

Aus der Klinik für Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung eines zellfreien, dreidimensionalen Implantates
zur Behandlung von Defekten knorpelartiger Gewebe

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Haberstroh

aus Großolbersdorf

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. M. Sittinger
 2. Prof. Dr. Dr. N.-C. Gellrich
 3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Strohm

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Abstract	Seite 4
Verwendete Abkürzungen	Seite 5
Zusammenfassung	Seite 6 - 13
Einleitung und Zielstellung	Seite 6
Methodik, Ergebnisse	Seite 7
Ergebnisse	Seite 9
Diskussion	Seite 11
Literatur	Seite 14 – 16
Anteilerklärung	
Ausgewählte Literatur	
Curriculum vitae	
Komplette Publikationsliste	
Selbständigkeitserklärung	
Danksagung	

ABSTRACT

Ziel der durchgeführten Studien war die Entwicklung eines zellfreien Implantats. Es sollte die Einwanderung von Vorläuferzellen aus umliegendem Gewebe oder Knochenmark durch chemoattraktorische Substanzen induzieren und nachfolgend die Differenzierung und Anregung dieser Zellen zur Bildung knorpelartigen Reparaturgewebes anregen. Mögliche Anwendungsgebiete eines solchen zellfreien Implantates sind neben Gelenkknorpeldefekten zum Beispiel des Knies auch der Ersatz des Nucleus pulposus nach dessen Exstirpation.

Die Wirkung von Serum als chemoattraktorische Substanz wurde mit einem 96-well Chemotaxis-Assays an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSZ) sowie an humanen Nucleus pulposus Zellen (hNPZ) nachgewiesen. Die Prüfung der chondrogenen Differenzierung erfolgte zum einen durch Bestimmung der Genexpressionsprofile knorpeltypischer Markergene oder durch Färbung von Schnitten der hochdichten Zellkulturen auf knorpeltypische Matrixbestandteile nach Stimulierung der hMSZs mit Hyaluronsäure und von hNPZ mit Hyaluronsäure oder Transformierendem Wachstumsfaktor $\beta 3$ (TGF $\beta 3$).

Als dreidimensionales Grundgerüst für das Implantatmaterial wurde ein Polyglycolsäure-Vlies gewählt, dem eine definierte Menge Hyaluronsäure zugegeben wurde. Dieses Polyglycolsäure/Hyaluronsäure-Vlies (PGS/HS-Vlies) wurde gefriergetrocknet und konnte durch Tränken in Serum dessen Bestandteile in hohem Maß aufnehmen.

Der Effekt des serumgetränkten PGS/HS-Vlieses wurde in einem *in vivo* Versuch am ovinen Knie verifiziert. Dazu wurden Knorpeldefekte gesetzt, die Defekte mit Mikrofrakturierung vorbehandelt und das Vliesmaterial im Defekt mit resorbierbaren Fäden fixiert. Die Mikrofrakturierung erleichtert die Einwanderung von hMSZ aus dem darunterliegenden Knochenmark in den Defekt und das Vliesmaterial hinein.

Die behandelten ovinen Knorpeldefekte zeigten histologisch zu allen Untersuchungszeitpunkten, im Gegensatz zu den lediglich mit Mikrofrakturierung behandelten Defekten, eine deutlich verbesserte Bildung von knorpelartigem, hyalinem Reparaturgewebe. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das entwickelte zellfreie, serumgetränkte PGS/HS-Vlies für die Behandlung von Knorpeldefekten des Knies gut geeignet ist. Es besitzt zudem den Vorteil, dass es, im Gegensatz zu zellbesiedelten Tissue-Engineering-Konstrukten, *ad hoc* bei der Erst-Operation zur Verfügung steht und der Eingriff für die Gewinnung der Zellen entfällt.

Am Kaninchen wurde das serumgetränkte PGS/HS-Vlies inzwischen auch von einer anderen Arbeitsgruppe zum Ersatz des Nucleus pulposus erfolgreich eingesetzt. Hierbei bildete sich funktionelles hyalinartiges Gewebe im Defektbereich aus [1].

Verwendete Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	Fetales bovines Serum
GAPDH	Glycero-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HS	Hyaluronsäure
LINK	<i>Cartilage Link Protein</i>
hMSZ	Humane mesenchymale Stammzellen
hNPZ	Humane Nucleus pulposus Zellen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDGF bb	<i>Platelet-Derived Growth Factor Subtype bb</i> , Plättchenwachstumsfaktor bb
PGS	Polyglycolsäure
TE	<i>Tissue Engineering</i>
TGF β 3	<i>Transforming Growth Factor β3</i> , Transformierender Wachstumsfaktor β 3

EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Knorpelgewebe wie Gelenkknorpel und Bandscheibe besitzen nur eine sehr geringe Heilungskapazität [2,3] und ihre Defekte führen potentiell zu schweren degenerativen Veränderungen. Zur Behandlung stehen zur Zeit unter anderem verschiedene Verfahren des Tissue Engineering (TE) zur Verfügung. Besonders die autologe Chondrozytenimplantation wurde extensiv untersucht und ihre Eignung für die Wiederherstellung von Knorpelgeweben gezeigt [4,5]. Als TE-Strukturmaterialien wurden unter anderem chondrozytenbesiedelte dreidimensionale Vliese aus Polyglycolsäure (PGS) [6], Polylactid oder deren Copolymeren untersucht. Sie induzieren die Bildung von funktionellem Reparaturgewebe aus hyalinem Knorpel mit guten biochemischen und biomechanischen Eigenschaften. Darüber hinaus erlauben sie die homogene dreidimensionale Verteilung der Zellen und stellen initial die notwendige mechanische Stabilität und Handhabbarkeit während des chirurgischen Eingriffs sicher.

Als gängiges chirurgisches Verfahren wird bei Defekten des Kniegelenkknorpels die sogenannte Mikrofrakturierung mit zahlreichen Perforationen des subchondralen Defektbereichs durchgeführt. Eine Behandlung mit Mikrofrakturierung führt bei Patienten zu verbesserter Funktion und verringert den Schmerz [7,8]. Das so entstandene Reparaturgewebe besteht in der Regel aus Faserknorpel mit limitierter kurzzeitiger Haltbarkeit und eine weitere Verbesserung der Technik wäre von Vorteil. Der durch die Mikrofrakturierung erzeugte Blutclot enthält neben Blutzellen auch hMSZ des Knochenmarks [9] sowie Wachstumsfaktoren und Chemokine. Solche Faktoren, wie zum Beispiel PDGF und TGF β 3 kommen auch in Serum vor [10] und können bei verschiedenen Zelltypen Migration und Differenzierung auslösen [11,12]. Die Migrationsinduktion von hMSZ [13] und hNPZ [14] durch Serum konnte durch unsere Versuche nachgewiesen werden.

Aufgrund ihres multipotenten Differenzierungsvermögens [15] können hMSZ unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren aus dem subchondralen Knochen zur Bildung von knorpelartigem Reparaturgewebe angeregt werden [16]. Bei equinen Stammzellen induzieren Synovialflüssigkeit und HS eine chondrogene Differenzierung [17]. Unsere Versuche zeigten, dass auch hMSZ durch HS bzw. hNPZ durch HS oder TGF β 3 einen chondrogenen Charakter annehmen [13,14]. Unsere *in vivo* Untersuchungen am Schafsknie bestätigten die Aussagen der *in vitro* Untersuchungen. Das neu entwickelte serumgetränkte PGS/HS-Vlies hat migrations- und differenzierungsfördernde Eigenschaften für hMSZ und hNPZ. Dadurch kann der sonst beim TE notwendige Eingriff zur Zellgewinnung entfallen.

METHODIK, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

METHODIK

Humane MSZ: Gewinnung der Zellen, Migration, Differenzierung

Die Zellen wurden aus Knochenmark von Tibiakopfresektaten gewonnen, in handelsüblichen Zellkulturmedien vermehrt und routinemäßig auf die Präsenz typischer hMSZ Oberflächenantigene SH2, SH3 und die Abwesenheit von CD34 und CD45 getestet.

Die Migrationsinduktion durch Serum in Richtung auf einen Serumgradienten wurde mit dem ChemoTX[®] Assay System (Neuroprobe, USA) geprüft [18]. Zur Untersuchung der Differenzierung der hMSZ durch HS wurde eine high-density Zellkultur wie von Johnstone beschrieben [19] mit HS behandelt. Zur Prüfung der Differenzierung dieser Zellen wurden Genexpressionsprofile von knorpeltypischen Matrixproteinen wie Typ II Kollagen mittels real-time-PCR und Beurteilung histologischer Schnitte mit Färbung auf Typ II Kollagen und Proteoglykane durchgeführt. Die detaillierte Methodik ist in Publikation [13] beschrieben.

Humane NPZ: Gewinnung der Zellen, Migration, Differenzierung

Für die Migrations- und Differenzierungsversuche wurden Zellen aus exstirpiertem humanem Nucleus pulposus Material verwendet. Nach Zerkleinerung des Nucleus pulposus Gewebes und Verdauung der Matrix wurden die Zellen in handelsüblichen Zellkulturmedien vermehrt. Zur Prüfung der Differenzierung in chondrogene Zellen bzw. die Fähigkeit knorpeltypische Matrix zu bilden, wurden die so gewonnenen hNPZ in einer high-density Zellkultur, wie von Johnstone [19] beschrieben, unter Zusatz von HS oder TGF β 3, kultiviert. Die Zellen dieser Kulturen wurden durch semiquantitative Genexpressionsanalysen von typischen Knorpelmatrixproteinen wie Typ II Kollagen untersucht. Außerdem wurden die high-density-Zelkulturen histologisch bewertet und ihre Schnitte auf für hyalinen Knorpel typisches Kollagen Typ II sowie knorpeltypische Proteoglykane gefärbt. Die detaillierte Methodik ist in Publikation [14] beschrieben.

Herstellung des dreidimensionalen PGS/HS Vliesmaterials

Auf resorbierbare PGS-Vliese (15 x 20 x 1,1 mm), (Alpha Research Deutschland GmbH, Deutschland) wurden mit einer Pipette 330 μ l Hyaluronsäure (Ostenil[®], 10mg/ml HS, TRB Chemedica AG, Deutschland) gegeben. Die PGS/HS-Vliese wurden gefriergetrocknet, steril verpackt und in einem Dessikator bis zur Anwendung gelagert.

Tierexperimentelle Untersuchung

In vivo Versuche am Schafsknie: Regenerationsverhalten bei Behandlung mit PGS/HS-Vlies nach Mikrofrakturierung des Knorpeldefektbereiches

Die Versuche am Schaf wurden durch die zuständige Genehmigungsbehörde in Baden-Württemberg geprüft und bewilligt (AZ. 35-9185.81/1/847; G 05/24).

Da in Veröffentlichung [13] ausführlich beschrieben, wird hier lediglich auf die Grundzüge der Vorgehensweise eingegangen. Nach Eröffnung des Kniegelenkes wurden 11 mm x 8 mm große Knorpeldefekte im medialen Bereich der femoralen Kondyle gesetzt und der Defektbereich mittels eines Chondropick an neun Stellen mikrofrakturiert. In der Verumgruppe wurde in den mikrofrakturierten Defekt das größenadaptierte, serumgetränkte PGS/HS-Vliesmaterial eingesetzt und transossär mit resorbierbaren Fäden fixiert. Die Tiere wurden gruppenabhängig 2 Wochen, 3 Monate und 6 Monate nach Implantation des Vlieses getötet und der entsprechende Kondylenbereich für die histologische Bewertung entnommen.

Histologische Auswertung des Tierversuches

Das Gewebematerial wurde mit Standardverfahren fixiert, dekalzifiziert, in Paraffin eingebettet und gefärbt wie von Erggelet *et al.* beschrieben [20].

2-Wochen- / 3-Monats-Gruppe

Die Schnitte der Defektbereiche aus Verum- und Kontrollgruppe wurden mit Safranin O gefärbt und histologisch hinsichtlich Matrix, Zellverteilung und -form beurteilt. Die Beurteilungen der Verum- bzw. Kontrollgruppe wurden einander gegenübergestellt.

6-Monats-Gruppe

Die Histologien der Tiere der 6-Monats-Gruppe wurden nach Färbung mit Hämatoxylin / Eosin [20] mittels der von O'Driscoll [21], Pineda [22] und Wakitani [23] beschriebenen Scoring-Verfahren durch zwei unabhängige Untersucher beurteilt. Auch wurden Schnitte mit Alcianblau / Nuclear Fast Red zum Nachweis knorpeltypisches Proteoglykane sowie immunhistochemisch auf Typ II Kollagen gefärbt.

ERGEBNISSE

In vitro Versuche

Migrationsverhalten von hMSZ und hNPZ

Humane MSZ

Die Migrationsversuche mit ChemoTX-System zeigten, dass Serum eine serumgerichtete Migration von hMSZ induziert.

Humane NPZ

Auch bei hNPZ wurde die Migration in Richtung zum Serum hin induziert.

Differenzierungsverhalten von hMSZ und hNPZ

Humane MSZ

Unter dem Einfluß von HS differenzierten sich hMSZ zu chondrogenen Zellen. Ihre Genexpressionanalyse für typische Knorpelmarkergene belegte, dass eine Kultivierung über 2 Wochen in Gegenwart von HS die Expression von knorpeltypischen Genprodukten wie Typ II α 1 Kollagen, LINK und COMP, sowie Aggrecan erhöht [13].

Humane NPZ

Humane NPZs wiesen dagegen nur unter dem Einfluss von TGF β 3, nicht aber von HS, ein im Vergleich zur Kontrolle signifikant verändertes Expressionsprofil für chondrogene Markergene auf.

Dagegen zeigte die immunhistochemische Färbung der Schnitte der high-density-Zellkulturen auf Kollagen Typ II deutlich das Vorhandensein von für hyalinen Knorpel typischem Typ II Kollagen für TGF β 3 als auch HS behandelte Zellkulturen. Auch durch die histochemische Färbung mit Alcianblau / Nuclear Fast Red der Schnitte der Zellkulturen konnte sowohl für TGF β 3 als auch für HS Behandlung das Vorhandensein von knorpeltypischen Proteoglykanen nachgewiesen werden [14].

Tierexperimentelle Untersuchung

In vivo Versuche am Schafsknie: Regenerationsverhalten bei Behandlung mit PGS/HS-Vliesen nach Mikrofrakturierung des Knorpeldefektbereichs.

Die makroskopische Inspektion der Defektzonen, die nur mit Mikrofrakturierung behandelt wurden, zeigte lediglich ein Hereinwachsen von Knorpelgewebe ausgehend von den Defekträndern. Im zentralen Defektbereich konnten noch Blutungsstellen als Residuen der Mikrofrakturierung beobachtet werden. Die zusätzlich mit serumgetränktem PGS/HS-Vlies

behandelten Defekte zeigten dagegen die Entstehung von knorpelartigem Reparaturgewebe mit hyalinähnlichem Charakter. Das Reparaturgewebe füllte die Defektareale teilweise aus. Details sind in Veröffentlichung [13] beschrieben.

Histologische Auswertung des Tierversuches

2-Wochen-Gruppe

Die histologische Begutachtung der Schnitte der Defektbereiche zeigte bei den unbehandelten Defekten keinerlei Ausbildung von Reparaturgewebe, während bei PGS/HS-Vlies behandelten Defekten in den Vliesen an der zum Gelenkraum liegenden Seite eine oberflächliche Schicht mit zahlreichen, fibrösen Zellen erkennbar war. Das Implantat war deutlich mit dem Defektboden verbunden [13].

3-Monats-Gruppe

Histologisch war bei den nur mit Mikrofrakturierung behandelten Defekten der Kontrollgruppe keine Neubildung von Regenerationsgewebe verifizierbar. Lediglich von den Defekträndern war ein Hereinwachsen von Knorpelgewebe erkennbar. Im Defektzentrum zeigten sich Reste der Mikrofrakturen mit Blutungen aus dem subchondralen Knochen.

Die mit Mikrofrakturierung und Implantat behandelten Defekte wiesen eine Bildung von knorpelartigem Gewebe auf, das intensiv auf Proteoglykane gefärbt werden konnte. Das hyalinartige Reparaturgewebe füllte den Defekt teilweise auf. Die Zellen des neugebildeten Gewebes hatten überwiegend abgerundete chondrozytentypische Form und zeigten säulenförmige oder clusterartige Anordnung. Dies ist näher in Veröffentlichung [13] erläutert.

6-Monats-Gruppe

Die mit Hämatoxylin / Eosin gefärbten histologischen Schnitte wurden mit einem Scoring Verfahren beurteilt. Die verwendeten Scoring-Systeme von Wakitani und Pineda stehen bei niedrigen Punktwerten für natives knorpelartiges Gewebe (min 0, max 15), während der Score von O'Driscoll umgekehrt bei hohen Werten (max. 24) nativen Knorpel anzeigt. Die nur mit Mikrofrakturierung behandelten Defekte zeigten folgende Punktwerte 9,5 (Wakitani), 9,0 (Pineda) und 7,8 (O'Driscoll). Die zusätzlich mit PGA/HS Vlies behandelten Defekte zeigten signifikant bessere Score-Ergebnisse: 5,1 (Wakitani), 5,0 (Pineda) und 14,7 (O'Driscoll), [20].

DISKUSSION

Serum enthält vasoaktive Substanzen sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine [10], die die Migration, Differenzierung und Gewebeentwicklung beeinflussen können [16,24]. Neuere Untersuchungen belegen, dass Chemokine und Bone Morphogenetic Proteine (BMP) [25], sowie auch Synovialflüssigkeit [18] die Migration von MSZ *in vitro* anregen. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch Serum serumgerichtete Migrationsbewegungen von hMSZ und hNPZ induziert werden. Dies deckt sich mit den Befunden von Kramer und Kollegen, die zeigten, dass in einer porcinen Kollagenmembran, die durch die Mikrofrakturierung mit Blut getränkt und mit Fibrinkleber und Serum fixiert worden war, multipotente MSZ eingewandert waren [9]. Daraus lässt sich ableiten, dass das neugebildete knorpelartige Gewebe in unserem *in vivo* Versuch von MSZ gebildet wurde, die aus dem Knochenmark eingewandert waren.

Die Differenzierung von MSZ zu Zellen mit chondrogenem Charakter wird nicht nur von einzelnen Faktoren wie TGF oder BMP [19,25,26] hervorgerufen, sondern, wie auch durch unsere Ergebnisse belegt, durch strukturelle Komponenten mesenchymalen Gewebes wie Hyaluronsäure. Dazu liegen auch Versuchsergebnisse von Kayakabe et al. 2006 [27] vor, der autologe MSZ eingebettet in HS-Schwämme, in osteochondrale Defekte beim Kaninchen einsetzte und damit eine gute Wiederherstellung mit funktionellem Knorpelgewebe erreichte. Die in high-density-Zellkultur durchgeführten Untersuchungen des Genexpressionsmusters knorpelzelltypischer Gene wie Typ II Kollagen und Aggrecan zeigen für hMSZ unter dem Einfluss von HS eine deutliche Genexpression dieser Markergene.

Die histochemische und die immunhistochemische Färbung der Schnitte der high-density-Zellkulturen konnten auch für hNPZ beweisen, dass sie unter dem Einfluss von HS oder TGF β 3 typische chondrogene Matrixproteine generieren. Letzteres deckt sich mit den Beobachtungen von Hegewald et al. [17], die in einer experimentellen Studie am Pferd zeigten, dass neben Synovialflüssigkeit auch HS in unterschiedlichen Konzentrationen die Chondrogenese stimulieren kann. Diese Ergebnisse unterstützen die von uns gefundenen Resultate, dass HS eine chondrogene Entwicklung von hMSZ induzieren und fördern kann. Neben den Eigenschaften der HS kann auch die anfänglich mechanisch stabile Form des Vlieses kombiniert mit der Mikrofrakturierung die Entwicklung von zellreichem Gewebe mit knorpelähnlichem Aussehen, das den Defekt teilweise gefüllt hat, beigetragen haben.

Die histologische Auswertung der mikrofrakturierten Knorpeldefekte am Schafsknie bestätigen, dass ein dreidimensionales serumgetränktes PGS/HS Vlies gegenüber der Gruppe, bei der nur eine Mikrofrakturierung des Defektbereichs durchgeführt wurde, Vorteile

hinsichtlich der Qualität und Menge des entwickelten Regenerationsgewebes bringt. Zum einen ergeben sich nach unseren Befunden eine frühere und bessere Deckung des Defektes, zusätzlich weist das entstandene Gewebe deutlich Anteile hyalinartiger Strukturen auf.

Zellfreie Implantate zur Knorpeldefektbehandlung wurden zuvor schon von mehreren anderen experimentellen Gruppen angewendet. So konnten Behrens et al. [28] mit einer zellfreien Kollagenmatrix, versetzt mit autologem Serum, eine Chondrogenese nach Mikrofrakturierung induzieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem ovinen Knorpeldefektmodell nach Deckung des mikrofrakturierten Defekts mit einer zellfreien porcinen Kollagenmatrix keine verbesserte Heilung nach 4 und 12 Monaten. Erst durch die vorherige *in vitro* Besiedlung der Kollagenmatrix mit autologen Chondrozyten konnte die Bildung von Reparaturgewebe deutlich gesteigert werden [29].

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen des Migrations- und Differenzierungs- bzw. Expressionsverhaltens von hMSZ und hNPZ waren Voraussetzung für die Entwicklung eines zellfreien Vliesmaterials aus PGS, das mit einer definierten Menge HS getränkt und danach lyophilisiert wurde [17]. Durch die Lyophilisierung nimmt das Vlies Serum sehr gut auf.

Das gefriergetrocknete Vlies ist haltbar und kann, vergleichbar mit chirurgischem Nahtmaterial, im Operationssaal vorrätig gehalten und so bei bestehender Indikation *ad hoc* serumgetränkt am Patienten eingesetzt werden. Der Einsatz zellfreier Konstrukte hat gegenüber der Verwendung von zellbasierten TE-Implantaten den Vorteil, dass nur ein einmaliger chirurgischer Eingriff notwendig ist. Zudem lassen sich textile Vliese durch resorbierbare transossäre Fäden oder resorbierbare Pins sicher im Defektbereich fixieren [30]. Darüberhinaus wurde eine Indikationserweiterung für den Einsatz des PGS/HS Vlieses mit dem Ziel des funktionellen Ersatzes von exstirpiertem Nucleus pulposus Material untersucht. Der Nucleus pulposus besteht aus Typ II Kollagen und enthält große Mengen Hyaluronan sowie Proteoglykane, von denen Aggrecan den höchsten Anteil ausmacht. Eigene Genexpressionsanalysen, histochemische und immunhistochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass ortsständige hNPZ unter Einfluss von TGF β 3 beziehungsweise HS chondrogenen Charakter annehmen und charakteristische Proteine des Nucleus pulposus Gewebes, wie Typ II Kollagen, generieren und ebenso wie hMSZ unter Serumeinfluss serumgerichtet migrieren.

Diese *in vitro* Ergebnisse an hNPZ konnten inzwischen an der Kaninchenwirbelsäule *in vivo* verifiziert werden [1].

Verfahren des TE, die zur Ausbildung eines funktionsspezifischen Gewebes führen, sind wegweisend für die weitere Verbesserung der Patientenbehandlung. Allerdings haben

zellbasierte TE Konstrukte den Nachteil der Notwendigkeit zweier operativer Eingriffe mit den damit erhöhten Operationsrisiken für den Patienten. Durch das hier vorgestellte Verfahren des Gewebeersatzes durch ein zellfreies biokompatibles Material, das einerseits Vorläuferzellen anlockt sowie deren Differenzierung zu chondrogenen Zellen fördert bzw. die Generation von typischen Knorpelmatrixbestandteilen induziert und damit zur Ausbildung knorpelartigen Gewebes führt, ist innerhalb nur eines chirurgischen Eingriffs durchführbar und stellt einen weiteren Schritt zur Optimierung der Behandlung von Patienten mit Defekten knorpelartiger Gewebe dar. Die klassische Behandlung von Knorpeldefekten des Knies mit Mikrofrakturierung führt zur Bildung von fibrösem Knorpel mit eingeschränkter Haltbarkeit [7,8]. Das entwickelte kombinierte Behandlungsverfahren der Mikrofrakturierung mit PGS/HS-Vlies ist diesem dahingehend überlegen, dass es zur Bildung hyalinen, funktionellen Knorpelgewebes führen kann.

LITERATUR

- 1 Abbushi A, Endres M, Cabraja M, et al. Regeneration of intervertebral disc tissue by resorbable cell-free polyglycolic acid-based implants in a rabbit model of disc degeneration. *Spine* 2008;33:1527-1532.
- 2 Hegewald AA, Ringe J, Sittinger M, Thomé C. Regenerative treatment strategies in spinal surgery. *Front Biosci* 2008;13:1507-1525.
- 3 Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD. Advances in articular cartilage repair. *Injury* 2005;36:14-23.
- 4 Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000;374:212-234.
- 5 Minas T. Autologous chondrocyte implantation in the arthritis knee. *Orthopedics* 2003;26:945-947.
- 6 Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D. Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1147-1154.
- 7 Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcome of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:477-487.
- 8 Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, et al. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy* 2006;22:1180-1186.
- 9 Kramer J, Böhrnsen F, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J. In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:616-626.
- 10 McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirat and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 2009; 27:1033-1042.
- 11 Han J, Meng HX, Tang JM, Li SL, Tang Y, Chen ZB. The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Cell Prolif* 2007;40:241-252.
- 12 Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006;12:3067-3073.
- 13 Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials* 2007;28:5570-5580.

- 14 Haberstroh K, Enz A, Zenclussen ML, et al. Human intervertebral disc-derived cells are recruited by human serum and form nucleus pulposus-like tissue upon stimulation with TGF-beta3 or hyaluronan in vitro. *Tissue Cell* 2009; [Epub ahead of print].
- 15 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- 16 Shapiro F, Koide S, Glimcher FJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75: 532-553.
- 17 Hegewald AA, Ringe J, Bartel J, et al. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell* 2004;36:431-438.
- 18 Endres M, Neumann K, Häupl T, et al. Synovial fluid recruits human mesenchymal progenitors from subchondral spongy bone marrow. *J Orthop Res* 2007;25:1200-1307.
- 19 Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-272.
- 20 Erggelet C, Endres M, Neumann K, et al. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res* 2009; [published online].
- 21 O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 1986;68:1017-1035.
- 22 Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat* 1992;143:335-340.
- 23 Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:579-592.
- 24 Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 2002;87:305-312.
- 25 Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005;320:269-276.
- 26 Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001;189:275-284.

27 Kayakabe M, Tsutsumi S, Watanabe H, Kato Y, Takagishi K. Transplantation of autologous rabbit BM-derived mesenchymal stromal cells embedded in hyaluronic acid gel sponge into osteochondral defects of the knee. *Cytotherapy* 2006;8:343-353.

28 Behrens P. Matrix-coupled microfracture - a new concept for cartilage defect repair (in German). *Arthroskopie* 2005;18:193-197.

29 Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:655-664.

30 Drobic M, Radosavljevic D, Ravnik, Pavlovic V, Hribernik M. Comparison of four techniques for the fixation of a collagen scaffold in the human cadaveric knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:337-344.

ERKLÄRUNG ÜBER DEN ANTEIL AN DEN FOLGENDEN DREI PUBLIKATIONEN

Kathrin Haberstroh, geboren am 08.02.1957, hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

PUBLIKATION 1

Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials* 2007;28:5570-5580.

Impact Factor: 6,262 (2007)

Anteil 40%

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Vorbereitung und Durchführung des Tierversuchs, Aufbereitung der Proben, Auswahl der Testverfahren, Bearbeitung der Ergebnisse, Erstellung des Bildmaterials, Überarbeitung des Manuskripts.

PUBLIKATION 2

Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res* 2009;[Epub ahead of print]

Impact Factor: 2,437 (2007)

Anteil 30 %

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Vorbereitung und Durchführung des Tierversuchs, Gewinnung und Aufbereitung der Proben, Auswahl der Testverfahren, Histologische Auswertung der Proben, Bearbeitung der Ergebnisse, Überarbeitung des Manuskripts.

PUBLIKATION 3

Haberstroh K, Enz A, Zenclussen ML, Hegewald AA, Neumann K, Abbushi A, Thomé C, Sittinger M, Endres M, Kaps C. Human intervertebral disc-derived cells are recruited by human serum and form nucleus pulposus-like tissue upon stimulation with TGF-beta3 or hyaluronan in vitro. *Tissue Cell* 2009:[Epub ahead of print]

Impact Factor: 1,237 (2007)

Anteil 75%

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Auswahl der Testparameter,
Durchführung der Zellkulturexperimente: Migrationstests, histologische Auswertung.
Statistische Auswertung der *in vitro*-Versuche, Gesamterstellung des Manuskripts

Prof. Dr. rer. nat. M. Sittinger
Doktorvater

Kathrin Haberstroh
Promovendin

AUSGEWÄHLTE LITERATUR

PUBLIKATION 1

Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. *Biomaterials* 2007;28:5570-5580.

PUBLIKATION 2

Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. *J Orthop Res* 2009;[Epub ahead of print]

PUBLIKATION 3

Human intervertebral disc-derived cells are recruited by human serum and form nucleus pulposus-like tissue upon stimulation with TGF-beta3 or hyaluronan in vitro. Haberstroh K, Enz A, Zenclussen ML, Hegewald AA, Neumann K, Abbushi A, Thomé C, Sittinger M, Endres M, Kaps C. *Tissue Cell* 2009;[Epub ahead of print]

CURRICULUM VITAE

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

Haberstroh K, Enz A, Zenclussen ML, Hegewald AA, Neumann K, Abbushi A, Thomé C, Sittinger M, Endres M, Kaps C. Human intervertebral disc-derived cells are recruited by human serum and form nucleus pulposus-like tissue upon stimulation with TGF-beta3 or hyaluronan in vitro. *Tissue Cells*, accepted May 2009, [Epub ahead of print].

Impact Factor: 1,237 (2007)

Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res* 2009. [Epub ahead of print]

Impact Factor: 2,437 (2007)

Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials* 2007;28:5570-80.

Impact Factor: 6,262 (2007)

Haberstroh K, Heigold S, Bauer G. Transformed cell-derived reactive oxygen species support and inhibit nitric oxide-mediated apoptosis induction. *Int J Oncol* 2002;21:145-51.

Impact Factor: 2,295 (2007)

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Kathrin Haberstroh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

- Entwicklung eines zellfreien dreidimensionalen Implantates zur Behandlung von Defekten knorpelartiger Gewebe –

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Michael Sittinger für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die jederzeit gewährte Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken, vor allem aber bei Dr. Christian Kaps, der mir mit seinem umfangreichen Wissen wertvolle Hilfe zuteil werden ließ, sowie bei Dr. Michaela Endres und Katja Neumann, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Danke sagen möchte ich auch Samuel Vetterlein für seine exzellente Arbeit im Labor.

Nicht zuletzt gilt mein herzliches Dankeschön meinem lieben Mann. Jörg ich danke Dir dafür, dass Du immer an mich geglaubt, mir den nötigen Freiraum gegeben und mich auch in schwierigen Phasen der Arbeit stets motiviert hast.