

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Erprobung eines resorbierbaren Bioimplantates zum
Knorpelersatz im Schafsfermur**

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

vorgelegt von
Stefanie Schrödl
aus München/Bayern
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Kessler

Prof. Dr. K. Kunze

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. P. E. Müller

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen

Prüfung: 23.Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Bedeutung chondraler Gelenkdefekte.....	1
1.2. Allgemeiner Knorpelaufbau.....	3
1.3. Bisheriger Forschungsstand.....	7
2. Versuchsziele.....	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1. Implantate - Material und Bearbeitung.....	17
3.2. Versuchstiere.....	18
3.3. Protokolle.....	19
3.3.1. Operationsverfahren und –technik	19
3.3.2. Postoperatives Vorgehen.....	23
3.3.3. Postoperative Befunde.....	23
3.3.4. Materialentnahme.....	23
3.4. Methoden zur Weiterverarbeitung.....	24
3.4.1. Makroskopie.....	24
3.4.2. Mikroskopie.....	24
3.4.2.1. Herstellung histologischer Schnitte.....	24
3.4.2.2. Färbung mit HE, Safranin-O, Toluidin blau	25
3.4.2.3. Immunlabelling Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan.....	25
3.4.3. Auswertung mittels O'Driscoll Score.....	27
3.4.4. Prozentuale Defektdeckung.....	27
3.4.5. Statistische Auswertung.....	28
4. Ergebnisse.....	29
4.1. vorzeitiger Abbruch.....	29
4.2. Leerlöcher.....	29
4.2.1. Makroskopische Betrachtung	29
4.2.2. Histologie	31
4.2.3. Immunhistochemische Markierung.....	34
4.2.4. Erweiterter O'Driscoll Score.....	40
4.3. Knorpelimplantate.....	41
4.3.1. Makroskopische Betrachtung.....	41
4.3.2. Histologie	43
4.3.3. Immunhistochemische Markierung.....	46
4.3.4. Erweiterter O'Driscoll Score.....	52

4.4. Prozentuale Defektdeckung.....	55
4.5. Statistische Auswertung.....	56
5. Diskussion.....	57
5.1. Probleme der Arthrose und Endoprothetik.....	57
5.2. Aktuelle Operationsverfahren und Behandlungstechniken.....	57
5.3. Bioimplantate zur Deckung rein chondraler Defekte.....	59
5.3.1. Prinzip.....	59
5.3.2. Implantataufbau.....	59
5.3.3. Versuchstiere.....	62
5.3.4. Auswertung mittels Score.....	64
5.4. Diskussion der Ergebnisse.....	66
5.4.1. Problematik des Scores.....	66
5.4.2. Probleme bei den Implantaten.....	68
5.5. Vergleich mit anderen Forschungsgruppen.....	67
5.6. Zusammenfassung.....	71
6. Literaturverzeichnis	73
7. Anhang.....	85
7.1. App. 1.....	85
7.2. Tab. 1.....	86
7.3. Tab. 2.....	87
7.4. Tab. 3.....	89
8. Lebenslauf	90
9. Danksagung	91

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung chondraler Gelenkdefekte

Knorpeldefekte beim Menschen stellen insbesondere im Hüft- und Kniegelenk ein großes Problem dar. Bei jungen Menschen entstehen sie als isolierte, lokalisierte Knorpeldefekte ohne Störung des subchondralen Knochens durch Trauma (bei Sportverletzungen) oder Nekrose (z.B. Osteochondrosis dissecans, Morbus Ahlbäck) im Sinne einer sekundären Arthrose, bei älteren Menschen im Rahmen der mit steigendem Lebensalter zunehmenden Abnutzung der Gelenke als primäre Arthrose. Diese Knorpelläsionen sind wegen der äußerst begrenzten Fähigkeit des Knorpelgewebes zur spontanen Selbstheilung [20,24,31] gefürchtete Defekte, die zu fortschreitender Degeneration der Gelenkoberfläche [40] mit stärksten Schmerzen und Funktionseinschränkung führen. 5 Millionen Menschen in Deutschland - das sind 6 % der Gesamtbevölkerung und 20% der Bevölkerung nach dem 40. Lebensjahr - leiden gemäß den Angaben des Zentralinstitutes der Krankenkassen, München an einer Arthrose, der häufigsten Gelenkerkrankung [112]. Da die primäre Arthrose mit dem Alter korreliert, ist bei steigender Lebenserwartung mit einer starken Zunahme der Fallzahlen zu rechnen: Experten schätzen, daß im Jahr 2010 bereits jeder Fünfte betroffen sein wird [95]. Der schmerzhafte Verschleiß des Gelenkknorpels ist eine der häufigsten Ursachen für Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung. Finanzielle Nachteile für den Patienten, aber auch materielle Einschränkungen für die Familie sind die Folge. Vorzeitige Berentung, Sportunfähigkeit und verminderte Mobilität führen schnell zu einer Ausgrenzung oder einem Rückzug aus dem gesellschaftlichen Umfeld und können zur Vereinsamung führen.

Die momentan existierenden zahllosen konservativen und operativen Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten erreichen in der Regel nur eine vorübergehende Linderung der Beschwerden und sind in ihrer Gesamtheit unbefriedigend, vor allem

was die Langzeitprognose betrifft [32]. In letzter Konsequenz müssen die Patienten endoprothetisch versorgt werden, mit der Problematik der hohen Kosten, der langen Arbeitsunfähigkeit und den bei Operationen in jungen Jahren häufig notwendigen Wechseloperationen, da die Endoprothesen aufgrund von Materialabnutzung und septischer oder aseptischer Lockerung im Durchschnitt nur ca. 12-15 Jahre halten [89,90,107]. Demzufolge beobachtet man von Jahr zu Jahr steigende Implantationszahlen und, aufgrund der steigenden Lebenserwartung, auch zunehmende Zahlen an Wechseloperationen. Wurden 1989 noch 80.000 Hüft- und 15.000 Knieendoprothesen implantiert, so waren es 1999 in Deutschland bereits 150.000 Hüft- und 60.000 Knieendoprothesen, sowie 30.000 Wechselimplantationen, verbunden mit einem Kostenfaktor von 356 Millionen Euro/Jahr [112]. Eine suffiziente Verankerung der Prothese wird von Wechsel zu Wechsel durch das dünner und poröser werdende Knochenlager immer schwieriger. Hierdurch wird regelmäßig als Endpunkt mehrfacher Wechsel eine Arthroese des Kniegelenkes oder eine Girdlestone Situation des Hüftgelenks mit konsekutiv reduzierter Lebensqualität und Dauerinvalidität des Patienten erforderlich. Eng verbunden mit den fortschreitenden Gelenkerkrankungen ist somit nicht zuletzt das hohe Risiko der Dauerinvalidität durch Bewegungseinschränkungen und kontrakturbedingte Gelenkfehlstellungen mit Folgeschäden im Achsenskelett des Patienten. Nach Berechnungen des Zentralinstituts für Krankenkassen in München kostet die Arthrose die Kranken- und Rentenkassen jährlich mehr als 8 Milliarden Euro [112].

1.2. Allgemeiner Knorpelaufbau

Beim Menschen unterscheidet man drei Grundformen des Knorpelgewebes:

1. Elastischer Knorpel, wie er z.B. im Ohr, der Epiglottis oder den kleinen Bronchien vorkommt. Dieser Knorpel ist gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an elastischen Fasern [Abb.1.2.1.].
2. Faserknorpel, welcher morphologisch sowohl Eigenschaften von kollagenem Bindegewebe wie auch hyalinem Knorpel aufweist und der sich unter anderem in den Bandscheiben und den Menisken findet [Abb.1.2.1.].
3. Hyaliner Knorpel der Gelenkflächen (sowie der Rippen und von Teilen des Kehlkopfes). Insbesondere an den Gelenkflächen ist dieser Knorpel durch eine charakteristische Struktur und durch eine charakteristische molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gekennzeichnet [Abb.1.2.1.].

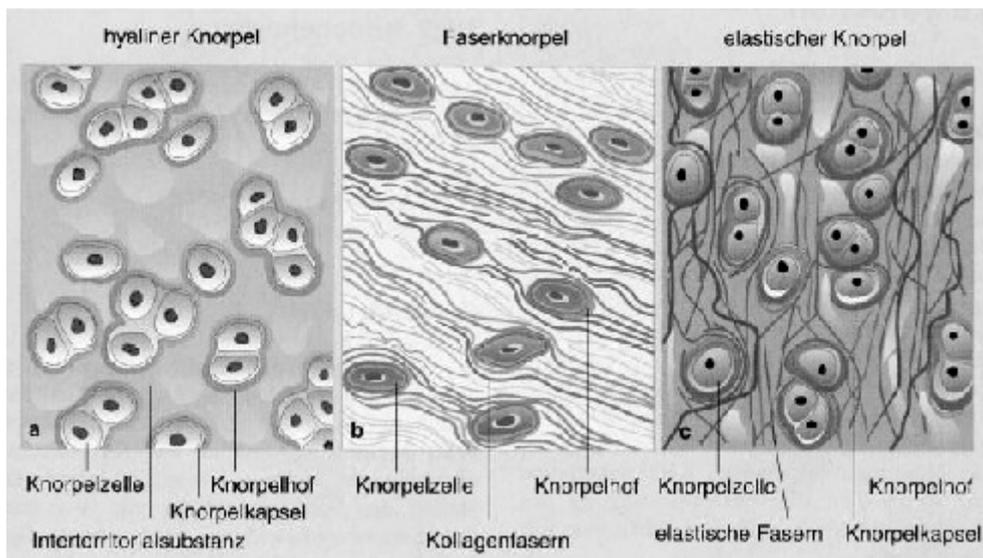


Abb.1.2.1.: Histologischer Aufbau von hyalinem, Faser- und elastischem Knorpel [98]

Zum besseren Verständnis soll im Folgenden kurz auf den anatomischen Aufbau des Knorpels im Allgemeinen und des hyalinen Gelenkknorpels im Besonderen eingegangen werden [Tab.1].

Knorpelgewebe nimmt aufgrund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften eine Mittelstellung zwischen Knochen und Bindegewebe ein [71]. Es ist fester und kompakter als Bindegewebe, in sehr geringem Maße mineralisiert und besitzt eine hohe Druckfestigkeit, sowie eine gewisse Zugelastizität, so daß es nach Deformierung von Außen seine ursprüngliche Form wieder annimmt [14,15].

Knorpelgewebe besteht zu 2-10 % aus Zellen, den Chondrozyten, die bevorzugt in kleinen Gruppen, den sogenannten Chondronen, zusammengelagert sind. Beim Erwachsenen teilen sich die Knorpelzellen in der Regel nicht mehr und nehmen in ihrer Gesamtzahl mit zunehmendem Alter ab [94]. Die Chondrozyten produzieren die sogenannte Interzellulärschubstanz, die amorphe Grundsubstanz des Knorpels, welche zu ca. 75% aus Wasser besteht und außerdem aus einer homogenen Matrix von Proteinen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und kollagenen Fasern. Der hohe Wassergehalt beeinflusst unter anderem die Gleiteigenschaften im Gelenk, während die kollagenen Fasern ein Netzwerk mit spezieller Architektur ausbilden, das dem Knorpel seine Festigkeit und Form gibt [94].

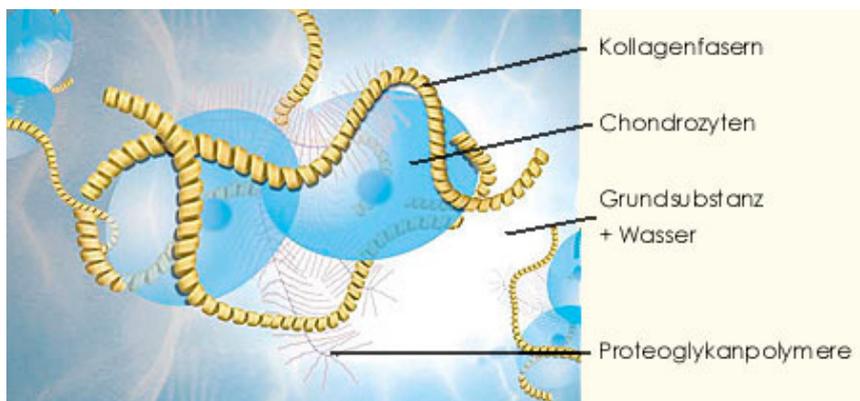


Abb.1.2.2.: Aufbau der Knorpelschubstanz [101]

Das Grundgerüst der Matrix wird von langen Hyaluronsäuremolekülen aufgebaut, an die sich die Proteoglykane mittels eigener Bindeproteine anheften. Das Hauptproteoglykan des menschlichen Knorpels ist das Aggrecan. Die Glykosaminoglykanketten (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatan-sulfat, Keratansulfat) wiederum sind radiär nach Art von Flaschenbürsten um die Kernproteine der Proteoglykane angeordnet. Aufgrund der hohen negativen Ladungen stoßen sich die mit dipolaren Wassermolekülen besetzten Glykosamino-

glykanseitenketten voneinander ab, woraus sich die prallelastische Druckfestigkeit des Knorpelgewebes ableitet [5,15,18,21].

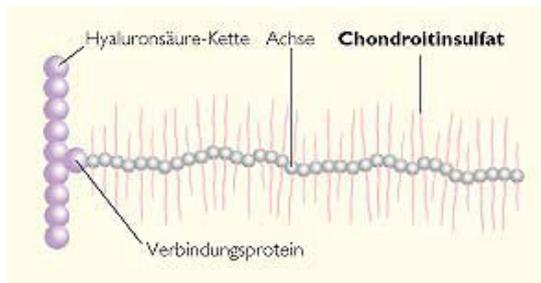


Abb. 1.2.3.: Schema eines Matrixmoleküls: Proteoglykane und Glykosaminoglykane binden sich an eine Hyaluronsäurekette [101]

In die Grundsubstanz sind außerdem fibrilläre Elemente in Form von Kollagenfasern eingelagert. Im reifen Knorpel finden sich viele dicke, dichtgepackte Fibrillen mit einem Durchmesser von 5 - 500 nm. Im hyalinen Knorpel bestehen sie zu 90 % aus Typ II Kollagen. Im Perichondrium und im Faserknorpel findet sich dagegen Typ I Kollagen [25], zusätzlich enthalten beide Knorpelarten in geringen Mengen Kollagen V, VI, IX und XI [108]. Um die einzelnen Knorpelzellen, bzw. -zellgruppen sind sehr dünne Fibrillen locker konzentrisch angeordnet, zwischen den Zellgruppen lagern sie sich zu Fasern aneinander und bauen parallel zur Hauptdehnungsrichtung des Knorpels ausgerichtete Faserbündel auf. Die kollagenen Fasern wirken in ihrer dreidimensionalen Ausrichtung dem Quellungsdruck der Proteoglykane entgegen und geben dem Knorpel somit auch eine gewisse Zugfestigkeit [43]. Im hyalinen Knorpel sind die Fasern unter dem Lichtmikroskop jedoch nicht sichtbar, sie sind wegen ihres Brechungsindexes „maskiert“, und werden in ihrer Ausrichtung erst im Polarisationsmikroskop aufgrund der Doppelbrechung der Fasern erkennbar [20,92].

Die physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes beruhen auf seinem Aufbau aus druckelastischen Proteoglykanen, den zugfesten Fibrillenkörben, welche die Knorpelzellen unter Spannung halten und den zugfesten kollagenen Faserbündeln der Grundsubstanz. Die Proteoglykane bauen durch ihr Wasserbindungsvermögen einen Innendruck auf, der von der dreidimensionalen zugfesten Verspannung der kollagenen Fasern im Gleichgewicht gehalten wird. Dies ist die Grundlage der hohen Viskoelastizität und definiert die physiologische Aufgabe und Fähigkeit des Knorpels zur Aufnahme und flächenhaften Verteilung von statischen und dynamischen Druckkräften auf den angrenzenden Knochen, sowie zur Abdämpfung von Stoßbelastungen und damit Verringerung von Belastungsspitzen auf den subchondralen Knochen [21,43]. Zusätzlich minimiert der Gelenkknorpel die Reibung der gegenläufigen Gelenkflächen. Aufgrund seiner viskoelastischen Verformungseigenschaften besitzt der Gelenkknorpel die Fähigkeit nach starker Deformierung durch Druck mit Gewichten bis zum 6-8-fachen des Körpergewichtes innerhalb kurzer Zeit wieder zu seiner Ausgangsform zurückzukehren. Man nennt dies das Prinzip der zugfesten Verspannung eines prallelastischen Volumens.

Bei Änderung der Beanspruchung über längere Zeit paßt sich das Knorpelgewebe den neuen Druck- und Zugbedingungen sowohl durch appositionelles Wachstum als auch durch Änderung der Stoffwechselaktivität der Chondrozyten an. In der Druckzone beispielsweise nimmt die Menge der Interzellulärsubstanz auf Kosten der Zelldichte zu. Als Ausdruck eines derartigen Anpassungsprozesses ist auch die ungleichmäßige Knorpeldicke der Gelenkflächen aufzufassen, wobei sich die dicksten Stellen im Bereich der größten Druckbelastungszonen finden [7,22]. Chondrozyten benötigen ständig den Reiz von intermittierendem Druck, um ihre Eigenschaften als Knorpelzellen nicht zu verlieren. Bei fehlender intermittierender Druckbelastung dedifferenzieren die Chondrozyten, wodurch der Grundaufbau und die Funktion des Gelenkknorpels verloren gehen.

Lokale Druckschwankungen im Knorpelgewebe – eine gewisse Durchwalkung – fördern die Diffusion v.a. im Gelenkknorpel, wodurch verständlich wird, daß Knorpelgewebe intermittierenden Druck benötigt, um die Ernährung und den

Abtransport von schädlichen Stoffwechselabfallprodukten zu gewährleisten. Somit wird intermittierender Druck über längere Zeit wesentlich besser toleriert als statische Belastung [21,54].

Die Unfähigkeit zur selbständigen Regeneration insbesondere des Gelenkknorpels ist bereits seit dem 18. Jahrhundert bekannt [31] und ergibt sich aus der Bradytrophie des Gewebes. Im ausdifferenzierten Zustand besitzt hyaliner Knorpel keine Gefäße und Nerven [109]. Die Ernährung erfolgt rein über Diffusion. Außerdem wird hyaliner Knorpel [6] nicht, wie der restliche Knorpel des Körpers, von Perichondrium, einer festen, faserigen Bindegewebsschicht mit Gefäßen und Nerven, umhüllt. Dadurch ist das Potential für eine Regeneration minimalisiert [13,14,17,42]. Bei einem Knorpeldefekt von elastischem oder Faserknorpel wächst aus dem Perichondrium [76], welches zeitlebens die Fähigkeit zur Knorpelbildung besitzt, ein faserknorpelähnliches Ersatzgewebe in den Defekt ein, welches dann weiter ausdifferenziert, um die ursprüngliche Funktion wiederherzustellen. Nach Ausreifung des hyalinen Knorpels jedoch bilden sich die fetalen Blutgefäße zurück, es entsteht kein Perichondrium und die Versorgung des Knorpelgewebes erfolgt durch Diffusion aus den Kapillarnetzen der angrenzenden Gewebe, v.a. des subchondralen Knochens, bzw. aus der Synovialflüssigkeit [46,53,54,55]. Da der hyaline Knorpel kein Perichondrium besitzt, kann eine Regeneration nur vom subchondralen Knochen aus erfolgen.

1.3. Bisheriger Forschungsstand

In unzähligen Forschungsarbeiten wurde versucht, Defekte des Gelenkknorpels in einer Weise zu beheben, daß danach die Funktionsfähigkeit und Belastbarkeit des ursprünglichen Gelenkknorpels weitgehend wiederhergestellt sind.

Oberflächliche Knorpeldefekte bewirken eine ineffiziente Steigerung der Glykosaminoglykan- und Kollagenproduktion, sowie eine mechanisch bedingte Verschiebung von Chondrozyten vom Defektrand in den Defekt, die jedoch nicht durch Proliferation der Knorpelzellen hervorgerufen wird [83]. Daher heilen ober-

flächliche Gelenkknorpeldefekte, auch wegen der fehlenden Vaskularisation, in der Regel nicht. Als Voraussetzung für eine intrinsische Heilung bei Fortschreiten der Arthrose gilt die Eröffnung des Knochenmarkraumes, damit es zu einem Einbluten in den Defekt mit Einwanderung verschiedener Zellen aus dem Markraum, dem Knochen, den Gefäßen, dem perivaskulären Gewebe und der Synovia kommen kann [81,105]. Zusätzlich werden große Mengen von Wachstumsfaktoren freigesetzt.[74]. Das sich im Defekt festsetzende Blutgerinnsel enthält die für die Regeneration notwendigen Bestandteile wie mesenchymale Stammzellen, Glykoproteine und korpuskuläre Blutbestandteile, welche Wachstumsfaktoren sezernieren. Hierdurch können kleinere Defekte mit wenigen mm Durchmesser ausheilen, größere jedoch nicht.

Gomar-Sancho zeigte bereits 1987 an Leerlochversuchen im lasttragenden Bereich des Kaninchenkondylus [26] die Wandlungsfähigkeit mesenchymalen Gewebes: während der ersten 2-3 Wochen nach einer osteochondralen Läsion kommt es zunächst zu einem Einwachsen von fibroartilaginärem Gewebe in die Defektzone. Nach 8 Wochen ist die Knochen- Knorpelneubildung im Defekt abgeschlossen, gelenkseitig zeigen sich innerhalb des neuen Knorpelgewebes lichtmikroskopisch hyaline Anteile, der Hauptanteil des Ersatzgewebes jedoch ist Faserknorpel mit einem überwiegenden Anteil von Kollagen I. Ab ca. der 12. Woche beginnt dann wegen der mechanischen Instabilität unter Belastung eine Degeneration und Ulzeration der neugebildeten Knorpelschicht, die zur Arthrose führt und in einer bindegewebigen Narbe endet [26]. Da der neu formierte unreife Knochen in der Tiefe des Defekts den auftretenden Belastungen nicht ausreichend Widerstand entgegensetzen konnte, waren die physikalischen Bedingungen für die Ausbildung von normalem Gelenkknorpel nicht gegeben, so daß das bereits entstandene hyalinartige Ersatzgewebe durch Faserknorpel ersetzt wurde, welcher später ulzerierte. Dennoch bestätigte sich hier, daß hyaliner Gelenkknorpel vom subchondralen Knochenmarkraum aus eine gewisse Regenerationsfähigkeit besitzt, was die Basis zur Entwicklung neuer Vorgehensweisen zur Reparatur von Knorpeldefekten darstellt.

Verschiedene Theorien z.B. von Wolff [107] und Pauwels [62,63], sowie Grundlagenstudien z.B. von Prendergast [72] und neuere tierexperimentelle

Arbeiten z.B. von Aspenberg und Tägil [3,96] oder Wakitani et al.[99] zeigten, daß mesenchymale Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich unter bestimmten mechanischen Einflußfaktoren in Chondrozyten zu differenzieren. Aspenberg und Tägil fanden in einem Experiment mit Ratten heraus, daß unter bestimmten Lastzyklen und definiertem Druck eine hyalinartige Knorpelschicht durch Umdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen entsteht [3].

Auf der Grundlage der Versuche von Gomar-Sancho veröffentlichten Löhnert und Raunest verschiedene neuere Methoden zur Behandlung von osteochondralen Defekten: die Pridie-Bohrung [39,73] folgt dem Konzept der Anlage von Bohrkanälen in sklerosierten Gelenkflächen zur Induktion und Proliferation von reparativem Granulationsgewebe aus dem subchondralen Bereich. Dieses Verfahren wurde in leicht abgewandelter Form von Mitchell und Shepard bereits 1976 praktiziert [50]. Der zunächst mit Blutkoagel gefüllte Bohrkanal dient hierbei als Schiene für eine Fibroblastenproliferation nach der Theorie der Umdifferenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen unter dem Einfluß bestimmter chronischer Scher- und Kompressionskräfte. Somit werden, ausgehend von den Mündungen der Bohrkanäle, Knorpelinseln gebildet, die sich zu flächigen Regeneraten der Gelenkoberfläche konsolidieren sollen. Schmerzverringerung und Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit bis zu einem gewissen Grad konnten in Studien gezeigt werden [80], jedoch sind die Effekte meist nicht lange anhaltend [78]. Im Tierexperiment mit Ratten füllten sich die Korpeldefekte bei der Pridie-Bohrung gar nur mit aus biomechanischer Sicht minderwertigem, schnell wieder degenerierendem Faserknorpel. Ein weiteres heute angewandtes Verfahren, welches dem gleichen Prinzip folgt, ist die von Pässler 2000 [61] publizierte und zuletzt 2001 von Steadman mit Langzeitergebnissen [93] verifizierte Technik der Mikrofrakturierung, bei der mit einer Ahle arthroskopisch im Abstand von 3-4 mm Perforationen in die subchondrale Knochenschicht eingebracht werden, bis es zur Blutung aus dem Markraum kommt. Es entsteht ein Blutkoagel mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Markraum, welche sich an der Gelenkoberfläche zu Chondrozyten umdifferenzieren und einen festen, belastbaren Ersatzfaserknorpel bilden. Der Vorteil der Mikrofrakturierung gegenüber der Pridie-Bohrung liegt in der fehlenden thermischen Schädigung durch den Bohrvorgang und einer rauheren

Oberfläche, welche ein besseres Anhaften des Blutkoagels bewirken soll [61,92]. Die kurz- bis mittelfristigen Ergebnisse zeigen auch hier eine Verbesserung der Schmerzsituation und der Beweglichkeit. Dennoch bildet sich auch bei diesem Verfahren in der Regel nur minderwertiger Faserknorpel aus [87]. Auch die Langzeitergebnisse sind noch abzuwarten. All diese Verfahren verfolgen das Prinzip, eine Umdifferenzierung von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen zu induzieren.

Das von Löhnert und Raunest entwickelte Verfahren der Abrasionschondroplastik [37], auch 1996 bereits von Johnson praktiziert [34] umfaßt eine arthroskopisch durchgeführte, ausgedehnte Abtragung des degenerativen Knorpels ohne Eröffnung spongöser Knochenräume, verbunden mit Resektion von Osteophyten und einer ausgiebigen Gelenklavage. Zwar bewirkte das Verfahren bei einem Teil der Patienten eine symptomatische Besserung, jedoch wurde bei Untersuchungen auch festgestellt, daß die Degeneration des Knorpels nach einer solchen Abrasionschondroplastik weiter fortschreitet [44]. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, daß auch mit dieser Methode nur Faserknorpel induziert werden kann [23].

Ebenfalls zur Erprobung kam das Prinzip der arthroskopischen Knorpelglättung [38] mit limitierter Resektion degenerativ veränderten Knorpelgewebes bei maximaler Strukturhaltung im Bereich des Kniegelenks.

Im Gegensatz zu den oben genannten Verfahren baut die Priostlappenplastik auf die chondrogene Potenz von Periostgewebe. Diese Fähigkeit wurde erstmals von Haebler 1925 beschrieben [28]. Immerhin konnten Salter et al., sowie Rubak et al. [35,52,58,59,75,76, 77] zeigen, daß Periostlappen bzw. Periosttransplantate, zur Überbrückung von Knorpeldefekten eingenäht, sich ohne zusätzliche Beimischung mit Chondrozyten in hyalinartige Knorpelschichten differenzieren. Hierbei wird ein autologes Periosttransplantat über der Defektstelle fixiert, wobei die Resultate jedoch von Größe und Lokalisation des Defekts abhängig sind. Größere Defekte, aber besonders auch tibiale und retropatellare Defekte, zeigen schlechte Ergebnisse. Oft wird nur eine partielle Deckung, meist nur mit minderwertigem Faserknorpel erreicht [90]. Auch wurde gezeigt, daß das Annähen des Periostlappens negative Auswirkung auf den defektumgebenden gesunden Knorpel hat. Im Gegensatz zum

Tierversuch ergab die klinische Anwendung keine befriedigenden Langzeitergebnisse. Zwar zeigten sich bei 50-80% der Patienten kurzfristig eine gute Beschwerdebesserung [2,7,8], die Bildung von hyalinem Knorpel oder eines auch langfristig biomechanisch stabilen Regeneratknorpels konnte jedoch nicht erreicht werden.

Attmannspacher et al.[4] testeten die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation mittels OATS® (osteocondral autograft transfer system). Dabei werden die Knorpeldefekte bis in den spongiösen Raum vertieft und danach Knorpel-Knochen-Zylinder aus unbelasteten, gesunden Anteilen des Kniegelenks in belastete und geschädigte Zonen transplantiert, wobei fraglich ist, ob im Kniegelenk solche unbelasteten Stellen überhaupt existieren. Somit wird das Problem vermutlich nur von den belasteten in die weniger belasteten Bereiche verlagert, wobei ungeklärt ist, ob der Knorpel aus wenig belasteten Arealen der vermehrten Beanspruchung in mehr belasteten Bereichen überhaupt standhalten kann. Die Anwendungsmöglichkeit des Verfahrens wird außerdem durch die Defektgröße limitiert, da nur ein begrenztes Areal zur Entnahme der Zylinder zur Verfügung steht. Unregelmäßigkeiten im Gelenkniveau nach der Transplantation führen bereits nach kurzer Zeit zu einer Degeneration des Transplantats, weshalb die Daten einen positiven Verlauf nur in Kurzzeitstudien zeigen, mit guten Ergebnissen bezüglich der Schmerzlinderung und der Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit in 60-90% der Fälle [4,48]. Eine tierexperimentelle Langzeitstudie zeigte jedoch, daß die Knorpelschicht des Zylinders nur ca. 6 Monate intakt bleibt, während der Knochenanteil des Zylinders gut integriert wird [104]. Gute Langzeitergebnisse, welche den Begleitschaden durch die Entnahme rechtfertigen würden, müssen in gesicherten Studien am Menschen erst noch vorgelegt werden.

Brittberg und Peterson [10-12] praktizierten 1994 die Deckung kleinerer Knorpeldefekte durch autologe Knorpelzellen, die nach Entnahme aus weniger belasteten Gelenkanteilen des Patienten in vitro kultiviert, vermehrt und in einer 2.Operation unter einem Periostlappenpatch in die Defektzone eingebracht werden. Danach dürfen die Gelenke für 6 Wochen nur teilbelastet werden. Die Ergebnisse werden sehr unterschiedlich bewertet, da die Chondrozyten während ihrer in vitro Kultivierung vorübergehend ihre Knorpelzelleigenschaften verlieren und zu Fibro-

blasten dedifferenzieren [46,113] und somit nicht klar ist, ob die chondrogene Potenz des Implantates den kultivierten Chondrozyten oder allein dem Periost zugesprochen werden muß [47]. Hierauf weisen diverse Studien hin, die zeigen, daß Periostlappen zur Überbrückung von Knorpeldefekten eingenäht, auch ohne vorherige Beimpfung mit Chondrozyten in hyalinartigen Knorpel differenzieren [35,52,58,59,75]. Größere oder dreidimensionale komplexere Defekte lassen sich jedoch auch mit diesem Verfahren nicht behandeln. Weitere Nachteile sind die hohen Kosten des Verfahrens, sowie die zweizeitige Operation und die lange Entlastungsphase, die eine hohe Belastung für den Patienten darstellt. Jedoch konnten verschiedene Studien gute Ergebnisse bezüglich der Schmerzreduktion und mehrheitlich auch der Histologien mit einem hyalinähnlichem Knorpelregenerat demonstrieren [11,65,66].

All diese Techniken bieten in ihrer Gesamtheit trotz zum Teil positiver Kurzzeitergebnisse bezüglich Schmerzsymptomatik und Gelenkbeweglichkeit nur unbefriedigende Ergebnisse, da das gebildete Ersatzgewebe in den meisten Fällen biochemisch minderwertigem Faserknorpel entspricht und positive Langzeitergebnisse damit kaum zu erwarten sind. Die Verfahren stellen somit keine befriedigende Problemlösung für das breite Spektrum der Gelenkerkrankungen durch Knorpelläsionen dar.

Im Rahmen des Tissue Engineering wurden zur Verbesserung der Reimplantation von *in vitro* gezüchteten Knorpelzellen auch Versuche unternommen, Chondrozyten in dreidimensionalen Trägerkonstruktionen aus bioresorbierbaren Materialien zu kultivieren [1,84,99,100], um für den operativen Einsatz geeignete Konstrukte zu erhalten. Trägermaterialien sind hierbei Vliese aus verwobenen Fäden, vornehmlich aus Polyglactin / Polydioxanon [64] oder Hyaluronsäure. Auch Konstrukte aus Kollagen II oder die Anzüchtung von Chondrozyten in Agarosemedien werden untersucht, mit dem Ziel, hyalinartige Knorpelschichten zu erhalten. Bei all diesen Methoden ergeben sich zwei Hauptprobleme: zum einen die zweizeitige Operation, die für sich bereits eine Belastung des Patienten darstellt, bei der zuerst Knorpelzellen aus Bereichen entnommen werden müssen, an denen die Entnahme keine negativen Konsequenzen hat, wobei die Frage unbeantwortet

bleibt, ob es solche Bereiche in einem Gelenk überhaupt gibt. Zum zweiten die Tatsache, daß die Chondrozyten bei der in vitro Kultivierung wegen fehlender mechanischer Stimuli ihre hyalinen Knorpelzeleigenschaften weitgehend verlieren [46,113]. Es ist fraglich, ob derartige Knorpelkonstrukte nach der Retransplantation in den Knorpeldefekt eine mechanisch tragfähige Funktion übernehmen können [47].

Gomar-Sancho et al. zeigten 1987 [26] die Wandlungsfähigkeit mesenchymalen Gewebes [19] durch Induktion von Einwanderung und Einwuchs von fibrokartilaginärem Gewebe in die Defektzone von Knorpelläsionen. In Zusammenschau mit der Literatur wurde aus den Ergebnissen gefolgert, daß die Eröffnung der subchondralen Knochenschicht für die Reparatur von Knorpeldefekten durch mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark erforderlich ist. Durch den beschriebenen Versuch wurde bestätigt, daß auch hyaliner Gelenkknorpel eine gewisse Regenerationsfähigkeit besitzt.

Wie bei Salter bereits 1975 und O'Driscoll et al. 1986 und 1988 [58,59,76,77] gezeigt, bedarf es zur Ausbildung eines hyalinartigen Gelenkknorpelersatzes zusätzlich einer stetigen zyklischen Gelenkbewegung und Druckbelastung, um die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport von schädlichen Stoffwechselabfallprodukten zu gewährleisten.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse entwickelte unsere Forschungsgruppe einen Versuchsansatz zur Neugenerierung von hyalinem Knorpelgewebe durch Umdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen in osteochondralen Defekten mit Hilfe einer geeigneten dreidimensionalen Trägerkonstruktion aus resorbierbaren Materialien ohne vorherige Beimpfung mit kultivierten Zellen.

In eigenen Studien am Kaninchen [33] wurden osteochondrale Defekte untersucht, bei der Trägerkonstruktion handelte es sich um „Bioimplantate“, für die ein resorbierbares Polyglaktin / Polydioxanon-Vlies auf einen im subchondralen Knochen verankerten, offenporigen Poly-D,L-Laktid (PLA)-Zylinder aufgebracht wurde. Diese Vliese werden in kurzer Zeit komplett resorbiert. PLA wurde erstmals bereits 1991 von v. Schroeder et al. als Trägermaterial bei der Deckung chondraler

Defekte verwendet [102] und erwies sich als biologisch gut verträglich und potent in der Induktion der Chondrozyteneinwanderung und –differenzierung [69], auch wenn die Abbauzeit mit ca. 1 Jahr relativ lang ist. Es wurde ein Defekt mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Tiefe von 6 mm in den lasttragenden Bereich des Femurkondylus gebohrt und mit dem Implantat gefüllt, so daß mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum in den Defekt einwandern und sich differenzieren konnten. Bei der Auswertung sah man bei den Implantaten sowohl makroskopisch als auch histologisch im Vergleich zu den Leerlöchern einen deutlichen Unterschied im Ergebnis – in den Implantatdefekten war bei den meisten Versuchstieren eine hyalinähnliche Knorpelmasse entstanden, wogegen die Defekte in den Leerlöchern sich kaum regeneriert oder gefüllt hatten.

Da jedoch das Kaninchen im Gegensatz zum Menschen ein Schnellknorpelbildner ist und außerdem dem Menschen in Bezug auf die Größe der betroffenen Gelenkflächen kaum ähnelt, wurde ein ähnlicher Versuch am Schaf, einem dem Menschen in Knorpeldicke und –regenerationseigenschaften ähnlicherem Individuum, durchgeführt. Die größeren Gelenkdimensionen ermöglichten hier eine bessere Anpassung der Implantate und damit das Vermeiden von Druckspitzen, bzw. das Fehlen von Belastung bei unter dem Niveau liegenden Implantaten. Anders als bei den Kaninchenversuchen wurden in diesen Folgeversuchen ausserdem rein chondrale Gelenkknorpeldefekte untersucht, da lokalisierte traumatische Defekte bei jungen Menschen häufig, die Arthrose des älteren Menschen immer ihren Ausgang am Knorpel ohne Beteiligung des subchondralen Knochens nehmen. Dieser wird erst später in die Umbauprozesse mit einbezogen. Wie in der Arbeit von Gomar-Sancho [26] gezeigt, sollte ein wichtiges Kriterium eines hierbei verwendeten „Bioimplantates“ sein, daß das in den Knorpeldefekt einsprossende mesenchymale Gewebe *sofort* nach Implantation mechanisch belastet wird. Denn nur durch sofortige, intermittierende Druckbelastung auf das Gelenk können sich die mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten umwandeln und somit hyalinartiges Knorpelgewebe mit den mechanischen Eigenschaften des ursprünglichen Knorpels bilden. Aus dieser Erkenntnis entstand die Überlegung eines zweischichtig aufgebauten Trägerkonstruktes: die im Knochen liegende

Schicht müßte eine dem Knochen angepaßte „harte“ Struktur („Knochenersatzschicht“), die im Knorpelniveau liegende Schicht eine „weiche“ Struktur („Knorpelersatzschicht“) besitzen. Beide Schichten müßten dabei offenporig gestaltet sein, um Stammzellen aus dem Marklager die Einwanderung und Ansiedelung in das Konstrukt und an die Defektoberfläche zu ermöglichen. Nur so könnte auf eine vorherige in vitro Kultivierung der Bioimplantate mit z.B. Chondrozyten verzichtet werden. Die weiche Knorpelersatzschicht des Bioimplantates sollte aus einem schnell resorbierbaren Vlies hergestellt sein, um die sich bildende dreidimensionale Kollagenstruktur nicht zu behindern. Außerdem bietet sich ein faseriges Material an, in dem sich die einwandernden Stammzellen gut festsetzen und umwandeln können. In der aktuellen Studie wurde ein Polygalaktin / Polydioxanon-Vlies verwendet, welches innerhalb eines Zeitraumes von 6 – 12 Wochen vollständig resorbiert wird und dessen Abbauprodukte intraartikulär gut verträglich sind. Diese Knorpelersatzschicht wurde auf Knochenverankerungsstifte aus Polylactid, sogenannte „Darts“ aufgebracht und damit im subchondralen Knochen befestigt, wodurch ein Zugang zum subchondralen Knochen und somit zum Markraum des Knochens geschaffen wurde.

Die vorliegende Arbeit soll die Tauglichkeit oben beschriebener Implantate in abgewandelter Form – nämlich als einschichtiges Bioimplantat am Schafsmodell in rein chondralen Defekten zeigen, indem ein bereits vorbestehender Knorpeldefekt als Implantatlager für das Vlies ausgefräst und durch die Verankerungsstifte ein Zugang zum Markraum geschaffen wird. Durch Einblutung aus dem subchondralen Knochengewebe wird ein Zugang und Weg für die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark geschaffen, die sich auf dem Vlies absiedeln und zu Knorpelzellen umdifferenzieren sollen ohne größere Traumatisierung und Penetration des subchondralen Knochens oder des umliegenden Gewebes.

2. Versuchsziele

Aufgrund der bisherigen unbefriedigenden Ergebnisse bei der Heilung von Knorpeldefekten ist das Ziel der vorliegenden Studie, folgende Fragestellungen bezüglich eines neuartigen Behandlungsverfahrens bei Gelenkknorpeldefekten zu klären:

Sind resorbierbare Bioimplantate geeignet, ohne vorherige Beimpfung mit kultivierten Chondrozyten die Differenzierung körpereigener mesenchymaler Stammzellen unter mechanischer Belastung zu induzieren und damit die Bildung von hyalinem Knorpel und die Heilung chondraler Gelenkdefekte zu bewirken?

3. Material und Methoden

3.1. Implantate - Material und Bearbeitung

Für die vorliegende Studie wurde ein resorbierbares Bioimplantat entwickelt, bei dem ein rundgeschnittenes Ethisorb®-Vlies aus verwobenen Fäden aus Polyglaktin / Polydioxanon (Ethisorb 210®, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit einem Durchmesser von 8 mm auf 6 schmale Stifte, sogenannte „Meniscal Darts“ (Fa. Arthrex, Karlsfeld, Deutschland) aus Poly-D,L-Laktid mit einer Länge von 8 mm zur Verankerung im subchondralen Knochen aufgebracht wurde.



Abb. 3.1.1.: Resorbierbares Bioimplantat zur Behandlung chondraler Defekte.

Die runden Vliese mit einem Durchmesser von 8 mm wurden von Hand aus einem großen Stück Polyglaktin / Polydioxanon-Vlies herausgeschnitten. Der Faserabstand beträgt 40 – 150 μm bei einem Faserdurchmesser von 10 μm . Die Darts sollten die Verankerung im Knochen mit dem Zugang zum Knochenmark darstellen und bestanden aus Poly-D,L-Laktid mit einer Länge von ca. 8 mm und einem Durchmesser von jeweils 400 μm . Die industriell vorgefertigten Darts wurden in 6 kreisförmig angebrachte Löcher in einer eigens angefertigten Stahl-

form gesteckt, das Vlies anschließend mittels eines Aceton-Poly-D,L-Laktid Gemischklebers, welcher in der Basis ebenfalls aus Poly-D,L-Laktid, dem Material der Verankerungstifte, besteht, auf diese Darts fixiert.



Abb. 3.1.2.: Form zur Fertigung der Bioimplantate.

Nach Verbindung der beiden Komponenten durch Trocknung und Verdunsten des Acetons konnten die fertigen Implantate entnommen und zur Sterilisation gegeben werden. Diese erfolgte im Plasmasterilisationsverfahren bei 45°C.

3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten für sämtliche Versuche insgesamt 6 ausgewachsene, weibliche Merinoschafe ab dem 1. Lebensjahr mit einem Körpergewicht von ca. 50 kg. Die Tiere wurden zunächst in einem Tierstall mit 16 m² Auslauf und 4 m² Innenbox in Strohhaltung gehalten. Sie erhielten die Möglichkeit, frei zwischen Innenbox und Auslauf zu wählen. Die Ernährung erfolgte mit Standard Schafsfutter über Pellets bei freiem Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Ab dem 5. postoperativen Tag wurden die Tiere dann in artgerechte Offenstallhaltung verbracht.

Die Schafe wurden 36 Stunden vor Narkoseeinleitung nüchtern gehalten, jedoch war ihnen freier Zugang zum Wasser ad libitum gestattet. Es wurden nur Tiere in den Versuch aufgenommen, die keine Anzeichen von Krankheit aufwiesen und normales Freß- und Artverhalten zeigten.

3.3. Protokolle

3.3.1. Operationsverfahren und –technik

Zur Anästhesie wurden die Tiere zunächst mit 6 ml (30 mg) Diazepam i.m. (Valium® Roche, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) unter O₂-Insufflation sediert, die Einleitung erfolgte anfangs über einen venösen Zugang mit Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 10 %; Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) in einer Dosierung von 8 mg / kg KG, gefolgt von einer intravenösen Gabe von 2-3 ml Propofol (Disoprivan 2 %; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) nach Wirkungseintritt. Danach wurde mit Ketamin i.v. nachdosiert (maximal 8 mg / kg KG) bis zum Erreichen einer Intubationstoleranz. Unmittelbar nach der Narkoseeinleitung wurden die Tiere mit einem 11er Tubus intubiert und der Tubus geblockt um eine Aspiration von Speichel oder regurtiertem Pansensekret zu verhindern. Anschließend wurde eine Magenschlußsonde zur Vermeidung einer Pansentympanie und zum kontrollierten Abfluß des Pansensekretes gelegt.

Zur Narkoseerhaltung wurde bei assistierter Beatmung ein Inhalationsgemisch aus Lachgas (N₂O) und Sauerstoff (O₂) im Verhältnis 2:1 sowie Enfluran (Ethrane®: Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einer Konzentration von 0,8 Vol % nach Wirkung verabreicht. Parallel zur Inhalationsanästhesie lief ein 2 %iger Propofolperfusor (~ 12 ml) (Disoprivan 2 %; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) zur Unterstützung der Anästhesiewirkung, sowie zur perioperativen Antibiose eine Augmentan-Infusionslösung (2,2 g / 55 ml NaCl; SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland), die bei Eingriffen über 45 min. Dauer auf 2 Dosen erhöht wurde.

Die perioperative Überwachung der Kreislaufsituation erfolgte während der Narkose durch Beurteilung von Pulsfrequenz, Pulsqualität, sowie der Sauerstoffsättigung mittels eines Pulsoxymeters.

Nachdem die Tiere in Narkose auf dem Operationstisch in Rückenlage gelagert wurden, erfolgte die Rasur des jeweils linken Hinterbeins und die Desinfektion mittels Polyvidon-Jod (Braunol®-Lösung: B.Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland). Ein steril gekleideter Operateur und ein Assistent deckten das Operationsgebiet mit sterilen Einmalabdecktüchern ab. Nun erfolgte eine gerade, ca. 10 cm lange Inzision über dem medialisseitigen Kniegelenk. Nach Eröffnen des Kniegelenkes wurde die Patella nach lateral verdrängt, so daß sich der mediale Femurkondylus darstellte. Bei jedem der 6 Tiere wurden nun in maximaler Beugstellung des Knies in der Belastungszone jeweils 2 Defekte gesetzt, welche entweder beide mit den Implantaten gefüllt oder beide als Leertlöcher belassen wurden. Insgesamt entstanden so 6 Defekte mit Bioimplantatfüllung und 6 Leertlöcher, welche miteinander verglichen werden konnten. Bei den Defekten für die Bioimplantate wurden mit einem Konkavfräser mit 8 mm Durchmesser und zentralem Führungsdorn Defekte von 8 mm Durchmesser und einer Tiefe bis zum subchondralen Knochen in den Gelenkknorpel gefräst. Der Fräser besaß eine konkave Oberflächengeometrie, so daß der Gelenkoberfläche angepaßte Defekte geschaffen werden konnten. Bei den Leertlöchern wurde der gleiche Fräser ohne zentralen Dorn verwendet.

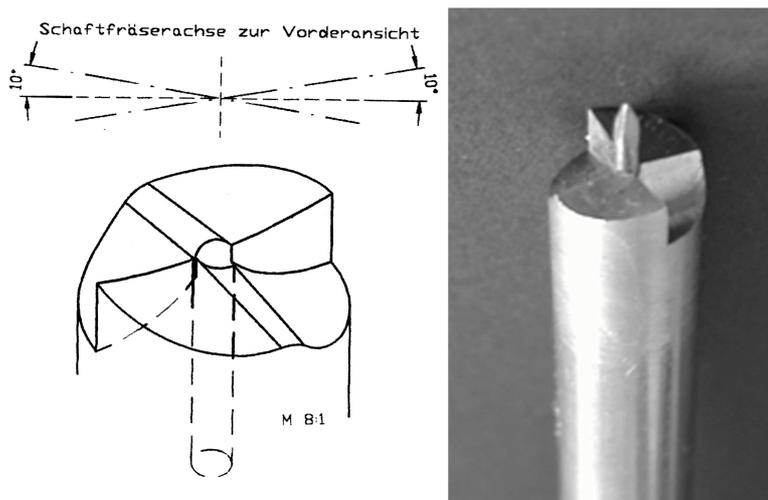


Abb. 3.3.1.1.: Instrument zum Fräsen der chondralen Defekte. Für die Implantatgruppe wurde zentral ein Führungsdorn eingesetzt, bei der Kontrollgruppe wurde ohne Führungsdorn gefräst.

Nach Spülung wurden bei den Implantatdefekten mittels eines Schlagdorninstrumentes mit 6 Dornen die Verankerungslöcher angelegt. Die Dorne hatten distal einen Durchmesser von 1,6 mm und proximal von 1,8 mm. Hierdurch sollten sich die Verankerungsdarts im distalen Anteil des Loches „press-fit“ verankern, proximal verblieb um die Darts eine Lücke, um das Einwandern von Zellen aus dem Markraum zu ermöglichen. Die Anordnung der Dorne entsprach hierbei den Darts auf dem Bioimplantat.

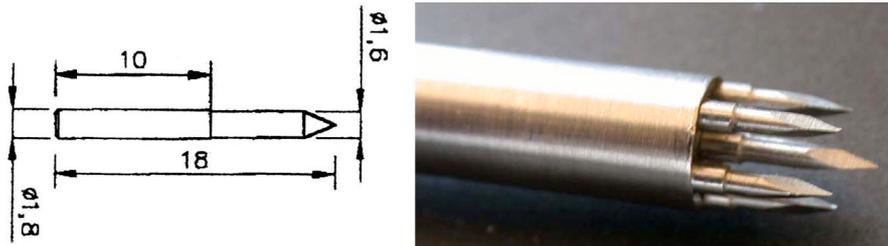


Abb. 3.3.1.2.: Schlagdorninstrument zur Anlage der Verankerungslöcher.

Schließlich wurde das Knorpelersatztransplantat mit den 6 Polylaktid-Stiften mittels eines eigens konstruierten Aufnahmeegeräts, sowie eines Stößels zur „press-fit“-Arretierung, in den vorgestanzten Löchern im subchondralen Knochen verankert, wobei die Oberfläche der Gelenkgeometrie angepasst wurde, so daß aus der Markhöhle heraus bereits intraoperativ eine Einblutung in den Defekt erfolgen konnte.

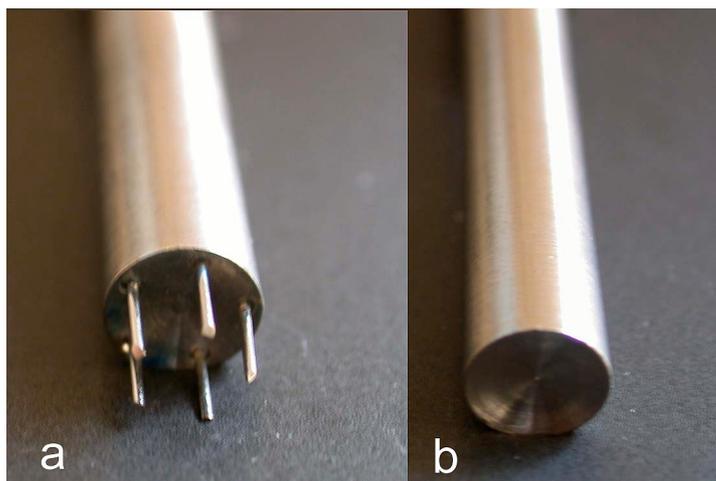


Abb. 3.3.1.3.: a) Fassinstrument b) Stößel zum „press-fit“-Arretieren der Bioimplantate.

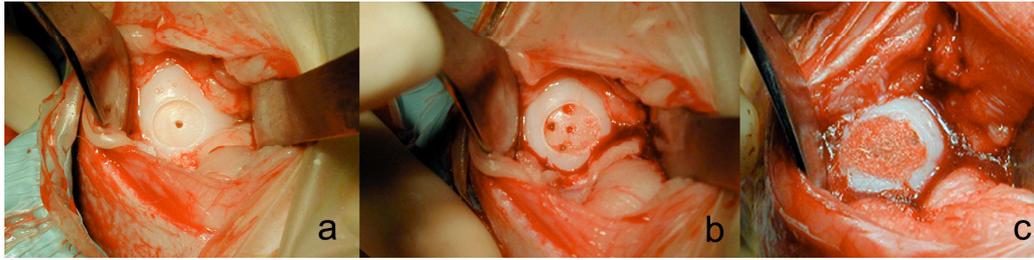


Abb. 3.3.1.4.: Intraoperativer Situs: a) 8 mm großer ausgefräster Knorpeldefekt im lasttragenden Bereich der medialen Femurkondyle. b) Verankerungslöcher mit intraoperativer Einblutung aus dem Markraum. c) Pressfit eingebrachtes Bioimplantat.

Bei dieser Verankerung trat ein Problem beim Einpassen der Verankerungsstifte auf, wobei einige der Stifte vom Vlies abbrachen, andere sich verbogen oder querlegten. Insgesamt erwies sich das Einbringen der Darts in die vorgestanzten Löcher als unerwartet schwierig. Bei den Leerlöchern wurde in gleicher Weise verfahren, nur daß hier der Knorpeldefekt im Femur nicht mit einem Implantat gefüllt wurde. Im Anschluß wurden die Gelenkkapsel und Haut mit 2-0-Vicryl®-Einzelknopfnähten verschlossen und ein Sprühpflaster (Nobecutan Spray: Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) sowie ein steriler Verband angelegt. Die Operationsdauer betrug ca. 40-50 Minuten.

5-10 Minuten vor dem Operationsende wurde die Enfluran- und Propofolzufuhr abgestellt und kurz vor Beendigung des Wundverschlusses auch die Lachgaszufuhr gestoppt. Es folgte eine ca. 10 minütige Beatmung mit 100 % Sauerstoff, um einer alveolären Lachgasdiffusion vorzubeugen. Bis zum Einsetzen der Spontanatmung, welche bei allen Versuchstieren praktisch sofort und ohne Komplikationen einsetzte, wurde mit Raumluft beatmet.

Bereits noch auf dem OP-Tisch erhielten die Tiere 1 ml Buprenorphin (Temgesic®: Essex Pharma, München, Deutschland) zur Schmerzstillung und wurden anschließend zum Aufwachen in einen Einzelinnenstall mit Stroheinlage verbracht. Das Erwachen aus der Narkose erfolgte bei allen Schafen problemlos und prompt nach Absetzen der Narkotika, bereits eine Stunde nach OP-Ende konnten die Tiere sicher stehend und laufend zu ihren Artgenossen ins Freigehege entlassen werden.

Die Studie wurde gemäß den Richtlinien des National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals durchgeführt und durch die Tierschutzbehörde genehmigt (Versuchsnummer 211-2531-15/97/99).

3.3.2. Postoperatives Vorgehen

Die Schafe wurden an den ersten beiden postoperativen Tagen 3x täglich im Abstand von 8 Stunden mit jeweils einer Ampulle (1 ml) Buprenorphin (Temgesic®) subcutan zur Schmerzstillung versorgt. Bei Schmerzzeichen, wie Zähneknirschen, Umherlaufen, Lautäußerungen, Pressen gegen die Stallwand oder Futterverweigerung erfolgte eine weitere Buprenorphingabe bei Bedarf. Die Tiere konnten und sollten sich im Gehege frei bewegen und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Am 5. postoperativen Tag erfolgte der Transport in die artgerechte Offenstallhaltung in 4er Gruppen.

3.3.3. Postoperative Befunde

Während der 12wöchigen Beobachtungszeit wurden keine weiteren Eingriffe an den Tieren mehr vorgenommen, die Schafe belasteten bereits ab dem 2. postoperativen Tag die operierten Gelenke ohne Anzeichen von Schmerzen voll. Die Wunden verheilten gut und ohne Infektionen, es traten keine Fälle von Nahtinsuffizienz auf, es gab keine relevanten Schwellungen oder Ergüsse.

3.3.4. Materialentnahme

Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Tiere durch Gabe von 20 ml Pentobarbital (Narcoren® 16 g / 100 ml: Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) i.v. sowie 20 ml KCl (1M Kaliumchlorid-Lösung: Pfimmer, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) i.v. eingeschläfert. Die Femurkondylen ebenso wie die Tibiagelenkfläche wurden nach Darstellung des kompletten Kniegelenkes unter Durchtrennung sämtlicher anatomischer Strukturen ca. 3 cm von der Gelenkfläche entfernt abgesägt und mit NaCl gereinigt. Nach Fotografie der Präparate erfolgte schließlich die Einlagerung und Fixierung in 100 %igem Methanol bei 4°C, bevor die weitere Bearbeitung erfolgte.

3.4. Methoden zur Weiterverarbeitung

3.4.1. Makroskopie

Die makroskopische Begutachtung erfolgte direkt nach Entnahme am frischen Präparat, wobei zur späteren Nachvollziehbarkeit der Befunde Fotografien angefertigt wurden. Die Kriterien zur Beurteilung waren allgemein Aussehen, Farbe, Glätte, Glanz, Anbindung an den Defektrand und Oberflächenkongruenz des neugebildeten Gewebes.

3.4.2. Mikroskopie

Nach der makroskopischen Betrachtung erfolgte die histologische Bewertung der Präparate. Beurteilt wurden Oberflächengewebe, Anbindung an den Defektrand, Struktur und Oberflächenkongruenz. Eine Knorpelinduktion galt als erreicht, wenn im Bereich des Knorpeldefektes Knorpelgewebe lichtmikroskopisch darstellbar war. Zusätzlich wurde der Nachweis von Kollagen II zur Beurteilung herangezogen. Die Spontanregeneration von Knorpel wurde anhand der Leerlöcher überprüft.

3.4.2.1. Herstellung histologischer Schnitte

Zur Gewinnung histologischer Schnitte aus den entnommenen Gelenkflächen wurden aus diesen zunächst die Defektstellen mit dem anliegenden Gelenkknorpel als quadratische Blöcke ausgesägt und anschließend zur Entkalkung in 5 %ige EDTA-Lösung (25 g Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Purum (> 97 %) auf 500 ml Aqua Dest.) eingelegt. Diese Lösung wurde jeden zweiten Tag erneuert und nach ca. 12-18 Wechseln konnten die Blöcke im Kryomikrotom (Microm HM 500 OM-Kryomikrotom) geschnitten werden. Dazu wurden die Präparate zur Vorbereitung über Nacht in 5 %ige Saccharose (D(+)- Sucrose (Firma Fluka Chemika AG, Neu Ulm, Deutschland) in Mischung 5 g / 100 ml

PBS¹) eingelegt und am nächsten Morgen mittels Kryoschnittechnik weiterverarbeitet: die Blöcke wurden bei -27°C auf die dafür vorgesehenen Träger aufgefroren, anschließend erfolgte die Anfertigung der Schnitte mit einer Dicke von 12 – 14 μm und die Aufbringung auf spezielle histologische Objektträger (Superfrost-Plus Objektträger, Menzel, München). Von jedem Präparat wurden mindestens 30 Schnitte angefertigt und anschließend bei -20°C für mindestens 2 Wochen fixiert. Danach wurden die Schnitte entweder mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt (HE, Safranin-O, Toluidinblau), oder mittels Immunhistologie weiterbearbeitet.

3.4.2.2. Färbungen mit HE, Safranin-O, Toluidinblau

Zur besseren morphologischen Beurteilung der verschiedenen Gewebearten, insbesondere von hyalinem und Faserknorpel, sowie Knochen, wurden entkalkte sowie im Kryomikrotom geschnittene Präparate verschiedenen Färbungen zugeführt [App.1]. Es wurden die konventionelle HE Färbung zur besseren Beurteilung der Knorpel-, Knochen- und Bindegewebsstrukturen, die Safranin-O Färbung (Gegenfärbung mit Echtgrün und Weigertschem Eisenhämatoxylin) für die Unterscheidung Knorpel / Knochen sowie die Toluidinblau Färbung durchgeführt. Deren Verhalten ist, wie bei der Färbung mit Safranin-O, abhängig von der Menge saurer Glykosaminoglykane im gefärbten Gewebe, jedoch findet bei der Färbung mit Toluidinblau der Farbumschlag wesentlich abrupter statt, wodurch die Trennung zwischen glykosaminoglykanreichem und -ärmerem Gewebe schärfer wird.

3.4.2.3. Immunlabelling Kollagen-I, Kollagen-II und Aggrecan

Mit dem Ziel, verschiedene Komponenten des Gerüsts des neu gebildeten Knorpels nachzuweisen und die Qualität des Ersatzgewebes zu beurteilen, wurden mehrere Immunlabelling-Prozesse [App.2+3] durchgeführt. Zum einen sollte eine

¹ PBS: 9 g / l Natriumchlorid (Fa. Merck KG, Darmstadt, Deutschland) + 0.32 g / l Natriumdihydrogenphosphat (Fa. Baker Chemicals, Deventer, Holland) + 1,42 g / l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Fa. Merck) pro 1000 ml Aqua Dest.)

Markierung des Kollagen I bzw. Kollagen II erfolgen, zum anderen das Hauptproteoglykan des menschlichen Gelenkknorpels, Aggrecan, sichtbar gemacht werden. Dazu erfolgte zunächst eine Rehydrierung der Schnitte mit PBS und Tween 20 für 5 Minuten, sowie eine Inaktivierung der endogenen Peroxidase sowie Fixation mit einem Methanol-H₂O₂-Gemisch. Hierauf wurde 3x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Es folgte die enzymatische Andauung mit Hyaluronidase (1,5 IU/ml) und Chondroitinase (0,25 IU/ml) für 30 Minuten bei 37°C zur Freilegung der Epitope. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Pferdeserum (1:20 in PBS, Vector Lab, Burlingame, USA) für 60 Minuten abgesättigt. Zum Kollagen I Nachweis wurde der monoklonale Antikörper Col 1 (Sigma) verwandt. Der Kollagen II Nachweis erfolgte mit dem CII-CI-Antikörper, der für Aggrecan mit dem 1C6-Antikörper. Die Negativkontrollen erfolgten durch Inkubation der Schnitte mit PBS oder mit einem Antikörper gegen ein im Präparat nicht vorkommendes Antigen. Nach erneutem Waschvorgang erfolgte eine Inkubation mit einem Sekundäntikörper (Vectastainin ABC-Kit Elite Anti-Maus, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 Minuten, gefolgt von einem erneuten Waschvorgang. Die Inkubation mit dem ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) erfolgte bei Raumtemperatur über 30 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Inkubation unter Lichtabschluss mit DAB (Diaminobenzidin, Vector Lab, Burlingame, USA). Die Präparate wurden anschließend noch mit Mayer's Hämalaun gefärbt und mit DePeX (Fluka) eingedeckt.

Die Aggrecan-Nachweisreaktionen wurden durch einen Reduktions- und einen Alkylierungsschritt vorbereitet. Zur Reduktion wurde Dithiotreitol (DTT) in Tris Puffer (pH 7,35) verwendet. Die Alkylierung erfolgte mit Iodacetamid in PBS (Sigma, München, Deutschland) zur Stabilisierung der zuvor unterbrochenen Disulfidbrücken.

3.4.3. Auswertung mittels O'Driscoll Score

Um für die Auswertung der Histologien und Immunmarkierungen ein einheitliches und unabhängiges Schema zu haben, wurde das histologisch-histochemische Knorpel-Scoring-System nach O'Driscoll [51,57,58,59,60] verwendet. Der Score bewertet verschiedene Komponenten des neu gebildeten Knorpels wie z.B. Zellmorphologie, Oberflächenregularität und strukturelle Integration des neuen Gewebes und verteilt je nach Ausprägung bzw. Güte Punkte für die einzelnen Charakteristika, so daß am Ende eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 und 24 Punkten errechnet werden kann [App.1]. Zur besseren Beurteilung des entstandenen Knorpelgewebes, wurde der O'Driscoll Score um einige, in unseren Augen für die korrekte Beurteilung wichtige Bewertungscharakteristika erweitert, wie z.B. die Anwesenheit von Kollagen I, II, Aggrecan und Blutgefäßen im Regenerat [Tab.2], so daß die höchst mögliche Punktzahl nun 34 betrug. Die Auswertung erfolgte nach diesem erweiterten Score verblindet durch zwei Histologen, die die Präparate unabhängig voneinander bewerteten, ohne zu wissen, ob sie ein Leerloch- oder ein Implantatpräparat vor sich hatten. Da in keiner der Arbeiten, die den Score benutzten, festgelegt ist, an welcher Stelle im Regenerat die Beurteilung vorgenommen werden soll, wurden in der hier durchgeführten Auswertung in Anbetracht der Inhomogenität des entstandenen Gewebes zur besseren Objektivierbarkeit immer das minderwertigste Gewebe eines zentralen Schnittes durch die Mitte des Defektes bewertet, um eine subjektive Beeinflussung des Ergebnisses zu vermeiden.

3.4.4. Prozentuale Defektdeckung

Zur weiteren Objektivierung der Knorpelregeneration wurde in einer gesonderten Analyse der Unterschied zwischen Implantaten und Leerlochpräparaten durch Vergleich der prozentualen flächenhaften Defektdeckung mit Knorpel beurteilt, d.h. wieviel Prozent des Defektes überhaupt mit einem knorpelähnlichen Material gedeckt wurden. Zu diesem Zweck wurde anhand von Digitalaufnahmen mit einem entsprechenden Programm (KS400) zuerst der Gesamtdurchmesser des ursprünglichen Defektes und anschließend die Defektdeckung mit Ersatzgewebe

ausgemessen und bestimmt. Aus den so erhaltenen Daten wurde die prozentuale Defektdeckung für die Implantate und Leerlöcher errechnet

3.4.5. Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Da wir Vergleichsgruppen mit sehr kleiner Gruppenzahl – jeweils 6 Objekte / Gruppe - haben, wurde zur statistischen Auswertung ein verteilungsfreier Tests benötigt. Wir verwendeten zur Bestimmung signifikanter Unterschiede den U-Tests nach Mann und Whitney. Dieser schien am besten zur statistischen Auswertung geeignet, da es sich bei den zu vergleichenden Ergebnissen zum einen um Rangwerte handelt, wie sie bei der Verwendung von festen Bewertungsschemata entstehen, zum anderen waren die Verteilungen der Ergebnisse asymmetrisch. Die Verwendung des U-Tests sowie das Vorgehen während der Auswertung wurden mit einem Diplom-Statistiker abgesprochen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Vorzeitiger Abbruch

Für die Versuche wurden nur Tiere verwendet, die keine Anzeichen für Krankheiten oder Verhaltensauffälligkeiten zeigten. Kriterien für einen vorzeitigen Abbruch waren starke Infektion oder Entzündung der operierten Knie bzw. Wunden, starke Schmerzen der Tiere trotz Buprenorphingaben in den ersten 3 Tagen postoperativ oder Zusammenbruch des Gelenks aufgrund der biomechanischen Schwächung der Femurkondylen durch das Aufbohren und Einbringen der Ersatzmaterialien mit Verformung und Instabilität. Es trat kein einziger Fall von Entzündung oder Erguß oder sonstiger offensichtlicher Gelenkschädigung auf. Die Tiere zeigten bereits 3 Tage postoperativ keine Anzeichen von Schmerzen mehr und belasteten die operierten Knie voll, so daß kein einziges Tier vorzeitig aus der Studie genommen und eingeschläfert werden mußte.

4.2. Leerlöcher

4.2.1. Makroskopische Betrachtung

Direkt nach der Entnahme der Kniegelenke wurden die Präparate makroskopisch betrachtet, fotografiert und beurteilt. Bei den Leerlöchern fielen die Defekte sofort ins Auge. Der umgebende Gelenkknorpel war glatt und unauffällig, die Defekte dagegen waren kaum mit Gewebe gedeckt oder gefüllt. Die in den Knorpel gefrästen Defekte waren bis auf den Wundgrund noch sichtbar, es hatten anscheinend keine nennenswerten Reparaturvorgänge stattgefunden, der Übergang vom Defektrand in den gesunden Knorpel wies Unregelmäßigkeiten und Risse in verschiedenem Schweregrad auf.

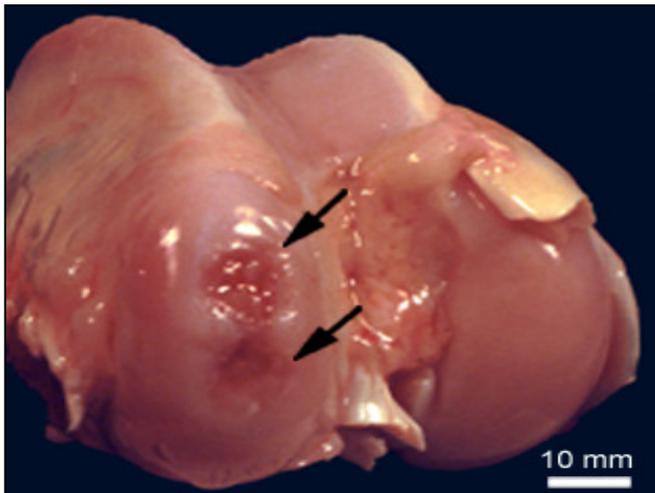


Abb.4.2.1.1.: Linker Femur mit 2 Knorpelleerlöchern im medialen Kondylus (Pfeile). Man sieht die völlige Desintegrität und Unregelmäßigkeit des Defektes, an dem praktisch kein Regenerationsvorgang stattgefunden hat. Er ist deutlich vom umgebenden, gesunden Knorpel abgrenzbar.

Auf den gegenüberliegenden Tibiaplateaus waren an den medialen Kondylen deutliche Schleifspuren im Kontaktbereich mit den Femurdefekten zu sehen.

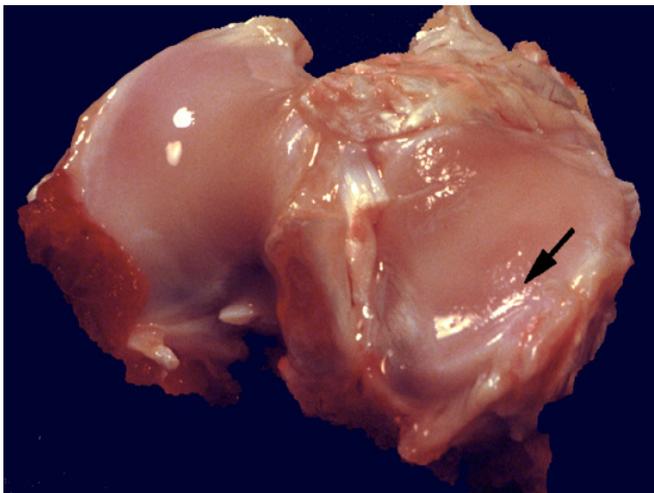


Abb.4.2.1.2.: Linkes Tibiaplateau mit deutlichen Schleifspuren am medialen Kondylus (Pfeil) im Kontaktbereich mit den Leerloch-Femurdefekten – im Gegensatz zur völlig glatten Oberfläche des lateralen Kondylus.

4.2.2. Histologie

Zur besseren Identifizierung und Auswertung der knorpeligen und köchernen Strukturen wurden entkalkte und geschnittene Präparate verschiedenen Färbungen zugeführt. Wir verwendeten die konventionelle HE Färbung, die Safranin-O Färbung und die Toluidinblau Färbung.

In sämtlichen Färbungen kann man sehen, daß bei der Operation nur die Gelenkknorpelschicht abgetragen wurde, wobei am Defektgrund ein schmaler Saum von Knorpelgewebe erhalten blieb. Der unterliegende subchondrale Knochen wurde nicht beschädigt.

In den Färbung der Leerlochpräparate sieht man am Boden sämtlicher Defekte die erhaltene schmale Schicht des ursprünglichen Knorpelgewebes, wobei es sich bei diesem Gewebe der Anfärbbarkeit nach, wie erwartet, um hyalinen Gelenkknorpel handelt. Der subchondrale Knochen der Defektzone zeigt sich in sämtlichen Präparaten unversehrt, der die Defektzone umgebende Gelenkknorpel präsentiert sich ebenfalls intakt und wird kräftig angefärbt.

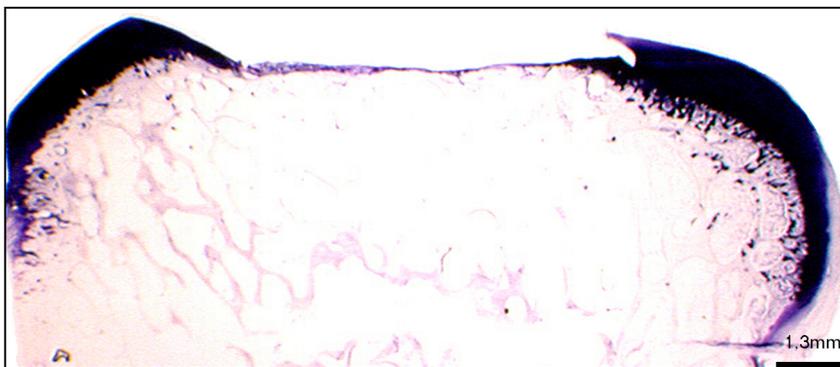


Abb 4.2.2.1.: Knorpelleerlochpräparat. Toluidinblau.
Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit mittig angeordneter oberflächlicher Knorpelläsion. Es ist deutlich erkennbar, dass nur die Gelenkknorpelschicht abgetragen wurde, der unterliegende subchondrale Knochen ist unversehrt. Man sieht die verbliebenen Restknorpelschicht am Grund des Defektes. Referenzstrecke 1,3 mm.

Das Regeneratgewebe im Übergangsbereich von intaktem Knorpel zum Defekt unterscheidet sich hinsichtlich seiner morphologischen Erscheinung deutlich vom normalen Gelenkknorpel und scheint eher bindegewebigen Charakter zu haben.



**Abb. 4.2.2.2.: Knorpelleerlochpräparat. Färbung mit Hämatoxylin / Eosin (HE).
Hochauflösende Rekonstruktion der Randzone eines oberflächlichen Knorpeldefektes. Der Übergang vom normalen Gelenkknorpel (linker Bildrand) zum Restknorpel der Defektzone (rechter Bildrand) ist klar erkennbar. Im Übergangsbereich von intaktem Knorpel zum Defekt ist ein Regeneratgewebeareal zu sehen (*) welches sich deutlich vom normalen Gelenkknorpel unterscheidet. Referenzstrecke 180 µm**

In den Detailaufnahmen sieht man im Randbereich des ursprünglichen Knorpeldefektes einsprossende Blutgefäße, welche wohl als Degenerationszeichen des Knorpelgewebes gewertet werden müssen, da sie in diesen Präparaten kaum für frisch gebildetes und nicht ausgereiftes Knorpel- oder Bindegewebe sprechen. Die Blutgefäße sind z.T. von rot dargestellten Knochenmanschetten umgeben, welche die noch teilweise bestehende sogenannte „Tidemark“ (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel,) durchbrechen.



**Abb. 4.2.2.3.: Knorpelleerlochpräparat. HE-Färbung.
Detailaufnahme aus 4.2.2.2. Randbereich des früheren Knorpeldefektes mit einsprossendem Blutgefäß (*) welches von einer rot dargestellten Knochenmanschette umgeben ist. Deutlich erkennbar ist, dass die noch teilweise bestehende Tidemark (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel, Pfeil) von dieser Knocheneinsprossung durchbrochen wird. Referenzstrecke 45 µm.**

Weiterhin ist im Randbereich der Knorpeldefekte eine deutliche Fissurbildung im ehemals intakten Gelenknorpelgewebe zu erkennen mit beginnendem Proteoglykanverlust im Bereich der oberen Gelenknorpelschichten, der sich in einem Verlust der Anfärbbarkeit mit Toluidinblau und Safranin-O äußert. Dies spricht dafür, dass das dortige, einst gesunde Knorpelgewebe bereits in Bindegewebe degeneriert.

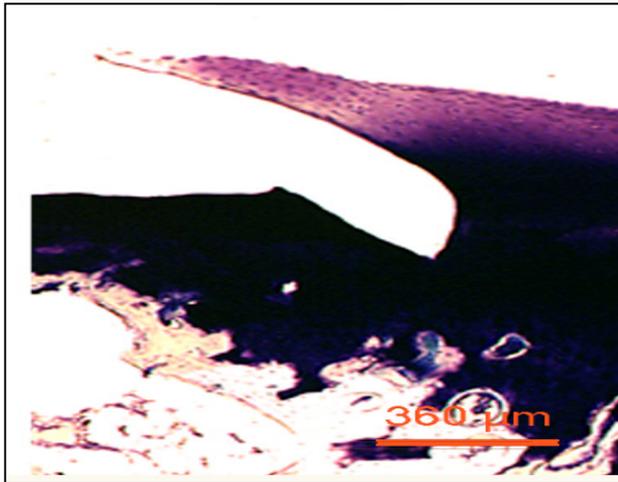


Abb. 4.2.2.4.: Knorpelleerlochpräparat. Toluidinblau.
Detailaufnahme aus 4.2.2.1. Randbereich des Knorpeldefektes mit deutlich erkennbarer Fissur und beginnendem Proteoglykanverlust im Bereich der oberen Gelenknorpelschichten (Verlust der Anfärbbarkeit mit Toluidinblau). Referenzstrecke 360 µm.

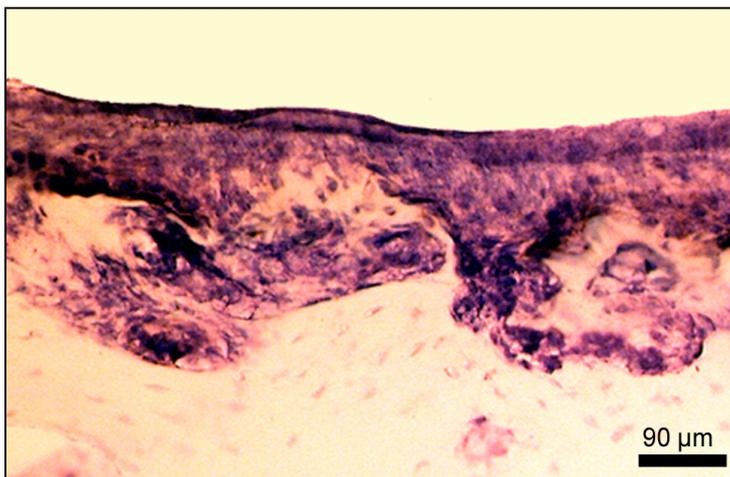


Abb. 4.2.2.5.: Knorpelleerlochpräparat. Toluidinblau.
Bindegewebige Oberfläche des Knorpeldefektes. Auf dem Knochen befindet sich eine dünne Schicht von undifferenziert erscheinenden Bindegewebszellen. Referenzstrecke 90 µm.

4.2.3. Immunhistochemische Markierung

Ziel der Immunhistochemie war es, durch Markierung bestimmter Strukturen wie Kollagen I bzw. II sowie Aggrecan mittels Antikörpern, die Qualität des neu gebildeten Gewebes in Bezug auf dessen Ähnlichkeit mit hyalinem Knorpel zu beurteilen. Hierbei indizierte die Anwesenheit von Kollagen II die Bildung eines hyalinartigen Knorpels, die von Kollagen I die Bildung von unphysiologischem Faserknorpel. Aggrecan ermöglicht als Hauptproteoglykan und Bindemolekül des menschlichen Knorpels die allgemeine Unterscheidung zwischen knorpeligem Gewebe und gewöhnlichem Bindegewebe.

Bei den Leerlöchern sah man auch in den Immunmarkierungen am Boden sämtlicher Präparate die Restschicht des ursprünglichen Knorpelgewebes. Dieses Gewebe besteht eindeutig aus hyaliner Knorpelmasse und gleicht von Aussehen, Organisation und Anfärbbarkeit her dem umgebenden, gesunden Gelenkknorpel. Ausserdem sieht man in sämtlichen immunhistochemischen Aufnahmen Randfissuren am Übergang vom gesunden Gelenkknorpel zum Defektbereich, sowie sehr unregelmäßige Defektoberflächen ohne adäquate Verbindung zum angrenzenden gesunden Gelenkknorpel.

In den Markierungen für Kollagen I zeigt sich der subchondrale Knochen bräunlich markiert und wächst in die am Defektgrund verbliebene Restschicht des Knorpels ein. Diese bleibt in den Kollagen I Färbungen unmarkiert, da es sich hierbei um den ursprünglichen hyalinen Gelenkknorpel handelt, welcher kein Kollagen I enthält. In den Randbereichen der Knorpeldefekte dagegen sieht man in den meisten Präparaten eine beginnende Kollagen I Expression der oberflächlichen Gelenkknorpelzellen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Randfissuren der Knorpeldefekte.

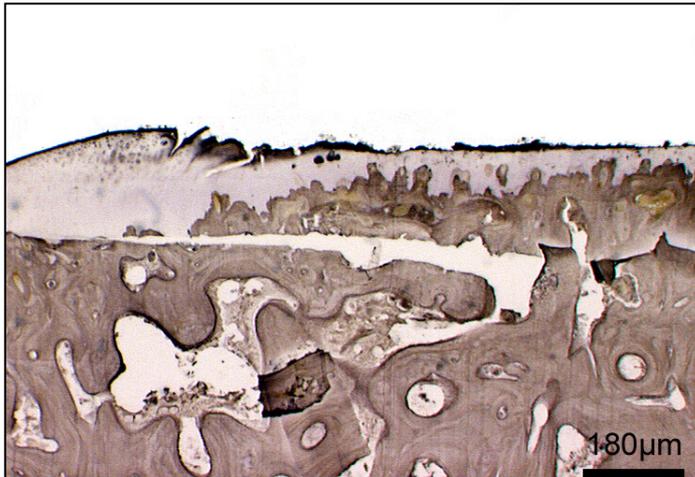


Abb. 4.2.3.1.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

Oberflächliche Knorpelläsion. Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion in den rechten 2/3 des Bildes. Der subchondrale Knochen ist bräunlich markiert, die Reste des Gelenkknorpels sind nicht markiert. Referenzstrecke 560 μm.

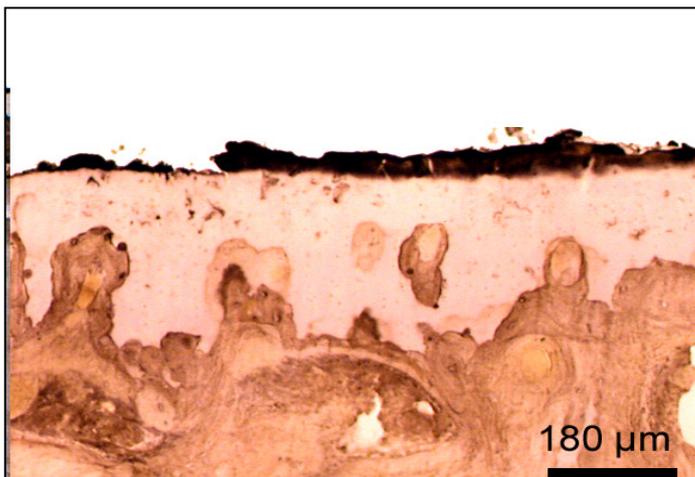


Abb. 4.2.3.2.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

Detailaufnahme aus 4.2.3.1.: Zentralbereich des Knorpeldefektes mit beginnender Invasion des subchondralen Knochens (bräunlich markiert) in die am Defektgrund verbliebenen Reste des Knorpels. Referenzstrecke 180 μm.

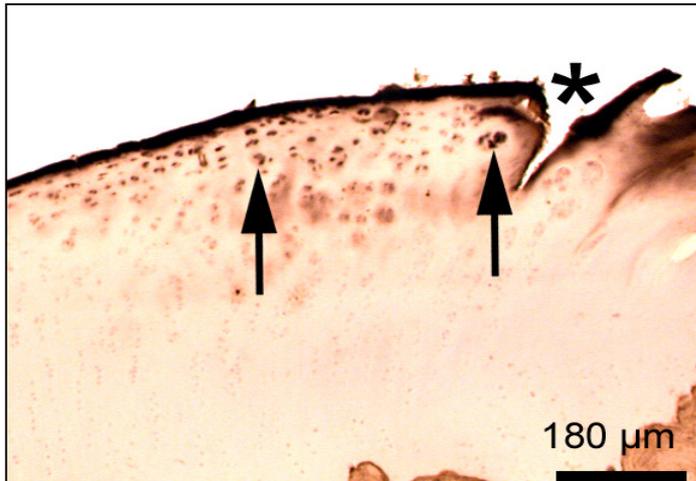


Abb. 4.2.3.3.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

Detailaufnahme aus 4.2.3.1.: Randbereich des Knorpeldefektes. In unmittelbarer Nachbarschaft der Randfissuren (*) des Knorpeldefektes beginnende Kollagen I Expression der oberflächlichen Gelenkknorpelzellen (Pfeile). Referenzstrecke 180 µm

In der Kollagen II Färbung ist das Ergebnis noch eindrücklicher. Außer in den ursprünglichen Restknorpelschichten am Defektgrund ist in keinem der 6 Leerlochdefekte Kollagen II nachweisbar. Diese mineralisierte Restknorpelschicht zeigt sich durch die Kollagen II Markierung bräunlich gefärbt, was den hyalinen Charakter dieses Gewebes bestätigt. Der darunter liegende subchondrale Knochen ist unmarkiert, da er kein Kollagen II enthält und reicht an einzelnen Stellen bereits beinahe bis an die Neogelenkfläche heran, ist also vom Wundgrund aus bereits in den Defekt eingewachsen. In den Randbereichen der Knorpeldefekte sieht man die Bildung von Fissuren, sowie Degenerationszeichen im angrenzenden Gelenkknorpel. Es zeigt sich eine deutliche Niveauabnahme im Verhältnis zum bräunlich markierten umgebenden Gelenkknorpel mit beginnender Chondrozytenclusterbildung zum Defekt hin. Außerdem entsteht durch die Niveauabsenkung des Ersatzgewebes eine Stufenbildung und Inkongruenz in der Gelenkoberfläche.

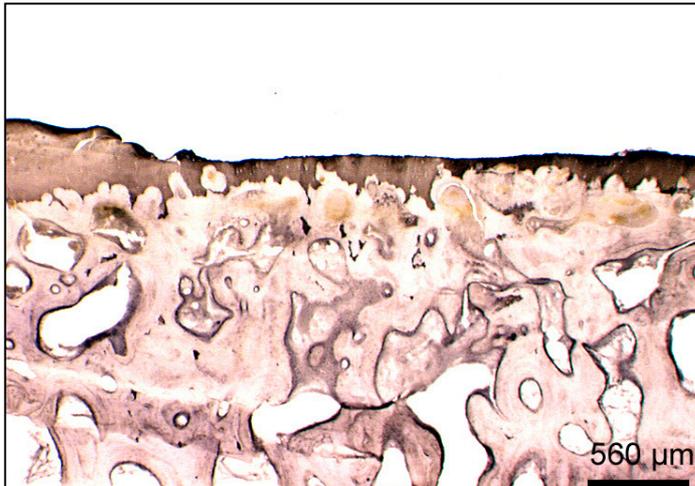


Abb. 4.2.3.4.: Knorpellerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin
Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion in den rechten 2/3 des Bildes. Die Reste des Knorpels sind bräunlich markiert, der subchondrale Knochen ist nicht markiert. Referenzstrecke 560 μm

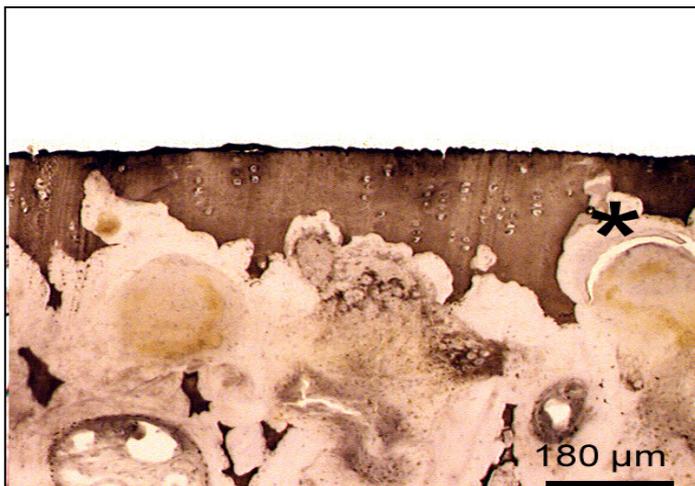
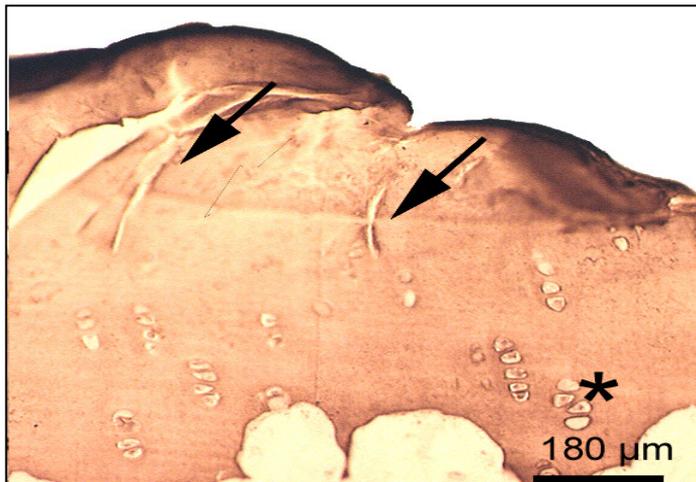


Abb. 4.2.3.5.: Knorpellerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin
Detailaufnahme aus 4.2.3.4.: Zentralbereich des Knorpeldefektes mit Resten des mineralisiertem Gelenkknorpels (bräunlich markiert) der darunter liegende subchondrale Knochen ist unmarkiert und erreicht an einzelnen Stellen bereits beinahe die Neogelenkfläche (*). Referenzstrecke 180 μm .



**Abb. 4.2.3.6.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin
Detailaufnahme aus 4.2.3.4.: Randbereich des Knorpeldefektes mit Fissurenbildung (Pfeile) und deutlicher Niveauabnahme des bräunlich markierten Gelenkknorpels und beginnender Clusterbildung (*) zum Defekt hin. Referenzstrecke 180 μm.**

In der Immunmarkierung mit Aggrecan zeigt sich die mineralisierte Restknorpelschicht am Defektgrund unterschiedlich stark, z.T. fleckig angefärbt. Man sieht, daß auch der mineralisierte, angrenzende Knorpel an einzelnen Stellen bereits Aggrecan zu verlieren scheint, was sich in einem beginnenden Verlust des Farbstoffniederschlags der Aggrecanfärbung widerspiegelt. Dies bedeutet, daß das Restknorpelgewebe sowie der umgebende Knorpel bereits langsam in gewöhnliches Bindegewebe degeneriert mit Verlust der großen knorpeltypischen Proteoglykane. Außerdem sind auch in dieser Markierung in den Randbereichen der Defekte zahlreiche Fissuren zu sehen. Der subchondrale Knochen bleibt in den Aggrecanfärbungen unmarkiert, da Aggrecan nur kennzeichnend für Knorpel- und Bindegewebe ist.

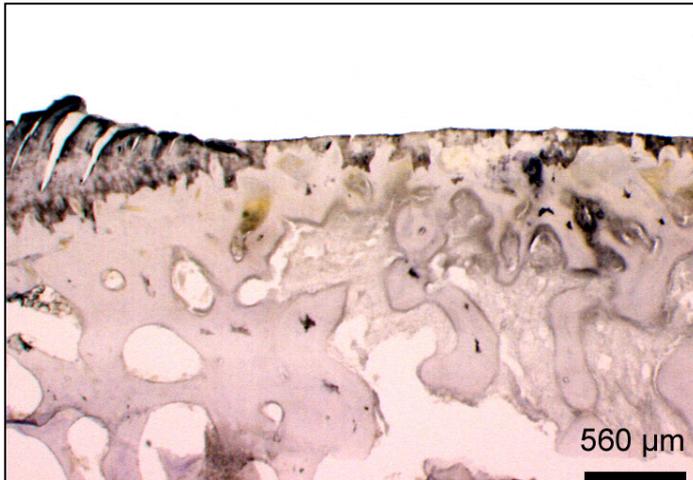


Abb. 4.2.3.7.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion in den rechten 2/3 des Bildes. Die Reste des Knorpels sind unterschiedlich stark markiert, der subchondrale Knochen ist nicht markiert. Referenzstrecke 560 µm.

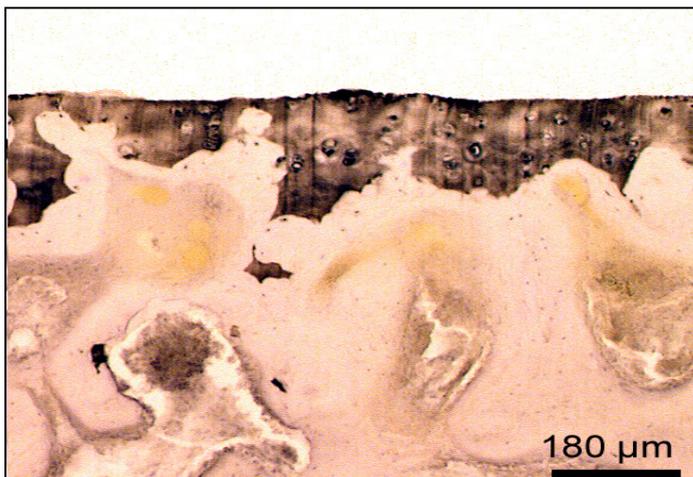


Abb. 4.2.3.8.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

Detailaufnahme aus 4.2.3.7.: Zentralbereich des Knorpeldefektes mit Resten des mineralisiertem Gelenkknorpels (fleckig markiert). Der mineralisierte Knorpel beginnt an einzelnen Stellen bereits Aggrecan zu verlieren was sich in einem Verlust des Farbstoffniederschlagelages widerspiegelt. Der darunter liegende subchondrale Knochen ist unmarkiert. Referenzstrecke 180 µm.

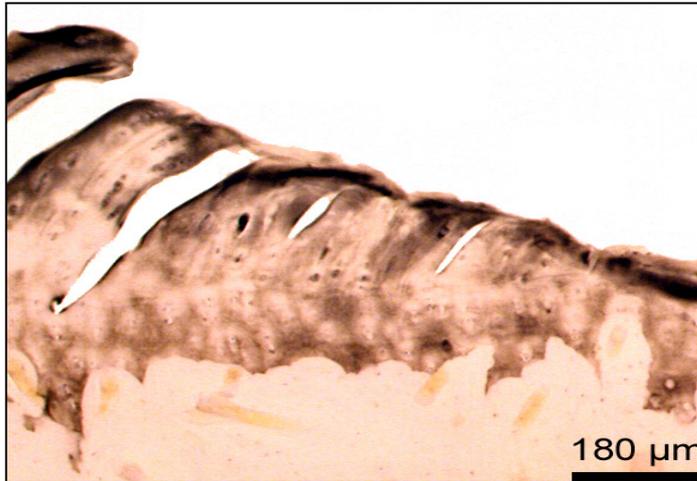


Abb. 4.2.3.9.: Knorpelleerlochpräparat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin
Detailaufnahme aus 4.2.3.7.: Randbereich des Knorpeldefektes mit deutlicher Fissurenbildung und fleckiger Aggrecanmarkierung. Dieses Markierungsmuster unterscheidet sich bereits deutlich von dem eines normalen Knorpels und deutet auch im Randbereich auf den Verlust der großen knorpeltypischen Proteoglykane hin. Referenzstrecke 180 μm .

In keinem der Leerlochpräparate war nach 12 Wochen hyalinähnliche Knorpelmasse nachweisbar. Man findet destruierte, tiefe Defektzonen mit ausgefranst Oberflächen ohne eine Spur von hyalinartigem Ersatzknorpel.

4.2.4. Erweiterter O'Driscoll Score

Die Auswertung der inhomogenen Defekte erfolgte aus Gründen der Objektivierung nicht an den repräsentativen, sondern immer an den schlechtesten Stellen in einem zentralen Schnitt aus der Mitte des Regenerats, um eine Verfälschung der Ergebnisse zum Positiven zu vermeiden. Nach Analyse und Auswertung der Leerlöcher mit dem ursprünglichen O'Driscoll Score ohne Erweiterung ergab sich für die Leerlochpräparate ein arithmetischer Mittelwert von 5,17 Punkten von 24 möglichen Punkten. Die Auswertung mit dem modifizierten, erweiterten Score ergab einen arithmetischen Mittelwert von 6,17 Punkten von 34 möglichen Punkten [Tab.2]. Dies verdeutlicht das schlechte Ergebnis und die schlechte Heilungstendenz bei den Leerlöchern. Bei der Auswertung nach dem Original O'Driscoll Score lagen die Punktzahlen für fast alle Kriterien, von Zellmorphologie über Oberflächenregularität, strukturelle Integration oder Dicke

des Regenerates in untersten Punktebereichen. Auch in der Score-Erweiterung konnten für sämtliche Kriterien praktisch keine Punkte vergeben werden.

4.3. Knorpelimplantate

4.3.1. Makroskopische Betrachtung

Auch die Knorpelimplantate wurden direkt nach der Entnahme einer genauen makroskopischen Betrachtung unterzogen. Im Gegensatz zu den Leerlöchern hatten hier sichtbare Veränderungen stattgefunden: die Defekte waren zum Teil durch eingewachsenes Gewebe deutlich kleiner geworden, zum Teil waren sie erst bei genauerem Hinsehen überhaupt im umliegenden Gelenkknorpel auszumachen. Offensichtlich war knorpelähnliches, oder zumindest bindegewebiges Gewebe von den Defekträndern und dem Defektgrund her eingewachsen und hatte begonnen, die Löcher bis zu einer Defektdeckung von annähernd 100 % zu füllen. Das neu gebildete Gewebe an den Defekträndern erschien in Aussehen und Farbe ähnlich dem gesunden umgebenden Gelenkknorpel, es war glatt und schimmerte leicht bläulich. Die am Wundgrund sichtbare Substanz dagegen war weißlich, faserig und bei Berührung nachgiebig und ähnelte somit eher Faserknorpel oder Bindegewebe, schloß jedoch zur Gelenkoberfläche hin im Oberflächenniveau des umliegenden Knorpels ab. Das Regeneratgewebe schien eine gute Anbindung an den gesunden umgebenden Knorpel zu haben. Makroskopisch waren keine Spalten erkennbar. Die Oberflächenstruktur dagegen war eher unregelmäßig mit Einziehungen der Regeneratoberfläche, welche stets im Zentrum der Defekte und nie am Rand lagen.

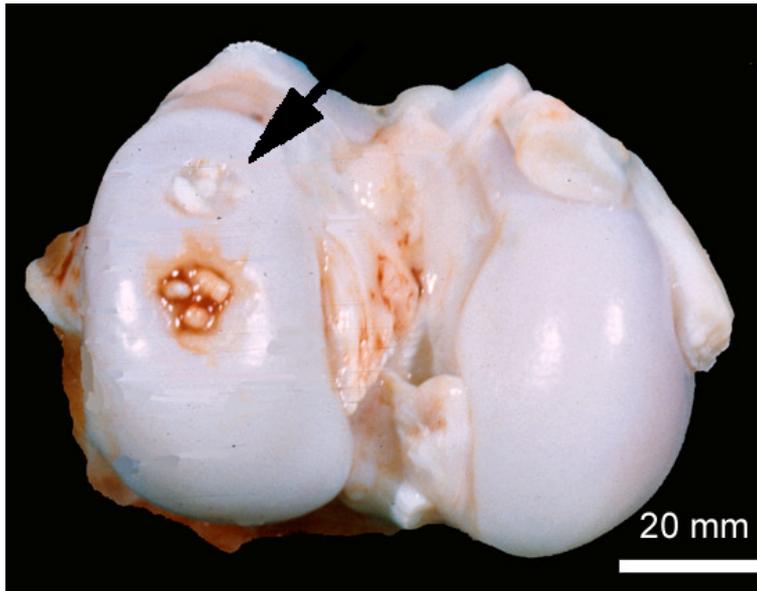


Abb.4.3.1.1.: Linker Femur mit 2 Knorpelimplantaten im medialen Kondylus. Vor allem beim hinteren der beiden Löcher (Pfeil) sieht man, dass das Regenerat dem umliegenden, gesunden Knorpel ähnelt und relativ gut im Oberflächenniveau liegt.

Auch die gegenüberliegenden Tibiaplateaus waren weit weniger in Mitleidenschaft gezogen als bei den Leerlöchern, es zeigten sich allenfalls geringe Schleifspuren bei wenigen Präparaten, bei denen Verankerungsdrants über die Regeneratoberfläche herausragten oder sich quergelegt hatten, was mit den vorbeschriebenen intraoperativen Implantationsproblemen korrelierte.

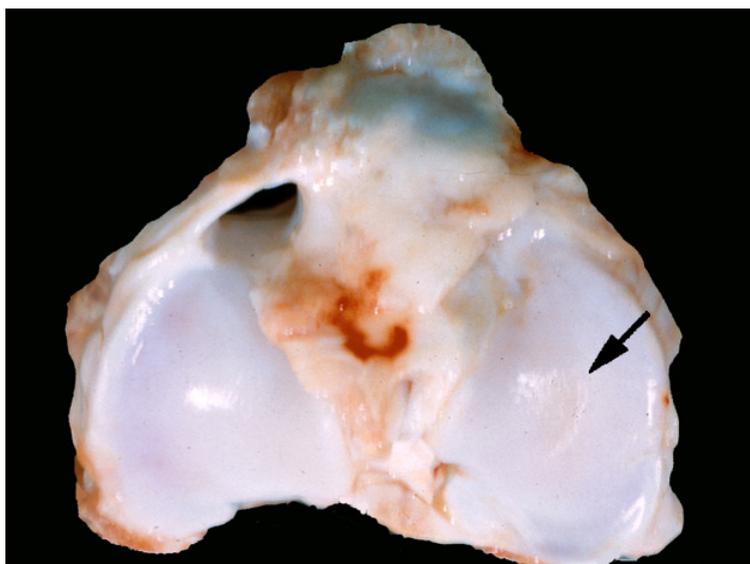


Abb.4.3.1.2.: Linkes Tibiaplateau mit allenfalls geringfügigen Schleifspuren am medialen Kondylus (Pfeil) im Kontaktbereich mit den Implantaten am Femur.

4.3.2. Histologie

Auch bei den Knorpelimplantaten wurden Präparateschnitte mit den verschiedenen Färbungen zur besseren Auswertbarkeit und Identifizierung verschiedener Knorpel- und Knochenstrukturen versehen.

In den Färbungen zeigt sich der an den Defekt angrenzende, gesunde Gelenkknorpel intakt, an den Defekträndern sind keine tiefen Fissuren erkennbar, die Oberfläche der Defekte erscheint glatt, allerdings sind die Knorpel-Knochengrenzen meist stark unregelmäßig und liegen teilweise tiefer als das ursprüngliche Niveau. Der Übergang vom angrenzenden, gesunden Gelenkknorpel zum Ersatzknorpelgewebe ist überall kontinuierlich. Die Safranin-O Färbungen zeigen die Gelenkflächen der meisten Präparate weitgehend von proteoglykanreichem, rot gefärbtem Gewebe bedeckt, was für den Knorpel-, nicht Bindegewebscharakter der neu gebildeten Deckschicht spricht.

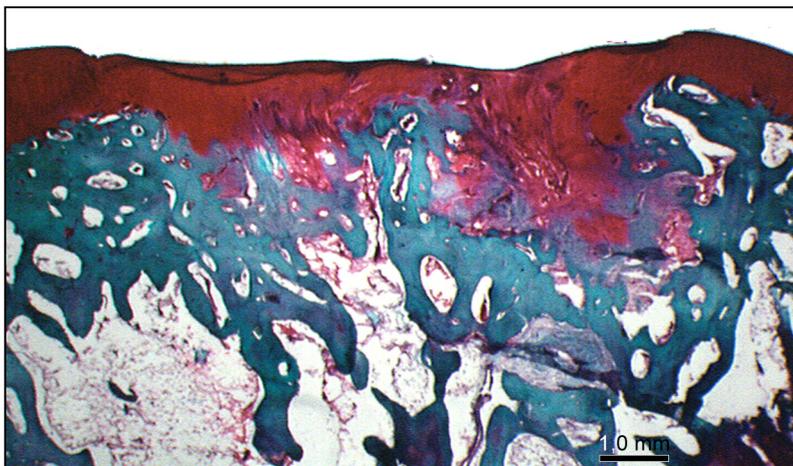


Abb. 4.3.2.1.: Knorpelimplantat. Färbung mit Safranin-O / Lichtgrün / Eisenhämatoxylin nach Weigert.

Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit mittig angeordneter oberflächlicher Knorpelläsion und anschließender Einbringung eines Bioimplantates für Knorpeldefekte. Die Gelenkfläche ist von proteoglykanreichem, rot gefärbtem Gewebe bedeckt. Man sieht keine tiefen Fissuren, allerdings ist die Knorpel-Knochengrenze stark unregelmäßig und liegt teilweise tiefer als es dem ehemaligen Niveau entspricht. Referenzstrecke 1,0 cm.

In den zentralen Regeneratbereichen sämtlicher Präparate sieht man neu gebildetes Knorpelgewebe aus longitudinal ausgerichteten Zellclustern, welches die blaßrosa Anfärbung des umgebenden gesunden Gelenkknorpels aufweist und somit hyalines

Knorpelgewebe zu sein scheint. Im Übergang zum rot markierten Knochen erkennt man unregelmäßig angeordnete Knorpelzellcluster und hypozelluläre Regionen, sowohl im ursprünglichen, wie auch im neu gebildeten Knorpel, welche die hier stattfindenden massiven Umbauvorgänge und Reaktionen des noch unreifen Neogewebes anzeigen.

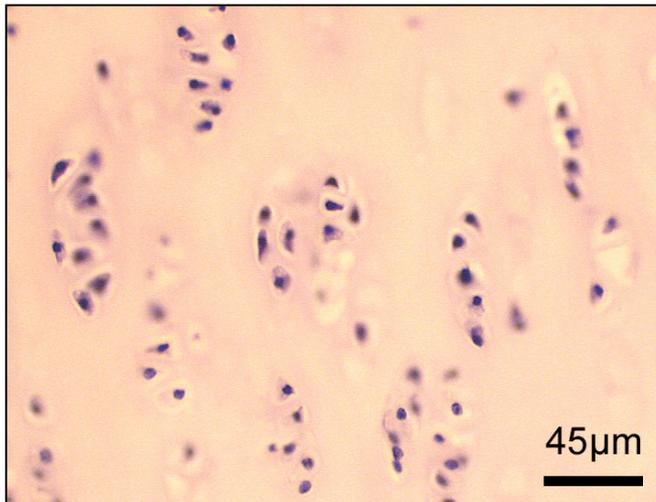


Abb. 4.3.2.2.: Knorpelimplantat. HE Färbung.
Zentraler Regeneratbereich mit neu gebildeten Knorpelgewebe welches aus longitudinal ausgerichteten Zellclustern besteht. Referenzstrecke 45 μm.

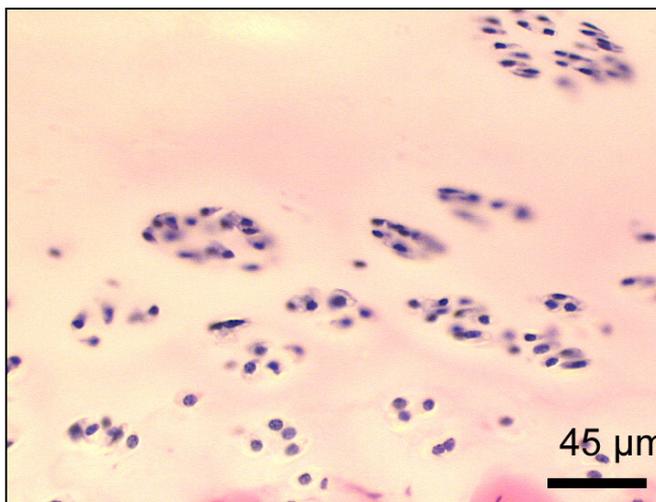


Abb. 4.3.2.3.: Knorpelimplantat. HE Färbung.
Tiefer Regeneratbereich mit Übergang zum rot markiertem Knochen, gekennzeichnet unregelmäßig angeordnete Knorpelzellcluster und hypozelluläre Regionen. Referenzstrecke 45 μm.

Das Regeneratgewebe in sämtlichen Präparaten unterscheidet sich vom normalen Knorpel durch eine höhere Zellzahl im zentralen Bereich und weist vereinzelt bis unter die Oberfläche reichende Blutgefäße auf, welche dafür sprechen, daß es sich um unreifen Knorpel handelt.

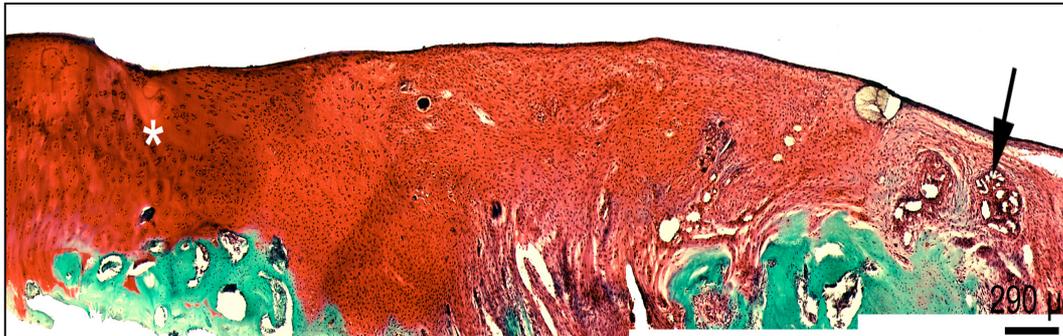


Abb. 4.3.2.4.: Knorpelimplantat. Färbung mit Safranin-O / Lichtgrün / Eisenhämatoxylin nach Weigert.

Hochauflösende Rekonstruktion des ehemaligen Knorpeldefektes. Der linke Bildrand stellt den Übergang vom normalen Gelenkknorpel zum Regeneratgewebe dar. Hier sieht man die im Gegensatz zum normalen Knorpel erhöhte Zellzahl und vereinzelte (rechter Bildrand) bis unter die Oberfläche reichende Blutgefäße (Pfeil). Der Übergang vom gesunden normalen Knorpel zum Regenerat ist kontinuierlich, jedoch zeigt sich eine hypozelluläre Zone mit Clusterbildung im unmittelbaren Übergangsbereich (*). Referenzstrecke 290 µm.

Auch die Knochen-Knorpelgrenzen in den Randbereichen der Regeneratgewebe lassen hypozelluläre Anteile und in einigen der Präparate Bioimplantatreste in der Knorpelzone erkennen.

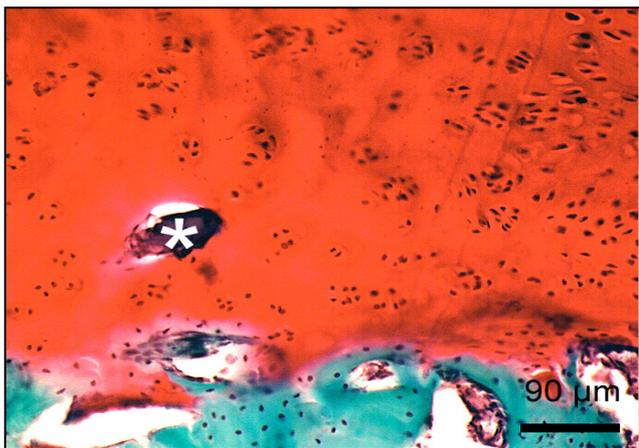


Abb. 4.3.2.5.: Knorpelimplantat. Färbung mit Safranin-O / Lichtgrün / Eisenhämatoxylin nach Weigert.

Detailaufnahme aus 4.3.2.4.: Knochen-Knorpel-Grenze im Randbereich des Regeneratgewebes mit hypozellulären Anteilen und Bioimplantatrest in der Knorpelzone (*). Referenzstrecke 90 µm.

In der Toluidinblau Färbung sieht man eine homogen mit Toluidinblau markierte Gelenkknorpelschicht, welche als Ausdruck einer erfolgreichen Regeneration mit Knorpelgewebe und nicht Bindegewebe angesehen werden kann. Diese Defektoberfläche präsentiert sich glatt und zeigt keinen Proteoglykanverlust wie die Leerlochpräparate.

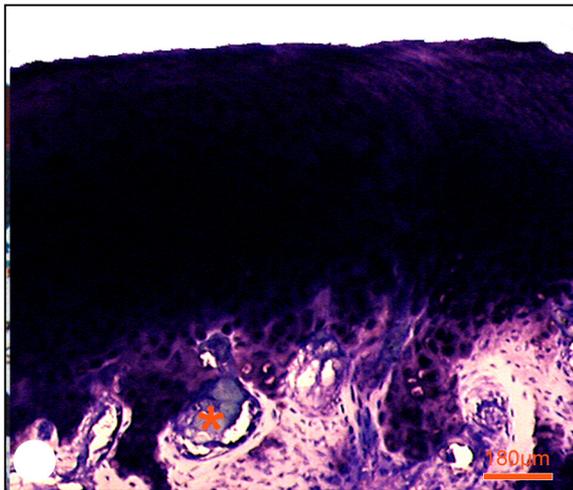


Abb. 4.3.2.6.: Knorpelimplantat. Färbung mit Toluidinblau.
Randzone des Knorpeldefektes mit Resten des Knorpelimplantates, welche im subchondralen Knochen eingemauert erscheinen (*). Darüber befindet sich eine homogen Toluidinblau markierte neu gebildete Gelenkknorpelschicht. Referenzstrecke 180 µm.

4.3.3. Immunhistochemische Markierung

Die qualitative Analyse der Immunhistochemie der Knorpelimplantate brachte als Ergebnis, daß in sämtlichen Implantatpräparaten sowohl Kollagen I als auch Kollagen II neu gebildet worden war.

In den Immunmarkierungen für Kollagen I sieht man bei sämtlichen Präparaten eine glatte Defektoberfläche ohne Ausfransungen oder Fissuren. Die Knorpeldefekte sind fast vollständig mit einem Kollagen I negativen Ersatzgewebe verschlossen worden, welches z.T. von einer mehr oder weniger großen Kollagen I positiven Zone unterbrochen wird. Es zeigt sich eine geschlossene Deckung aus intaktem, weitgehend hyalinähnlichem Gelenkknorpel, welcher fast überall negativ für Kollagen I ist. An der Oberfläche des Knorpelersatzgewebes erkennt man in den Detailaufnahmen jedoch in vielen Fällen Inseln aus Kollagen I positivem Faser-

knorpelgewebe, als Ausdruck einer unvollständigen, nicht überall adäquaten Bildung von hyalinartigem Ersatzknorpel. Der subchondrale Knochen im Regeneratbereich ist teilweise eingeschmolzen, so daß das Regeneratgewebe deutlich unter das Niveau der früheren Knochen-Knorpelgrenze reicht.

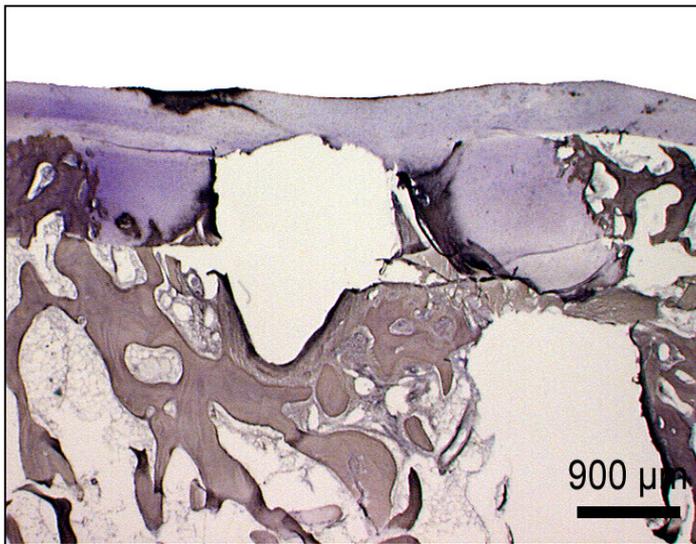
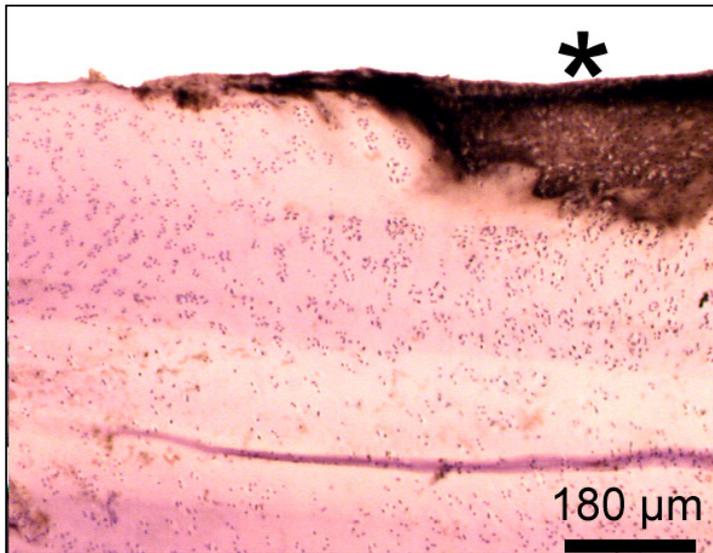


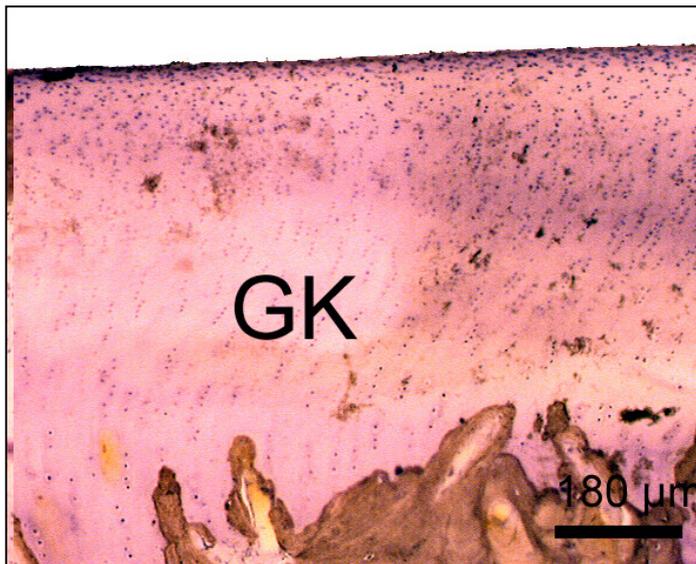
Abb. 4.3.3.1.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat für Knorpeldefekte. Vollständiger Verschluß des Knorpeldefektes durch ein Kollagen I negatives Ersatzgewebe, welches nur durch eine kleine Kollagen I positive Zone unterbrochen ist (Pfeil). Der subchondrale Knochen im Regeneratbereich ist teilweise eingeschmolzen, so daß das Regeneratgewebe deutlich unter das Niveau der früheren Knochen-Knorpelgrenze reicht. In der Mitte des Regenerates findet sich ein Hohlraum, vermutlich hervorgerufen durch einen ehemaligen Dart. Referenzstrecke 900 µm.

In Detailaufnahmen der Randbereiche der Knorpeldefekte zeigt sich der subchondrale Knochen positiv markiert und hyperreaktiv, da sich hier eine Umbau- bzw. Wachstumszone befindet, die den Knochen einschmilzt und die Knorpel-Knochengrenze weiter nach unten verschiebt.



**Abb. 4.3.3.2.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.
Detailaufnahme aus 4.3.3.1.: Oberfläche des Regeneratgewebes mit einer Insel aus Kollagen I positivem Faserknorpelgewebe (*). Referenzstrecke 180 μm.**



**Abb. 4.3.3.3.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen I, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.
Randbereich des Knorpeldefektes. Nur der subchondrale Knochen ist positiv markiert. Darüber findet sich eine geschlossene Deckung aus hyalinem Gelenknorpel (Gk), welcher negativ für Kollagen I ist. Referenzstrecke 180 μm.**

In den Kollagen II Färbungen lassen die Übersichtsaufnahmen erkennen, dass eine Anfüllung des Knorpeldefektes mit Kollagen II positivem Gewebe stattgefunden hat, welches indiziert, daß es sich hierbei um hyalinähnlichen Knorpelersatz handelt. Nur im Zentralbereich des Regeneratgewebes erkennt man eine Zone aus Kollagen II negativem Faserknorpel, welches die Kontinuität der Gelenkoberfläche jedoch nicht unterbricht.

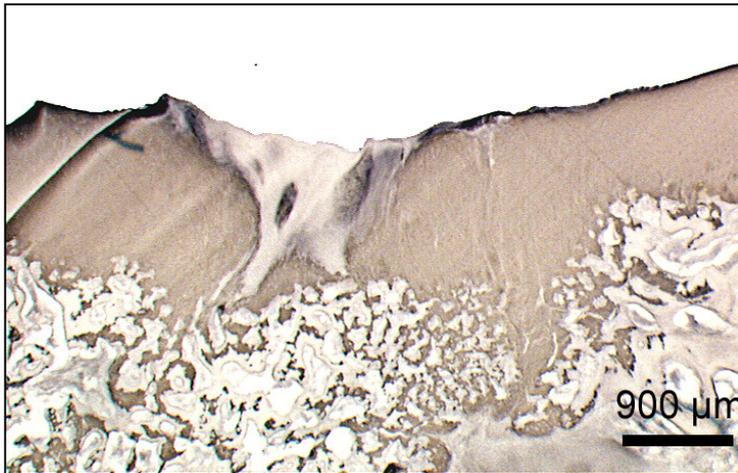


Abb. 4.3.3.4.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion. Bedeckung des Knorpeldefektes mit Kollagen II positivem Gewebe. Nur in der Mitte findet sich eine Kollagen II negative Zone, welche ein bindegewebiges Regeneratgewebe kennzeichnet. Referenzstrecke 900 µm.

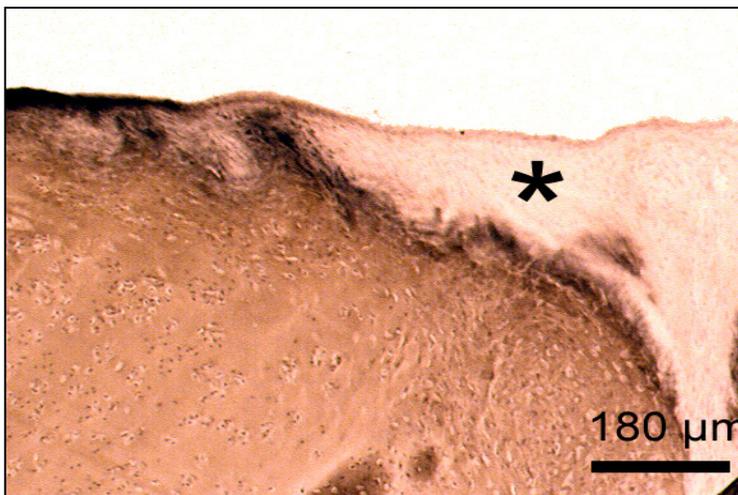


Abb. 4.3.3.5.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Detailaufnahme aus 4.3.3.4.: Zentralbereich des Regeneratgewebes mit Übergang von Kollagen II positivem Knorpel zum Kollagen II negativem Bindegewebe (*). Es zeigt sich, dass die Kontinuität der Gelenkoberfläche durch dieses Bindegewebe nicht unterbrochen wird. Referenzstrecke 180 µm.

In den Randbereichen der ursprünglichen Knorpeldefekte findet sich eine homogene Kollagen II Anfärbung des alten und neuen Gelenkknorpels, welche die Ähnlichkeit des neu gebildeten Ersatzknorpels mit dem gesunden Gelenkknorpel verdeutlicht. Eine Randspaltbildung oder Fissuren an der Oberfläche sind nicht feststellbar.

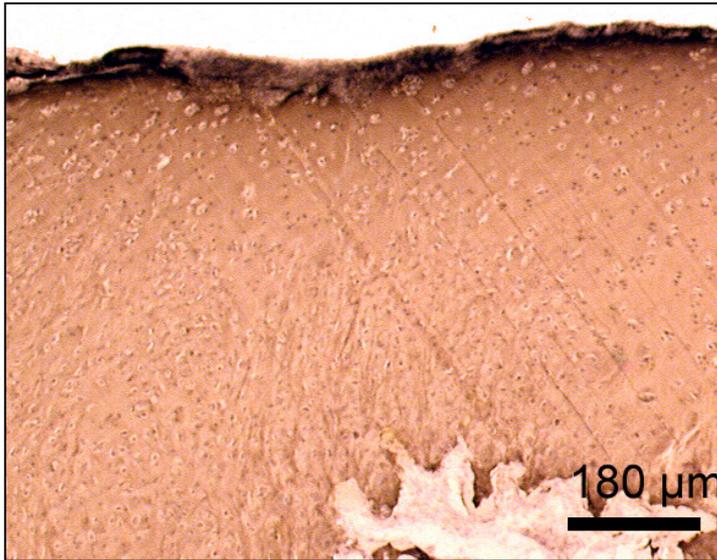


Abb. 4.3.3.6.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Kollagen II, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Detailaufnahme aus 4.3.3.4.: Randbereich des ehemaligen Knorpeldefektes. Homogene Markierung des alten und neuen Gelenkknorpels für Kollagen II. Eine Randspaltbildung ist nicht zu erkennen. Referenzstrecke 180 μm.

Bei der Anfärbung mit Aggrecan zeigt sich das Füllgewebe der Defekte markiert, was das Ersatzgewebe als Knorpelgewebe und nicht als gewöhnliches Bindegewebe identifiziert, der subchondrale Knochen bleibt ungefärbt, da er kein Aggrecan enthält.



Abb. 4.3.3.7.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion und Markierung des Füllgewebes mit Antikörper gegen Aggrecan, der Knochen ist nicht markiert. Im zentralen Regeneratbereich wird eine tiefe Einsenkung erkennbar unter der sich ein zystischer Hohlraum befindet, dessen Wände positiv für Aggrecan reagieren (Pfeil). Referenzstrecke 900 µm.

In den Randzonen sämtlicher Defekte findet man eine homogene Aggrecan Markierung des in diesen Randbereichen neu gebildeten Gelenkknorpels mit Clusterbildung, was das Gewebe eindeutig Knorpel und nicht gewöhnlichem Bindegewebe zurechnet, auch wenn dieser sich in Reaktions- und Umbauvorgängen zu befinden scheint.



Abb. 4.3.3.8.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Detailaufnahme aus 4.3.3.7.: Rand der Einsenkung. Mit Aggrecan positiven Gewebsarealen (*) welche der Kontur des in die Tiefe zurückweichenden Knochens (#) folgen. Referenzstrecke 180 µm.

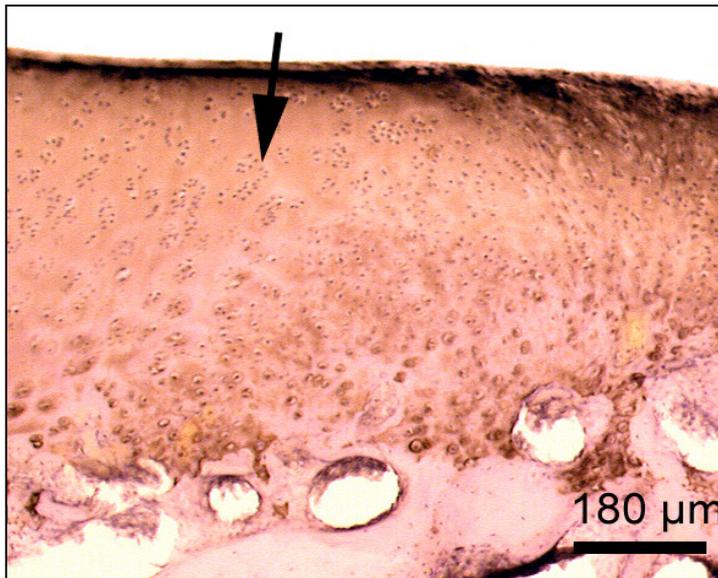


Abb. 4.3.3.9.: Knorpelimplantat. Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Detailaufnahme aus 4.3.3.7.: Randzone des Defektes. Homogene Markierung des Randbereichs gebildeten Gelenkknorpels für Aggrecan mit Clusterbildung Referenzstrecke 180 μm.

Insgesamt scheint in den Implantatpräparaten eine wesentlich bessere und umfangreichere Regeneration der Knorpeldefekte mit teilweise hyalinartigem Ersatzgewebe stattgefunden zu haben, als in den Leerlochpräparaten.

4.3.4. Erweiterter O'Driscoll Score

Auch bei den Implantaten erfolgte die Auswertung der inhomogenen Defekte nicht an den repräsentativen, sondern immer an den schlechtesten Stellen aus einem zentralen Schnitt. Nach den vielversprechenden makroskopischen und mikroskopischen Auswertungen zeigte sich überraschenderweise im O'Driscoll Score keine signifikante Überlegenheit der Implantate gegenüber den Leerlöchern. Der arithmetische Mittelwert des Originalscores lag für die Bioimplantate bei 6 von 24 möglichen Punkten, der erweiterte Score ergab 9,17 von 34 möglichen Punkten [Tab.2].

Die Implantate bekamen im Original O'Driscoll Score v.a. in den Bereichen Zellmorphologie, Safranin-O Anfärbung der Matrix, Abwesenheit von degenerativen Veränderungen im angrenzenden Knorpel und Bindung an den benachbarten gesunden Knorpel geringfügig bessere Punktzahlen als die Kontrollgruppe.

Kriterium	Punkte	Implantate	Leerlöcher
<u>Zellmorphologie</u>			
Hyaliner Gelenkknorpel	4	0x	0x
Inkomplett differenziertes Mesenchym	2	4x	2x
Bindegewebe oder Knochen	0	2x	4x
<u>Safranin-O-Anfärbung der Matrix</u>			
Normal oder fast normal	3	0x	0x
Mäßig	2	3x	2x
Schwach	1	2x	2x
Keine	0	1x	2x
<u>Abwesenheit von degenerativen Veränderungen im angrenzenden Knorpel</u>			
Normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit	3	0x	0x
Normale Zellzahl, leichte Clusterbildung, mäßige Anfärbung	2	5x	3x
Leichte od. mäßige Hypozellularität, schwache Anfärbung	1	0x	3x
Schwere Hypozellularität, schlechte oder keine Anfärbung	0	1x	0x
<u>Bindung an den angrenzenden Gelenkknorpel</u>			
An beiden Enden des Implantats verbunden	2	3x	1x
An einem Ende oder an beiden Enden teilweise verbunden	1	1x	2x
Nicht verbunden	0	2x	3x

Tabelle 4.3.4.1.: Vergleich der Ergebnisse der Gewebe- und Strukturauswertung im Original O'Driscoll Score; die angegebenen Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Kriteriums in der jeweiligen Gruppe. Zu sehen ist, daß die Implantate in den aufgeführten Kriterien tendenziell bessere Ergebnisse vorweisen als die Leerlochkontrollgruppe.

In der Score-Erweiterung gab es für die Implantate mehr Punkte bei den Kriterien Anwesenheit von Kollagen II und Aggrecan sowie Metachromasie bei Färbung mit Toluidin blau.

Kriterium	Punkte	Implantate	Leerlöcher
<u>Anwesenheit von Kollagen II</u>			
Kollagen II im ganzen Regenerat	2	0x	0x
Kollagen II in Teilen des Regenerats	1	5x	1x
Kein Nachweis von Kollagen II oder Kochen	0	1x	5x
<u>Anwesenheit von Aggrecan</u>			
Aggrecan im ganzen Regenerat	2	0x	0x
Aggrecan in Teilen des Regenerats	1	5x	1x
Kein Nachweis von Aggrecan oder Kochen	0	1x	5x
<u>Metachromasie bei Toluidin-blau-Färbung</u>			
Vorhanden	2	0x	0x
Teilweise vorhanden	1	5x	1x
Nicht vorhanden	0	0x	5x

Tabelle 4.3.4.2.: Vergleich der Ergebnisse der Gewebe- und Strukturauswertung in der Score-Erweiterung; die angegebenen Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Kriteriums in der jeweiligen Gruppe. Auch bei diesen Kriterien erhielten die Implantate höhere Punktzahlen als die Leerlöcher.

Bei anderen Kriterien wie Anwesenheit von Kollagen I in der Score-Erweiterung mußte das entstandene Knorpelgewebes jedoch negativ bewertet werden, ebenso wie bei den Kriterien Gleichmäßigkeit der Oberfläche, strukturelle Integrität, Dicke, Bildung von Chondrozytenclustern und Zellularität im ursprünglichen Score.

Kriterium	Punkte	Implantate	Leerlöcher
<u>Anwesenheit von Kollagen I</u>			
Kein Nachweis von Kollagen I im Regenerat	2	0x	0x
	1	1x	1x
Kollagen I in Teilen des Regenerats	0	5x	5x
Kollagen I im ganzen Regenerat oder Knochen			

Tabelle4.3.4.4.: Vergleich der Ergebnisse der Gewebe- und Strukturauswertung der Score-Erweiterung; die angegebenen Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Kriteriums in der jeweiligen Gruppe und zeigen, daß es bei diesem Kriterium keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab.

Kriterium	Punkte	Implantate	Leerlöcher
<u>Zellularität</u>			
Normale Zellzahl	3	0x	2x
Leichte Hypozellularität	2	0x	1x
Mäßige Hypozellularität	1	0x	1x
Schwere Hypozellularität	0	6x	2x
<u>Gleichmäßigkeit der Oberfläche</u>			
Glatt und intakt	3	0x	0x
Oberflächliche horizontale Schichtung	2	0x	0x
Risse (25-100% der Dicke)	1	1x	1x
Schwere Störung, einschließlich Fibrillation	0	5x	5x
<u>Strukturelle Integrität</u>			
Normal	2	0x	0x
Leichte Störungen, Zysten	1	0x	1x
Schwere Zerstörungen / Desintegrität	0	6x	5x
<u>Dicke des Regenerats</u>			
100 % des angrenzenden normalen Knorpels	2	0x	0x
50 –100 % des normalen Knorpels	1	0x	1x
0 - 50 % des normalen Knorpels	0	6x	5x
<u>Bildung von Chondrozytenclustern</u>			
Keine Cluster	2	0x	0x
< 25 % der Zellen bilden Cluster	1	2x	0x
> 25 % der Zellen bilden Cluster	0	4x	6x

Tabelle4.3.4.3.: Vergleich der Ergebnisse der Gewebe- und Strukturauswertung des Original O'Driscoll Scores; die angegebenen Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Kriteriums in der jeweiligen Gruppe. In den hier gezeigten Kriterien mußten die Implantate durchwegs schlechter beurteilt werden als die Kontrollgruppe.

4.4. Prozentuale Defektdeckung

Zur weiteren Beurteilung führten wir zusätzlich eine prozentuale Analyse der entstandenen Flächendeckung der Defekte mit knorpeligem Gewebe sowohl bei den 6 Leerlöchern, als auch bei den 6 Implantaten durch. Hierzu wurde anhand von Digitalaufnahmen der Gesamtdurchmesser des ursprünglichen Defektes sowie die

Defektdeckung mit Knorpelgewebe ausgemessen und aus den erhaltenen Daten die prozentuale Defektdeckung errechnet. Der Vergleich der Bioimplantate mit den Leerlochpräparaten zeigt hier mit 60,5% Deckung bei den Implantaten gegenüber 2,2% bei den Leerlöchern eine signifikante Verbesserung [Tab.3].

4.5. Statistische Auswertung

Die statistische Überprüfung des vollständigen Scores - also der Kombination des original O'Driscoll-Scores in Kombination mit der Erweiterung – bei der Leerloch- im Vergleich zur Implantatgruppe zeigt im Mann-Whitney-U-Test mit einem p-Wert von 0,8102 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Implantat- und der Leerlochgruppe bezüglich der im Score angewandten Kriterien. Im Gegenteil – das Ergebnis liegt sehr nahe am Wert 1, der absolute Gleichheit bedeutet, wohingegen ein Wert von 0,000 den größtmöglichen Unterschied kennzeichnen würde. Betrachtet man die Bestandteile des Scores einzeln, so ergibt sich im original Score nach O'Driscoll für die Leerlochgruppe ein mittlerer Punktwert von 5,17 von 24 möglichen Punkten und für die Versuchsgruppe von 6 Punkten. Im Mann-Whitney-U-Test ergibt sich auch hier mit einem p-Wert von 0,8102 kein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen. Auch die alleinige Testung der Score-Erweiterung liefert mit einem p-Wert von 0,6889 keinen Anhalt auf eine statistisch signifikante Verbesserung der Regeneration durch die Verwendung der Bioimplantate. Die Untersuchung der prozentualen Defektdeckung jedoch zeigt in der Leerlochgruppe eine mittlere Deckung von 2,2% im Unterschied zur der Versuchsgruppe, die eine durchschnittliche Defektdeckung von 60,5% aufweist. Nach der Auswertung ergibt sich hier ein p-Wert von 0,0039, der eine signifikante Verbesserung der Defektdeckung mit knorpelähnlichem Gewebe bei Verwendung der Bioimplantate gegenüber den Leerlöchern aufzeigt.

5. Diskussion

5.1. Probleme der Arthrose und Endoprothetik

Knorpeldefekte beim Menschen, insbesondere im Knie- und Hüftgelenk, stellen wegen der äußerst begrenzten Fähigkeit des Gelenkknorpels zur Selbstheilung ein großes Problem dar. Hohe Kosten der oft jahrelangen konservativen und operativen Behandlungen, entstehende Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung sowie in letzter Konsequenz oft unvermeidbare endoprothetische Versorgung der Patienten mit Arthrose, sei sie primär durch jahrelange Abnutzung oder sekundär als Folge z.B. einer Sportverletzung entstanden, bedingen einen hohen Leidensdruck der Patienten. Aufgrund oft ständiger Schmerzen und zunehmender Bewegungseinschränkung der betroffenen Gelenke besteht die Gefahr des sozialen Rückzugs mit fehlender Teilnahme am umgebenden Gesellschaftsleben und Isoliertheit. Bei jüngeren Patienten werden wegen der auf 12-15 Jahre beschränkten Haltbarkeit der Endoprothesen häufige Wechseloperationen mit erneuten Rehabilitationen nötig, welche jedesmal einen langen Krankenstand bedingen, wobei aufgrund der bei jedem Wechsel abnehmenden Knochenmasse die Verankerung der Implantate zunehmend schwieriger wird. Im Interesse der Patienten ist es daher wünschenswert, ein wirkungvolles Verfahren zur Wiederherstellung oder zumindest Verbesserung der schmerzfreien Gelenkfunktion zu entwickeln, um die Arbeits- und Gesellschaftsfähigkeit zu erhalten und Schmerz- und Leidensdruck zu vermindern.

5.2. Aktuelle Operationsverfahren und Behandlungstechniken

Hyaliner Gelenkknorpel besitzt so gut wie kein Selbstheilungspotenzial [13,14, 17,42], was zum einen an der fehlenden Blutversorgung liegt [46,53,54,55,109], zum anderen scheint die Anzahl der Vorläuferzellen zu gering zu sein [109], da Chondrozyten am Rand von artifiziellen Defekten zwar im Sinne eines möglichen 5

Heilungsversuches Zellcluster bilden, eine erfolgreiche Reparatur jedoch ausbleibt [44].

Eine Reparatur von Knorpeldefekten durch verschiedenste Techniken z.B. Mikrofrakturierung, Oats Plastik oder Knorpelzelltransplantation ist bis heute nicht mit zufriedenstellenden Ergebnissen möglich. Vor allem die Langzeit-Follow-Up-Studien zeigen, daß es über kurz oder lang entweder durch die Operationstechnik selbst (Entnahme von Knorpelzellen aus gesunden Teilen des Gelenkknorpels bei OATS-Plastik [4]) oder durch die Minderwertigkeit des neuen Reparaturgewebes zu degenerativen Veränderungen kommt, bzw. daß sich der zuerst gebildete hyalinartige Ersatzknorpel wieder zurückbildet und eine physiologisch minderwertige bindegewebige Narbe hinterläßt [26,34,46,47,91].

Neueste Forschungen beschäftigen sich mit dem „Tissue Engineering“ zur Entwicklung wirkungsvoller Ansätze zur Arthrotherapie. Beim Tissue Engineering handelt es sich im weitesten Sinne um die Entwicklung und Bearbeitung von in vitro gezüchteten Molekülen, Zellen, Geweben, oder Organen zum Ersatz oder zur Unterstützung von geschädigten bzw. verletzten Körperteilen [70]. Zu den neuesten Errungenschaften auf diesem Gebiet gehört die Möglichkeit, komplexe, dreidimensionale Gewebe zu erschaffen, die Eigenschaften und Funktion des ursprünglichen Gewebes praktisch vollständig übernehmen können. Überall in der Welt wird daran gearbeitet buchstäblich jedes Gewebe des menschlichen Körpers – Leber, Knochen, Muskel, Knorpel, Blutgefäße, Herzmuskelzellen, Nerven, pankreatische Inselzellen, Haut, etc. – zu züchten mit dem Ziel der schonenden und vollständigen Kopie von Aussehen und Funktionalität des ursprünglichen Gewebes und vor allem bedeutender finanzieller Einsparungen durch die kostengünstige Prozedur selbst, sowie bei der postoperative Betreuung. Im Bereich der Knorpelforschung entwickelten Brittberg und Peterson ein Verfahren [11,12] mit Entnahme von Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel des Patienten, anschließender in vitro Kultivierung und Reimplantation, welches nach den Angaben der Autoren gute Resultate zu erzielen scheint. Problematisch dabei ist jedoch, daß die Chondrozyten während ihrer in vitro Kultivierung vorübergehend zu Fibroblasten dedifferenzieren und ihre Knorpelzelleigenschaften verlieren [46,113]. Dadurch kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die

chondrogene Potenz des Implantates den kultivierten Chondrozyten oder allein dem abdeckenden Periostlappen zugesprochen werden muß [47], dessen Potenz zur Heilung von Korpeldefekten auch ohne vorherige Beimpfung mit Chondrozyten bereits 1986 durch O'Driscoll und Salter et al. gezeigt wurde [35,52,58,59,75]. Die Ergebnisse der Arbeit werden deshalb durchaus kontrovers diskutiert [46].

Vom Grundsatz her erfolgversprechend scheinen auch Verfahren zu sein, bei denen autologe Chondrozyten in vitro in dreidimensionalen Trägerkonstrukten gezüchtet werden [1,84,99,100]. Durch geeignete Wahl des Mediums, Zugabe von Wachstumsfaktoren und Beeinflussung des Sauerstoffmilieus läßt sich die Dedifferenzierung der Chondrozyten in Fibroblasten teilweise verhindern [99,100]. Auf diese Weise können auch größere Knorpelstücke in vitro gezüchtet werden, die dann in chondrale Gelenkdefekte retransplantiert werden könnten. Dabei ist das biochemische Kollagenmuster derartiger Knorpeltransplantate dem des hyalinen Knorpels durchaus sehr ähnlich [100,102]. Die Kollagenarchitektur und damit die mechanischen Eigenschaften solcher in vitro gezüchteter Knorpelstücke allerdings ist weit von der des hyalinen Knorpels entfernt. Ob aus derartigen Transplantaten je tragfähige Knorpelschichten in einem Gelenk entstehen können, bleibt abzuwarten [46].

5.3. Bioimplantate zur Deckung rein chondraler Defekte

5.3.1. Prinzip

In eigenen Studien am Kaninchen [34] wurde ein grundsätzlich neuer Weg beschritten: ausgehend von der Überlegung, daß mesenchymale Stammzellen ohne vorherige Kultivierung, unter mechanischer Belastung zur Differenzierung in Chondrozyten befähigt sind [26], wurden sogenannte „Bioimplantate“ als dreidimensionale Trägerkonstrukte aus resorbierbaren Materialien entwickelt, welche einen Zugang zum subchondralen Markraum schaffen und somit das

Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen in osteochondrale Defekte der Gelenkoberfläche induzieren sollten. Bei diesen Versuchen wurden resorbierbare Vliese auf Polylactid-Zylinder aufgeklebt, im subchondralen Knochen verankert und somit die Induktion von Knorpel- und Knochenwachstum bewirkt.

Die modifizierte Form der Implantate für die in der hier vorliegenden Studie untersuchten rein chondralen Defekte bestand aus einem einschichtigen Aufbau mit einem schnell resorbierbaren, offenporigen Vlies als „Knorpelersatzschicht“, welches zur Verankerung im subchondralen Knochen auf Polylactid-Verankerungsstifte aufgebracht wurde. Dadurch sollte das Einwandern von Zellen aus dem Knochenmark des Wirtslagers in die Vliesstrukturen ermöglicht und dann unter mechanischem Druck die Umwandlung dieser Zellen in Knochen- und Knorpelzellen induziert werden. Dazu ist eine sofortige, intermittierende Druckbelastung auf das Gelenk nötig, denn nur dadurch können sich die mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten umwandeln und somit hyalinartiges Knorpelgewebe mit den mechanischen Eigenschaften des ursprünglichen Knorpels bilden [26]. Für die Vliese ist hier die Platzhalterfunktion bei weicher Strukturfestigkeit und schneller – möglichst reaktionsarmer – Resorption von Bedeutung. Dabei ist die schnelle und vollständige Resorption ausgesprochen wichtig: jede Faser der Knorpelersatzschicht, die letztendlich in der Gelenkknorpelschicht verbliebe, würde möglicherweise deren natürliches Gefüge stören. Ein Kollagenvlies zum Beispiel, welches auf den ersten Blick als mögliche logische Lösung erscheint, erweist sich als ungeeignet, da im Gelenkknorpel aus offensichtlichen Gründen keine Enzyme zum Abbau von Kollagen vorhanden sind, welche im gesunden Knorpel körpereigenes Gewebe abbauen würden. Somit könnte ein Vlies aus Kollagen auf Dauer als störender Fremdkörper in der Gelenkknorpelschicht verbleiben und die Bildung, Struktur und Verankerung des sich neu bildenden Ersatzknorpelgewebes stören. Dadurch würde die Funktionstüchtigkeit des Regenerats eingeschränkt [110], obwohl das Kollagen ein biochemisch natürlicher Bestandteil des hyalinen Knorpels ist.

Für die Knorpelersatzschicht bietet sich weiterhin ein faseriges Material an, in dem sich die einwandernden Stammzellen gut festsetzen und umwandeln können. Die

Verankerungsstifte aus Polylactid dienen zur Befestigung des Vlieses im subchondralen Knochen, und haben somit neben der Verankerungsfunktion die Aufgabe, einen Zugang zum subchondralen Knochen und somit zum Markraum des Knochens zu schaffen.

5.3.2. Implantataufbau

Für die Implantate war somit ein weicher resorbierbarer Werkstoff als Knorpelersatzschicht erforderlich, welcher im subchondralen Knochen stabil verankert werden mußte. Aus diesen Gründen wurde für den Bereich des Gelenkknorpels ein Vlies aus verwobenen Polyglactin / Polydioxanon-Fasern gewählt, dessen schnelle und unproblematische Resorption aus einer Reihe von Arbeiten bekannt ist [64,97,98]. Der Faserabstand beträgt 40 – 150 µm bei einem Faserdurchmesser von 10 µm, was gemäß in vitro Studien im günstigen Bereich liegt [85,86]. Die Vliesstruktur sollte es einwandernden Zellen ermöglichen, sich schnell im Defektareal zu verankern und dabei die für die Differenzierung so wichtige sofortige intermittierende Druckbelastung zulassen (Theorie der kausalen Histogenese), ohne zu einer Dislokalisierung der zunächst noch ungeschützten Stammzellen zu führen [1,33,64].

Zur Verankerung in der Knochenschicht und als Zugang zum Markraum wurden industriell gefertigte Stifte aus Polylactid, sog. „Darts“ verwendet. Hierbei handelt es sich um langkettige Polymere aus einzelnen Milchsäuremolekülen, die hydrolytisch abgebaut werden. Poly-D,L-Laktid ist eine rein amorphe Substanz, welche über einen Zeitraum von 40-50 Wochen resorbiert wird und deren Resorptionsverhalten in Bezug auf die Ausbildung von aseptischen Fisteln als unkritisch anzusehen ist [68,69]. Außerdem wird dem Material eine gewisse osteogene Potenz zugesprochen [30]. Somit können die Darts ihrer Aufgabe als Verankerungsmaterial nachkommen, ohne durch ihren Abbau die Neubildung oder Struktur des Neogewebes zu beeinflussen oder zu schädigen.

5.3.3. Versuchstiere

Bei der Wahl des geeigneten Versuchstieres wurden verschiedene Gesichtspunkte in die Überlegungen einbezogen. Die Knorpeldefekte wurden im lasttragenden Bereich der hinteren Femurkondyle weiblicher Merinoschafe mit einem Alter von mindestens einem Jahr angelegt. Dieser Schafstamm hat sich als besonders robust erwiesen und ähnelt dem Menschen in Bezug auf Gewicht, Knochen-/Knorpelwachstumsverhalten - beide sind langsame Knochen-/Knorpelbildner, Gelenkgröße und Knorpeldicke[53] wesentlich mehr als das Kaninchenmodell, so daß Vergleiche mit dem menschlichen Kniegelenk realisiert werden können.

Die Epiphysenfugen der Tiere sind in diesem Alter bereits geschlossen, da die Tiere völlig ausgewachsen sind. Dies ist sehr wichtig, da bei im Wachstum befindlichen Individuen noch eine Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels und somit die Möglichkeit zur Selbstheilung bei Knorpeldefekten gegeben ist, welche nach dem Auswachsen nicht mehr vorhanden sind [29]. Somit würde das Resultat der Studie in Frage gestellt, da nicht genau feststellbar wäre, wieviel Prozent eines neu gebildeten Knorpelregenerats durch besagten Selbstheilungsmechanismus oder die verwendeten Implantate induziert wurde. Andererseits sind durch das relativ junge Alter der Tiere degenerative Gelenkschäden, wie sie im Alter beim Schaf relativ frühzeitig auftreten, ausgeschlossen.

Im Vergleich mit dem häufig verwendeten Kaninchenmodell weist das Schaf eine Reihe von Vorteilen auf, durch die es sich als Modell für die Regeneration von Knochen und Knorpel beim Menschen als überlegen erweist: Zum einen besteht ein großer Unterschied in der Dicke des gesunden Gelenkknorpels. Das Kaninchen verfügt im Kniegelenk lediglich über eine durchschnittliche Knorpeldicke von ca. 50 µm. Somit ist eine Übertragung auf menschliche Verhältnisse schwierig, da der Mensch im lasttragenden Bereich des Kniegelenks eine Knorpeldicke von ca. 3 Millimeter aufweist. Das Schaf mit einer Dicke um einen Millimeter zeigt sich hier dem Menschen deutlich ähnlicher, auch wenn die Knorpelstärken bei weitem nicht identisch sind. Somit sind die zur Implantation bestimmten Vliese der Dicke im Schafskondylus auch wesentlich besser anzupassen als den Dimensionen beim Kaninchen. Die Größe des Schafskniegelenkes ermöglicht das Anfertigen und

Einbringen von oberflächenpaßgenauen Bioimplantaten. Ein weiterer Punkt, der das Kaninchen als Modell für die Gelenkknorpelregeneration beim Menschen unbefriedigend macht, besteht in der stark abweichenden Reaktion auf Verletzungen der Gelenkoberfläche. So ist das Kaninchen zum einen ein Schnellknorpelbildner, d.h. der Heilungsprozess geht sehr viel schneller von statten. Zum anderen ist das Knorpelgewebe des Kaninchens sehr gut in der Lage, isolierte Knorpeldefekte ohne Beteiligung des subchondralen Knochens selbst zu schließen, während menschlicher Knorpel solche Schäden nur schlecht toleriert und das Selbstheilungspotential sehr gering ist [44]. Umgekehrt verbessert sich die Reparaturleistung des menschlichen Knorpels durch die Eröffnung des Markraums ganz erheblich, wohingegen dieses Vorgehen beim Kaninchen zu einer deutlichen Verschlechterung der Regenerationsleistung führt [44]. Aussagekräftige Schlußfolgerungen vom Kaninchen- zum Menschenmodell sind somit schwierig.

Andere Studiengruppen arbeiteten mit so unterschiedlichen Tieren wie Ratten, Kaninchen, Hunden, Pferden, Schweinen oder Ziegen [12,16,20,23,30,36,49,50,52, 53,59,76,82,96,102,104], was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Gruppen leider beeinträchtigt. Während Ziegen ebenso wie Schafe ein dem Menschen durchaus ähnliches Knorpelregenerationsverhalten an den Tag legen, ist dies bei den anderen genannten Modellen schlecht untersucht.

Gegen die Verwendung von Pferden spricht der ungleich höhere Aufwand für die Operation eines Pferdes schon rein aus Größen- und Gewichtsgründen auch wenn die Knorpeldicke hier sicherlich der des Menschen ähneln würde.

Ein versuchstechnischer Einwand gegen das Hundemodell liegt im Verhalten des Tieres auf Schmerz. Während Schafe unter adäquater Analgesie das operierte Bein sofort voll belasten, schonen und entlasten Hunde eine verletzte Extremität instinktiv, wodurch eine sofortige postoperative Belastung des Gelenks, welche in unserem Versuchsmodell nicht nur erlaubt, sondern sogar notwendig war, nicht zustande kommt. Zusätzlich steht oder läuft das Schaf, im Gegensatz zum Hund, die meiste Zeit, wodurch die für die Knorpelregeneration notwendige Druckbelastung der Bioimplantate gewährleistet ist.

Der in der Arbeit von Morris als ideales Modell für tierexperimentelle Studien zur Gelenkknorpelreparation benannte nichtmenschliche Primat [53] fand bislang keine Verwendung im Bereich der Arthroserforschung.

5.3.4. Auswertung mittels Score

Bei der Auswertung der vorliegenden Studie ergibt sich das Problem der Quantifizierung und Objektivierung der Ergebnisse hinsichtlich des Knorpelwachstums in den Defekten. Die Auswertungsergebnisse sollten reproduzierbar sein und für eine gewisse interpersonelle Konstanz der Ergebnisse sorgen. Zu diesem Zweck bietet sich daher die Verwendung von Auswertungsschemata - sogenannten "Scores" - an, die für definierte Kriterien eine bestimmte Punktzahl vergeben und somit einen unmittelbaren Vergleich verschiedener untersuchter Schnitte ermöglichen. Außerdem erfüllen sie im Idealfall die Kriterien der Reproduzierbarkeit, Konstanz und Unabhängigkeit vom Untersucher weitgehend. Ein Nachteil dieser Scores ist jedoch die Ungenauigkeit, die durch das Einordnen biologischer Zustände in ein starres Zahlensystem mit einer meist eng begrenzten Auswahl an Merkmalsausprägungen verbunden ist. So werden Fälle, die gerade noch ein bestimmtes Kriterium erreicht haben mit Befunden gleichgestellt, die die nächstbessere Bewertung nur knapp verfehlt haben. Trotz dieses Kritikpunktes hat sich die Verwendung solch definierter Punktesysteme zur Beurteilung verschiedener biologischer Sachverhalte in Medizin und Forschung durchgesetzt. Man findet in der aktuellen Literatur zahlreiche, meist einander ähnelnde Auswertungsschemata zur Beurteilung der Regeneration von Knorpelgewebe im Tierversuch wie auch beim Menschen. Während sich die Beurteilung der Ergebnisse beim Menschen jedoch weitgehend auf makroskopische Betrachtungen und ungenaue mechanische Untersuchungen stützen muß und nur selten Fällen histologische Ergebnisse mit einbezieht, basieren Auswertungen von Tierversuchen überwiegend auf mikroskopischen Untersuchungen am explantierten Gelenk. Dazu existiert beispielsweise ein Beurteilungsschema von Pineda [51,67], welches in der Auswertung neben einer überschießenden Gewebsreaktion im Defekt auch die Wiederherstellung der osteochondralen Grenzschicht berücksich-

tigt. Von diesem Score leitet sich das Schema nach Wakitani [103] ab, der an Stelle der osteochondralen Grenze den Grad der Integration des Regenerats in das umgebende Knorpelgewebe bewertet und so zu etwas abweichenden Ergebnissen kommt. Umfassender als diese beiden ist der auch in unserer Arbeit verwendete Score nach O'Driscoll [51,57,58,59,60] [App.4], der ein breiteres Spektrum verschiedener Kriterien überprüft und so eine differenziertere Bewertung des Neogewebes ermöglicht. Neben den rein morphologischen Kriterien des Regenerats werden auch Zeichen der Degeneration im defektfüllenden Gewebe und im defektangrenzenden, primär nicht geschädigten Knorpel bewertet. Eine neuere Erweiterung dieses Scores ist die von Niederauer zur Beurteilung der Knorpelreparatur benutzte [56], in der zusätzlich auch Geweberscheinungen wie Hyperzellularität gewertet werden, die im ursprünglichen Score nicht berücksichtigt sind. Obwohl der Score nach O'Driscoll eine umfangreiche Beurteilung des Regenerats erlaubt, benutzen wir in unserer Arbeit eine Erweiterung, die weiteren wichtigen Kriterien zur Knorpelneubildung Rechnung tragen soll wie z.B. den wesentlichen strukturellen Bestandteilen des Knorpels Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan. Da Kollagen I ein wesentlicher Bestandteil von Faserknorpel, aber auch von degenerierendem hyalinem Knorpel ist, ist seine Anwesenheit im Regenerat als ungünstig zu bewerten, wohingegen Kollagen II nahezu ausschließlich in hyalinem Knorpel zu finden ist, seine Anwesenheit also für ein normalem Gelenkknorpel sehr ähnliches Gewebe spricht. Aggrecan ermöglicht als generell in Knorpel vorkommendes Bindemolekül die Unterscheidung zwischen knorpeligem Gewebe und Bindegewebe so daß man neu gebildetes Gewebe als physiologisch minderwertiges Bindegewebe oder funktionstüchtiges Knorpelgewebe identifizieren kann. Ein weiteres Zusatzkriterium unseres erweiterten Scores stellt die Anwesenheit von Blutgefäßen in der neugebildeten Knorpelgewebsschicht dar. Gesunder Gelenkknorpel enthält in keinem Fall Gefäße, so daß ihre Anwesenheit als Zeichen für pathologische, in der Regel resorptive Vorgänge oder die Bildung von Granulationsgewebe mit Bindegewebsproliferation gelten muß. Als letztes Kriterium wurde das metachromatische Verhalten des Neoknorpels bei Färbung mit Toluidinblau eingeführt. Dieses Verhalten ist, wie bei der Färbung mit Safranin-O, abhängig von der Menge saurer Glykosaminoglykane im gefärbten Gewebe, jedoch

findet bei der Färbung mit Toluidinblau der Farbumschlag wesentlich abrupter statt, wodurch die Trennung zwischen glykosaminoglykanreichem und -ärmerem Gewebe schärfer wird.

5.4. Diskussion der Ergebnisse

5.4.1. Problematik des Scores

In der endgültigen Auswertung der histologischen Präparate mit dem Scoresystem ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe im Bezug auf die Neubildung von hyalinem Knorpelgewebe. Die Histologie der Implantate sah zwar auf den ersten Blick deutlich besser aus, als die der Kontrollgruppe. Auch kam es zu einer zumindest partiellen, wenn auch nicht vollständigen Deckung der Defekte mit hyalinähnlichem Knorpelgewebe, dennoch zeigte sich nach Auswertung mit dem Score überraschenderweise praktisch kein Unterschied in der Endpunktezah zwischen den beiden Versuchsgruppen [Tab.2]. Hierfür kommen mehrere mögliche Ursachen in Frage.

Ein Kritikpunkt der oben genannten Auswertungshilfen ist, daß in keiner der Quellen, die diese Scores benutzten, festgelegt ist, an welcher Stelle im Regenerat die Beurteilung vorgenommen werden soll [12,58,105,109]. Somit ergeben sich völlig unterschiedliche Ergebnisse abhängig davon, welches Gewebe beurteilt wird. In den meisten Studien wird das repräsentative Gewebe beurteilt, wobei nicht angegeben wird wie viel Prozent des Regenerates mit diesem Gewebe bedeckt sind und wo dieses Gewebe liegt. Am Defektrand findet sich in der Regel ein deutlich besseres Resultat als in den zentralen Defektbereichen, wo eine vollständige Deckung meist nicht zustandekommt. In der hier durchgeführten Auswertung wurden in Anbetracht der Inhomogenität des entstandenen Gewebes immer die schlechtesten Stellen eines zentralen Schnittes durch die Mitte des Defektareals bewertet, um eine positive Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden und die größtmögliche Objektivität zu gewährleisten. Da somit durch den Score immer das minderwertigste Gewebe in einem Defekt beurteilt wurde, nicht das für die Studie

repräsentative, kommt es zu großen Differenzen zwischen den Ergebnissen der Score-Auswertung und der Beschreibung der Histologien, sowie der Auswertung der prozentualen Defektdeckung, die jeweils den gesamten Defekt betrachten und bewerten.

Die Probleme der Score-Erweiterung liegen darin, daß die Kriterien allesamt sehr spezifisch für hyalinen Knorpel sind und im Grunde nur hyalinen Knorpel positiv bewerten. Die Kriterien von Faserknorpel, wie Kollagen I werden negativ bewertet, ebenso Anzeichen für sonstiges Bindegewebe so daß gerade bei der von uns verwendeten Auswertung der schlechtesten Stelle im Regenerat das Ergebnis sehr negativ ausfällt, da an diesen Stellen meist kein oder nur bindegewebiges Ersatzmaterial entstanden ist. Offensichtlich unterscheidet die in dieser Arbeit vorgeschlagene Score-Erweiterung sehr streng zwischen einem guten und einem schlechten Regenerat, so daß nur hochentwickelter hyaliner Ersatzknorpel, wie er nur in wenigen Bereichen im Präparat vorkommt, positiv bewertet wird, nicht jedoch faserknorpeliges oder hyalinartiges Ersatzgewebe. Es ist möglich, daß ein differenzierteres Bewertungsschema mit mehreren Abstufungen innerhalb der einzelnen Kriterien, also beispielsweise "Anwesenheit von Kollagen II in mehr als 25% des Regenerats" usw. die Aussagekraft der vorgeschlagenen Erweiterung bezüglich verschiedener Qualitäten des Regeneratgewebes verbessern würde. Somit werden die mikroskopisch guten Ergebnisse durch die Auswertung des schlechtesten anstatt des repräsentativen Gewebes im Regenerat verfälscht und vom Score aus oben genannten Gründen nicht erfaßt, sondern zu negativ bewertet. Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls ein inhomogenes Ersatzgewebe, beurteilen aber in Ihren Auswertungen mit den Scores das beste Gewebe, oder das „repräsentative“, oder beschreiben in ihren Arbeiten überhaupt nicht, wo im neu gebildeten Gewebe sie die Auswertung vornahmen [12,58,105,109].

Zwar zeigt sich im Score kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen in Bezug auf Aufbau und Eigenschaften hyalinen Knorpels, betrachtet man jedoch isoliert die flächenhafte Defektdeckung in einer separaten Auswertung [Tab.3], so fällt auf, daß sich die Gruppen zumindest im Ausmaß der Defektdeckung mit knorpeligem Gewebe stark und signifikant unterscheiden [Tab.2]. Die mit Implantaten versorgten Defekte weisen hier eine durchschnittliche

Defektdeckung von 60,5 % im Gegensatz zu 2,2 % bei der Kontrollgruppe auf. Der Score ist somit nicht in der Lage, einige wichtige Kriterien wie die prozentuale Flächendeckung der Knorpeldefekte, welche in der vorliegenden Arbeit sehr gut war, zu erfassen. Er bewertet nur den histologischen Aufbau des Ersatzgewebes nicht jedoch seine Ausdehnung im Defektareal und die verschiedenen Qualitäten an verschiedenen Regeneratstellen.

In zukünftigen Studien sollte somit eine Einteilung der Regenerate in Zonen und somit einzelne Auswertungen auch der guten Reparationsstellen vorgenommen werden, um eine Aussage für den gesamten Defekt treffen zu können.

5.4.2. Probleme bei den Implantaten

Als weitere Ursache für das nicht zufriedenstellende Abschneiden der Versuchsgruppe ist zu sehen, daß die Implantate von Hand in die Defekte eingebracht wurden, wodurch gewisse Inhomogenitäten beim Fräsen der Implantatlager nicht zu vermeiden waren. Insbesondere das Einbringen der Darts in die vorgestanzten Verankerungslöcher erwies sich als unerwartet schwierig, wobei einige Darts verloren gingen, andere sich querlegten oder am Ende über das Vlies überstanden. Dadurch ist eine unzureichende Fixierung des Vlieses in den Defekten möglich, ebenso wie das Entstehen von Druckspitzen und somit eine Störung der biomechanischen Rahmenbedingungen für die Knorpelneubildung. Kleinste Inkongruenzen der artifiziellen Gelenkschicht und Abweichungen vom angestrebten Gelenkniveau von wenigen zehntel Millimetern reichen aus, um unphysiologische Druckverhältnisse in der Knorpelersatzschicht zu induzieren, so daß eine Umdifferenzierung mesenchymalen Gewebes in Chondrozyten nicht mehr möglich ist [26,50]. Es ist außerdem denkbar, daß die Darts die vorgebohrten Löcher, die einen Zugang zum subchondralen Markraum eröffnen sollten, zu stark wieder abdichteten, so daß die Eröffnung des subchondralen Raumes nicht suffizient war und somit zu wenig Zellen aus dem Markraum in das Implantat bzw. den Defekt einwandern konnten, was eine gute Knorpelneubildung verhindert haben könnte [26,50]. Bei Durchmusterung der Leerlochpräparate in der histologischen Auswertung zeigte sich zwar, daß in allen Defekten an mehreren

Stellen Öffnungen zum Subchondralraum vorhanden waren und daher sowohl in der Leerlochgruppe, als auch in der Implantatgruppe ein Einwandern von mesenchymalen Zellen in das Implantat möglich war. Auch intraoperativ konnte man sehen, daß eine Benetzung der Implantate und der Leerlöcher mit Knochenmarksblut stattfand, jedoch war die Einblutung in der Stärke eher gering.

5.5. Vergleich mit anderen Forschungsgruppen

Im Vergleich mit der Forschungsgruppe von Niederauer et al. wird deutlich, daß im Verhältnis die bei uns gesetzten Knorpeldefekte wesentlich größer waren. Diese Gruppe untersuchte die Wirkung von vier verschiedenen dreischichtigen Bioimplantaten auf die Regeneration osteochondraler Defekte im medialen Femurkondylus bei Ziegen [56]. Ein Teil der Implantate wurde mit autologen Chondrozyten beimpft, die Ergebnisse nach 16 Wochen Vollbelastung mittels histologischer Färbungen durch den O'Driscoll Score ausgewertet. Die qualitative und histologische Auswertung des Reparaturgewebes ergab einen hohen Prozentsatz von neu gebildetem hyalinartigem Knorpel und guter Knochenregeneration in allen Versuchsgruppen. Der Neoknorpel war dabei gut in den umgebenden Knorpel integriert worden. Aus diesen Versuchen wurde auf das gute Potential von multiphasischen Bioimplantaten zur Heilung von fokalen, osteochondralen Defekten in Gelenken geschlossen. Die Defektgröße bei diesen Versuchen betrug jedoch lediglich 3 mm im Durchmesser und 4 mm in der Tiefe, also nicht einmal die Hälfte der bei unseren Versuchen gesetzten Defekte, obwohl die verwendeten Ziegen in Größe und Gewicht in etwa Merinoschafen entsprechen. Zusätzlich wurde mit einer Defekttiefe von 4 mm im Gegensatz zur hier vorgelegten Arbeit, der subchondrale Raum direkt eröffnet, um die Einwanderung mesenchymaler Stammzellen zu sichern, jedoch um den Preis einer weitaus größeren Traumatisierung der Gelenkfläche. Somit findet bei Niederauer et al. auf den ersten Blick eine bessere Reparatur der Defekte als in der hier vorgelegten Studie statt, allerdings waren die Defekte deutlich kleiner. Beachtet man das auch in unserer Arbeit gebildete hyaline Ersatzknorpelmaterial, welches die großen

Defekte mit 8 mm Durchmesser zwar nicht vollständig, aber doch zu einem großen Teil decken konnte, erkennt man, daß sich das Ergebnis von Niederauer et al. durch die geringe Größe der osteochondralen Defekte relativiert.

Brittberg et al. [11,12] z.B. zeigten am Kaninchenmodell den Einfluß der Chondrozytentransplantation auf die Knorpelregeneration in chondralen Defekten der Kniescheibe mit 3 mm Durchmesser. Nach 12 Wochen Beobachtungszeitraum zeigte sich eine Füllung von nur 29% der Fläche der Leerlochkontrollgruppe, wobei das Füllgewebe hauptsächlich aus Bindegewebe bestand. Die Versuchsgruppen mit 1. Chondrozyten und Periostversiegelung, 2. mit Chondrozyten besiedelte Carbonfibrerüste 3. Carbonfibrerüste allein ohne Zellbesiedlung erreichten Deckungen zwischen 20 und 90%. Im Score nach O'Driscoll erreichten die Leerlöcher einen Punktwert von 2,7, die Chondrozytentransplantation 15,3, die Carbonfibrerüste ohne Zellbesiedlung 5,4 und mit Zellbesiedlung 18,1 Punkte. Auch in dieser Veröffentlichung wird nicht angegeben, wo im Präparat die Auswertung vorgenommen wurde, wobei die Regenerate gemäß Beschreibung im Randbereich besser waren als im zentralen Defekt. Außerdem handelte es sich bei den Versuchstieren um 4 Monate alte Kaninchen, die noch nicht ausgewachsen waren und daher von Haus aus ein höheres Knorpelregenerationspotential besaßen.

Shortkroff et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung der Chondrozytentransplantation auf 3 mm große chondrale Defekte, allerdings am Hundemodell und mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 4 Wochen [82]. Die chondralen Leerlochdefekte wurden hier nicht mit Regeneratgewebe gefüllt, während die Defekte nach Chondrozytentransplantation einen Füllungsgrad zwischen 50 und 90% aufwiesen, wobei es sich bei dem Füllungsgewebe überwiegend um minderwertiges Bindegewebe ohne Knorpelanteile handelte. Eine Auswertung anhand eines Scores zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde leider nicht durchgeführt, so daß die Ergebnisse kaum objektivierbar sind.

Wei et al. untersuchten osteochondrale Defekte im Vergleich zu Leerlöchern am ausgewachsenen Kaninchen nach 24 Wochen [105]. Hier erreichten die Regenerate im Score nach O'Driscoll 10 Punkte, wobei eine prozentuale Defektdeckung von 75,5% erreicht wurde. Diese sehr guten Ergebnisse hängen möglicherweise mit der

längeren Nachbeobachtungszeit und dem höheren Regenerationspotential von Kaninchen gegenüber Schafen zusammen, ebenso wie in den Studien von Gomar-Sancho [26], Moran und Salter [52] und O'Driscoll et al [58,59].

5.6. Zusammenfassung

Im Vergleich zu den oben genannten Studien scheinen die hier präsentierten Ergebnisse anhand des Scores schlechter auszufallen, jedoch muß man das neue, bisher nicht erprobte Verfahren mit nicht perfekten Materialien und Techniken, das Ausmaß der Gelenkknorpeldefekte, die in unserem Versuch im Verhältnis wesentlich größer waren, als in anderen Studien, das unterschiedliche Potential der verschiedenen Versuchstiere zur Knorpelregeneration, welches beim häufig verwendeten Kaninchen im Gegensatz zu Schafen erhalten ist, und den großen Unterschied der beurteilten Regeneratstellen in der Score-Auswertung berücksichtigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Bioimplantate bei reinen chondralen Defekten zu einer besseren Deckung mit neugebildeten Knorpel führten, auch wenn das Regenerat stark inhomogen war und qualitativ von faserknorpelähnlichen bis zu hyalinartigen Knorpelanteilen reichte. Die Eröffnung des subchondralen Raumes scheint aber tatsächlich, wie bereits die eigenen Vorversuche am Kaninchenmodell zeigten, entscheidend für das Regenerationspotential zu sein.

Der von uns durchgeführte Ansatz erscheint vielversprechend, aber verbesserungsbedürftig. Weitere Versuche mit verbesserter Operationstechnik zur Vermeidung von Inhomogenitäten und Ungenauigkeiten, die dann die Bildung des Ersatzknorpels behindern, müssen zeigen, ob eine *komplette* Überdeckung der Knorpeldefekte erzielt werden kann und somit durch Perfektionierung von Material und Technik eventuell doch das Wachstum von eindeutig hyalinartigem Knorpel induziert werden kann. Langzeitversuche müssen dann zeigen ob dieser Regeneratknorpel den Belastungen längerfristig stand hält.

Interessant dürfte dahingehend auch die Untersuchung der Wirkung von speziellen Wachstumsfaktoren auf die Bildung des Neoknorpels sein, wie sie im Rahmen der Knochenregeneration bereits für das "Bone Morphogenic Protein 2" (BMP2) angestellt und dessen Freisetzungsmuster in vitro untersucht wurde [27,110]. So existieren verschiedene Beschreibungen über die medikamentöse Beeinflussung von Zellen in vitro, sich in Richtung Chondrozyten zu differenzieren [106,111]. Ein wesentliches Problem dieser Verfahren ist jedoch die gezielte Zuführung dieser Substanzen zu den differenzierenden Zellen, die in vivo noch nicht im erforderlichen Maß durchgeführt werden kann. Ob die Einbettung solcher Substanzen in eine resorbierbare Implantatmatrix hier hilfreich sein kann, wäre interessanter Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Es bedarf noch viel weiterer Forschungsarbeit und Weiterentwicklung, bevor man ernsthaft daran denken kann, dieses Verfahren am Menschen anzuwenden, um endlich ein wirkungsvolles Verfahren zur Heilung von Knorpeldefekten bei Patienten mit Arthrose, Sportverletzungen, Flake Fractures u.ä. zur Verfügung zu haben.

Literaturverzeichnis

1. Aigner.; Tegeler, J.; Hutzler, P.; Campoccia, D.; Pavesio, A.; Hammer, C.; Kastenbauer, E.; Naumann, A.
Cartilage Tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester.
J. Biomed. Mater. Res. 42: 172-181, 1996
2. Angermann, P., Riegels-Nielsen, P., Pedersen, H.
Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation. Poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years.
Acta. Orthop. Scand. 1998; 69: 595-597.
3. Aspenberg, P.; Tägil, M.; Kristensson, C.; Lidin, S.
Bone graft proteins influence osteoinduction. A titanium chamber study in rats.
Acta. Orthop. Scand. 67(4): 377-382, 1996
4. Attmannspacher, W ; Dittrich, V ; Stedtfeld, H.-W.
Erfahrungen in der arthroskopischen Therapie von chondralen und osteochondralen Defekten am Kniegelenk mit OATS®.
Zentralbl. Chir. 125: 494-499, 2000
5. Benninghoff, A.
Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen – Band 1
15. Auflage, Verlag Urban & Schwarzenberg, München 1994
6. Benninghoff, A.
Der funktionelle Bau des Hyalinknorpels.
Ergeb. Anat. Entw. Gesch. 26: 1-54, 1925
7. Benninghoff, A.
Form und Bau der Gelenknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion, 2. Der Aufbau des Gelenknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion.
Z. Zellforsch. mikros. Anat. 2: 783-862, 1925
8. Bouwmeester S.J., Beckers J.M., Kuijer R., van der Linden A.J., Bulstra S.K.
Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee.
Int. Orthop. 1997; 21: 313-317.
9. Bouwmeester, P.S.; Homminga, G.N.; Bulstra, S.K.; van der Linden, A.J. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee.
J. Bone Joint Surg. Br. 1990; 72: 1003-1007.

10. Brittberg, M.; Faxén, E.; Peterson, L.
Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee arthrosis. A prospective 4-year follow-up of 37 patients.
Clin.Orthop. 307: 155-164, 1994
11. Brittberg, M.; Lindahl. A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson. O.; Peterson, L.
Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.
New Eng. J. Med. 331: 889-895, 1994
12. Brittberg, M.; Nilsson, A.; Lindahl, A.; Ohlsson, C.; Peterson, L.
Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes.
Clin. Orthop. Rel. Res. 326: 270-283, 1996
13. Buckwalter, J.A.; Rosenberg, L.; Coutts, R.; Hunziker, E.; Reddi, A.; Mow, V.
Articular cartilage: injury and repair.
In: Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues. Edited by S.L-Y. Woo and J.A. Buckwalter, Park Ridge, Illinois. The American Academy for Orthopaedic Surgeons: 465-482, 1988
14. Buckwalter, J.A.; Rosenberg, L.C.; Hunziker, E.B.
Articular cartilage: Composition, structure, response to injury, and methods of facilitating repair.
In: Articular cartilage and knee joint function: Basic science and arthroscopy, J.W. Ewing (ed.), Raven Press, New York: 19-56, 1990
15. Bullough, P.; Goodfellow, J.
The significance of the fine structure of articular cartilage.
J. Bone Joint Surg. 50 B: 852-857, 1968
16. Butnariu-Ephrat, M.; Robinson, D.; Mendes, D.G.; Halperin, N.; Nevo, Z.
Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow.
Clin. Orthop. 330: 234-243, 1996
17. Campbell, C.J.
The healing of cartilage defects.
Clin. Orthop. 64: 45-63, 1969
18. Caplan, A.I.
Cartilage
Sci. Am. 251: 84-90, 1984

19. Caplan, A.I.
Mesenchymal stem cells
J. Orthop. res. 9: 641-650, 1991
20. Clarke, I.C.
Surface characteristics of human articular cartilage – a scanning electron microscope study
J. Anat. 108: 23-30, 1971
21. Cohen, N.P.; Foster, R.J.; Mow, V.C.
Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function and maintaining healthy state.
J. Orthop. Sports. Phys. Ther. 28: 203-215, 1998
22. Egli, P.S.; Hunziker, E.B.; Schenk, R.K.
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. 222: 217-227, 1988
23. Furukawa, T.; Takemitsu; Eyre D.R.; Koide, S.; Seiichi; Glimcher, M.J.
Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee.
J. Bone Joint Surg. 62 A: 79-89, 1980
24. Geneser, F.
Knorpelgewebe
In: Histologie. Deutscher Ärzte-Verlag Köln: 215-216, 1990
25. Goldwasser, M.; Van der Rest, M.; Glovieux, F.H.
Analysis of types of collagen present in human newborn and adult articular cartilage.
Trans. Orthop. Res. Soc. 3: 75, 1978
26. Gomar-Sancho, F.; Gastaldi Orquin, E.
Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit's knee. The use of autologous osteochondral and meniscal grafts.
Int. Orthopaedics 11: 65-69, 1987
27. Gooch, K.J.; Blunk, T.; Courter, D.L.; Sieminski, A.L.; Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L.E.
Bone morphogenetic Proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage.
Tissue Engineering 8/4: 591-601, 2002
28. Haebler, C.
Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration des Gelenkknorpels.
Klin. Chir. 1925; 134: 602-640.

29. Hollinger, J.O.
Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA).
J. Bone Joint Surg. 53 A: 742-748, 1971
30. Honner, R.; Thompson, R.C.
The nutritional pathways of articular cartilage
J. Biomed. Mater. res. 17: 71-82, 1983
31. Hunter, W.
Of the structure and diseases of articular cartilage.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B42: 514-521, 1743
32. Hunziker, E.B.; Rosenberg, L.C.
Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: Cell recruitment from the synovial membrane.
J. Bone Joint Surg. 78 A: 721-733, 1996
33. Jansson, V.; Müller, P.E.; Thal, S.; Arnholz, C.; Milz, S.; Koch, K.U.; Refior, H.J.
Ein neues resorbierbares Knochen-Knorpel-Ersatztransplantat. Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie.
Orthopäde 29: 151-157, 2000
34. Johnson, L.L.
Arthroscopic abrasion arthroplasty.
In: Operative arthroscopy (Ed. McGinty J.B.). Lippincott-Raven Publ. Philadelphia: 427-446, 1996
35. Kreder, H.J.; Moran, M.; Keeley, F.W.; Salter, R.B.
Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model.
Clin. Orthop. 300: 288-296, 1994
36. Liu, Y.; Chen, F.; Liu, W.; Cui, L.; Shang, Q.; Xia, W.; Wang, J.; Cui, Y.; Yang, G.; Liu, D.; Wu, J.; Xu, R.; Buonocore, S.D.; Cao, Y.
Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage.
Tissue Engineering 8(4): 709-721, 2002
37. Löhnert, J.; Raunest, J.
Abrasionschondroplastik
Arthroskopische OP-Lehre des Kniegelenks, Biermann GmbH, Zürich: 159-162, 1990

38. Löhnert, J.; Raunest, J.
Knorpelglättung
Arthroskopische OP-Lehre des Kniegelenks, Biermann GmbH, Zürich:
151-157, 1990
39. Löhnert, J.; Raunest, J.
Pridie-Bohrung
Arthroskopische OP-Lehre des Kniegelenks, Biermann GmbH, Zürich:
159-162, 1990
40. Mankin, H.J.
The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (parts one
and two).
New Eng. J. Med. 291: 1285-1292; 1335-1340, 1974
41. Mankin, H.J.
The response of articular cartilage to mechanical injury. Current
concepts review.
J. Bone Joint Surg. 64 A: 460-466, 1982
42. Maroudas, A.
Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and
degenerate cartilage.
Nature 260: 808, 1976
43. Maschka, K.; Bert, J.M.
The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-
year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic
debridement and arthroscopic debridement alone.
Arthroscopy. 1989; 5: 25-32.
44. Meachim, G.
The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit.
J. Bone Joint Surg. 45 B: 150-161, 1963
45. Meachim, G.; Roberts, C.
Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee.
J. Anat. 109: 317-327, 1971
46. Messner, K.; Gillquist, J.
Cartilage repair. A critical review.
Acta Orthop. Scand. 67: 523-529, 1996
47. Messner, K.; Maletius, W.;
The long term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage
in the knee. A 14-year clinical and radiologic follow-up in 28 young
athletes.
Acta Orthop. Scand. 67: 165-168, 1996

48. Minas, T.; Bentley, G.
Treating joint damage in young people.
BMJ. 2000; 320: 1585-1588.
49. Mitchell, N.; Shepard, N.
Healing of articular cartilage in intra-articular fractures in rabbits.
J. Bone Joint Surg. 62 A: 628-634, 1980
50. Mitchell, N.; Shepard, N.
The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone.
J. Bone Joint Surg. 58 A: 230-233, 1976
51. Moojen, D.J.F.; Saris, D..F.; Auw Yang, K.G.; Dhert, W.J.A.; Verbout, A.J.
The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair.
Tissue Engineering 8(4): 627-634, 2002
52. Moran, M.E.; Kim, H.K.; Salter, R.B.
Biologic resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage in rabbits. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion.
J. Bone Joint Surg. 74 B: 659-667, 1992
53. Morris, E.A.; Peluso, D.; Gill, T.J.; Powers, J.; Glasco
The choice of the animal model of articular cartilage repair studies.
Transactions of the 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society Group: 260, 2001
54. Mow, V.C.; Holmes, M.H.; Lai, W.M.
Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review.
J. Biomechanics 17: 377-394, 1984
55. Mow, V.C.; Lai, W.M.
Some surface characteristics of articular cartilage. A scanning electron microscopy study and a theoretical model for the dynamic interaction of synovial fluid and articular cartilage.
J. Biomechanics 7: 449-456, 1974
56. Niederauer, G.G.; Slivka, M.A.; Leatherbury, N.C.; Korvick, D.L.; Harrhoff, H.H.; Ehler, W.C.; Dunn, C.J., Kieswetter, K.
Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats.
Biomaterials 21: 2561-2574, 2000

57. O'Driscoll et al.
Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system.
Tissue Eng. 7: 313-320, 2001
58. O'Driscoll, S.W.; Keeley, F.W.; Salter, R.B.
Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion.
J. Bone Joint Surg. 70 A: 595-606, 1988
59. O'Driscoll, S.W.; Keeley, F.W.; Salter, R.B.
The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.
J. Bone Joint Surg. 68 A: 1017-1035, 1986
60. O'Driscoll, S.W.; Miura, Y.; Gallay, S.H.
Objective assessment of a subjective histochemical scoring system for chondrogenesis.
Trans. Orthop. Res. Soc. 15: 210, 1990
61. Pässler, H.H.
Die Mikrofrakturierung zur Behandlung von Knorpeldefekten.
Zentralbl. Chir. 125: 500-504, 2000
62. Pauwels, F.
Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1965
63. Pauwels, F.
Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1973
64. Perka et al.
Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon Fleece.
Orthopäde 29: 112-119, 2000
65. Peterson, L.; Brittberg, M.; Kiviranta, I.; Akerlund, E.L.; Lindahl, A.
Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability.
Am. J. Sports Med. 2002; 30: 2-12.

66. Peterson, L.; Minas, T.; Brittberg, M.; Nilsson, A.; Sjogren-Jansson, E.; Lindahl, A.
Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee.
Clin. Orthop. 2000; 212-234.
67. Pineda, S.; Pollack, A.; Stevenson, S.; Goldberg, V.; Caplan, A.
A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair.
Acta. Anat. 143: 335-340, 1992
68. Pistner, H.; Gutwald, R.; Ordnung, R.; Reuther, J.; Mühling, J.
Poly(L-lactide): a long-term degradation study *in vivo* Part I. Biological results
Biomaterials 14(9): 671-677, 1993
69. Pistner, H.; Stallforth, H.; Gutwald, R.; Mühling, J.; Reuther, J.; Michel, Ch.
Poly(L-lactide): a long-term degradation study *in vivo* Part II. physico-mechanical behaviour of implants
Biomaterials 14(9): 671-677, 1994
70. Pittsburgh Tissue Engineering Initiative (PTEI), Pittsburg, PA, USA
Homepage "Pittsburgh Tissue Engineering Initiative (PTEI)"
Internet: <http://www.ptei.org>
71. Ploetz, E.
Funktioneller Bau und funktionelle Anpassung der Gleitsehnen (D25)
Z. Orthop. 67: 212-234, (1938)
72. Prendergast, P.J; Huiskes, R.; Soballe, K.
ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces.
J. Biomech.30(6): 539-548, (1997)
73. Pridie, K.H.
A method of resurfacing osteoarthritic knee joints.
In: Proceedings of the British Orthopaedic Association.
J. Bone Joint Surg. 41 B: 618-619, 1959
74. Reddi A.H.
Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration.
Nat. Biotechnol. 1998; 16: 247-252.
75. Rubak, J.M.
Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts: An experimental study
Acta Orthop. Scand. 53: 175-180, 1982

76. Salter, R.B.; Simmonds, D.F.; Malcolm, B.W.; Rumble, E.J.; Macmichael, D.;
The effects of continuous passive motion on the healing of articular cartilage defects: an experimental investigation in rabbits (abstract).
J. Bone Joint Surg. 57:570, 1975
77. Salter, R.B.; Simmonds, D.F.; Malcolm, B.W.; Rumble, E.J.; Macmichael, D.; Clements, N.D.
The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage.
J. Bone Joint Surg. 62 A:1232-1251, 1980
78. Schmidt, H.; Hasse, E.
Arthroskopische operative Behandlung von umschriebenen Knorpelschäden mittels Spongialisierung oder Pridie-Bohrung.
Beitr. Orthop. Traumatol. 1989; 36: 35-37.
79. Schiebler, T.H.; Schmidt, W.; Zilles, K.
Anatomie – Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen.
7. Auflage, Springer Verlag, Berlin 1997; 154-160, 180-189.
80. Scuderi, G.R.; Goldman, R.T.; Kelly, M.A.
Arthroscopic treatment of the degenerative knee in older athletes.
Clin. Sports Med. 1997; 16: 51-68.
81. Shapiro, F.; Koide, S.; Glimcher M.J.
Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage.
J. Bone Joint Surg. 75A:532-553, 1993
82. Shortkroff S., Barone L., Hsu H.P., Wrenn C., Gagne T., Chi T., Breinan H., Minas T., Sledge C.B., Tubo R., Spector M.
Healing of chondral and osteo-chondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in re-generation of articular cartilage.
Biomaterials. 1996; 17: 147-154.
83. Silbermann, M.; Bruns, J.; Kersten, P.; Liese, W.
Cartilage-flow phenomenon and evidence for it in perichondrial grafting.
Arch. Orthop. Trauma Surg. 1997; 116: 66-73.
84. Sittinger, M.; Bujia, J.; Minuth, W.W.; Hammer, C.; Burmester, G.R.
Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture.
Biomaterials 15(6): 451-456, 1994

85. Sittering M., Bujia J., Minuth W.W., Hammer C., Burmester G.R.
Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture.
Biomaterials. 1994; 15: 451-456.
86. Sittering M., Bujia J., Rotter N., Reitzel D., Minuth W.W., Burmester G.R.
Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.
Biomaterials. 1996; 17: 237-242.
87. Sledge, S.L.
Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries.
Clin Sports Med. 2001; 20: 365-377.
88. Sobotta, J.; Hammersen, F.
Histologie.
4. Auflage, Verlag Urban&Schwarzenberg, München, 1994; 74.
89. Soderman, P.; Malchau, H.; Herberts, P.
Outcome after total hip arthroplasty: Part I. General health evaluation in relation to definition of failure in the Swedish National Total Hip Arthroplasty register.
Acta Orthop. Scand. 2000; 71: 354-359.
90. Soderman, P.; Malchau, H.; Herberts, P.; Zugner, R.; Regner, H.; Garellick, G.
Outcome after total hip arthroplasty: Part II. Disease-specific follow-up and the Swedish National Total Hip Arthroplasty Register.
Acta Orthop. Scand. 2001; 72: 113-119.
91. Nehrer, S.; Spector, M.; Minas, T.
Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures.
Clin. Orthop. 1999; 149-162.
92. Speer, D.P.; Dahners, L.
The collagenous architecture of articular cartilage. Correlation of scanning electron microscopy and polarized light microscopy observations.
Clin. Orthop. Rel. Res. 139: 267-275, 1979
93. Steadman, J.R.; Rodkey, W.G.; Rodrigo, J.J.
Microfracture: Surgical Technique and Rehabilitation to treat Chondral Defects.
Clin. Orthop. Rel. Res. 391S:362-369, 2001
94. Stockwell, R.A.
The cell density of human articular and costal cartilage.
J. Anat. 1967; 101: 753-763.

95. Swoboda, B.
Sprecher d. Arbeitskreises Arthrose der DGRh, Abtlg. F. Orthopädische Rheumatologie, Orthopädische Klinik d. Universität Waldkrankenhaus; St.Marien, Erlangen
Internetartikel, Home Page der DGRh .
96. Tägil, M.; Aspenberg, P.
Cartilage induction by controlled mechanical stimulation. A chamber study in rats.
44th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, New Orleans, Louisiana
97. Tillmann, B.; Zilles, K.; Leonhard, H.
Anatomie des Menschen Band I.
1. Auflage, Thieme Verlag, 1987; 34-38, 96-101
98. Universität Graz, Österreich,
Internetseite: www-ang.kfunigraz.ac.at/~groschne/bindegewebe.pdf
99. Vacanti, C.A.; Upton, J.
Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices.
Clin. Plast. Surg. 21(3): 445-462, 1994
100. Vacanti, C.A.; Vacanti, J.P.
Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches.
Otolaryngologic Clinic of North America 27(1): 263-276, 1994
101. Virbac Internetseite: www.virbac.at/fortiflex/pages/seite2.htm
102. von Schroeder, H.P.; Kwan, M.; Amiel, D.; Coutts, R.D.
The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects.
J. Biomed. Mater. Res. 25: 329-339, 1991
103. Wakitani, S.; Goto, T.; Pineda, S.; Young, R.; Mansour, J.M.; Caplan, A.; Goldberg, V.
Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.
J. Bone Joint Surg. 76 A: 579-592, 1994
104. Warren S.; Hurtig, M.; Pearce, S.; Kalra, M.; Miniaci, A.
Arthroscopic mosaic arthroplasty in the equine third carpal bone.
Vet. Surg. 2001; 30: 228-239.

105. Wei, X.; Messner, K.
Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint.
J. Biomed. Mater. Res. 1999; 46: 539-548.
106. Whang, K.; Goldstick, T.K.; Healy, K.E.
A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors.
Biomaterials 21: 2545-2551, 2000
107. Wolff, J.
Über die Bedeutung der Architektur der spongiösen Substanz
Centralbl. Med. Wiss. 54: 849-851 (1869)
108. Wu, J.J.; Apone, S.; Eyre, D.R.
Collagen heterogeneity in articular cartilage: identification of five genetically distinct molecular species.
Trans. Orthop. Res. Soc. 1987; 12: 109.
109. Yoo J.U., Solchaga L.A., Lundberg M., Dennis J.E., Huibregtse B.A., Goldberg V.M., Caplan A.I.
Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects.
J. Orthop. Res. 2000; 18: 773-780.
110. Young G., Nehrer S., Breinan H.A., Ramappa A., Shortkroff S., Minas T., Sledge C.B., Yannas I.V., Spector M.
Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro.
J. Biomed. Mater. Res. 1997; 38: 95-104.
111. Zakany, R.; Szucs, K.; Bako, E.; Felszeghy, S.; Czifra, G.; Biro, T.; Modis, L.; Gergely, P.
Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis.
Experimental Cell Research 275(1): 1-8, 2002
112. Zentralinstitut der Krankenkassen. Telephonische Auskunft. 2001.
113. Zimmermann, B.; Grundmann, K.; Barrach, H.J.; Merker, H.J.
Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies.
Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol. 1980; 389: 167-187.

Score nach O'Driscoll

(nach: Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year.

O'Driscoll, S.W.; Keeley F.W.; Salter R.B.
J. Bone Joint Surg AM 1988 Apr; 70(4):595-606)

Natur des vorherrschenden Gewebes

Zellmorphologie

Hyaliner Gelenknorpel	4 Punkte
Unvollständig differenziertes Mesenchym	2 Punkte
Bindegewebe oder Knochen	0 Punkte

Safranin-O Anfärbarkeit der Matrix

Normal fast normal	3 Punkte
Mäßig	2 Punkte
Schwach	1 Punkt
Keine	0 Punkte

Strukturelle Charakteristik

Gleichmäßigkeit der Oberfläche

Glatt und intakt	3 Punkte
Oberflächliche horizontale Schichtungen	2 Punkte
Risse (25 to 100% der Dicke)	1 Punkt
Schwere Störung einschließlich Fibrillation	0 Punkte

Strukturelle Integrität

Normal	2 Punkte
Leichte Störungen einschließlich Zysten	1 Punkt
Schwere Zerstörung / Desintegrität	0 Punkte

Dicke

100% des normalen angrenzenden Knorpels	2 Punkte
50-100% des normalen Knorpels	1 Punkt
<50% des normalen Knorpels	0 Punkte

Bindung an den angrenzenden Knorpel

an beiden Enden verbunden	2 Punkte
an einem Ende oder teilweise an beiden verbunden	1 Punkt
Nicht verbunden	0 Punkte

Abwesenheit von degenerativen Zellveränderungen

Zellularität

Normale Zellzahl	3 Punkte
Leichte Hypozellularität	2 Punkte
Mäßige Hypozellularität	1 Punkt
Schwere Hypozellularität	0 Punkte

Bildung von Chondrozytenclustern

Keine Cluster	2 Punkte
<25% der Zellen bilden Cluster	1 Punkt
25-100% der Zellen bilden Cluster	0 Punkte

Abwesenheit degenerativer Veränderungen am angrenzenden Knorpel

Normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbarkeit	3 Punkte
Normale Zellzahl, leichte Cluster, mäßige Anfärbung	2 Punkte
Leichte od. mäßige Hypozellularität, schwache Anfärbung	1 Punkt
Schwere Hypozellularität, schlechte od. keine Anfärbung	0 Punkte

Appendix 1: Score nach O'Driscoll

Vergleich Hyaliner Knorpel / Faserknorpel

	<i>Hyaliner Knorpel</i>	<i>Faserknorpel</i>
Vorkommen	Gelenkoberfläche, sternaler Rippenanteil, Nasenskelett, mittlere + tiefe Luftwege	Bandscheiben, Disci, Menisci, Symphysis Pubica, Gleitsehnen, Gelenkkapsel, Kiefer- u. Sternoclaviculargelenk
Aussehen makroskopisch	weißlich-bläulich, glasartig	Faserig, weißlich
Zusammensetzung	Interzellulärmatrix (75% Wasser, Proteoglykane, Glykoproteine, Kollageneiweiße > 40% d. Trockenmasse), relativ wenige Zellen (Chondrozyten); Kollagen Typ II	
	nur Kollagen II, kein Typ I	Kollagen Typ I >> Typ II
Aufbau mikroskopisch	<p>Zellen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chondrozyten in isogenen Gruppen = Chondrone, zwiebelschalenförmig umgeben v. Kollagenfasern Typ 6, 9, 12 = Territorien, dazw. Interterritorialsubstanz; • <u>i.Tiefe</u> kugelig, in Reihen, senkrecht zur Gelenkoberfläche; <u>i.Peripherie</u> spindelförmig, parallel zur Gelenkoberfläche; Oberfläche zellreicher als Tiefe <p>Matrix:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 90-95 % Kollagen Typ II, lockeres Netzwerk, Fibrillendurchm.: 10-20 nm, • arkadenförmige Ausrichtung • zonale Gliederung d. Knorpels, geordnet 	<p>Zellen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Oberflächlich einzelne Zellen, i.d. Tiefe kleine isogene Gruppen kugelig Chondrozyten in von Interterritorialsubst. Umgebenen Lakunen, niedrige Zelldichte, Zellen liegen in Reihen hintereinander <p>Matrix:</p> <ul style="list-style-type: none"> • v.a. dicht gepackte Faserbündel, Kollagen Typ I u. II Fibrillendurchm.: 20-100 nm, • Verlauf abhängig v. Beanspruchungsrichtung • keine Gliederung, relative Unordnung
Chem. Verhalten	amorphe Interzellulärsubstanz = basophil, perzellulär viele Proteoglykane (Knorpelkapsel) → schmale Höfe um Chondrone; kationische Kollagenfasern = azidophil	
Ernährung	keine eigene Vaskularisierung	
	Ernährung aus Synovia u. subchondralem Knochen	Versorgung in Disci und Menisci von der Kapsel aus,
	keine Lymphgefäße, keine Nerven → bradytrophes Gewebe	
Funktion	v.a. Druckelastizität , b. Druck: „Sprungfedereffekt“ durch Wasser + Proteoglykane • b. ↑ physiolog. Belastung → ↑↑↑ Dicke (nur Matrix!) • b. zu hoher „“ → degenerative Zerstörung	v.a. Zugfestigkeit , geringe Elastizität
Sonstiges	<u>Mechanische Eigenschaften:</u> Extrazellulärmatrix <u>Viskosität:</u> Proteoglykane (Hyaluronsre.+Chondroitinsulfat) <u>Elastizität:</u> Kollagenfibrillen	wie hyaliner K., nur steifer

Tabelle 1: Vergleich von Aufbau und Eigenschaften von hyalinem Knorpel und Faserknorpel [5,24,79,85,94].

Auswertung mittels erweitertem O'Driscoll Score

Score nach O'Driscoll		Knorpelimplantate						Knorpelleerlöcher					
		7056 vorne	7056 hinten	4266 vorne	4266 hinten	5016 vorne	5016 hinten	5346 vorne	5346 hinten	12941 vorne	12941 hinten	12942 vorne	12942 hinten
Zellmorphologie		0	2	2	2	2	0	0	0	0	2	0	2
Hyaliner Gelenknorpel	4 Pkte												
Unvollständig differenziertes Mesenchym	2 Pkte												
Bindegewebe oder Knochen	0 Pkte												
Safranin-O Anfärbarkeit der Matrix		0	2	2	1	2	1	0	1	0	2	1	2
Normal oder fast normal	3 Pkte												
Schwach	2 Pkte												
Mäßig	1 Pkt												
Keine	0 Pkte												
Gleichmäßigkeit der Oberfläche		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Glatt und intakt	3 Pkte												
Oberflächliche horizontale Schichtungen	2 Pkte												
Risse (25 bis 100% der Dicke)	1 Pkt												
schwere Störung einschließlich Fibrillation	0 Pkte												
Strukturelle Integrität		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	2 Pkte												
Leichte Störungen, einschl. Zysten	1 Pkt												
Schwere Zerstörungen / Desintegrität	0 Pkte												
Dicke		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
100% des angrenzenden normalen Korpels	2 Pkte												
50-100 % d. normalen Knorpels	1 Pkt												
0-50 % d. normalen Knorpels	0 Pkte												
Bindung an den angrenzenden Knorpel		1	2	2	0	2	0	0	0	0	1	2	1
An beiden Enden verbunden	2 Pkte												
An einem oder an beiden Enden teilweise verbunden	1 Pkt												
Nicht verbunden	0 Pkte												
Zellularität		0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	3	2
Normale Zellzahl	3 Pkte												
Leichte Hypozellularität	2 Pkte												
Mäßige Hypozellularität	1 Pkt												
Schwere Hypozellularität	0 Pkte												
Bildung von Chondrozytenclustern		0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Keine Cluster	2 Pkte												
<25 % der Zellen bilden Cluster	1 Pkt												
>25 % der Zellen bilden Cluster	0 Pkte												
Abwesenheit degenerativer Veränderungen am angrenzenden Knorpel		0	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1
normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbarkeit	3 Pkte												
normale Zellzahl, leichte Clusterbildung, mäßige Anfärbung	2 Pkte												
leichte od. mittlere Hypozellularität, schwache Anfärbung	1 Pkt												
Schwere Hypozellularität, schlechte od. keine Anfärbung	0 Pkte												
Gesamtscore O'Driscoll (max. 24, min. 0)		1	10	8	5	9	3	5	4	1	7	8	6
Arithmetischer Mittelwert O'Driscoll-Score		6						5,17					

Erweiterung													
Anwesenheit von Kollagen I		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
kein Nachweis von Kollagen I	2 Pkte												
Kollagen I in Teilen des Regenerats	1 Pkt												
Kollagen I im ganzen Regenerat oder Knochen	0 Pkte												
Anwesenheit von Kollagen II		1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Kollagen II im ganzen Regenerat	2 Pkte												
Kollagen II in Teilen des Regenerats	1 Pkt												
Kein Nachweis von Kollagen II oder Knochen	0 Pkte												
Anwesenheit von Aggrecan		1	1	1	0	1	1	0	0	0	0		1
Kollagen II im ganzen Regenerat	2 Pkte												
Kollagen II in Teilen des Regenerats	1 Pkt												
Kein Nachweis von Kollagen II oder Knochen	0 Pkte												
Blutgefäße im Regenerat		1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
keine Gefäße sichtbar	2 Pkte												
Gefäße ohne Kontakt zur Gelenkfläche	1 Pkt												
Gefäße mit Kontakt zur Gelenkfläche	0 Pkte												
Metachromasie bei Toluidin blau – Färbung		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Vorhanden	2 Pkte												
Teilweise vorhanden	1 Pkt												
Nicht vorhanden	0 Pkte												
Gesamtscore Erweiterung		4	2	4	2	4	3	0	0	0	2	0	4
Gesamtscore O'Driscoll + Erweiterung		5	12	12	7	13	6	5	4	1	9	8	10
Arithmetischer Mittelwert beider Scores		9,17						6,17					

Tabelle 2: Auswertung des modifizierten O'Driscoll Scores mit der Erweiterung

Prozentuale Defektdeckung von Implantaten vs.

Leerlöcher im Vergleich

Dist.ges = Durchmesser des ursprünglichen Defekts

Deck.li = Breite des Regenerates auf der linken Seite des Defekts

Deck.re = Breite des Regenerates auf der rechten Seite des Defekts

Proz = errechnete prozentuale Deckung im Defekt

Knorpelimplantate

4266 vorne				4266 hinten				5016 vorne			
Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz
371	66	59	33,7	362	131	141	75,1	440	132	175	69,8

5016 hinten				7056 vorne				7056 hinten			
Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz
433	166	167	76,9	552	152	52	37,0	540	294	87	70,6

Prozentualer Durchschnitt 60,5 %

Knorpelleerlöcher

1294-1 vorne				1294-1 hinten				1294-2 vorne			
Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz
479	1	2	0,6	411	11	9	4,9	452	14	5	4,2

1294-2 hinten				5346 vorne				5346 hinten			
Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz	Dist.ges	Deck.li	Deck.re	Proz
471	3	1	0,8	486	1	3	0,8	376	4	4	2,1

Prozentualer Durchschnitt 2,2 %

Tabelle 3: Prozentuale Deckung in den einzelnen Defekten

7. Lebenslauf

Name: Stefanie Schrödl

geb.am: 23.06.1976 in München

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Eltern: Walter Schrödl und Gudrun, geb. Graf

1982-86 Grundschohle Esting

1986-95 Elsa-Brändström-Gymnasium, München-Pasing

1995-02 - Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München,
- Ablegen von Physikum, 1. und 2. Staatsexamen
- Praktisches Jahr: Chirurgie, KH Dritter Orden, München; Innere Medizin: Royal Perth Hospital, Perth, WA, Australien und Concord Hospital, Sydney, NSW, Australien; Anästhesie: Klinikum Großhadern, München

04/02 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

07/02-12/03 AIP: Innere Medizin, Privatklinik Dr.Robert Schindlbeck, Herrsching

seit 01/04 Assistenzärztin mit Facharztvertrag Innere Medizin, Privatklinik Dr. Robert Schindlbeck, Herrsching

8. Danksagung

Nach Fertigstellung der Dissertation möchte ich allen danken, die das Zustandekommen ermöglichten:

Mein Dank gilt zu allererst Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson gilt mein besonderer Dank für die zur Verfügungstellung des Themas, die kritischen Diskussionen und Anregungen sowie die außerordentlich freundliche Behandlung während unserer Zusammenarbeit.

Für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und die hervorragende und fachkundige Betreuung, die weit über das Normalmaß hinausgingen, sowie für seine freundschaftliche Haltung mir gegenüber bin ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller zu tiefstem Dank verpflichtet. Ohne seine fachliche Anleitung und Kooperation wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen und ich wünsche ihm für seine weitere Laufbahn das Allerbeste.

Herrn PD Dr. Stefan Milz gebührt Dank dafür, daß er mir stets freundlich und kompetent bei der Bearbeitung der Präparate und der Auswertung der Ergebnisse zur Seite stand.

Florian Schrimpf danke ich für seine große Zuverlässigkeit, seine grenzenlose Hilfsbereitschaft und seinen Einsatz zu nahezu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ausserdem danke ich allen lieben Menschen in meinem privaten Umfeld, die das Zustandekommen dieser Arbeit durch Ihre Unterstützung möglich gemacht haben.

Zuletzt gebührt mein Dank Frau Münzing, Frau Allmeling und allen anderen Mitarbeitern des Labors sowohl im ICF als auch in der Anatomischen Anstalt für die freundliche Hilfsbereitschaft und fachkundige Anleitung in allen Laborfragen.