

Zonenspezifische Deformation im hyalinen Gelenkknorpel

Abhängigkeit von Last und
Oberflächenintegrität

vorgelegt von

Yvonne Maria Bernadette Kollrack

AUS DER ANATOMISCHEN ANSTALT DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

VORSTAND: UNIV. PROF. DR. MED. R. PUTZ

Zonenspezifische Deformation im hyalinen Gelenkknorpel

Abhängigkeit von Last und
Oberflächenintegrität

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Yvonne Maria Bernadette Kollrack

aus

Singen

2004

**MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. R. Putz

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. J. Müller- Höcker

Prof. Dr. W. Nathrath

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ch. Glaser

Dekan:

Prof. Dr.med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2004

Meiner Mutter Gerlinde Kollrack

Sage es mir, und ich vergesse es; zeige es mir, und ich erinnere mich;

laß es mich tun, und ich behalte es

(Konfuzius)

INHALTSVERZEICHNIS

1.1. Einleitung.....	1
1.2 Fragestellung.....	2
2 Aktueller Kenntnisstand in der Literatur.....	4
2.1 Gelenkknorpel: Aufbau und Funktion	4
2.1.1. Allgemeines	4
2.1.2. Zonale Gliederung	4
2.1.3. Territoriale Gliederung	9
2.1.4. Chondrozyten	10
2.1.5. Matrix	13
2.2.Funktionelle Biomechanik	14
2.2.1. Matrix	14
2.2.2. Biomechanik des Chondrons	16
2.2.3. Zonale Unterschiede der Biomechanik	17
2.3. Degeneration / Regeneration / Therapeutische Ansätze	18
2.3.1. Degeneration	18
2.3.2. Regeneration / Therapeutische Ansätze	20
3 Material.....	23
3.1. Materialgewinnung	23
3.2. Probengewinnung	23
4 Methoden.....	26
4.1. Belastungsdesign und Probenverteilung	26
4.1.1. Belastung	26
4.1.2. Reversibilitätsprüfung	29
4.2. Weiterverarbeitung	30
4.2.1. Histologie	30
4.2.2. Rasterelektronenmikroskopie	31

1.1. Einleitung

Hyaliner Knorpel gilt als avaskuläres, aneurales und alymphatisches Bindegewebe. Er bedeckt die artikulierenden Enden der Gelenke und sorgt dort für eine reibungsarme, lastabsorbierende und lastverteilende Oberfläche. Wie jedes Bindegewebe besteht Knorpel aus Zellen, Fasern und Grundsubstanz.

Die Fähigkeit des Gelenkknorpels, Kompressions-, Zug- und Scherkräften zu widerstehen, ist an die strukturelle Integrität oben genannter Bestandteile gebunden. Verlust von Knorpelmasse sowie Störungen dieser Integrität führen zum Krankheitsbild der Osteoarthritis. Sie ist eine der häufigsten Alterserscheinungen unserer Zeit mit großer sozialmedizinischer Bedeutung. Daher steht der Gelenkknorpel im Zentrum vieler wissenschaftlicher Untersuchungen.

Basierend auf Unterschieden in der Morphologie, der Zellanordnung, der Kollagenfaserarchitektur und der Glykosaminoglykankonzentration wird Gelenkknorpel in verschiedene Zonen unterteilt. Diese Zonen wurden in verschiedenen Studien auf ihre morphologischen (Bertam, Lierse et al. 1991, Poole et al. 1984, Freeman et al. 1994, Smith et al. 1995), biochemischen (Parkinnen et al. 1993, Kim et al. 1994, Bachrach et al. 1995, Torzilli et al. 1997, Wong et al. 1996) und biomechanischen (Setton et al. 1993, Freeman et al. 1994, Mak et al. 1986, Mow et al. 1980, Jurvelin et al. 1988) Eigenschaften hin untersucht.

Gelenkfunktion und Gelenkgesundheit werden maßgeblich durch die auf das Gelenk und seinen Knorpel wirkenden Kräfte, d.h. die mechanische Umgebung, beeinflusst. Mechanische Signale wirken sich auf den Gleichgewichtszustand des Grundgerüsts des Knorpels, der Matrix, aus. Über Veränderungen der Matrixbeschaffenheit oder direkt durch die Last als Signal werden die Knorpelzellen, die Chondrozyten, beeinflusst und in ihrer Stoffwechselaktivität und damit in der Produktion der sie umgebenden Matrix gesteuert. Viele Studien untersuchen daher den Einfluß unterschiedlichster experimenteller Konditionen auf Stoffwechsel und Ultrastruktur des Knorpels. Dies geschieht etwa unter verschiedenen Lastbedingungen (Sah et al. 1989, Torzilli et al. 1997, Parkinnen et al. 1993, Kim et al. 1994), in Kultur (Smith et al. 1995, Freeman et al. 1994, Parkinnen et al. 1993) oder in situ (Guilak et al. 1995, Wong et al. 1996, Setton et al. 1993), unter vergleichender Betrachtung einzelner

Zonen (Guilak et al. 1995, Wong et al. 1996) oder unter Betrachtung nur einzelner Zonen an sich (Setton et al. 1993).

Die Integrität der Knorpeloberfläche stellt für das biomechanische Verhalten des Gesamtknorpels eine wichtige Komponente dar (Setton et al. 1993). Fibrillationen der Oberfläche sind eines der frühesten Degenerationszeichen. Daher liegt besonderes Augenmerk auf der obersten Zone des Knorpels, der sogenannten Tangentialzone (Guilak et al. 1995, Saxena et al. 1991).

Man weiß, daß bei Schädigung der Tangentialzone Zeichen einer erhöhten Matrixdeformation gefunden werden (Setton et al. 1993, Glaser et al. 2002).

Man weiß auch, daß in vivo bei erhöhter Zelldeformation eine reduzierte Biosynthese der Chondrozyten gefunden wird (Guilak et al. 1995, Wong et al. 1997).

Noch nicht untersucht wurde, ob diese beiden Aussagen in Zusammenhang zu bringen sind. Der Ansatz hierzu heißt, ob es bei geschädigter Knorpeloberfläche zusätzlich zu der erhöhten Matrixdeformation auch zu einer vermehrten Zelldeformation kommt. Das fehlende Glied dieser Plausibilitätskette, nämlich die Frage, ob Schädigung der Tangentialzone zu erhöhter Zelldeformation führt, soll hier untersucht werden.

1.2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit setzt sich die Vervollständigung oben genannter Plausibilitätskette zum Primärziel. Sie betrachtet die Zellen in verschiedener Höhenlokalisation im Knorpel bei akuter mechanischer Belastung und ihre Deformation unter der Last. Es wird untersucht, ob sich das Ausmaß der Deformation in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit des Knorpels verändert. Dazu wird die Tangentialzone abgetragen. Auch stellt sie die Frage nach der Deformation der einzelnen Knorpelzonen und des Gesamtknorpels bei geschädigter Oberfläche unter akuter mechanischer Belastung. Dabei werden die einzelnen Zonen nach zellmorphologischen Kriterien definiert. Da die Einteilung des Knorpels in Zonen auch nach kollagenfaserarchitektonischen Kriterien erfolgen kann, wollen wir etwaige Unterschiede der Deformation hier als Nebenaspekt im Auge behalten.

In zweiter Linie wird untersucht, ob es einen Einfluß von Größe der Last und Dauer der Last auf die Deformation von Zellen und Zonen gibt.

2 Aktueller Kenntnisstand in der Literatur

2.1. Gelenkknorpel: Aufbau und Funktion

2.1.1. Allgemeines

Knorpelgewebe besteht histologisch aus Zellen (Chondrozyten), Fasern und Grundsubstanz. Fasern und Grundsubstanz bilden die Matrix. Je nach Art und Mischung dieser Bestandteile unterscheidet man Faserknorpel, elastischen Knorpel und hyalinen Knorpel. Im hyalinen Knorpel nehmen die Chondrozyten ca. 1-10% des gesamten Gewebevolumentums ein. Die biomechanischen Eigenschaften werden vor allem durch die von den Zellen gebildete Interzellularsubstanz, die Matrix, bestimmt. Diese besteht zu 60-80 % aus Wasser und Ionen, sowie aus Kollagenen und Proteoglykanen mit einem großen Anteil von Glykosaminoglykanen. Hyaliner Knorpel bildet die Gleitflächen der Gelenke. Er wird von der Oberfläche absteigend in verschiedene Zonen unterteilt. Der Gelenkknorpel spielt eine wichtige Rolle bei der Verknöcherung der Skelettanlage, des epiphysären Längenwachstums und der Frakturheilung. Zwar sind die knorpelüberzogenen Gelenkflächen makroskopisch glatt, mikroskopisch zeigen sich jedoch kleine Inkongruenzen, die größtenteils durch die Synovialflüssigkeit ausgeglichen werden (Debrunner, 3Aufl., 1983). Der Friktionskoeffizient (Friktion: Bei Bewegung entstehende Reibung) des intakten Gelenkknorpels beträgt nur etwa 1/5 des Wertes von Eis auf Eis und ist damit wesentlich niedriger als der künstlicher Ersatzmaterialien (z.B. Polyethylen auf Metall) (Mankin et al. 1994; Rudert, Wirth et al. 1998).

2.1.2. Zonale Gliederung

Der Gelenkknorpel in seiner Gesamtheit wird in oberflächenparallele Zonen unterteilt. Dabei wird zunächst der kalzifizierte Knorpel vom darüberliegenden, nicht kalzifizierten Knorpel durch eine oberflächenparallele Grenzlinie, die Tide Mark, abgeschieden. Die Einteilung des unkalzifizierten Knorpels kann dann weiter einerseits nach der kollagenen

Faservorzugrichtung oder aber nach der bevorzugten Anordnung, Form und Orientierung seiner Zellen erfolgen.

In der Regel wird die Einteilung in drei oberflächenparallele Zonen verwendet. Diese heißen Superfizialzone, Intermediärzone und Basalzone oder auch Tangential-, Transitional- und Radiärzone. Dabei beschreiben letztere Begriffe die Orientierung der Faservorzugsrichtung der Kollagenfasern oder der Zelllängsachsen zur Oberfläche (z.B. Benninghoff 15.Aufl. 1994, Stockwell et al. 1975, Rudert et al. 1998).

Die Zellen, welche den verschiedenen Zonen zugeordnet werden, unterscheiden sich nicht nur morphologisch in Form, Größe und Anordnung, sondern auch in ihrer Stoffwechselaktivität (Aydelotte et al. 1988). Betreff einiger Zellparameter (Volumen, Oberfläche, Matrixvolumen) wurde dargestellt, daß Zellvolumen und Zelloberfläche von superfizial nach radial um den Faktor zwei steigen (Wong et al. 1996). Die metabolische Aktivität, gewertet am Gehalt an Granula, der Zellvakuolen und Transport- oder Speichervesikel, ist gering in der superfizialen Zone und steigt über die Transitionalzone bis zu einem sehr hohen Granulagehalt in der Radiärzone (Wong et al. 1996, Brighton et al. 1984), wo demnach die höchste Stoffwechselaktivität vermutet wird (Meachim et al. 1962).

Allerdings ergeben sich von dieser oben genannten klassischen Zoneneinteilung, abhängig von Studiendesign und bildgebender Methode (Hedlund et al. 1993), abweichende Zoneneinteilungen. Da die Gliederung nach der prädominanten Kollagenfaserverlaufsrichtung oder der Anordnung der Zellen in der praktischen Anwendung oft keine eindeutig reproduzierbaren Grenzen liefert, erfolgte auch die pragmatisch arithmetische Teilung in eine durch ihre Zellanordnung eindeutig bestimmbare obere Zone (Tangentialzone mit oberflächenparallelen flachen Zellen) und drei in gleichem Abstand zueinander liegende weitere Zonen (Eggli et al. 1988). Auch wurden durch weitere Unterteilung der oberen Zone in eine weitere superfiziale und tiefe Schicht vier Zonen des unkalzifizierten Knorpels unterschieden (Weiss et al. 1968), drei Zonen inklusive kalzifiziertem Anteil (Palfrey et al. 1975) oder drei Zonen mit zweigeteilter mineralisierter Zone (Brighton et al. 1984).

Aus diesen Uneinheitlichkeiten heraus sind zonenbezogene morphologische Ergebnisse des Knorpels und seiner Zellen oft schwer vergleichbar.

Wir halten uns in unserer Arbeit an die oben aufgeführte klassische Einteilung. Diese allgemein anerkannte zonale Gliederung des Gelenkknorpels sieht von der Oberfläche zur Tide Mark absteigend folgende Zonen und Zonencharakteristika vor:

I Tangentialzone

Die Dicke der Tangentialzone beträgt je nach Knorpel wenige 100 µm. Die Zellen der obersten und dünnsten Zone sind charakterisiert durch ihre einzelne Lage, flache, diskoide, spindelähnliche Form und die Ausrichtung ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche (Poole et al. 1997, Brighton et al. 1984). Sie enthalten reichlich RER und Mitochondrien, wenig Vakuolen und Vesikel, etwas Golgiapparat, Zytoplasmavakuolen („holes“) und Glykogen. Das Zytosol erscheint in der Elektronenmikroskopie dunkel (Brighton et al. 1984).

Die sie umgebenden Kollagenfasern aus dichten Laminae einheitlichen Kollagens (Poole et al. 1997) sind parallel zur Oberfläche ausgerichtet (Clarke et al. 1971, Fischer et al. 1988). Der Kollagengehalt ist in dieser Zone am höchsten, die Kollagenfaserbündel liegen oberflächenparallel geordnet vor und sie haben einen hohen Vernetzungsgrad (Muir et al. 1970).

Der Proteoglykangehalt dieser Zone ist niedrig (Poole et al. 1997, Muir et al. 1970).

Aus diesen Eigenschaften ergibt sich eine vergleichsweise hohe Zugfestigkeit (Torzilli et al. 1989) und niedrige Permeabilität (Maroudas et al. 1978, 1979). Die Tangentialzone als oberste Knorpelzone ist verantwortlich für die Kontrolle des Flüssigkeitsaustausches und für das viskoelastische Verhalten des Knorpels (Torzilli et al. 1989, Setton et al. 1993). Man sieht die Tangentialzone als „tension resistant diaphragm“ (Meachim, Stockwell et al. 1979). Sie gilt auch als mechanische Schutzschicht gegen Scherkräfte, Abnutzung und tangentielle Dehnung (Broom et al. 1986, O'Connor et al. 1993, Fischer et al. 1991). Verantwortlich dafür wird ihre Faseranordnung gemacht, welche geeignet scheint, einwirkende Kräfte über die Gesamtoberfläche zu verteilen (Putz et al. 1993, Broom et al. 1985, Glaser et al. 2002). Unter degenerativen Prozessen können die oberflächlichen Kollagenfasern demaskiert werden. Dies wird sichtbar als Fibrillation auf der Oberfläche, bis hin zur Aufrauung und Rupturen der Oberfläche (Broom et al. 1986, Roth et al. 1980).

II Transitionalzone

Diese Zone liegt unter der Tangential- und oberhalb der Radiärzone. Die Transitionalzone, auch als reine Übergangszone zur Radiärzone beschrieben (Aspen and Huskins 1989, Clark et al. 1985), nimmt methodenabhängig (Putz et al. 1993) ca. 20 – 70 % der Gesamtknorpelhöhe ein (Broom et al. 1985, Omelianeko et al. 1991).

Sie wird als Übergangszone bezeichnet, da die Zellanordnung hier von der oberflächenparallelen Orientierung zur typisch oberflächenvertikalen der darunterliegenden Radiärzone übergeht und nicht in einer typischen, einheitlichen Form zu erfassen ist.

Die Chondrozyten runden sich ab, sie bekommen eine spheroidale Form (Poole et al. 1997), sind weniger flach und platt und liegen in zufallsverteilten kleinen Zellgruppen (Brighton et al. 1984). Ihre Längsausrichtung ist uneinheitlich mit schrägem bis oberflächenparallelem Verlauf (Benninghoff 15. Aufl. 1994).

Die Chondrozyten besitzen reichlich RER, Golgi und Mitochondrien. Im Zytoplasma sind wenig Vakuolen und Vesikel sichtbar, es enthält Fett und Glykogen, einige Filamentstrukturen und Zytoplasmalöcher. Das Zytosol erscheint im Elektronenmikroskop dunkel (Brighton et al. 1984).

Auch die Kollagenfasern sind ohne Vorzugsrichtung orientiert. Sie bilden ein schräg übergehendes Netzwerk (Poole et al. 1997, Benninghoff 15. Aufl. 1994). Der Kollagengehalt sinkt im Vergleich zur Tangentialzone (Muir et al. 1970)

Die Proteoglykankonzentration dagegen steigt an (Maroudas et al. 1976, Poole et al. 1997).

Aus ihrer Zusammensetzung ergibt sich für die Transitionalzone im Vergleich zur Tangentialzone eine geringere Zugfestigkeit (Broom et al. 1986 / Saxena et al. 1991) bei wachsender Drucksteife (O'Connor 1989).

III Radiärzone

Diese Zone grenzt nach oben an die Transitionalzone und wird nach unten durch die Tide Mark von der mineralisierten oder kalzifizierten Zone abgeschieden.

Die runden bis spheroiden Chondrozyten mit senkrecht zur Oberfläche laufender Orientierung liegen in Säulen zusammengefaßt. Sie weisen einen bevorzugt radiären, d.h. senkrechten, Verlauf zur Oberfläche auf (Poole et al. 1997, Brighton et al. 1984).

Auffällig ist der hohe Gehalt an RER, Mitochondrien, Golgi, feinen Filamenten und Glykogen. Es finden sich Zytoplasmalöcher, Vakuolen und Vesikel im dunklen Zytosol (Elektronenmikroskopie) (Brighton et al. 1984).

Die bevorzugte Orientierung senkrecht zur Oberfläche gilt auch für die Kollagenfasernanordnung (Omelianeko et al. 1991, Clarke et al. 1971, Clark et al. 1985). Diese radiäre Verlaufsrichtung der Fasern scheint sich erst mit der Skelettreife herauszubilden, wie Untersuchungen am Schwein gezeigt haben (Putz et Fischer 1993). Der Kollagengehalt sinkt mit steigendem Abstand von der Oberfläche (Hedlund et al. 1993).

Man findet im Vergleich zu den weiter oberflächennahen Zonen einen steigenden Proteoglykangehalt (Poole et al. 1997). Der Proteoglykangehalt ist bei 50 – 75 % der Gesamthöhe gerechnet von der Oberfläche maximal. Dort ist auch die Drucksteife maximal ausgeprägt (O'Connor et al. 1989), während die Zugsteife in Korrelation mit dem geringeren Kollagengehalt minimal ist (Roberts et al. 1986, Roth et al. 1985).

IV Mineralisierte Zone

Die durch die Tide Mark (TM) nach oben abgrenzbare mineralisierte Zone gehört eingelagerter Kalziumphosphat-Kristalle wegen nicht mehr zum unkalzifizierten Knorpel. Brighton (1984) unterscheidet innerhalb der mineralisierten Zone einen oberen von einem unteren Abschnitt. Die mineralisierte Zone ist von großer Bedeutung. Nicht nur da von ihr beim Kind und Jugendlichen Wachstum und enchondrale Verknöcherung ausgehen, sondern auch, weil sie eine gewisse Regenerationsfähigkeit behält und dadurch Ansätze für eine Therapie bei Knorpelschäden bietet (Rudert et Wirth 1998, Wakitani et al. 1994). Der Anteil der mineralisierten Zone an der Knorpelgesamthöhe beträgt durchschnittlich 3 – 9 %. Er ist intraindividuell konstant, schwankt infolge der „Verzahnung“ mit dem subchondralen Knochen lokal allerdings um bis zu 50 % (Müller-Gerbl et al. 1987). Man kann die mineralisierte Zone zum subchondralen Knochen durch eine sogenannte „cement line“ abgrenzen (Poole et al. 1997).

Man findet runde Zellen in unkalzifizierten Lakunen (Poole et al. 1997). Diese werden zum Teil als auffällig degeneriert aussehend beschrieben. Sie sind einzeln und zufällig verteilt (Brighton et al. 1984). Die Chondrozyten liegen in kleinen Gruppen, aber nicht mehr in Säulen. Das Zytosol ist im Elektronenmikroskop hell und enthält viele Löcher, mäßig RER, kein Glykogen, Filamente oder Vesikel (Brighton et al. 1984).

In neuerer Zeit werden die statisch-strukturellen zonalen Gliederungen von funktionellen zonalen Gliederungen erweitert. Das beruht auf Veränderungen der Kollagenfaserarchitektur bei Belastung im Rasterelektronenmikroskop, bei denen Tangential- und Transitionalzone eine funktionelle Einheit zu bilden scheinen (Glaser et al. 2002).

2.1.3. Territoriale Gliederung

Zusätzlich zur horizontalen Unterteilung des Gelenkknorpels in Zonen erfolgt histologisch und elektronenmikroskopisch eine weitere Einteilung. Diese verläuft konzentrisch um die Chondrozyten herum in Territorien oder Matrices (Poole et al. 1984). Sie stellen zusammen die Mikroumgebung des Chondrozyten dar (Poole et al. 1984). Der Chondrozyt und seine perizelluläre Mikroumgebung bilden die strukturelle Einheit des Chondrons (siehe unten) (Benninghoff et al. 1925, Szirmai et al. 1969, Poole et al. 1988). Chondrone besitzen bei 3D-Rekonstruktion nach Elektronenmikroskopie eine Polarität (Poole et al. 1997): den artikulären Pol (zur Oberfläche hin, er scheint dichter) und den basalen Pol (zur Tide Mark hin). Die folgenden Ausführungen beziehen sich ebenfalls auf Betrachtungen im Elektronenmikroskop:

Perizelluläre Matrix (PCM):

Hier findet sich ein feines Netzwerk aus dünnem, filamentartigem Material (Kollagen IX (Poole et al. 1997), Kollagen Typ VI (Poole et al. 1992)) mit einem hohen Gehalt an kondensiertem Proteoglykan. Es kommen keine gebündelten Kollagenbänder vor (Poole et al. 1984). Desweiteren weist die PCM einen hohen Hyaluronatgehalt auf (Mason et al. 1981, Poole et al. 1997), viele sulfatierte Proteoglykane (Poole et al. 1984), Biglykan (Moisge et al. 1994), Fibronectin (Glant et al. 1985), Laminin (Burr et al. 1996) und Matrixglykoprotein inklusive des „link proteins“ (Ratcliffe et Mow 1996).

Perizelluläre Kapsel:

Sie ist eine diskrete Umkapselung aus fibrillären Strukturen, welche nur in der mittleren und tiefen Knorpelzone die PCM umgibt. Es handelt sich um ein Netz feiner Fibrillen. Sie umgeben longitudinal, transversal, schräg und zirkulär die Chondrozyten. Zur Gelenkoberfläche hin gelegene Kapselanteile scheinen aus konzentrischen Laminae transversaler und longitudinaler Fibrillen zu bestehen. In der superfizialen Zone ist eine perizelluläre Kapsel nur bei Fixation während Kompression erkennbar (Poole et al. 1984).

Perizelluläre Kanäle:

Man findet sie nur in der mittleren und tiefen Knorpelzone. Sie sind immer zum artikulären Pol gerichtet. Diese Kanäle, die durch lokale Kompaktierung und Umformung von Kapselfasern entstehen, verbinden die PCM mit der territorialen Matrix (Poole et al. 1984).

Territoriale Matrix (TMa):

Es handelt sich hier um eine direkt an die perizelluläre Kapsel anschließende Region. Bestehend aus Bündeln von Kollagenfibrillen weist sie elektronendurchlässige Räume auf. Diese können elektronendichte Proteoglykanaggregate enthalten. Am Übergang zur Interterritorialen Matrix wird die Kollagenfaserpackung dichter (Poole 1984). Die TMa ist reich an Chondroitinsulfat (Meachim, Stockwell et al. 1979).

Interterritoriale Matrix (ITM):

Die interterritoriale Matrix ist die eigentliche Knorpelmatrix. Auffällig ist die dichtere Packung der Kollagenfasern im Vergleich zur territorialen Matrix (Poole et al. 1984, Paukkonen et al. 1987). An den Kollagenfasern liegen große Mengen elektronendichten Materials an. Dessen Menge nimmt von der mittleren Zone zur tiefen hin zu. Dieses Material ist granulär und verschwindet bei Entkalkung nicht (Poole et al. 1984). Die ITM besitzt einen großen Gehalt an hochmolekularem Keratansulfat (Stockwell, Meachim et al. 1979, Kincaid et Van Sickle et al. 1981).

2.1.4. Chondrozyten – die zellulären Elemente des Knorpels

Chondrozyten differenzieren sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen über Vorknorpelzellen und Chondroblasten zu gering basophilen Chondrozyten. Sie besitzen einen hohen Gehalt an rauhem endoplasmatischem Retikulum (RER), Golgi-Apparat und Mitochondrien. Die große Zahl von Glykogengranula weist auf die hohe Produktionsrate von Grundsubstanz, vornehmlich Glykosaminoglykanen und Protein, hin (Benninghoff 15.Aufl. 1994). Die Chondroblasten werden bei der Produktion der Grundsubstanz auseinandergedrängt. So entstehen einzeln liegende Chondrozyten. Sie sind umgeben von territorialer und interterritotialer Matrix. Bis etwa zur 18. Schwangerschaftswoche liegen die Chondrozyten einzeln verteilt (Rother et al. 1990). Bei ihrer Teilung ergeben sich isogene Zellgruppen. Diese werden allgemein auch als Chondron bezeichnet. Poole (1997) bezeichnet in Anlehnung an Benninghoff (1925) als Chondron auch den einzelnen Chondrozyten mit seiner perizellulären Matrix oder Kapsel. Die eigentliche Knorpelmatrix, welche die typischen Kollagenarchitektur des Knorpels bildet (Benninghoff et al. 1925), wird auch als interterritoriale Matrix bezeichnet. Dazwischen liegt die territoriale Matrix. Die isogenen Zellgruppen bilden dann Doppel-, Dreier- oder Mehrfach-Chondrone. Diese Gruppierung

wird auch als Clusterung bezeichnet und findet erst postpartal statt (Rother et al. 1990). Die Chondrozyten nehmen 1-10 % des Gewebevolumens ein (Stockwell 1967). Die Zelldichte ist im menschlichem Knorpel oberflächennah am höchsten. Sie sinkt mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche (Stockwell et al. 1967, 1971). Zellen in verschiedenen Zonen unterschieden sich durch ihre Größe, Form und metabolische Aktivität (Aydelotte et al. 1988)

Die metabolische Aktivität der Chondrozyten wird durch externe Belastung und Parameter, die Folgen der Belastung sind, komplex beeinflusst. So ist der Zellmetabolismus abhängig von der Position der Zelle zwischen Oberfläche und Tide Mark (Aydelotte et al. 1988) und von der auf sie einwirkenden Kraft (Sah, Kim et al. 1989). Zelluläre Deformation beeinflusst so die zelluläre Aktivität (Lipiello et al. 1985, Parkinnen et al. 1992). Auch Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Mediatoren sind Einflußfaktoren (Bayliss et al. 1992). Physiologisch stehen Produktion und Abbau der Matrixkomponenten unter Zytokinkontrolle. Die Zytokine stammen z.T. von den Chondrozyten selbst (Autoregulation), z.T. aus der Synovialflüssigkeit (parakrine Regulation) (Buddecke 3. Aufl. 1993). Mechanische Faktoren agieren synergistisch mit physiochemischen und pharmakologischen (Zytokine, Prostaglandine, NSAR) bei der Regulation von Zellaktivität und Gewebemorphologie (Torzilli et al. 1997). Reduktion der chondrozytären Syntheseleistung unter inadäquater mechanischer Belastung führt zum Überwiegen kataboler Prozesse und zur Degeneration des Knorpels (Buddecke 3. Aufl. 1993).

Bei der Degeneration des Knorpels liegt besonderes Augenmerk auf den Zellen der oberflächlichsten Knorpelschicht. Bei Untersuchung der Chondrozytenhöhlen (als präparationsbedingtem Maß für die Chondrozytengröße) fand man abnehmende Zahl und Dichte der Knorpelhöhlen von superfizial nach basal mit steigendem Abstand zueinander (Bertam et Lierse 1991). Da Chondrozyten bei arthrotischer Degeneration schrumpfen (Annefeld et al. 1983), wurde die Tendenz zu verschmälerten Chondrozytenhöhlen der superfizialen Schicht in präarthrotischem Knorpel als Atrophiezeichen der Zellen gewertet (Bertam et Lierse 1991). Die Tangentialzone besitzt zwar die beste Nährstoffversorgung, da sie zum Gelenkspalt mit der nährenden Synovialflüssigkeit die kürzeste Diffusionsstrecke zu überwinden hat (Bertram et Lierse 1991). Andererseits besitzt diese Zone mit der höchsten Zelldichte die geringste Stoffwechselaktivität. Dies wird als Nachteil in der Anpassungsfähigkeit auf mechanische Belastung gewertet (Bertram et Lierse 1991).

Insgesamt wird dieser Zone daher ein hohes Arthroserisiko zugeschrieben (Bertram et Lierse 1991).

Die StoffwechsellLeistungen der Knorpelzellen werden nicht nur durch die Position oder zonale Zuordnung im Gesamtknorpel bestimmt.

Die Chondrozytensyntheseaktivität kann auch territorial unterschiedlich ausgeprägt sein. So liegen Maxima für die Sulfatproduktion einerseits in der oberen Radialzone, andererseits in der perizellulären Matrix. Für die Prolinkonzentration finden sich Maxima in der unteren Radialzone mit gleichmäßiger Verteilung über die perizelluläre, territoriale und interterritoriale Matrix (Wong et al. 1996).

Eine veränderte Syntheseleistung der Chondrozyten kann durch mechanische Belastung erzielt werden. In diesem Zusammenhang wird von Guilak und Fremann das Paradigma „function follows form“ vorgestellt (Freeman et al. 1994, Guilak et al. 1995). Zelluläre Form, Oberflächenumfang und Zellvolumen bestimmen Phänotyp und Genexpression (Urban et al. 1993, Newmann et al. 1988). Beispielsweise produzieren Zellen mit runder Form in Agarosegel vorwiegend Kollagen II (Zanetti et al. 1989) flache Zellen in Kultur dagegen Kollagen I (Benga et al. 1982, Zanetti et al. 1989).

Zur Anpassung auf mechanische Belastung ist eine Möglichkeit der Stoffwechselregulation unter deformierender Last die direkte Weitergabe des mechanischen Signals über das Zytoskelett an den Zellkern (Guilak et al. 1995). Hier fungiert das Zytoskelett selbst als second messenger bei der Signaltransduktion. Dabei kann diese Signaltransduktionsmaschinerie auf das äußere Signal hin moduliert werden (Bran et Stanford 1994). Die Vorstellung des Zytoskelettes als second messenger wird gestützt durch eine unterbrochene Signalweitergabe bei Zerstörung des Zytoskelettes (Guilak et al. 1995, Benjamin et al. 1994, Durrant et al. 1996). Weitere potentielle Überträger des äußeren mechanischen Signals sind Flüssigkeits- und Elektrolytströme, Kalziumkonzentrations-Anstieg (Guilak et al. 1994), osmotische Potentiale und Volumenregulation (Freeman et al. 1994). Die Deformation der Extrazellulärmatrix führt über Deformation der Zellen (Broom et Myers 1980, Guilak et al. 1995) zur Kerndeformation (Guilak et al. 1995). Die Deformierung des Kernes allerdings beeinflusst die Syntheseleistung (Aggrecane) (Buschmann et al. 1996).

2.1.5. Matrix

Die Matrix besteht aus einem Kollagenfasergerüst und füllender Grundsubstanz.

Bei den Fasern handelt es sich überwiegend Typ II- Fasern (90%). Perizellulär kommt Typ-I-Kollagen vor. Um die zellulären Elemente herum sind die Kollagenfasern konzentrisch angeordnet, interterritorial herrscht eine zonale Vorzugsrichtung vor. Dabei findet man Kollagenfasern unterschiedlicher Polarität. Etwa je 50 % laufen parallel bzw. antiparallel ausgerichtet. Ob dieses Phänomen durch die Art ihrer Fibrillogenese bedingt wird, ist unklar. Nach Hedlund weichen etwa 5 % der Fasern von der Hauptrichtung ab (Hedlund et al. 1993). Während Palfrey die höchste Volumendichte an Kollagen in einer mittleren Knorpelhöhe beschreibt (1975), finden Hedlund et al. steigende Volumendichte und Faserdurchmesser sowohl von perizellulär nach interterritorial, wie auch von superfizial nach basal (Weiss et al. 1968). Knorpel hoher Belastung weist variabelere und breitere Faserstärken auf (Zambrano et al. 1982). Basal beschriebene dickere Fasern können nicht eindeutig als separate Population eingeordnet werden. Es ist nicht sicher, ob sie nicht nach superfizial astartig in dünnere Fasern auslaufen. Auch wenn dargelegt wurde, daß die Kollagenfasern durch fast die gesamte Knorpelhöhe laufen und daher ein großes Längen/Durchmesser- Verhältnis besitzen (Clark et al. 1985), konnten einzelne Fasern nicht durchgehend von basal nach superfizial verfolgt werden.

Die Grundsubstanz besteht zu 70 % aus Wasser und zu 4 % aus Mineralsubstanz. Die Verteilung der Grundsubstanz um die Chondrozyten herum ist inhomogen. Von perichondral nach interterritorial nimmt die Konzentration ab. Konsekutiv ergibt sich eine abnehmende Färbungsintensität (z.B. Azan). Das Grundgerüst wird von Hyaluronat gebildet. An dieses sind über Bindemoleküle Proteoglykane geheftet. Von ihnen ragen flaschenbürstenartig die Glykosaminoglykane (GAG) ab. Im Fall des hyalinen Knorpels ist das Hauptproteoglykan, neben anderen kleineren (Heinegard et al. 1992), das Aggrekan. Es besteht aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Über Hyaluronektin bindet es als link protein. Die GAG-Seitenketten besitzen eine hohe Wasserbindungskapazität und stoßen sich wegen ihrer gleichartig nach außen gerichteten negativen Ladung voneinander ab. Sie sind das wesentliche druckaufnehmende Element im Knorpel. Sie bedingen die prallelastischen Eigenschaften und die Druckfestigkeit des Knorpels. Bei osteoarthrotischer Degeneration verändern sich der Proteoglykangehalt (Weiss et al. 1979), der Hyaluronatgehalt, die GAG-Zusammensetzung (Vasan et al. 1983) und der Wassergehalt (Mankin et al. 1975).

Die Proteoglykane stehen mit den Kollagenfasern in elektrostatischer Wechselwirkung (Schmidt et al. 1990). Sie nehmen durch Einbindung in die Kollagenmatrix nur 1/5 des Volumens ein, welches sie in freier Lösung hätten (Muir et al. 1983). Die sie einfassenden Kollagenfibrillen sorgen für Zugfestigkeit und Gewebsintegrität. Je nach Position im Gelenk ist ihre Vorzugsrichtung verschieden (Zambrano et al. 1982, Paukkonen et Helminen 1987). Aus der Kombination zwischen Proteoglykan- vermittelter Druckfestigkeit und Kollagen vermittelter Zugfestigkeit ergibt sich die hohe mechanische Belastbarkeit des Knorpels.

2.2. Funktionelle Biomechanik des Gelenkknorpels

2.2.1. Matrix

Die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels werden durch sein viskoelastisches Verhalten erklärt. Dieses hängt von der Interaktion zwischen Kollagenen, Proteoglykanen und vom Wassergehalt ab. Einen sehr guten Überblick über die Entwicklung des Verständnisses zur funktionellen Biomechanik des Gelenkknorpels bietet L. Setton et al. (1993):

In den 70er Jahren stellte man sich das viskoelastische Verhalten des Knorpels als Interaktionsergebnis solider Matrixmoleküle (d.h. single-phase-behaviour) vor. Zum Beispiel als „spring-dashpot-elements“ (Coletti et al. 1972, Hayes, Mockros et al. 1971, Parson, Black et al. 1977) oder als „short / longtime-moduli“ (Hori, Mockros et al. 1976, Kempson et al. 1971) in einer Flüssigkeitsausstrom-unabhängigen (flow-independent) Belastungsantwort.

Erweitert wurde diese Vorstellung sehr bald von Mow et al. (1980 und 1982) als Interaktion aus inkompressibler elastischer Matrix und nicht visköser inkompressibler Flüssigkeit. Da diese Interaktion ihrerseits durch den Grad des Flüssigkeitsflusses bzw. der Permeabilität der Matrix bestimmt wird, wird hier ein „flow-dependent biphasic behaviour“ beschrieben. Diese biphasische Theorie (BP) wird weiter ergänzt durch die Vorstellung eines biphasischen poroelastischen Verhaltens (BPVE) des Gelenkknorpels. Dieses bezieht zusätzlich die intrinsische Viskoelastizität der Matrix ein und berücksichtigt daher sowohl flow-dependent als auch flow-independent Mechanismen (Mak et al. 1986).

Zum Vergleich der BP- und BPVE-Theorie bezüglich des Verhaltens oberflächendefekten und –beschädigten Knorpels unter mechanischer Last: Die BPVE-Theorie zeigt eine deutlich

suffizientere Beschreibung der Reaktion oberflächendefekten Knorpels. Bei intakter Oberfläche stellen beide Theorien die Vorgänge im Knorpel valide dar. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei beschädigter Oberfläche Permeabilität und konsekutiv „creep“- (= Flüssigkeitsausstrom) Geschwindigkeit stark ansteigen. Hierdurch kommt es zu einer größeren und rascheren Abhängigkeit des biomechanischen Verhaltens von der Matrix. Die Matrixbeanspruchung steigt infolgedessen mit steigender Permeabilität an. Die flow-independent Mechanismen gewinnen an Bedeutung. Umgekehrt wird das flow-independent intrinsische viskoelastische Verhalten der Matrix von einer niedrigen Permeabilität „gecovert“. Je kleiner die Permeabilität, desto weniger Bedeutung hat das intrinsische Matrixverhalten. Schlußfolgernd ist die BP ausreichend bei der Darstellung mechanischen Verhaltens intakten Knorpels unter kurzer Last, die BPVE aber überlegen bei der Beschreibung oberflächendefekten Knorpels unter Last.

In der Vorstellung der BPVE-Theorie wird die initiale elastische Deformation von den Kollagenfasern bestimmt (solide Phase) (Jurvelin et al. 1988, Bader, Kempson et al. 1994, Kim et al. 1995). Sie nehmen richtungsabhängig (anisotrop) Zugkräfte auf (Akizuki et al. 1986). Bei anhaltender Belastung presst sich die interstitielle Flüssigkeit (fluid phase) durch die widerstandsleistenden Proteoglyken-Kollagen-Matrixporen (= creep) (Mow et al. 1984). Der so generierte hydrostatische Druck steigt an, bis er mit der äußeren Kraft im Gleichgewicht steht. Dann endet der Flüssigkeitsausstrom. Da „creep“ Proteoglykanabhängig ist (Jurvelin et al. 1988, Mow, Ratcliffe et al. 1996), steigt mit wachsendem Proteoglykangehalt der Aggregatmodulus.

Die metabolischen Auswirkungen des poroelastischen Verhaltens zeigen Bachrach et al. (1995). Bei der zeitabhängigen Antwort des Knorpels auf mechanische Last dominiert während der soliden Phase der Druck auf die pralle Zelle. Man findet die vorherrschende mechanische Spannung an der Membran, dagegen nicht im Intrazellularraum. Mit der flüssigen Phase, dem Flüssigkeitsausstrom in den Extrazellularraum, verlagert sich die Last bzw. der Druck auf die stabilen Zellkomponenten, d.h. das Zytoskelett. Mit dessen Deformierung ergeben sich Änderungen der Zellaktivität, hier als veränderte Glycosaminoglykansynthese.

Externe Deformation beeinflusst daher den Zellmetabolismus genauso wie Immobilisation und hohe oder ungewöhnliche Gelenkkräfte. Dabei werden metabolische Veränderungen durch morphologische Veränderungen determiniert (Smith et al. 1995).

2.2.2 Biomechanik des Chondrons

Die Antwort des Gelenkknorpels auf mechanische Belastung wird nicht von der Matrix alleine geleistet. Die Chondrozyten bilden eine signifikante viskoeleastische Komponente (Freeman et al. 1994). Zellen und Matrix stellen als hydroelastische Suspension eine synergistische Funktionseinheit dar. Sie absorbiert Kompressions- und Scherkräfte, verteilt sie und leitet sie an den subchondralen Knochen weiter (Poole et al. 1997). Die Compliance der Zellen soll dabei mindestens so groß sein, wie die Compliance der Matrix (Freeman et al. 1994). Andererseits wird die Kompressionssteife der Chondrozyten kleiner vermutet als die der Matrix, da bei 15% lokalem Gewebestreß Zellhöhe und Zellvolumen im Verhältnis gesehen stärker (~ 23 bzw. 20%) abnehmen (Guilak et al. 1995).

Benninghoff (1925) sieht das Chondron als flüssigkeitsgefüllte Blase. Sie vermag gegen Kompression Widerstand zu leisten, Last zu absorbieren und den Chondrozyten zu schützen. Es wurde gezeigt, daß Chondrone bei Belastung vertikal kompaktieren (Broom und Myers et al. 1980), nach lateral deformieren und unter Last ausscheren (Guilak et al. 1995). Bei Entfernung der Last regenerieren sie aber vollständig (Guilak et al. 1995). Chondrozytensäulen sollen sich bei Last kompaktieren und nur etwas nach lateral deformieren. Dabei sollen einzelne Chondrozyten verschoben und rotiert werden (Poole et al. 1984). Auch sollen Mehrfachchondrone (Säulen) eine größere Kompression erfahren als die einzeln liegende Zelle (Guilak et al. 1995)

Poole (Poole et al. 1984) beschreibt das Chondron als mikromechanische Einheit, deren Kapselkollagene als Haltekräfte den Schwelldruck der perizellulären Proteoglykane beschränken. Dieser Restriktionskräfte wegen sollen vertikale Kompression und laterale Deformation nicht-elastisch erfolgen. Das Volumen des Chondrons verkleinert sich bei konstanter Oberfläche, wodurch der intrachondrale Druck steigt (Poole et al. 1984). Als hydraulischer Schutz wird nun von der Proteoglykanmatrix Flüssigkeit abgepresst („cartilage creep“). Dies geschieht von perizellulär durch die perizellulären Kanäle nach territorial (Poole et al. 1984). Bei Belastungsende erfolgt durch osmotische Schwellung Wiederaufnahme von Wasser durch die Proteoglykane zu einem neuen Gleichgewichtszustand (Poole et al. 1997; Mow, Ratcliffe et al. 1996). Dieser Vorgang kann als Mikrozirkulation verstanden werden. Das durch diese Zirkulation erzeugte Strömungspotential transportiert in Chondrozytennähe

Matrixvesikel und Syntheseprodukte in die territoriale und interterritoriale Matrix (Poole et al. 1984, Poole et al. 1988, Poole et al. 1993, Poole et al. 1997).

2.2.3. Zonale Unterschiede in der Biomechanik

Mit der Position der Chondrozyten im Knorpel variieren ihre Form, Dichte und Anordnung. Diese werden von der zonal unterschiedlichen Organisation der Matrix und ihrer Kollagenfaserarchitektur mitbestimmt (Guilak et al. 1995).

Weil die mechanische Antwort auf Deformation durch den ultrastrukturellen Aufbau der Matrixbestandteile determiniert wird, ergibt sich eine zonal differierende, inhomogene und anisotrope Deformationsantwort bei uniaxialem Stress (Guilak et al. 1995). Zusammengefaßt beruht die zonal unterschiedliche Deformationsantwort so zum einen auf zonal unterschiedlicher Zelldichte, Zellform und Zellanordnung, zum anderen auf zonal unterschiedlicher Kollagenfaserarchitektur und zum dritten auf unterschiedlicher Zusammensetzung der Matrix.

Bei Betrachtung der zellulären Elemente führt eine entsprechende Belastung bei Chondrozyten in allen Zonen zu Deformation im Sinne einer Verformung. Die Zellen der superfizialen Zone werden dabei diskoider, die der tieferen Schichten spheroider (Broom, Myers et al. 1980). Bei einer Matrix mit Einschlüssen, hier den Zellen, werden die Matrixeigenschaften um so mehr verändert, je mehr Einschlüsse sie enthält (Guilak et al. 1995). Zusätzlich werden die Matrixeigenschaften beeinflusst durch die Größe, den Elastizitätsmodulus (Chen et al. 1978) und die Volumenfraktion ihrer Einschlüsse (Guilak et al. 1995). Steigt die Volumenfraktion von Zellen mit niedrigem Elastizitätsmodulus an, so sinkt der Gesamtelastizitätsmodulus der Matrix. Dies ist der Fall in der superfizialen Zone des Gelenkknorpels (Guilak et al. 1995). Denn sie weist viele Zellen mit hoher Volumenfraktion auf (Wong et al. 1996). Es werden in der superfizialen Zone die größten Zellhöhen- und -volumenabnahmen bei Kompression beschrieben (Guilak et al. 1995).

Die Kompressionssteife der oberen Knorpelschicht soll um 27% kleiner sein als die tieferer Schichten (Guilak et al. 1995).

Betrachtet man die zonal unterschiedliche Kollagenfaserarchitektur, verlaufen die Kollagenfasern in der Superfizialzone vorwiegend tangential, die der Basalzone radiär. Die Zugsteife ist dort am ausgeprägtesten, wo Streß senkrecht zu den „split-lines“, das ist die

Hauptverlaufsrichtung der Kollagenfasern, ausgeübt wird. Die Kompressionssteife ist dort am ausgeprägtesten, wo Streß parallel zu ihnen ausgeübt wird (Guilak et al. 1995). Die Tangentialzone besitzt demnach eine hohe Zugsteife, die Radiärzone eine hohe Kompressionssteife bei senkrecht zur Knorpeloberfläche wirkender Last. Weiterhin wird die jeweilige Kompressionssteife einer Zone auch als Funktion der Chondrozytensubpopulation der jeweiligen Zone (Aydelotte et al. 1988) und ihrer Zellform (Guilak, Mow et al. 1992) angesehen. Eine stärkere Deformation der oberen Knorpelzone bei Belastung liegt nach oben angeführtem aufgrund zellulärer und faserarchitektonischer Eigenheiten nahe.

2.3. Degeneration / Regeneration und therapeutische Ansätze

2.3.1. Degeneration

Die Osteoarthrose wird morphologisch definiert als Verlust von Knorpelsubstanz. Er ist begleitet von Reparaturvorgängen. Dabei handelt es sich um Sequenzen von Zell- und Matrixveränderungen. Makroskopisch wird das sichtbar als Remodellierung und Sklerose des subchondralen Knochens, sowie als Zystenbildung und osteophytäre Ausziehungen (Buckwalter, Mankin et al. 1997). Dabei muß deutlich unterschieden werden zwischen pathologischen osteoarthrotischen Veränderungen und einfachen Alterungserscheinungen (Martin, Buckwalter et al. 1996, Buckwalter, Mankin et al. 1997).

Buckwalter und Mankin (1997) definieren drei morphologisch- biochemisch unterscheidbare Stadien der Osteoarthrose:

Stadium 1:

Besonderes Augenmerk liegt auf der Knorpeloberfläche. Auch vor sichtbarer Fibrillation der Gelenkoberfläche besteht eine Störung im Aufbau des Matrixgerüsts. Bei konstantem Kollagen II -Gehalt steigt der Wassergehalt der Matrix. Die Proteoglykankonzentration, Aggrecankonzentration und Glykosaminoglykankettenlänge nehmen ab. Jedoch berichten andere Autoren bei beginnender Knorpeldegeneration über steigende Proteoglykan- und Glykosaminoglykan- Konzentration und -kettenlänge (Carney et al. 1985). Dabei soll der Anstieg der Glykosaminoglykan -Konzentration sogar positiv mit dem histologischen Schweregrad der Osteoarthrose korrelieren (Teshima et al. 1983). Buckwalter und Mankin

(1997) berichten weiterhin über Störungen in der Beziehung zwischen Typ-II-Kollagen und anderen, den sogenannten „minor“ Kollagenen. All diese Veränderungen sollen zu gesteigerter Permeabilität, sinkender Steife und konsekutiv erhöhter Vulnerabilität des Knorpels führen.

Stadium 2:

Angeregt durch Änderung der Osmolarität, der Ladungsdichte oder direkt als Reaktion auf mechanischen Stress (Guilak et al. 1995) greifen nun auch die Chondrozyten in den osteoarthrotischen Prozeß ein. Katabole und anabole Faktoren wirken nebeneinander. Zum einen findet man proliferationsbedingte Zellcluster (Schünke et al. 1988). Sie sind umgeben von neu synthetisierter Matrix. Zum anderen sieht man ein destabilisiertes Kollagen II-Netzwerk. Dadurch wird weitere Aufschwellung der Matrix ermöglicht. Der enzymatische Abbau untergegangener Matrixbestandteile mag anabole Zytokine freisetzen. Sie regen die Neusynthese von Makromolekülen an. Gleichzeitig wird die Produktion von NO diskutiert, welches seinerseits die IL-1- Ausschüttung fördern soll (Amin et al. 1995) In dieser Phase überwiegt die Reparationsantwort die katabolen Effekte. Sie kann über Jahre anhalten und sogar Reversibilität der Degenerationen zeigen (Buckwalter, Mankin et al. 1997). Dennoch erfolgt letztendlich keine regelhafte Reparatur. Mankin et al. (1994) nennt hierfür mehrere Möglichkeiten. Einmal die fehlende Blutversorgung im Gelenkknorpel selbst, sowie die Abwesenheit von Fibrinogen in der Synovialflüssigkeit. Zum anderen den hohen Proteoglykangehalt, der die Aktivierung und Aktionen von IGF- β hemmt. Aber auch das Wirken einer „degradative cascade“ aus Stromelysin, Plasmin und Kollagenase wird erwähnt, welche sämtliche Reparaturfaktoren überwiegt, bevor diese ihre Wirkung entfalten können.

Stadium 3:

Die chondrozytäre Reaktion schwächt ab. Im Vordergrund stehen Verlust an Knorpelsubstanz und Veränderungen des subchondralen Knochens. Meist peripher entstehen knöchern-kartilaginäre- fibröse Ausziehungen. Sie werden als Osteophyten bezeichnet. In der Mehrzahl besitzen diese eine kartilaginäre Oberfläche mit Ähnlichkeit zu normalem Knorpelgewebe. Oft entstehen sie an der Knorpel-Knochengrenze. Über die Herkunft dieses kartilaginären Gewebes besteht noch keine Einigkeit. Zusätzlich treten in diesem Stadium sekundäre Veränderungen des Muskel- Kapsel- Band- Apparates auf.

Zu beachten ist, daß die histologische Ausprägung der Schädigung nicht unbedingt mit dem Grad der klinischen Symptomatik korrelieren muß (Buckwalter, Mankin et al. 1997).

Poole beschreibt die Mikroanatomie der Osteoarthrose wie folgt: Die Veränderungen beginnen in der Superfizialzone und schreiten von dort fort. Frühestes Zeichen der katabolen Stoffwechsellage bei Osteoarthrose sind Veränderungen in der Mikroanatomie des Chondrons (Poole et al. 1997). Es erfolgt eine Remodellierung des Chondrons. Dabei schwillt seine Mikroumgebung auf und weicht auseinander (Poole et al. 1997). Um die entstandenen Lücken zu schließen, werden klonale Proliferation und Chondronteilung initiiert (Poole et al. 1992). Dabei kommt es zur Abnahme der Toluidinfärbbarkeit, zum Verlust der fibrillären Architektur und zur Ausbildung einer engen, dichten Glykokalix um den Chondrozyten herum (Poole et al. 1997). Poole beschreibt eine reaktive Erosionsfront von superfizial fortschreitend. An der Erosionsoberfläche bilden sich Chondrozytencluster. Perizellulär findet sich eine nicht-farbbaffine Matrix, während die Matrix zwischen den einzelnen Clustern dunkel erscheint. In der Mitte der Erosionsfront findet eine deutliche Zellteilung statt. Die Chondrozyten migrieren an den Rand der Schwellzone. Die Konzentration perizellulären Kollagens IX sinkt, ebenso wie an der Erosionsoberfläche. Im Gegensatz dazu soll Typ VI Kollagen erst perizellulär, dann direkt an der Zelloberfläche bei Osteoarthrose zunehmend zu finden sein. Durch das umgebende Kollagen VI sollen die Zellen bei Teilung beieinandergehalten werden, was das Auftreten von „Zellklumpen“ erklären kann (Poole et al. 1997).

Wie und ob degenerative Prozesse aufgehalten oder therapiert werden können sind aktuelle Fragen der Forschung.

2.3.2. Regeneration / Therapeutische Ansätze

Im Gegensatz zu Knochen, der eine hohe Heilungskapazität aufweist, besitzt hyaliner Knorpel nur eine begrenzte Selbstheilungstendenz (Rudert, Wirth et al. 1996). Zwar soll Gelenkknorpel zeitlebens syntheseaktive und teilungsfähige Zellen (Chondroblasten) enthalten. Sie sollen durch Proliferation und Synthese von Interzellulärschubstanz auch kleinere Gewebedefekte heilen können (Benninghoff 15.Aufl. 1994). Oberflächliche Läsionen von mehreren mm² zeigen jedoch keine Bildung von Reparationsgewebe (Kim et al. 1991).

Andererseits finden sich oberflächliche Fibrillationen besonders im Alter in vielen Gelenken, ohne daß eine klinische Symptomatik besteht. Sie wirken eventuell aber prädisponierend für weitere Degeneration (Buckwalter, Mankin et al. 1997).

Aus tiefen, d.h. den subchondralen Knochen erreichenden Defekten, kann Regenerationsgewebe von variabler, fibröser bis hyalinartiger Beschaffenheit entstehen (Kim et al. 1991; Rudert, Wirth et al. 1997). Seine Haltbarkeit scheint jedoch begrenzt (Shapiro et al. 1993, Kim et al. 1991). Wie die mineralisierte Zone, welche die Fähigkeit zur Knochenbildung behält (Benninghoff 15.Aufl. 1994), bei der Rekrutierung von Osteoblasten und Osteoklasten (van de Wijngart et al. 1988) und der Remodellierung der Gelenkoberfläche in Abhängigkeit der Gelenkbeanspruchung (Benninghoff 15.Aufl., 1994) wirkt, wird diskutiert. Beschrieben wird die Stimulation der Bildung einer neuen Knorpeloberfläche nach Osteotomie (Buckwalter et al. 1997). Im Röntgenbild soll sich nach Osteotomie ein erweiterter Gelenkspalt darstellen, welcher durch Formation einer neuen fibrocartilaginösen Oberfläche entstanden sein soll (Buckwalter et al. 1994).

Therapeutische Anwendung finden desweiteren sowohl oberflächliche Behandlungen (Knorpelglättung, Laserglättung, Debridement) als auch tiefe (Eröffnung des knöchernen Markraumes mittels subchondraler Abrasion, Spongialisierung, Pridie-Bohrung). Daneben stehen weitere Methoden zur Verfügung bzw. sind in Erprobung (Mikrofrakturierung, Gentherapie, Transplantation autolog / allogene) (Rudert, Wirth et al. 1998).

Dabei zeigt die oberflächliche Glättung, wie originale oberflächliche Läsionen, allenfalls eine kurzzeitige metabolische und enzymatische Antwort (Rudert, Wirth et al. 1996; Rudert, Wirth et al. 1997). Sie besteht in zellulärer Klonierung und verstärkter Safranin-O- Färbbarkeit (Kim et al. 1991), hat aber keine echte Heilungstendenz. Scheinbar kann es zu vorübergehender Faserknorpelbildung kommen. Er unterliegt jedoch rascher Abtragung (Mankin et al. 1982). Ansonsten stehen hier Degenerationszeichen wie Zellnekrosen unterliegender Knorpelschichten, Oberflächenunregelmäßigkeiten und Retraktion der Läsionsränder im Vordergrund (Kim et al. 1991).

Auch tiefe Defekte werden therapeutisch gesetzt. Man erhofft sich von der Freilegung des Knochenmarkraumes die Einwanderung undifferenzierter Stammzellen und somit Heilung im Sinne von Wiederherstellung der Gewebsintegrität (Kim et al. 1991, Wakitani et al. 1994). Hier soll es nach Abdeckung des Defektes mit Blut und Ausbildung eines fibinösen,

arkadenförmigen Netzwerkes zur Einwanderung undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen aus dem Markraum in die Peripherie kommen (Shapiro et al. 1993). In diesem Granulationsgewebe (Rudert, Wirth et al. 1997) differenzieren sich diese Zellen zuerst in fibroblastenartige Zellen, später zu Chondroblasten (Shapiro et al. 1993). In einem langandauernden [8 Wochen (Shapiro et al. 1993), 12 Wochen (Kim et al. 1992), 12 Monate (Rudert, Wirth et al. 1997)] Regenerationsprozeß kann es über die Bildung fibrösen Gewebes zur Ausbildung hyalinen Knorpels kommen. Dessen superfiziale Schicht ähnelt der ursprünglichen Tangentialzone, ist aber fibrokartilaginös (Shapiro et al. 1993). Die Verbindung des Regenerates zum Nachbargewebe ist mangelhaft (Shapiro et al. 1993). Seine Haltbarkeit ist deshalb und wegen einer sich vom normalen Knorpel unterscheidenden Komposition [(Kollagen Typ I (Furukawa et al. 1980)), Struktur (Shapiro et al. 1993) und mechanischer Eigenschaft (Buckwalter et al. 1997) schlecht. Degeneration ist daher häufig (Shapiro et al. 1993).

Einen neuen, vielversprechenden Ansatz bietet die autologe Chondrozytentransplantation. Ihre Morphologie und Klinik wird aktuell untersucht. Es liegen aber noch keine systematisch ausgewerteten Langzeituntersuchungen über mehr als 5 Jahre vor (Mankin et al. 1994, Rudert, Wirth et al. 1997, 1998, Buckwalter et al. 1997, Brittberg et al. 1996).

3 Material

3.1. Materialgewinnung

10 Rinderhüftköpfe von Schlachtkühen im Alter zwischen 4 und 10 Jahren (Durchschnittsalter: 6,5 Jahre, +/- 2,4) mit einem Durchschnittsgewicht von 339,6 kg (+/- 58,9) wurden sofort nach Erhalt vom Schlachthof verarbeitet. Bis dahin waren zwischen 48 und 96 Stunden nach Schlachtung des Tieres vergangen, im Mittel 56,6 Stunden (+/-21,9). Die Rinderhälften waren in der Schlachtanlage ständig gekühlt. (Innentemperatur höchstens +7°C nach FIHV Anlage 2a, 2.4). Es handelte sich bei den 10 Hüftköpfen um intakten Knorpel, d.h. mit glatter, weißer und glänzender Oberfläche. Zusätzlich verarbeiteten wir 3 primär arthrotische Hüftköpfe mit makroskopisch aufgerauhter, aufgefaselter, gelblich verfärbter und stumpf erscheinender Oberfläche. Die Hüftköpfe wurden unterhalb des Trochanter major abgesetzt (Abbildung 1). Nach Entnahme wurden die Hüftköpfe sofort in 0,9% NaCl-Lösung eingebracht und gekühlt bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Der Transport erfolgte ebenfalls in 0,9% NaCl-Lösung, um Austrocknungsartefakte zu verhindern.

3.2. Probengewinnung

Nach Waschen des Hüftkopfes in 0,9%-Kochsalzlösung, wurde der Hüftkopf in eine Haltevorrichtung eingespannt. Die Faßmuffen wurden dabei am Trochanteranteil und an der kaudalen Kopfseite angesetzt. Die Knorpelfläche des Entnahmeareals wurde dabei nicht tangiert. Als Entnahmeareal wurde die zentrale Zone der kranialseitigen Konkavität am Übergang von Hals zum Femurkopf gewählt (Abbildung 1).

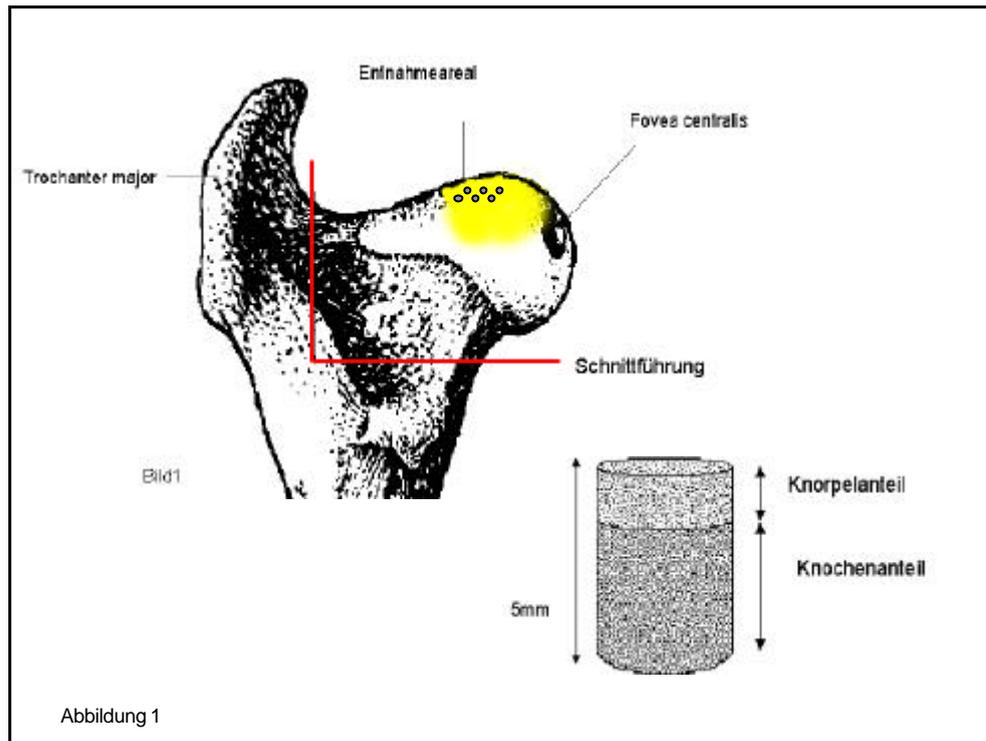


Abbildung 1: Absetzlinien am Femurkopf des Rindes mit Entnahmeareal und Knorpel-Knochen- Zylinder

Insgesamt wurden 206 Knorpel- Knochen- Zylinder entnommen. Pro Hüftkopf wurden mit einem 7mm- Innendurchmesser- Hohlbohrer zwischen 14 und 20 Knorpel-Knochen-Zylinder, durchschnittlich 16, entnommen. Die Abweichungen ergaben sich aus der unterschiedlichen Hüftkopfgröße und des davon abhängigen streng definierten Entnahmeareals. Der Bohrer wurde dabei senkrecht zur Oberfläche aufgesetzt, um Knorpel-Knochen-Zylinder zu erhalten, deren Längsachse senkrecht zur Oberfläche liegt. Zur Ableitung der Reibungswärme des Bohrers wurde mit 0,9%-NaCl-Lösung ständig gespült. Die entnommenen Knorpel- Knochen- Zylinder wurden unter Spülung im Knochenanteil auf 5mm parallel zur Knorpeloberfläche gekürzt (Abbildung 1) und zur Reinigung in NaCl-Lösung mehrmals gespült.

Zur Simulation der Destruktion der oberen Knorpelzone wurde bei 58 der insgesamt 206 Präparate die Knorpeloberfläche abgetragen. Diese 58 Proben stammten aus Proben mit vorher intakten Oberflächen. Es wurden die oberen 100µm mit einer Inloch-Säge Leica SP1600 entfernt. In Abhängigkeit von der Gesamtknorpeldicke entsprach dies der Tangentialzone respektive Tangentialzone und Transitionalzonenanteil. 28 Zylinder wurden aus den 3 Hüftköpfen mit primär arthrotischem Knorpel entnommen.

Es ergaben sich so aus den 206 Proben drei Oberflächeneigenschaften: Intakte Oberfläche (im Folgenden kurz: intakt/i): $n = 120$, künstlich abgetragene Oberfläche (defekt/d): $n = 58$, primär arthrotische Oberfläche (arthrotisch/a): $n = 28$.

4 Methoden

4.1. Belastungsdesign und Probenverteilung

4.1.1. Belastung

Zur Belastung wurden die Knorpel- Knochen –Zylinder in spezielle Haltezyylinder (Innendurchmesser 7mm, Höhe 2 cm) eingesetzt, welche in einer Fußplatte fest verankert wurden. Auf die Proben wurden rechteckige Stempel der Fläche $1 \times 4 \text{ mm}^2$ aufgebracht, welche ebenfalls im Haltezyylinder sicher geführt wurden, um mit ihrer Last senkrecht zur Knorpeloberfläche zu wirken (Abbildung 2).

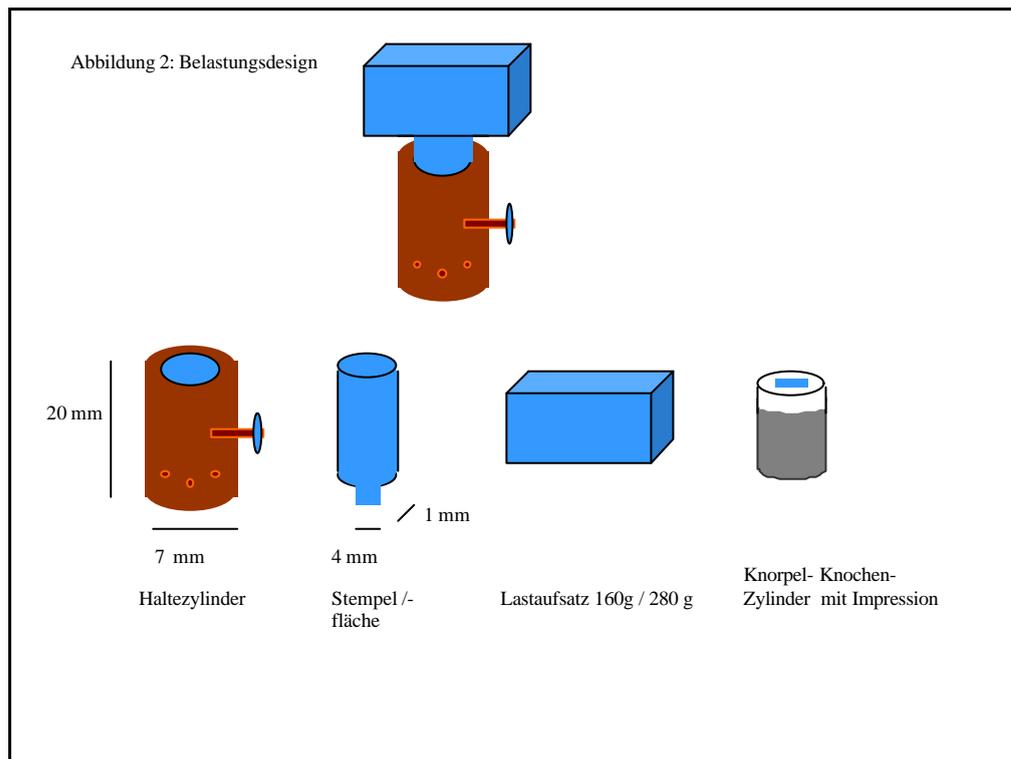


Abbildung 2 : Belastungsdesign: Knorpel- Knochenzylinder im Haltezyylinder mit Stempel und Lastaufsatz

Um Austrocknung zu verhindern, wurden die Haltezyylinder bis zur Hälfte ihrer Höhe mit 0,9% Kochsalzlösung umspült. Sie umgab durch seitliche Aufbohrungen die Proben auch vollständig im Inneren des Zylinders. Der Stempel wurde mit einem Gewicht der Masse 160g

bzw. 280g belastet. Dies entspricht einem Druck von 0,39 MPa bzw. 0,68 MPa. Dieser Druck wurde in Relation zu physiologischen Belastungsverhältnissen im Gelenk gewählt (Standbein beim Schritt des Rindes 0,5MPa) (Fritz W.G. 1975). Die Dauer der Belastung betrug 20 min bzw. 1 min. Noch unter Last wurde der Stempel am Ende der jeweiligen Belastungsdauer mittels einer Stellschraube fixiert. Damit sollten Rückstellvorgänge vermieden werden. Dann erst wurde das Gewicht entfernt. Anschließend wurden die Proben fixiert. Dazu wurden sie im Zylinder mit arretiertem Stempel für 24h in 4% Formalinlösung eingebracht. Danach wurden Stempel und Haltezylinder entfernt. Man erhielt so Knorpel-Knochen-Zylinder, die an ihrer Knorpeloberfläche zentral eine quaderförmige Stempelimpressionsfläche aufweisen (Abbildung 2 und 7).

Nach Oberflächenbeschaffenheit, Belastungsparametern (Lastgröße und Lastdauer) und Untersuchungsmethode (Rasterelektronenmikroskopie, Lichtmikroskopie) ergab sich folgende weitere Probenverteilung: (Abbildung 3a):

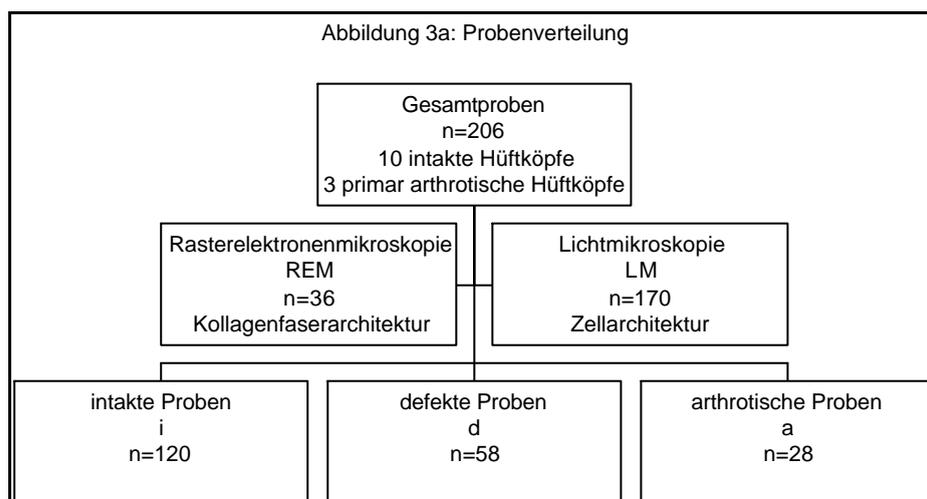


Abbildung 3a: Probenverteilung in intakte (i), defekte (d) und arthrotische (a) Präparate für Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie.

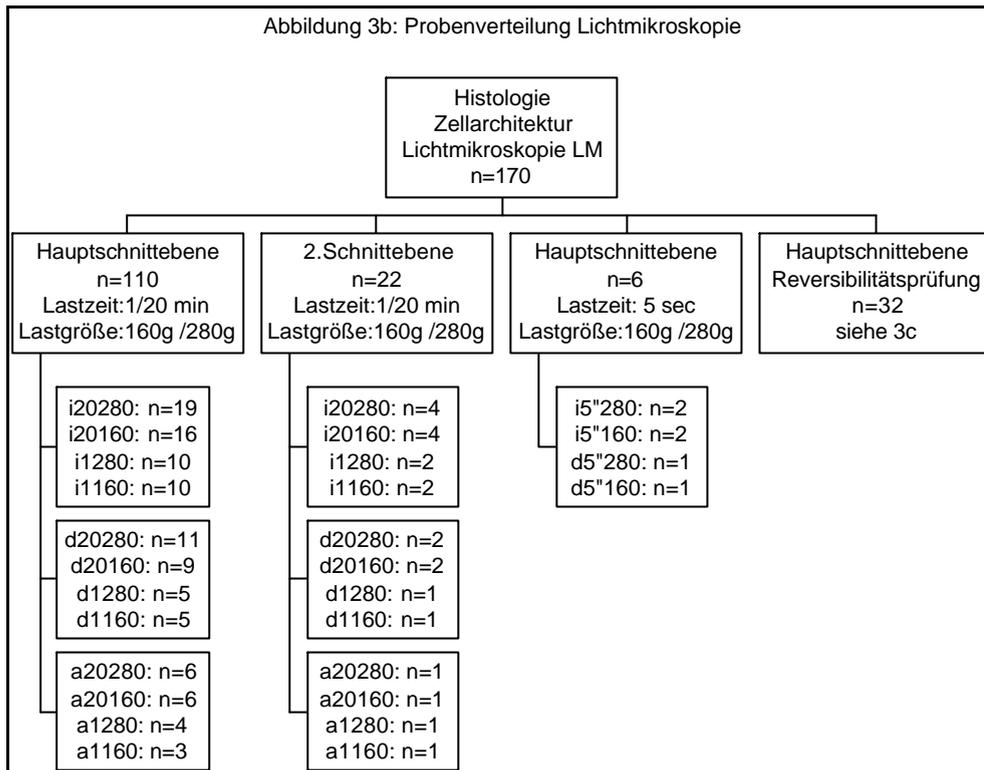


Abbildung 3b: Probenverteilung in der Lichtmikroskopie auf verschiedene Laststufen. Kodierung nach Oberflächenbeschaffenheit (intakt i, defekt d, arthrotisch a; Lastzeit 20min / 1min; Lastgröße 160g / 280g. n = Anzahl.

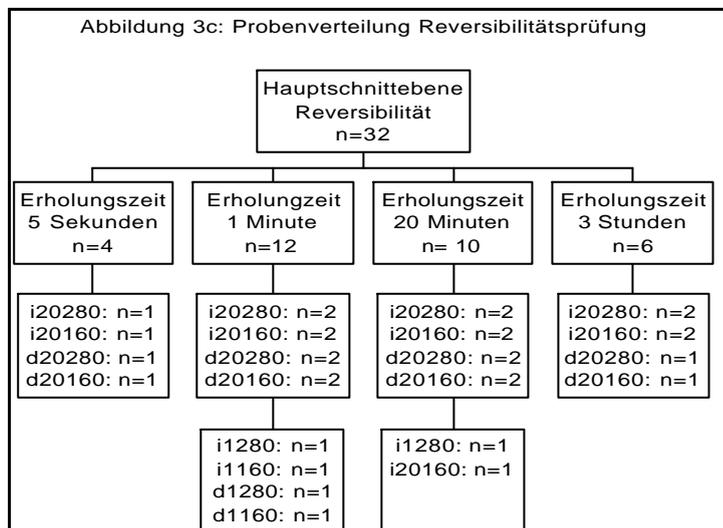


Abbildung 3c: Probenverteilung der Reversibilitätsprüfung in der Lichtmikroskopie. Legende entsprechend 3b.

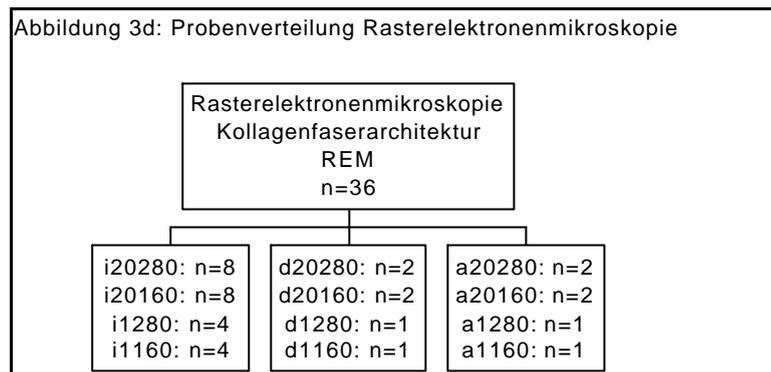


Abbildung 3d: Probenverteilung in der Rasterelektronenmikroskopie auf die einzelnen Laststufen. Legende entsprechend 3b.

Zur Betrachtung der Zellarchitektur in der histologischen Weiterverarbeitung erhielten wir insgesamt 171 Proben. (Abbildung 3b)

Von den 171 Proben wurden 133 Proben wie oben beschrieben belastet (20 min/1 min und 0,39 MPa/ 0,68 MPa). Davon wurden 111 Proben später in einer Hauptschnittebene geschnitten (siehe 4.2.1, Abbildung 7), 22 in einer dazu senkrechten Kontrollebene. 6 Proben wurden nur 5 sec belastet und ebenfalls in der Hauptschnittebene geschnitten. 32 Proben wurden einer Reversibilitätsprüfung zugeführt (Abbildung 3c).

Zur Betrachtung der Kollagenfaserarchitektur in der Rasterelektronenmikroskopie wurden 36 Proben herangezogen. 24 hatten eine intakte Oberfläche, 6 eine defekte und 6 eine primär arthrotische (Abbildung 3d).

4.1.2 Reversibilitätsprüfung

32 Proben aller Oberflächeneigenschaften wurden histologisch einer Reversibilitätsprüfung unterzogen. Sie betrachtet den zeitlichen Verlauf und die Rückbildungstendenz der lastinduzierten Veränderungen im Rahmen der Knorpeldeformation. Dazu wurden die Proben je 20 min belastet und nach Relaxationszeiten von 5 sec, 1 min, 20 min und 3 Stunden fixiert (Abbildung 3c).

4.2. Weiterverarbeitung

4.2.1 Histologie

Zur Entkalkung wurden die formalinfixierten Proben gewaschen und im Vorversuch zunächst in 7% EDTA entkalkt. Da die Entkalkungszeit auf diese Weise über 5 Monate betragen konnte, wurden alle zur Auswertung herangezogenen 171 Proben in 5%iger Salpetersäure entkalkt (Romeis 17. Aufl. 1989). Die Entkalkungsdauer betrug im Wärmeschrank hier nur knapp 24h. Anschließend wurden die Proben in 5%ige Lithiumsulfatlösung eingebracht, um ein Aufquellen der Proben während des nachfolgenden 24- 48 stündigen Wässerns zu verhindern. Die Proben wurden dann zur Entwässerung in einem Einbettautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2h in Alkohol 30,50,50,70,70,80,90,100%, Xylol 100%, Xylol 100%) geführt und dann in Paraffin eingebettet. Die Stempelimpression wurde so ausgerichtet, daß sie später beim Schneiden mit dem Mikrotom senkrecht getroffen wurde. 118 Proben wurden in unserer sogenannten Hauptschnittebene geschnitten. Dabei ist der Schnitt senkrecht zur Längsachse der Stempelimpression und senkrecht zur Knorpeloberfläche ausgerichtet (Abbildung 4). 22 Proben (10,5 %) wurden in einer Kontrollebene geschnitten. Diese verläuft senkrecht zur Hauptebene und damit parallel zu der Längsachse der Impression in selbiger, aber ebenfalls senkrecht zur Knorpeloberfläche. Mit diesen beiden zueinander und zur Knorpeloberfläche senkrechten Schnittebenen konnten wir später alle drei Hauptzellachsen, d.h. die Ausmaße einer Zelle in allen drei Dimensionen des Raumes erfassen. Die Schnittdicke betrug jeweils 7µm. Beim Schneiden in der Hauptschnittebene wurden die ersten 1500µm der angeschnittenen Impression verworfen. Aus dem zentralen Anteil der Impression wurden in drei Schnittblöcken, welche 500µm auseinander lagen, je drei konsekutive Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht (Abbildung 4). Beim Schneiden der Kontrollebene wurden die ersten 400µm verworfen. Dann wurden ebenfalls im zentralen Anteil der Impression in drei Schnittblöcken, welche 100 µm auseinander lagen, je drei konsekutive Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet und anschließend azangefärbt.

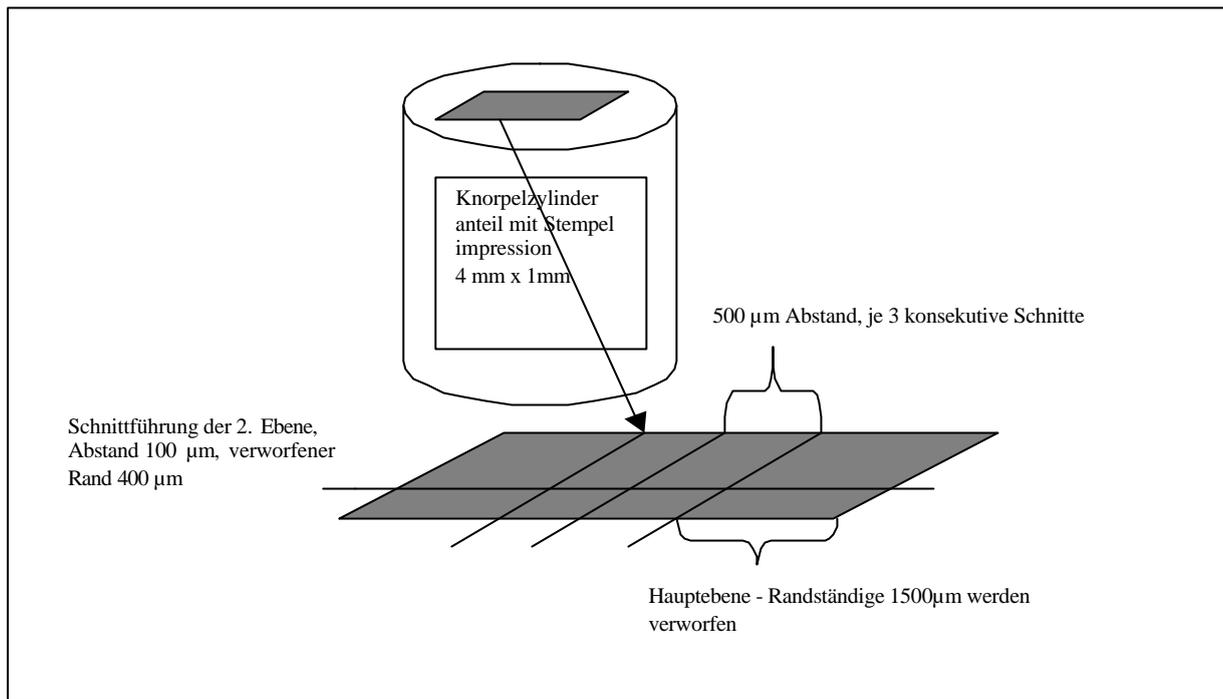


Abbildung 4: Schnittführung für die Histologie in der Hauptebene senkrecht zur Impressionslängsachse im sicher belasteten Bereich. Je 3 konsecutive Schnitte im Abstand von 500 µm. Daneben angedeutet die 2. Ebene.

4.2.2. Rasterelektronenmikroskopie

36 formalinfixierte Knorpel- Knochen- Zylinder wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (je 30 min in Alkohol 25, 50, 70, 85, 90, 95, 100, 100%, dann über Nacht in Alkohol 100%), im Anschluß daran Critical-Point getrocknet (CO₂, 10 Durchgänge, Baltec CPDO30) und sofort in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Proben wurden von der Knochenseite mit einem N₂- gekühlten Skalpell auf gekühlter Unterlage quer zur Impressionslängsachse gebrochen. Die Proben wurden sodann mit 300 Å Gold besputtert. Kurz vor der Betrachtung im Rasterelektronenmikroskop erfolgte eine erneute Besputterung mit 100 Å. Zur Auswertung wurden nur gebrochene, nicht geschnittene, Präparate mit klar erkennbarer Kollagenfaserstruktur ohne Verschmierungen herangezogen.

4.3. Auswertung

4.3.1 Histologie (Lichtmikroskopie, LM)

Im histologischen Präparat wurden innerhalb einer Präparatgruppe der unbelastete mit dem belasteten Bereich verglichen. Dann wurde zwischen den verschiedenen Laststufen und Oberflächeneigenschaften verglichen. Zum Vergleich herangezogen wurden die Gesamtknorpelhöhe und anhand der zonenspezifischen Zellanordnung (s.u.) die zonalen Höhen (Dicke der einzelnen Zone), zonale Zelldichte und zelluläre Abmessungen, d.h. Hauptachsen und Fläche der Zellen in den einzelnen Zonen (Abbildung 5). Pro Knorpel-Knochen-Zylinder wurden dazu je die ersten beiden Schnitte eines randständigen und des mittleren Schnittblockes (Abbildung 4) ausgewertet. Aus den Mittelwerten der 4 Schnitte wurden für den jeweiligen Zylinder repräsentative Mittelwerte gebildet.

Die histologische Auswertung erfolgte computergestützt mittels eines speziell für unsere Fragestellung selbst konfigurierten Algorithmus mit dem VIDAS-Bildanalyseprogramm Kontron 400 ®.

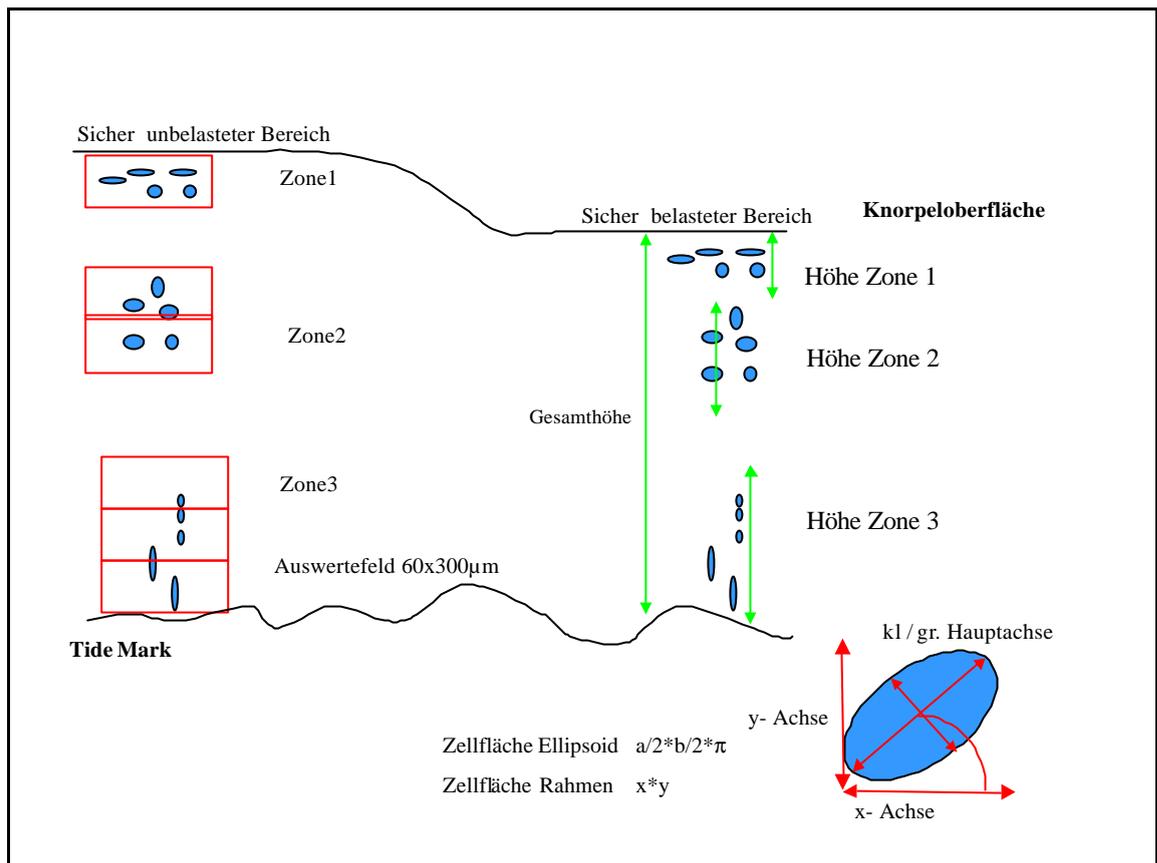


Abbildung 5: Auswertung in einem histologischen Schnitt im je sicher belasteten bzw. unbelasteten Bereich: Gebildet wurden anhand der zonentypischen Zellanordnung repräsentative Mittelwerte für Gesamthöhe, Zonale Höhe, Zelldichte und verschiedene Zellparameter. Vergrößerung 25- fach (Gesamthöhe), 50 -fach (zonale Höhe), 100- fach (Zellparameter/ Zelldichte).

4.3.1.1. Zellparameter: Zonale Zelldeformation

Ausgewertet wurden in unter 4.3.1.2. genauer beschriebenen Auswertefeldern bei 100- facher Vergrößerung je fünf repräsentative Zellen. Es wurde ein Rahmen um jede Zelle gezogen, dessen Oberkante parallel zur Knorpeloberfläche orientiert ist. Diese Oberkante wurde als x- Achse bezeichnet, die dazu senkrecht verlaufende Kante als y-Achse, wie in einem Koordinatensystem. Die Fläche des Rahmens als Produkt beider Achsen (yx-Fläche) wurde als Parameter für die Zellfläche in beiden Schnittebenen herangezogen. Dabei gehen wir bei Betrachtung der 2. Schnittebene von der Erfassung der z-Achse dieses Koordinatensystems aus, bei definitionsgemäß gleicher Orientierung der y- Achse. Somit ergibt sich eine dreidimensionale Betrachtung mit der Möglichkeit, auf das Zellvolumen abzielen. Durch

Vergleich der Achsen und der Fläche vor und nach Deformation sollte die zelluläre Deformation unter Belastung erfaßt werden.

Zellen könnten auch als Ellipsoid aufgefaßt werden. Ein Ellipsoid hat drei Hauptachsen. Pro Schnittebene könnten 2 Hauptachsen erfaßt werden, eine kleinere und eine größere. Rein deskriptiv haben wir als Nebenaspekt diese Achsen betrachtet.

Die Werte aller histomorphometrischen Parameter der Hauptschnittebene wurden mit der Kontrollebene verglichen.

4.3.1.2. Zelldichte

Als Korrelat für die zonale Zelldichte wurde die Zellzahl bei 100- facher Vergrößerung in einem Auswertefeld der Fläche $1800\mu\text{m}^2$, aus $60\mu\text{m}$ Höhe und $300\mu\text{m}$ Breite bestimmt. Bei einer Breite der zentralen Impression von etwa $800\mu\text{m}$ und einer von uns angenommenen Höhe der Tangentialzone von ca. $100\mu\text{m}$, paßte dieses Auswertefeld sicher in den uns interessierenden Bereich. Bei Annahme der Höhe der Tangentialzone stützen wir uns auf Literaturangaben (Hedlund et al. 1993, Mitrovic et al. 1989). Gezählt wurden alle komplett in unserem Auswertefeld liegenden Zellen mit deutlich angeschnittenem Zellkern. Damit wollten wir vermeiden, Artefakte zu erfassen. Für Zone 1 wurden zwei (in der Abbildung 5 ist aus Platzgründen je nur eines der Felder dargestellt) nebeneinander direkt unter der Oberfläche liegende Felder herangezogen. Für Zone 2 wurden insgesamt 4 Felder ausgewertet, davon zwei nebeneinander mit ihrer Obergrenze $120\mu\text{m}$ unter der Oberfläche liegende Felder ausgewertet und zwei direkt unter ihnen darunter liegende Felder. Für Zone 3 wurden 6 Felder betrachtet, in zwei direkt nebeneinander liegenden Blöcken von je drei Feldern, von denen das unterste direkt an der Tide Mark angrenzte. Für jede Zone wurde aus den ausgewerteten Feldern der repräsentative Wert für die Zellzahl pro Fläche berechnet und als Maß für die zonale Zelldichte verwendet (Abbildung 5).

4.3.1.3. Gesamthöhe des Knorpels

Bei 25-facher Vergrößerung wurde die Gesamthöhe von der Oberfläche zur Tide-Mark (TM) gemessen, sowohl im sicher belasteten zentralen Bereich der Impression als auch im sicher unbelasteten Bereich an drei verschiedenen Meßachsen. Der sicher belastete Bereich

zeichnete sich durch mittige Lage in der Impression und planparallele Oberfläche zur TM aus. Der sicher unbelastete Bereich lag mindestens 1500µm vom Rand des Präparates entfernt und wies ebenfalls eine horizontal zur TM liegende Oberfläche auf. Die drei Meßachsen lagen jeweils je 100 µm auseinander. Aus ihnen wurden repräsentative Werte für die Höhe des Gesamtknorpels des Schnittes gebildet (Abbildung 5).

4.3.1.4. Zonale Höhe

Bei 50-facher Vergrößerung wurde anhand der zonentypischen Zellanordnung die Höhe der einzelnen Zonen gemessen. Die Zonen wurden absteigend von der Oberfläche zur Tide- Mark nummeriert. Als Zone 1 wurde diejenige Zone des Knorpels bezeichnet, in der die Längsachse der flachen diskoiden bis rundlichen kleinen Zellen parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist. Die Zellen lagen einzeln oder als übereinander stehende Paare. Die nach unten anschließende Zone 2 wurde definiert als Zone uneinheitlich orientierter, runder, einzeln oder paarig liegender größerer Zellen. Die anschließende unterste Zone 3 schließlich wurde durch in Säulen liegende Chondrozyten mit senkrechtem Verlauf zur Oberfläche charakterisiert. Die Zellen hier wiesen runde bis gestreckte Formen auf.

Gemessen wurde pro Schnitt wiederum an je drei Meßachsen in 100µm Abstand im sicher belasteten und unbelasteten Bereich. Dabei wurden nur sicher zonentypische Bereiche gemessen. Aus den drei Meßorten wurden repräsentative Werte für die zonalen Höhen des Schnittes gebildet (Abbildung 5).

Anschließend betrachteten wir neben den absoluten Zonenhöhen in µm den prozentualen Anteil einer Zone an der Höhe des Gesamtknorpels. Dabei wurde nur der eindeutig einer Zone zuteilbare Knorpelanteil berücksichtigt, so daß die Summe aller Anteile nicht 100% entspricht. Zur genaueren Vergleichbarkeit wurde zusätzlich die Veränderung der zonalen Höhe durch die Belastung als Zu- oder Abnahme in % durch die Funktion $f = (\text{belastete Zonenhöhe} - \text{unbelastete Zonenhöhe}) / \text{unbelastete Zonenhöhe}$ beschrieben.

4.3.1.5. Strukturelle Veränderungen: Zell- Bulging

Als „Bulging“ wird das seitliche Ausweichen der Kollagenfasern weg vom Zentrum der Belastung verstanden (Broom and Poole 1982, Glaser Dissertation 2000). Analog zum

Bulging der Kollagenfasern bei Belastung im REM gibt es auch ein Zellbulging. Entsprechend dem Bulging im Verlauf der Kollagenfasern im REM handelt es sich dabei um einen ausweichenden Verlauf der Zellanordnung um die Impression herum, in einer von der Oberfläche zur Tide Mark senkrecht verlaufenden sich seitlich um die Impression herum ausbeulenden Linie. Dieses Bulging wurde bei 25- facher Vergrößerung in Stärke und Ausprägung untersucht.

4.3.1.6. Zerstörung des Knorpels

Bei 25-facher Vergrößerung wurden die Präparate auf Zerstörung und Schrumpfung durchmustert. Als zerstört wurde ein Präparat angesehen, wenn die Oberfläche abgehoben, stark zerfasert oder nicht mehr anfärbbar war. Schrumpfung des Präparates zeigte sich an seiner seitlichen Abrundung im unbelasteten Rand. Diese Präparate wurden ausgesondert.

4.3.2 Auswertung Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Im gefriergebrochenen Präparat wurden Gesamtknorpelhöhe und anhand der zonentypischen Kollagenfaserarchitektur (s.u.) die Höhe der einzelnen Zonen betrachtet (Abbildung 6).

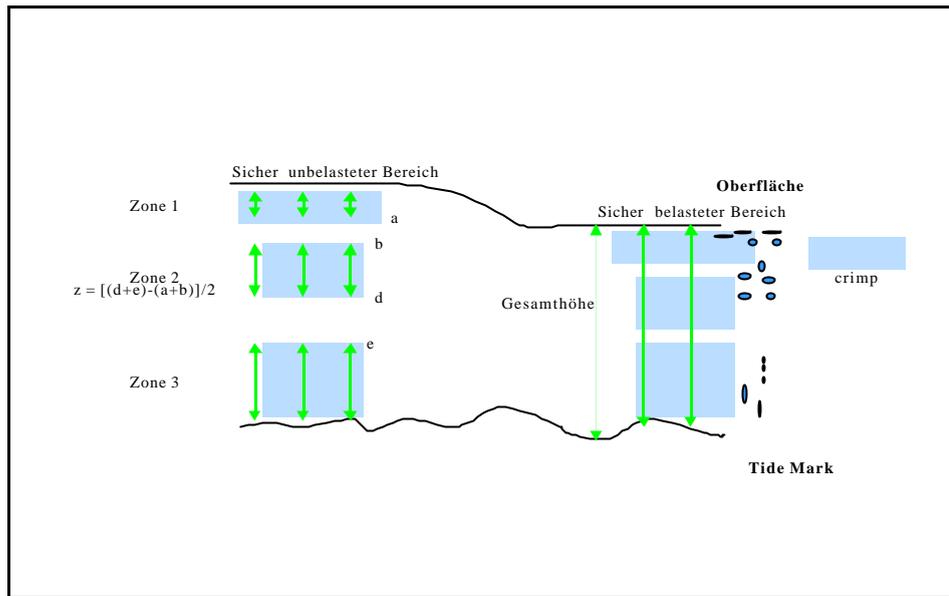


Abbildung 6: Auswertung in einem rasterelektronenmikroskopischen Gefrierbruch im je sicher belasteten bzw. unbelasteten Bereich: Gebildet wurden anhand der Kollegenfaserarchitektur repräsentative Mittelwerte für Gesamthöhe und Zonale Höhe dazu Betrachtung von „Crimp“ und „Bulging“.

Die Übereinstimmung von Kollagenfaserarchitektur und Zellanordnung in den jeweiligen Zonen wurde deskriptiv überprüft. Die Auswertung erfolgte manuell bei Betrachtung im REM (Jeol 35CF).

4.3.2.1. Gesamthöhe des Knorpels

Bei 60-facher Vergrößerung wird die Gesamthöhe von der Oberfläche bis zur Tide Mark gemessen. Dies geschieht im sicher belasteten zentralen Bereich der Impression und im sicher unbelasteten Bereich. Man mißt an je drei unabhängigen Orten im Abstand von 100 µm. Aus den einzelnen Meßwerten wird der Mittelwert gebildet.

4.3.2.2. Zonale Höhe

Bei 6000-facher Vergrößerung wurde anhand der zonentypischen Kollagenfaserarchitektur die Höhe der einzelnen Zonen festgelegt. Hierbei charakterisieren vorwiegend parallel zur

Oberfläche verlaufende Kollagenfasern die Tangentialzone, zufällig ungeordnet verlaufende Kollagenfasern ohne Vorzugsrichtung die Transitionalzone und bevorzugt radiär angeordnete Kollagenfasern die Radiärzone. Gemessen wird wiederum an je drei Stellen im sicher belasteten und unbelasteten Bereich. Dabei wurden nur sicher der jeweiligen Zone zugeordnete Strecken berücksichtigt. Die wahre Zonenhöhe z wird mit der Formel $z = [(d+e)-(a+b)]/2$ errechnet, wobei b = Obergrenze der gemessenen Zone, a = gemessene Untergrenze der nächst höheren Zone, d = Untergrenze der gemessenen Zone, e = gemessene Obergrenze der nächst tieferen Zone. Für die Tangentialzone ist $b=0$ (entspricht der Oberfläche), für die Radiärzone ist $e=0$ (entspricht der TM). Es wurden aus den je drei erhaltenen Werten pro Zone die Mittelwerte gebildet (Abbildung 6).

4.3.2.3. Übereinstimmung von Kollagenfaserarchitektur und Zellanordnung

Bei 2000- bis 4800-facher Vergrößerung wurde intraindividuell die Übereinstimmung von Kollagenfaserarchitektur und Zellanordnung in den jeweiligen Zonen überprüft und beispielhaft dokumentiert.

4.3.2.4. Strukturelle Veränderungen: Bulging und Crimp

Im Übersichtspräparat (60x) erfolgte die Prüfung auf Ausprägung von Bulging der Kollagenfasern. Als Bulging wurde das seitliche Ausbeulen der von der TM radiär aufsteigenden Kollagenfasern lastabhängig um die Impression mit konvergierendem Verlauf zur Oberfläche hin bezeichnet. Bei 6000- bis 10000-facher Vergrößerung wurde der Knorpel nach Crimp der Kollagenfasern durchmustert. Crimp bezeichnet dabei senkrecht zur Oberfläche „aufgekräuselte“, wellenartig angeordnet scheinende Kollagenfasern (Broom et al. 1986, Broom and Poole 1982).

4.3.2.5. Zerstörung des Knorpels

Im Übersichtspräparat (60x) erfolgte das Durchmustern auf Zerstörung des Knorpels. Zerstörung manifestierte sich im völligen Abscheren des Knorpels vom Knochen bzw. Spaltbildung unter der Impressionsfläche. Diese Proben wurden ausgesondert.

4.3.3. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse wurde das allgemeine lineare Modell (generell linear model, GLM) der 3- Faktoriellen Varianzanalyse herangezogen. Dieses überprüft zunächst in allgemeiner Form, ob die gewählten Einflußfaktoren die gefundenen Ergebnisse (outcome) beeinflussen und differenziert daraufhin die Faktoren in ihrer Bedeutung (Deuffner, Jensen, Schuhmacher et al. 1992). Als Software benutzten wir SAS for Windows 8.1. Cary NC. Statistisch als signifikant wurden Ergebnisse angesehen deren $p < 0,05$ lag. Zur statistischen Auswertung wurden sowohl die absoluten Endwerte herangezogen als auch die Veränderung Δ , die durch die Belastung erzeugt wurde. Dazu wurde die Funktion Δ des jeweiligen histomorphometrischen Parameters P $\Delta(P) = (P_{\text{unbelastet}} - P_{\text{belastet}}) / P_{\text{unbelastet}}$ herangezogen. Damit konnte egalisiert werden, daß bei oberflächenbedingt unterschiedlichen absoluten Ausgangswerten die absoluten betrachteten Endwerte nicht vergleichbar gewesen wären. Dies betraf vor allem die Auswertung der Zelldichte und der Zellparameter, da bei der Auswertung der zonalen Höhe die o.g. Funktion schon von vornherein beachtet wurde.

Die rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse wurden rein deskriptiv dargelegt.

5 Ergebnisse

5.1. Histologie

5.1.1 Zellparameter

5.1.1.1. Zellachsen: Achsen des Zellrahmens: x- Achse (oberflächenparallel)
und y-Achse (senkrecht zur Oberfläche)

Die gemittelten absoluten Ausgangswerte in μm für die oberflächenparallele x-Achse und die dazu senkrecht stehende y-Achse sind bei Betrachtung der einzelnen Zonen innerhalb der Oberflächengruppen vergleichbar (Tabellen 1, 2 und 3). Zur besseren Übersichtlichkeit werden im folgenden die Werte aller Proben einer Oberflächenbeschaffenheit ohne Beachtung der späteren Belastungsdauer und –größe gemeinsam betrachtet.

Bei den Ausgangswerten der x-Achse in Zone 1 zeigen sich die Werte intakt (13,98 bis 14,16 μm) minimal größer als in Zone 1 arthrotisch (11,85 bis 13,12 μm). Die gemittelten Werte der Zone 1 der defekten Proben liegen bei 11,47 bis 13,18 μm . In diesem Bereich, zwischen 12,82 und 13,14 μm , liegen auch die gemittelten Werte für die x-Achse der intakten Proben in Zone 2. Da die Zellen in Zone 1 der defekten Proben per definitionem in ihrem Ursprung den Zellen der Zone 2 der intakten Proben entsprechen, ist dies erwartungsgemäß. In Zone 2 und 3 sind die x-Achsenausgangswerte sowohl innerhalb der Oberflächengruppen, als auch unter ihnen vergleichbar (Zone 2 defekt 11,47 bis 12,20 μm , arthrotisch 11,43 bis 12,45 μm ; Zone 3 intakt 11,40 bis 12,60 μm , defekt 11,32 bis 11,52 μm , arthrotisch 11,48 bis 13,35 μm) (Tabelle 1,2,3).

Die gemittelten y-Achsenausgangswerte sind in der Zone 1 der intakten Proben mit 8,88 bis 16,45 μm kleiner als für arthrotische Proben (13,83 bis 18,04 μm). Die Werte der Zone 1 defekt entsprechen mit 15,42 bis 17,93 μm bei insgesamt großer Standardabweichung (bis 4,42 für Zone 1 defekt) den Werten in Zone 2 intakt (13,09 bis 16,18 μm). Dabei sind die Werte für die Zone 2 bei den Proben aller Oberflächen vergleichbar (defekt 14,75 bis 16,18 μm , arthrotisch 14,10 bis 16,13 μm).

In Zone 3 liegen die gemittelten Ausgangswerte für die y-Achse bei allen Oberflächen mit 18,00 bis 21,27 μm intakt, 16,06 bis 19,36 defekt und 17,88 bis 22,77 μm bei den arthrotischen Proben im gleichen Rahmen (Tabelle 1,2,3).

Nach Belastung finden wir für die Mittelwerte der x-Achse in allen Zonen und bei allen Oberflächen keine signifikanten Veränderungen. In Zone 1 liegen die gemittelten Werte nach Belastung für alle belasteten intakten Proben zwischen 12,52 und 13,68 μm , für die defekten zwischen 10,92 und 12,30 μm und für die arthrotischen zwischen 11,50 und 12,45 μm . Da sich zwischen den einzelnen Laststufen primär kein unterschiedliches Verhalten abzeichnet, werden auch hier die belasteten Werte einer Oberflächengruppe ohne Beachtung von Lastgröße und -dauer gemeinsam betrachtet. Die Werte bei den intakten Proben sind wie bei den Ausgangswerten minimal größer als bei den arthrotischen. Die Mittelwerte bei den defekten Proben sind wiederum etwas kleiner und entsprechen weiterhin den x-Achsenwerten der Zellen der Zone 2 der intakten Proben mit 10,53 bis 11,78 μm . Auch hier gilt wie im unbelasteten Zustand, daß in Zone 2 und 3 die x-Achsenwerte sowohl innerhalb der Oberflächengruppen, als auch zwischen ihnen vergleichbar sind (Zone 2 defekt 11,95 bis 13,42 μm , arthrotisch 11,81 bis 12,09 μm ; Zone 3 intakt 11,47 bis 12,16 μm , defekt 11,06 bis 12,17 μm , arthrotisch 11,95 bis 12,61 μm) (Tabelle 1,2,3).

Nach Belastung finden wir bei Betrachtung der y- Achse deutliche Veränderungen. In Zone 1 liegen die gemittelten Werte nach Belastung für die intakten Proben nun fast um die Hälfte niedriger zwischen 6,44 und 7,38 μm , für die defekten zwischen 7,28 und 9,09 μm und für die arthrotischen zwischen 6,41 und 7,43 μm . Die Mittelwerte für die intakten Proben und die arthrotischen unterschieden sich nicht wesentlich. Die Werte der Zone 1 defekt sind nun kleiner als die Werte der ihnen in ihrer Höhenlokalisierung ursprünglich entsprechenden Zellen in Zone 2 intakt (10,53 bis 11,78 μm).

Auch in Zone 2 finden sich bei allen Oberflächen nun kleinere Mittelwerte für die y- Achse. Bei den defekten Proben liegen sie zwischen 11,37 und 12,54 μm , bei den arthrotischen zwischen 10,31 und 12,99 μm . Die Veränderungen sind bei allen Oberflächen in Zone 2 weniger stark ausgeprägt als in Zone 1. In Zone 3 liegen die belasteten Mittelwerte für die intakten Proben zwischen 17,99 und 20,10 μm , für die defekten zwischen 17,55 und 20,80 μm und für die arthrotischen mit 21,78 und 24,06. Sie liegen damit in einem vergleichbaren Rahmen und sind mit den Ausgangswerten vergleichbar. Es zeigten sich keine Veränderungen nach Belastung (Tabelle 1,2,3).

Lichtmikroskopie: Zellparameter Zone 1: x-Achse,y-Achse, xy-Fläche, Zellfläche									
		unbelastet				belastet			
		Zone 1				Zone 1			
Laststufe		x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche	x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche
i 20 280	m	14,16	8,88	126,87	91,62	12,83	6,44	84,56	67,10
	s	2,04	2,74	44,47	22,10	2,33	1,18	30,78	23,72
d 20 280	m	12,22	16,43	197,73	155,10	12,30	8,49	104,63	84,25
	s	1,96	3,74	42,28	32,43	1,70	2,53	33,53	27,13
a 20 280	m	11,85	18,04	213,30	159,69	12,10	6,61	80,99	63,42
	s	1,08	2,13	27,37	19,52	2,93	1,04	26,44	19,76
i 20 160	m	13,00	9,32	121,54	96,74	12,52	6,75	85,27	67,97
	s	1,23	1,85	27,83	17,94	1,72	1,01	20,01	15,84
d 20 160	m	12,35	17,93	223,97	169,91	11,86	9,09	113,73	91,71
	s	1,66	3,39	61,50	45,16	2,52	3,33	59,13	48,12
a 20 160	m	11,91	13,83	171,42	133,21	11,60	6,41	75,33	59,01
	s	2,04	5,57	85,50	62,45	2,04	0,76	21,53	15,30
i 1 280	m	14,15	16,45	232,81	177,66	12,94	7,38	97,13	77,93
	s	0,90	4,15	60,30	44,69	2,38	1,34	30,41	23,93
d 1 280	m	11,47	15,28	180,30	138,41	12,15	8,30	103,98	84,87
	s	2,80	3,88	72,57	54,99	1,50	3,18	51,05	41,54
a 1 280	m	13,12	15,73	207,46	151,29	12,45	7,43	92,40	74,24
	s	0,58	4,57	66,87	44,31	0,41	1,15	13,91	11,81
i 1 160	m	13,98	15,70	224,90	167,93	13,68	7,33	101,04	81,07
	s	1,83	3,80	71,96	51,59	2,21	1,27	26,04	20,98
d 1 160	m	13,18	15,42	204,39	155,76	10,92	7,28	82,21	64,93
	s	1,88	4,42	69,42	45,13	2,04	2,66	42,80	30,94
a 1 160	m	12,84	18,51	237,60	179,31	11,50	6,80	79,47	61,23
	s	0,93	0,89	20,95	18,84	1,66	1,15	25,48	15,85

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g; m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 1: Zellparameter Zone 1 im Vergleich unbelastet und belastet. Die y- Achse wird oberflächenabhängig und lastabhängig gestaucht, die x- Achse zeigt keine signifikanten Veränderungen.

Lichtmikroskopie: Zellparameter Zone 2: x-Achse,y-Achse, xy-Fläche, Zellfläche									
		unbelastet				belastet			
		Zone2				Zone2			
Präparat	Last	x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche	x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche
i 20 280	m	13,14	13,09	173,93	142,59	12,65	10,80	139,21	112,60
	s	2,03	2,02	43,77	34,21	2,62	2,10	48,40	41,99
d 20 280	m	11,47	15,50	177,47	139,56	11,95	11,52	136,26	110,56
	s	1,21	2,48	31,69	26,15	1,64	2,19	25,98	20,31
a 20 280	m	11,43	14,44	164,43	127,45	11,82	10,31	122,48	99,66
	s	1,10	1,50	17,38	13,04	0,76	2,18	31,05	25,81
i 20 160	m	12,82	13,36	170,17	136,45	12,52	10,53	133,07	108,44
	s	1,54	1,52	20,87	16,91	1,60	2,42	35,91	30,29
d 20 160	m	11,55	15,12	174,73	138,49	12,25	12,54	158,13	129,33
	s	1,48	2,58	35,96	30,06	2,15	3,27	59,81	48,26
a 20 160	m	12,45	14,10	175,58	141,67	12,09	10,97	132,71	108,09
	s	1,38	1,41	26,62	22,70	0,97	1,38	21,33	17,82
i 1 280	m	12,65	14,60	184,46	144,97	12,89	11,70	151,44	124,22
	s	0,97	2,09	27,01	21,74	2,02	1,78	34,59	26,84
d 1 280	m	12,20	14,75	176,96	140,77	13,42	11,37	154,25	123,91
	s	2,07	2,34	24,01	18,27	1,67	2,30	46,18	36,98
a 1 280	m	13,03	16,13	210,40	162,01	11,81	12,35	147,04	117,49
	s	0,92	1,20	23,83	16,99	0,76	2,38	36,93	32,99
i 1 160	m	13,02	13,65	181,60	141,62	12,85	11,78	152,38	126,02
	s	2,14	2,42	54,37	42,00	1,54	1,73	32,81	26,16
d 1 160	m	11,57	16,18	186,65	145,64	12,06	11,50	138,70	113,23
	s	0,61	1,81	15,81	12,75	1,79	2,02	30,87	22,41
a 1 160	m	12,10	15,83	191,77	148,85	11,92	12,99	156,42	126,81
	s	1,39	0,29	25,44	23,62	1,95	1,81	42,79	37,90

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g; m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 2: Zellparameter Zone 2 im Vergleich unbelastet und belastet. Die Veränderungen bei der y-Achse sind weniger deutlich ausgeprägt als in Zone 1. Die x- Achse erfährt bei keiner Oberflächenbeschaffenheit eine Deformation.

Lichtmikroskopie: Zellparameter Zone 3: x-Achse,y-Achse, xy-Fläche, Zellfläche									
		unbelastet				belastet			
		Zone 3				Zone 3			
Laststufe		x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche	x-Achse	y-Achse	yx-Fläche	Zellfläche
i 20 280	m	11,81	21,27	134,77	203,07	12,16	18,71	227,38	174,99
	s	1,83	2,47	22,07	49,37	1,48	3,60	52,23	45,09
d 20 280	m	11,32	19,36	220,84	173,99	12,05	17,79	216,89	171,17
	s	1,25	3,65	55,92	44,11	1,97	4,56	74,67	57,09
a 20 280	m	11,49	17,88	206,35	164,23	12,61	22,80	287,90	223,45
	s	0,73	1,67	30,07	23,59	0,73	3,60	51,49	40,54
i 20 160	m	11,40	19,94	227,79	180,32	11,47	17,99	206,30	164,02
	s	0,86	2,58	39,18	31,80	1,37	4,12	54,21	42,47
d 20 160	m	11,42	18,13	208,00	164,27	11,06	18,72	212,46	168,54
	s	1,29	2,14	38,91	31,52	2,08	4,69	67,67	53,07
a 20 160	m	12,14	22,26	271,33	212,72	12,09	21,78	263,15	203,20
	s	0,99	3,13	51,47	39,34	0,83	1,47	24,36	18,64
i 1 280	m	12,18	18,32	222,49	178,09	11,96	19,75	236,66	189,14
	s	1,80	2,09	35,81	27,55	2,06	2,68	51,64	42,87
d 1 280	m	11,49	16,08	182,74	144,98	11,22	17,55	196,31	158,08
	s	1,53	2,02	15,26	8,83	1,64	1,52	28,75	23,73
a 1 280	m	13,35	22,77	305,11	239,57	12,45	22,78	286,45	224,60
	s	1,18	4,73	77,96	60,24	1,35	4,50	76,78	56,64
i 1 160	m	12,60	18,00	228,01	177,90	11,64	20,10	236,33	186,09
	s	2,07	1,91	51,59	37,97	1,54	3,27	59,73	47,81
d 1 160	m	11,52	18,93	218,22	172,08	12,17	20,80	253,44	200,17
	s	1,11	2,62	37,59	28,25	0,75	3,91	53,20	42,46
a 1 160	m	11,48	20,50	238,69	189,73	11,95	24,06	289,63	227,49
	s	2,09	2,38	68,56	56,21	1,23	3,08	61,66	46,36

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g; m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 3: Zellparameter Zone 3 im Vergleich unbelastet und belastet. Bei allen Oberflächen zeigen weder y- noch x- Achse signifikante Veränderungen unter Belastung.

In unserer Hauptschnittebene ist lediglich eine zweidimensionale Betrachtung der Veränderungen unter Belastung möglich. Interessant ist die dreidimensionale Betrachtung einer Knorpelzelle unter Belastung im Raum. Daher wurde eine Kontrollebene senkrecht zur Hauptebene unter den gleichen Aspekten der Zellparameter betrachtet. Ihre unbelasteten mittleren Ausgangswerte stimmen sowohl für die y-Achse als auch die x- Achse mit denen der Hauptschnittebene überein. Nach Belastung finden wir wiederum kleinere mittlere Werte der y- Achse. Auch hier ist die Abnahme der Größe der y-Achse in Zone 1 stärker ausgeprägt als in Zone 2. In Zone 3 finden sich für die y- Achse keine Veränderungen durch die Belastung. Die x- Achse zeigt in der Kontrollebene wie in der Hauptebene keine Veränderungen unter Belastung für keine Zone.

Unter Belastung zeigt sich in Hauptschnittebene und Kontrollebene, daß die mittleren Werte der x-Achsen bei allen Proben unabhängig von Oberfläche oder Größe und Dauer der Belastung in allen Zonen unverändert bleiben.

Die y-Achse zeigt in beiden Ebenen Veränderungen im Sinne einer Stauchung. Diese Stauchung ist in der Zone 1 stärker ausgeprägt als in Zone 2. Sie ist oberflächenabhängig und lastabhängig für die Zone 1. Sie ist für die Zone 2 oberflächenabhängig verschieden stark ausgeprägt. In der Zone 3 kommt es nicht zu Veränderungen der y-Achse (Abbildung 7a,7b,8).

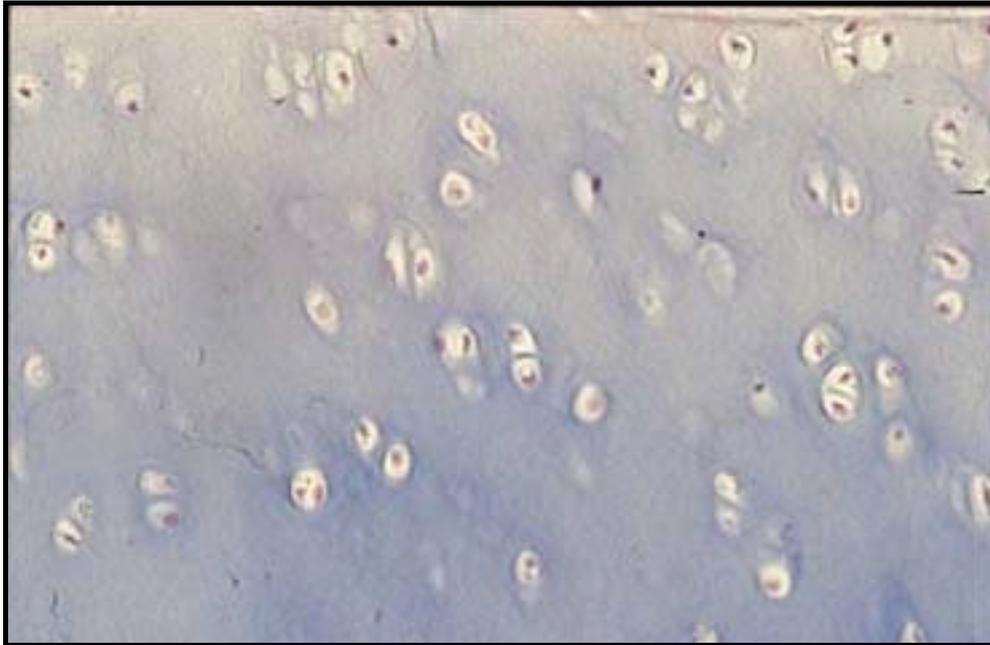


Abbildung 7a: defekte Oberfläche, unbelastet: Die Zellen direkt unter der Oberfläche (Zone 1) besitzen im Mittel eine y-Achse (Höhe eines die Zelle umgebenden Rahmens) von 15,42 bis 17,93 μm . 100-fache Vergrößerung.

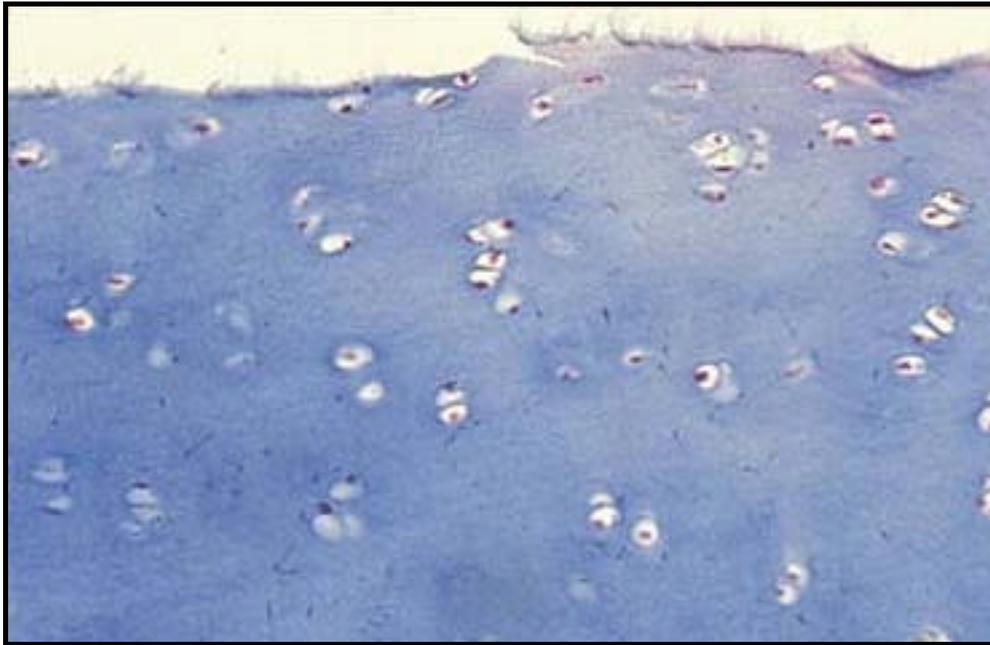


Abbildung 7 b: defekte Oberfläche, belastet mit 280g / 20 min. Zu erkennen ist eine Kompression der Zellen unter der Oberfläche im Sinne einer Stauchung in Richtung der y-Achse. Die Stauchung zeigt eine vermehrte Ausprägung bei defekter Oberfläche und höherer Last. Die Mittelwerte für die y- Achse schwanken nun zwischen 7,28 und 9,09 μ m. Es kommt zu keinen Veränderungen in x- Richtung. 100-fache Vergrößerung.

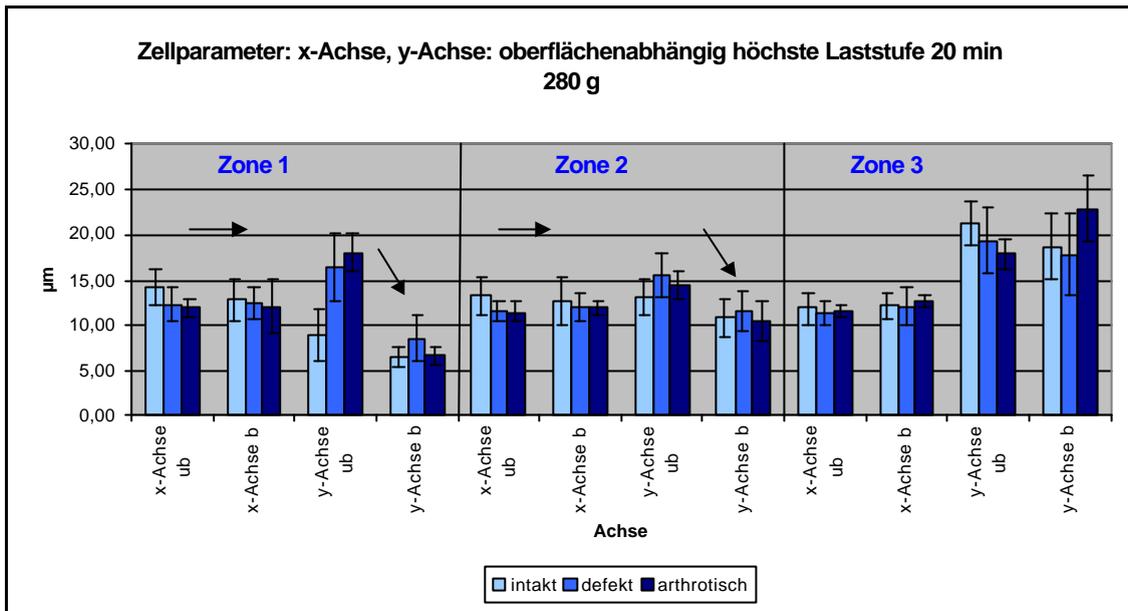


Abbildung 8: Bei Belastung ergibt sich eine signifikante Abnahme (Stauchung) der y-Achse, vor allem direkt unter der Knorpeloberfläche (Zone 1 mit $p < 0,0001$ und Zone 2 mit $p = 0,0315$). Die Stauchung ist in ihrer Ausprägung abhängig von einer intakten Oberfläche. In allen Zonen, bei allen Oberflächen und bei allen Laststufen wird die x-Achse nicht signifikant verändert. b = belastet, ub = unbelastet.

Bei der statistischen Betrachtung der absoluten gemittelten Endwerte findet sich für die x-Achse weder in Zone 1 ($p = 0,0264$), noch in Zone 2 ($p = 0,1014$), noch in Zone 3 ($p = 0,0275$) signifikante Unterschiede in der Achsenlänge. Bei der statistischen Betrachtung der (von etwaigen oberflächenbedingten unterschiedlichen Ausgangswerten unabhängigen) Veränderung durch die Belastung finden sich p-Werte von $p = 0,7151$ für die Zone 1, von $p = 0,2823$ für die Zone 2 und von $p = 0,3006$ für Zone 3. Damit finden bezüglich der x-Achse bei keiner Oberfläche und keiner Laststufe in keiner Zone Veränderungen durch die Belastung statt.

Bei gleichem Vorgehen bezüglich der y-Achse unter Betrachtung der absoluten gemittelten Endwerte finden sich für die y-Achse nach Belastung in Zone 1 ($p < 0,0001$) signifikant unterschiedliche Werte. Bei der genaueren Differenzierung sind diese Unterschiede mit $p < 0,0001$ oberflächenabhängig. Dies wird nicht durch die unterschiedlichen Ausgangswerte bedingt. Denn bei der statistischen Überprüfung, ob durch die unterschiedliche Belastung unterschiedliche Veränderungen erzielt wurden (von etwaigen oberflächenbedingten unterschiedlichen Ausgangswerten unabhängig durch Bildung der Differenzen vor / nach

Belastung [Parameter (unbelastet –belastet) /unbelastet]) finden sich signifikante p-Werte. Die Ausprägung der erzielten Veränderungen der y-Achse in Zone 1 ist mit einem $p < 0,0001$ signifikant unterschiedlich. Signifikant bedeutsam ist dabei mit einem $p < 0,0001$ die Belastungsdauer und mit einem $p = 0,0003$ die Oberflächenbeschaffenheit. Die intakten Proben zeigen signifikant geringere Veränderungen der y-Achse in Zone 1 durch die Belastung als die defekten Proben mit einem $p = 0,0446$. Sie zeigen auch geringere Veränderungen der y-Achse durch die Belastung in Zone 1 als die arthrotischen Proben mit einem $p = 0,0446$.

Die Ausprägung der erzielten Veränderungen der y-Achse in Zone 2 ist mit einem $p = 0,0315$ ebenfalls signifikant. Signifikant bedeutsam ist dabei mit einem $p = 0,0172$ nur die Oberflächenbeschaffenheit. Die intakten Proben zeigen dabei signifikant geringere Veränderungen der y-Achse durch die Belastung in Zone 2 als die arthrotischen Proben mit einem $p = 0,0504$.

Bei der zusätzlichen rein deskriptiven Betrachtung des Verhältnisses von y-Achse zur x-Achse in den einzelnen Zonen vor und nach Belastung finden wir folgende Anhaltswerte.

xy-Achsenverhältnis x zu y , x:y

	unbelastet			belastet		
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 1	Zone 2	Zone 3
intakt	3:2	1:1	2:3	2:1	1:1	2:3
defekt	3:4	3:4	2:3	4:3	1:1	2:3
arthrotisch	4:5	3:4	2:3	2:1	1:1	2:3

Das Achsenverhältnis x:y in Zone 3 liegt stets bei 2:3 und wird in unserer Arbeit durch Oberflächenbeschaffenheit und Belastung nicht beeinflusst. In Zone 2 ist vor Belastung das Verhältnis der x- Achse zur y- Achse bei den defekten und arthrotischen Proben mit 3:4 zugunsten der y- Achse leicht betont. Nach Belastung gleicht es sich dem Achsenverhältnis der Zone 2 der intakten Proben mit 1:1 an und ist nun oberflächenunabhängig. In Zone 1 ist ein ähnliches Verhalten angedeutet. Ob hier ein Grenzwert für die Zellproportion besteht (2:3 für Zone 3, 1:1 für Zone 2, 2:1 für Zone 1) könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.1.1.2. Zellfläche aus yx-Achsen

Die angenäherte „Zellfläche“ wird als Zellrahmen aus den Rahmenachsen x und y betrachtet. Bei der Untersuchung der gemittelten absoluten Zellfläche vor Belastung nimmt die Zellfläche von der Oberfläche abwärts zu. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Werte aller Proben einer Oberflächenbeschaffenheit ohne Beachtung der späteren Belastungsdauer und –größe gemeinsam betrachtet. In Zone 1 der intakten Proben finden sich gemittelte Ausgangswerte von 121,54 bis 232,81 μm^2 , in Zone 1 der defekten Proben von 180,30 bis 223,97 μm^2 und in Zone 1 der arthrotischen Proben von 171,42 bis 237,60 μm^2 . Für die Zone 2 finden sich intakt Ausgangswerte von 170,17 bis 184,46 μm^2 , defekt von 174,73 bis 186,65 μm^2 und arthrotisch von 164,43 bis 210,40 μm^2 . Die Zellflächen liegen in einem vergleichbaren Bereich. In Zone 3 liegen die Ausgangswerte für die intakten Proben zwischen 134,77 und 228,02 μm^2 , für die defekten Proben zwischen 182,74 und 220,84 μm^2 und für die arthrotischen zwischen 206,35 und 305,11 μm^2 . Die arthrotischen Proben zeigen hier eine etwas größere Zellfläche (Tabelle 1,2,3).

Nach Belastung sind die gemittelten Werte (wiederum wurden die einzelnen Laststufen zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefaßt betrachtet) der jeweiligen Oberflächengruppen in Zone 1 und 2 kleiner, in Zone 3 unverändert. Das entspricht dem Verhalten der x- und y-Achse. In Zone 1 der intakten Proben finden sich deutlich kleinere Mittelwerte von 84,56 bis 101,04 μm^2 , genauso in Zone 1 der defekten Proben von 82,21 bis 113,73 μm^2 und entsprechend in Zone 1 der arthrotischen Proben von 75,33 bis 92,40 μm^2 . Für die Zone 2 finden sich intakt belastete Mittelwerte von 133,07 bis 151,44 μm^2 , defekt von 136,26 bis 158,13 μm^2 und arthrotisch von 122,48 bis 156,42 μm^2 . Die Zellflächen liegen auch hier in einem vergleichbaren Bereich. In Zone 3 liegen die Werte nach Belastung für die intakten Proben zwischen 206,30 und 236,66 μm^2 , für die defekten Proben zwischen 196,31 und 253,44 μm^2 und für die arthrotischen zwischen 263,15 und 289,63 μm^2 . Diese Werte sind im Vergleich mit den Ausgangswerten nicht verändert (Tabelle 1,2,3).

Unter Belastung wird die „Zellfläche“ in Zone 1 signifikant kleiner. Deskriptiv trifft dies auch noch für Zone 2 zu. Die Abnahme der Zellfläche in Zone 1 ist bei intakten Proben und bei kurzer Last signifikant geringer ausgeprägt. In Zone 3 bleibt die Rahmenfläche stets unverändert, dabei besitzen sowohl die unbelasteten als auch die belasteten Zellen der arthrotischen Proben eine signifikant höhere Zellfläche als die der beiden anderen Oberflächen. Die Kontrollebene bestätigt dies. Da bei Flächenabnahme in 2 Ebenen eine

Volumenabnahme angenommen werden darf, kann für die Zellvolumina auf ein gleichartiges Verhalten geschlossen werden (Tabelle 1,2,3; Abbildung 7a,b).

Die statistische Auswertung zeigt bei der Betrachtung der absoluten belasteten Mittelwerte für die Zone 3 eine signifikant global unterschiedliche Zellfläche ($p < 0,0001$). Die belastete Zellfläche der arthrotischen Proben ist oberflächenabhängig signifikant größer ($< 0,0001$). Es findet sich jedoch keine signifikante Veränderung der Zellfläche durch die Lastgröße / Lastdauer.

Die Zellfläche aus der y- und x- Rahmenachse verändert sich unter Belastung [Parameter (unbelastet-belastet)/unbelastet] unterschiedlich groß in Zone 1 ($p < 0,0001$). Diese Unterschiede sind bedingt durch die Lastdauer ($p = 0,0014$) und die Oberfläche ($p = 0,05$). In Zone 2 haben Oberfläche, Lastgröße und Lastdauer keinen signifikanten Einfluß auf die Größe der Veränderung der Zellfläche ($p = 0,2134$).

5.1.1.3. Zellachsen: Kleine und große Zellhauptachse (kleinster und größter Zelldurchmesser)

Die Veränderungen dieser zusätzlich rein deskriptiv betrachteten Achsen unter Belastung entsprechen im wesentlichen den Veränderungen der y- Achse und x- Achse. Anhand der unsicheren Definition der Lage dieser Achsen zur Lastwirkrichtung ist die Schwankungsbreite der gefundenen Werte sehr groß und keine statistisch sicheren Aussagen zu treffen (siehe Diskussion Material und Methoden). Deskriptiv kommt es in Zone 1 und 2 zu Längeneinbußen beider Achsen. Diese Einbußen scheinen bei intakter Oberfläche am geringsten zu sein. In Zone 3 verändern sich sowohl kleine und große Zellhauptachse nie.

5.1.1.4. Zellfläche aus kleiner und großer Hauptachse der Zelle unter der Annahme eines Ellipsoides

Die ellipsoide Zellfläche wird aus der kleinen und großen Hauptachse errechnet. Auch hier können daher nur rein deskriptive Ergebnisse dargelegt werden. Unter Belastung ergibt sich eine Abnahme der als Ellipsoid berechneten Zellfläche in Zone 1. Die unbelastete Zellfläche in Zone 1 bei intakten Proben liegt zwischen $91,62$ und $177,66 \mu\text{m}^2$, nach Belastung liegt sie bei $67,10$ bis $81,07 \mu\text{m}^2$. Für die defekten Proben findet sich eine Reduktion in Zone 1 von

138,41 bis 169,91 μm^2 auf 64,93 bis 84,25 μm^2 . Die arthrotischen Proben zeigen unbelastet eine ellipsoide Zellfläche von 133,21 bis 179,31 μm^2 , belastet aber 59,01 bis 74,24 μm^2 . Die Reduktion der Zellfläche ist oberflächenabhängig verschieden stark ausgeprägt. Defekte und arthrotische Proben werden stärker betroffen als intakte. Auch in Zone 2 kommt es bei allen Oberflächenbeschaffenheiten zu einer geringen Abnahme der ellipsoiden Zellfläche. Eine Oberflächenabhängigkeit ist hier nicht offensichtlich. Die ellipsoide Zellfläche der Zone 3 zeigt keinerlei Veränderungen. Ihre Werte liegen um 200 - 250 μm^2 . Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen bei Betrachtung der Zellfläche aus y- und x-Achse (Tabelle 1,2,3).

5.1.2. Zelldichte

Die unbelastete Zelldichte nimmt oberflächenunabhängig von der Oberfläche abwärts ab. Die gemittelte Ausgangszelldichte der Zonen 1 (11,26 bis 13,81 Zellen pro Auswertefeld) und 2 (5,26 bis 6,23) liegt bei intakten Proben leicht höher als bei arthrotischen bzw. defekten (Zone 1: 6,64 bis 14,15). Zone 2 hat bei intakt, defekt und arthrotisch eine gleiche Zelldichte (3,96 bis 6,21), so daß die höhere Zelldichte in Zone (1+2) bei den intakten Proben durch höhere Zellzahlen in Zone 1 bedingt ist. Zone 3 zeigt arthrotisch eine leicht kleinere Zelldichte (1,93 bis 4,02 unbelastet) als intakt (4,60 bis 5,36 unbelastet) und defekt (4,61 bis 5,12 unbelastet) (Tabelle 4).

Nach Belastung zeigt die Zelldichte in Zone 1 im Mittel intakt Werte von 12,83 bis 14,28 Zellen pro Auswertefeld, in Zone 2 von 5,24 bis 7,37, in Zone (1+2) 8,26 bis 10,02 und in Zone 3 4,67 bis 5,34 Zellen /Auswertefeld. Defekt liegt die belastete Zelldichte in Zone 1 bei 8,30 bis 13,60, in Zone 2 bei 4,36 bis 6,75, in Zone (1+2) bei 6,62 bis 10,18 und in Zone 3 bei gemittelten 4,83 bis 5,18 Zellen /Auswertefeld. Für die arthrotischen belasteten Proben ergeben sich unter Belastung Zelldichten in Zone 1 von 7,83 bis 11,75, in Zone 2 von 3,17 bis 4,53, in Zone (1+2) von 5,97 bis 8,14 und in Zone 3 von 2,38 bis 3,72.

Bei keiner Oberflächengruppe und bei keiner Laststufe findet sich unter Belastung eine signifikante Veränderung der Zellzahl pro Auswertefeld als Maßeinheit für die Zelldichte (Tabelle 4, Abbildung 9, 10a und b). In der statistischen Auswertung ist die vor und nach Belastung verglichene Zelldichte nicht signifikant verändert.

Lichtmikroskopie: Zonale Zelldichte									
		Zelldichte unbelastet				belastet			
Laststufe		Zone 1	Zone 2	m Zone 1+2	Zone 3	Zone 1	Zone 2	m Zone 1+2	Zone 3
i 20 280	m	13,07	5,74	9,40	5,36	13,17	6,32	9,74	5,34
	s	4,02	2,43	3,01	1,95	5,01	4,04	4,37	3,19
d 20 280	m	6,64	4,30	5,47	4,84	9,80	5,38	7,59	4,95
	s	4,40	2,44	3,24	1,48	5,92	2,78	4,12	1,61
a 20 280	m	9,54	4,53	7,04	1,93	7,83	4,10	5,97	2,38
	s	2,85	1,41	2,01	0,88	1,74	0,95	1,16	0,98
i 20 160	m	13,81	6,23	10,02	5,04	14,28	7,37	9,93	5,58
	s	3,00	2,36	2,53	1,15	5,42	3,56	3,38	1,85
d 20 160	m	8,06	5,64	6,85	4,90	9,08	4,36	6,72	4,83
	s	3,48	3,57	3,34	2,39	6,68	2,26	4,13	2,29
a 20 160	m	8,46	3,96	6,21	2,43	8,42	4,42	6,42	2,90
	s	2,58	1,39	1,52	1,09	3,56	1,43	1,95	1,67
i 1 280	m	12,08	5,41	8,74	4,76	12,83	5,24	9,03	4,90
	s	3,42	2,76	2,55	1,08	4,35	2,75	3,10	1,62
d 1 280	m	7,00	5,15	6,08	4,61	8,30	5,33	6,81	5,14
	s	3,04	2,02	2,49	1,41	5,39	1,72	2,78	2,56
a 1 280	m	11,50	4,94	8,22	3,79	11,75	4,53	8,14	3,54
	s	0,89	0,88	0,74	1,03	1,02	0,77	0,66	0,50
i 1 160	m	11,26	5,26	8,26	4,60	13,85	6,39	10,12	4,67
	s	3,44	2,16	2,02	1,06	3,66	2,84	2,66	1,67
d 1 160	m	14,15	5,73	9,94	5,12	13,60	6,75	10,18	5,18
	s	8,43	1,83	4,09	1,82	2,82	2,59	1,53	2,05
a 1 160	m	9,58	3,71	6,65	4,02	8,97	3,17	6,07	3,72
	s	2,88	0,81	1,84	0,79	2,25	0,94	1,30	0,60

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch:1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g; m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 4: Zelldichte in Zone 1,2,(1+2) und 3 im Vergleich unbelastet und belastet. Es finden sich nach Belastung in keiner Zone und bei keiner Oberfläche signifikante Veränderungen

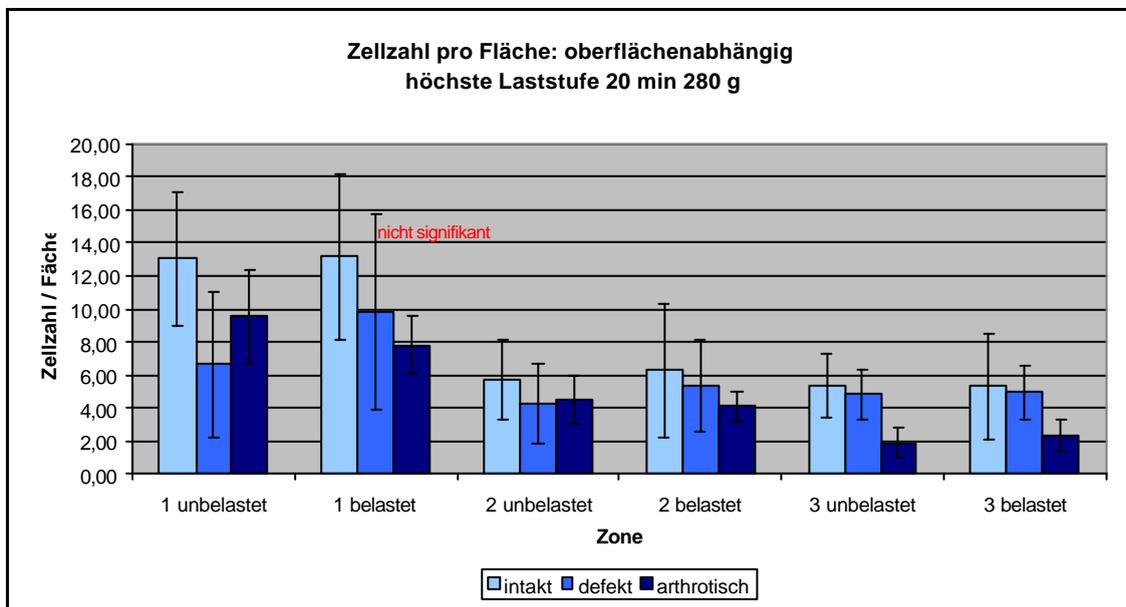


Abbildung 9: Die Zelldichte nimmt von der Oberfläche abwärts ab. Unabhängig von der Oberfläche oder der Größe und Dauer der Belastung finden sich keine signifikanten Veränderungen der zonalen Zelldichte unter Belastung.

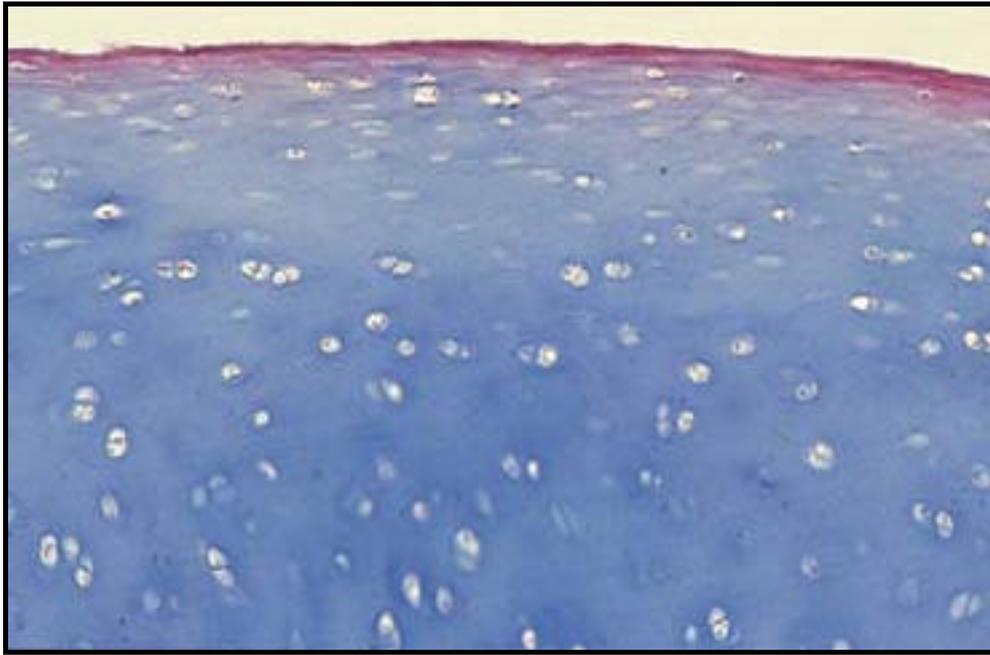


Abbildung 10a : Intaktes Präparat, unbelastet: Die Zelldichte beträgt in Zone 1 im Mittel 11,26 bis 13,83 Zellen /Auswertefeld in Zone 2 5,26 bis 6,23 Zellen /Auswertefeld, in Zone (1+2) 8,26 bis 10,02 Zellen / Auswertefeld

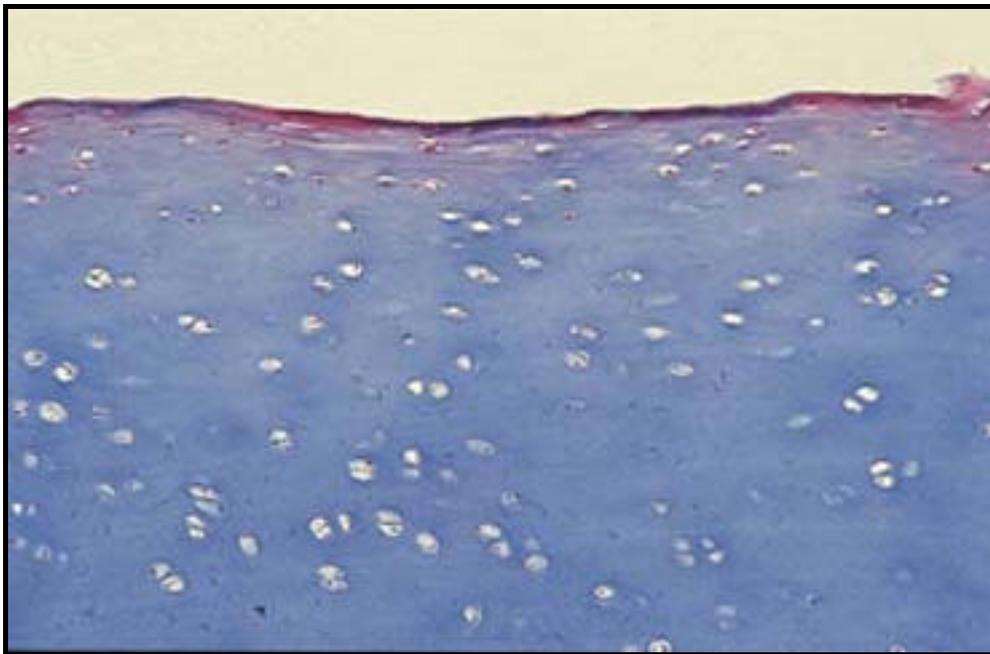


Abbildung 10b : Intaktes Präparat, belastet mit 280g für 20 min: Die Zelldichte zeigt keine signifikanten Veränderungen unter Belastung. Sie beträgt in Zone 1 im Mittel 12,83 bis 14,28 Zellen / Auswertefeld in Zone 2 5,24 bis 7,37 Zellen / Auswertefeld und in Zone (1+2) 9,03 bis 10,12 Zellen / Auswertefeld.

5.1.3. Gesamthöhe und Zonale Höhe

Beim Vergleich der unbelasteten absoluten Gesamthöhe und der unbelasteten absoluten Zonenhöhen zeigen sich vergleichbare Ausgangswerte für die Zonen 1, 2 und 1+2 bei den intakten und arthrotischen Präparaten. Durch die abgetragene Oberfläche sind diese Zonen bei den defekten Präparaten kleiner. Zone 3 defekt entspricht wieder der Zone 3 intakt.

Es zeigen sich im Vergleich mit den intakten Proben größere mittlere absolute Ausgangswerte für die Gesamthöhe und die Zone 3 bei den arthrotischen Präparaten. Dabei korrelieren Unterschiede in der Höhe des Gesamtknorpels mit unterschiedlicher Höhe der Zone 3. Die Höhe der Zone 3 scheint die Gesamthöhe zu bestimmen. Es scheint auch bei Betrachtung der anderen Oberflächengruppen und ihrer einzelnen Präparate, daß die Höhe des Gesamtknorpels im wesentlichen von der Höhe der Radiärzone bestimmt wird (Abbildung 11,12).

Bei der Betrachtung der zonalen Höhe als absolute mittlere Werte liegen die unbelasteten Ausgangswerte für die Oberflächengruppen in Zone 1 zwischen 68,45µm und 77,13µm, für Zone 1 arthrotisch zwischen 59,50µm und 67,50µm. Bei den defekten abgetragenen Oberflächen blieb eine Restzone 1 von 10,09µm bis 35,40µm. Zone 2 intakt liegt bei Betrachtung der Mittelwerte der Gruppen zwischen 243,77 µm und 294,76µm, für Zone 2 arthrotisch zwischen 220,67µm und 259,75µm. Bei den defekten finden wir eine Zone 2 von 155,00µm und 262,70µm. Ebenfalls vergleichbar liegen die Werte auch in der zusammengefaßten Zone (1+2) die intakt zwischen 298,65µm und 371,89µm liegt, bei arthrotischen Proben zwischen 282,00µm und 327,25µm, bei defekten wieder entsprechend geringer mit 168,05µm und 298,10µm. Schwankungen der Gesamthöhe, die sich bei defekten (1046,40µm bis 1415,61µm) und arthrotischen (1420,50µm bis 1960,33µm) Gruppen finden, bei intakt weniger streuend mit 1235,19µm bis 1378,45µm, ergeben sich aus korrelierenden Schwankungen der Höhe der Zone 3. Deren Werte liegen intakt wenig gestreut zwischen 863,74µm und 1008,70µm, defekt zwischen 818,40µm und 1145,82µm und arthrotisch bei 1036,63µm bis 1667,33µm (Tabelle 5).

Beim Vergleich der unbelasteten prozentualen Zonenhöhen zeigt sich der größte Anteil der Zone (1+2) mit 25% bis 29% bei den intakten Proben. Bei den defekten Proben ist ein Anteil von 13 –21% vorhanden. Die arthrotischen Proben zeigen hier mit 14 –22% einen entsprechenden Anteil der Zone (1+2) an der Gesamthöhe, aber einen kleineren Anteil im

Vergleich zu den intakten Proben. Die Zone 3 macht bei ihnen mit 71-85% den Großteil der Gesamthöhe aus. Da der Anteil der Zone 3 an der Gesamthöhe bei abgetragener Oberfläche im Vergleich zu den intakten Proben wächst, finden sich bei den defekten Proben prozentual höhere Werte (75-83%) als bei den intakten Proben (64-73%) (Tabelle 6).

Nach Belastung sind die absoluten mittleren Werte für Zone 1, 2 und (1+2) bei den intakten und arthrotischen Proben größer. Sie sind untereinander weiterhin in ihrer Höhe vergleichbar. Die Zonen 1 und (1+2) der defekten Proben sind ebenfalls größer geworden, aber weiterhin kleiner als bei den intakten Proben. Zone 2 ist vergleichbar hoch bei allen Oberflächenzuständen.

Zone 3 ist bei allen Oberflächenzuständen kleiner geworden. Auch die Gesamthöhe hat abgenommen (Abbildung 11,12,Tabelle 5).

Im einzelnen liegen die mittleren absoluten Werte nach Belastung für intakte Proben in Zone 1 zwischen 80,05µm und 106,53µm. Für Zone 1 arthrotisch sind sie ebenfalls erhöht und liegen zwischen 88,88µm und 137,92µm. Bei den defekten Oberflächen liegt die Höhe bei 26,68µm bis 68,70µm. Die mittleren Absolutwerte für Zone 2 intakt liegen zwischen 281,45µm und 364,50µm, für Zone 2 arthrotisch zwischen 280,83µm und 422,58µm. Bei den defekten finden wir eine Zone 2 von 201,60µm bis 368,52µm. Vergleichbar ist auch die zusammengefaßte Zone (1+2) die intakt zwischen 361,50µm und 471,03µm liegt, bei arthrotischen zwischen 382,83µm und 560,50µm, bei defekten entsprechend geringer mit 270,30µm und 424,66µm. Wir finden eine Abnahme der Gesamthöhe, die bei defekten Gruppen nun zwischen 797,38µm bis 1202,17µm und arthrotischen zwischen 1293,13µm und 1690,00µm liegt, bei intakten zwischen 1022,72µm bis 1301,40µm. Auch die Höhe der Zone 3 nimmt ab, ihre Werte liegen intakt zwischen 603,45µm und 855,50µm, defekt zwischen 482,30µm und 861,67µm und arthrotisch bei 775,08µm bis 1234,50µm (Tabelle 5).

Die gemittelten prozentualen Anteile der Zonenhöhe an der Gesamthöhe liegen nach Belastung für die Zone (1+2) zwischen 29% und 47 % bei den intakten Proben. Für die Zone 3 der intakten Proben finden sich Anteile von 49 bis 66 %. Je höher dabei die Last (in der Reihenfolge 1/160, 1/280, 20/160, 20/280) desto größer der Anteil der Zone (1+2) und desto geringer der Anteil der Zone 3. Die gilt auch für die Laststufe 20/280 im Vergleich zu den anderen Laststufen bei den defekten und arthrotischen Proben. Hier ist zwischen der Laststufe 20/280 und den niedrigeren Laststufen ein deutlicher Sprung im Unterschied der

Zonenanteile zu erkennen. So ist bei den defekten Proben der Zonenanteil der Zone (1+2) bei 20/280 mit 45% deutlich höher als derjenige der folgenden Laststufen (27,34,36%), bei den arthrotischen finden wir 43% zu 27, 36, 34%). Das gleiche trifft für die Zone 3 zu, die bei der Laststufe 20/280 kleinere Anteile ausmacht als bei den übrigen Laststufen. Bei den intakten Proben finden wir nach Laststufe gestaffelte Höhenanteile von 49% bis 66%. Bei den defekten Proben ist ein Anteil von 52 –71 % vorhanden. Die arthrotischen Proben zeigen hier mit 53 bis 73% ein entsprechendes Verhalten (Tabelle 6, Abbildung 13).

Lichtmikroskopie: Gesamthöhe und Zonale Höhe												
Laststufe		absolute Zonenhöhe in µm					Gesamt	belastet				
		unbelastet						belastet				
		Zone 1	Zone 2	Zone1+2	Zone3	Gesamt	Zone 1	Zone 2	Zone1+2	Zone3	Gesamt	
i 20 280	m	77,13	294,76	371,89	863,74	1338,61	106,53	364,50	471,03	603,45	1116,24	
	s	29,19	88,50	100,27	353,38	423,72	40,01	153,88	168,35	378,63	439,16	
d 20 280	m	10,09	157,95	168,05	1145,82	1392,50	56,14	368,52	424,66	600,64	1051,64	
	s	20,46	105,22	113,35	598,00	572,73	41,76	228,01	228,23	547,03	576,34	
a 20 280	m	67,50	259,75	327,25	1328,50	1850,33	137,92	422,58	560,50	775,08	1404,08	
	s	10,96	115,72	120,10	385,08	246,94	32,44	147,44	133,62	396,93	396,31	
i 20 160	m	68,34	230,31	298,65	898,47	1235,19	91,00	302,81	393,81	605,00	1022,72	
	s	26,56	82,84	102,87	373,34	395,76	23,83	152,75	147,41	338,80	413,39	
d 20 160	m	14,11	164,83	178,94	1185,28	1415,61	26,28	274,22	300,50	861,67	1202,17	
	s	26,19	112,48	120,92	526,24	588,65	36,11	163,55	169,89	400,00	554,79	
a 20 160	m	66,58	256,92	323,50	1440,00	1895,75	96,83	306,83	403,67	1044,33	1550,83	
	s	10,92	73,39	74,28	177,13	255,90	31,52	144,92	148,65	279,08	217,39	
i 1 280	m	69,15	243,77	312,92	1008,70	1386,29	98,30	322,90	421,20	797,90	1183,80	
	s	21,81	110,43	128,31	464,32	483,61	33,38	130,37	144,97	414,74	468,03	
d 1 280	m	23,90	155,00	178,90	818,40	1046,40	68,70	201,60	270,30	482,30	797,38	
	s	46,02	66,77	102,31	248,10	219,35	30,43	75,61	99,65	256,81	217,61	
a 1 280	m	59,50	258,63	318,13	1036,63	1420,50	88,88	298,13	387,00	896,88	1293,13	
	s	24,00	179,08	201,94	62,81	83,09	32,77	193,39	225,79	171,52	95,89	
i 1 160	m	68,45	280,50	348,95	921,35	1378,45	80,05	281,45	361,50	855,50	1301,40	
	s	18,17	101,33	103,42	291,55	444,51	11,43	84,55	89,72	276,29	407,46	
d 1 160	m	35,40	262,70	298,10	942,60	1304,90	67,90	331,40	399,30	736,90	1155,70	
	s	39,24	206,84	235,37	330,13	489,99	30,57	226,68	245,84	328,54	469,74	
a 1 160	m	61,33	220,67	282,00	1667,33	1960,33	102,00	280,83	382,83	1234,50	1690,00	
	s	14,89	51,89	44,81	314,11	369,28	43,75	40,50	84,15	169,76	179,76	

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g, m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 5: Zonale Höhe vor und nach Belastung als Absolutwerte in µm. Im Vergleich mit den intakten Proben fällt bei den arthrotischen unbelastet eine größere Gesamthöhe und Höhe der Zone 3 auf. Belastet zeigen alle Oberflächen und Laststufen für die Zone 1,2 eine Höhenzunahme bei Abnahme der Zone 3 und der Gesamthöhe. Die Ausprägung der Veränderungen ist last- und oberflächenabhängig.

Lichtmikroskopie: Prozentuale Zonenhöhe									
		Zonenhöhe in% der Gesamthöhe							
		unbelastet				belastet			
Laststufe		Zone 1 in %	Zone2 in %	Zone1+2in%	Zone3in%	Zone 1 in %	Zone2 in %	Zone1+2in%	Zone3in%
i 20 280	m	0,06	0,23	0,29	0,64	0,12	0,35	0,47	0,49
	s	0,03	0,06	0,08	0,11	0,07	0,12	0,18	0,18
d 20 280	m	0,01	0,12	0,13	0,80	0,06	0,38	0,45	0,52
	s	0,02	0,09	0,10	0,14	0,05	0,15	0,16	0,18
a 20 280	m	0,04	0,14	0,18	0,71	0,11	0,32	0,43	0,53
	s	0,01	0,07	0,08	0,15	0,06	0,11	0,14	0,17
i 20 160	m	0,06	0,19	0,25	0,71	0,30	0,30	0,41	0,56
	s	0,02	0,05	0,07	0,10	0,09	0,09	0,11	0,14
d 20 160	m	0,01	0,13	0,14	0,83	0,04	0,23	0,27	0,71
	s	0,02	0,08	0,09	0,10	0,05	0,08	0,11	0,09
a 20 160	m	0,04	0,13	0,17	0,77	0,06	0,20	0,27	0,67
	s	0,01	0,03	0,03	0,09	0,01	0,12	0,12	0,12
i 1 280	m	0,06	0,19	0,25	0,71	0,30	0,30	0,40	0,66
	s	0,03	0,09	0,11	0,11	0,14	0,14	0,17	0,21
d 1 280	m	0,03	0,16	0,18	0,78	0,09	0,27	0,36	0,58
	s	0,05	0,07	0,11	0,13	0,04	0,12	0,14	0,15
a 1 280	m	0,04	0,18	0,22	0,73	0,07	0,23	0,30	0,70
	s	0,01	0,11	0,12	0,08	0,02	0,14	0,16	0,14
i 1 160	m	0,05	0,21	0,26	0,67	0,22	0,22	0,29	0,66
	s	0,02	0,07	0,08	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06
d 1 160	m	0,03	0,18	0,21	0,75	0,07	0,28	0,34	0,64
	s	0,03	0,14	0,16	0,18	0,04	0,15	0,18	0,18
a 1 160	m	0,03	0,11	0,14	0,85	0,06	0,17	0,23	0,73
	s	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min, 160/280= Größe der Last in g; m= Mittelwert, s= Standardabweichung;

Tabelle 6: Zonale Höhe vor und nach Belastung in Prozent der Gesamthöhe. Auch hier zeigen alle Oberflächen und Laststufen für die Zone 1,2 eine Höhenzunahme bei Abnahme der Zone 3 und der Gesamthöhe. Die Ausprägung der Veränderungen ist last- und oberflächenabhängig.

Beim Vergleich sowohl der absoluten als auch der prozentualen Mittelwerte vor und nach Belastung zeigen in allen Belastungsstufen und Oberflächengruppen die Zonen 1, 2, (1+2) eine Höhenzunahme, Zone 3 und Gesamthöhe eine Abnahme. Die Ausprägung der Veränderungen ist oberflächenabhängig und abhängig von der einwirkenden Last (vgl. Abbildung 11 bis16).

Bei Betrachtung der gemittelten absoluten belasteten Zonenhöhen nach Belastung finden wir mit einem $p=0,0359$ unterschiedliche Höhen der Zone (1+2) vor. Die Ausgangswerte dieser Zonenhöhe waren durch die Oberflächenabtragung verschieden groß. Wir finden nun aber nicht nur die erwartete Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit, sondern nun auch mit einem $p=0,0423$ von der Größe der Last.

Auch die absoluten gemittelten Ausgangshöhen der Zone 3 unbelastet unterschieden sich (arthrotisch höher). Dies trifft auch für die absoluten gemittelten Werte nach Belastung in dieser Zone zu. Hier finden wir keine statistisch signifikante Abhängigkeit von Lastdauer

oder Lastgröße. Die mit einem $p=0,0006$ signifikante Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit können wir als Hinweis auf die höhere Zone 3 bei den arthrotischen Proben verwenden (intakt versus arthrotisch $p=0,0262$, defekt versus arthrotisch $p=0,05$).

Bei der statistischen Auswertung der gemittelten prozentualen belasteten Werte für die Zonen (1+2) sowie 3 finden wir Entsprechendes. Es ergeben sich bei oberflächenabhängig unbelastet unterschiedlichen Ausgangswerten auch unterschiedliche belastete Werte für die Zone (1+2) mit $p=0,0002$. Diese Werte sind erwartungsgemäß abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit ($p=0,0471$). Sie sind nach Belastung aber auch abhängig von der Größe der Last mit $p=0,0006$ und von der Dauer der Last mit $p=0,0180$.

Gleiches gilt für die Zone 3. Hier findet sich eine Abhängigkeit mit $p=0,0035$ von der Größe der Last und mit $p=0,0113$ von der Dauer der Belastung.

Zur besseren Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Ausgangswerten eignet sich bevorzugt die Betrachtung der relativen Veränderungen der jeweiligen Zonenhöhe durch $\Delta = (\text{belastete Zonenhöhe} - \text{unbelastete Zonenhöhe}) / \text{unbelastete Zonenhöhe}$. Hier fallen Schwierigkeiten der Vergleichbarkeit durch unterschiedliche Ausgangshöhen heraus (Tabelle 7). Es fallen bei den defekten Gruppen der Zone 1,2, 1+2 z.T. Werte heraus. Dies rührt daher, daß sich bei der mathematischen Berechnung der Bruchfunktion bei Einzelproben mit komplett abgetragener oberster Zone im Nenner Null ergab und für die Gesamtfunktion ein ungültiges Ergebnis entstand. Unberührt davon sind jedoch alle Zonen (1+2) intakt und arthrotisch, sowie alle Zonen 3 und die Gesamthöhe intakt, defekt und arthrotisch, so daß wir hier statistisch vergleichen können (Tabelle 7).

Lichtmikroskopie: Zonale Höhe im Verhältnis vor und nach Belastung						
		Zonenhöhe Verhältnis vor und nach Belastung in %d.h.				
		$(\text{zone belastet} - \text{zone unbelastet}) / \text{zone unbelastet}$				
Laststufe		Zone 1	Zone 2	Zone 1+2	Zone 3	Gesamthöhe
i 20 280	m	0,46	0,24	0,28	-0,37	-0,19
	s	0,50	0,33	0,31	0,25	0,12
d 20 280	m	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,52	-0,28
	s	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,18	0,12
a 20 280	m	1,10	0,90	0,92	-0,43	-0,25
	s	0,64	0,90	0,80	0,20	0,16
i 20 160	m	0,44	0,35	0,39	-0,35	-0,19
	s	0,49	0,56	0,48	0,23	0,15
d 20 160	m	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,29	-0,17
	s	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,16	0,16
a 20 160	m	0,49	0,15	0,21	-0,28	-0,17
	s	0,55	0,22	0,18	0,15	0,12
i 1 280	m	0,49	0,42	0,43	-0,22	-0,14
	s	0,54	0,51	0,46	0,13	0,17
d 1 280	m	#DIV/0!	0,51	0,90	-0,40	-0,23
	s	#DIV/0!	0,72	1,08	0,24	0,15
a 1 280	m	0,53	0,17	0,25	-0,14	-0,09
	s	0,30	0,27	0,27	0,12	0,04
i 1 160	m	0,21	0,03	0,06	-0,07	-0,05
	s	0,21	0,14	0,12	0,05	0,03
d 1 160	m	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,25	-0,12
	s	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,15	0,09
a 1 160	m	0,80	0,29	0,35	-0,24	-0,13
	s	1,03	0,12	0,15	0,15	0,12

i= intakt d=defekt a= arthrotisch: 1/20= Dauer der Last in min 160/280= Größe der Last in g
m= Mittelwert, s= Standardabweichung:

Tabelle 7: Zonenhöhe im Verhältnis vor und nach Belastung nach der Funktion $f = [(\text{belastete Zonenhöhe} - \text{unbelastete Zonenhöhe}) / \text{unbelastete Zonenhöhe}]$. Es fallen bei den defekten Gruppen der Zone 1,2, 1+2 z.T. Werte heraus. Dies rührt daher, daß sich bei der mathematischen Berechnung der Bruchfunktion bei Einzelproben mit komplett abgetragener oberster Zone im Nenner Null ergab und für die Gesamtfunktion ein ungültiges Ergebnis entstand. Wir finden für die Zone (1+2) eine signifikante Abhängigkeit der Ausprägung der unterschiedlichen Zunahme der Zonenhöhe von der Oberflächenbeschaffenheit.

Die unterschiedlichen Zonenhöhen vor Belastung im Vergleich zu nach der Belastung in der Zone (1+2) sind bei der globalen Betrachtung der GLM (general linear model) - Methode mit einem $p < 0,0038$ statistisch signifikant. Dabei betrachtet diese Form der statistischen Auswertung alle 111 Proben der Hauptschnittebene in den unterschiedlichen Laststufen gemeinsam. Signifikant ist auch die unterschiedliche Zonenhöhe in der Zone 3 nach Belastung im Vergleich zum unbelasteten Zustand mit einem $p < 0,0037$. Dabei findet sich für die Zone (1+2) eine Abhängigkeit der Ausprägung der unterschiedlichen Zunahme der Zonenhöhe von der Oberflächenbeschaffenheit mit einem $p = 0,0006$. Die Oberfläche beeinflusst die stärkere Höhenzunahme in der Zone (1+2) bei den defekten Proben gegen die intakten mit einem $p = 0,0251$. Die arthrotischen Proben werden in der Zone (1+2) mit einem $p = 0,0006$ stärker in ihrer Höhe verändert als die intakten Proben.

Die Höhe der einzelnen Zonen im Knorpel wird also durch Belastung abhängig von Größe der Last und Oberflächenbeschaffenheit signifikant beeinflusst. Die intakte Oberfläche hält die Deformation im Vergleich mit der defekten Oberfläche geringer (Abbildungen 11 bis 15).

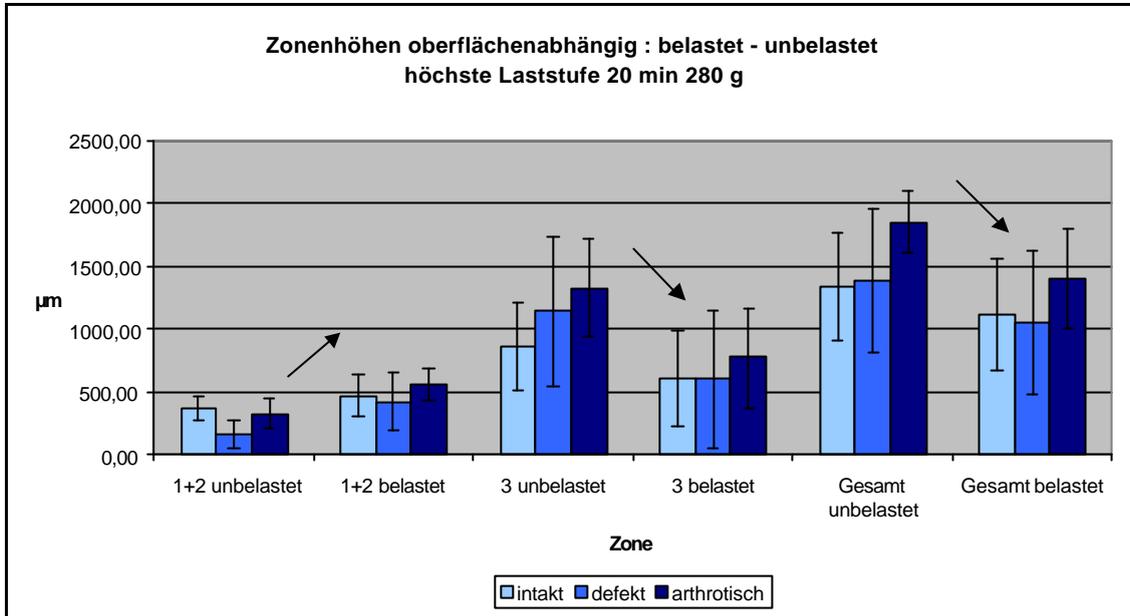


Abbildung 11: Veränderungen der absoluten zonalen Höhe in µm und der Gesamthöhe vor/nach Belastung mit 280g/20min. Alle Oberflächen (intakt, defekt, arthrotisch) im Vergleich. Die Gesamthöhe wird wesentlich von der Höhe der Zone 3 bestimmt. Unter Belastung nimmt die Zone 1+2 zu. Dies geschieht auf Kosten der Zone 3 bei gleichzeitiger Reduktion der Gesamthöhe.

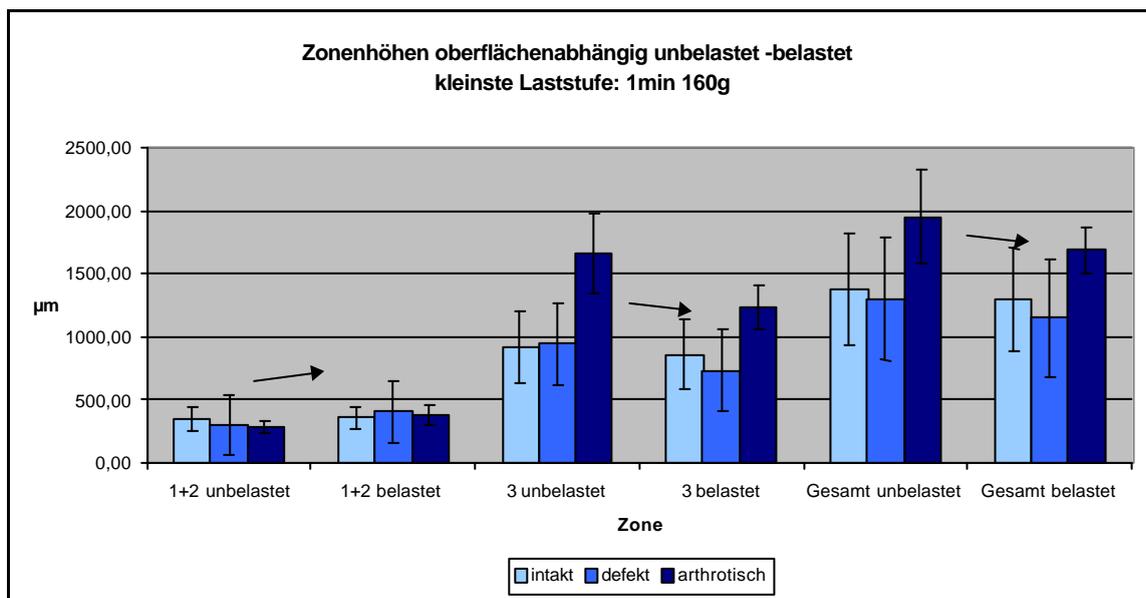


Abbildung 12: Veränderungen der absoluten zonalen Höhe in μm und der Gesamthöhe vor /nach Belastung mit 160g/1min. Alle Oberflächen (intakt, defekt, arthrotisch) im Vergleich. Die Gesamthöhe wird wesentlich von der Höhe der Zone 3 bestimmt. Unter Belastung nimmt die Zone 1+2 zu. Bei der kleinsten Laststufe sind die genannten Veränderungen deutlich geringer ausgeprägt (vgl. Abbildung 11). Es ist wieder die Abhängigkeit der Gesamthöhe von der Höhe der Zone 3 zu erkennen.

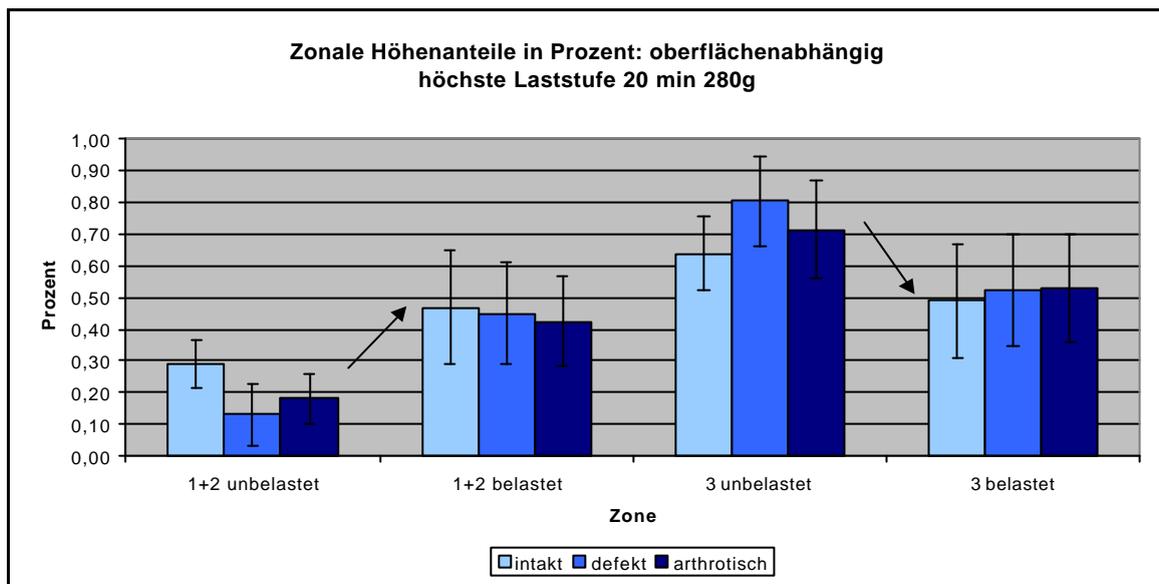


Abbildung 13: Veränderungen der prozentualen zonalen Höhe vor /nach Belastung mit 280g/20min. Alle Oberflächen (intakt, defekt, arthrotisch) im Vergleich. Auch bei Betrachtung der prozentualen Höhenanteile an der Gesamthöhe zeigt sich wieder eine Höhenzunahme der oberen Knorpelzonen (1+2) auf Kosten der unteren Zone 3 bei insgesamt Kompression der Knorpelhöhe unter Belastung.



Abbildung 14: Intakte Oberfläche, Belastung 280g, 20 min: Die Impression ist flach und läuft beidseitig sanft aus.

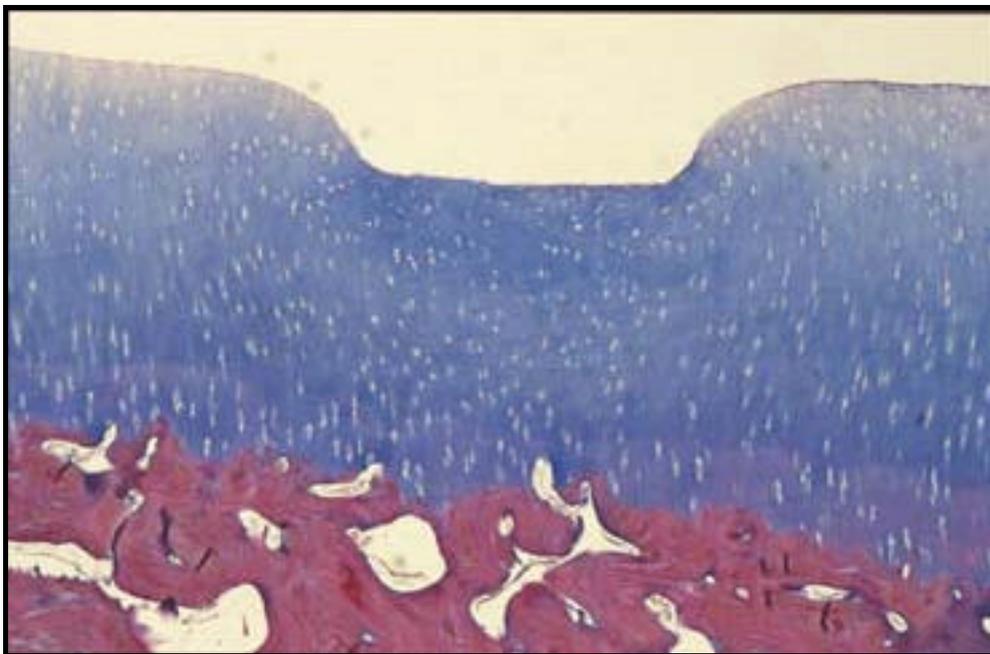


Abbildung 15: Defekte Oberfläche, Belastung 280g, 20 min. Die Impression schneidet in die Oberfläche ein und ist tiefer als bei intakter Oberfläche.

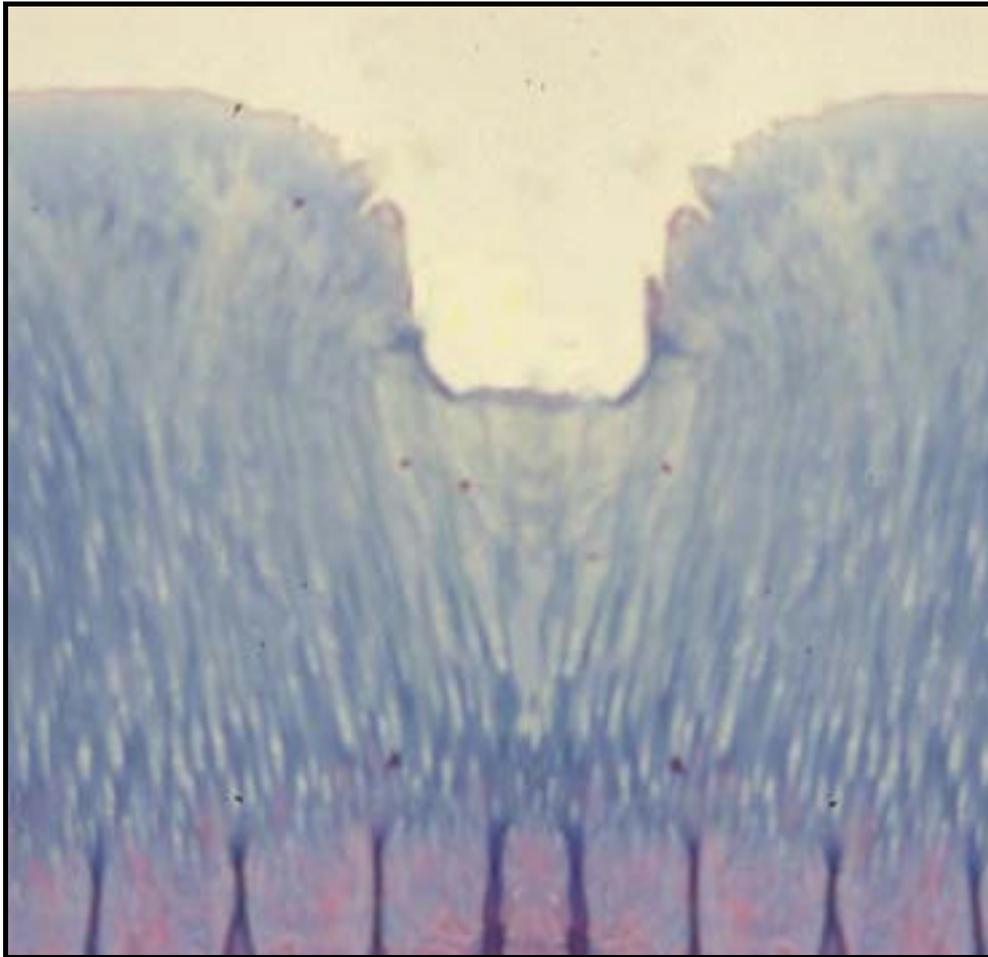


Abbildung 16: Arthrotische Oberfläche, Belastung 280g, 20min. Man sieht im Vergleich mit Abbildung 14 und 15 die Abhängigkeit der Höhenveränderungen von der Oberflächenbeschaffenheit bei höchster Laststufe. Deutlich wird die unterschiedlich stark ausgeprägte Tiefe der Impression. Bei gleicher Vergrößerung wie in Abb. 14 und 15 fällt die größere Gesamthöhe bei arthrotischen Präparaten auf.

5.1.4.Reversibilität

Schon makroskopisch weisen alle intakten 1 oder 20 Minuten belasteten Proben nach Relaxation von 5 sec, 1 min, 20 min und 3 Stunden keine Zeichen der Impression mehr auf. Dies bestätigt sich histologisch. Die oberflächenbeschädigten Proben weisen makroskopisch bei kurzer Belastungszeit und allen Relaxationszeiten noch Impressionsspuren auf. Bei langer Belastungszeit ist die Impression ebenfalls noch deutlich zu erkennen. Dabei zeigt sich bei

defekter wie arthrotischer Oberfläche kein Einfluß der Dauer der Relaxation. Auch histologisch verhalten sich diese Proben wie die entsprechenden Proben ohne Relaxationszeit.

5.1.5. Belastungszeit 5 Sekunden

Die Proben zeigen sowohl bei intakter als auch bei defekter Oberfläche ein Verhalten, das demjenigen bei einminütiger Belastungszeit entspricht.

5.2. Rasterelektronenmikroskopie

5.2.1. Gesamthöhe

Die gemittelten absoluten Ausgangswerte der intakten Proben liegen für die Gesamthöhe zwischen 1529,90 μm und 1743,25 μm . Wie in der Lichtmikroskopie sind die mittleren Ausgangswerte der arthrotischen Proben mit 1668,20 bis 1845,50 μm größer. Die defekten Proben mit der abgetragenen Oberfläche haben kleinere gemittelte Ausgangshöhen zwischen 992,20 und 1653,75 μm (Tabelle 8).

Nach Belastung ist die Gesamthöhe kleiner geworden. Die gemittelten absoluten Endhöhen der intakten Proben liegen nun zwischen 1139,82 μm und 1412,00 μm . Die defekten Proben besitzen nach Belastung noch eine Gesamthöhe zwischen 800,25 und 1291,00 μm (Tabelle 8).

5.2.2. Zonale Höhe

Bei der prozentualen Betrachtung der Anteile der einzelnen Knorpelzonen an der Gesamthöhe macht die Zone 1 der intakten Proben unbelastet rund 5% aus, die Zone 2 10 bis 15% und die Zone 3 etwa 75 bis 85%. Bei den defekten Proben verteilen sich die Zonenanteile unbelastet auf 8,5 bis 10% Zone 2 und 88 bis 90% Zone 3.

Nach Belastung besitzt die Zone 1 der intakten Proben mit ca. 4 bis 7,5% einen höheren Anteil, die Zone 2 mit nun 13 bis 23% ebenfalls und die Zone 3 wurde auf 80 bis 73%

reduziert. Die defekten Proben zeigen unter Belastung einen Zuwachs der Zone 2 auf 11,8 bis 25% Anteil an der Gesamthöhe, die Zone 3 eine Reduktion auf 73,9 bis 89,8%.

Die Gesamthöhe nimmt bei Belastung ab. Wie in der Lichtmikroskopie nehmen die prozentualen Höhenanteile der Zone 1 und 2 zu, derjenige der Zone 3 ab. Dabei ist das Ausmaß dieser Veränderungen größer bei defekter Oberfläche. Außerdem findet sich ein stärkerer Höhenverlust bei höherer Last (Tabelle 8, Abbildung 17a,b,18a,b).

Rasterelektronenmikroskopie: Gesamthöhe und Zonale Höhe								
Gesamthöhe absolut in µm (Mittelwerte)								
	unbelastet				belastet			
Laststufe	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamthöhe	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamthöhe
i 20 280	85,55	248,64	1402,73	1741,91	72,18	271,82	874,00	1139,82
i 20 160	54,20	168,90	1329,70	1529,90	55,10	194,50	974,30	1212,10
i 1 280	70,25	248,50	1371,88	1743,25	59,63	267,63	1038,25	1412,00
i 1 160	84,00	219,17	1283,67	1547,50	91,83	165,50	961,33	1214,00
d 20 280	0,00	129,75	1277,50	1430,75	0,00	176,50	600,25	800,25
d 20 160	0,00	141,75	1517,75	1653,75	0,00	152,00	1160,00	1291,00
d 1 280	0,00	109,50	1163,50	1257,00	0,00	157,00	779,00	942,50
d 1 160	0,00	94,00	896,00	992,00	0,00	201,50	595,00	805,00
a 20 280	22,67	302,50	924,83	1845,50	22,50	204,00	699,50	971,67
a 20 260	27,20	214,80	1498,40	1668,20	42,00	279,00	713,40	987,60
Zonale Höhe in % der Gesamthöhe (Mittelwerte)								
	unbelastet				belastet			
Laststufe	Zone 1	Zone 2	Zone 3		Zone 1	Zone 2	Zone 3	
i 20 280	4,90	14,20	80,50		6,30	23,70	76,70	
i 20 160	3,50	11,00	86,90		4,50	16,00	80,30	
i 1 280	4,00	14,20	78,60		4,20	18,90	73,50	
i 1 160	5,40	14,10	82,90		7,40	13,60	79,20	
d 20 280	0,00	9,00	89,30		0,00	22,00	75,00	
d 20 160	0,00	8,50	91,70		0,00	11,80	89,80	
d 1 280	0,00	8,60	92,50		0,00	16,60	82,70	
d 1 160	0,00	9,50	90,30		0,00	25,00	73,90	

i= intakt, d=defekt,a= arthrotisch;1/20= Dauer der Last in min. 160/280= Größe der Last in µm

Tabelle 8: Rasterelektronenmikroskopie: Gesamthöhe und Zonale Höhe als Absolutwerte in µm und als prozentuale Höhe vor und nach Belastung. Nach Belastung ist die absolute Gesamthöhe verkleinert. Wie in der Lichtmikroskopie nehmen die prozentualen Höhenanteile der Zone 1 und 2 zu, derjenige der Zone 3 ab. Dabei ist das Ausmaß dieser Veränderungen größer bei defekter Oberfläche. Außerdem finden sich stärkere Höhenveränderungen bei höherer Last.

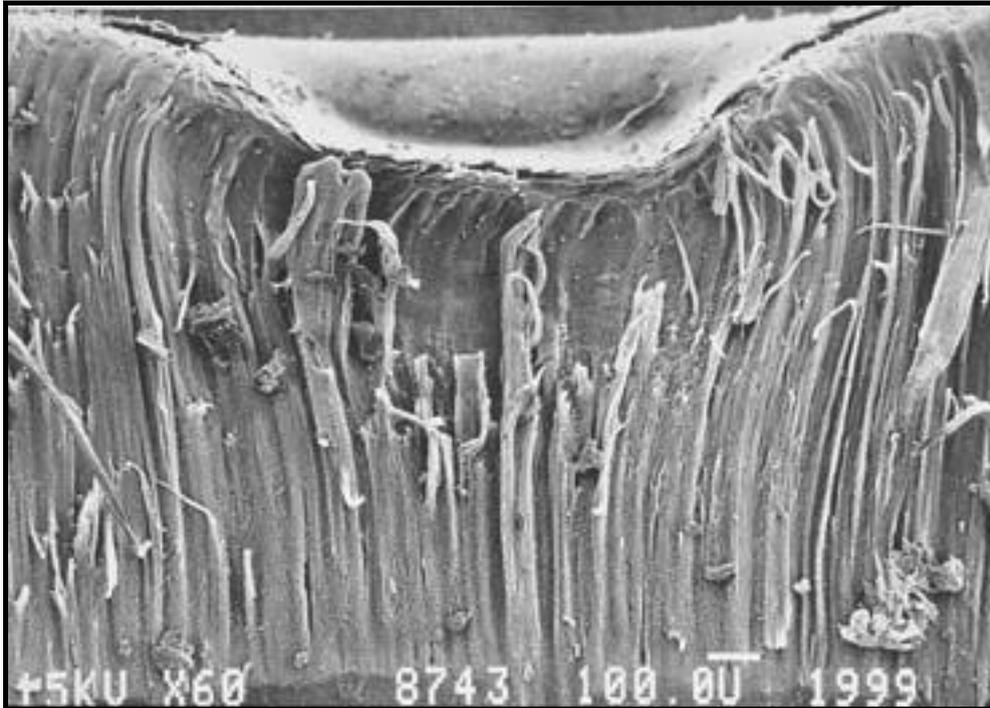


Abbildung 17a: Rasterelektronenmikroskopie: Intakte Oberfläche, Belastung mit 160g, 1min. Höhenabnahme der Gesamthöhe unter der Impression in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit und der Lastgröße (Vgl. Abbildung 17b,18a,18b).

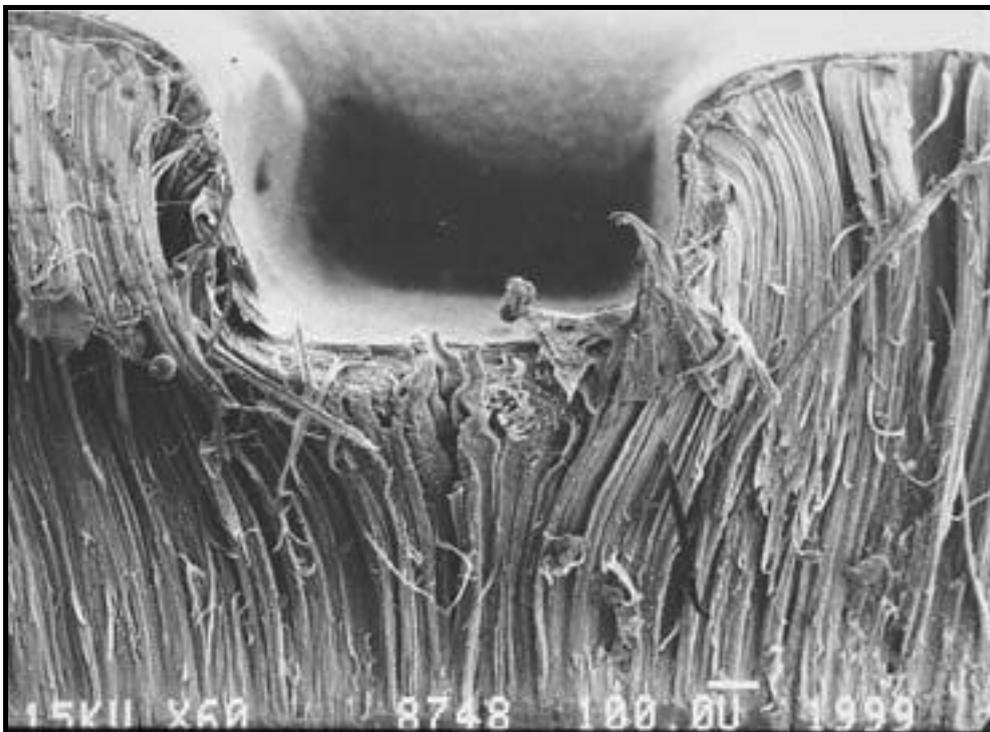


Abbildung 17b: Rasterelektronenmikroskopie: Intakte Oberfläche, Belastung mit 280g, 20min. Deutlich stärkere Höhendeformation und Einschneiden des Stempels als bei niedriger Last. (Vgl. Abbildung 17a,18a,18b).

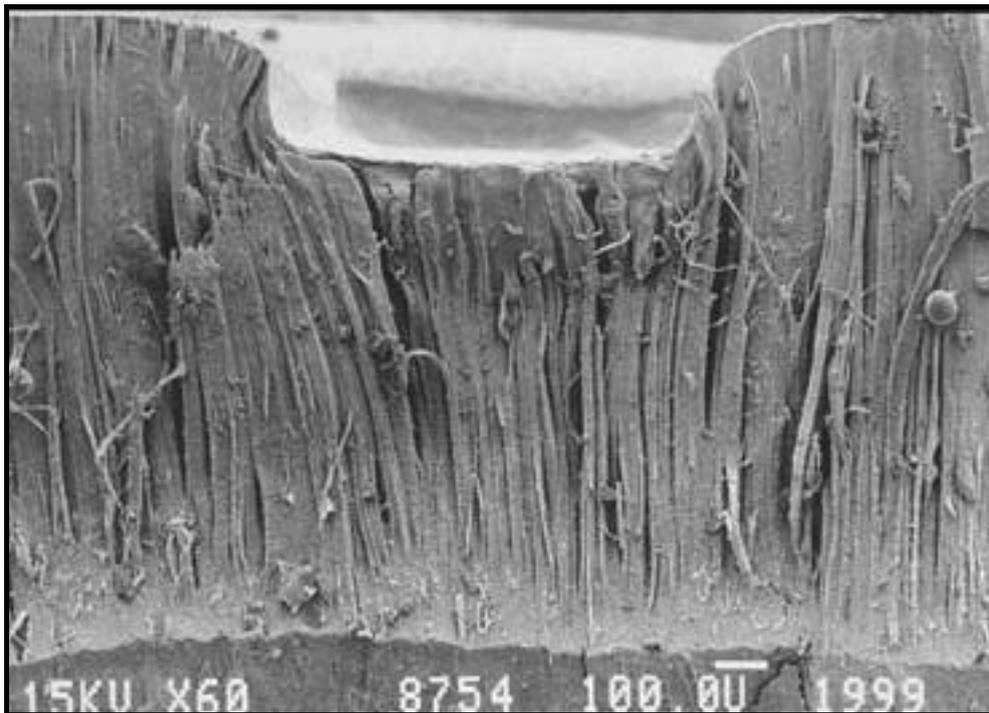


Abbildung 18a: Rasterelektronenmikroskopie: Defekte Oberfläche, Belastung mit 160g, 1min. Im Vergleich zur Abbildung 17a wird wie in der Lichtmikroskopie (Abbildung 14,15) das stärkere Einschneiden des Stempels deutlich. Auch hier stärkere Höhenabnahme der Gesamthöhe unter der Impression in Abhängigkeit von der defekten Oberflächenbeschaffenheit bei gleicher Last. (Vgl. v.a. Abbildung 17a, auch 17b,18b).

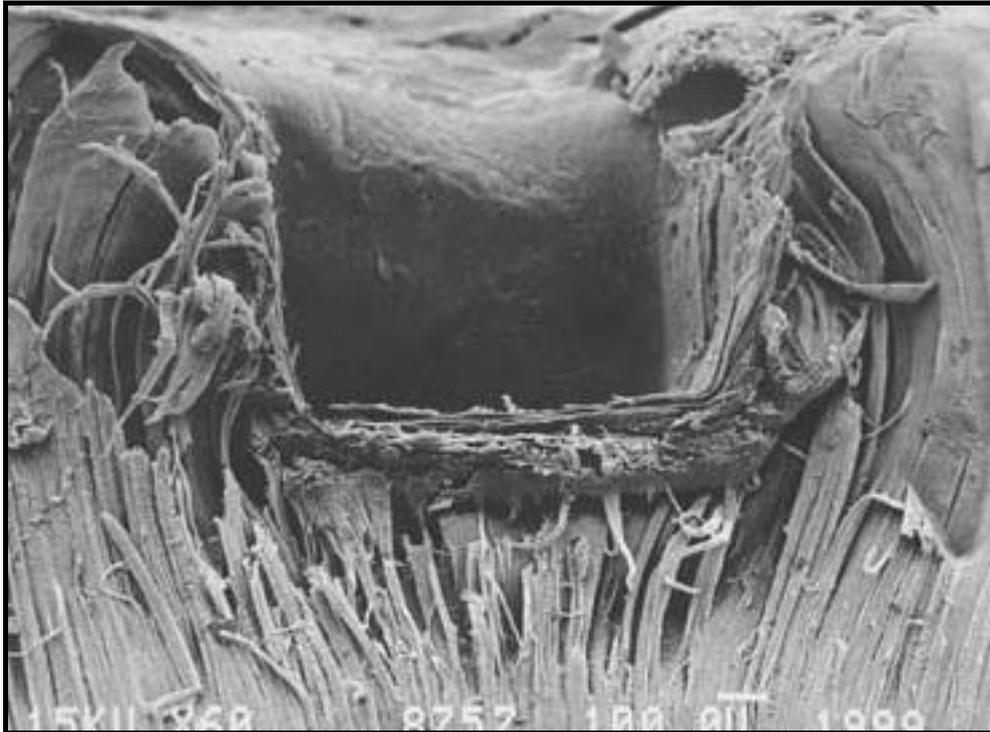


Abbildung 18b: Rasterelektronenmikroskopie: Defekte Oberfläche, Belastung mit 280g, 20min. Deutlich vermehrte Höhenabnahme der Gesamthöhe unter der Impression und starkes Einschneiden des Stempels mit deutlichem Bulging, abhängig von der defekten Oberfläche (vgl. Abb.17 b) und der Lastgröße (vgl. Abbildung 18a).

5.2.3. Übereinstimmung Kollagenfaseranordnung und Zellanordnung

Die unbelastete prozentuale zonale Höhe ist bei beiden Definitionen (Kollagenfaserarchitektur / Zellanordnung) vergleichbar. Beim Vergleich der belasteten zonalen Höhe wird erkennbar, daß die anhand der Kollagenfasern definierte Zone 1 weniger weit in die Tiefe reicht als die anhand der Zellen definierte. Dies zeigt sich auch direkt im REM. Während die kollagenfaserdefinierte Zone 1 im Mittel 69,66µm von der Oberfläche in die Tiefe reicht, findet man nach Definition der Zone 1 zugehörige Zellen noch bis 150µm Tiefe (Abbildung 19,20). Für die Zone 1 und Zone 2 finden wir hier nach Belastung keine gute Übereinstimmung der Zonendefinition nach zellarchitektonischen und kollagenfaserarchitektonischen Kriterien.



Abbildung 19: Unbelastetes Präparat mit intakter Oberfläche. Die Knorpelzellen sind umgeben von ihrer Kollagenfasermatrix. Die Zoneneinteilung nach Kollagenfaserarchitektur und Zellanordnung stimmt überein.



Abbildung 20: Mit 280g 20 min belastetes Präparat mit intakter Oberfläche. Die Zoneneinteilung nach Kollagenfaserarchitektur und Zellanordnung stimmt nicht überein. Die anhand der Kollagenfasern definierte Zone 1 reicht weniger weit in die Tiefe als die anhand der Zellen definierte.

5.3. Zerstörung des Knorpels / Bulging

Eine Zerstörung des Knorpels kann bei defekter bzw. stark arthrotischer Oberfläche und vor allem 20 minütiger Belastung gefunden werden. Die Zerstörung zeigt sich in Spaltung der Oberfläche und Plattenbildung. Diese Platten können sich bei starker Vorschädigung übereinanderschieben. Solche Proben wurden jedoch nicht bei der Auswertung berücksichtigt. Eine schwächere Störung, jedoch nicht Zerstörung, des Knorpels zeigt sich im Fehlen von zellulären Strukturen unter der Impressionsfläche (defekte Präparate, hohe Last) bzw. flachen aufgekräuselten, wellenförmigen Zellstrukturen (intakte Proben, hohe Last).

Entsprechend dem Bulging im Verlauf der Kollagenfasern im REM finden wir ein Zellbulging. Dies ist ein ausweichender Verlauf der Zellanordnung um die Impression herum. Dies geschieht in einer von der Oberfläche zur Tide Mark senkrecht verlaufenden, sich seitlich um die Impression herum ausbeulenden Linie. Die Ausprägung dieses Bulgings nimmt mit zunehmender Lastdauer und –größe zu, genauso bei defekter Oberfläche. Auch im Rasterelektronenmikroskop sieht man ein Zellbulging. Dabei passen sich vor allem der Zellen der Zone 3 dem Verlauf des Kollagenfaserbulgings an. Auch dieses Bulging ist in seiner seitlichen und zur Tide Mark gerichteten Ausdehnung um so ausgeprägter, je höher die Last ist (Abbildung 21).

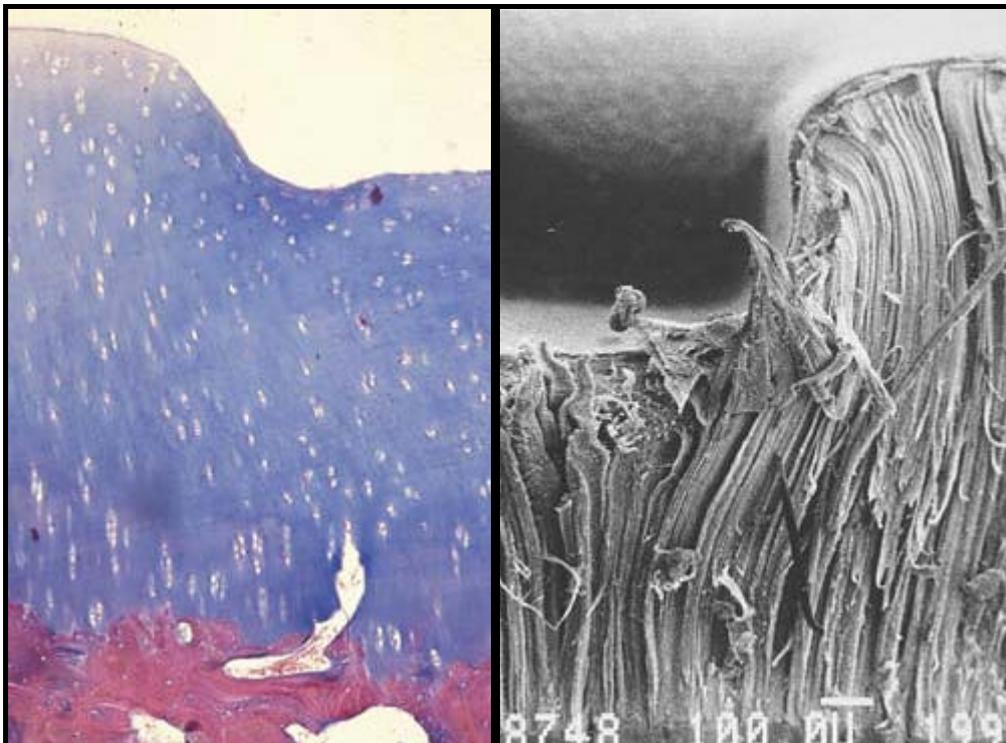


Abbildung 21: Lichtmikroskopie links und Rasterelektronenmikroskopie rechts: Bulging der Zellen (links) und entsprechendes Bulging der Kollagenfasern (rechts) um die Impression bei hoher Last (280g/ 20 min) und defekter Oberfläche.

6 Diskussion Material und Methoden

6.1. Materialgewinnung

Wir wählten Rinderhüftköpfe als Probenmaterial, da dieses in ausreichender Menge und Frische gut zu beschaffen ist. Zum anderen ergab sich hieraus die Vergleichsmöglichkeit mit den Beobachtungen (REM) von Glaser (Glaser et al. 2002) am gleichen Material. Die Altersspanne wurde auf 4 bis 10 Jahre festgelegt, da hier die zonale Gliederung zum einen schon ausgereift ist (Fischer et al. 1988), zum anderen bei einem Alter größer 10 Jahre fast regelhaft makroskopische Knorpelalterationen wie Rauigkeiten, Verfärbungen oder Knorpelverlust auftreten. Das Körpergewicht allein ist zwar kein zuverlässiger Index für die Ausreifung (Masoud et al. 1986), ist aber wichtig für die vergleichbare Krafteinwirkung auf das Hüftgelenk, da die Knorpeldicke durch die Dicke der subchondralen Platte mit der auf sie einwirkenden Last korreliert (Eggli et al. 1988, Milz et al. 1995). Die Kühlung auf eine Innentemperatur von höchstens +7°C nach FIHV Anlage 2a, 2.4 reduziert enzymatische Aktivitäten. Die ständige Benetzung mit 0,9% NaCl verhindert etwaige trocknungsbedingte Artefakte (Zimmerman et al. 1988). In der Oberflächenqualität unterschieden wir intakte von primär arthrotischen Oberflächen. Die Kriterien ergaben sich aus allgemein anerkannten makroskopischen Arthrosekriterien (Aufrauhung, Auffaserung, gelbliche Verfärbung, Abstumpfung (siehe auch Kapitel 2).

6.2. Probengewinnung

Das Entnahmeareal wurde anhand von Voruntersuchungen gewählt, in denen Stellen vergleichbarer subchondraler Knochendichte definiert wurden (Glaser et al. 2002). Die Verteilung der subchondralen Dichte kann als Ausdruck der Anpassung an die Langzeitbeanspruchung angesehen werden (Müller-Gerbl et al.1989, Oberländer et al. 1973). Daher konnten wir die Proben als Probenzylinder mit vergleichbarer vorausgehender Langzeitbeanspruchung ansehen. Desweiteren konnten wir schon bei der Versuchsplanung, wie später in den Ergebnissen bestätigt, vergleichbare Knorpeldicken annehmen, nachdem Oberländer et al.(1973) gezeigt hat, daß eine positive Korrelation zwischen Knorpeldicke und

subchondraler Dicke für das Hüftgelenk besteht. Durch die Auswahl der Rinder nach einer vergleichbaren Masse wurde dem Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und Körpergewicht Folge geleistet (Simon 1970).

6.3. Methoden

6.3.1. Belastungsdesign

6.3.1.1. Belastung

Eine Belastung durch Druckstempel der Fläche $1 \times 4 \text{ mm}^2$ mit der Masse 160g bzw. 280g entspricht einem Druck von 0,39MPa bzw. 0,68MPa. Dieser Druck wurde in Relation zur physiologischen Belastungsverhältnissen im Gelenk gewählt. Nach Fritz (1975) ergibt sich unter der Vorstellung sich ausgleichender Drehmomente durch gehaltenes Gewicht und haltende Muskulatur an einem idealisierten halbkugeligen Femurkopf ein Druck auf dem Standbein beim Schritt des Rindes von 0,5MPa. Höhere Drücke ergeben sich beispielsweise beim Galopp des Rindes. Solche „dynamischen“ Drücke können anhand der Untersuchungen von Bergmann et al.(1990) an einem menschlichen Hüftprothesenmodell abgeschätzt werden. Wir wählten dementsprechend einerseits einen niedrigeren, zum anderen einen höheren Belastungsdruck (vergleiche auch Putz und Fischer 1989). Andere Studien orientieren sich am physiologischen Druck, indem eine maximale surface-to-surface Kompressionsrate von 15% der Knorpelfläche aufgebracht wird (Armstrong et al. 1977, Guilak et al 1995). Torzilli et al. (1997) verwendet am Hunde- Humeruskopf neben cyclisch aufgebrachtem Druck auch statische Drücke von 0,5MPa bis 24 MPa. Dabei entsprechen die Drücke kleiner 5 MPa denen der unteren Extremität im Stand (Kurosawa et al. 1980). Zur Möglichkeit der Einschätzung einer statischen Kraft von 0,5MPa sei angemerkt, daß sich bei statischer Belastung stärkere Deformationen und in ihren Auswirkungen metabolisch ungünstigere Folgen ergeben als bei zyklischer Belastung mit entsprechenden Entlastungsphasen (Torzilli et al. 1997 am Humeruskopf des Hundes). Bei zyklischer Kraftwirkung kleiner 0,5MPa fand man eine gesteigerte Biosynthese (Parkinnen et al. 1989 in Torzilli et al. 1997). Bei Kraftwirkung ab 5MPa zyklisch werden Nekrosezeichen gefunden (Chen et al. 2001). Ab 6 MPa wurde eine

gesenkte Stoffwechselaktivität und ab 35MPa Zerstörung des Knorpels beobachtet (Clemets et al. 2001).

Bachrach et al. (1995) führt seine Studien an Knorpel-Knochen-Scheiben in einer confining chamber bei 0,1MPa für 10 min bzw. 20 Stunden durch, um die bimodale Antwort des Knorpels sicher zu erfassen, wobei 20 Stunden Belastung unphysiologische Verhältnisse darstellen. Wir wählten die Dauer der Belastung mit 20 min bzw. 1 min anhand der Dynamik der Antwort des Knorpels auf Belastung. Diese besteht aus einer initialen elastischen Deformation, die von den Kollagenfasern bestimmt wird (solide Phase) (Jurvelin et al. 1988, Bader, Kempson et al.1994, Kim et al.1995) und einer „fluid phase“ mit Flüssigkeitsausstrom durch die widerstandsleistenden Proteoglyken-Kollagen-Matrixporen (= creep) (Mow et al.1984). Das creep-Verhalten verläuft zeitlich als asymptotische Kurve, mit maximaler Deformierung in den ersten 100 sec. Dabei steigt der generierte hydrostatische Druck an, bis er mit der äußeren Kraft im Gleichgewicht steht. Dann endet der Flüssigkeitsausstrom. Die maximale Höhenabnahme ist erreicht nach 15 bis 20 min (Athanasίου et al. 1991, Setton et al. 1993). An diesem Gleichgewichtszustand orientierten wir uns mit unserem 20 min Wert. Um die frühe „solid phase“ und die Besonderheiten bei beschädigter Oberfläche zu erfassen - da hier Permeabilität und konsekutiv „creep“- (= Flüssigkeitsausstrom) Geschwindigkeit stark ansteigen (Setton et al. 1993) - nahmen wir einen 1 min Wert hinzu. Dieser liegt in dem Bereich der asymptotischen Creep-Kurve, in dem die Steigung in erster Näherung linear verläuft und maximal ist. Eine unserem 20 min Wert ähnliche Belastungsdauer findet sich auch bei Nötzli (et al. 1997), wobei er diese Spanne nicht als lang genug zum Erreichen eines Gleichgewichtes ansieht (Sah et al. 1995), ganz im Gegensatz zu Freeman et al. (1994).

Um die Zelle als dreidimensionalen Körper, und somit etwaige Volumenveränderungen, erfassen zu können wählten wir für die histomorphometrische Auswertung die oben beschriebenen zwei Ebenen: Hauptschnittebene und Kontrollebene.

6.4. Weiterverarbeitung

6.4.1 Histologie

Zur Darstellung der Knorpelzonen, ihrer Zellen und deren Größe und Orientierung genügt die Darstellung im Lichtmikroskop. Zur Entkalkung wurde eine schonende und schnelle Standardmethode herangezogen (Romeis, Mikroskopische Technik, 1989).

Die Stempelimpression wurde bewußt rechteckig und begrenzt gewählt. Damit befanden sich innerhalb desselben Präparates sicher belastete und sicher unbelastete Zonen. Diese sicher belasteten bzw. unbelasteten Zonen wurden durch Verwerfen der Rand- und Übergangszonen vor der Auswertung weiter definiert. Mit der Wahl eines begrenzten Lastwirkareals sollten auch etwaige Ausweichreaktionen erlaubt werden. In der Literatur werden seitlich begrenzte (Setton et al. 1993) und unbegrenzte (z.B. Guilak et al. 1995) Kompressionsversuche gleichermaßen beschrieben. Dabei werden begrenzte Kompressionen als der Situation in situ entsprechender angesehen. Unbegrenzte Kompression führt vermutlich zu größerer Deformation als in situ (Torzilli et al. 1997). Neben mechanischer Belastung in situ finden sich auch Versuche an Knorpelzellen in vitro (z.B. Freeman et al. 1994), sowie Versuche unter statischer (z.B. Wong et al. 1997), als auch dynamischer (z.B. Kim et al. 1994) Belastung. Die dynamische oder zyklische Belastung versucht dabei die natürlichen Belastungsvorgänge nachzuahmen. Die Fixierung nach oder unter statischer Belastung zeigt eine Momentaufnahme. Dabei finden sich erhebliche Unterschiede in der Reaktion des Knorpels auf statische und dynamische Belastung. Es wird beispielsweise unter statischer Last eine allschichtige und höhere Kollagendeformation und eine stärkere Höhenabnahme beschrieben (Kaab et al. 1998). Bezüglich der Aggrekansynthese wurde bei dynamischer Belastung eine Erhöhung, jedoch eine Abnahme bei statischer Belastung beschrieben (Ragan et al. 2000). Ergebnisse statischer und dynamischer Versuche am Knorpel müssen aus diesem Grund genau differenziert werden.

Die Azanfärbung als Standardfärbung für Knorpelgewebe bot eine sichere und einfache Färbemethode. Sie besitzt eine sehr gute Eignung zur Darstellung der Chondrozyten. Auch Bertram und Lierse wenden diese für ihre histologischen Schnitte an und beziehen sich wie wir auf Goldner und Hale (in Romeis: Mikroskopische Technik, 1968). Andere Studien benutzen daneben je nach zu erzielender Aussage Safranin-O (zur Proteoglykandarstellung) oder HE-Färbung (Zimmermann et al. 1988). Auffällig bei unserer Versuchsreihe war ein bisweilen fehlendes Ansprechen auf die Färbung bei starker Belastung und beschädigter Oberfläche (Abbildung 22).

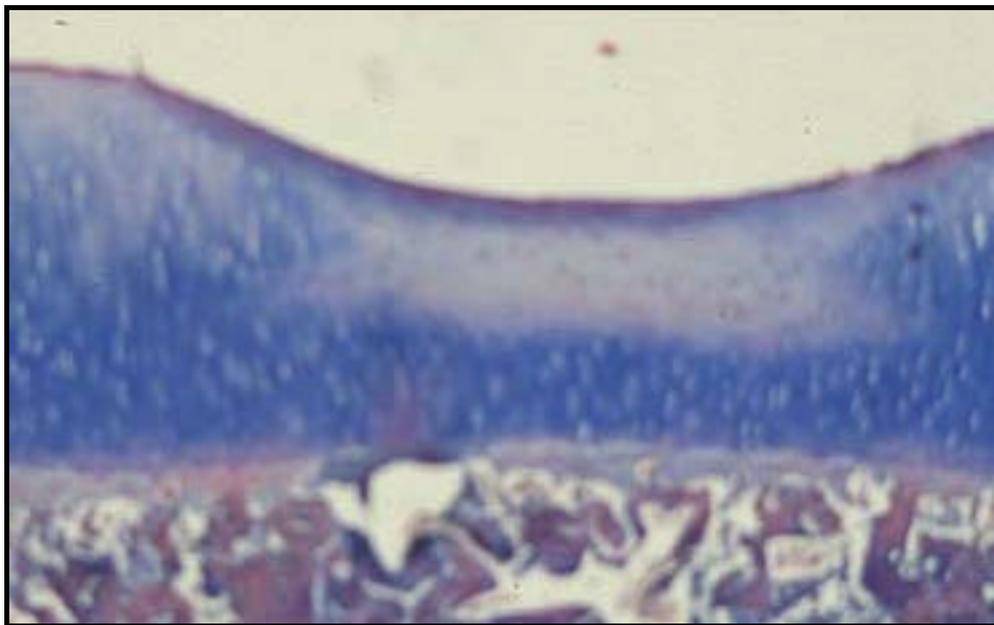


Abbildung 22: Fehlende Azan - Anfärbbarkeit direkt unter der Impression. Die zellulären Strukturen sind klein. Häufig besteht die Zelle nur noch aus Zellkern und ist nur anhand dieses als Zelle zu identifizieren. Oft finden sich auch nur leer erscheinende Knorpelhöhlen.

In diesen Fällen stellte sich die Knorpeloberfläche wannenförmig gräulich und aufgewellt dar, mit leer erscheinenden Knorpelhöhlen. Zellkerne waren nicht darstellbar. Direkt unter der Knorpeloberfläche bei hoher Laststufe fand sich manchmal eine bis mehrere 10µm breite Zone, mit azellulärem Erscheinungsbild oder welligen, leeren Zellhöhlen oder Zellresten. Sollte es sich hier nicht um Artefakte, sondern um maximal komprimierte Zellen gehandelt haben, konnten wir sie methodisch bedingt nicht erfassen. Da wir nur exakt angefärbte Präparate zur Auswertung heranzogen, die diese Auffälligkeiten nicht aufwiesen, wichen wir diesem Problem aus. Gegebenenfalls sind die Ergebnisse zur Zelldichte für hohe Belastungen

genauer zu erfassen, indem der direkt der Impression anliegende Tangentialzonenanteil gesondert betrachtet wird.

Shapiro (et al. 1993 in Fig. 10-C, Safranin O) präsentiert in seiner Studie zur Reparatur von Knorpelschäden ähnliche Bilder. Auch hier finden sich Änderungen des Färbeverhaltens in der oberflächlichen Zone mit welliger Formation der Oberfläche und fehlenden Zellkernen, im Gegensatz zum angrenzenden Originalknorpel. Safranin O stellt bevorzugt Proteoglykane dar. Dasselbe Färbeverhalten beschreibt Ohno (et al. 1988) bei der Chondromalazie als „unevenly staining matrix“. Er bezieht dies auf einen Proteoglykanverlust, welcher direkt um die Chondrozyten herum am ausgeprägtesten ist. Auch eine Abnahme der Toluidin- und Rutheniumfärbbarkeit wurde bei der Untersuchung der Mikroanatomie der Osteoarthrose beschrieben. Die verminderte Färbbarkeit hier geht einher mit Schwellung und Auseinanderweichen der zellulären Mikroumgebung. Neben einer vermehrten Teilung und Clusterung der Chondrozyten finden sich dabei auch ein Verlust fibrillärer Architektur und Entwicklung einer engen Glykokalix um die Zellen herum (Poole et al. 1992).

6.4.2. Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie bietet eine einfache und sichere Methode zur Darstellung der Kollagenfasern. Aufgrund der reliefartigen Bruchfläche lässt sich die Orientierung der Fasern so ganz besonders gut erkennen. Bei der TEM (Transelectronenmikroskopie) als Alternativmethode lässt sich der Faserverlauf aufgrund der sehr geringen Schnittdicke schwer verfolgen und es kann zum Informationsverlust kommen (Broom et al. 1986).

Die Proben wurden von der Knochenseite mit einem N₂- gekühlten Skalpell auf gekühlter Unterlage quer zur Impressionslängsachse gebrochen. Ein rascher Ablauf des Brechens ist zur Verhinderung einer Antauung während des Bruchvorganges entscheidend. Die Bruchrichtung von der Knochenseite her ist vorzuziehen, da bei nicht gekühlter (sonst bis 100% Klingenschleiß) Skalpellklinge Antauvorgänge der Schichten direkt im Auflagebereich auftreten können.

6.5. Auswertung

Bei allen unseren Betrachtungen stellen wir als erstes intraindividuelle Vergleiche zwischen belasteten und unbelasteten Arealen innerhalb des jeweiligen Präparates und dann innerhalb der Präparategruppe an. Der unbelastete Präparatanteil gibt uns dabei Auskunft über die normale Morphologie. Wir gehen dabei von der klassischen zellmorphologischen zonalen Architektur des Gelenkknorpels aus. So können wir Veränderungen im direkten Vergleich exakter erfassen, um Folgerungen für den theoretischen Ablauf selbiger in einer umfassenden Sichtweise erzielen zu können. Eventuelle präparationsbedingte Artefakte, die dann sowohl be- als auch unbelasteten Bereich gleichermaßen betreffen, können so egalisiert werden. Aufgrund dieser Basis wollen wir dann fortschreiten zu interindividuellen Vergleichen zwischen den einzelnen Oberflächen- und Belastungsgruppen. Dabei erfolgt zuerst ein Vergleich der einzelnen vorgefundenen Veränderungen mit bisher beschriebenen Befunden aus der Literatur. Danach werden Abweichungen oder Übereinstimmungen diskutiert. Schließlich folgt eine Eingliederung unserer Ergebnisse in das Gesamtkonzept der Morphologie, Biomechanik und Pathologie des Knorpels.

Langzeitadaptionen des Knorpels wie sie in situ auftreten werden, können wir dabei nicht erfassen (allenfalls ansatzweise bei Betrachtung der arthrotischen Präparategruppen), denn eine statische Belastung, wie wir sie verwenden und in unseren belasteten Zonen beschreiben, stellt eine Momentaufnahme dar, die nur dazu dienen kann, momentane Belastungsfolgen zu erfassen.

6.5.1 Histologie (Lichtmikroskopie, LM)

Die histologische Auswertung erfolgte computergestützt mittels eines selbst konfigurierten und programmierten Algorithmus mit dem VIDAS-Bildanalyseprogramm Kontron 400 ®. Dieses bietet die Möglichkeit der benutzerdefinierten Auswertung eines histologischen Präparates. Damit konnte eine genau auf unsere spezifische Fragestellung adaptierte Auswertung erzielt werden.

6.5.1.1 Zellparameter: Zonale Zelldeformation und Zellorientierung

Bei der Betrachtung der Zelle als Ellipsoid ergab sich das Problem, aufgrund der naturgemäß auch unregelmäßig runden Zellform (z.B. spindelförmige Zelle) den kleinsten und größten Zelldurchmesser exakt festzulegen. Als konstanterer und zuverlässigerer Wert erwies sich die Betrachtung der Zelle und ihrer Ausdehnungen durch Umrahmung in einem yx -Koordinatensystem. Zwar bestünde auch die Möglichkeit, Aussagen zur Zellfläche und zur Zelldeformation über die große und kleine Zellhauptachse zu erfassen, es hat sich aber in Vorversuchen gezeigt, daß das xy -System zuverlässiger ist. Daher liegt bei der Diskussion der Ergebnisse unser Hauptaugenmerk auf den durch das xy -Koordinatensystem bestimmten Werten. Ein solches Koordinatensystem wendet bei einer *in vitro* Studie auch Freeman (et al. 1994) an. Ebenfalls anhand der Deformation senkrecht (x) und parallel (y) zur Kompressionsachse beschreibt Lee (et al. 1995) die Zellform *in vitro*, wobei er zusätzlich einen Deformationsindex $I = y / x$ verwendet. Wir fanden, daß diese Parameter die größte Aussagekraft beinhalten und sich aus ihrem Produkt eine gute Annäherung für die Zellfläche, bzw. unter Hinzunahme der 2. Ebene auf das Zellvolumen, erfassen lässt. Zudem sind die yx -Werte eindeutiger in ihrem Verlauf zur Wirkrichtung der Last zu zuordnen. Diese verläuft senkrecht zur Knorpeloberfläche und damit in y -Richtung. Die Messungen in einem Koordinatensystem sind desweiteren gut reproduzierbar.

6.5.1.2. Zonale Zelldichte

Die zonale Zelldichte als Zellzahl pro definierte Auswertefläche zu betrachten erwies sich als praktisch und gut anwendbar. Ein ähnliches Vorgehen der Bestimmung der Zelldichte durch Auszählen der absoluten Zellzahl pro Flächeneinheit wenden auch Rother et Ranke (et al. 1990) an. Ebenfalls auf die numerische Zelldichte in einem Referenzrahmen bezieht sich Wong (et al. 1996). Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Zelldichte besteht durch Ermittlung des Abstandes zwischen zwei Chondrozytenhöhlen (Bertram, Lierse et al. 1991). Für uns erwies sich ersteres Vorgehen als praktischer. Jedoch trat bei Belastung hier zuweilen das Problem auf, daß in der belasteten Zone entweder durch unten beschriebene Farbealterationen oder durch maximale Kompression nur noch flache, oft wellige, Zellhöhlen zu erkennen waren, die jedoch auch als Artefakte gedeutet werden konnten, so daß sie nicht als Zelle in der Auszählung berücksichtigt werden konnten. Diese Zellhöhlen fanden sich in einer wenige $10\mu\text{m}$ breiten Zone direkt unterhalb der belasteten Knorpeloberfläche. Oft fand

sich hier auch eine praktisch azelluläre Zone. Diese beiden Phänomene beschreibt auch Mitrovic (et al. 1983) in seiner Arbeit zur Zelldichte bei verschiedenen Oberflächen. Auch Eggli (et al. 1988) beschreibt eine reduzierte Anzahl von Zellprofilen in der obersten Knorpelzone.

6.5.1.3. Zonale Höhe und Gesamthöhe

Wir bestimmten die Gesamthöhe des Knorpels durch den Abstand der Oberfläche zur Tide Mark. Dies ist ein allgemein in der histologischen Auswertung übliches Vorgehen (Bertram, Lierse et al. 1991). Wir können zusätzlich noch zwischen unseren verschiedenen Oberflächengruppen vergleichen, da diese alle aus dem gleichen definierten Entnahmeareal stammen. Differenzen in der Gesamthöhe ergeben sich aus der Art des Gelenkes, dem Alter, Geschlecht und der Lasteinwirkung (Hedlund et al. 1993). Andere Verfahren zur Bestimmung der Knorpelhöhe orientieren sich ebenfalls an Oberfläche und Tide Mark, sei es an Photokopien von Gefrierschnitten (Eckstein et al. 1992) oder neuerdings auch in der MRT, die hochauflösend Knorpelzonen und die subchondrale Platte darzustellen vermag (Modl et al. 1991, Freeman et al. 1997).

Die meisten Studien zur Chondrozytenmorphologie in situ können sich darauf beschränken, aus den einzelnen Zonen einige typische Zellen zu untersuchen. Für sie ist es daher nicht wichtig, die einzelnen Zonen exakt abzugrenzen. Somit kommt es zu willkürlich festgelegten Zonengrenzen, die sich außer an der Zellmorphologie an prozentualen Anteilen der Gesamthöhe orientieren (Hedlund et al 1993, Mitrovic et al. 1983). Um die genaue zonale Höhe vergleichen zu können, mußten wir einen Weg finden, diese möglichst exakt zu bestimmen. Dazu wurden anhand der typischen Zellmorphologie sogenannte „sichere“ Zonenanteile festgelegt. Obergrenze der Tangentialzone bzw. Zone 1 und Untergrenze der Zone 3 oder Radialzone ergaben sich aus Oberfläche und Tide Mark. Zwischen Zone 1 und 2 sowie 2 und 3 lag jeweils eine Übergangszone ohne eindeutige Vorzugsrichtung in der Zellanordnung. Diese Übergangsbereiche betragen wenige 10µm. Sie wurden keiner Zone zugeschlagen. Beim Vergleich der Addition der einzelnen Zonenhöhen mit der Gesamthöhe ergibt sich daher eine gewisse auswertungsbedingte Diskrepanz von mehreren 10µm. Diese beeinträchtigt jedoch angesichts der Knorpelgesamthöhe im Bereich von 1000µm die Aussagen der Ergebnisse zur zonalen Deformation nicht.

Beim weiteren Vergleich der Zonen mußte stets beachtet werden, daß die Zone 1 im oberflächenbeschädigten Präparat ihrem Zellursprung nach der natürlichen Zone 2 entspricht, dem Lasteinwirkungsgrad nach jedoch der Zone 1, nämlich der direkt an die Last grenzenden Zone. Dadurch wurden wir veranlaßt, schließlich jeweils die oberen Knorpelzonen 1 und 2 gemeinsam als Zone (1+2) zu betrachten. Dies entspricht auch dem Bild einer funktionell zusammengehörigen „oberen Zone“ (Glaser et al. 2002). Viele Studien, die zwischen normalem und oberflächenbeschädigtem Knorpel vergleichende Studien anstellen, konnten dies methodisch bedingt nicht berücksichtigen (z.B. Mitrovic et al. 1983; Bertram, Lierse et al. 1991).

6.5.2. Statistische Auswertung

Die Methode des GLM (general linear model) hat vor allem einen hypothesenerzeugenden und explorativen Charakter (Deuffner, Jensen, Schuhmacher et al. 1992). Für unsere übergreifenden Untersuchungen vieler Einflußfaktoren in einer Arbeit ist sie jedoch ideal. Die verwendete statistische Methode zielt darauf ab, als signifikant nachweisbare Einflußfaktoren heraus zu arbeiten. Anschließend können die signifikanten Einflußfaktoren dann in ihrer Art und Quantität weiter differenziert werden.

Voraussetzung für die Anwendung des GLM war eine Normalverteilung der gefundenen Ergebnisse, diese war ausnahmslos vorhanden. Es konnten pro Gelenk mehr als ein Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen werden, ohne die statistische Aussagekraft zu beeinträchtigen. Dies wurde durch die Auswahl der Gelenke nach als vergleichbar anzunehmender Größe, Alter und Gewicht des Tieres ermöglicht.

7 Diskussion der Ergebnisse

Im Unterschied zu bisherigen Arbeiten wurden in dieser Arbeit die zellulären Elemente des Gelenkknorpels unter akuter mechanischer Belastung mit z.T. defekter Oberfläche in situ betrachtet. Dabei wurde besonders die zonale Einteilung des Gesamtknorpels beachtet. Der Gelenkknorpel, in Form von Knorpel- Knochen- Zylindern aus dem Rinderhüftkopf, wurde bei verschiedenen Oberflächenzuständen seitlich partiell begrenzt statisch belastet. Hiermit soll eine Brücke geschaffen werden zwischen vorangehenden Arbeiten. Zum einen beschäftigten sich frühere Arbeiten mit den Auswirkungen einer Deformation auf die Chondrozyten in ihrer Form und ihren biomechanischen und signaltransduktorischen Eigenschaften sowie ihres Zytoskelettes. Zum anderen beschäftigte man sich mit den Auswirkungen einer Oberflächenveränderung auf die Deformation des Knorpels. Das Augenmerk dieser Arbeit als bindendem Glied zwischen beiden Ansätzen liegt auf den Auswirkungen einer Oberflächenveränderung des Knorpels auf die Deformation der zellulären Elemente des Knorpels bei Druckbelastung.

7. 1. Morphologie der Zellen und Zonen

7.1.1. Zellparameter

Das klassische Zellbild von flachen Tangentialzellen, runden Transitionalzellen und gestreckten Radiärzellen finden wir nur in unseren entsprechenden Zonen 1, 2 und 3 bei intakter Oberfläche. Hier liegt die Betonung der Zellachsen x (oberflächenparallel) und y (senkrecht dazu) in der Tangentialzone auf der x -Achse. In der Transitionalzone sind beide Achsen etwa gleich groß. In der Radiärzone schließlich ist die y -Achse deutlich betont.

In den oberen Zonen defekten und arthrotischen Knorpels dominieren eher runde Zellen. Die runden Zellen der Zone 1 defekt unbelastet entsprechen damit erwartungsgemäß den Zellen der Zone 2 bei intakter Oberfläche, also klassischen Transitionalzellen. Dies bestätigt den Erfolg unserer Abtragung der Tangentialzone. Die Radiärzonenzellen aller Oberflächen entsprechen den Erwartungen einer betonten y -Achse.

Die Zellhöhe, entsprechend unserer y-Achse, in situ bei Guilak, Ratcliffe and Mow (1995) liegt in Zone 1 bei $4,8\mu\text{m}$, in Zone 2 bei $14,9\mu\text{m}$ und in Zone 3 bei $12,2\mu\text{m}$. Ihre Breite, entsprechend unserer x-Achse, zeigt bei diesen Autoren eine Abnahme von ca. $15\mu\text{m}$ auf $13\mu\text{m}$ im Verlauf über die Tiefe des Knorpels. Auffällig ist, daß die hier zitierte Zellbreite in etwa mit unserer übereinstimmt, unsere Höhe jedoch nur in Zone 2 übereinstimmt. Außerdem finden wir in der Radiärzone die größten Werte. Dies kann am unterschiedlichen Untersuchungsmaterial (Hüftkopf Rind vs. Femurkondylus Hund) liegen. Allerdings zeigen die zugehörigen Volumenwerte dieser Untersucher dasselbe tendenziöse Verhalten. Hingegen geben andere Untersucher (Brighton et al. 1984: Femurkondylus, Hase; Wong et al. 1996: Schulter, Rind) ein deutlich von tangential nach radiär zunehmendes Zellvolumen an. Da wir (s.u.) letzteres bestätigen können, gehen wir von materialbedingten Schwankungen aus.

Die angenäherte Zellfläche aus der yx -Rahmenfläche liegt in Zone 1 intakt ($120\mu\text{m}^2$) geringer als bei den anderen Oberflächen ($200\mu\text{m}^2$). Zone 2 (ca. $200\mu\text{m}^2$) ist bei allen Oberflächen vergleichbar. Zone 3 bei arthrotischer Oberfläche zeigt größere Zellen ($280\mu\text{m}^2$) als bei intakter und defekter Oberfläche ($220\mu\text{m}^2$). Wir können damit bestätigen, daß die Zellgröße von tangential nach radiär ansteigt (Brighton et al. 1984, Aydelotte et al. 1985). Die obersten Zellen der abgetragenen Oberfläche entsprechen auch hier wieder den Zellen der Zone 2 der intakten Oberfläche, wie wir es erwartet haben.

Zu diskutieren ist die im Vergleich größere Zellfläche der unbelasteten arthrotischen Proben in den Zonen 1 und 3. In der Radiärzone fanden wir eine korrespondierende zonale Dickenerhöhung. Es kann zur Erklärung herangezogen werden, daß die Radiärzellen bedingt durch eine vermehrte Matrixproduktion und Stimulation größer sind. Wir fanden zudem eine geringere Zelldichte als bei intakten Proben. Schon bei normalem Knorpel ist die Dickenerhöhung einer Zone ein Zeichen vermehrter metabolischer Aktivität. Die erhöhte Zellfläche in Zone 1 kann ebenfalls auf erhöhte metabolische Aktivität hinweisen. Sie kann auch im Rahmen von Anpassungs- /Reparaturvorgängen gesehen werden. Das stimmt mit Befunden in anfänglichen Stadien der Osteoarthritis überein. Auch hier ist die Knorpelgesamtdicke anfänglich erhöht. Die Chondrozyten versuchen durch Umstellung der Syntheseleistung die Matrix aufrecht zu erhalten. Eine zelluläre Antwort in Form anaboler aber auch kataboler Effekte bildet sich aus (Buckwalter and Mankin 1997).

Seitlich unbegrenzte Kompression im physiologischen Rahmen führt zu Abnahme der Zellhöhe, des Zellvolumens, sowie von Kernhöhe und Kernvolumen bei Zellen aus mittleren Knorpelzonen (Guilak et al. 1995, 2000). Der Abnahme der Zellhöhe entspricht im Koordinatensystem einer Deformierung in y-Richtung. Dies können wir bei beschädigter Oberfläche, sei sie arthrotisch oder abgetragen, vor allem in der Zone 1, aber auch in Zone 2 bestätigen. Bei intakter Oberfläche ist diese Stauchung geringer ausgeprägt. Wie wir findet Guilak (et al. 1995) in keiner Zone signifikante Veränderungen der seitlichen Zellausdehnung, also der x- Achse. Buschmann et al. (1996) beschreibt bei statischer Belastung eine Abnahme von Zell- und Zellkernvolumen in Richtung der einwirkenden Kraft ohne signifikante Veränderungen senkrecht zur Lastrichtung. Des weiteren finden diese Autoren, daß Zelldeformation und Veränderungen der Gesamthöhe in Einklang stehen.

Bei Betrachtung des Chondrozyten und seiner Umgebung als funktionelle Einheit (Chondron) erwartet Poole (et al. 1997) vertikale Kompression und laterale Deformation unter Bewahrung des Oberflächenareals. Wir finden unter mechanischer Belastung vor allem vertikale Kompression und eine Flächenverminderung. Da diese Flächenverminderung von uns in beiden untersuchten Schnittebenen vorgefunden wird, können wir auf eine Verminderung des zellulären Volumens schliessen. Freeman (et al. 1994) vermutet an isolierten Zellen eine Volumenverminderung unter Streß, konnte dieses anhand einer fehlenden zweiten Ebene allerdings nicht sicherstellen. Wie wir an den verminderten Flächen aus den x-y-Achsen feststellen konnten und mit einer zweiten Ebene bestätigt fanden, scheint Freemans Vermutung zuzutreffen. Komprimierte Zellen sind ihr Volumen betreffend kleiner. Direkt unter der belasteten Knorpeloberfläche finden wir kleine Zellen mit reduzierter y-Achse und Zellfläche. In Einzelfällen scheinen die Chondrone nur noch aus Zellkernen zu bestehen. Da zumindest bei intakter Oberfläche sämtliche Veränderungen reversibel sind, wie es auch Broom and Myers (et al. 1980) beschreiben, scheint es uns naheliegend, nicht nur für zonale Veränderungen (s.u.), sondern auch für zelluläre Veränderungen Flüssigkeitsbewegungen verantwortlich zu machen. Poole (et al. 1997) schließt aus oben angeführten Annahmen auf steigenden intrachondronalen Druck und konsekutiv Wasserverschiebungen, Mikrozirkulation und Strömungspotentialen, die dann Transporteigenschaften für synthetisierte Matrixvesikel übernehmen. Poole et al. (1983) meint, daß bei einem unter Kompression geratenen Chondron die Zelle an sich, ihre perizelluläre Matrix, die territoriale und interterritoriale Matrix synergistisch funktionieren. Die vorwiegende Mechanismus sei dabei der Ausgleich osmotischer Druckpotentiale durch Flüssigkeitsströmungen. Auch Guilak et al. (1995) erklärt

die unter Kompression vorgefundene Volumenabnahme auf diese Weise. Ihm zufolge verursacht Kompression eines Knorpelareals die Exsudation von interstitieller Flüssigkeit mit konsekutiver Steigerung der Ladungsdichte. Ausserhalb des Chondrozyten steigt so der osmotische Druck (Maroudas et al. 1979). Da die zelluläre Membran für Wasser permeabel ist, kommt es zum Flüssigkeitsaustrom aus der Zelle und zur Verkleinerung des Zellvolumens. Diese Argumentation wollen wir aufgreifen, sie erklärt unsere Ergebnisse sehr gut. Wir nehmen an, daß es bei mechanischer Belastung nach der initialen isovolumetrischen elastischen Deformation als Funktion der Kollagenfasern (Jurvelin et al. 1988) auch in der unmittelbaren zellulären Umgebung zum „Creep“ kommt. Bei Entlastung scheinen diese Vorgänge in umgekehrter Richtung zu erfolgen. Die Reversibilität der Veränderungen des Zellvolumens bei den intakten Proben läßt sich so sehr gut nachvollziehen. Nach der Diskussion des zugrundeliegenden Mechanismus für die Abnahme des Zellvolumens müssen nun noch die Gründe für die vermehrte Deformation bei defekter Oberfläche und auch bei arthrotischer Oberfläche beleuchtet werden.

Bei 15% Kompression (strain) finden Guilak, Ratcliffe and Mow (1995) die größte y-Achsen- Deformation in der Tangentialzone. Dies können wir bestätigen, allerdings finden wir keine Deformation in der Radiärzone. Auch Smith et al. (1995) beschreiben die radiären Zellen als fast inkompressibel. Deutlich jedoch ist die Abhängigkeit der Deformation der y-Achse in Lastrichtung von einer intakten Oberfläche.

Wir sehen eine deutlich größere Deformierung der Absolutwerte der y-Achse in den Zonen 1 und 2 für defekte und arthrotische Proben als bei intakten Proben. Auch Veränderungen der Zellflächen (bzw. Hinweise auf ein gleichartiges Verhalten des zellulären Volumens bei Hinzunahme der Kontrollebene) sind bei defekten und arthrotischen Proben deutlicher ausgeprägt. Bezüglich der arthrotischen Oberfläche ist bekannt, daß osteoarthrotische Zellen andere viskoelastische Eigenschaften als normale Zellen besitzen, dies sei bedingt durch veränderte Eigenschaften des Zytoskelettes (Trickey et al. 2000). Osteoarthrotische Zellen besäßen auch veränderte Volumenregulationsfähigkeiten in Antwort auf mechanische Last. Unter unserer Annahme der Flüssigkeitsbewegungen bzw. des Wasseraustromes aus der Zelle und Wiedereinstromes bei Entlassung könnten sich diese Veränderungen bei Osteoarthrose in Richtung auf einen größeren Volumenverlust auswirken. Manche Autoren beschreiben eine löchrige Zellmembran bei arthrotischen Zellen (Chen et al. 2001). Auch dadurch kann ein erhöhter Flüssigkeitsausstrom bei arthrotischem Knorpel bedingt sein.

Bei den defekten Proben mit künstlich abgetragener Oberfläche kurz vor Belastung kann dies nicht zur Erklärung herangezogen werden. Da die Zellen der defekten Proben vor Abtragung der Oberfläche unter einer intakten Oberfläche lagen, können diese langfristigen Adaptationsvorgänge für sie nicht zutreffen. Hier muß ein erhöhter Flüssigkeitsausstrom und damit die Volumenabnahme anders bedingt sein. Vorstellbar wäre zum einen, daß die einzelne Zelle bei defekter Oberfläche wegen deren fehlender Lastverteilungsfunktion einfach mechanisch vermehrt komprimiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Zelle bei defekter Oberfläche in die Flüssigkeitsbewegungen der Matrix (s.u.) vermehrt eingebunden wird. Dies kann auch bedeuten, daß stärkere osmotische Druckpotentiale generiert werden, die durch größeren Flüssigkeitsausstrom aus der Zelle ausgeglichen werden müssen. Da die Zellen der Zone 1 bei defekter Oberfläche ursprünglichen Zone 2 Zellen bei intakter Oberfläche entsprechen, kann die vermehrte Volumenabnahme bzw. Deformation in y-Richtung auch auf diese ursprünglich andere Herkunft der Zelle bezogen werden. Die Zelldeformation wird als abhängig von der zonalen Subpopulation der Zelle beschrieben (Zanetti et al. 1985, Aydelotte et al. 1988) . So haben Zellen verschiedener Höhenlokalisation im Knorpel andere intrinsische mechanische Eigenschaften. Man geht weiter davon aus, daß der Faktor der Antwort auf mechanische Belastung die Art und Menge der second messenger und folgend Art und Menge der Produktion einer Zelle mitbestimmen (Guilak et Mow, 1992). Dies erscheint in Anbetracht örtlich verschiedener typischer und notwendiger Syntheseleistung sinnvoll. Gegebenenfalls könnte man damit das Ausmaß der Deformation gleichzeitig als einen Hinweis für die Zelle ansehen, in welcher Art und Weise die Syntheseleistung gelenkt werden muß, um weiterer Belastung standzuhalten. Dabei wäre die ursprüngliche Höhenlokalisation bzw. Subpopulation allerdings zweitrangig, in diesem Fall könnte sich jede Zelle jeder Produktionsnotwendigkeit anpassen und dies würde gesteuert durch das Ausmaß der Deformation.

Eine Abstufung der Veränderungen nach Größe und Dauer der Last ist unseren Ergebnissen zufolge mindestens bei intakter Oberfläche vorhanden, hier scheint die Deformation bei höherer Last stärker. Auch für diesen Fall kann die eben oben genannte Argumentation valide verwendet werden.

7.1.2. Zelldichte

In menschlichen adulten Knorpel ist die Zelldichte an der Knorpeloberfläche am größten. Sie nimmt mit zunehmender Tiefe im Knorpel ab (Stockwell et al.1971, Bertram et Lierse et al.1991, Stockwell et al. 1967, Mitrovic et al. 1983). Analoge Befunde zeigt die vorliegende Arbeit für den Gelenkknorpel des Rindes.

Unsere Zelldichtewerte sind im Vergleich mit Werten vom humanen Femurkopf (450 /mm² superfizial, Alter >40J) (Mitrovic et al. 1983) um den Faktor 10 (ca. 67,5mm²) deutlich kleiner. Allerdings gilt nach Stockwell (et al. 1971), daß Zelldichte und Knorpeldicke, sowie Körpergewicht, umgekehrt proportional zueinander stehen, sowie daß Knorpel kleiner Arten eine höhere Zelldichte aufweist. Ein Vergleich zwischen Spezies ist daher schwierig. Wir zählten pro Schnitt und Auswertefeld nur komplett dargestellte Zellen mit zentralem Kern, Mitrovic (et al. 1983) in seiner Studie jedoch alle vorgefundenen Zellkerne. Zellkernähnliche Strukturen waren direkt unter der Oberfläche durchaus vorhanden. Von uns wurden aber nur Strukturen erfaßt, die unserer Zelldefinition entsprachen. Bei Betrachtung der Vitalität der Zellen präsentiert Mitrovic dann auch Zelldichteunterschiede zwischen Alcian - positiven Zellen und ungefärbten Zellen die etwa dem Faktor 10 entsprechen. Dies könnte auch auf das unterschiedliche Ansprechen von Zellen bzw. Zellkernen oder Zellresten auf die Azanfärbung zurückzuführen sein und ebenfalls zu den vorgefundenen Diskrepanzen beitragen. Eggli (et al. 1988) findet eine beinahe totale Abwesenheit von Zellen im obersten Zehntel des lasttragenden Areals in Hasenfemurkondylen. Bei ihm handelt es sich allerdings um ein durch Langzeitadaptation hervorgerufenen Phänomen.

Ein weiteres Problem der Vergleichbarkeit entsteht aus unserer zweidimensionalen Betrachtung. Sowohl Stockwell (et al. 1971), als auch Wong (et al. 1996) plädieren für eine korrigierte, dreidimensionale Erfassung der Zellzahl, um dem Problem nur teilweiser Anschnitte zu entgehen. Zwar haben wir die Zellzahl in 2 verschiedenen Schnittebenen betrachtet, können daraus jedoch keine Zellzahl- pro- Volumen- Berechnung erzielen. Dazu benötigte man in beiden Ebenen identische Meßausschnitte.

Stockwell (et al. 1971) berichtet, daß die Zellzahl im unkalzifiziertem Knorpel unter einer Einheitsfläche der Knorpeloberfläche bei verschiedenen Knorpeldicken und regionalen Zelldichten relativ konstant sei. Weiter sei die Zelldichte bei kleiner Gesamthöhe größer, bei großer Gesamthöhe geringer. Uns beschäftigt daher nun das Phänomen der gleichbleibenden

Zelldichte bei verminderter Gesamtknorpelhöhe. Wie bei der Diskussion der zonalen Höhen zu sehen ist, nimmt die Radiärzone an Höhe ab, die oberen Zonen gewinnen hinzu. In der Radiärzone ist der Zell-Zell-Abstand am größten (Bertram and Lierse et al. 1991), so daß in unserem relativ kleinem Auswertefeld von $300\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$, ein verminderter Zellabstand, nicht unbedingt als vermehrte Zellzahl /Feld bemerkbar werden wird. Für die oberen Zonen haben wir eben einen Flüssigkeitseinstrom von radiär her postuliert. Damit würde eine zunächst erwartete Dichtezunahme durch „Creep“ aus der Tangentialzone in den Gelenkspalt ausgeglichen. Wie wir bei der Diskussion der Anhaltswerte für das Zellvolumen noch sehen werden, nimmt dieses ab, so daß wir auch noch einen Flüssigkeitsstrom von der Zelle in die Matrix postulieren können, der bei abnehmendem Zellvolumen ebenfalls für eine Bewahrung der Zell-Matrix- Relation und damit der Zelldichte sorgen sollte.

Wong (et al. 1997) beschreibt bei statischer Kompression erhöhte Zelldichte unter inhibierter Synthese. Er findet bei einer Kompression von 17% (etwa den physiologischen Verhältnissen entsprechend und damit unserer Situation vergleichbar) Zellzahlen in einem definierten Volumen von ca. $60.000/\text{mm}^3$ bis $40.000/\text{mm}^3$ in radiärer Richtung. Seine Zelldichte nimmt in zonenspezifischer Art mit zunehmender Kompression zu. Bei 52% Kompression, also weit größer als wir sie anwenden, findet Wong den größten Dichteanstieg in oberen Zonen, wogegen sich die Dichte in der unteren Radiärzone auch bei ihm nicht verändert. Wir könnten daraus die Folgerung ziehen, daß eine Zelldichtezunahme von der aufgebrachten Kompression abhängig sein muß. Man kann weiter folgern, daß die Zelldichtevermehrung bei Kompression von der Oberfläche beginnend zur Tide Mark fortschreitet. So könnten wir entweder unsere Last als zu gering ansehen, um eine Dichtezunahme zu erzielen, oder davon ausgehen, daß unsere Kompression vor allem die ganz zuoberst liegenden Knorpelanteile betroffen hat. Diese müßten dann so stark in ihrem sie tangential umschließenden Kollagenfasernetz komprimiert worden sein, daß es mit unserer Technik nicht mehr eindeutig zu beurteilen war, ob die Strukturen, die wir unter der Oberfläche angetroffen haben nicht doch komprimierten Zellen entsprochen haben. Wenn wir annehmen, daß die direkt wenige $10\ \mu\text{m}$ unter der Oberfläche bisweilen aufgefundenen welligen, an leere, flachgedrückte Zellhöhlen erinnernden Strukturen, stark komprimierten Zellen entsprechen, dann können wir eine starke Kompression und Dichtezunahme der direkt der Last anliegenden Knorpelanteile postulieren. Gegebenenfalls ist dann die Differenz der Zelldichte vor und nach Belastung verglichen auch so dicht unter der Oberfläche lokalisiert oder so geringfügig, daß methodisch

bedingt für Zone 1 keine abschließende Aussage zur Zelldichte möglich erscheint (siehe Diskussion Material und Methoden).

Eine verminderte Zellzahl ist ein charakteristisches Zeichen der Osteoarthrose (Chen et al. 2001). Bei stark erhöhter, lang andauernder Beanspruchung, z.B. in lasttragenden Arealen, findet sich (bei erhöhter Gesamtdicke) eine reduzierte Zellzahl. Dabei findet sich beinahe eine Abwesenheit von Zellen, vor allem in der superfizialen Zone. Kurz über der Tide Mark finden sich diesbezüglich keine Unterschiede (Egglı et al. 1988). Eine verminderte Zelldichte können wir mit unseren Zahlen für arthrotische Proben bestätigen. Dabei müssen wir allerdings eine stärker variierende Schwankungsbreite beachten. Eventuell wird dieses Phänomen durch unterschiedliche Arthrosegrade der verwendeten Hüftköpfe trotz makroskopischer einheitlicher Definition hervorgerufen. Eine Rolle dürfte auch die mit drei Exemplaren geringe Anzahl der arthrotischen Hüftköpfe spielen. Die Verminderung der Ausgangszellzahl betrifft bei unseren arthrotischen Proben alle Zonen. Diesbezüglich müssen wir im Hinterkopf behalten, daß Gesamthöhe und vor allem Radiärzone der arthrotischen Präparate dicker waren, als die der normalen. Das legt nahe, daß die Matrix bei arthrotischer Degeneration, bzw. erhöhtem auf sie wirkendem Streß regulativ vermehrt wird (siehe Kapitel 2). Der erhöhte Streß könnte dabei durch die fehlende oder verminderte Lastverteilungsfunktion der defekten Oberfläche zustande kommen. Bei gleichbleibender Zellzahl verminderte sich so die Zelldichte. Gegebenenfalls ist dieses Phänomen auch durch Schwellung im Sinne einer Wassereinlagerung bei osteoarthrotischem Knorpel bedingt.

Zur Clusterbildung (siehe Kapitel 2) und damit Erhöhung der lokalen Zelldichte kommt es erst bei einem Matrixverlust. Wir würden eine erhöhte Zelldichte in osteoarthrotischen Präparaten damit erst bei fortgeschrittenen Stadien erwarten.

Das Phänomen einer einfachen methodisch bedingten Quellung können wir hier, wie auch bei Betrachtung der zonalen Höhen, ausschließen. Handelte es sich bei der erniedrigten Zelldichte arthrotischer Proben um kurzfristigen methodisch bedingten Wassereinstrom mit konsekutiver Volumenvermehrung, sollten wir bei den artifiziell oberflächenbeschädigten defekten Proben gleiches finden. Auch würden wir bei Kompression ebenso einen kurzfristigen Wasserausstrom und damit eine Zunahme der Zelldichte erwarten, die wir jedoch nicht finden.

Mit unseren Ergebnissen können wir nicht die Befunde von Bertram und Lierse (et al. 1991) bestätigen. Danach finden sich im präarthrotischen und normalen Knorpel keine eindeutigen

Unterschiede bezüglich der Zelldichte. Diese Ergebnisse wurden allerdings indirekt berechnet aus dem Quotienten der Summe von Zellflächen und Referenzareal, letzteres wird bei 320-facher Vergrößerung im Photoabzug mit $25 \times 10,2 \text{ cm}^2$ angegeben (vgl. unsere Arbeit 100-fache Vergrößerung / $60 \times 300 \mu\text{m}^2$).

7.1.3. Zonale Höhe

Im unbelasteten Präparat fanden wir eine starke Abhängigkeit der Gesamthöhe des Knorpels von der nach ihrer Zellmorphologie definierten Radiärzone. Die Höhe des Gesamtknorpels wird anscheinend im wesentlichen von der Höhe der Radiärzone bestimmt. Die Knorpeldicke ist physiologischerweise sowohl ein Ausdruck der Langzeitbeanspruchung (Eckstein et al. 1992, Milz et al. 1995), als auch eine Funktion der dynamischen Belastung (Adam et al. 1998). Sie ist ebenfalls Ausdruck des hydrostatischen Druckes, der auf seine Oberfläche einwirkt (Carter et al. 1987). Der hydrostatische Druck verhindert das Fortschreiten der Kalzifizierungsfront in Richtung Oberfläche. So wird garantiert, daß eine dem Anspruch angemessene nicht kalzifizierte Knorpelzone vorhanden ist. Das bestätigt in Bezug auf unsere Beobachtung bei normalem Knorpel, daß das Fortschreiten der Kalzifizierungsfront zuerst die Radiärzone betreffen muß. Deren Höhe weist in Folge dessen die stärkste Variabilität auf.

Die im Vergleich höheren Werte für Radiärzone und Gesamthöhe bei den arthrotischen Präparaten können oberflächenbedingt gewertet werden. Fibrillationen und Schädigung der Knorpeloberfläche sind initiale Faktoren der Osteoarthrose. Die Schutzfunktion der Tangentialzone (siehe auch 7.2.) wäre hier gestört. Die Belastung wirkte sich so weiter in die Tiefe aus als bei intakter Oberfläche. Es bezeichnen Bank (et al. 2000) „Schwellung“ als das charakteristische Zeichen (und vorwiegenden Mechanismus nach eingetretener Schädigung der Tangentialzone) der Osteoarthrose aufgrund eines geschwächten Kollagennetzwerkes. Die Degeneration der Tangentialzone führt hier zu einer herabgesetzten Begrenzungsfunktion gegen den herrschenden Quelldruck (Aspden and Hukins 1989). Panula et al. (1998) finden bei Osteoarthrose wie wir ebenfalls eine erhöhte Gesamtknorpeldicke, jedoch mit verschmälertem Superfizialzone.

Die erhöhte Gesamtknorpeldicke der arthrotischen Präparate kann nicht durch eine durch die beschädigte Oberfläche bedingte vermehrte Quellung beispielsweise im Rahmen des Wässerns nach Entkalkung erklärt werden. In diesem Fall müßten auch die defekten Proben

eine solche Gesamtdickenzunahme zeigen. Außerdem würde hier vor allem eine Schwellung der oberen Zonen erwartet werden.

Für unsere späteren Schlußfolgerungen auch von Bedeutung ist die Beobachtung von Sheperd und Seedhom (et al. 1999), daß bei erhöhter Knorpeldicke der Elastizitätsmodulus abnimmt, also größere Deformationen pro Krafteinheit möglich sind.

Gelegentlich fiel auf, daß im Vergleich eine geringere Höhe nicht nur der Zone 1, sondern auch der Zone 2 bei abgetragener Oberfläche gemessen wurde. Hier fand sich bei teilweiser, aber noch vorhandener, abgetragener Zone 1 oft auch eine im Vergleich zur entsprechenden intakten Zone 2 kleinere zonale Höhe der „defekten“ Zone 2. Da dies womöglich an Differenzierungsschwierigkeiten gelegen haben mag, war dies ein weiterer Grund dafür, diese beiden oberen Zonen als eine Einheit zu betrachten. Da die Zone 1 und 2, respektive die Tangential- und Transitionalzone des Gelenkknorpels funktionell eine Einheit darstellen (Glaser et al. 2002) bot sich diese Vorgehen an.

Bei Belastung zeigen in allen Oberflächengruppen die Zonen 1, 2, (1+2) eine Höhenzunahme, Zone 3 und Gesamthöhe eine Abnahme. Prozentual finden wir eine Höhenabnahme des Gesamtknorpels auf Kosten der Radiärzone. Die Belastung mit 280g bei 20 min zeigt die größten Veränderungen und hat bei veränderter Oberfläche stärkere Auswirkungen auf die Deformation als bei intakter.

In der Literatur beschrieben wird zunächst eine stärkste Deformierung bei mechanischer Belastung in der Tangentialzone (Eckstein et al. 1996, Gore et al. 1983, Putz und Fischer 1993, Guilak et al. 1995). Guilak et al. (1995) bezieht sich in seinen Aussagen auf die zellulären Elemente. Man würde also nun in unserem Versuchsaufbau eine Höhenabnahme der Tangentialzone, bzw. aller Zonen, von oben nach unten abnehmend, erwarten. Schon Kaab et al. (2000) und Glaser et al. (2002) aber beschreiben einen Gesamthöhenverlust bei steigender Dicke der Schicht der parallel zur Oberfläche orientierten Kollagenfasern. Dies ist in unserer Definition die obere Zone (Zone 1+2). Wir finden ein ebenso differenziertes Knorpelverhalten:

Poole et al. (1984) beschreiben im Rahmen des „cartilage-creep“ bei Belastung, daß nach einer Phase der initialen isovolumetrischen elastischen Deformation, in der nächsten Phase Volumen von Proteoglykandomainen im komprimierten Knorpel in unkomprimierte Areale verschoben wird. Desweiteren erfolge bei seitlich begrenzter Kompression die

Volumenverschiebung der „fluid flow phase“ der Kompressionsantwort radial (Setton et al. 1993).

Der größte Flüssigkeitssaustausch, „fluid exchange“, wird in der superfizialen Zone gefunden, deren Wassergehalt sich mit der Synovialflüssigkeit austauscht (Smith et al. 1995). Da die Kompression von der Oberfläche her erfolgt, liegt hier der größte Kompressionsdruck, der ausgeglichen werden muß. Andererseits finden wir in der Literatur, daß die Tangentialzone die geringste Permeabilität aufweist und ein Flüssigkeitsausstrom Richtung Oberfläche zur Wahrung des Innendruckes möglichst klein gehalten wird (Setton et al. 1993).

Unsere Hypothese baut darauf auf, daß zum einen ein Abstrom von Flüssigkeit aus den oberen Knorpelzonen in den Gelenkspalt stattfindet. Dieser Abstrom ist bei defekter Oberfläche größer als bei intakter, da die Permeabilität einer defekten Oberfläche höher ist. Man würde nun eine Abnahme der Knorpelgesamthöhe und eine Abnahme der oberen, oberflächennahen Knorpelzonen erwarten. Die Höhen der oberen Zonen werden jedoch nicht vermindert, sondern wachsen an. Eine Abnahme der zonalen Höhe findet sich überraschenderweise für die Radiärzone. In ähnlicher Weise wurden diese Befunde für die über die Kollagenfaserarchitektur definierten Zonen des Knorpels beschrieben (Glaser et al. 2002). Hier wird die Radiärzone als Reservezone angesehen. Bei unveränderter Faserpackungsdichte wird nicht eine Kompression der zuvor radiär verlaufenden Fasern, sondern eine dynamische Umlagerung und Flüssigkeitsverschiebungen zum Aufbau einer möglichst hohen Drucksteife verantwortlich gemacht.

Wie kann es nun auch in einer zellmorphologisch definierten zonalen Architektur zu einer Abnahme der radiären Zonenhöhe kommen?

Dazu wollen wir nun die zonal unterschiedliche Zell-Matrix-Relation, Relation der soliden Elemente zur flüssigen Phase des Knorpels sowie den unterschiedlichen Proteoglykangehalt betrachten.

- Als ersten Aspekt wollen wir ein Modell knorpelinterner Flüssigkeitsströme vorstellen. Auf eine aufgebrachte Last reagiert der Knorpel mit einer Gleichgewichtseinstellung im Sinne einer Gegenkraft (Mow et al. 1994, Setton et al. 1993). Nach der initialen soliden Phase kommt es zu Flüssigkeitsverschiebungen, Wasser wird aus dem Knorpel gepreßt, der von den an negative Ladungen der Proteoglykane gebundenen Kationen (Na⁺) erzeugte Quellungsdruck nimmt zu (Mow et al. 1994, Setton et al. 1993). Dieser Druck

steigt an, bis er mit der äußeren Kraft im Gleichgewicht steht. Dann endet der Flüssigkeitsausstrom oder „Creep“ (Mow et al. 1994, Setton et al 1993). Da dieser „Creep“ Proteoglykan- abhängig ist (Jurvelin et al.,1988,Mow and Ratcliffe et al.1996) kann sich in der Radiärzone erhöhter „Creep“ finden (Poole et al.1997). Zudem steigt mit wachsendem Proteoglykangehalt der Aggregatmodulus und sinkt die Membranpermeabilität (Mow, Ratcliffe et al. 1996), wodurch in der Radiärzone leichter Flüssigkeitsverschiebungen toleriert und erzeugt werden können. Durch den hohen PG-Gehalt besitzt diese Zone auch ein größeres osmotisches Potential und eine größere Viskoelastizität (Poole et al.1997, Mow, Ratcliffe et al. 1996). Auch dadurch können Höhenveränderungen leichter erreicht und toleriert werden. Dagegen ist die Fähigkeit der Volumenverschiebung der Tangentialzone durch den starken Grad der Kollagenvernetzung eingeschränkt (Setton et al. 1993). Dies liegt an dem hohen Vernetzungsgrad des Kollagens, der die Extension des Proteoglykan-Wasser-Gels in der Tangentialzone limitiert (Poole et al. 1994, Muir et al. 1983).

Die Abnahme der Höhe der Radiärzone kann durch Wasserausstrom bedingt sein. Da ein Fluß Richtung kalzifizierten Knorpel unwahrscheinlich ist, kommt nur ein Fluß in die oberen Zonen in Frage. Wie oben angeführt besitzt die Radiärzone eine ausreichende Flexibilität, Wassergehalt und eine geeignet geringe Kollagenvernetzung. Allerdings ist der Proteoglykangehalt im unkomprimierten Knorpel in der Radiärzone höher als in der Tangentialzone, wodurch Wasser gebunden wird. Wenn bei Kompression der oberen Zonen durch Wasseraustritt aus dem Knorpel kurzfristig hier eine höhere Proteoglykan- und Ladungsdichte entstünde als in der Radiärzone, könnte so ein osmotisches Potential entstehen. Dieses wäre dann in der Lage per „fluid flow“ einen Wassereinstrom aus der Radiärzone zu generieren, bis wieder ein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

- Der zweite Aspekt beschreibt die Interaktion zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Die Kompressionssteife des Knorpels wird beeinflusst von der Kompressionssteife ihrer einzelnen Teile. Da die Kompressionssteife der Matrix größer ist als die der Zellen (Guilak et al. 1995), sinkt die Kompressionssteife mit steigender Zelldichte. Das Zell-Matrix-Verhältnis der Tangentialzone liegt bei den zellulären Elementen. Die zellulären Elemente der Tangentialzone besitzen zwar auch ein viskoelastisches Verhalten mit dem sie auf Kompression reagieren können (Freemann et al. 1994), die Flexibilität der Tangentialzone ist aber nach dem oben gesagten deutlich geringer als die der Radiärzone.

Guilak, Ratcliffe, Mow (et al.1995) beschreiben daß die Verformung („strain“) auf der Tangentialzone (19%) überproportional größer der eigentlich aufgebrachten Belastung ist, während sie in den beiden unteren Zonen der von ihnen aufgebrachten von 15% entspricht. Wong (et al. 1997) bestätigen dies mit einer zonenabhängigen Deformation bei statischer Belastung mit höherer Kompression der oberen und niedrigerer Kompression der unteren Knorpelzonen als der aufgebrachten verformenden Last entsprechend. In der oberen Zone ist der Kompressionsmodulus ca. 27% kleiner als in den unteren Zonen, die Kompressionsteife ist hier am niedrigsten (Guilak, Ratcliffe, Mow et al. 1995). Der oben formulierte „fluid flow“ von der Radiärzone könnte dies ausgleichen, um in der oberen Zone das Zell-Matrix-Verhältnis nicht weiter zu erniedrigen. Die oberen Knorpelzonen können wahrscheinlich ihre Zell-Matrix-Relation nicht weiter vergrößern. Der Zell-Zell-Abstand ist hier von vornherein gering, so daß zur Wahrung der perizellulären Matrix wohl Matrixwasser bewahrt werden muß.

Dies könnte auch erklären, weshalb die Zelldichte bei Belastung so relativ konstant bleibt, wie wir es vorgefunden haben (dazu siehe unten). Zum anderen besitzt die Radiärzone als Gewebe mit hohem PG-Gehalt (Poole et al. 1997) und niederem Kollagengehalt (Hedlund et al.1993) eine hohe Drucksteife (O'Connor et al. 1989), was für die tangential Zone nicht zutrifft. Es wäre möglich, daß die Radiärzone dieses Defizit ausgleicht und somit die Tangentialzone vor einem hohen Wasserverlust durch Kompression schützt, während die Tangentialzone durch ihre Lastverteilungsfunktion die darunterliegenden Zonen vor übermäßiger Kompression schützt (Meachim, Stockwell et al. 1979). Wasserverlust ist ungünstig, da ausreichender Flüssigkeitsgehalt eine Voraussetzung zum Aufbau einer angemessenen Drucksteife als Gegenkraft zur aufgebrachten Last ist.

- Ein dritter Aspekt ist die Sichtweise der Knorpelreaktion auf Belastung als dynamische Antwort, die eine zonale Unterteilung anhand morphometrischer Gesichtspunkte in Form eines dynamischen – lastabhängigen Modells benötigt. Zu beachten ist hier, daß Zellen und Matrix eine funktionelle Einheit bilden. Bei dynamischer Umlagerung des die Zelle umgebenden Kollagenfasergerüsts ist auch eine Formänderung der in dieses Gerüst eingebetteten Zelle vorstellbar. So wäre es denkbar, daß ein in bevorzugt radiär verlaufende Kollagenfaserbündel eingebetteter, in seiner Längsachse radiär betonter, länglicher Chondrozyt sich mit seiner Umgebung in seiner Form verändert. Bei Umlagerung der Kollagenfaserbündel zu einer mehr tangentialen oder ungeordneten, gegebenenfalls auch wabenförmigen Struktur, könnte sich die Zelle ebenfalls der neuen

Vorzugsrichtung anpassen und eine mehr runde Form annehmen. Damit wäre in unserer Definition eine Zuordnung dieser Zelle zur oberen Zone gegeben. Eine Abnahme der Höhe der Radiärzone wäre so erklärbar.

Bei oben vorgestellten Ansätzen zur Erklärung der zonalen Höhenveränderungen, sowohl dem des „fluid flow“, als auch dem der Abhängigkeit der Zellform von der Kollagenfaserarchitektur können wir größere Deformationen bei größerer Last oder defekter Oberfläche erklären. Bei hoher und langer Belastung muß zum einen ein stärkerer Gegendruck aufgebracht werden, weswegen es dann zum einen zu stärkeren Volumenverschiebungen von radiär nach tangential kommen müßte, zum anderen zu einer vermehrten dynamischen Umlagerung der Kollagenfasern in der Reservezone Radiärzone und ihrer Zellen.

Bei näherer Betrachtung des Einflusses der Lasthöhe scheint das Gewicht bei intakter Oberfläche an Bedeutung zu gewinnen, wenn die Lastzeit kurz ist. Hingegen scheint die Höhe der Last bei langer Belastungsdauer keine wesentliche Rolle zu spielen. Die vorgefundenen Deformationen sind bei 1min /280g höher als bei 1min /160g. Dies spricht für die Dynamik der Deformation und der Deformationsantwort. Da die Höhe der aufgebrachten Last bei defekter Oberfläche auch bei kleiner Zeit mehr Deformationen auslöst, spricht dies dafür, daß eine intakte Oberfläche einen Schutz darstellt gegen das einwirkende Gewicht. Hier ist die Zeit entscheidend für den Grad der Deformation, bei defekter Oberfläche dagegen Gewicht und Zeit zusammen.

Bei beschädigter Oberfläche ist der Flüssigkeitsausstrom zum Gelenkspalt hin vergrößert (Setton et al.1993), konsekutiv ist ggf. der ausgleichende Einstrom aus der Radiärzone vergrößert und daher finden wir hier größere relative Höhenveränderungen. Vielleicht liegt es auch an diesen Flüssigkeitsströmen, daß Kaab et al.(2000) die größte Deformation der Kollagenfasern bei Belastung nicht an der Oberfläche, sondern in der Transitional- und oberen Radiärzone finden, also dem Bereich, der bei unserem Modell quasi „durchströmt“ würde.

Das zweite Phänomen, das wir erklären wollen, betrifft das Zellbulging. Wir finden eine starke seitliche Ausdehnung der Zellanordnung im Bereich der oberen Knorpelzone (Bulging). Diese Ausbeulung verläuft bis in den Bereich, den wir als Übergangsbereich zwischen sicher belastetem und unbelastetem Areal nicht ausgewertet haben. Die vorgefundene Ausbeulung läuft sektglasförmig nach radiär aus. Diese seitliche Ausbiegung

(Bulging) erfaßt sowohl Kollagenfasern (Glaser et al. 2002) als auch Zellen. Wie oben schon betont, stehen die zellulären Elemente in ihrer Umgebung in enger Verbindung mit der Kollagenfasermatrix. Daher ist es verständlich, daß radiale und axiale Verschiebungen beide Elemente des Knorpels gemeinsam betreffen. Wir haben also nicht nur eine relative Höhenzunahme der oberen Knorpelanteile nach vertikal unten, sondern auch eine seitliche Expansion.

Mit unserer Hypothese des „fluid flow“ können wir auch hier diskutieren. Im Rahmen der initialen Kompression der Tangentialzone mit konsekutiv erhöhter Proteoglykan- und Ladungsdichte im Vergleich zur unbelasteten könnte auch reaktiv Volumen von seitwärts aus unbelasteten Bereichen in die oberen Knorpelzonen „geschifft“ werden. Dabei führen wir die stärkere Ausprägung des Bulgings im oberen Knorpelbereich auch auf Beobachtungen von Zarek und Edwards (1963) zurück, welche unter einer Lastauflagefläche Druckbeanspruchungen finden, die im oberen Knorpelbereich maximal sind und mit zunehmender Tiefe asymptotisch abnehmen.

7.2. Abgetragene Oberfläche / Bedeutung der Tangentialzone

Das Ziel unserer Versuchsanordnung war die Untersuchung der Auswirkung der Beschaffenheit der Knorpeloberfläche auf die Deformation der Chondrozyten. Die vorgefundenen Ergebnisse zeigen, daß bei defekter Oberfläche mit gleicher Belastung eine größere Deformation der Zellen und der Zonen des Knorpels erfolgt als bei intakter Oberfläche. Die Zellen werden dabei in den oberen Zonen stärker in Lastrichtung deformiert. Dies ist zwei Schnittebenen nachweisbar. Es scheint zu einer Volumenverminderung der Chondrozyten bei Belastung zu kommen, welche bei defekter Oberfläche stärker ausgeprägt ist als bei intakter. Einen Einfluß einer defekten Oberfläche bei Belastung auf die zonale Zelldichte konnten wir nicht nachweisen. Auch die zonale Deformation geschieht oberflächenabhängig. Bei defekter Oberfläche kommt es zu einer stärkeren Gesamtdeformation im Sinne einer Abnahme der Gesamtknorpelhöhe. Dabei sind der Höhengewinn der Zone (1+2) und der Höhenverlust der Radiärzone bei defekter Oberfläche stärker ausgeprägt als bei intakter. Alle vorgefundenen Befunde für die defekte, artifiziell beschädigte Oberfläche, sind auch bei den arthrotischen Proben nachweisbar.

Die Rolle der Tangentialzone muß ausführlich diskutiert werden. Bei der Betrachtung der Tangentialzone muß unterschieden werden, zwischen den Eigenschaften dieser Zone, die bei ihrer Integrität zu spezifischen Veränderungen ihrer Bestandteile unter Belastung führen und den Folgen, die sich aus einer gestörten Integrität ergeben.

Die Bedeutung der intakten Tangentialzone als Schutzzone des darunterliegenden Knorpels ist unumstritten. Sie beschränkt die Exsudation und hält den internen Flüssigkeitsdruck aufrecht (Setton et al. 1993).

Matrix und Zellen reagieren als Einheit (Poole et al. 1997). Dabei findet ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen extrazellulärer und perizellulärer Matrix sowie den Zellen statt (Guilak et al. 2002). Partiiell ist der Chondrozyt fähig, sein Volumen aufrecht zu erhalten. Eine Erklärung ist die Behinderung von Plasmaausstrom durch die Zellmembran und die umgebende perizelluläre Matrix, den Kollagenfaserverlauf und den Proteoglykangehalt (Guilak, Ratcliffe, Mow 1995). Die verminderte Deformierung der Zellen der Zone 2 entsprechenden Transitional- und fehlende Deformierung der Zellen der der Zone 3 äquivalenten Radiärzone in intaktem Knorpel kann durch die zelluläre Umgebung beeinflusst sein. Diese besteht in den zuletzt genannten Zonen aus perizellulärer (PCM), territorialer und interterritorialer Matrix, in der Tangentialzone nur aus der PCM (Poole et al. 1984, Poole et al. 1997). Diese Befunde können dafür sprechen, daß in der oberen Zone perizellulär begrenzt ein anderes, erleichtertes Strömungsverhalten vorliegt, welches zu vermehrten Flüssigkeitsverschiebungen aus der Zelle heraus führt. Damit wäre eine Volumenabnahme der Zelle erklärbar. Auch kann bei höchstem initialem „Creep“ in der Gesamtmatrix der Tangentialzone mit einem hier initial unter Belastung erhöhtem osmotischen Potential argumentiert werden, welches nicht nur durch Flüssigkeitseinstrom aus unbelasteten Matrixanteilen, sondern auch durch Flüssigkeitseinstrom aus den Zellen neutralisiert wird.

Allerdings reicht diese Argumentation nicht dazu aus, zu erklären, warum die Volumenverminderung vorherrschend durch Deformation in Lastrichtung erzeugt wird. Andere Einflußfaktoren sollten beachtet werden.

Beachtet werden muß neben der Interaktion zwischen Zellen und der flüssigen Phase der Matrix auch die Interaktion zwischen Zelle und umgebendem Kollagenfasergestüt. In der Tangentialzone verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Lastrichtung, radiär dagegen parallel. Hauptdeformationsrichtung der Zelle ist in Lastrichtung. Bei Deformation geschieht eine dynamische Umlagerung der Kollagenfasern, die die eingebetteten Zellen mit einbeziehen kann (s.o.). In der Tangentialzone kommt es zu vermehrtem „crimp“. Es ist

vorstellbar, daß die zwischen den Kollagenfasern in der Tangentialzone relativ eng gepackten Zellen in Veränderungen mit einbezogen werden. Bei enger parallel zur Oberfläche und zueinander gelagerten Fasern ist dann eine kleinere Zellhöhe zwischen diesen parallelen Fasern denkbar. Durch die sich nicht wesentlich verändernde Quervernetzung der Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche kann die x-Achse der Zellen konstant bleiben.

Die Kollagenfasern der Tangentialzone besitzen eine hohe Zugsteife. Sie sind als lastverteilendes Netz, vielleicht am ehesten einem Trampolin vergleichbar, zu verstehen. Diese Funktion beinhaltet eine gewisse Flexibilität, ein flächiges Nachgeben gegenüber der aufgetragenen Last. Bildlich passen unsere lichtmikroskopischen Darstellungen der muldenförmigen, an den Rändern sanft eingedrückten belasteten Oberfläche bei intakten Präparate dazu. Eine Kompression der Zellen zwischen diesen eingedrückten Netzteilen ist vorstellbar.

Lee (et al. 1995) findet an isolierten Chondrozyten eine vom Kompressionstreß abhängige Deformation, dabei vermindert eine umgebende Matrix die Deformation im Vergleich zu isolierten Zellen. Den schützenden Einfluß einer ausreichend vorhanden Matrix sehen wir an den bei allen Parametern stets fehlenden Veränderungen der Zellen der Radiärzone. Der gleiche Autor beschreibt, daß sich frisch isolierte Radiärzonenzellen mehr deformierten als isolierte Tangentialzonenzellen, dieser Effekt aber nach 6 Tagen in Kultur nicht mehr nachweisbar sei. Die Radiärzonenzellen scheinen also besonders von ihrer Matrix abhängig. Ebenfalls Lee (et al. 2000) beschreibt eine Änderung im Verhältnis der Achsendurchmesser bei Kompressionstreß von 25% von 1,0 auf 0,6. Die begleitende Deformierung des Zellkernes erfolgt in Richtung des aufgetragenen Stresses. Dies hieße in unserem Fall wieder in Richtung der y- Koordinate. Die Veränderung des Achsenverhältnisses können wir auf unsere Tangentialzonenzellen beziehen, da hier der schützende Matrixeinfluß am kleinsten sein dürfte und den isolierten Zellen Lee's am ähnlichsten wäre. Wir finden eine Veränderung des xy -Achsenverhältnis zugunsten der y-Achse von 3:2 vor auf 2:1 nach Belastung. Auch wenn die nicht vergleichbare Größe des ausgeübten Stresses und die Zellsituation im Knorpelsitus bei uns zu beachten sind, können wir aber dennoch von gleicher Tendenz sprechen.

Bei Betrachtung der Achsenverhältnisse für yx-Achsen und Hauptachsen fällt uns für intakte Oberflächen ein bis auf Zone 1 stabiles Achsenverhältnis auf. Die Zellen in der Zone 3 sind bei allen Oberflächen stabil. Das Achsenverhältnis bei Belastung für arthrotische und defekte Oberflächen gleicht sich an die Werte der intakten Zellen an. Hier könnte eventuell ein

Grenzwert vorhanden sein. Beachten wir wieder unsere Hypothese der Flüssigkeitsverschiebungen aus den Zellen, so kann gegebenenfalls eine bestimmte Konzentration der intrazellulären Matrix nicht überschritten werden. Es wäre möglich, daß intra- und extrazelluläre Konzentrationen in einem bestimmten optimalen Gleichgewicht zu stehen anzustreben, da die Grenzwerte zonenabhängig sind. Sie könnten so von der zonal unterschiedlichen Konzentration an Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen u.s.w. abhängig sein. Ob wirklich ein solcher Grenzwert für die Zellproportion besteht könnte allerdings Gegenstand weiterer spezifischer Untersuchungen sein.

Bei beschädigter Tangentialzone stellt sich der oben genannte reaktive Gleichgewichtszustand bei Belastung wesentlich verspätet ein. Aufgrund der erhöhten Permeabilität kommt es zu einem verstärktem „Creep“- Phänomen (Setton et al. 1993). Das BPVE zeigt eine stärkere Abhängigkeit von den soliden Matrixkomponenten (Setton et al. 1993). Bei gleicher äußerer Last intensiviert sich nach dem Abtragen der Tangentialzone aufgrund vermehrten Flüssigkeitsabstromes die Deformation des Kollagenfasernetzes (Glaser et al. 2002). Dabei wurden die Zonen nach ihrer Kollagenfaserarchitektur definiert (Glaser et al. 2002). Auch bei der hier verwendeten zonalen Definition nach der Zellmorphologie führt eine fehlende oder defekte Tangentialzone zu erhöhter zonaler und zellulärer Deformation. Bei geschädigter Oberfläche mit vermehrtem „Creep“, erhöhtem osmotischem Druck und dadurch (entsprechend oben angeführter Hypothese) vermehrtem Wasserausstrom aus der Zelle, kann so eine vergrößerte Volumenabnahme als bei intakter Oberfläche mit geringerem „Creep“ durch die Begrenzungsfunktion der Tangentialzone plausibel erscheinen.

Für die defekten Proben können wir auch wieder unser Modell des Zusammenwirkens zwischen Zellen und Kollagenfaserarchitektur hinzuziehen. Die starke Deformation der obersten Schicht, die in ihrem Aufbau einer normalen Transitionalzone mit ungeordnetem Kollagenfaserverlauf entspricht, können wir auf deren kleine Kompressionssteife zurückführen. Zum anderen kann dafür die fehlende Zugsteife der Tangentialzone und damit verminderte Druckverteilung verantwortlich sein. Bei beschädigter Oberfläche finden Nötzli and Clark (et al. 1997) ein „Umknicken“ der zuoberst exponierten Fasern mit Ausbildung einer neuen, vom Faserverlauf tangentialzonenähnlichen Struktur. Von dieser Umstrukturierung können dann auch die zellulären Elemente betroffen sein, die wieder zwischen den parallel zur Lastwirkung laufenden Fasern liegen und größerer Deformationsfortleitung ausgesetzt sind.

Es wurde gezeigt, daß eine verstärkte Deformation der Zellen und Volumenverlust Auswirkungen auf die Syntheseleistung der Zellen haben. Sie ist abhängig von Größe der einwirkenden Last, der Dauer ihrer Einwirkung (Sah et al. 1991) und der Deformation (Lee et al. 1995). Die Antwort auf mechanische Belastung bestimmt die Art und Menge der „second messenger“ und nachfolgend Art und Menge der Produktion einer Zelle mit (Guilak, Mow et al. 1992). Gegebenenfalls paßt die Zelle ihre Produktionsleistung damit der Belastungssituation an, um weiterer Belastung standzuhalten.

Eine optimale Matrixsynthese wird durch intermittierende Kompression des Knorpels von 15% erzeugt (Guilak et al. 1995). Eine auf Dauer vermehrte und inadäquate Kompression bzw. Deformation sollte zu reduzierter Synthese führen. Damit könnte die Fähigkeit zur Reparatur von Schäden bzw. zur Anpassung durch Umbauvorgänge eingeschränkt werden.

Unsere Kompression, gemessen an der Differenz der Gesamthöhe unbelastet zu belastet (Tabelle 6) zeigt eine statische Kompression von 19% bei intakten Proben und 28% bei defekten Proben, jeweils bei höchster Belastung. Damit liegt die Kompression des Knorpels bei den intakten Proben in Bezug auf die Größe im optimalen Bereich. Bei den defekten Proben findet sich eine wesentlich höhere statische Kompression, welche einen negativen Einfluß auf die Syntheseleistung haben könnte. Allerdings betrachten wir ja statische Belastung, das bedeutet wir sehen den Zustand nach einer Belastung ohne Relaxation von der intermittierenden Belastung, die Guilak et al. 1995 beschrieben haben.

Für die arthrotischen Proben finden wir sowohl in der obersten als auch in der mittleren Zone stärkere Deformationen bezüglich Zellhöhe und –fläche als intakt. Der Matrixaufbau um die Zellen herum sollte normalem Knorpel entsprechen, ebenfalls der Kollagenfaserverlauf. Zu beachten ist in beiden Fällen jedoch, daß wir unter Belastung bei Betrachtung der zonalen Höhen eine Höhenzunahme dieser oberen Zonen gefunden hatten. Dies hatten wir mit einem fluid –Einstrom zu erklären versucht. Nun ist dieser auch in den intakten Proben vorhanden, allerdings in geringerem Maße (geringere Höhenverschiebungen). Die vermehrte Deformation bei beschädigter Oberfläche, aber auch in den oberen Zonen allgemein, machen wir daher auch vom fluid-flow abhängig. In der Radiärzone geht Flüssigkeit verloren, in die oberen Zonen strömt sie ein. Damit verschieben sich auch osmotische Valenzen, der negative Ladungsdruck der Proteoglykane würde erhöht. Da diese Faktoren (osmotische Eigenschaften) für die Steifheit und Kompressionsmoduli und Compliance verantwortlich sind (Poole et al.1997, Mow, Ratcliffe et al. 1996), wäre denkbar, daß sich durch

Flüssigkeitsströme die lokale Compliance, die Steifheit und das Deformationausmaß veränderten.

7.3. Reversibilität

Eine vollständige Rückbildung der beobachteten Veränderungen finden wir nur bei einer intakten Oberfläche. Chondrozyten, die von einer Matrix umgeben sind, haben eine längere Erholungszeit nach Deformation als isolierte Chondrozyten (Lee et al. 1995). Dies bestätigt unsere Annahme von einer komplexen synergistischen Matrix- Zell- Interaktion und beide betreffenden fluid- flow bei Kompression. Dabei scheint die Erholungszeit der Chondrozyten länger zu sein als die des Kollagenfasergerüsts. Die Rückbildung der Deformationen scheint abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit zu sein, z.T. auch von Größe und Dauer der Belastung. Bei dynamischer Last ist die Reversibilität der zonalen Deformation der Kollagenstruktur rascher als bei statischer Last. Sie erfolgt aber in jedem Fall innerhalb 30 min bei Belastung in situ mit dem dreifachen Körpergewicht (Kaab et al.1998). Totale Erholung der Veränderungen bezüglich Zellhöhe und Zellvolumen finden Guilak et al. (1995) nach Kompression bei 15% surface-to-surface- Streß für 1200 Sekunden mit ebenso langer Erholungszeit. Wir finden bei intakter Oberfläche schon makroskopisch keine Zeichen der Impression mehr, was sich histologisch bestätigt. Darin stimmen wir mit oben genannten Untersuchern überein. Dabei ist unsere Erholungszeit mit 1 min zum Teil erheblich kürzer. Bei beschädigter Oberfläche finden wir bis zu 20 Minuten keine Reversibilität der zonalen oder zellulären Deformation. Poole (et al. 1984) sagt, daß der Erholung nach Deformation der osmotische Schwellungsdruck des Proteoglykanwassergels zugrunde liegt. Dessen osmotisches Potential ziehe Wasser zurück in die Matrix und spanne das Kollagenfasernetzwerk. Dazu aber ist an der Knorpeloberfläche die Tangentialzone erforderlich, die als Permeabilitätshindernis den osmotischen Spannungszustand aufrecht erhält (Setton et al. 1993).

7.4. Bedeutung der Radiärzone

Im normalen Knorpel wird die Höhe des Gesamtknorpels im wesentlichen von der Höhe der Radiärzone bestimmt. Dabei wird einerseits durch Reize auf die Kalzifizierungsfront entwicklungsphysiologisch (Carter et al. 1987) bei hoher Druckbelastung von vornherein eine starke Knorpeldicke angelegt (z.B. Patella), andererseits reaktiv durch vermehrte Matrixproduktion als Antwort auf den mechanischen Reiz in der synthetisch aktiven Radiärzone die Knorpeldicke erhöht (Buckwalter, Mankin et al. 1997, Schünke et al. 1988).

Während der Belastung ist die Radiärzone eine Reservezone für die Kollagenumlagerung unter Belastung und verankert gleichzeitig den unkalzifizierten Knorpel durch die TM im kalzifizierten Knorpel (Glaser et al. 2002). Die Radiärzone kann eine Reservezone für die flüssigen Matrixanteile darstellen und sie könnte für einen ausgleichenden „fluid flow“ zu den oberen Knorpelanteilen sorgen. Dies bedeutete, daß versucht wird, die Dicken der Tangential- und Transitionalzone aufrecht zu erhalten. Dies geschähe zum einen mittels dynamischer Umlagerung der soliden Matrix in Form einer Kollagenumlagerung, zum anderen durch dynamische Verschiebung der flüssigen Matrixbestandteile. Auch unter diesem Aspekt ist es verständlich, daß stärker auf Druck beanspruchter Knorpel eine größere Radiärzone benötigt, um bei dieser Dynamik ausreichend Substanz zur Verfügung stellen zu können. Auch wäre im Rahmen dieser Anpassungsvorgänge eine Zellumlagerung (Zellbulging) und Änderungen der Zellmorphologie denkbar, als Hinweis, daß nicht nur flüssige und solide Matrix unter Last interagieren und ein System darstellen, sondern daß in diesem System auch die Chondrozyten eingeschlossen sind.

7.5. Übereinstimmung Kollagenfaseranordnung und Zellanordnung und Bedeutung

In unbelastetem Zustand stimmen Kollagenfaserarchitektur und Zellarchitektur weitgehend überein. Bei Belastung finden wir größere Veränderungen bei der zellulär bestimmten Zonenhöhe. Während Glaser (et al. 2002) mit der gleichen Methodik im Rasterelektronenmikroskop gleichbleibende absolute Werte für die Höhen der beiden oberen Zonen auf Kosten eines Verlustes der Radiärzone findet, finden wir sogar eine Höhenzunahme der oberen Zonen auf Kosten der Radiärzone. Auch in den direkten Vergleichen, die wir im REM anstellen konnten (Abbildung 19, 20), ergab es sich, daß sich

nach Belastung diese beiden zonalen Definitionen divergierend verhalten. Es waren der Tangentialzone per definitionem zugehörige Zellen auch noch in einem Bereich aufzufinden, der kollagenfaserarchitektonisch schon als Transitionalzone bezeichnet werden mußte. Bedingt werden kann dieser Befund durch die unterschiedlichen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und ihrer umgebenden Matrix. In diesem Sinne weisen die hier erhaltenen Reversibilitätsbefunde im Vergleich mit Glaser (et al. 2002) auf ein differentes zeitliches Deformationsverhalten zwischen Zellen und Fasern hin. Dieses wäre auch schon allein deshalb als sinnvoll anzusehen, weil kurzfristige, reversible strukturelle Veränderungen der Matrix nicht unbedingt eine Änderung der metabolischen Aktivität erfordern. Daher ist es verständlich, wenn die Chondrozyten auf Belastung und Entlastung langsamer antworten als ihr umgebendes Gerüst.

Unberührt davon ist die enge Interaktion zwischen Zellen und Matrix, wie wir es schon bei der Betrachtung der Zelldichte und Zellparameter angeführt haben.

7.6. Folgerungen / Bedeutung für das Verständnis der Osteoarthrose

Bei beschädigter Oberfläche kommt es nach oben angeführtem sowohl zu erhöhter Matrix-, als auch Zelldeformation. Wenn gilt: „function follows form“ (Freeman et al. 1994, Guilak et al. 1995) beeinflussen sich zelluläre Form, Oberflächenumfang und Zellvolumen Phänotyp und Genexpression gegenseitig (Urban et al. 1993, Newmann et al. 1988). So kann die Deformation der Zelle direkte Auswirkungen auf ihre synthetische Aktivität haben (Wong et al. 1997). Die Antwort der Zelle auf mechanische Belastung wird beispielsweise in einer Veränderung der intrazellulären Zusammensetzung vermutet (Freeman et al. 1994). Dabei schaffen Zytoskelett und perizelluläre Matrix die Verbindung in der Signaltransduktion zwischen Kompression der extrazellulären Matrix und der Deformation des Zellkernes (Guilak et al. 1995, Guilak and Mow et al. 2000).

Osteoarthrotische Chondrozyten und normale Chondrozyten unterscheiden sich durch ihre viskoelastischen Eigenschaften, bedingt wahrscheinlich durch eine veränderte Struktur und Komposition ihres Zytoskelettes (Trickey et al. 2000). Damit wäre dann auch eine veränderte Signaltransduktion verbunden, welche Anpassungsvorgänge auf Belastung bzw. das Potential dazu negativ beeinflussen mag.

Bei defekter Oberfläche wie bei unserem Modell oder aber auch bei primär arthrotischen Knorpelproben, finden wir eine erhöhte zonale Deformation und eine erhöhte zelluläre Deformation in Lastrichtung. Die Vorgänge bei abgetragener Oberfläche sind mit denen bei primär arthrotischem Knorpel vergleichbar. Das benutzte Modell scheint zumindest in erster Näherung anwendbar zu sein auf die Situation bei osteoarthrotischem Knorpel. Allerdings können wir unsere Lastapplikation nicht als Modell für normale Belastungsvorgänge im gesunden Knorpel ansehen und auch nicht für frühe Stadien der Osteoarthrose. Denn hier erfolgt zum einen die Lastwirkung zyklisch, zum anderen ist die Oberfläche noch intakt.

Die Flüssigkeitsströme („Creep“) als Reaktion auf eine Belastung gewinnen bei defekter Oberfläche eine größere Bedeutung im Vergleich zur elastischen Komponente der Lastreaktion. Sie scheinen zur Rückbildung eine längere Zeit zu beanspruchen. Wir haben gesehen, daß die Reversibilität der Deformation bei beschädigter Oberfläche eine längere Zeit benötigt. Es wäre vorstellbar, daß bei zyklischer Belastung die Entlastungsphase ab einem gewissen Stadium der Oberflächenschädigung kleiner wird, als die zur Rückbildung der Veränderungen nötige Zeit. Die Entlastungsphase bei zyklischer Belastung müßte immer länger werden, um die Zellen und die Matrix vollständig erholen zu lassen. Da jedoch die Phasenlänge beim normalen Gang immer gleich sein wird, käme es ab einer bestimmten Schädigungsgrad nicht mehr zur vollständigen Erholung. Ein Teil der eingetretenen Deformation wäre bei erneuter Belastung noch nicht zurückgebildet. Ein gewisses Deformationsmaß bliebe erhalten. Es wäre denkbar, daß dann die Zellen deformiert bleiben und sich sogar ein Zustand einstellte, der einer statischen, ständig einwirkenden Last gleichzusetzen sei. Eine anhaltende Deformation der Zellen ergäbe Auswirkungen auf die Syntheseleistung. Nach allem, was man bisher weiß, wäre plausibel, daß die Syntheseleistung sich dann derart auswirke, daß Reparaturvorgänge nicht oder nur unzureichend eingesetzt werden könnten. Vorstellbar wäre bei anhaltender Belastung ein Fortschreiten des Oberflächendefektes. Die Schädigung der Oberfläche käme dann der Eintrittspforte in einen „circulus vitiosus“ gleich.

Torzilli et al. (1997) beschreiben sowohl bei statischer als auch dynamischer Belastung herabgesetzte Proteoglykan (PG) -Syntheseraten proportional zum aufgebrauchten Streß. Dabei spielt die Frequenz der Belastung eine Rolle (Parkinnen et al. 1992). Ebenfalls führt intermittierende Belastung zu erhöhter Fibronectin Synthese und dessen erhöhter Freisetzung

(Steinmeyer et al. 1997). Vorgefunden wurde auch eine verstärkte Prostaglandin E Synthese auf Scherkräfte (Smith et al. 1995).

In situ zeigen superfiziale Zellen zum Teil eine reduzierte Vitalität. Buschmann et al. (1996) beschreiben, daß die Aggrekan Synthese bei statischer Last in gleichem Maße reduziert wird wie der Grad der Deformation steigt, bei zyklischer Last finden Buschmann et al. (1999) eine erhöhte Aggrekan Synthese in Regionen mit erhöhtem „fluid flow“. Den gleichen Unterschied zwischen statischer und dynamischer Belastung finden auch andere Untersucher (Ragan et al. 2000, Quinn et al. 1998). Eine sinusoidale Scherbelastung stimuliere die Proteinsynthese um ungefähr 50% und die PG-Synthese um 25% auch ohne relevanten „fluid flow“ (Jin et al. 2001). Während zyklische Last im allgemeinen die PG Synthese ankurbelt und die mechanischen Eigenschaften der Matrix verbessert (Steife), führt kontinuierliche Kompression zu verminderter PG-Synthese und Schädigung durch Nekrose (Arokosi et al. 2000).

All diese Befunde können sich bei veränderter Syntheseleistung durch anhaltende Deformation negativ auf des Reparaturpotential auswirken und oben formulierten Teufelskreis unterhalten.

Wir wollen im folgenden vereinfacht nun davon ausgehen, daß unter dynamischer Belastung in den unteren Zonen die Syntheseraten steigen, unter statischer sinken und daß superfiziale Zellen unter Belastung ihre metabolische Aktivität reduzieren und Vitalität einbüßen.

Desweiteren wollen wir unsere Beobachtungen als Veränderungen im Moment einer einwirkenden Last betrachten, wie sie auch in der Belastungsphase einer zyklisch einwirkenden Last aussehen könnte, solange die Oberfläche intakt ist, und als Dauerzustand aufgrund fehlender Reversibilität bei defekter Oberfläche.

Unseren Befunden nach erfahren dann die Zellen der Tangential- und Transitionalzone eine Veränderung ihrer metabolischen Aktivität aufgrund „fluid flow“ und direkter Deformation, die der Radiärzone nur aufgrund eines „fluid flow“. Die Stärke der Veränderungen ist abhängig von der Integrität der Oberfläche.

Der Flüssigkeitsstrom, wie er auch bei Applikation reiner Scherkräfte auftritt, erhöht die Glykosaminoglykan(GAG)- Syntheserate mit Ausbildung längerer Ketten. Smith et al. (1995) fanden dies bei der Untersuchung beginnender Knorpeldegeneration, wo Scherkräfte auftreten und der Syntheseanstieg der Glykosaminoglykane mit dem Schweregrad der OA korreliert. Bei dynamischer Belastung finden Lee et al. (1998) eine Stimulation der

Glykosaminoglykansynthese ursprünglicher Radiärzellen. Isolierte Superfizialzellen sollen auf die gleiche Belastung mit einer Synthesereduktion reagieren. Dafür zeigten diese Zellen eine Stimulation der Proliferation. Da wir eben als Reaktion auf Belastung einen vermehrten Flüssigkeitssaustrom von der Radiärzone zu den oberen Zonen als Hypothese aufstellten, könnte man weiter folgern, daß sich für die Radiärzone aus den Ergebnissen von Lee und Smith eine erhöhte Glykosaminoglykan- Synthese ergibt.

In diesem Anpassungsmechanismus wäre einen Versuch zu erkennen, die Produktion der Matrixbestandteile zu verstärken. Als Folge einer verstärkte Matrixproduktion könnten wir dann auch die erhöhte Dicke der Radiärzone und der Gesamthöhe bei arthrotischem Knorpel deuten. Da Glykosaminoglykane Wasser binden und die Drucksteife erhöhen, verbesserte sich die Fähigkeit der Radiärzone, sowohl für die solide als auch die flüssige Phase der Lastantwort, als Reservezone zur Verfügung zu stehen.

Die von uns vorgefundene konstante Zelldichte auch unter Belastung läßt dem komprimierten Knorpel die Möglichkeit, genug Synthesorte zur Verfügung zu haben. Als eine Voraussetzung dazu ist allerdings anzusehen, daß die Vitalität der Zellen erhalten bleibt. Bei inadäquater Deformation, welche ab einem Zeitpunkt erfolgen kann, bei dem die Integrität der Knorpeloberfläche gestört ist, und die Relaxationszeit zur Rückbildung der Belastungsfolgen nicht ausreicht (s.o.), ergäbe sich eine Einschränkung der Vitalität der Zellen. Steinmeyer et al. (1997) beschreibt das für die Zellen der Tangentialzone unter Belastung, indem er eine reduzierte Vitalität und Apoptose der Zellen vorfindet.

In Kultur sollen die Deformationsgrade bei 15% Kompression für Zellen der Herkunft jeglicher Höhenlokalisation im Knorpel gleich sein (Lee et al. 1998). Hier zeigt sich wieder der Einfluß der umgebenden Matrix und läßt auch auf die Folgen schließen, die entstehen, wenn diese Matrix beschädigt wird (Veränderung der Oberfläche) oder die Matrix nicht aufrechterhalten wird durch verminderte Matrixproduktion (Veränderung der metabolischen Aktivität der Zellen durch vermehrte / zu starke Zelldeformation). Wir haben es hier also mit komplexen Zusammenhängen eines circulus vitiosus zu tun.

Dabei spielt eine intakte Oberfläche die entscheidende Rolle, da sie den Grad der Deformation und die Erholungszeit der Chondrozyten unter der Oberfläche so beeinflusst, daß bei ihrer Integrität der Lastreiz eine Größe innehat, mit dem anpassende metabolische Vorgänge erzeugt werden. Bei Störung dieser Integrität erhält der Deformationsreiz eine Größe, der zur Apoptose führt. Eine intakte Oberfläche hält die Erholungszeit der

Deformation kurz und schafft die Voraussetzung für intermittierende Lastwirkung, welche ebenfalls positive Reize auf die Aktivität ausübt, während eine defekte Oberfläche zu andauernder Deformation und in ihrer Auswirkung quasi „statischer“ Lastwirkung führt, welche die Signaltransduktion über das Zytoskelett negativ beeinflusst. Der Knorpel ist also imstande auf eine adäquate Last zu reagieren und sich dieser anzupassen, jedoch nur solange die Integrität der Oberfläche gewahrt bleibt. Als einen einschneidenden Prozeß in der Pathogenese der OA, für ihr Fortschreiten und Reversibilität ist also der Übergang vom Überwiegen der Anpassungsvorgänge zum Überwiegen der Deformation mit fehlender Reparatur der Beschädigung der Oberfläche anzusehen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Arthrose ist eine der häufigsten Alterserscheinungen mit großer sozialmedizinischer Bedeutung. Dadurch rückt der Gelenkknorpel in das Interesse zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Ein Teilgebiet dieser Untersuchungen befasst sich mit den Auswirkungen von Belastung und Oberflächenschädigung auf die Bestandteile der Knorpelmatrix, insbesondere deren Deformation. Andere Studien beschäftigen sich mit den Auswirkungen einer Zelldeformation auf die zelluläre Syntheseleistung.

Unklar ist bisher in diesem Zusammenhang, inwiefern eine beschädigte Knorpeloberfläche, wie sie initial bei Osteoarthrose auftritt, das zelluläre Deformationsverhalten im Knorpel beeinflusst.

Die vorliegende Studie möchte - nach Darlegung einer die morphologischen und funktionellen Aspekte des Gelenkknorpels betreffenden Literaturübersicht - mit Hilfe der Lichtmikroskopie am Rinderhüftknorpel die Auswirkung einer Oberflächenschädigung auf die zonale zelluläre Deformation, die zonale Zelldichte und die zonale und Gesamtdeformation des Knorpels beschreiben. Auf diese Weise sollen oben genannte Forschungsansätze einander angenähert werden.

Dazu werden aus 10 Hüftköpfen adulter Rinder 178 Knorpel- Knochen- Zylinder entnommen und an 58 Proben die obere Knorpelzone abgetragen. Mittels eines quaderförmigen Stempels werden diese Proben anschliessend mit 0,39 bzw. 0,68 MPa für 20 Minuten bzw. 1 Minute belastet. Sie werden danach unter Belastung fixiert, um Rückstellvorgänge zu vermeiden. 32 Proben werden einer Reversibilitätsprüfung unterzogen. 91 oberflächenintakte Proben und 50 Proben mit abgetragener Oberfläche werden nach Entkalkung, Entwässerung und Paraffineinbettung der lichtmikroskopischen Untersuchung anhand zellmorphologischer Zonenkriterien zugeführt. Dies geschieht in zwei aufeinander senkrechten Schnittebenen. Zusätzlich werden Proben aus drei primär arthrotisch veränderten Hüftköpfen in gleicher Weise untersucht. 24 intakte und 6 defekte Proben werden nach entsprechender Vorbereitung rasterelektronenmikroskopisch anhand einer kollagenfaserarchitektonisch definierten Zoneneinteilung betrachtet.

Zur Untersuchung der zellulären Deformation als erstem Aspekt wurden verschiedene histomorphometrische Parameter herangezogen. Dazu wurde ein Zellrahmen in Form eines yx-Koordinatensystemes um die Zelle gelegt. Die x- Achse läuft oberflächenparallel, die y-

Achse parallel der Lastwirkrichtung. Das Produkt der beiden Achsen erlaubte eine Aussage über die Zellfläche, unter Hinzunahme der zweiten Schnittebene konnten Rückschlüsse auf das Zellvolumen gezogen werden. Die zonale Zelldichte als zweiter Aspekt wurde zonenspezifisch anhand der Zellzahl in einem definierten Meßfeld ausgewertet. Als dritter Aspekt wurde die belastungsbedingte oberflächenabhängige Veränderung der zonalen Höhen und der Gesamthöhe durch Messung an drei verschiedenen Meßorten im sicher unbelasteten bzw. sicher belasteten Bereich erfaßt.

Die vorgefundenen Ergebnisse zeigen, daß bei defekter Oberfläche mit gleicher Belastung eine größere Deformation der Zellen und der Zonen des Knorpels auftritt. Die Zellen werden dabei in den oberen Zonen 1 und 2 in Richtung der einwirkenden Last (y-Richtung) deformiert. Die Werte der Zellausdehnung in Lastwirkrichtung nach Belastung sind bei den intakten Proben in Zone 1 mit einem $p < 0,0001$ fast um die Hälfte kleiner und liegen zwischen 6,44 und 7,38 μm , die der defekten Proben zwischen 7,28 und 9,09 μm . Signifikant bedeutsam ist dabei für die Ausprägung der Deformation mit einem $p < 0,0001$ die Belastungsdauer, mit einem $p < 0,0003$ die Oberflächenbeschaffenheit. Die Zellen der Zone 1 erfahren eine stärkere Deformation als die der Zone 2. Senkrecht dazu (x-Richtung) findet keine Deformation statt. Diese Befunde sind in zwei senkrecht zueinander stehenden Schnittebenen nachweisbar. In der unteren Knorpelzone 3 fanden sich keine Veränderungen der histomorphometrischen Parameter.

Eine Änderung der zonalen Zelldichte unter Belastung trat bei keiner Oberflächenbeschaffenheit und keiner Belastungsstufe auf. Die Zelldichte in Zone 1 für intakte Proben liegt vor und nach Belastung zwischen 10- 15 Zellen / 1800 μm^2 . Richtung untere Knorpelzonen nimmt die Zelldichte ab, sie liegt in Zone 3 intakter Proben bei 4-6 Zellen/1800 μm^2 .

Die zonale Deformation ist dagegen v.a. oberflächenabhängig ausgeprägt. Bei defekter Oberfläche kommt es zu einer stärkeren Abnahme der Gesamtknorpelhöhe. Dabei kommt es zu Höhengewinn der Zone (1+2) ($p = 0,0002$) auf Kosten eines Höhenverlustes der Radiärzone mit stärkerer Ausprägung bei defekter Oberfläche (Zone 1+2: $p = 0,047$) und höherer Last (Zone 1+2: $p = 0,0006$). Vor Belastung machen die oberen Knorpelzonen (1+2) bei intakten Proben 25-29%, bei defekten 13-21% aus. Nach Belastung finden wir für Zone 1+2 Anteile von 29-47% bei intakten und von 27 bis 45% bei defekten Proben. Die Anteile der Zone 3 verhalten sich gegensätzlich dazu. Die absoluten Werte für die Zonenhöhe

bestätigen diese Befunde. Alle vorgefunden Befunde für die artifiziell beschädigte Oberfläche sind auch bei arthrotischen Proben nachweisbar.

Beim Vergleich mit den rasterelektronenmikroskopischen Befunden zur kollagenfaserarchitektonisch und zellmorphologisch definierten zonalen Unterteilung des Gelenkknorpels fanden wir unter Belastung divergierende Zonendefinitionen. Der Tangentialzone definitionsgemäß zugehörige Zellen fanden sich nach Belastung auch noch in einem kollagenfaserarchitektonisch schon als Transitionalzone zu wertendem Bereich.

Die oberflächenabhängigen Veränderungen der zonalen Höhen bei Belastung führen wir auf drei mögliche Aspekte zurück. Dabei erfolgt zwischen Chondrozyten, Kollagenfasern und Proteoglykanen als funktioneller Einheit ein komplexes Zusammenspiel. Erstens könnten knorpelinterne Strömungen („Creep“) aufgrund initial veränderter osmotischer Potentiale unter Kompression Flüssigkeit derart verschieben, daß es zu einem Abstrom von Flüssigkeit aus der Radiärzone in die oberen Knorpelzonen kommt. Diese Ströme sollten einen primären Ausstrom von Flüssigkeit aus den oberen Zonen Richtung Gelenkspalt kompensieren. Bei beschädigter Oberfläche wäre der initiale Ausstrom aus dem Gelenkknorpel gelenkflächenwärts verstärkt, wodurch ausgeprägtere Ausgleichsmechanismen nötig wären, welche für uns als vermehrte Veränderung der zonalen Höhen sichtbar wurde. Die Radiärzone scheint dabei eine Reservezone darzustellen und für einen ausgleichenden „fluid flow“ zu sorgen. Eine intakte Tangentialzone wirkte dabei als Permeabilitätsschranke. Die Tangentialzone würde so vor Wasserverlust und Verlust von Drucksteife geschützt, während sie durch ihre Lastverteilungsfunktion den unter ihr liegenden Knorpelanteil schützte.

Zweitens können wir uns eine enge Interaktion zwischen den Knorpelzellen und der umgebenden Matrix vorstellen. Dabei würden Flüssigkeitsströme von radiär benutzt werden, um die Zell-Matrix Relation möglichst konstant zu halten, damit eine genügende Matrixsteife, die durch ein steigendes Zell/Matrix-Verhältnis herabgesetzt würde, vorhanden bliebe.

Drittens stellen wir uns eine durch Einbettung in das sich unter Belastung deformierende Kollagenfasergestützte eine rein mechanisch bedingte Zellverformung vor, welche bei Anwendung zonaler Einteilung anhand der Zellmorphologie eine dynamisch- lastabhängige zonale Unterteilung erforderte. Bei beschädigter Tangentialzone käme es dann simultan mit vermehrter Kollagenfaserumlagerung auch zu verstärkter zellulärer Deformation.

Die zelluläre Deformation möchten wir aber auch auf Flüssigkeitsbewegungen aus der Zelle heraus zurückführen. Kompressionsbedingt entstehende osmotische Potentiale könnten nicht

nur durch Ausstrom von Flüssigkeit aus lastfernen Matrixarealen ausbalanciert werden, sondern auch durch Flüssigkeitsausstrom aus den Zellen in die zelluläre Umgebung mit konsekutiver Deformation / Volumenabnahme der Zelle. Dabei besäßen Zonen der Tangentialzone aufgrund der Komposition ihrer perizellulären Matrix ein erleichtertes Strömungsverhalten, was die verstärkte zelluläre Deformation in dieser Zone erklärte (Hypothetisch könnten mit den Flüssigkeitsströmen aus der Zelle heraus auch Matrixsynthesevesikel transportiert werden. Dies wäre ein bedenkenswerter Aspekt für die Adaptationsvorgänge unter Belastung.). Zum anderen können wir uns auch eine rein mechanisch bedingte, passive Formänderung der in das Kollagenfasergestell eingebetteten Zelle durch dynamische Umlagerung dieses Gerüsts unter Belastung vorstellen. Bei beschädigter Oberfläche wäre die verstärkte zelluläre Deformation durch vermehrte rein mechanische Kompression bei fehlender Lastverteilung möglich, durch die andere Zellherkunft aus primär tiefer gelegenen Knorpelschichten mit gegebenenfalls anderen mechanischen oder synthetischen Eigenschaften oder durch verstärkte Stömungspotentiale.

Die gleichbleibende Zelldichte unter Belastung kann auf eine gleichbleibende Zell- Matrix Relation bei Flüssigkeitsausstrom aus dem Chondrozyten in die Matrix mit konsekutiv kleineren Zellen zurückzuführen sein.

Wir führen die Divergenzen bei einer kollagenfaser- und zellmorphologisch- definierten Zoneneinteilung unter Belastung auf unterschiedliche viskoelastische Eigenschaften von Zellen und Matrix zurück. Wir stellen uns dabei ein zeitlich differentes Deformations- und Relaxationsverhalten vor, mit langsamerer zellulärer Antwort. Da Zelldeformation auch eine Änderung der metabolischen Aktivität nach sich ziehen kann, scheint dies bei Beachtung kurzfristiger, reversibler Belastung sinnvoll.

Auch für die Rückschlüsse zur Pathogenese der Osteoarthritis möchten wir auf unser Modell der Flüssigkeitsströme zurückgreifen. „Creep“ gewinnt bei defekter Oberfläche eine größere Bedeutung im Vergleich zur elastischen Komponente der Lastreaktion. Seine Reversibilität scheint bei beschädigter Oberfläche eine längere Zeit einzunehmen. Es wäre vorstellbar, daß bei zyklischer Belastung die Entlastungsphase ab einem gewissen Stadium der Oberflächenschädigung kleiner wird, als die zur Rückbildung der Veränderungen nötige Zeit. Eine anhaltende Deformation der Zellen hat gewiß Auswirkungen auf die Syntheseleistung. Reparaturvorgänge könnten unzureichend werden und ein Oberflächenschaden fortschreiten.

Die Schädigung der Oberfläche käme dann der Eintrittspforte in einen „Teufelskreis der Osteoarthritis“ gleich.

Da „Creep“ abhängig von der lokalen Proteoglykankonzentration und ihren zonalen Unterschieden ist, wäre eine Untersuchung der Verteilung des Proteoglykangehaltes unter Belastung und bei hier bei verschiedenen Oberflächenzuständen hoch interessant. Auf diese Weise könnte ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen Morphologie und Funktion geschaffen werden und wertvolle Hinweise zur Biomechanik intakten und pathologisch veränderten Knorpels gefunden werden.

Eine Untersuchung mit der hier verwendeten Methodik unter zyklischer Belastung könnte weiteren Aufschluß über die zelluläre Deformation und ihrer Rückbildung in Abhängigkeit von verschiedenen langer Be- und Entlastungsphasen bei intakter und geschädigter Oberfläche geben. Dies könnte weiter zur genaueren Deutung der durch die Deformation beeinflussten Biosynthese verwendet werden und der Folgen einer übermäßigen Belastung auf Reparaturvorgänge. Schließlich könnten sich in Fortsetzung unserer Studie hieraus noch genauere Vorstellungen über die Pathogenese der Osteoarthritis ableiten lassen.

Untersuchungen zur dynamisch – funktionellen zonalen Unterteilung des Gelenkknorpels im Hinblick auf die vorgefundenen zellmorphologisch und kollagenfaserarchitektonischen Differenzen könnten ein weiteres differenziertes Verständnis zur Deformationsantwort des Gelenkknorpels geben.

9 Literaturnachweis

1. Akizuki S, Mow VC, Muller F et al.: „Tensile properties of human knee joint cartilage: Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus“ J Orthop Res (US), 1986, 4(4) p379-92
2. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P et al.: „The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase“ J Exp Med (US), Dec 1 1995, 182(6) p2097-102
3. Anfeld M: „Der Chondrozyt, das lebende Element des Gelenkknorpels“ in Fassbender: „Gelenkknorpel und Arthrose“, pp 29-40, Huber, Bern 1983
4. Armstrong CG, Gardner DI: „Thickness distribution of human femoral head articular cartilage“ Ann Rheum Dis 1977; 36; 407-12
5. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE: „Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism“ Connect Tissue Res (GB), 1988, 18(3) p223-34
6. Bachrach NM, Valhmu WB, Stazzone E et al.: „Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment“ J Biomech (US), Dec 1995, 28(12) p1561-9
7. Bader DL, Kempson GE: „The short-term compressive properties of adult human articular cartilage“ Biomed Mater Eng (US), 1994, 4(3) p245-56
8. Bank RA et al: „The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation“ Arth Rheum 2000; 43(10): 2202-2210
9. Bayliss in Kuettner KE (Ed.): „Articular cartilage and Osteoarthritis“ 1992, pp. 487-99, Raven press, N.Y
10. Benga G, Pop VI, Ionescu M et al.: „Irreversible inhibition of water transport in erythrocytes by fluoresceinmercuric acetate“ Cell Biol Int Rep (GB), Aug 1982, 6(8) p775-81
11. Benjamin M, Archer CW, Ralphs JR: „Cytoskeleton of cartilage cells“ Microsc Res Tech (US), Aug 1 1994, 28(5) p372-7
12. Benninghoff A: „Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion“ Zeitschrift für Zellforschung 1925, 2, p783-862
13. Benninghoff: „Anatomie“ Bd.1., 14. Aufl. Urban und Schwzenberg, 1994
14. Bertram C, Lierse W: „Morphometric evaluation of chondrocyte cavities in normal and prearthrotic human femoral heads“ Acta Anat (Basel) (CH), 1991, 140(2) p183-92
15. Bran: Dissertationsschrift, Stanford, USA, 1994
16. Brighton CT, Kitajima T, Hunt RM: „Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes“ Arthritis Rheum (US), Nov 1984, 27(11) p1290-9
17. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A et al.: „Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes“ Clin Orthop (US), May 1996, (326) p270-83
18. Broom ND, Marra DL: „New structural concepts of articular cartilage demonstrated with a physical model“ Connect Tissue Res (GB), 1985, 14(1) p1-8
19. Broom ND, Myers DB: „A study of the structural response of wet hyaline cartilage to various loading situations“ Connect Tissue Res (GB), 1980, 7(4) p227-37

20. Broom ND, Myers DD: „Fibrous waveforms or crimp in surface and subsurface layers of hyaline cartilage maintained in its wet functional condition“ *Connect Tissue Res (GB)*, 1980, 7(3) p165-75

21. Buckwalter JA, Lohmander S: „Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development“ *JBJS Am (US)*, Sep 1994, 76(9) p1405-18

22. Buckwalter JA, Mankin HJ: Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons – „Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation“ [Record Supplied By Aries Systems] *JBJS Am*, Apr 1997, 79-A(4) p612-632

23. Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A: „Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage“ [Record Supplied By Publisher] *J Am Acad Orthop Surg (US)*, Jul 1994, 2(4) p192-201

24. Buddecke E (Ed): „Grundriß der Biochemie“ De Gruyter, 14. Auflage, Oktober 1994

25. Buschmann MD, Hunziker EB, Kim YJ et al.: „Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage“ *J Cell Sci (GB)*, Feb 1996, 109 (Pt 2) p499-508

26. Carney SL, Billingham ME, Muir H et al.: „Structure of newly synthesised (35S)-proteoglycans and (35S)-proteoglycan turnover products of cartilage explant cultures from dogs with experimental osteoarthritis“ *J Orthop Res (US)*, 1985, 3(2) p140-7

27. Carter DR: „Mechanical loading history and skeletal biology.“ *J Biomech*, 1987, 20, 1095-1109

28. Chen CT et al.: „Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage“ *J Orthop Res* 2001, 19 (4) :703-711

29. Chen HS, Acrivas A et al.: „The effective elastic moduli of composite materials containing spherical inclusions at non-dilutive concentrations“ *Int J Solid Struct* 14, 1978, 349-64

30. Clark JM: „The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study“ *J Orthop Res (US)*, 1985, 3(1) p17-29

31. Clarke IC: „Surface characteristics of human articular cartilage--a scanning electron microscope study“ *J Anat (GB)*, Jan 1971, 108(1) p23-30

32. Clarke IC: „Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. 1.The interterritorial fibrillar architecture“ *JBJSBr (GB)*, Nov 1971, 53(4) p732-50

33. Clements KM et al.: „How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage?“ *Osteoarth Cart* 2001, 9(5): 499-507

34. Coletti JM, Akeson WH, Woo SL: „A comparison of the physical behavior of normal articular cartilage and the arthroplasty surface“ *JBJSAm (US)*, Jan 1972, 54(1) p147-60

35. Debrunner: „Orthopädie und Orthopädische Chirurgie“, Huber - Verlag, Bern, 1983

36. Deuffner J, Jensen U, Schumacher E: „Statistik mit SAS“, Teutner Verlag, Stuttgart, 1992

37. Durr J, Lammi P, Goodman SI et al.: „Identification and immunolocalization of laminin in cartilage“ *Exp Cell Res* 222, 1996, p225-33

38. Durrant in: „Transactions of the Orthopaedic Research Society“, 1996, 21, p289 aus Eckstein et al.: „Aktuelle Aspekte zu Aufbau, funktioneller Anpassung und mechanisch bedingter Degeneration des Gelenkknorpels“ *Sportortopädie- Sporttraumatologie* 1996, 12.3

39. Eckstein et al.: „Aktuelle Aspekte zu Aufbau, funktioneller Anpassung und mechanisch bedingter Degeneration des Gelenkknorpels“ *Sportortopädie- Sporttraumatologie* 1996, 12.3

40. Eckstein F et al.: „Quantitative analysis of incongruity, contact areas and cartilage thickness in the human

-
41. Eckstein F, Müller-Gerbl M, Putz R: „Distribution of subchondral bone density and cartilage thickness in the human patella“ J Anat 1992, 180: 425-433
-
42. Eggli PS, Hunziker EB, Schenk RK : „Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits“ Anat Rec (US), Nov 1988, 222(3) p217-27
-
43. Faber U, Walther D: „Animal experimental studies on the regeneration capability of the hyaline cartilage and on the possibilities of stimulation of the cartilage regeneration“ Arch Orthop Unfallchir (Germany, West), 1966, 59(4) p401-8
-
44. Fischer H, Putz R: „Zur zonalen Deformation des Gelenkknorpels bei definierter Belastung in vitro“, Veh. Anat. Ges. 1991, 84: 67-68
-
45. Fischer H: „Darstellung und Anordnung der kollagenen Fibrillen in der Matrix des Gelenkknorpels“ Doctoral Dissertation , Freiburg i.Br., 1988
-
46. Freeman DM et al.: „Short TE MR Microscopy: Accurate Measurement and Zonal Differentiation of Normal Hyaline Cartilage“ MRM, 1997, 38:72-81
-
47. Freeman PM, Natarajan RN, Kimura JH et al.: „Chondrocyte cells respond mechanically to compressive loads“ J Orthop Res (US), May 1994, 12(3) p311-20
-
48. Fritz W.G.: „Funktionelle Anpassung des Rinderhüftgelenkes“ Dissertation, Köln, 1975
-
49. Furukawa T, Eyre DR, Koide S et al.: „Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee“ JBJSAm (US), Jan 1980, 62(1) p79-89
-
50. Glant TT, Hadhazy C, Mikecz K et al.: „Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II“ Histochemistry (Germany, West), 1985, 82(2) p149-58
-
51. Glaser C, Putz R: „Functional anatomy of articular cartilage under compressive loading. Quantitative aspects of global, local and zonal reactions of the collagenous network with respect to the surface integrity“ Osteoarthritis Cartilage 2002, Feb; 10(2):83-99
-
52. Glaser C: „Kollagenfaserarchitektur des Gelenkknorpels unter verschiedenen mechanischen Belastungssituationen“ Diisertation, München, 2000
-
53. Gore DM, Higginson GR, Minns RJ: „Compliance of articular cartilage and its variation through the thickness“ Phys Med Biol (GB), Mar 1983, 28(3) p233-47
-
54. Guilak F, Mow VC: „Determination of the mechanical response of the chondrocyte in situ using confocal microscopy and finite element analysis“ ASME Adv. Bioeng BED, 1992, 22, 21-23
-
55. Guilak F, Ratcliffe A, Mow VC: „Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study“ J Orthop Res (US), May 1995, 13(3) p410-21
-
56. Guilak F: „Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus“ J Biomech (US), Dec 1995, 28(12) p1529-41
-
57. Guilak F: „The deformation behaviour and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage“ Biomechanics 2000: 37 (1-2):27-44
-
58. Guilak F: „Volume and surface area measurement of viable chondrocytes in situ using geometric modelling of serial confocal sections“ J Microsc, 1994, 173: 245-56
-
59. Hayes WC, Mockros LF: „Viscoelastic properties of human articular cartilage“ J Appl Physiol (US), Oct

-
60. Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP et al.: „Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage“ *APMIS (Denmark)*, Feb 1993, 101(2) p133-40
-
61. Heinegard, Pimental in Küttner KE: „Articular Cartilage and Osteoarthritis“ 1992., S.95, Raven Press, N.Y.
-
62. Hori RY, Mockros LF: „Indentation tests of human articular cartilage“ *J Biomech (US)*, 1976, 9(4) p259-68
-
63. Huber M et al: „Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage“ *Investigate Radiology*, 2000, Vol. 35, Number 10, 573-580
-
64. Hulkrantz W: *Verh. Anat Ges.* 12: 248; 1898 aus Eckstein et al.: „Aktuelle Aspekte zu Aufbau, funktioneller Anpassung und mechanisch bedingter Degeneration des Gelenkknorpels“ *Sportortopädie-Sporttraumatologie* 1996, 12.3
-
65. Jeffrey Ak, Blum GW, Archer CW: „Three dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage“ *JBJS* 1991, 73B, 795-801
-
66. Jurvelin J, Saamanen AM, Arokoski J et al.: „Biomechanical properties of the canine knee articular cartilage as related to matrix proteoglycans and collagen“ *Eng Med (GB)*, Oct 1988, 17(4) p157-62
-
67. Kaab MJ et al.: „Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading „ *J Orthop Res* 1998, 16(6), 743-751
-
68. Kempson GE, Spivey CJ, Swanson SA et al.: „Patterns of cartilage stiffness on normal and degenerate human femoral heads“ *J Biomech (US)*, Dec 1971, 4(6) p597-609
-
69. Kim HK, Moran ME, Salter RB: „The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits“ *JBJSAm (US)*, Oct 1991, 73(9) p1301-15
-
70. Kim YJ, Bonassar LJ, Grodzinsky AJ: „The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression“ *J Biomech (US)*, Sep 1995, 28(9) p1055-66
-
71. Kincaid SA, Van Sickle DC: „Regional histochemical and thickness variations of adult canine articular cartilage“ *Am J Vet Res (US)*, Mar 1981, 42(3) p428-32
-
72. Lee DA et al.: „The development and characterization of an in vitro system to study strain-induced cell deformation in isolated chondrocytes“ *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995, 31(11): 828-835
-
73. Lippiello L, Kaye C, Neumata T et al.: „In vitro metabolic response of articular cartilage segments to low levels of hydrostatic pressure“ *Connect Tissue Res (GB)*, 1985, 13(2) p99-107
-
74. Lovász G et al.: „Cartilage Changes Caused by Coronal Surface Stepoff in a Rabbit Model“ *Clin Ortop and Rel Research*, 1998, Number 354, 224-234
-
75. Mak AF: „The apparent viscoelastic behavior of articular cartilage--the contributions from the intrinsic matrix viscoelasticity and interstitial fluid flows“ *J Biomech Eng (US)*, May 1986, 108(2) p123-30
-
76. Mankin HJ, Thrasher AZ: „Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage“ *JBJSAm (US)*, Jan 1975, 57(1) p76-80
-
77. Mankin HJ: „Chondrocyte transplantation--one answer to an old question“ *N Engl J Med (US)*, Oct 6 1994, 331(14) p940-1
-
78. Mankin HJ: „The response of articular cartilage to mechanical injury“ *JBJSAm (US)*, Mar 1982, 64(3) p460-6

79. Maroudas A: „Physiochemical properties of articular cartilage“, in Freeman MAR (Ed): „Adult articular cartilage“ 215-290, 1979, Pitman Med. Publishers, Kent
-
80. Martin, Buckwalter JA: „Articular cartilage: aging and degeneration“ Sports Med and Arthrosc.1996, Rev 4, 263-75
-
81. Mason RM: „Recent advantages in the biochemistry of hyaluronic acid in cartilage“ in: Deyl Z, Adam M (Ed): Connect Tissue Res 1981, 87-112
-
82. Masoud I et al.: „A longitudinal study of the growth of the New Zealand White rabbit: Cumulative and biweekly incremental growth rate for body length, body weight, femoral length and tibial length“ J Orthop Res 1986, 4, 221-231
-
83. Meachim G, Collins DH: „Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate in vitro“ Ann Rheum Dis 1962, 21: 45
-
84. Meachim G, Stockwell RA: „The Matrix“ in Freeman MAR (Ed): Adult Art Cart ,1979, 2nd ed, 1-67, Pitman Med.,London
-
85. Milz S, Eckstein F, Putz R: „The thickness of the subchondral plate and its correlation with the thickness of the uncalcified articular cartilage in the human patella“ Anat Embryo 1995, 192: 437-444
-
86. Miosge N, Flachsbarth K, Goetz W et al.: „Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage“ Histochem J (GB), Dec 1994, 26(12) p939-45
-
87. Mitrovic D et al.: „Cell Density of Adult Human Femoral Condylar Articular Cartilage“ Laboratory Investigation, 1983, Vol. 49. No 3, p309
-
88. Modl JM, Sether LA, Haughton VM et al.: „Articular cartilage: correlation of histologic zones with signal intensity using MR imaging“ Radiology 1991; 181; 853-55
-
89. Mow VC, Holmes MH, Lai WM: „Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review“ J Biomech (US), 1984, 17(5) p377-94
-
90. Mow VC, Kuei SC, Lai WM et al.: „Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments“ J Biomech Eng (US), Feb 1980, 102(1) p73-84
-
91. Mow VC, Ratcliffe A in Mow CV, Hayes WC (Ed): Basic orthop biomechs 2nd edition 1996, Raven press
-
92. Mow VC, Ratcliffe A: „Articular cartilage“ in: Extracell Matrix Vol 1, „Tissue Function“ 1996, 234-302, The Netherlands Harwood Acad. Pub.
-
93. Mow VC: „Advanced theoretical and experimental techniques in cartilage research“ in: Biomechanics: „Principles and Applications“ 1982, pp 47-74, Martinus Nijhoff Pub., The Hague
-
94. Muir H, Bullough P, Maroudas A: „The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications“ JBJSBr (GB), Aug 1970, 52(3) p554-63
-
95. Muir H: „Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix“ Biochem Soc Trans (GB), Dec 1983, 11(6) p613-22
-
96. Müller-Gerbl M et al.: „The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported? „J Anat 1987, 154: 103-111
-
97. Newman P, Watt FM: „Influence of cytochalasin D-induced changes in cell shape on proteoglycan synthesis by cultured articular chondrocytes“ Exp Cell Res (US), Oct 1988, 178(2) p199-210
-
98. O`Connor JJ, Johnston I: „Mechanics of the osteoarthrosis of the knee“ . 14th congress of biomechanics,

-
99. Ohno O et al: „An Electron Microscopic Study of Early Pathology in Chondromalacia of the Patella“ JBJS 1988, 70-A, 6, 883- 899
-
100. Omelianenko NP: „A quantitative analysis of the ultrastructural organization of extracellular components in human articular cartilage“. Clin Orthop (US), May 1991, (266) p34-41
-
101. Palfrey AJ: „Matrix structure in articular cartilage“ Am Rheum Dis 1975; 34, Suppl. p20
-
102. Panula HE et al.: „Articular cartilage superficial zone collagen birefringence reduced and cartilage thickness increased before surface fibrillation in experimental osteoarthritis“ Ann Rheum Dis 1998; 57: 237-245
-
103. Parkkinen JJ, Lammi MJ, Helminen HJ et al.: „Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro“ J Orthop Res (US), Sep 1992, 10(5) p610-20
-
104. Parsons JR, Black J: „The viscoelastic shear behavior of normal rabbit articular cartilage“ J Biomech (US), 1977, 10(1) p21-9
-
105. Paukkonen K, Helminen HJ: „Decrease of proteoglycan granule number but increase of their size in articular cartilage of young rabbits after physical exercise and immobilization by splinting“ Anat Rec (US), Sep 1987, 219(1) p45-52
-
106. Poole CA, Ayad S, Gilbert RT: „Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy“ J Cell Sci (GB), Dec 1992, 103 (Pt 4) p1101-10
-
107. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW: „Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure“ J Orthop Res (US), 1988, 6(3) p408-19
-
108. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW: „Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices“ J Anat (GB), Jan 1984, 138 (Pt 1) p113-38
-
109. Poole CA, Gilbert RT et al.: „Immunolocalisation of type IV collagen, decorin and fibromodulin in articular cartilage and isolated chondrons“ Transactions of Orthop Res Soc 1993, 39, 644
-
110. Poole CA, Gilbert RT, Herbage D et al.: „Immunolocalization of type IX collagen in normal and spontaneously osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons“ Osteoarthritis Cartilage (GB), May 1997, 5(3) p191-204
-
111. Poole CA: „Articular cartilage chondrons: form, function and failure“ J Anat (GB), Jul 1997, 191 (Pt 1) p1-13
-
112. Putz R, Fischer H: „Altersunterschiede der Anordnung der kollagenen Fasern im Gelenkknorpel“ Osteologie aktuell VII 1993, 42-44
-
113. Ragan PM et al: „Chondrocyte extracellular matrix synthesis and turnover are influenced by static compression in a new alginate disk culture system“ Arch Biochem Biophys 2000, 15; 383(2), 256-64
-
114. Ranke I, Ranke TP Quant: „Analyse der Knorpelzellichte und des Chondrozytenmusters im transitorischen hyalinen Knorpel der embryonalen Anlagen von Sternum und Patella“, Med. Diplomarbeit, 1986, Leipzig
-
115. Ratcliffe A, Mow VC: „Articular cartilage“ in: Extracell Matrix Voll, Tissue Function 1996, 234-302, The Netherlands Harwood Acad. Pub.
-
116. Romeis B et al.: „Mikroskopische Technik“ , 17.Aufl., 1989, Oldenbourg München , pp373-416
-
117. Roth V, Mow VC: „The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age“ JBJSAm (US), Oct 1980, 62(7) p1102-17

118. Rother P, Ranke TP, Forriol F et al.: „Quantitative analysis of cell density and pattern of chondrocytes in transitory hyaline cartilage anlagen of human tarsal bones“ *Acta Anat (Basel) (CH)*, 1990, 138(4) p327-31
-
119. Rudert M, Wirth CJ: „[Cartilage cell transplantation. Experimental principles and clinical applications“ *Orthopäde (Germany)*, Aug 1997, 26(8) p741-7
-
120. Rudert M, Wirth CJ: „Cartilage regeneration and substitution“ *Orthopäde (Germany)*, May 1998, 27(5) pW309-21
-
121. Rudert M, Wirth CJ: „Techniques of cartilage grow enhancement: a review of the literature“ *Arthroskopie* 1996, 12, 3, 300-8
-
122. Sah RL, Kim YJ, Doong JY et al.: „Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression“ *J Orthop Res (US)*, 1989, 7(5) p619-36
-
123. Saxena RK, Sahay KB, Guha SK: „Morphological changes in the bovine articular cartilage subjected to moderate and high loadings“ *Acta Anat (Basel) (CH)*, 1991, 142(2) p152-7
-
124. Schmidt MB, Mow VC, Chun LE et al.: „Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage“ *J Orthop Res (US)*, May 1990, 8(3) p353-63
-
125. Schunke M, Tillmann B, Bruck M et al.: „Morphologic characteristics of developing osteoarthrotic lesions in the knee cartilage of STR/IN mice“ *Arthritis Rheum (US)*, Jul 1988, 31(7) p898-905
-
126. Setton LA, Zhu W, Mow VC: „The biphasic poroviscoelastic behavior of articular cartilage: role of the surface zone in governing the compressive behavior“ *J Biomech (US)*, Apr-May 1993, 26(4-5) p581-92
-
127. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ: „Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage“ *JBJSAm (US)*, Apr 1993, 75(4) p532-53
-
128. Shepherd DET, Seedhom BB: „Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb“ *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 27-34
-
129. Simon WH: „Scale effects in animal joints. Articular cartilage thickness and compressive stress“ *Arth Rheum* 1970, 13: 244-255
-
130. Smith RL, Donlon BS, Gupta MK et al.: „Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro“ *J Orthop Res (US)*, Nov 1995, 13(6) p824-31
-
131. Stockwell R: „The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage“ *J Anat* 1971; 109: 411-421
-
132. Stockwell RA: „Chondrocytes“ *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol) (GB)*, 1978, 12 p7-13
-
133. Stockwell RA: „Structural and histochemical aspects of the pericellular environment in cartilage“ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (GB)*, Jul 17 1975, 271(912) p243-5
-
134. Stockwell RA: „The cell density of human articular and costal cartilage“ *J Anat* 1967; 101: 753-763
-
135. Szirmai JA: „Structure of cartilage“ in: Enyd A(Ed): „Ageing of Connective and Skeletal Tissue“, 1969, 163-84, Stockholm Nordiska Bokhandeln
-
136. Teshima R, Treadwell BV, Trahan CA et al.: „Comparative rates of proteoglycan synthesis and size of proteoglycans in normal and osteoarthrotic chondrocytes“ *Arthritis Rheum (US)*, Oct 1983, 26(10) p1225-30
-
137. Torzilli PA, Arduino JM, Gregory JD et al.: „Effect of proteoglycan removal on solute mobility in articular cartilage“ *J Biomech (US)*, Sep 1997, 30(9) p895-902
-
138. Trickey TR, Lee M, Guilak T: „Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthrotic

human cartilage“ J Orthop Res 2000, 18(6), 891-898

-
139. Urban JP, Hall AC, Gohl KA: „Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes“ J Cell Physiol (US), Feb 1993, 154(2) p262-70
-
140. van de Wijngaert FP, Schipper CA, Tas MC et al.: „Role of mineralizing cartilage in osteoclast and osteoblast recruitment“ Bone (US), 1988, 9(2) p81-8
-
141. Vasan N: „Proteoglycans in normal and severely osteoarthritic human cartilage“ Biochem J (GB), Jun 1 1980, 187(3) p781-7
-
142. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ et al.: „Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage“ JBJSAm (US), Apr 1994, 76(4) p579-92
-
143. Weiss C, Rosenberg L, Helfet AJ: „An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage“ JBJSAm (US), Jun 1968, 50(4) p663-74
-
144. Weiss C: „Normal and osteoarthritic articular cartilage“ Orthop Clin North Am (US), Jan 1979, 10(1) p175-89
-
145. Wong M, Wuethrich P, Eggli P et al.: „Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography“ J Orthop Res (US), May 1996, 14(3) p424-32
-
146. Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM et al.: „Collagen arrangement in cartilages“ Acta Anat (Basel) (CH), 1982, 113(1) p26-38
-
147. Zanetti M, Ratcliffe A, Watt FM: „Two subpopulations of differentiated chondrocytes identified with a monoclonal antibody to keratan sulfate“ J Cell Biol 1985, 101: 53-59
-
148. Zanetti et al.: „Effect of cell shape on cartilage differentiation“ in: Cell shape : „Determinants, Regulation and Regulatory Role“ , pp 292-327. Ed by Stein&Bronner San Diego Academic Press 1989
-
149. Zarek JM and Edwards J: „The stress- structure relationship in articular cartilage“ Med. Electron. Biol. Eng. Vol. 1, 1963 : 479-507

Danksagung

Für die Überlassung des Themas bedanke ich mich bei Herrn Professor R. Putz

Für die durchgehende Betreuung bei der Bearbeitung danke ich Herrn Dr. Ch. Glaser

Für die stets freundliche, kompetente und geduldige Unterstützung danke ich Frau G. Lippelt
und Frau C. Dinter sowie allen Mitarbeitern des Instituts

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Freunden, die mich über die lange, oft schwierige, aber auch lehrreiche und formende Zeit der Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere tusend takk for Brele, die immer und überall für mich da war, egal ob persönlich, per email, sms, Post oder Telefon.

Einen riesigen Dank an G.

Großer Dank geht an Gabi und Ina und Ruth für ihre umfassende Unterstützung und Hilfestellung jeglicher Art und sei es in Form von Schokolade (vor allem in der experimentellen Phase).

Viele Grüße an Regi, der es bei der Suche nach zwei Buchstaben und einem Punkt genauso erging wie mir.

Dank besonders an Christian K. und Christian E. für ihre Hilfe bei zahllosen undurchsichtigen Computerproblemen. Genauso bedanke ich mich bei Christian W., der besonders in der ersten Endphase für die nötige Motivation gesorgt hat.

Ich danke meinem ersten Oberarzt Dr. Engels für sein ärztliches, operatives und menschliches Vorbild und meinen Kollegen Markus und Karim für viel Spaß bei der klinischen Arbeit und das Ertragen meiner Augenringe, während ich an den Korrekturen zu feilen hatte.

Hallo an Eva, Leila und Sara!

Zuletzt danke ich ganz besonderes meiner Mutter für ihre Liebe, ihre große Geduld und ihr grenzenloses Verständnis in schwierigen Phasen, für ihre unbeschränkte Unterstützung, und dafür, daß sie immer an mich geglaubt hat.

CURRICULUM VITAE

YVONNE MARIA BERNADETTE KOLLRACK

- Persönliche Daten:** Yvonne Maria Bernadette Kollrack, geboren am 03.03.1975 in Singen am Hohentwiel als Tochter von Gerlinde Kollrack (geb. Hicksch) und Dr.med. Dipl. Psych. H.W. Kollrack
- Schulausbildung:** 1981 – 1985 Grundschule Marbach, Marburg
1985 – 1994 Humanistisches Gymnasium, Marburg
- Universitätsausbildung:** 1994 – 1996 Studium der Medizin,
Philipps-Universität Marburg
1996 – 1997 Studium der Medizin,
Leopold-Franzens-Universität
Innsbruck, Österreich
1997 – 2001 Studium der Medizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München
- Universitätsabschluß:** 24.10.2001 Ärztliche Prüfung mit der Note sehr gut
- Ärztliche Tätigkeit:** 01/2002- 6/2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für
Allgemein- und Gefäßchirurgie des Josephs-
Hospitals Warendorf (Prof. Dr. M. Arndt)
07/2003 –9/2003 Assistenzärztin in der Abteilung für Notfall
und Intensivmedizin des Josephs- Hospitals
Warendorf (Dr. med. R. Wisdorf)
ab 01.10.2003 Assistenzärztin in der Abteilung für Unfall,-
Hand- und Wiederherstellungschirurgie des
Krankenhauses der Bramherzigen Brüder
Regensburg (Prof. Dr. Neugebauer)

Warendorf, im September 2003

