifikanten Anstieg der Flächen an Kallus und neugebildetem Knochen (Holzer, Majeska *et al.* 1999). Kudo *et al.* versahen Kaninchen mit zylindrischen 3 mm starken osteochondralen Defekten in der Trochlea des Femurs. Anschließend versorgten sie die Tiere für den Zeitraum der Heilung über osmotische Pumpen mit rekombinantem PTH. Ihre Auswertungen ergaben eine Verzögerung der Chondrogenese während der Heilung von osteochondralen Defekten (Kudo, Mizuta *et al.* 2000). Wachstumshormon wirkt anabol auf die Zellen des Knochenstoffwechsels, es stimuliert sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation der Zellen. Seine Wirkung erreicht es auf direktem Wege (Schlechter, Russell, Greenberg *et al.* 1986; Schlechter, Russell, Spencer *et al.* 1986; Slootweg, van Buul-Offers, Herrmann-Erlee und Duursma 1988; Slootweg, van Buul-Offers, Herrmann-Erlee, van der Meer *et al.* 1988; Morel, Chavassieux *et al.* 1993; Slootweg 1993) und auch via IGF. Wachstumshormon und IGF wirken synergistisch. Im Knochen vermag Wachstumshormon direkt auf Osteoblasten und Osteoklasten einzuwirken und steuert auf diesem Wege sowohl Knochenformation als auch –resorption (Mühlbach, Tarsoly *et al.* 1972; Schlechter, Russell, Greenberg *et al.* 1986; Schlechter, Russell, Spencer *et al.* 1986; Isaksson, Lindahl *et al.* 1988; Slootweg, van Buul-Offers, Herrmann-Erlee und Duursma 1988; Slootweg, van Buul-Offers, Herrmann-Erlee, van der Meer *et al.* 1988; Parfitt 1991; Kassem, Blum *et al.* 1993; Morel, Chavassieux *et al.* 1993; Slootweg 1993; Wüster 1993; Hunziker, Wagner *et al.* 1994; Inzucchi und Robbins 1994; Kassem, Brixen *et al.* 1994; Kassem, Mosekilde *et al.* 1994; Wüster 1995; Eriksen, Kassem *et al.* 1996; Ohlsson, Bengtsson *et al.* 1998). Eine Wachstumshormoninfusion scheint einen größeren osteogenetischen Effekt zu bewirken als die Infusion einer äquimolaren Menge an IGF (Schiltz, Ohta *et al.* 1992). Die Wirkung des Hormons ist abhängig von seiner Dosis (Bak, Jorgensen *et al.* 1990; Kassem, Mosekilde *et al.* 1994).

Wachstumshormon scheint die Mineralisation zu verstärken und damit den Mineralsalzgehalt des Knochens zu erhöhen, nicht aber dessen Mineraleichte (Ohlsson, Bengtsson *et al.* 1998). Bei den Chondrozyten der Wachstumsfuge bewirkt Wachstumshormon ebenfalls sowohl Differenzierung als auch Proliferation (Isaksson, Nilsson *et al.* 1990; Isaksson, Ohlsson *et al.* 1991; Hunziker, Wagner *et al.* 1994). *In vitro* potenziert es die Kolonieformation von Chondrozyten (Lindahl, Isgaard *et al.* 1986), allein oder kombiniert mit IGF steigert es deren extrazelluläre Matrixsynthese (Smith, Palathumpat *et al.* 1989; Livne, Laufer *et al.* 1997).

Einige neuere Studien haben sich mit der systemischen Anwendung von Wachstumshormon bei der Knochenheilung beschäftigt (Northmore-Ball, Wood *et al.* 1980; Bak, Jorgensen *et al.* 1990; Bak und Andreassen 1991; Bak, Jorgensen *et al.* 1991; Nielsen, Bak *et al.* 1991; Bak 1993; Mosekilde und Bak 1993; Bail, Raschke *et al.* 1998; Raschke, Bail *et al.* 1999; Raschke, Kolbeck *et al.* 2000). Während die anderen Gruppen mit humanem Wachstumshormon an Ratten arbeiteten, verwendeten Bail *et al.* und Raschke *et al.* rekombinantes artgleiches Wachstumshormon an Schweinen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß Wachstumshormon eine initiale Beschleunigung der Frakturheilung bewirkt. Carpenter *et al.* hingegen fanden keinen meßbaren, die Frakturheilung beschleunigenden Effekt (Carpenter, Hipp *et al.* 1992). Die Arbeitsgruppe um Mosekilde beobachtete eine Bildung von Kallus geringerer Qualität bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren. Dies konnte durch Bail *et al.* nicht bestätigt werden. Hier wurde bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren eine gleiche Kallusdichte bei größerer Kallusmenge gefunden (Bail, Raschke *et al.* 1998).

Schon im intakten Gelenkknorpel bewirkt die Gabe von exogenem Wachstumshormon eine Erhöhung der Zellzahl und einen Anstieg der Matrixsynthese (Silberberg, Hasler *et al.* 1966; Silberberg und Hasler 1971; Sledge 1973). Der alleinige Einsatz von Wachstumshormon bei Knorpeldefekten fand bisher nur sehr wenig Anwendung (Rokkanen und Kettunen 1972; Chrisman 1975; Hendricson, Havdrup *et al.* 1982). Bei experimentell gesetzten Knorpeldefekten an Kaninchenknien führt die intraperitoneale Gabe von porcinem Wachstumshormon zu einer Erhöhung der Zellzahl, der Mitoserate, des DNS-Gehaltes, der Kollagensynthese sowie der Matrixstabilität im Defekt. Dies war sowohl nach kurzzeitiger (zwei Wochen), als auch nach langzeitiger (sechs Monate) Gabe von Wachstumshormon zu beobachten (Chrisman 1975). Hendricson *et al.* konnten diese Zunahme der Mitoseaktivität bei Kurzzeitbehandlung mit exogenem Wachstumshormon in Kombination mit Thyroxin an scarifiziertem Gelenkknorpel von Kaninchen bestätigen (Hendricson, Havdrup *et al.* 1982). Auch bei experimentell hervorgerufenen degenerativen Veränderungen am Gelenkknorpel

von Kaninchen wurde bereits Wachstumshormon eingesetzt. Den Tieren wurde zunächst für vier Wochen das Kniegelenk versteift, um osteoarthrotische Degenerationen hervorzurufen. In dieser Phase waren die degenerativen Veränderungen in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe identisch. Nachdem das Gelenk remobilisiert worden war, war nach weiteren vier Wochen eine signifikant bessere Knorpelheilung in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe festzustellen. Die Tiere erhielten biosynthetisches humanes Wachstumshormon intramuskulär (Halbrecht, Carlstedt *et al.* 1990). In einer Studie, die an Ratten durchgeführt wurde, wurde das Wachstumshormon allein und in Kombination mit thyreotropem Hormon (TSH) verabreicht. Die Resultate zeigen, daß eine Behandlung mit Wachstumshormon und TSH sowohl allein, als auch in Kombination zu einer Beschleunigung der Knorpeldefektheilung führt, indem eine schnellere Formation von neugebildetem Knorpel induziert wird (Rokkanen und Kettunen 1972).

Wachstumshormon wirkt stimulierend auf Zellen des Knochen- und Knorpelstoffwechsels. Es kann daher ein analoger positiver Effekt bei der Heilung osteochondraler Defekte vermutet werden, wenngleich keine aktuellen Studien über das Heilungsverhalten ungefüllter osteochondraler Defekte unter dem Einfluß einer alleinigen systemischen Verabreichung eines speziesspezifischen Wachstumshormons am Großtier zu existieren scheinen, die dies belegen.

#### 2.4.4 Wachstumsfaktoren

Einige Wachstumsfaktoren zeigen bei *in vitro* Versuchen eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Chondrozyten und deren Fähigkeit, Matrix zu synthetisieren. Dazu gehören unter anderem *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), die *bone morphogenetic proteins* (BMP), die *insulin like growth factors* (IGF-I und II) und *transforming growth factor-β* (TGF-β).

FGF wirkt *in vitro* mitogen auf Chondrozyten und spielt eine Rolle bei der Matrixsynthese (Mankin, Jennings *et al.* 1991; Sah, Chen *et al.* 1994; Trippel 1995). Aus bovinen Hypophysen gewonnener FGF bewirkt eine 10fache Steigerung der Inkorporation von <sup>3</sup>H Thymidin in einer bovinen Knorpelzellkultur, während EGF und IGF-I allein verabreicht dies nicht bewirken. Alle Faktoren zusammen verabreicht wirken synergistisch und stimulieren die DNA-Synthese um ein 20-40faches (Osborn, Trippel *et al.* 1989). EGF, FGF und PDGF bewirken eine Steigerung der Glucosaminoglykansynthese und der Inkorporation an Radiosulfaten in Knorpelzellmonolayerkulturen (Prins, Lipman *et al.* 1982). TGFs-β und

BMPs werden von Zellen des Knochenstoffwechsels produziert und beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Linkhart, Mohan *et al.* 1996). BMP, TGF- $\beta$  und PDGF wirken chemotaktisch auf Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen (Lind 1998). TGF- $\beta$  steigert in einer Kultur von Periostzellen die Synthese von Kollagen II (Izumi, Scully *et al.* 1992). In einer Mäuseknochenzellkultur wirkt BMP-2 direkt auf Osteoklasten und beeinflusst damit möglicherweise Resorptionsvorgänge (Kanatani, Sugimoto *et al.* 1995). In der Zellkultur steigern IGF-I und TGF- $\beta$  die Proteoglykansynthese (Sah, Chen *et al.* 1994; Sah, Trippel *et al.* 1996; van Osch, van den Berg *et al.* 1998; Fortier, Lust *et al.* 1999).

IGF-I und IGF-II beschleunigen die Proliferation von humanen sowie fetalen Knochenzellen von Huhn, Maus und Ratte (Mohan und Baylink 1991). Beide stimulieren *in vitro* die Kollagensynthese im Knochen und vermindern die Kollagendegradation. Ebenso steuert TGF- $\beta$  die Kollagensynthese von osteoblastenartigen Zellen (Strong, Beachler *et al.* 1991).

#### **2.4.4.1 Wachstumsfaktoren und Frakturheilung**

Im Tierversuch führt saurer FGF in den Frakturbereich von Ratten injiziert zu einer signifikanten Vergrößerung der Menge an neugebildetem Kallus, aber nicht dessen mechanischer Festigkeit. Desweiteren beobachtete man einen höheren Gehalt an Kollagen und DNA (Jingushi, Heydemann *et al.* 1990). Nakamura *et al.* applizierten Hunden mit Tibiafrakturen rekombinanten humanen sauren FGF in den Frakturbereich und stellten eine Erhöhung der Kallusmenge bei gleichzeitiger Erhöhung des Knochenmineralsalzgehalts und der Osteoklastenzahl fest (Nakamura, Hara *et al.* 1998). Basischer FGF hingegen wirkte sich bei Andreshak *et al.* nicht förderlich auf die Frakturheilung im Rattenmodell aus (Andreshak, Rabin *et al.* 1997). BMP-2 verbesserte weder die Kallusqualität noch die –menge bei Tibiafrakturen am Kaninchen. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob das BMP-2 lokal aus einem Trägermedium freigesetzt oder injiziert wurde (Bax, Wozney *et al.* 1999).

Subperiostale Injektionen von TGF- $\beta$  am Femur von neugeborenen Ratten lösten eine enchondrale Ossifikation an der Injektionsstelle aus. Joyce *et al.* schlossen daraus, daß mesenchymale Stammzellen von TGF- $\beta$  zu Proliferation und Differenzierung veranlaßt werden (Joyce, Jingushi *et al.* 1990; Joyce, Roberts *et al.* 1990; Joyce, Terek *et al.* 1990). Mit TGF- $\beta$  beschichtete Implantate beschleunigen sowohl im belasteten als auch im unbelasteten Frakturmodell die Knochenformation beim Hund (Lind 1998).

Lokal freigesetzt wirkt IGF-I beschleunigend auf die Frakturheilung (Einhorn und Trippel 1997). Eine Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1, lokal und kontinuierlich aus einer biodegradierbaren Beschichtung freigesetzt, beschleunigt die Frakturheilung bei Ratten, deren

frakturierte Tibia mit entsprechend beschichteten Implantaten stabilisiert waren. Der Frakturbereich war bei den genannten Tieren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe 42 Tage *post operationem* komplett durchbaut und im biomechanischen Test signifikant steifer (Schmidmaier, Wildemann *et al.* 2000).

#### **2.4.4.2 Wachstumsfaktoren und Knorpeldefekte**

Intraartikulär verabreicht beschleunigt basischer FGF die Heilung osteochondraler Defekte (Petzold, Wellmitz *et al.* 1980; Cuevas, Burgos *et al.* 1988; Shida, Jingushi *et al.* 1996), ein FGF enthaltendes bovines Gehirnextrakt intraartikulär verabreicht beschleunigt bei Knorpeldefekten in Kaninchenknien die Proliferation von Chondrozyten (Jentsch, Wellmitz *et al.* 1980). Bei osteochondralen Defekten mit einem Durchmesser von 3 mm in Kaninchenknien induzierte lokal freigesetztes BMP-2 die Bildung von hyalinem Knorpel (Frenkel, Saadeh *et al.* 2000). Grgic *et al.* setzten 6 x 3x 3 mm große Knorpeldefekte in Kaninchenknien und brachten mit BMP-7 imprägnierte Kollagenschwämme in diese ein. Sie stellten „hyalinartigen“ Knorpel im Regenerat fest (Grgic, Jelic *et al.* 1997). Sellers *et al.* verwendeten in einen Kollagenschwamm eingelagertes, rekombinantes BMP-2 in einem osteochondralen Defekt von 3 mm Durchmesser und 3 mm Tiefe in der Trochlea von Kaninchenknien. Sie konnten in der mit BMP-2 behandelten Gruppe signifikant mehr neugebildetes Kollagen II nachweisen, die Defekte schnitten beim Scoring deutlich besser ab (Sellers, Peluso *et al.* 1997; Sellers, Zhang *et al.* 2000). In arthritische Mäuseknie injiziert, stimulierte TGF- $\beta$  den Reparatursprozeß über eine Vermehrung der Proteoglykansynthese, sowie eine Erhöhung der Osteophytenzahl. BMP-2 zeigte diese Effekte nicht (van Beuningen, van der Kraan *et al.* 1994; Glandsbeek, van Beuningen *et al.* 1998). IGF-I stimuliert Knorpelzellen in der Wachstumsfuge von hypophysektomierten Ratten (Hunziker, Wagner *et al.* 1994). Bei osteochondralen Defekten mit einem Durchmesser von 4 mm in Kaninchenknien stellten Wakitani *et al.* nach sechs Monaten einen deutlich besseren Regenerationsgrad bei den Tieren fest, die intraartikulär IGF-I erhalten hatten (Wakitani, Imoto *et al.* 1997). Nixon *et al.* kamen zu dem Schluß, daß das Einbringen von mit IGF-I imprägnierten Fibrinpräparaten in osteochondrale Defekte in Pferdeknieen, in einer vermehrten Bildung von Kollagen II resultiert. Jedoch fanden die Untersucher nach sechs Monaten keine mit normalem Knorpel gefüllten Defekte (Nixon, Fortier *et al.* 1999). Die intraartikuläre Verabreichung einer Wachstumsfaktorenkombination aus IGF-I, EGF und FGF bei Kaninchen mit einem osteochondralen Defekt im Knie bewirkt keine Verbesserung der Gelenk-knorpelheilung (Neidel 1992).