

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

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

**Beeinflussung  
der Gelenknorpelregeneration beim Schaf  
durch den Einsatz resorbierbarer Implantate**

Dissertation

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

vorgelegt von Florian Manfred Schrimpf  
aus Garmisch-Partenkirchen/Bayern

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Hertlein  
Prof. Dr. med. R.G.H. Baumeister

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. P.E. Müller

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2004

gewidmet meiner Mutter,  
Dr. med. Monika Schimpf, geb. Fürst

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Bioimplantate . . . . .	16
2.2. Operation . . . . .	17
2.3. In vivo Fluoreszenzmarkierung . . . . .	19
2.4. Gewinnung der Präparate und Entkalkung . . . . .	20
2.5. Histologische Aufarbeitung . . . . .	21
2.6. Auswertung . . . . .	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1. Histologische Auswertung . . . . .	27
3.1.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin . . . . .	27
3.1.2. Färbung mit Safranin-O . . . . .	30
3.1.3. Färbung mit Toluidinblau . . . . .	33
3.1.4. Markierung für Kollagen I . . . . .	33
3.1.5. Markierung für Kollagen II . . . . .	38
3.1.6. Markierung für Aggrecan . . . . .	41
3.1.7. Fluoreszenzfärbung . . . . .	44
3.1.8. Färbung nach Ladewig . . . . .	44
3.2. Messung der prozentualen Deckung mit Knorpelgewebe . . . . .	49
3.3. Beurteilung nach Auswertungsschema . . . . .	49
<b>4. Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1. Das Implantat . . . . .	54
4.2. Das Tiermodell . . . . .	57
4.3. Das Auswertungsschema . . . . .	58

4.4. Das Defektmodell . . . . .	61
4.5. Die Ergebnisse . . . . .	61
4.6. Ein Ausblick . . . . .	64
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>A. Reduzierung und Alkylierung für Aggrecanmarkierung</b>	<b>74</b>
<b>B. Immunmarkierung (Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan)</b>	<b>75</b>
<b>C. Toluidinblau-Färbung mit Metachromasie</b>	<b>77</b>
<b>D. Safranin-O-Färbung</b>	<b>78</b>
<b>E. Modifizierte Ladewig-Färbung für MMA-Schnitte</b>	<b>79</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1. Zur Immunhistologie verwendete Antikörper . . . . .	22
2.2. Bewertung des vorherrschenden Gewebes nach O'Driscoll . . . . .	22
2.3. Bewertung der strukturellen Charkteristika nach O'Driscoll . . . . .	23
2.4. Bewertung von Degenerationsszeichen nach O'Driscoll . . . . .	23
2.5. Bewertung des angrenzenden Knorpels nach O'Driscoll . . . . .	23
2.6. Erweiterung für Score nach O'Driscoll . . . . .	25
3.1. Ergebnis nach O'Driscoll . . . . .	50
3.2. Ergebnis der Score-Erweiterung . . . . .	52

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Schema der "kausalen Histogenese" . . . . .	12
2.1. Verwendetes Bioimplantat . . . . .	18
3.1. Kontrolle bei Färbung mit Hämatoxylin und Eosin . . . . .	28
3.2. Bioimplantat bei Färbung mit Hämatoxylin und Eosin . . . . .	29
3.3. Kontrolle bei Färbung mit Safranin-O . . . . .	31
3.4. Bioimplantat bei Färbung mit Safranin-O . . . . .	32
3.5. Kontrollen bei Färbung mit Toluidinblau . . . . .	34
3.6. Bioimplantat bei Färbung mit Toluidinblau . . . . .	35
3.7. Leerlochkontrolle bei Kollagen I Markierung . . . . .	36
3.8. Bioimplantat bei Kollagen I Markierung . . . . .	37
3.9. Kontrolle bei Kollagen II Markierung . . . . .	39
3.10. Bioimplantat bei Kollagen II Markierung . . . . .	40
3.11. Kontrolle bei Markierung für Aggrecan . . . . .	42
3.12. Bioimplantat bei Aggrecan Markierung . . . . .	43
3.13. Kontrolle bei Fluoreszenz Markierung . . . . .	45
3.14. Bioimplantat bei Fluoreszenz Markierung . . . . .	46
3.15. Kontrolle bei Färbung nach Ladewig . . . . .	47
3.16. Bioimplantat bei Färbung nach Ladewig . . . . .	48

# 1. Einleitung

Schon lange ist bekannt, dass sich hyaliner Knorpel - anders als die allermeisten Gewebe im menschlichen Körper - beim erwachsenen Menschen nur sehr schlecht von erlittenen Läsionen erholt. [22, 46] Leider ist diese Feststellung bis heute weiterhin gültig. [13, 45] Die sozioökonomische Bedeutung dieses Problems wird deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass kleinere Knorpelläsionen, egal welcher Genese, in nahezu allen Fällen fortschreiten. Dies führt im Verlauf mehrerer Jahre zu einer Gelenksarthrose. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, an der im Jahre 2001 alleine in der Bundesrepublik Deutschland ca. fünf Millionen Menschen leiden - das entspricht einem Anteil von etwa sechs Prozent der in Deutschland lebenden Gesamtbevölkerung. Nach Berechnungen des in München ansässigen Zentralinstituts für Krankenkassen verursachen diese fünf Millionen Menschen durch ihre Erkrankung bei den Kranken- und Rentenkassen Kosten in Höhe von über 8,4 Milliarden Euro. Darüber hinaus gibt es Schätzungen, wonach sich der Anteil der an Arthrose erkrankten Personen in Deutschland, alleine auf Grund des Anstiegs des Lebensalters, auf 20 Prozent im Jahre 2010 erhöhen wird. [16]

Aufgrund der hohen Inzidenz der Arthrose ist es wenig verwunderlich, dass sich zahlreiche Arbeitsgruppen weltweit mit der Behandlung von Defekten des hyalinen Knorpels beschäftigen. Eine Methode zur Behandlung degenerativer Knorpelläsionen stellt die Abrasionschondroplastik dar, bei der arthroskopisch der degenerierte Knorpel mittels motorbetriebener Instrumente bis in den Bereich der sogenannten "Tidemark" - der Grenze zwischen verkalktem und nicht verkalktem Knorpel -, ohne Eröffnung spongöser Knochenräume abgetragen wird. [25] Ziel dieses Eingriffs ist die Entfernung des geschädigten Knorpelgewebes, um gesundem Knorpel die Möglichkeit zu geben, den Defekt auszufüllen. Bei einem Teil der Patienten führt dieses Verfahren zu einer spürbaren Verbesserung des klinischen Befundes. Es gibt allerdings auch zahlreiche Beobachtungen, wonach die Degeneration des Knorpels durch die Abrasionschondroplastik sogar noch verstärkt wird. Da es sich um einen sehr aggressiven therapeutischen Ansatz mit unklaren Erfolgsaussichten handelt, ist die Indikation auf schwerste Schäden des Gelenk-

knorpels beschränkt; es handelt sich hierbei um einen letzten Versuch, einen alloplastischen Gelenkersatz zu vermeiden oder zumindest zu verzögern. [3] Das als "Spongialisation" bezeichnete Vorgehen geht hier noch einen Schritt weiter. Hierbei wird aus den gleichen Überlegungen heraus neben dem geschädigten Knorpel auch die subchondrale Platte vollständig entfernt und die Knochenspongiosa freigelegt. [15] Dieses Verfahren findet allerdings nur bei Defekten im Bereich des Patellarknorpels Anwendung. Bei der arthroskopisch durchgeführten Pridie-Bohrung werden nach Abtragung der oberflächlichen Knorpel- und Knochenschichten innerhalb des degenerierten Areals mehrere 2 mm dicke und ca. 4 cm tiefe Bohrungen im Abstand von jeweils 5 mm angelegt. Durch diese künstliche Verletzung des subchondral gelegenen Knochens soll das Einwachsen von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in den Bereich der Gelenkoberfläche gefördert werden. Durch die herrschenden mechanischen Bedingungen will man eine Differenzierung dieser Stammzellen zu Chondrozyten und damit die Ausbildung von Knorpelinseln im Bereich der durchgeführten Bohrungen erreichen. Bei entsprechender geometrischer Anordnung der Bohrungen soll es zu einer vollständigen Deckung des Defekts kommen. [27] Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens stellt die "Mikrofrakturierung" dar. Nach Entfernung des degenerierten Knorpels ohne Verletzung des subchondralen Knochens wird bei diesem Verfahren mittels spezieller Ahlen eine Reihe von Defekten in dem freigelegten subchondralen Knochen erzeugt, die senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufen und bis in den Markraum reichen. Das Ergebnis sind mehrere, ca. 4 mm voneinander entfernte Löcher im subchondralen Knochen, durch die es wie bei der Pridie-Bohrung zu einer Einblutung aus dem Markraum und zur Ausbildung einer Blutansammlung im Bereich des behandelten Defekts kommt. Die postulierten Vorteile der Mikrofrakturierung liegen in der Vermeidung durch den Bohrer induzierter thermischer Nekrosen sowie der rauheren Oberfläche innerhalb des Defektes, wodurch es zu einer besseren Anhaftung des entstehenden Gerinnsels kommen soll. [44, 50] Bei dem osteochondralen autologen Transplantationssystem (OATS) werden mittels spezieller Hohlmeißel freie Transplantate aus gering belasteten Arealen des Kniegelenks entnommen und an anderer Stelle wieder eingesetzt. [1, 49] Diese Methode ist allerdings nicht bei allen Gelenken anwendbar. Ein weiteres Problem stellt die maximal behandelbare Defektgröße dar. Diese Grenze liegt bei circa vier bis fünf Quadratzentimetern. Bei größeren Defekten stellt sich zunächst das Problem einer nur begrenzten Entnahmemöglichkeit der Transplantate. Diese ist auf diejenigen Anteile der Gelenkoberfläche beschränkt, die lediglich geringen Belastungen ausgesetzt sind. Selbst wenn es möglich sein sollte, eine ausreichende Menge an Transplantaten zu gewinnen, so ist die Veran-

kerung derselben in der press-fit-Technik in einem entsprechend großen Defekt äußerst kritisch. [9] Auch das beschriebene Verfahren, ein freies osteochondrales Transplantat aus einer Femurkondyle zu gewinnen, ist lediglich als ein Reserveverfahren anzusehen. Durch den Wegfall des posterioren Femurkondylus werden längere Beugungen des betroffenen Knies auch ohne Belastung nicht toleriert. [9] Jedoch selbst bei kleineren Defekten kommt es durch diese Methode im günstigsten Fall lediglich zu einer Verlagerung des Knorpeldefektes in ein weniger belastetes Areal des Gelenkes. Insgesamt führt dieses Verfahren bei einer Mehrheit der Patienten jedoch zu einer zeitweiligen signifikanten Verbesserung der Beschwerden. Ein weiterer Ansatz ist die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT). Bei diesem Verfahren wird hyaliner Knorpel aus einem nicht oder nur wenig belasteten Areal innerhalb eines Gelenks entnommen, die darin enthaltenen Chondrozyten in Kultur vermehrt, und die so gewonnenen Zellen anschließend unter einen über den Defekt genähten Periostlappen injiziert. Dieses Verfahren wurde erstmals von Brittberg und Peterson [8] beschrieben. Ein Problem dieser Methode stellt allerdings die Dedifferenzierung von Chondrozyten in Kultur hin zu Fibroblasten dar. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob es überhaupt einen Bereich des Knorpels gibt, an dem Gewebe ohne Folgen für die Gelenkfunktion entnommen werden kann. Zusätzlich stellt diese Therapie mit ihrer zweizeitigen Operation mit Entnahme von Periost eine nicht unerhebliche Belastung für den Patienten dar. Trotz aller Berichte über gute Erfolge mit dieser Methode [8], gibt es auch hier Beobachtungen, wonach bei diesem schlecht standardisierten Verfahren auch lediglich ein faserknorpeliges Regenerat entsteht. [21, 48] Dieser Faserknorpel kann den Belastungen im Gelenk nicht lange standhalten und degeneriert. Ein grundsätzliches Problem besteht darin, dass der Defekt im günstigsten Falle lediglich aus dem betroffenen, in der Regel lasttragenden, in einen Randbereich der Knorpeloberfläche verlegt wird.

Einen experimentellen Ansatz, die Regeneration von Knorpeldefekten zu fördern, stellt die Transplantation von autologem Perichondrium dar. Dieses Perichondrium wird in der Regel von einer Rippe gewonnen und während der gleichen Operation mittels eines Fibrinklebers in dem zuvor debridierten geschädigten Knorpelareal fixiert. Obwohl hierfür bislang keine gesicherten Daten vorliegen, wird einer Fixierung, bei der die so genannte Kambium-Schicht des Perichondriums der Gelenkoberfläche zugewandt ist, eine höhere Potenz zur Bildung eines hyalinartigen Ersatzknorpels zugeschrieben. [20] Diese Methode führt bei vielen Patienten zu einer deutlichen Besserung des klinischen Beschwerdebildes. Auch existieren histologische und biochemische Untersuchungen, die auf eine gute

Reparatur des Defektes hinweisen. So fanden sich bei etlichen bioptisch untersuchten Patienten eine weitgehend normale Histologie und ein guter Gehalt an Kollagen II im Bereich des Regeneratgewebes. [5] Es fällt aber auch hier wieder die teilweise erhebliche Diskrepanz zwischen dem histologischen und dem klinischen Bild auf. So sind auch bei dieser Methode Fälle beschrieben, die trotz hervorragender klinischer Ergebnisse ein histologisch schlechtes Regenerat aufwiesen und umgekehrt. Verfolgt man die Patienten allerdings über einen längeren Zeitraum, so gibt es keinen signifikanten Vorteil dieser Methode gegenüber der oben beschriebenen Pridie-Bohrung, tendenziell sind die Ergebnisse der herkömmlichen Methode sogar vorteilhafter. [6] Vor dem Hintergrund des größeren operativen Eingriffs - es muss ja zusätzlich zur Arthrotomie noch Rippenperichondrium gewonnen werden - stellen diese Ergebnisse den Sinn der Transplantation von Perichondrium jedoch in Frage.

Schon früh wurden Überlegungen angestellt, worauf die unterschiedlichen Arten von Bindegewebe zurück zu führen sind. So beobachtete Wolff, dass sich die Architektur der Knochenspongiosa auf Änderungen der Belastung des Knochens hin stets in charakteristischer Weise verändert. Diese Beobachtungen führten ihn 1869 zur Formulierung des "Gesetzes der Transformation der Knochen". [56] Pauwels nahm diese Theorie auf und vermutete, dass Zellen zwischen einer Deformation ohne Druckanstieg und einem Druckanstieg ohne Deformation unterscheiden und darauf in unterschiedlicher Art und Weise reagieren könnten. [38] Später entwickelte Pauwels auf dieser Basis die Theorie der "kausalen Histogenese", die besagt, dass die mechanischen Rahmenbedingungen, die auf eine mesenchymale Zelle wirken, eine festgelegte Gewebsdifferenzierung zur Folge haben. Diese Bedingungen sind schematisch in der Abbildung 1.1 aufgezeigt. Die prinzipielle Richtigkeit dieser Theorie wurde schließlich 1995 von Kummer auch mathematisch bestätigt, indem er nachwies, dass sich durch Anwendung der Überlegungen von Pauwels die Knorpeldichteverteilung bei gegebener Form und Belastung mit hinreichender Genauigkeit den natürlichen Bedingungen annähern lässt. [24] Ebenfalls auf der Theorie von Pauwels basieren die Überlegungen von Carter, wonach intermittierende Scherkräfte den Prozess des Knorpelwachstums, der Reifung und der anschließenden Ossifikation beschleunigen, wohin gegen intermittierender hydrostatischer Druck diesen Vorgang aufhält oder sogar ganz verhindert und so zum Erhalt des Knorpels beiträgt. Unter Verwendung des von ihm entwickelten mathematischen Modells gelang es Carter auch, das Ossifikationsverhalten sowie die Dichteverteilung innerhalb langer Röhrenknochen zu berechnen. [11] Bereits seit 1937 gibt es Beobachtungen in vivo, wonach es möglich ist, durch repetitive

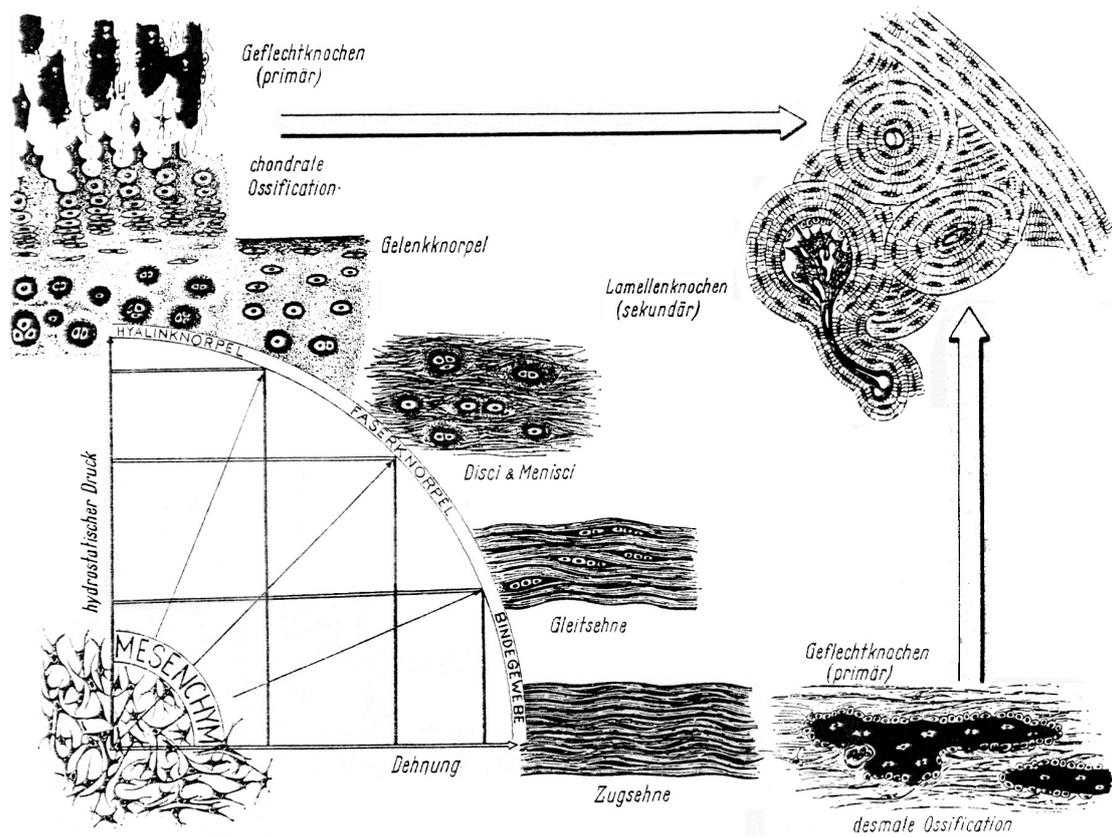


Abbildung 1.1.: Schema der "kausalen Histogenese" von Pauwels. Ausgangspunkt ist das mesenchymale Bindegewebe (linke untere Ecke). Je nach Verhältnis der einwirkenden Druck- und Zugkräfte wird die Differenzierung der Zellen in unterschiedliche Richtungen gelenkt. Abbildung entnommen aus [24]

Druckbelastungen eine Knorpelbildung zu erzielen. So beschrieb Plötz nach der iatrogenen Luxation von Sehnen beim Kaninchen das Auftreten von "vesikulösen Zellen" - heute würde man von "chondrocytenähnlichen Zellen" sprechen - sowie eine "Hyaluronisierung der Interzellulärsubstanz", also eine knorpelige Umwandlung, in dem durch Druck und Scherkraft belasteten Anteil der Sehne. [43] Diese Beobachtungen decken sich mit neueren Erkenntnissen in Fingerstrecksehnen des Menschen im Bereich der proximalen Interphalangealgelenke [30] sowie in den Strecksehnen der Zehen [31]. Hier kommt es an Stellen, an denen die Sehnen bei Bewegungen rezidivierenden Druckbelastungen ausgesetzt sind, zur Ausbildung von Sesambeinen, die immunhistologisch als Faserknorpel identifiziert wurden.

Da jede der bisher bekannten Methoden zur Behandlung osteochondraler Defekte entweder mit einer beschränkten Erfolgsaussicht oder mit einer lediglichen Verlagerung des Defektes in einen weniger störenden Bereich einhergeht, und kein Verfahren in der Lage ist, eine vollständige und intakte Knorpeloberfläche zu erzeugen, muss sich das Augenmerk auf andere Ansätze zur Wiederherstellung des hyalinen Knorpels richten. So untersuchte Gomar-Sancho die Möglichkeit, tiefer gehende osteochondrale Defekte mit freien osteochondralen Transplantaten - vergleichbar dem oben beschriebenen OATS - oder mit Mensikustransplantaten zu versorgen. Bei dem Vergleich der Ergebnisse mit den Leerlochkontrollen fand sich bei diesen drei bis vier Wochen nach der Operation eine partielle hyaline Defektauffüllung über einer noch ungeordneten knöchernen Ersatzschicht. Nach längeren Versuchszeiten fand sich jedoch anstelle des hyalinen Knorpels nur noch ein faserknorpeliges Regenerat. Wahrscheinlich war dieser Faserknorpel jedoch den später auftretenden Belastungen nicht gewachsen und wies am Ende des Beobachtungszeitraums zwölf Wochen postoperativ tiefe Ulzerationen auf, wie sie für eine schwere Arthrose typisch sind. [17] Die Ursache für diese Degeneration blieb unklar, es liegt allerdings nahe, dass der neu formierte, jedoch noch unreife Knochen in der Tiefe des Defektes nicht in der Lage war, den auftretenden Belastungen einen ausreichenden Widerstand entgegen zu setzen. Dies könnte dazu geführt haben, dass sich der bereits vorhandene hyaline Knorpel in Faserknorpel umdifferenzierte. Schließlich gelang es Tägil und Aspenberg mittels in Rattenfemora implantierten einfachen Druckkammern, bei einem Teil ihrer Versuchstiere die Ausbildung eines knorpeligen Gewebes im Bereich dieser Kammern hervor zu rufen, indem sie über einen Zeitraum von sieben Wochen täglich intermittierenden Druck auf das in die Kammer eingewachsene mesenchymale Gewebe ausübten. [51, 52, 53] Diese Ergebnisse erinnern an eigene Beobachtungen der Arbeits-

gruppe bei der Explantation aseptisch gelockerter Gelenkprothesen beim Menschen. Hier konnte in mehreren Fällen im Bereich gelockerter Knieprothesen ein hyalinartiges Knorpelgewebe gefunden werden. Möglicherweise kam es durch die über einen längeren Zeitraum bestehende Instabilität zu intermittierender Druckbelastung auf das umgebende Gewebe, das sich unter diesen Bedingungen, analog zu den Beobachtungen beim Tier, in einen hyalinartigen Knorpel umwandelte.

Diese Beobachtungen und theoretische Überlegungen waren Anlass für die Entwicklung von resorbierbaren Implantaten und der anschließenden Erprobung im Rahmen einer Studie am Kaninchenmodell. In dieser Untersuchung wurden bei insgesamt 36 ausgewachsenen Chinchilla Bastardkaninchen im lasttragenden Bereich des Kniegelenks Defekte mit einem Durchmesser von vier Millimetern und einer Tiefe von sechs Millimetern angelegt. In ein Drittel der so erzeugten osteochondralen Defekte wurden speziell gefertigte Implantate in "press-fit"-Technik eingebracht. Diese sogenannten "Bioimplantate" bestanden aus zwei verschiedenen Schichten. Der in der Tiefe des Defektes zu liegen kommende Anteil bestand aus einer dreidimensionalen Gitterstruktur aus resorbierbarem Poly-D,L-Lactid, auf welches ein ebenfalls resorbierbares Vlies aus Polyglactin/Polydioxanon aufgeklebt war. Dieses Vlies befand sich nach der Implantation im Bereich des Gelenkknorpels. Zur weiteren Untersuchung der Herkunft der chondrogenen Zellen erhielt ein weiteres Drittel der Tiere ein vergleichbares Implantat, bei welchem zwischen den beiden Schichten eine zusätzliche Trennschicht aus Knochenzement eingebracht war. Das letzte Drittel wurde zur Dokumentation des natürlichen Heilungsverlaufs leer belassen. Bei der histologischen Untersuchung des erzielten Regeneratgewebes nach acht und zehn Wochen zeigte sich bei den Bioimplantaten ohne Trennschicht eine vollständige Deckung des Defektes durch Regeneratgewebe mit knorpeligen Inseln. Das Vorhandensein einer Trennschicht verhinderte die Bildung dieser knorpeligen Inseln, so dass sich lediglich eine sehr unregelmässige Narbe aus Bindegewebe nachweisen ließ. In beiden Gruppen kam es jedoch zu einer vollständigen Integration der Knochenersatzschicht des Implantats in den umliegenden Knochen. Bei den Leerlochkontrollen kam es ebenfalls lediglich zur Ausbildung eines bindegewebigen Narbenpfropfs, der jedoch auch die tieferen Bereiche des Loches mit erfasste. [23, 32]

Diese Ergebnisse lassen sich aber nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. Zunächst einmal besteht ein großer Unterschied hinsichtlich der Knorpeldicke. Während beim Menschen als Richtwert für die großen Gelenke eine Knorpelstärke von drei Milli-

metern angegeben wird, weist das Kaninchen im untersuchten Kniegelenk lediglich eine Knorpeldicke von um die 0,3 Millimetern auf. Dies macht eine exakte Niveaueinpassung eines eingebrachten Implantates unmöglich, so dass es leicht zu einer zu hohen oder zu niedrigen Druckbelastung im Implantat kommt. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch im Reparaturvermögen chondraler und osteochondraler Defekte. So zeigt der Kaninchenknorpel ein erstaunliches Regenerationvermögen bei Defekten, jedoch nur solange die subchondrale Knochenschicht nicht verletzt ist. [34] Der menschliche Gelenkknorpel zeigt dieses Verhalten jedoch nicht; viele der Therapieversuche basieren auf einer Verletzung des subchondral gelegenen Knochens und der damit verbundenen Eröffnung des Markraumes. Das Kaninchenmodell scheint also nicht optimal geeignet, will man eine fundierte Aussage zur Wirksamkeit einer Technik beim Menschen treffen. Gleichwohl ist es gut geeignet, will man grundsätzliche Aussagen beispielsweise zur Funktionsweise einer Methode treffen.

Nach dem Nachweis der prinzipiellen Funktionsfähigkeit des beim Kaninchen verwendeten Implantates wurde für weitere Untersuchungen ein anderes Versuchstier gewählt. Hier bietet sich das Schaf als besser auf den Menschen übertragbares Tiermodell an. Der Knorpel des Schafes ähnelt dem des Menschen insbesondere im Hinblick auf Regeneration und Wachstum, während die Dicke im hier untersuchten Kniegelenk mit durchschnittlich lediglich einem Millimeter unter derjenigen des Menschen liegt. Bei dieser Knorpeldicke ist jedoch bereits eine niveaugenaue Einpassung des Implantates möglich.

In dieser Dissertation soll untersucht werden, ob durch die Verwendung solcher Bioimplantate eine Verbesserung der Regeneration osteochondraler Defekte beim Schaf erzielt werden kann. Hierzu sollen die gewonnenen Gewebeproben nach einem semiquantitativen Score ausgewertet werden, sowie die prozentuale Deckung des Defektes durch neu gebildetes Knorpelgewebe bestimmt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bioimplantate

Verwendung fanden resorbierbare, aus zwei verschiedenen Schichten aufgebaute Bioimplantate. Die hierfür verwendeten Substanzen sind alle für den Einsatz beim Menschen zugelassen. Für den später im Knochen zu liegen kommenden Anteil der Implantate wurde mittels des sogenannten "Multiphase-jet-solidification-Verfahren" durch die Fraunhofergesellschaft in Stuttgart, Deutschland, ein offenesporiges Konstrukt aus Poly-D,L-Lactid (RESOMER LR708, Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland) hergestellt, um ein Einwandern mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark zu ermöglichen. Bei diesem Verfahren werden dünne Stäbe eines Materials schichtweise aufeinander aufgetragen, wodurch die Herstellung auch komplexer dreidimensionaler Strukturen möglich wird. Durch Änderungen der Dicke und der räumlichen Anordnung der aufgetragenen Stäbe lassen sich weiterhin die physikalischen Eigenschaften des entstehenden Konstrukts beeinflussen. Eine zusätzliche Beschichtung des Materials mit anderen Substanzen ist ebenfalls möglich, wurde hier jedoch nicht durchgeführt. Bei Poly-D,L-Lactid handelt es sich um ein hydrolytisch spaltbares Kohlenwasserstoff-Polymer, das in vivo über einen Zeitraum von 40 bis 50 Wochen vollständig resorbiert wird. Als Knorpelersatzschicht wurde ein handelsübliches, 0,3 Millimeter dickes Vlies aus Polyglactin/Polydioxanon (Ethisorb 201, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Dieses Vlies wird in vivo im Laufe von ca. zehn Wochen vollständig hydrolytisch gespalten.

Aus dem in Würfelform gelieferten Rohmaterial der Knochenersatzschicht wurde mittels einer Fräse ein zehn Millimeter hoher Zylinder mit einem Durchmesser von acht Millimetern herausgearbeitet. Die später der Gelenkoberfläche zugewandte Seite wurde mittels spanender Verfahren gleichmäßig abgerundet, um eine physiologische Gelenkconfiguration zu erreichen. Im Anschluss an die Konstruktion der Knochenersatzschicht wurde das Polyglactin/Polydioxanon-Vlies als Knorpelersatzschicht auf die abgerundete Seite aufgeklebt. Der Klebstoff bestand aus Poly-(L-co-D,L-Lactid)-Granulat (RE-

SOMER LR708, Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland), welches im Verhältnis von 1:50 in hochreinem Aceton aufgelöst wurde. Dieser Klebstoff wurde dünn auf die oberflächlich gelegenen Poly-D,L-Lactid-Stäbe aufgestrichen und das Vlies aufgelegt. Nach dem vollständigen Ausdampfen des Acetons bestand eine feste Verbindung des aufgelegten Vlieses mit der darunter liegenden Gitterkonstruktion. Das überstehende Vlies wurde abgetrennt und die fertiggestellten Bioimplantate (Abbildung 2.1) einzeln verpackt der Plasmasterilisation zugeführt.

## 2.2. Operation

Das im folgenden beschriebene Vorgehen wurde vor Beginn des Versuches unter der Nummer 211-2531-15/97/99 von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt. Operiert wurden sechs ausgewachsene, weibliche Merino-Schafe mit einem Mindestalter von einem Jahr. Präoperativ wurden die Tiere 36 Stunden nüchtern, aber mit Wasser ad libitum gehalten. Die Tiere wurden mit 2 ml Diazepam (Diazepam Desitin Injektionslösung 10 mg, Desitin Arzneimittel, Hamburg, Deutschland) prämediziert. Die eigentliche Narkose wurde 20 Minuten später mit Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) in der Dosierung 8 mg/kg Körpergewicht sowie Propofol (Disoprivan 2%, Fa. AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) jeweils intravenös verabreicht, eingeleitet. Die Dosis des Ketaminhydrochlorids wurde bis zum Erreichen einer Intubationstoleranz erhöht. Sobald dieser Zustand erreicht war, wurden die Tiere intubiert und bekamen eine Pansensonde gelegt. Zur Fortführung der Narkose erhielten die Tiere eine assistierte Beatmung mit einem Gemisch aus Lachgas ( $N_2O$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ) im Verhältnis 2:1 sowie Enflourane (Ethrane, Fa. Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und eine weitere Gabe von Propofol mittels Perfusor zur feineren Kontrolle der Narkosetiefe. Vor der Operation wurden die narkotisierten Tiere auf der rechten Seite mit abduziertem linken Hinterbein gelagert. Das linke Bein wurde rasiert, entfettet und anschließend von einem steril gekleideten Operateur mit einem Lochtuch abgedeckt. Der operative Zugang erfolgte durch eine Inzision über dem medialeseitigen Kniegelenk mit anschließender Verdrängung der Patella nach lateral zur Darstellung des medialen Femurkondylus. In Beugestellung des Kniegelenks wurden zwei Löcher von acht Millimetern Durchmesser und zehn Millimetern Tiefe gebohrt, die nach sorgfältiger Spülung jeweils entweder mit den oben beschriebenen Implantaten versorgt oder als Kontrollen unversorgt belassen wurden. Anschließend wurden Gelenkkapsel und Haut mit 2-0 Vicryl-Faden (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach

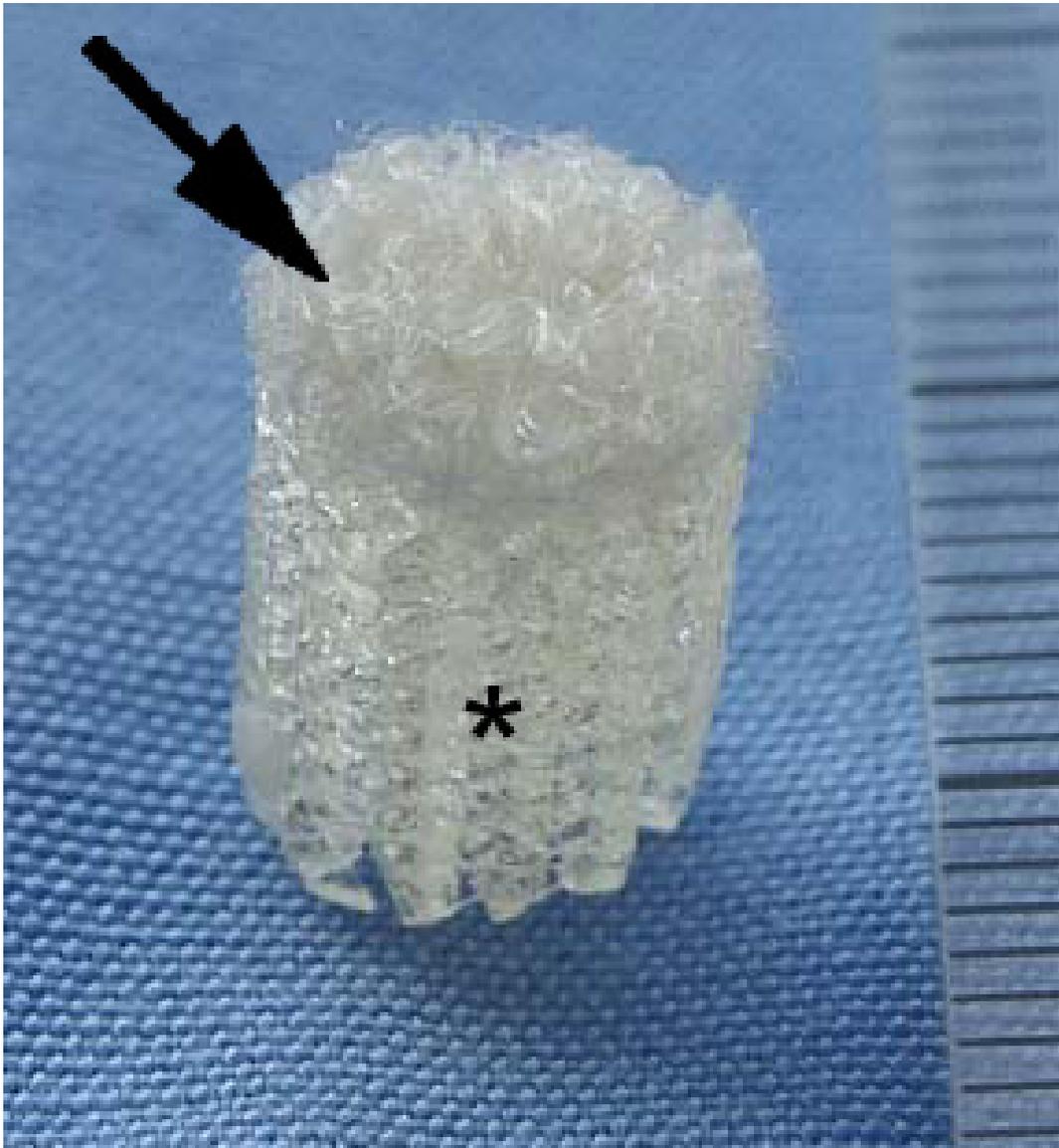


Abbildung 2.1.: Verwendetes Bioimplantat vor der Implantation. Die Skala am rechten Bildrand trägt eine Unterteilung in Millimetern. Im oberen Bereich des Implantats erkennt man das Vliessmaterial (Pfeil) der späteren Knorpelersatzschicht, im unteren Bildanteil die Gitterstruktur der Knochenersatzschicht (\*).

Beendigung der Hautnaht wurde ein Sprühverband aus Methacrylsäureethoxyethylester und Thiram (Nobecutan Spray, Fa. Astra GmbH, Wedel, Deutschland) sowie ein herkömmlicher steriler Pflasterverband aufgebracht. Die Zufuhr von Propofol und Enflouran endete ca. 5-10 Minuten vor Ende der Operation, die Lachgaszufuhr kurz vor dem Hautverschluß. Im Anschluß daran erfolgte eine ca. 10-minütige Beatmung mit 100%-igem Sauerstoff, an die sich eine weitere Beatmung mit Raumluft bis zum Beginn der Spontanatmung anschloß. Mit dem Erwachen des Tieres wurde der Endotrachealtubus entfernt und das Tier zur weiteren Erholung für ca. zwei Stunden in einen Einzelstall gebracht. Nach Ende dieser Erholungszeit wurde das Tier in den Gemeinschaftsstall entlassen.

Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere intraoperativ 2,12 g Amoxicillin-Natrium - entsprechend 2 g Amoxicillin - und 238,25 mg Clavulansäure (Augmentan i.v. 2,2g, Fa. SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland) als Kurzinfusion intravenös. Ab einer Operationsdauer von 45 Minuten erhielten die Tiere eine nochmalige Antibiotikagabe.

Die postoperative Analgesie erfolgte mit 0,324 mg Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic, Fa. Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) i.m. - entsprechend 0,3 mg Buprenorphin - drei mal pro Tag bis zum Abend des zweiten postoperativen Tages, sowie einer Initialgabe von 0,324 mg Buprenorphinhydrochlorid unmittelbar postoperativ. In dieser Zeit wurden die Tiere gemeinsam in einem Gehege zunächst bei Wasser ad libitum und ab dem ersten postoperativen Tag bei Wasser und fester Nahrung ad libitum gehalten. Während dieser Zeit wurde besonders auf die Belastung des operierten Beines beim Stehen und Laufen sowie auf Schmerzzeichen wie Zähneknirschen bei den Tieren geachtet. Beim Auftreten von Schmerzzeichen wurde die Schmerzmitteldosis erhöht. Nach Ablauf dieser postoperativen Beobachtungsphase wurden die Tiere in ein Freigehege verlegt.

### **2.3. In vivo Fluoreszenzmarkierung**

Um das Wachstum des knöchernen Anteils des Regenerates im zeitlichen Ablauf beurteilen zu können, wurde am fünften sowie am 35. postoperativen Tag jeweils 25 ml - entsprechend etwa 50 mg pro kg Körpergewicht - Oxytetracyclin und am zwanzigsten postoperativen Tag 25 ml - entsprechend etwa 25 mg pro kg Körpergewicht - einer 5%-

igen Calceinlösung (Fa. WALDECK GmbH & Co Division Chroma, Münster, Deutschland) verabreicht. [29, 2, 47] Beide Substanzen lagern sich an Calcium an, das neu in den Knochen eingebaut wird. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich so die Umbauprozesse innerhalb des Knochens anhand der Anordnung der Fluoreszenz in ihrem zeitlichen Ablauf verfolgen.

## 2.4. Gewinnung der Präparate und Entkalkung

Zur Gewinnung der Präparate wurden die Schafe zwölf Wochen nach der Operation durch Injektion von 20ml Pentobarbital (Narcoren, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) sowie 20ml einmolare KCl-Lösung (1M Kaliumchlorid-Lösung Pfimmer, Fa. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) nach erfolgter Narkose getötet. Nach Eintreten des Herzstillstands wurde das operierte Knie freigelegt und die femur- sowie die tibiaseitigen Gelenkflächen abgesetzt. Die Defektstellen wurden mittels elektrischer Bandsäge aus den explantierten Gelenken herausgetrennt.

Zur Entkalkung der so gewonnenen Blöcke wurde eine 5%-ige Lösung aus in Aqua destillata gelöstem Ethylendiamin-Tetraacetat (Titriplex III, Fa. MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) verwendet. Diese Lösung wurde über einen Zeitraum von ca. vier Wochen regelmäßig alle zwei bis drei Tage gewechselt; die Präparate wurden in dieser Zeit in einem Kühlschrank gelagert. Nach Abschluss der Entkalkung wurden die Präparate für 24 Stunden in 5%-ige Saccharose-Lösung überführt, um einen Zellschutz für die folgende weitere Bearbeitung mit einem Microm HM 500 OM-Kryomikrotom zu erhalten. Mit diesem Mikrotom wurden 14  $\mu\text{m}$  dicke, in der Frontalebene gelegene Schnitte angefertigt.

Da die auf diesem Wege gewonnenen Präparate teils deutliche Schnittartefakte aufweisen, die eine Beurteilung der subchondralen Anteile des Defektes unmöglich machten, wurden Anteile der gesetzten Defekte zunächst mit Aceton entfettet sowie mit 100%-igem Methanol entwässert. Anschließend wurden die Präparate in Methylmetacrylat (MMA; Fa. MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) eingebettet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Nonylphenyl-polyethylenglycol-acetat (Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, CH) sowie getrocknetes Benzoylperoxid (Fa. MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) eingeleitet. Die so behandelten Präparate wurden bis zum Abschluss der Polymerisation bei einer Temperatur von 37°C in einem Wärmeschrank gela-

gert. Nach abgeschlossener Aushärtung des Einbettungsmediums wurden mit einer Leica 1200 Innenloch-Säge (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) Schnitte mit einer Stärke von 100  $\mu\text{m}$  angefertigt, die ebenfalls histologisch aufbereitet wurden.

## 2.5. Histologische Aufarbeitung

Die gewonnenen Gefrierschnitte wurden verschiedenen histologischen Verfahren zugeführt. Von jedem Präparat wurde an einem Objektträger einer Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin durchgeführt. Ein weiterer Teil der Objektträger wurde mit Safranin-O angefärbt. Safranin-O bindet an saure Glykosaminoglykane (GAG), wie sie in der Matrix von hyalinem Knorpel zu finden sind. Die Färbintensität ist in einem gewissen Bereich proportional zur Konzentration der sauren GAG; die Färbung erlaubt daher Rückschlüsse auf die Menge der GAG in der Knorpelmatrix. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung mit Echtgrün und Weigertschem Eisenhämatoxylin durchgeführt. Weitere Objektträger wurden mit Toluidinblau gefärbt. Toluidinblau bindet ebenfalls an saure GAG, es kommt jedoch ab einer gewissen Konzentration zur Ausbildung einer metachromatischen Farbreaktion, die als rotviolette Färbung sichtbar wird.

Weiterhin wurden immunhistochemische Markierungen für Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan durchgeführt. Kollagen I findet sich vor allem in Faserknorpel, Sehnen und Bindegewebe. In gesunden hyalinen Knorpel lässt sich Kollagen I nicht nachweisen. Kollagen II ist ein typisches Kollagen des Knorpels. Bei Aggrecan (einem großen Proteoglycan) handelt es sich ebenfalls um einen typischen Bestandteil der Knorpelmatrix. Es kann allerdings sowohl an Kollagen I als auch an Kollagen II binden und ist daher auch in Faserknorpel anzutreffen. Die genauen Bezeichnungen der zur Markierung verwendeten Antikörper sowie der enzymatische Vorbehandlung der Kryoschnitte findet sich in Tabelle 2.1. Die Antikörperbindung wurde mit dem Vectastain ABC 'Elite' Avidin/Biotin/Peroxidase-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) nachgewiesen, als Substrat für die Färbereaktion wurde DAB verwendet. An die erfolgte Nachweisreaktion schloss sich noch eine Gegenfärbung mit Mayerschem Hämatoxylin an.

Die in MMA eingebetteten Präparate wurden zunächst nativ unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Fa. Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) untersucht; die Anregung erfolgte bei 450 nm – 490 nm (Filter Nr. 9, Fa. Carl Zeiss, Göttingen, Deutsch-

erkanntes Antigen	Antikörper	Vorbehandlung <sup>a</sup>	Literaturquelle
Kollagen I	ColII	Hyal <sup>b</sup> (1,5 IU/ml) und ChABC <sup>c</sup> (0,25 IU/ml)	
Kollagen II	CIICI	Hyal (1,5 IU/ml) und ChABC (0,25 IU/ml)	Holmdahl et al. [19]
Aggrecan	1C6	Hyal (1,5 IU/ml) und ChABC (0,25 IU/ml) nach Reduzierung und Alkylierung	Calabro et al. [10]

<sup>a</sup>Enzymatische Andauung für 30 Minuten bei 37°C

<sup>b</sup>Hyaluronidase

<sup>c</sup>Chondroitinase ABC

Tabelle 2.1.: Zur Immunhistologie verwendete Antikörper

Art des vorherrschenden Gewebes	Punkte
<i>Zellmorphologie</i>	
hyaliner Gelenkknorpel	4
unvollständig differenziertes Mesenchym	2
Bindegewebe oder Knochen	0
<i>Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-O</i>	
normal oder fast normal	3
mittel	2
schwach	1
keine	0

Tabelle 2.2.: Bewertung des vorherrschenden Gewebes nach O’Driscoll

land). Anschließend wurden die Schnitte noch einer Färbung nach Ladewig unterzogen, die eine gute Beurteilung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe ermöglicht.

## 2.6. Auswertung

Zur Beurteilung der Güte des erhaltenen Regenerats fand das Auswertungsschema nach O’Driscoll [36] Verwendung, das in den Tabellen 2.2 bis 2.5, in die deutsche Sprache übertragen, dargestellt ist.

Die Kriterien des von O’Driscoll vorgeschlagenen Auswertungsschemas lassen sich in vier Gruppen einteilen. Eine solche Gruppe stellt die Beurteilung des Regeneratgewebes nach seiner Zellmorphologie und der Anfärbbarkeit der Gewebematrix mit Safranin-O

strukturelle Charakteristika	Punkte
<i>Gleichmäßigkeit der Oberfläche</i>	
glatt und intakt	3
oberflächliche horizontale Schichtung	2
Risse – 25 bis 100 Prozent der Dicke	1
schwere Störung, einschließlich Fibrillation	0
<i>strukturelle Integrität</i>	
normal	2
leichte Störungen, einschließlich Zysten	1
schwere Zerstörungen	0
<i>Dicke</i>	
100 Prozent des angrenzenden normalen Knorpels	2
50 – 100 Prozent des normalen Knorpels	1
0 – 50 Prozent des normalen Knorpels	0
<i>Verbindung mit angrenzendem Knorpel</i>	
an beiden Enden des Implantats verbunden	2
an einem Ende oder an beiden Enden teilweise verbunden	1
nicht verbunden	0

Tabelle 2.3.: Bewertung der strukturellen Charakteristika nach O’Driscoll

Freiheit von zellulären Degenerationszeichen	Punkte
<i>Zellularität</i>	
normale Zellzahl	3
leichte Hypozellularität	2
mittelschwere Hypozellularität	1
schwere Hypozellularität oder Hyperzellularität	0
<i>Bildung von Chondrozytenclustern</i>	
keine Cluster	2
<25 Prozent der Zellen	1
25 – 100 Prozent der Zellen	0

Tabelle 2.4.: Bewertung von Degenerationsszeichen nach O’Driscoll

Freiheit des angrenzenden Knorpels von degenerativen Erscheinungen	Punkte
normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbbbarkeit	3
normale Zellzahl, leichte Clusterbildung, mittlere Anfärbbbarkeit	2
leichte oder mittelschwere Hypozellularität, schwache Anfärbbbarkeit	1
schwere Hypozellularität, schlechte oder keine Anfärbbbarkeit	0

Tabelle 2.5.: Bewertung des angrenzenden Knorpels nach O’Driscoll

dar, die Punktezuordnung zu den einzelnen Beobachtungen ist in Tabelle 2.2 dargestellt. In einem weiteren Schritt werden strukturelle Eigenschaften des Regenerates bewertet. Wie Tabelle 2.3 zeigt, wird zunächst die Oberflächenbeschaffenheit begutachtet. Die Möglichkeiten reichen hierbei von einer glatten und somit günstigen Oberfläche über Risse, die sich durch das gesamte Regenerat ziehen können, bis hin zu schwersten Störungen der Oberflächenstruktur, die die Funktion als adäquater Oberflächenersatz nicht mehr gewährleisten. Einen weiteren Punkt stellt die Integrität des Gesamtregenerates dar. Die mögliche Skala reicht hier von einer unauffälligen Struktur des neugebildeten Gewebes über leichtere Störungen, worunter hier auch die Bildung von Zysten fällt, bis hin zu schwersten Zerstörungen des Gefüges. Ebenfalls beurteilt wird die Dicke des erzielten Regenerates. Im Idealfall wird hier eine Deckung genau im Niveau erwartet, eine Stärke unter 50% des physiologischen Knorpels wird bereits als nicht mehr adäquat angesehen und mit der schlechtest möglichen Punktzahl gewertet. Zuletzt wird in dieser Gruppe noch die Verbindung des neu entstandenen Gewebes mit dem umliegenden Knorpel beurteilt. Eine weitere Gruppe der Beurteilung stellt die Freiheit des Regeneratgewebes von Degenerationszeichen dar. Das erste Kriterium stellt die Chondrozytenzahl im Vergleich zur Anzahl in ungeschädigtem Gelenkknorpel dar. Wie in Tabelle 2.4 zu sehen ist, wird hierbei zwischen vier verschiedenen Merkmalsausprägungen unterschieden. Das Optimum ist auch wieder der physiologische Zustand, hier also eine normale Zellzahl. Im ungünstigsten Fall zeigt das Regenerat eine, im Vergleich zu dem gesunden hyalinen Knorpel, stark reduzierte Zellzahl. Die in etlichen Regeneraten nachgewiesene Erhöhung der Zellmenge wurde in Abweichung zum unveränderten Score nach O'Driscoll ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet. Ein anderes Zeichen für eine Degeneration des Knorpelgewebes stellt die Bildung von haufenartigen Ansammlungen von Chondrozyten, sogenannten Chondrozytenclustern, dar. Das Schema von O'Driscoll unterscheidet hier je nach der prozentualen Menge der in Clustern zusammen liegenden Knorpelzellen zwischen drei verschiedenen Gruppen, wobei für die Einstufung in die ungünstigste Gruppe bereits eine Zahl von 25% der vorhandenen Chondrozyten ausreichend ist. Falls sich in einem Regenerat keine Knorpelzellen nachweisen ließen, wurde hier ebenfalls die schlechtestmögliche Einstufung gewählt. Zuletzt geht in das Auswertungsschema noch eine Degeneration des angrenzenden Knorpelgewebes mit ein. Wie Tabelle 2.5 zeigt, sind hier mehrere Kriterien, die im eigentlichen Regenerat gesondert beurteilt werden, zu einer Einstufung zusammengefasst worden. Für jede dieser Gruppen werden Punkte vergeben. Für eine endgültige Einschätzung werden die erzielten Punktwerte in den einzelnen Beurteilungskriterien addiert, so dass sich ein mögliches Punktespektrum von 24 im Falle

zusätzliche Kriterien	Punkte
<i>Anwesenheit von Kollagen I</i>	
kein Nachweis von Kollagen I	2
Kollagen I in Teilen des Regenerats	1
Kollagen I im ganzen Regenerat oder knöcherner Oberfläche	0
<i>Anwesenheit von Kollagen II</i>	
Kollagen II im ganzen Regenerat	2
Kollagen II in Teilen des Regenerats	1
kein Nachweis von Kollagen II oder knöcherner Oberfläche	0
<i>Anwesenheit von Aggrecan</i>	
Aggrecan im ganzen Regenerat	2
Aggrecan in Teilen des Regenerats	1
kein Nachweis von Aggrecan oder knöcherner Oberfläche	0
<i>Blutgefäße im Regenerat</i>	
keine Gefäße sichtbar	2
Gefäße ohne Kontakt zur Gelenkoberfläche	1
Gefäße mit Kontakt zur Gelenkoberfläche	0
<i>Metachromasie bei Toluidin-blau</i>	
vorhanden	2
nicht überall vorhanden	1
nicht vorhanden	0

Tabelle 2.6.: Erweiterung für Score nach O’Driscoll

eines perfekten Regenerates bis 0 bei einer fehlgeschlagenen Reperatur mit schwerster Schädigung der angrenzenden Knorpelanteile ergibt.

Da weder der Score nach Pineda [40] noch derjenige nach Wakitani [54] noch der originale Score nach O’Driscoll immunhistologische Ergebnisse in die Gesamtbeurteilung mit einschließen, wurde das Auswerteschema nach O’Driscoll durch entsprechende Kriterien ergänzt. Weitere Erweiterungen bestanden in der Beurteilung der Metachromasie des Regeneratgewebes bei der Färbung mit Toluidinblau und der Suche nach Gefäßen im Regenerat. Die vollständige Erweiterung ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Die verwendeten Immunmarkierungen für Kollagen I, Kollagen II sowie Aggrecan geben eine detailliertere Auskunft über die Art des gebildeten Regenerats, als dies mit den konventionellen Färbemethoden möglich ist. Insbesondere erlauben sie eine Differenzierung zwischen hyalinartigem und faserknorpelartigem Gewebe, die nicht nur auf strukturellen Kriterien basiert.

Zur Beurteilung des Regeneratgewebes wurde die Mitte des ehemaligen Defektes auf-

gesucht und das dort gelegene Gewebe bewertet. Knorpelgewebe am Boden eines tiefen und mit faserreichem Material aufgefüllten Defektes wurde nicht als günstig gewertet. In solchen Fällen wurde das oberflächliche und gelenknahe Ersatzgewebe beurteilt. Im Falle einer Gewebshomogenität des Regeneratgewebes wurde der im Sinne des Schemas jeweils ungünstigste Punktwert zugewiesen, wobei ebenfalls nur das gelenkflächennahe Gewebe bewertet wurde. Bei der Beurteilung der Anbindung des Regenerats an den umliegenden ursprünglichen Knorpel wurde nur eine knorpelige Anheftung als günstig bewertet. Eine rein bindegewebige Anbindung wurde nicht als Anheftung im Sinne des Scores gewürdigt. Die Bildung von Chondrocytenclustern im Regeneratknorpel sowie in den defektnahen Anteilen des ursprünglich vorhandenen Knorpels galt als pathologische, degenerative Veränderung des Gewebes. Als solche ging sie in die Bewertung ein. Nach einer ersten Auswertung anhand oben angegebener Richtlinien erhielten zwei weitere, mit histologischen Fragestellungen vertraute, Auswerter die Präparate verblindet zur unabhängigen Bewertung. Durch die strikte Anwendung des geschilderten Scores sowie der Beurteilung durch mehrere verblindete Untersucher wurde versucht, die Ergebnisse zu objektivieren und dadurch auch für andere Arbeitsgruppen nachvollziehbar zu gestalten.

Zusätzlich wurde die prozentuale Deckung der Defekte mit Knorpel untersucht. Hierzu wurde zunächst eine digitale Aufnahme des gesamten Defektes erstellt. Anschließend wurde mittels eines geeigneten Programmes (KS400, Fa. Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) die erkennbare Gesamtbreite des Defektes sowie die Breite der Deckung mit Knorpelgewebe an beiden Enden bestimmt. Aus diesen Werten wurde daraufhin die prozentuale Deckung berechnet.

## 3. Ergebnisse

Im Rahmen der Versuche ergaben sich keine postoperativen Wundinfektionen bei den Versuchstieren. Bei einem Tier wurden nach wässrigen Diarrhöen in einer Stuhluntersuchung Coccygien gefunden; das betroffene Tier sowie die anderen zum gleichen Zeitpunkt operierten Tiere wurden daraufhin mit Oxytetracyclin behandelt. In diesen Fällen entfiel die im Protokoll vorgesehene Gabe von Oxytetracyclin am fünften postoperativen Tag, da die betroffenen Tiere wegen der Infektion vom dritten bis zum sechsten Tag jeweils 50 mg Oxytetracyclin pro kg Körpergewicht erhielten. Die weiteren vorgesehenen Applikationen von 25 mg Calcein pro kg Körpergewicht am zwanzigsten postoperativen Tag und 50 mg Oxytetracyclin pro kg Körpergewicht am 35. postoperativen Tag wurden wie vorgesehen durchgeführt.

### 3.1. Histologische Auswertung

#### 3.1.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

In der Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) zeigten die unversorgten Defekte schwere Schäden. Die in jedem Fall noch deutlich erkennbaren Defekte enthielten meist ein zell- und faserreiches Narbengewebe, welches teils unter dem Niveau der ursprünglichen Gelenkfläche zurückblieb, in einzelnen Fällen jedoch auch über die ursprüngliche Gelenkskontur hinausragte. Wie Abbildung 3.1 zeigt, war die Oberfläche des neugebildeten Gewebes wellig, das Regenerat selbst bestand aus einem lockeren und inhomogenen Bindegewebe. Es waren weder knorpelige Areale noch einzelne Knorpelzellen zu erkennen. Über den mit einem Bioimplantat versorgten osteochondralen Defekten kam es in allen Fällen zur Ausbildung eines knorpelartigen Ersatzgewebes, auch wenn in keinem Fall eine vollständige Deckung mit neugebildetem Knorpel beobachtet werden konnte. In den knorpelig gedeckten Bereichen fand sich durchweg eine glatte Oberfläche. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch eine weitgehende Deckung des gesetzten Defektes mit einem

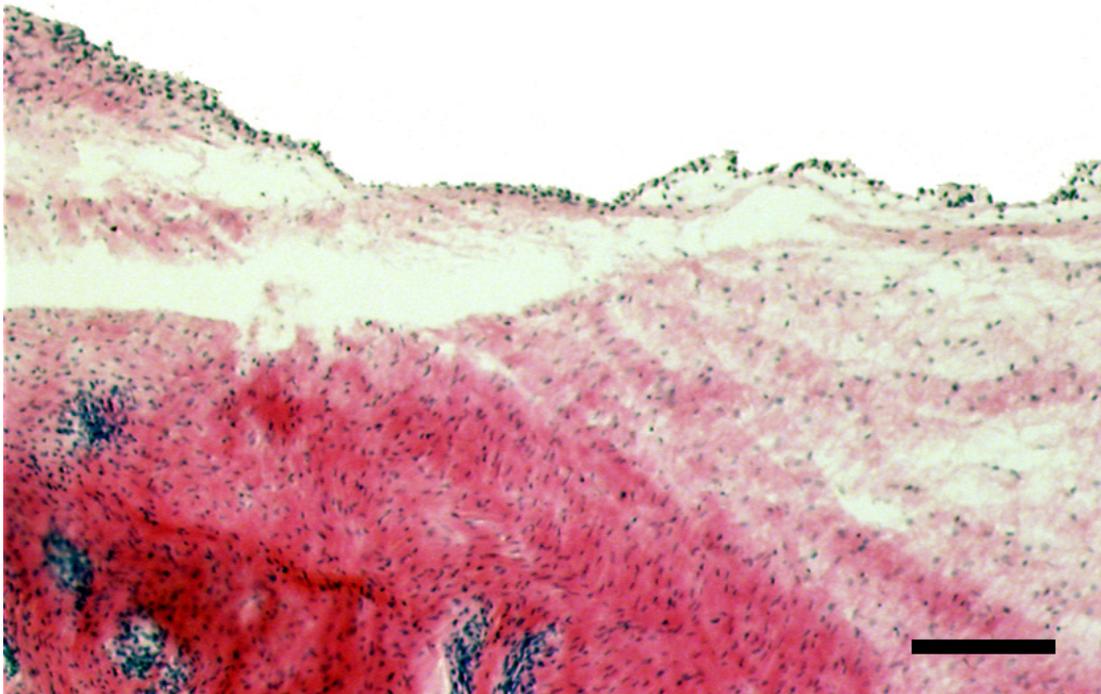


Abbildung 3.1.: Aufnahmen der Femurkondyle einer Leerlochkontrolle bei Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Der Defekt ist mit einem mäßig zellreichen lockeren Bindegewebe ausgefüllt. Die Gelenkoberfläche ist unregelmäßig. Referenzstrecke 180  $\mu\text{m}$ .

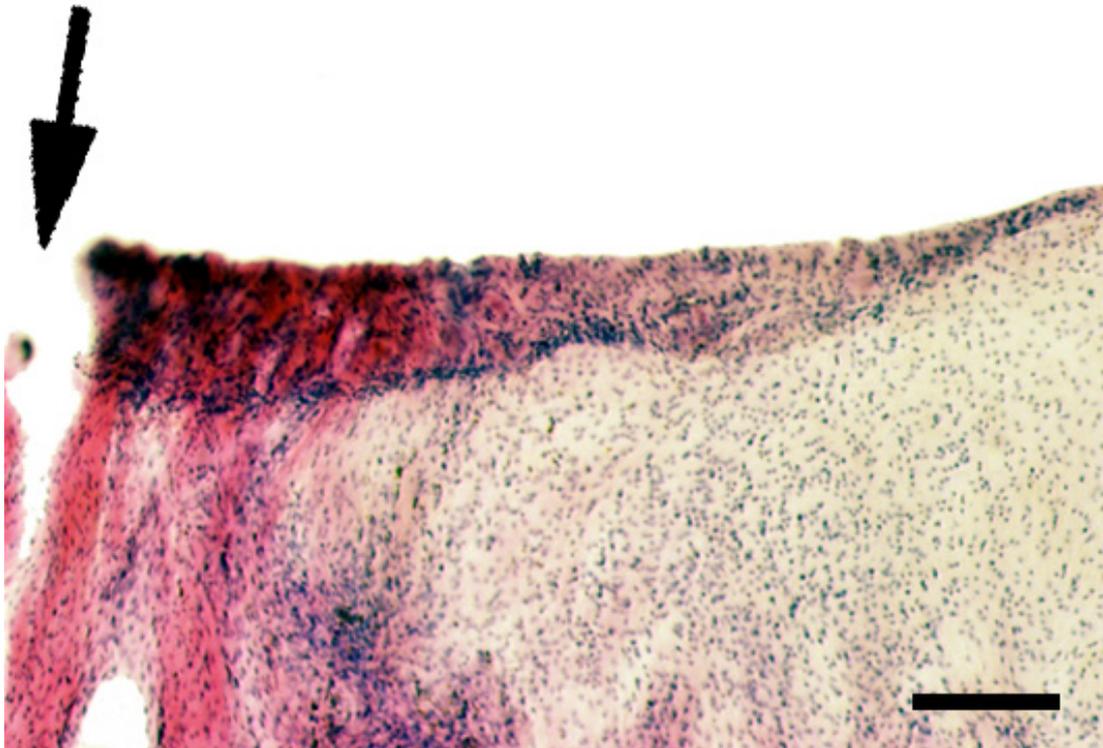


Abbildung 3.2.: Aufnahme eines mit Bioimplantat versorgten Defektes bei Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Der Defekt ist mit einem zellreichen Neoknorpel gedeckt, im Zentrum des Defektes sind Fissuren zu erkennen (Pfeil). Trotz des eingeschlagenen Gewebes ist eine glatte Gelenkoberfläche sichtbar. Referenzstrecke 180  $\mu\text{m}$ .

solchen Neoknorpel. Trotz des oberflächlich gelegenen, eingeschlagenen Gewebes war die glatte Oberfläche als solche erkennbar. Das Zentrum des Defektes wies jedoch Fissuren auf.

In der HE-Färbung fielen zunächst die rein morphologischen Unterschiede zwischen den Regeneraten auf, welche in beiden Versuchsgruppen entstanden. Während der Spontanverlauf in der Ausbildung einer lockeren bindegewebigen Narbe mit einer gewellten Oberfläche bestand, zeigten die mit einem Bioimplantat versorgten Defekte einen neu gebildeten Knorpel mit einer glatten Oberfläche. Dieser Knorpel bedeckte allerdings nicht den gesamten Defektdurchmesser. Weiterhin enthielt er mehr Zellen als ein gesunder Knorpel, wobei die Zellen lediglich in begrenzten Arealen in der für Gelenknorpel allerdings typischen säulenförmige Anordnung lagen.

### **3.1.2. Färbung mit Safranin-O**

In der Färbung der histologischen Präparate mit Safranin-O wiesen die Präparate der Kontrollgruppe durchweg eine erniedrigte Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix auf. Abbildung 3.3 zeigt ein solches Bild. Das oberflächlich gelegene Gewebe war homogen grün eingefärbt, was einen stark verminderten Gehalt saurer GAG anzeigt; die Oberfläche selbst war unregelmäßig. Das neu entstandene Gewebe erschien insgesamt aufgelockert und es fanden sich multiple, kleine Zysten, die nahe an der Gelenkfläche lagen. Abbildung 3.4 demonstriert das Ergebnis bei Verwendung eines Bioimplantats. Es zeigte sich eine weitestgehend geschlossene Deckung mit einem homogen rot eingefärbten Knorpel mit einer glatten Oberfläche. Das Regenerat verfügte hier über eine normale Anfärbbarkeit für Safranin-O und somit auch über einen weitgehend normalen Gehalt an sauren GAG. Unter dem Knorpelgewebe zeigten sich eine Schicht aus homogen grün angefärbtem Knochen und erkennbare Reste des eingebrachten Implantats.

Die Untersuchung der mit Safranin-O gefärbten Schnitte zeigte zunächst die, schon von den mit HE gefärbten Präparaten bekannte, unruhige Oberfläche in der Kontrollgruppe, während die Defekte bei der Verwendung der Bioimplantate mit einem glatten Gewebe gedeckt waren. Weiter fiel das unterschiedliche Anfärbeverhalten in beiden Gruppen ins Auge. Während das Regenerat in den Tieren der Kontrollgruppe grün gefärbt und somit arm an sauren GAG war, färbte sich der Neoknorpel bei den Tieren mit Bioimplantat intensiv rot und zeigte dadurch eine höhere Menge an physiologischen Matrixbestandteilen auf.

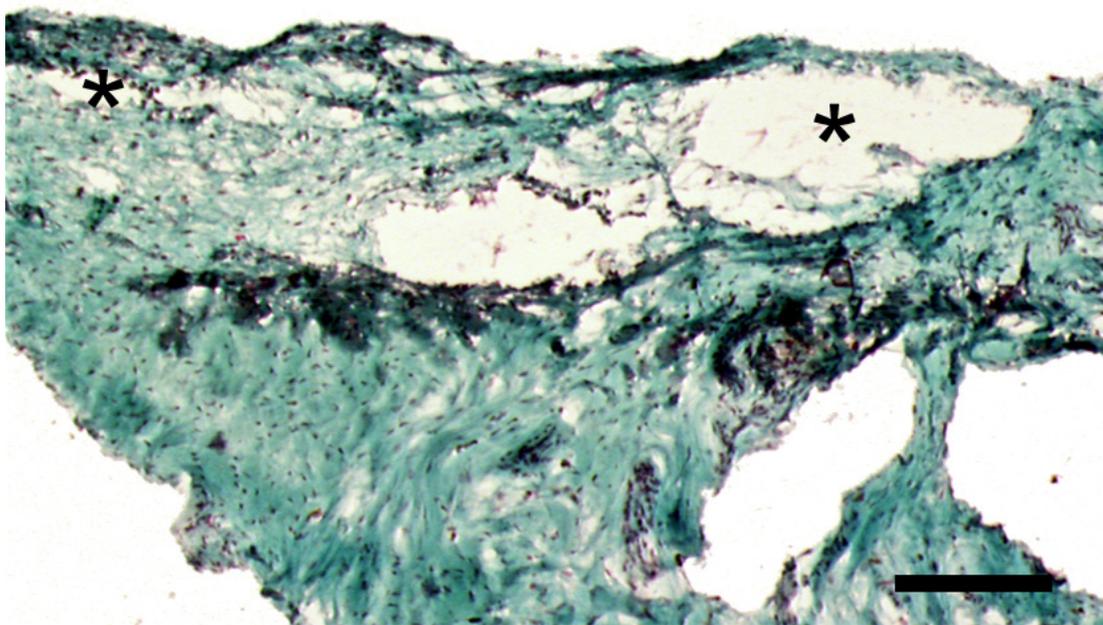


Abbildung 3.3.: Darstellung der Femurkondyle einer Kontrolle bei Färbung mit Safranin-O, Echtgrün und Weigertschem Eisenhämatoxylin. Das Gewebe an der Gelenksoberfläche ist homogen grün angefärbt, die Oberfläche selbst ist unregelmäßig. Knapp unter der Oberfläche sind kleine Zysten (\*) erkennbar. Referenzstrecke 180  $\mu\text{m}$ .

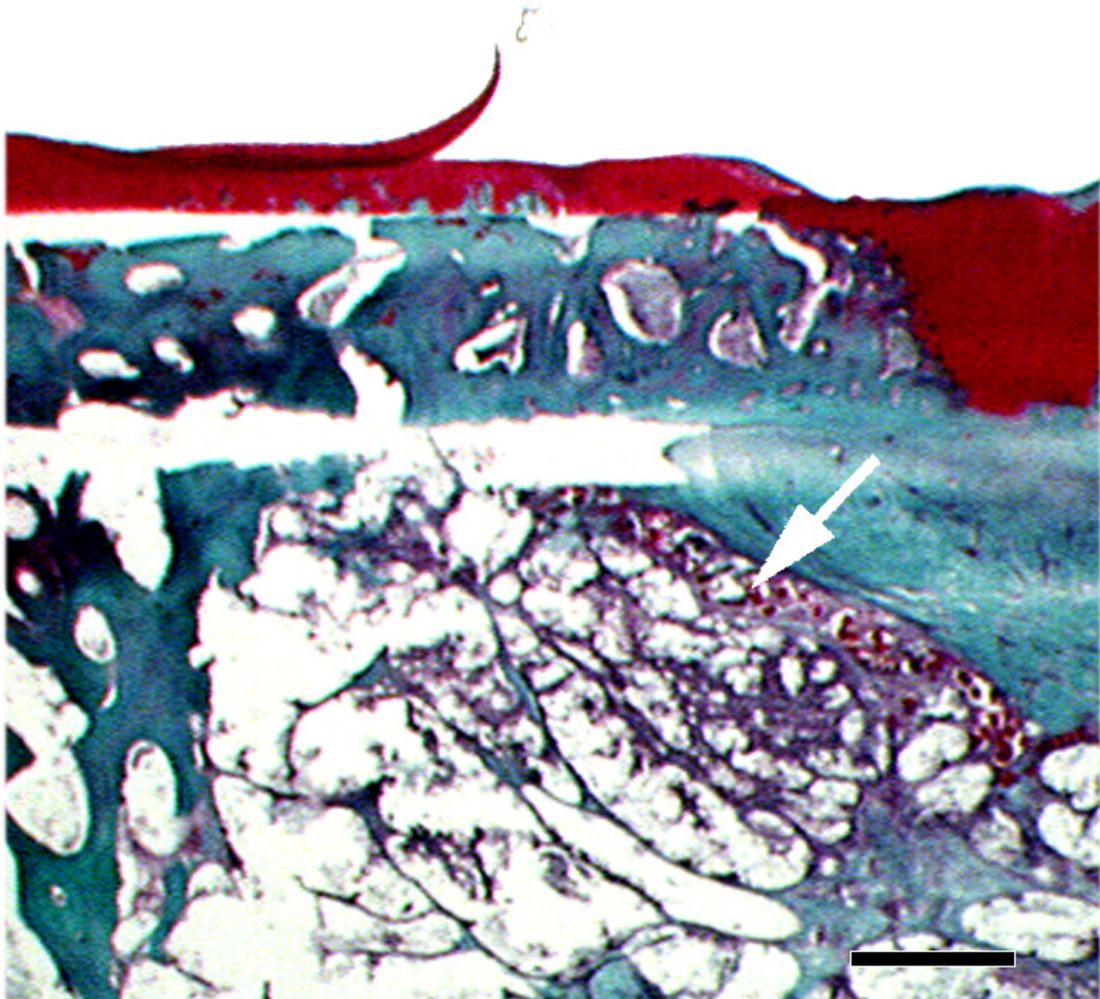


Abbildung 3.4.: Abbildung eines mit Bioimplantat versorgten osteochondralen Defektes bei Färbung mit Safranin-O, Echtgrün und Weigertschem Eisenhämatoxylin. Die Gelenkoberfläche wird von einem glatten, intensiv rot gefärbten zellreichen Neoknorpel gebildet. In der Tiefe sind noch Reste des Implantatmaterials (Pfeil) zu erkennen. Bei dem in das Gelenk hineinragenden Sporn handelt es sich um ein eingeschlagenes Gewebestück. Referenzstrecke 180  $\mu\text{m}$ .

### **3.1.3. Färbung mit Toluidinblau**

Abbildung 3.5a zeigt ein repräsentatives Beispiel für einen unversorgten Defekt, der mit Toluidinblau gefärbt wurde. Auffallend war hier die tiefe Fissur, die zwischen dem Regenerat und dem umliegenden Gewebe lag. Hier kam es bis weit in die Tiefe des Defektes hinein zu keiner Anbindung des neu gebildeten Gewebes. Bemerkenswert war weiterhin die intensive rot-violette Färbung in den Randbereichen des Defektes, die hier die gleiche Intensität erreichte, wie sie der gesunde Gelenkknorpel aufweist. Der Defekt selber war mit einem sehr unruhigen Gewebe angefüllt, welches sich lediglich in geringem Maße violett darstellt. Das Reperaturgewebe wies also lediglich einen geringen Gehalt an sauren GAG auf. Bei der Verwendung einer stärkeren Vergrößerung - eine solche ist in Bild 3.5b zu sehen - zeigten sich zahlreiche Gefäße in Inneren des Narbenpropfes. Die Blutgefäße waren eingebettet in ein sehr zell- und faserreiches Bindegewebe; die Fasern verliefen allerdings ungeordnet. In Abbildung 3.6 ist ein Ausschnitt aus den oberflächlichen Anteilen eines mit einem Bioimplantat versorgten Defektes zu sehen. Der neugebildete Knorpel zeigte eine weitgehend homogene, intensive Metachromasie, was einem hohen Gehalt an GAG gleichkommt. Das Regenerat war in nahezu allen Präparaten auf beiden Seiten gut an den angrenzenden Knorpel angebunden. Die wiederhergestellte Gelenksoberfläche wies einen leicht gewellten Verlauf auf.

Auch die mit Toluidinblau angefärbten Gefrierschnitte ließen Differenzen zwischen beiden Gruppen erkennen. Besonders auffällig war auch hier wieder der Unterschied in der Beschaffenheit der verschiedenen Regenerate. Während das neu entstandene Gewebe überwiegend bindegewebig differenziert und arm an GAG war, zeigten die mit einem Bioimplantat versorgten Defekte eine Deckung mit einem kräftig metachromatischen Gewebe. Die Farbintensität dieses Gewebes war nicht von der des gesunden Gelenkknorpels zu unterscheiden. Unterschiede fanden sich auch in der Ausdehnung der einzelnen Gewebearten. Während die Kontrolldefekte in der Regel von einem einzelnen bindegewebigen Pfropf erfüllt waren, fand sich bei den Defekten mit Bioimplantat eine deutliche Grenze zwischen zwei unterschiedlich differenzierten Geweben.

### **3.1.4. Markierung für Kollagen I**

Die immunologische Markierung für Kollagen I erbrachte bei fast allen untersuchten Kontrolldefekten einen positiven Nachweis in sämtlichen Anteilen des Regenerates. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 3.7. Es zeigte sich eine gleichmässige Markierung für

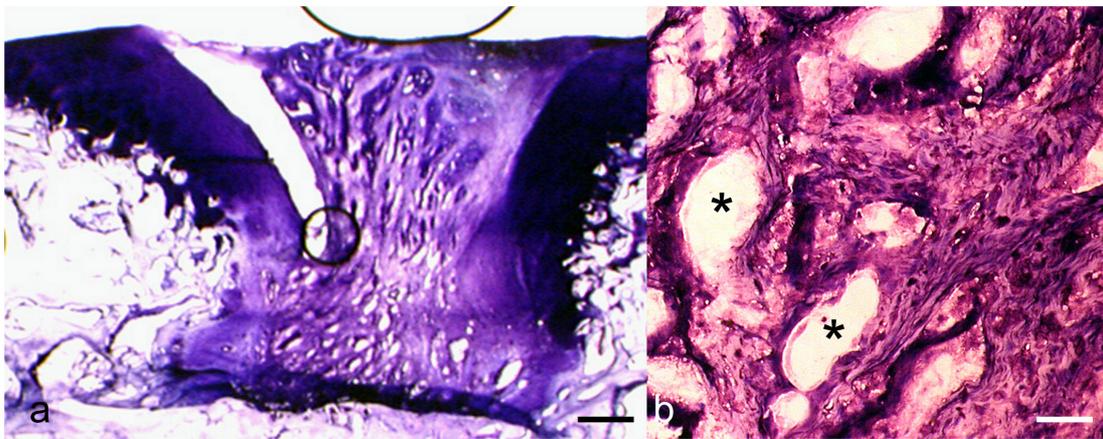


Abbildung 3.5.: Aufnahmen einer Kontrolle, Toluidinblau *a)* Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit zentral angeordnetem tiefen Knochen-Knorpeldefekt. Der tiefe Krater des ehemaligen Knochen-Knorpeldefektes ist an den Rändern von tief dunkelblauem Knorpelgewebe begrenzt während sich im Zentralbereich ein gefäßreiches bindegewebiges Narbengewebe findet. Dies reicht vom Markraum bis zur Gelenkoberfläche. Referenzstrecke 500  $\mu\text{m}$ . *b)* Detailaufnahme aus *a)*. Bindegewebe mit zahlreichen Gefäßen (\*) im Bereich der Narbenzone. Referenzstrecke 90  $\mu\text{m}$ .

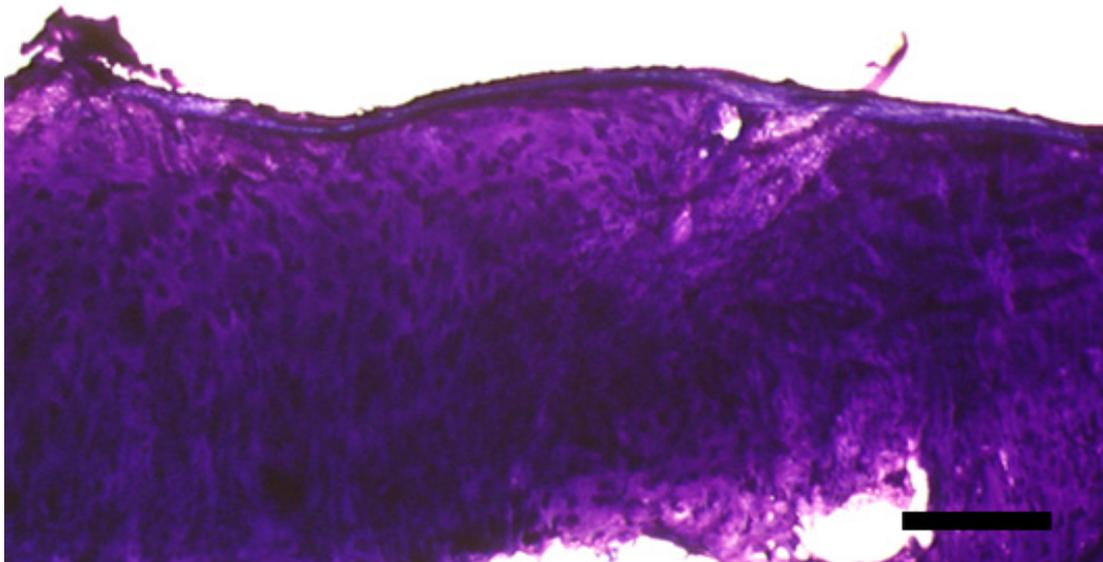


Abbildung 3.6.: Aufnahme eines mit einem Bioimplantat versorgten Defektes. Bei leicht welliger Oberfläche präsentiert sich das Regeneratgewebe homogen in einem dunklen rot-violett. Toluidinblau. Referenzstrecke 180  $\mu\text{m}$ .

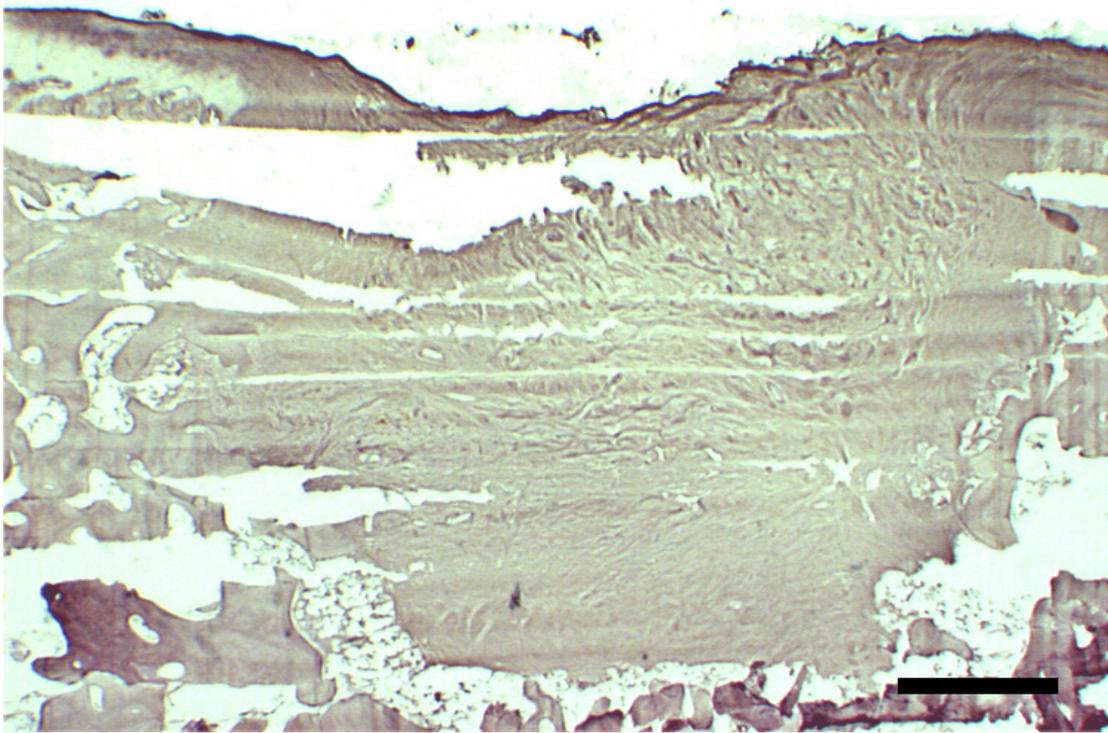


Abbildung 3.7.: Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit tiefer Knorpel-Knochenläsion bei Markierung für Kollagen I und Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Der bindegewebige Narbenpfropf sowie das darunter oder daneben liegende Knochengewebe sind einheitlich markiert. Referenzstrecke 930  $\mu\text{m}$ .

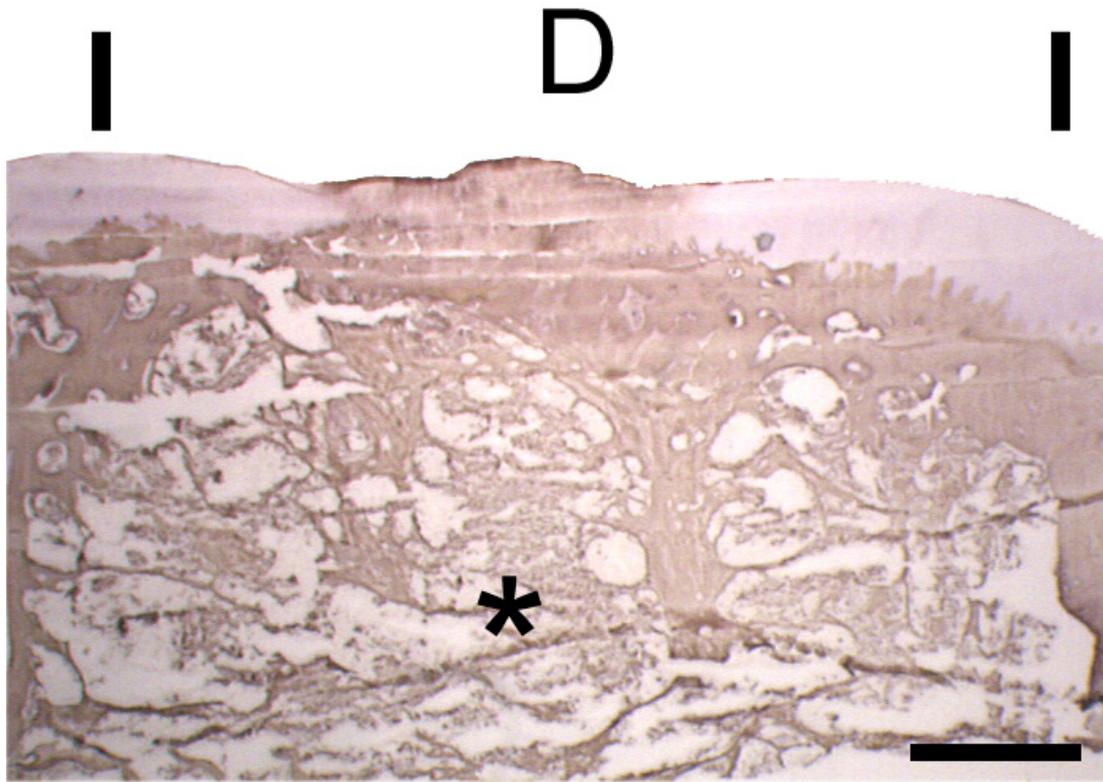


Abbildung 3.8.: Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit tiefer Knochen-Knorpelläsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat für Knochen-Knorpeldefekte bei Markierung für Kollagen I und Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Kompletter Verschluss des Knochen-Knorpeldefektes mit zwei morphologisch unterscheidbaren Gewebstypen. Die Gelenkfläche wird gebildet durch ein im zentralen Defektbereich noch Kollagen I positives Gewebe welches im Randbereich bereits Kollagen I negativ ist. Unter dem Gelenkflächenüberzug befindet sich eine Zone mit Kollagen I positivem subchondralem Knochen, welcher an den Rändern des ehemaligen Defektes nahtlos und weitgehend niveaugleich angebunden ist. In der Tiefe sind die Reste der ursprünglich mit Bioimplantat gefüllten Zone erkennbar (\*). Die Markierung zeigt die Weite des ursprünglichen Defektes. Referenzstrecke 1,5mm

Kollagen I, die sich auch bis in den angrenzenden, primär nicht geschädigten Knorpel erstreckte. Die tiefen Anteile des Defektes waren mit einem ebenfalls Kollagen I-haltigen Narbengewebe gefüllt. Die Oberfläche zeigte eine deutliche zentrale Absenkung unter die ursprüngliche Gelenkskontur. Die Markierung für Kollagen I bei der Verwendung eines Bioimplantats zeigte eine fast vollständige Deckung mit Knorpelgewebe, welches lediglich in den zentralen Anteilen noch positiv für Kollagen I markierte. Die peripher liegenden Bereiche des Ersatzknorpels sowie der angrenzende Gelenkknorpel markierten negativ für dieses Kollagen. Im Bereich des Knochens sind noch Reste des Implantatmaterials zu erkennen. (Abbildung 3.8)

Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen I in den untersuchten Proben der Kontrollgruppe zeigte eine gleichmässige Markierung im gesamten Defektareal. Im Unterschied hierzu ließ sich in der neugebildeten Knorpelschicht der mit einem Bioimplantat versorgten Defekte lediglich in den zentralen Anteilen noch Kollagen I nachweisen. In den Randbereichen fand sich kein Kollagen I. Auch in dieser Methode zeigte sich in den Kontrollen ein bindegewebiges Narbengewebe, während sich bei Verwendung der Bioimplantate zwei Schichten mit unterschiedlichem Matrixaufbau aufzeigen ließen.

### **3.1.5. Markierung für Kollagen II**

Wie Abbildung 3.9 zeigt, fand sich im Defekt ein Regenerat aus Bindegewebe, in welchem sich gleichmässig verteiltes Kollagen II nachweisen ließ. Die Faserzüge in diesem Regeneratgewebe ließen keine bevorzugte Ausrichtung erkennen. Insgesamt wirkte das neu gebildete Gewebe zellreich und von zahlreichen Blutgefäßen durchzogen. Zu einer Deckung des Defektes mit einem knorpelartigen Ersatzgewebe kam es nicht, der angrenzende Knorpel ging unmittelbar in das bindegewebige Regenerat über. Wie Abbildung 3.10 zeigt, führte die Verwendung eines Bioimplantates zu der Ausbildung eines positiv für Kollagen II markierenden Knorpelgewebes. Der neugebildete Knorpel weist im Zentrum des Defektes jedoch Fissuren auf. Unter dieser Knorpeldeckung bildete sich ein Knochengewebe aus, in welchem sich kein Kollagen II nachweisen lies.

Die Markierung für Kollagen II zeigte bei den Tieren, die kein Bioimplantat erhalten hatten, eine gleichmässige Anfärbereaktion im kompletten Regenerat. Es kam hierbei nicht zur Ausbildung einer, von weiter in der Tiefe gelegenen Knochen abgrenzbaren, Knorpelersatzschicht, der gesamte Defekt war von Bindegewebe erfüllt. Anders verhielt es sich bei der Untersuchung der mit einem Bioimplantat versorgten Defekte. Hier kam

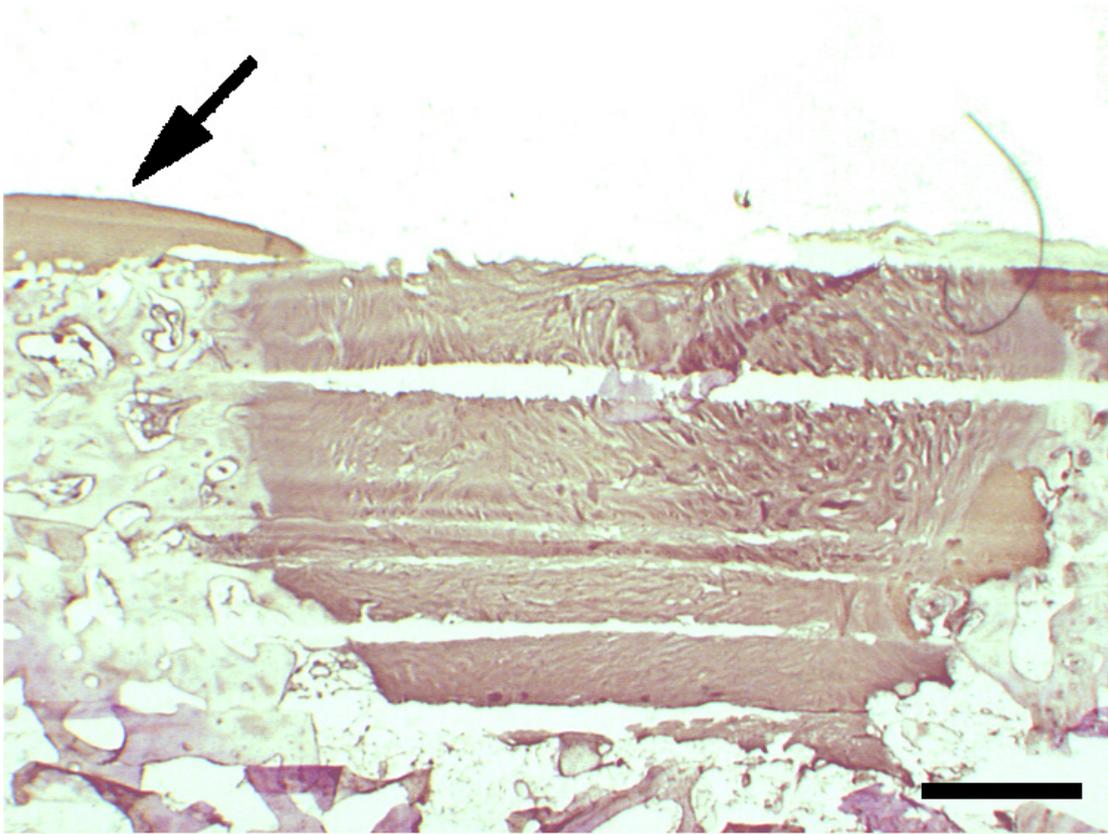


Abbildung 3.9.: Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit tiefer Knorpel-Knochenläsion bei Markierung für Kollagen II und Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Das Bindegewebe im Defekt zeigt eine kräftige Markierung für Kollagen II, während der angrenzende Knochen unmarkiert bleibt. Die Reste des Gelenkknorpels sind ebenfalls markiert (linker Bildrand, Pfeil). Referenzstrecke 930  $\mu\text{m}$ .

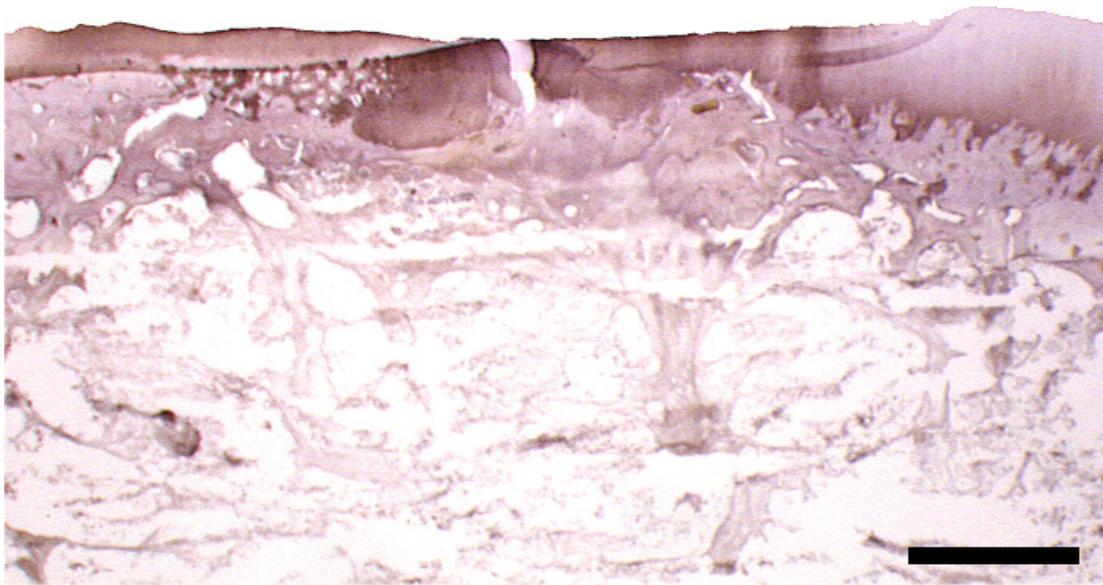


Abbildung 3.10.: Übersichtaufnahme einer Femurkondyle mit tiefer Knochen-Knorpelläsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat für Knochen-Knorpeldefekte bei Markierung für Kollagen II und Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Bedeckung des Defektes mit Kollagen II positivem Gewebe. (Die Unterbrechung in Bildmitte ist ein Schnittartefakt) Der subchondrale Knochen ist unmarkiert. Referenzstrecke 1,5mm.

es zur Entwicklung einer positiv für Kollagen II markierenden Knorpeldeckung des Defektes, wobei der Knorpel eine zentrale Fissur aufweist. Das neu gebildete Regenerat verfügte jedoch über eine ansonsten glatte Oberfläche. Unter dieser Knorpelschicht kam es zur Bildung von Knochen, der nicht für Kollagen II markiert. Die Knochen-Knorpelgrenze verlief allerdings tiefer als in den umliegenden Gelenkanteilen.

### **3.1.6. Markierung für Aggrecan**

Abbildung 3.11 zeigt das Ergebnis der Markierung eines Defektes der Kontrollgruppe mit Antikörpern gegen Aggrecan. Es fand sich ein intensiv positiv reagierendes Gewebe, welches den gesetzten Defekt vollständig ausfüllte. Das entstandene Gewebe wies eine Vielzahl von Blutgefäßen sowie einen weitgehend ungeordneten Verlauf der Kollagenfasern auf. Bemerkenswert war die weitgehende Zerstörung des angrenzenden, initial nicht beschädigten Gelenkknorpels mit Freiliegen des subchondralen Knochens. Die Markierung für Aggrecan, wie sie in Abbildung 3.12 gezeigt wird, erbrachte den Nachweis zweier verschiedener Gewebsdifferenzierungen im Defektgebiet. Oberflächlich gelegen fand sich eine gleichmäßig angefärbte Knorpelschicht, die gut in den angrenzenden Gelenkknorpel integriert ist. Die zentralen Anteile des Defektes sind jedoch deutlich unter das ursprüngliche Niveau der Gelenkfläche abgesunken; weiterhin war die Oberfläche des neu entstandenen Knorpels gewellt. Der angrenzende hyaline Knorpel zeigte keine erkennbaren Schäden.

Der immunhistologische Nachweis von Aggrecan zeigte in den untersuchten Präparaten eine positive Anfärbereaktion. Unterschiede bestanden jedoch in den positiv markierten Regionen. Während in der Kontrollgruppe in der Regel der gesamte Defekt mit einem Aggrecan-haltigen Gewebe ausgefüllt war, markierte in der Gruppe der Tiere, die mit Bioimplantaten versorgt wurden, lediglich ein gelenkflächennah gelegener Bereich. In jenem Gewebe, welches im Bereich des Knochens entstanden war, ließ sich jedoch kein Aggrecan nachweisen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen aus den bereits beschriebenen Färbungen, wonach die Defekte in der Kontrollgruppe von einem weitgehend einheitlichen bindegewebsartigen Gewebe ausgefüllt sind. Es zeigt hier allerdings durch die Expression eines knorpeltypischen Matrixbestandteils eine relative Nähe zu Knorpel, die in den rein morphologischen Färbungen wie HE, Safranin-O oder Toluidinblau nicht zu erkennen war. Im Gegensatz zu den Präparaten der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Verwendung von Bioimplantaten kein Aggrecan in den tiefen Anteilen des Defektes. Der knöcherne Anteil des Defektes wurde hier durch zum Zeitpunkt der Un-

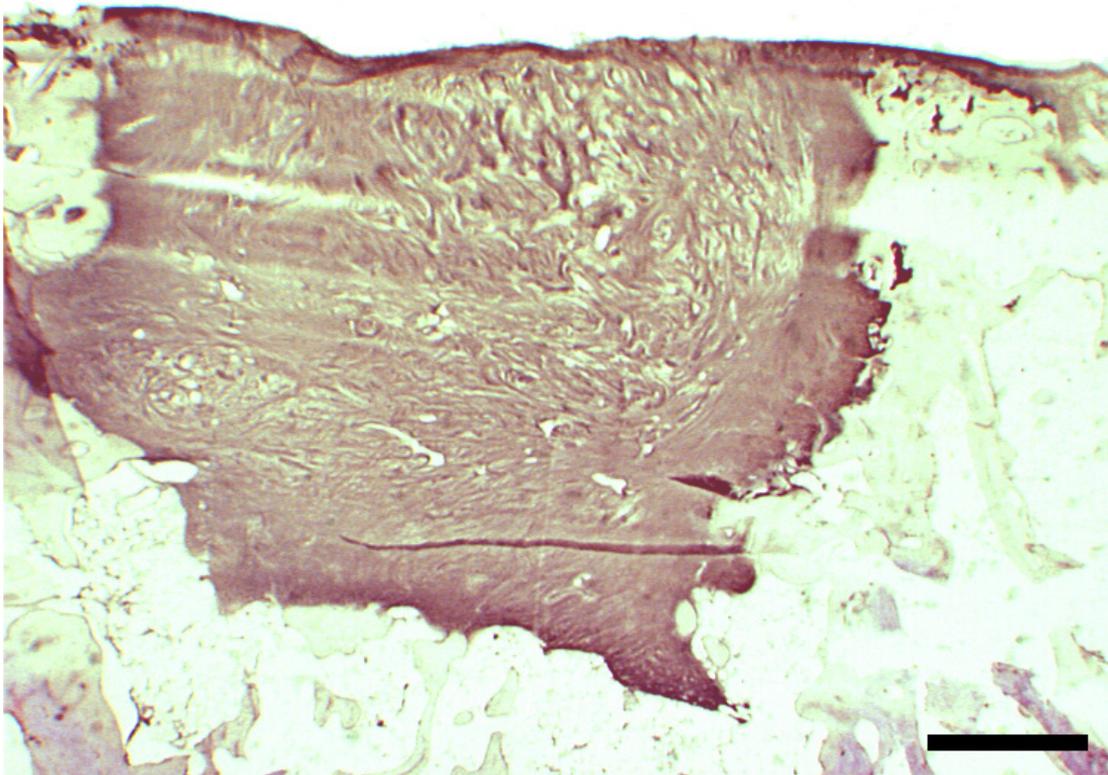


Abbildung 3.11.: Übersichtaufnahme einer Femurkondyle. Das Füllgewebe ist mit Antikörper gegen Aggrecan markiert, der Knochen ist nicht markiert. Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Referenzstrecke 930  $\mu\text{m}$ .

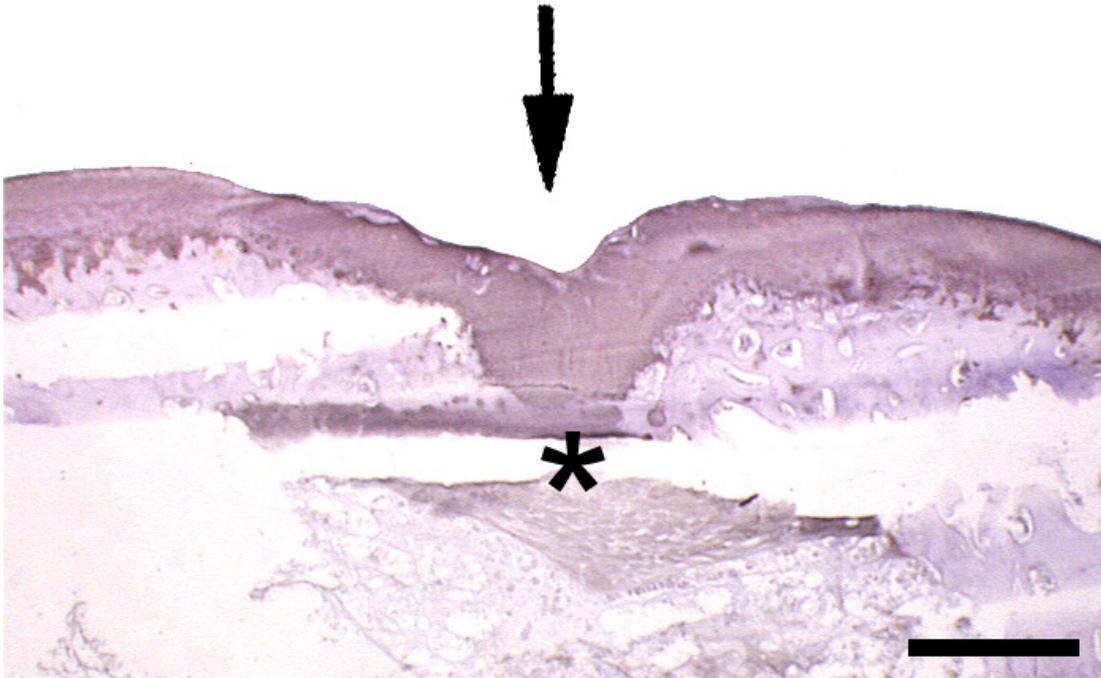


Abbildung 3.12.: Immunmarkierung für Aggrecan, Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit tiefer Knochen-Knorpelläsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat und Markierung des Regeneratgewebes mit Antikörper gegen Aggrecan, der Knochen ist nicht markiert. Im zentralen Regeneratbereich wird eine Einsenkung erkennbar. Die Knorpel-Knochen-Grenze senkt sich im zentralen Defektbereich deutlich unter das frühere Niveau ab (Pfeil). Bei der horizontal verlaufenden Strukturunterbrechung (\*) handelt es sich um ein Schnittartefakt. Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Referenzstrecke 1,5mm.

tersuchung noch unreifen Knochen verschlossen, welcher wie ausgereifter Knochen auch physiologischerweise kein Aggrecan enthält.

### **3.1.7. Fluoreszenzfärbung**

Das in Abbildung 3.13 dargestellte Bild zeigt die Situation, wie sie in allen untersuchten Proben der Kontrollgruppe aufgefunden wurde. Erkennbar war eine intensive gelb-grüne sowie eine orangefarbige Fluoreszenz in den Wänden des gesetzten Defektes. Im Defektareal selbst fand sich in der Tiefe keinerlei auffällige Fluoreszenz. Im Gegensatz hierzu fand sich im Lager der Bioimplantate lediglich eine mäßig intensive Fluoreszenz, während der Bereich des Implantates eine gleichmäßige Fluoreszenz zeigte. Das in Abbildung 3.14 erkennbare Bild zeigt ein solches Verteilungsmuster.

Bei dem Vergleich der Fluoreszenzverteilungen bei Leerlochkontrollen und Bioimplantatempfängern fiel zunächst die Färbung im Randbereich des Defektes auf. Die intensive Fluoreszenz der Leerlochkontrollen weist auf einen intensiven Umbauprozess in diesem Bereich hin, der durch eine erhöhte Belastung des Knochens an der Defektgrenze erklärbar ist. Analog hierzu zeigt die geringere Fluoreszenz im Lager der Bioimplantate eine geringere Belastung des umgebenden Knochens an. Dies ist ein Hinweis, dass das Bioimplantat die aufgetretenen Belastungen in ähnlicher Weise wie Knochen aufgenommen und an die angrenzenden Strukturen weitergegeben hat. Eine ähnliche Situation bestand auch im Inneren des Defektes. Hier fand sich in den Leerlöchern lediglich eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz. Im Bereich der Bioimplantate ließ sich jedoch eine intensive orangefarbige Fluoreszenz nachweisen, die eine Einlagerung von Calcium in das Defektareal zeigt, wie sie für einwachsendes Knochengewebe typisch ist.

### **3.1.8. Färbung nach Ladewig**

In der Färbung nach Ladewig (Abbildung 3.15) zeigten sich die Ränder der Leerlochkontrollen scharf begrenzt. Der Defekt selbst war mit einem, von dem umgebenden Knochengewebe deutlich abgegrenzten, faserigen Narbengewebe ausgefüllt. Teilweise fanden sich zentral im Defekt gelegene Fissuren, die sich bis weit in die Tiefe erstreckten. Eine Deckung des Defektareals mit knorpelartigem Ersatzgewebe ließ sich nicht nachweisen. Bei der Verwendung eines Bioimplantates zeigte sich eine Deckung der Defektoberfläche mit einem knorpelartig imponierenden Gewebe. Dieses wies jedoch teilweise eine wellige Oberfläche sowie eine im Vergleich zu dem normalen Knorpel höhere Dicke auf. In ur-

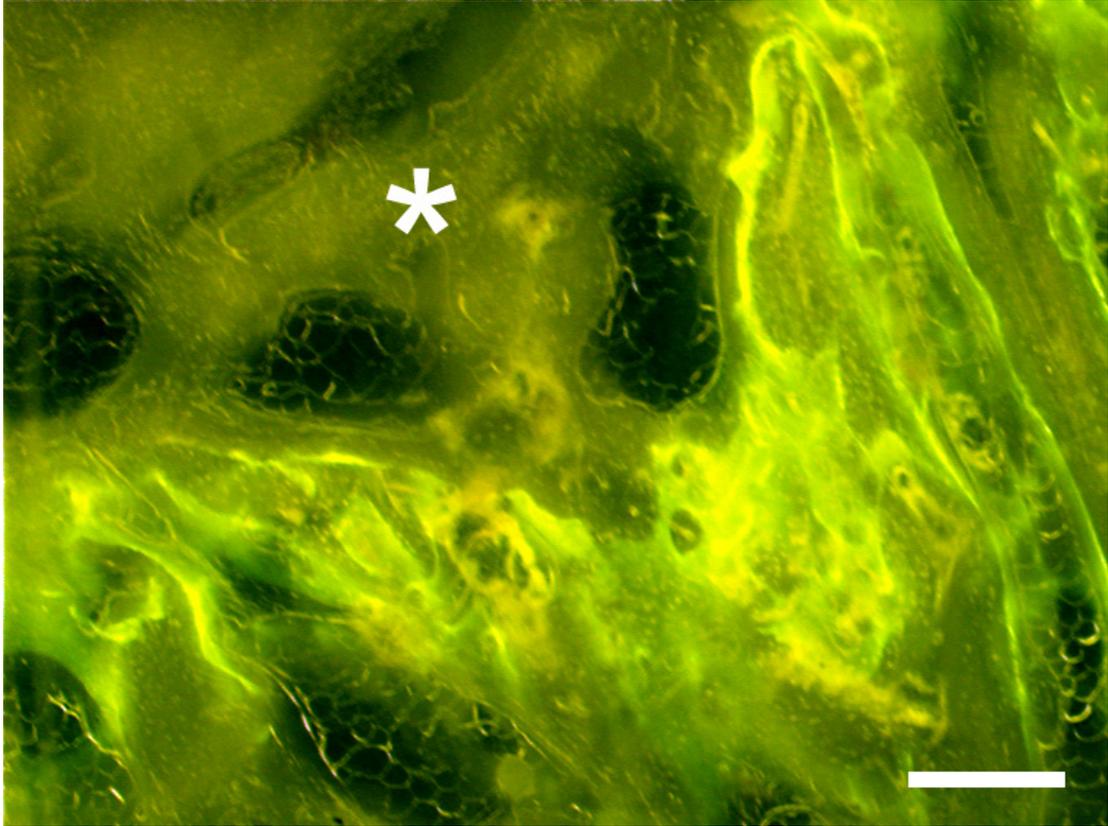


Abbildung 3.13.: Übersichtsaufnahme einer Leerlochkontrolle. Man erkennt eine kräftige zweifarbige Fluoreszenz als Ausdruck einer starken Gewebsproliferation im Bereich der Defektwand. Im Defekt (\*) selbst ist keine auffällige Fluoreszenz zu sehen. Fluoreszenz von Oxytetracyclin und Calcein bei Anregung mit einer Wellenlänge von 450nm – 490 nm. Referenzstrecke 360  $\mu\text{m}$ .

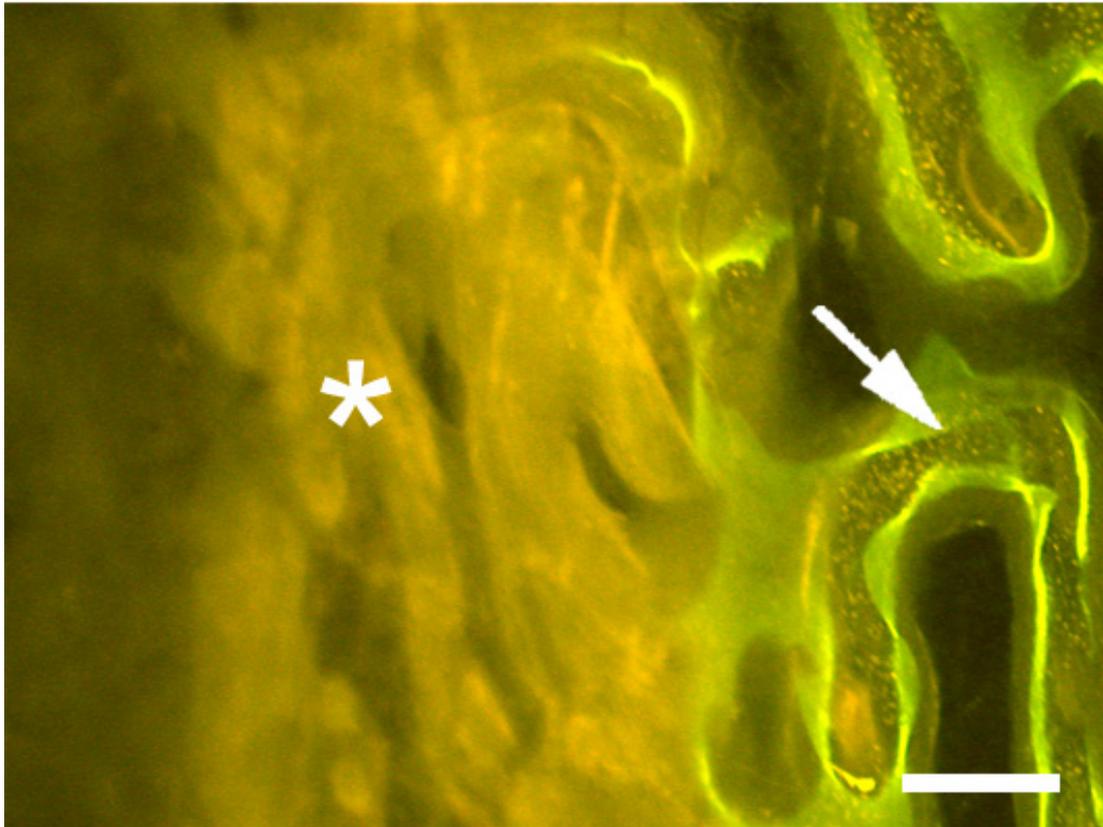


Abbildung 3.14.: Aufnahme aus dem Randbereich eines mit einem Bioimplantat versorgten Defekt. Es zeigt sich eine mäßig intensive Fluoreszenz im Bereich des Implantatlagers (Pfeil). Gleichzeitig ist eine Fluoreszenz im Bereich des Defektes (\*) sichtbar, die ein Einwachsen des Knochengewebes in den Defekt aufzeigt. Fluoreszenz von Oxytetracyclin und Calcein bei Anregung mit einer Wellenlänge von 450nm – 490 nm. Referenzstrecke 180  $\mu$ m.

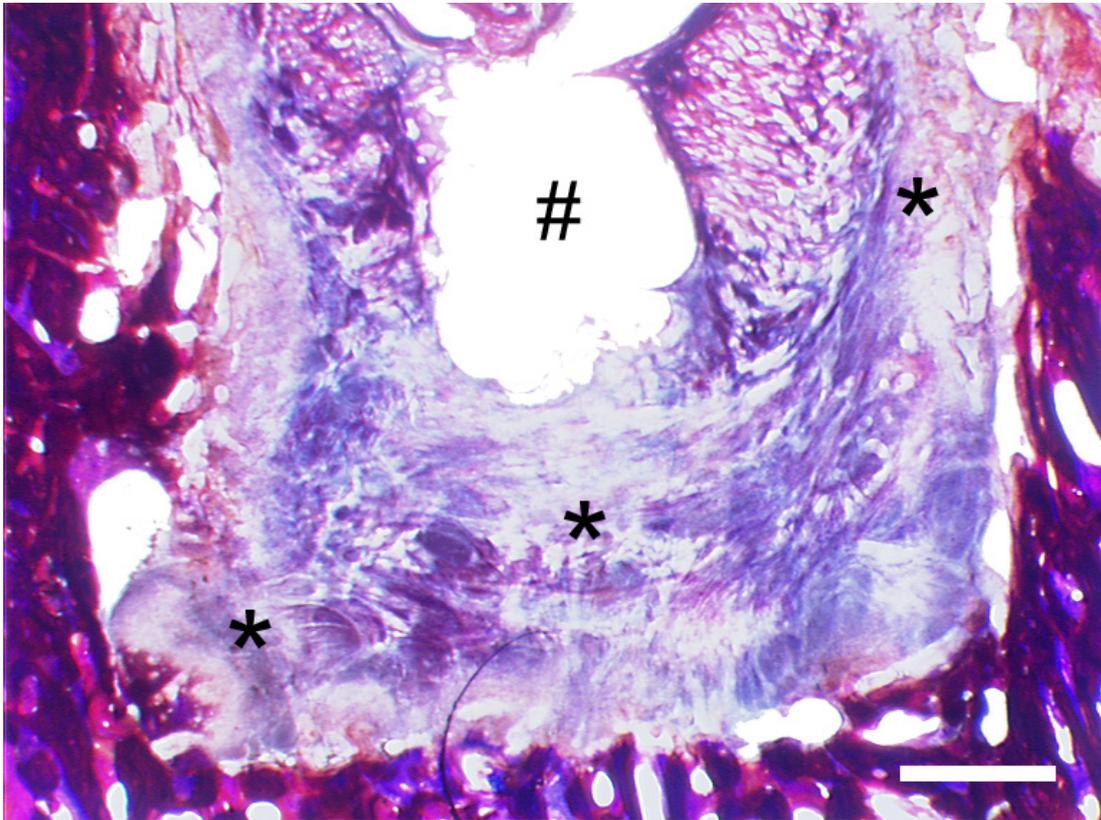


Abbildung 3.15.: Übersichtsaufnahme der tiefen Anteile eines Knochen-Knorpeldefektes bei Färbung nach Ladewig. Im Randbereich findet sich kräftig rot und blau gefärbte Knochensubstanz. Der Defekt ist mit einem nur schwach gefärbten faserigen Narbengewebe (\*) gefüllt. Die Defektränder sind glatt begrenzt, der Knochen zeigt keine Tendenz, in den Defekt einzuwachsen. Zentral befindet sich eine tiefe Fissur (#). Referenzstrecke 1300  $\mu\text{m}$ .

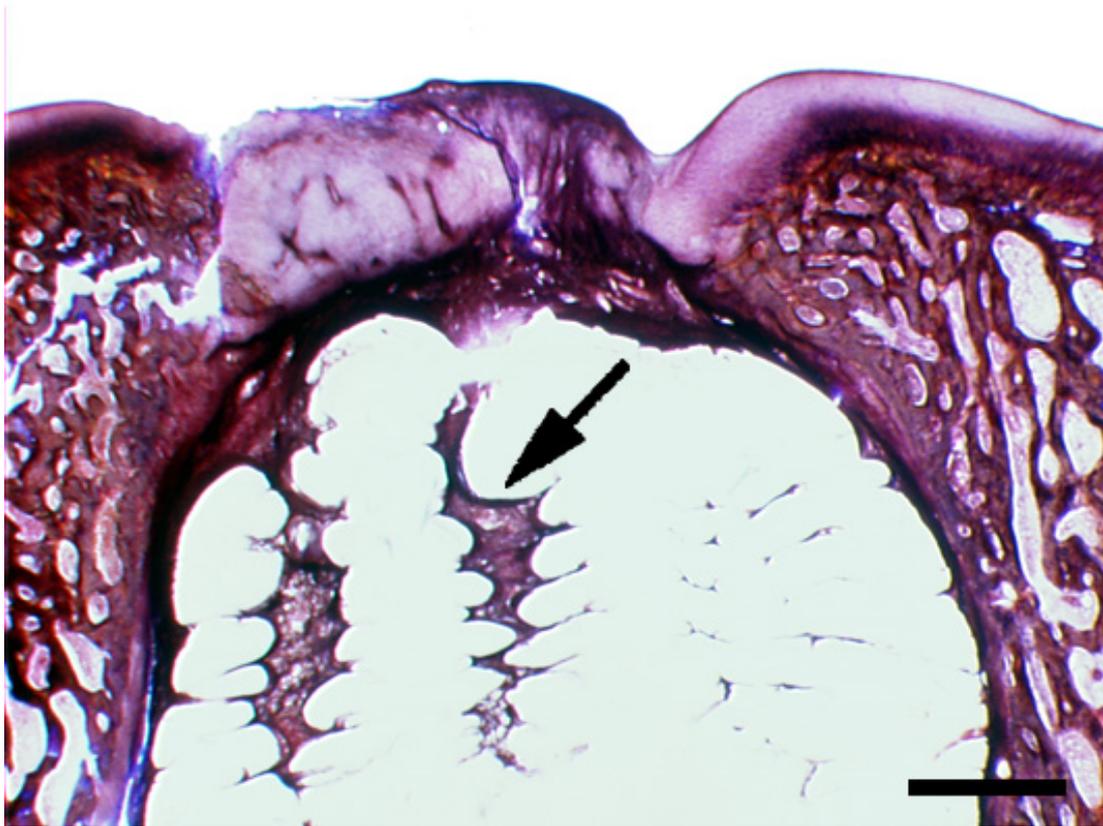


Abbildung 3.16.: Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle nach Versorgung mit einem Bioimplantat bei Färbung nach Ladewig. Vollständiger Verschluss des Defektes durch zwei morphologisch unterschiedliche Gewebe. Die Oberfläche des Defektes wird durch ein knorpelartig imponierendes Gewebe gebildet, welches im Bereich des Defektes dicker als in den angrenzenden Arealen ist. Die Defektoberfläche ist jedoch gewellt. In der Tiefe schliesst sich an dieses Gewebe eine knöcherne Schicht an. Bei dem grossen, zystenartigen Gebiet handelt es sich um den ursprünglich durch das Bioimplantat ausgefüllten Bereich; das Implantat wurde durch die Einbettung in Methylmetacrylat aufgelöst. Es zeigen sich hier Gewebsverbände im Inneren des ehemaligen Implantats (Pfeil). Referenzstrecke 1300  $\mu\text{m}$ .

sprünglich durch das Bioimplantat ausgefüllten Anteilen des Defektes fanden sich Inseln von Gewebe, die in den Hohlräumen des Implantates entstanden sind. (Abbildung 3.16)

## **3.2. Messung der prozentualen Deckung mit Knorpelgewebe**

Vor einer weitergehenden Auswertung wurde die prozentuale Deckung des Defektes mit knorpeligem Gewebe untersucht. Hierzu wurde ein Schnitt mit einer klar erkennbaren Defektgrenze gewählt. Die Messung der Deckung der Defekte mit knorpeligem Gewebe ergab bei den Leerlochkontrollen eine mittlere Deckung von  $23,4\% \pm 15,99$ . Die Bestimmung der Defektdeckung in der Gruppe, die mit einem Bioimplantat versorgt worden war, ergab einen Mittelwert von  $58,65\% \pm 20,34$ . Die Untersuchung auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Dieser Test ergab mit einem p-Wert von  $p=0,025$  eine signifikant bessere Defektdeckung bei der Verwendung von Bioimplantaten im Vergleich zur Leerlochkontrolle.

## **3.3. Beurteilung nach Auswertungsschema**

Die erstellten histologischen Präparate wurden nach dem in Kapitel 2.6 vorgestellten Schema ausgewertet und anschließend zwei verblindeten, mit histologischen Fragestellungen vertrauten, weiteren Auswertern vorgelegt. In Fällen, in denen es zwischen den einzelnen Auswertern zu keiner Übereinstimmung in der Bewertung kam, wurde eine gemeinsame Bewertung durchgeführt. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.1.

Die Beurteilung des Regenerates hinsichtlich der Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-O sowie der vorherrschenden Zellmorphologie zeigte eine stärkere Anfärbbarkeit derjenigen Regenerate, die nach der Implantation eines Bioimplantats entstanden waren. Hier wiesen drei Präparate eine mittlere Anfärbbarkeit auf; in einem Fall ließ sich sogar eine weitgehend normale Farbintensität bei der Färbung mit Safranin-O nachweisen. Zwei Regenerate zeigten lediglich eine schwache Anfärbbarkeit. Bei den Leerlochkontrollen wiesen vier der untersuchten Präparate nur eine schwache Farbreaktion auf. In einem Fall lies sich im Regeneratgewebe keinerlei Färbung mit Safranin-O nachweisen, in einem weiteren Regenerat fand sich eine mittelstarke Anfärbung. Die im Defekt neu entstan-

	Punkte		
	Leerloch	Bio- implantat	max.
Zellmorphologie	1,6	2,1	4
Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-O	1	1,9	3
Gleichmäßigkeit der Oberfläche	0,3	1,3	3
Strukturelle Integrität	0	0,8	2
Dicke	0,3	0,8	2
Verbindung mit angrenzendem Knorpel	0,7	1,8	2
Zellularität	0	0,2	3
Bildung von Chondrozytenclustern	0	0,3	2
Freiheit d. angrenz. Knorpels von deg. Erscheinungen	2,2	1,9	3
<b>Gesamt</b>	<b>6,1</b>	<b>11,1</b>	<b>24</b>

Tabelle 3.1.: Ergebnis der Auswertung der Präparate mittels des Scores nach O’Driscoll. Die angegebenen Zahlen stellen die Mittelwerte der Ergebnisse der einzelnen Präparate im entsprechenden Kriterium dar.

dene Gewebe bestand in beiden Gruppen aus unvollständig differenziertem Mesenchym; in einer Leerlochkontrolle fand sich nur Bindegewebe. Das zweite untersuchte Kriterium stellte die Oberflächenbeschaffenheit des Regeneratgewebes dar. Hier zeigten sich in sämtlichen Leerlochkontrollen entweder Einrisse des Gewebes oder sogar hierüber hinausgehende schwerste Störungen. Solche Veränderungen fanden sich jedoch nur bei drei der sechs Präparate in der mit einem Bioimplantat versorgten Gruppe. In dieser Gruppe fanden sich in zwei Fällen lediglich eine oberflächliche Schichtung des Gewebes, in einem Fall fand sich eine vollkommen glatte und intakte Gelenkoberfläche im ehemaligen Defektareal. Die Untersuchung der strukturellen Integrität des Knorpelersatzgewebes zeigte bei allen Leerlochkontrollen schwere Zerstörungen. Im Gegensatz hierzu fanden sich nach der Versorgung der Defekte mit einem Bioimplantat lediglich in zwei Fällen vergleichbare Störungen. In drei Fällen fanden sich lediglich leichte Störungen wie beispielsweise die Bildung von Zysten im Bereich des neu gebildeten Gewebes. In einem Fall ließen sich keine Auffälligkeiten an der strukturellen Integrität nachweisen. Die Untersuchung der Dicke der entstandenen Knorpelersatzschicht ergab in zwei der untersuchten Kontrollpräparate eine Regeneratdicke von über 50 Prozent des umliegenden Gelenkknorpels, die anderen Defektareale wiesen eine Deckung mit einem Regenerat auf, welches eine Dicke von weniger als der Hälfte des angrenzenden Knorpels erreichte. In keinem Fall wurde der Defekt vollständig aufgefüllt. Nach der Implantation eines Bioimplantates konnte in einem Fall eine vollständige Ausfüllung des Defektes auf das ursprüngliche Niveau erzielt werden, in drei weiteren Fällen kam es zu einer Regeneratdicke vom mehr als 50

Prozent. In zwei Fällen wurde nur eine Gewebsdicke von weniger als 50 Prozent der angestrebten Dicke erreicht. Die Untersuchung der Anbindung des entstandenen Regenerates an den angrenzenden Knorpel ergab in der Gruppe der Kontrollen in keinem Fall eine vollständige Integration zu den angrenzenden Knorpelgeweben. In fünf der untersuchten Defekte fand sich eine lediglich partielle Anbindung, wobei das Knorpelersatzgewebe am Übergang zum umliegenden Knorpel in der Regel auf beiden Seiten tiefe Fissuren aufwies, sich in der Tiefe jedoch ein Gewebkontakt nachweisen lies. In einem Fall fand sich auch in der Tiefe des Defektes keine Verbindung des Regenerates mit dem angrenzenden hyalinen Knorpel. In der Gruppe der Tiere, die ein Bioimplantat erhalten hatten, fand sich in jedem Fall eine Verbindung zwischen der neu gebildeten Knorpelersatzschicht und dem umliegenden Gelenkknorpel. In vier Fällen erschien das Regenerat gut mit dem angrenzenden Knorpel verbunden, in zwei Fällen zeigte sich jedoch nur eine unvollkommene Anbindung.

Bei der Untersuchung der zellulären Degenerationszeichen innerhalb des Regenerates wiesen sämtliche Präparate der Kontrollgruppe eine Hyperzellularität im Vergleich zu normalem Knorpel auf. Knorpelzellen waren in keinem Fall abgrenzbar, so dass in dem Kriterium der Clusterbildung die schlechtest mögliche Einstufung gewählt wurde. Bei der Verwendung der Bioimplantate zeigte sich in fünf untersuchten Proben eine erhöhte Zellzahl oder eine schwere Hypozellularität. In einem Fall konnte eine mittelschwere Verminderung der Zellzahl nachgewiesen werden. Eine Abschätzung der in Clustern liegenden Chondrozytenzahl ergab in zwei Fällen einen Anteil von weniger 25 Prozent, in allen weiteren Präparaten fanden sich mehr als ein Viertel der Knorpelzellen in Clustern. In der Kontrollgruppe zeigten sich im an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpel in fünf Fällen lediglich eine leichte Bildung von Chondrozytenclustern oder eine leicht reduzierte Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix mit Safranin-O. Ein Präparat zeigte eine weitergehende Reduzierung der Farbtintensität von Safranin-O.

Der an die Bioimplantate angrenzende Knorpel wies in zwei der untersuchten Proben keine morphologischen Auffälligkeiten auf. In vier Fällen zeigte sich allerdings eine leichte Ausbildung von Clustern aus Chondrozyten oder ein leichter Rückgang der Färbung mit Safranin-O.

Bei der Untersuchung der vorgeschlagenen zusätzlichen Kriterien (Tabelle 3.2) fand sich in fünf Präparaten der Leerlochgruppe Kollagen I im gesamten Regenerat; lediglich in einem Fall gab es Bereiche, in denen sich kein Kollagen I nachweisen lies. Bei der Verwendung der Bioimplantate markierte das Regenerat in drei Fällen in Teilen

	Punkte		
	Leerloch	Bio- implantat	max.
Anwesenheit von Kollagen I	0,2	0,5	2
Anwesenheit von Kollagen II	1	1,2	2
Anwesenheit von Aggrecan	1,4	1	2
Blutgefäße im Regenerat	0,5	0,7	2
Metachromasie bei Toluidinblau	1	1,3	2
<b>Gesamt</b>	<b>4,1</b>	<b>4,7</b>	<b>10</b>

Tabelle 3.2.: Ergebnis der Auswertung nach der vorgeschlagenen Erweiterung zum Score nach O'Driscoll. Die angegebenen Zahlen stellen die Mittelwerte der Ergebnisse der einzelnen Präparate im entsprechenden Kriterium dar.

positiv für Kollagen I, in den restlichen fand sich Kollagen I im gesamten Regenerat. In einem Fall der Kontrollgruppe fand sich Kollagen II in allen Bereichen des Knorpelersatzgewebes. In vier Fällen gab es zumindest Bereiche, die für Kollagen II positiv markierten. In einem weiteren Fall markierte das neu gebildete Gewebe nicht für Kollagen II. Nach der Implantation eines Bioimplantats ließ sich in allen Bereichen von zwei Präparaten Kollagen II nachweisen, in drei Fällen fand es sich lediglich in Teilbereichen. In einem Fall markierte das Regenerat nicht für Kollagen II. Der immunhistologische Nachweis von Aggrecan ergab in drei Fällen in der Kontrollgruppe eine positive Markierung des gesamten Regenerates. In den weiteren drei Proben fand sich Aggrecan in Teilen des neu entstandenen Gewebes. In der Bioimplantatgruppe ließ sich nur in einem Fall Aggrecan im ganzen Regenerat nachweisen, in weiteren vier Fällen fanden sich auch Aggrecan-freie Areale. In einem Fall zeigte sich kein Aggrecan im Defektbereich. Bei der Untersuchung des Regenerates auf vorhandene Blutgefäße fanden sich in der Gruppe der Leerlochkontrollen in jeweils drei Präparaten Gefäße mit beziehungsweise ohne Kontakt zur Gelenkoberfläche. Bei der Verwendung von Bioimplantaten fanden sich in vier Fällen Gefäße im Bereich der Knorpelschicht jedoch ohne Kontakt zur Oberfläche. In zwei Fällen ergab sich jedoch eine solche Verbindung. Die Beurteilung der Metachromasie der Knorpelersatzschicht des Regeneratgewebes bei der Färbung mit Toluidinblau ergab bei einem Präparat der Kontrollgruppe eine normale Metachromasie des neu gebildeten Knorpels. In vier Fällen fanden sich Areale ohne Metachromasie neben solchen, in denen eine Metachromasie beobachtet werden konnte. In einem Präparat konnte keine metachromatische Farbreaktion nachgewiesen werden. Bei zwei der histologischen Präparaten der Bioimplantatgruppe fand sich eine Metachromasie des gesamten Knorpelgewebes. Eine teilweise Metachromasie des neu gebildeten Regenerates zeigte sich in

drei der untersuchten Gewebsschnitte. In einem Fall trat keine Metachromasie im Bereich des Knorpelregenerates auf.

Für jedes untersuchte Präparat wurde gemäß der Punkteverteilung des Auswertungsschemas ein Punktwert berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse beider Versuchsgruppen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Bei allen durchgeführten Vergleichen fand der Mann-Whitney U-Test Verwendung. Dieser Test wurde gewählt, da es sich bei den zu vergleichenden Ergebnissen um Rangwerte, wie sie bei der Verwendung von festen Bewertungsschemata entstehen, handelte und sich die Verteilungen der Ergebnisse darüber hinaus asymmetrisch darstellten. Das Vorgehen während der Auswertung sowie die Verwendung des U-Tests wurden mit einem Statistiker abgesprochen. In einem ersten Schritt wurde das Ergebnis bei der Bewertung nach dem unveränderten Score nach O'Driscoll untersucht. Hier ergab sich für die Gruppe der Leerlochkontrollen ein mittlerer Punktwert von  $6,00 \pm 1,41$ , also ein Wert im unteren Drittel der möglichen Bewertungen. In der mit einem Bioimplantat versorgten Gruppe errechnete sich mit einem Mittelwert von  $11,33 \pm 3,56$  ein Ergebnis, welches knapp der Hälfte der maximalen Punktzahl des Scores entspricht. Der U-Test ergab hier einen p-Wert von  $p=0,020$  und somit einen statistisch signifikanten Unterschied in der Beurteilung beider Gruppen durch den Score nach O'Driscoll. Bei einer alleinigen Betrachtung der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Erweiterung des Schemas nach O'Driscoll ergab sich bei den Leerlochkontrollen ein mittlerer Score von  $4,17 \pm 1,17$  und bei der Verwendung der Bioimplantate eine mittlere Bewertung von  $4,50 \pm 2,07$ . Der U-Test zeigte hier mit einem p-Wert von  $p=0,688$  keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen auf. Bei der Kombination der Ergebnisse des Scores nach O'Driscoll mit denen der hier vorgeschlagenen Erweiterung, so errechnete sich für die Leerlochkontrollen ein Mittelwert von  $10,17 \pm 1,72$  und für die mit einem Bioimplantat versorgte Gruppe von  $15,83 \pm 5,57$ . Der durchgeführte U-Test konnte mit einem p-Wert von  $p=0,128$  keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mehr feststellen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Das Implantat

Die bislang verwendeten Verfahren zur Behandlung von Defekten des Gelenkknorpels lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe basiert auf der Entnahme von Knorpel an einer Stelle des Gelenkes und die Verpflanzung des entnommenen Gewebes in den Defekt entweder sofort (OATS) oder nach einer Vermehrung der enthaltenen Chondrozyten in Kultur (ACT). Bei beiden Methoden bleibt jedoch ein Defekt an der Entnahmestelle zurück. Die ACT weist darüber hinaus noch ein weiteres, verfahrensspezifisches Problem auf - die Dedifferenzierung der gewonnenen Chondrozyten in der Zellkultur. Die andere Gruppe beruht auf einer Eröffnung des subchondral gelegenen Markraumes des spongösen Knochens, um ein Einwandern mesenchymaler Stammzellen in das verletzte Areal zu ermöglichen. Diese Stammzellen sollen sich in dem Defekt ansiedeln, dort zu Knorpelzellen differenzieren und zu einer Deckung des Defektes mit Knorpelgewebe führen. Eine Schwierigkeit dieses Ansatzes stellt jedoch die Verankerung der Stammzellen im Defekt dar. Beiden Gruppen gemein ist noch ein weiteres Problem. So ist bei keinem der genannten Verfahren eine unmittelbare postoperative Vollbelastung der operierten Extremität möglich, je nach angewandtem Verfahren ist eine längere Zeit der Entlastung mit anschließender Teilbelastung notwendig. In dieser Zeit hat die Differenzierung der eingewanderten Stammzellen beziehungsweise die Redifferenzierung der implantierten Chondrozyten bereits eingesetzt, ohne dass die Zellen den für ein Gelenk normalen Belastungen ausgesetzt waren. Geht man von der Richtigkeit der Theorie der "kausalen Histogenese" aus, so benötigen die Zellen jedoch die normalerweise im Gelenk herrschenden Bedingungen zur Differenzierung hin zu Chondrozyten sowie zur Ausbildung eines hyalinen Knorpels; es muss also idealerweise unmittelbar postoperativ eine Vollbelastung möglich sein.

Um eine Verschleppung der eingewanderten Stammzellen aus dem Defekt zu verhindern, erscheint es sinnvoll, eine Struktur anzubieten, die es den Zellen erlaubt, sich im

Defekt zu verankern. Nach der Theorie der "kausalen Histogenese" müssen mesenchymale Stammzellen jedoch intermittierenden Druckbelastungen ausgesetzt sein, um sich zu Chondrozyten zu differenzieren. Das Implantat muss also auch dafür sorgen, dass die durch die Benutzung des Gelenkes auftretenden intermittierenden Druckbelastungen an die eingewanderten Zellen weitergegeben werden. Dies hat unmittelbare Auswirkungen auf die mechanischen Anforderungen, die an das Implantat gestellt werden. Zum einen muss das Material so stabil sein, dass eine Vollbelastung nach der Operation möglich ist, damit die eingewanderten Zellen von Anfang an die physikalischen Stimuli erfahren, die sie zu einer Differenzierung zu Chondrozyten veranlasst. Zum anderen darf die Elastizität nicht zu gering sein, da es sonst durch das Implantat zu unphysiologischen Druckspitzen kommen kann, die ihrerseits das umliegende Gewebe schädigen und somit die Reparatur beeinträchtigen können.

Weiterhin darf das Implantat aber auch keine Entzündungsreaktion im Gelenk auslösen oder die Ausbildung der für hyalinen Knorpel typischen arkadenförmigen Faserarchitektur behindern. Während eine Vielzahl unterschiedlichster Werkstoffe - angefangen bei Titanlegierungen über verschiedene Kunststoffe und Korallenteile bis hin zu Kollagenen - das Kriterium der Biokompatibilität ausweisen, ist die Erfüllung des zweiten Punktes schwieriger zu erreichen. Da die Kollagenfasern erst im Laufe der Reparatur gebildet werden und darüber hinaus auch sehr dicht gepackt sind, muss das Implantatmaterial nach Abschluss der Heilung wieder entfernt werden. Ein weiterer Punkt, der für die Entfernung des Implantatmaterials spricht, besteht in der möglichen Förderung einer Arthrose durch den im Gelenk befindlichen Fremdkörper. Da aber das Regeneratgewebe in das Implantat eingewachsen ist, und eine Entfernung somit das neu entstandene Gewebe zerstören würde, bleibt die Verwendung resorbierbarer Werkstoffe einzig möglicher Ausweg.

Auf Grund der unterschiedlichen Anforderungen, die an die Knorpel- und die Knochenersatzschicht gestellt werden, ist ein zweischichtiger Aufbau des Implantates sinnvoll. Die Knorpelersatzschicht dient wegen der insgesamt nur geringen Dicke hauptsächlich als Platzhalter für das entstehende Regenerat. Das Elastizitätsmodul (E-Modul) sollte unter dem des gesunden Knorpels liegen. Hier wurde ein Vlies aus einem Gemisch von Polyglactin und Polydioxanon (Ethisorb 201, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Dieses Material wird innerhalb von sechs bis zwölf Wochen hydrolytisch ohne wesentliche Gewebsirritationen abgebaut. [41] Die von der Knochenersatzschicht geforderten

Eigenschaften unterscheiden sich hiervon. Da die Entwicklung von Knochengewebe einen längeren Zeitraum beansprucht, ist auch die Unterstützung durch des Implantat über einen längeren Zeitraum notwendig. Weiterhin muss der Werkstoff über eine ausreichende Festigkeit verfügen und reaktionsarm abgebaut werden können. Die Wahl fiel auf Polylactid als Werkstoff. Polylactid ist ein Polymer aus Milchsäureestern, das hydrolytisch in einzelne Milchsäuremoleküle aufgespalten wird. Milchsäure selbst entsteht im Rahmen der Glykolyse in sämtlichen Zellen des Körpers und kann vom Körper weiterverarbeitet werden. Weiterhin ist es möglich, die mechanischen Eigenschaften sowie die Abbaugeschwindigkeit durch die Zugabe weiterer Substanzen zu beeinflussen. [42] Auf eine solche Modifikation wird hier jedoch verzichtet. Das E-Modul der verwendeten Knochenersatzschicht liegt leicht unter dem des umliegenden Knochens. Hierdurch wird auf das eingewachsene Gewebe ein Reiz ausgeübt, sich zu Knochengewebe zu differenzieren. Die Resorptionszeit des verwendeten Materials spielt hier keine Rolle, da so lange Knochengewebe gebildet wird, bis die gleiche Festigkeit wie im angrenzenden Knochen erreicht ist. Bei einem Abbau des Implantats wird daher zusätzlich Knochen gebildet, bis wieder ein Gleichgewicht erreicht ist. Weiterhin wird Polylactid eine osteogene Potenz zugesprochen [18], was ebenfalls für eine Verwendung als Knochenersatzschicht spricht.

Zur Herstellung der Implantate wurde aus Poly-D,L-Lactid mit Hilfe des Multiphasejet-solidification-Verfahrens ein Würfel hergestellt; eine Herstellung in Zylinderform ist mit diesem Verfahren bisher nicht möglich. Aus diesen Würfeln wurde anschließend der Zylinder herausgearbeitet, der als Knochenersatzschicht fungiert. Bei dem Heraustrennen mit Hilfe spanender Verfahren kam es jedoch temperaturbedingt zu einer plastischen Verformung des Materials, was zu einer deutlichen Reduzierung der Offenporigkeit des Implantates führte. Der Versuch, dieses Anschmelzen durch eine Kühlung mit Druckluft zu verhindern scheiterte jedoch. Ein Versuch mit einer Wasserkühlung die Verformung zu verhindern wurde wegen der hierbei zu erwartenden Degradation des Resomers nicht durchgeführt. Bei der anschließenden Plasmasterilisation kam es bei Temperaturen um 45°C zu einer weiteren Verformung des Implantates, wodurch sich die Geometrie und auch die Offenporigkeit veränderten. Gerade die Offenporigkeit ist jedoch für die Funktion des Implantates entscheidend, erlaubt sie doch ein Einwandern mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark in den Defekt. Bei einem Versuch mit ähnlich gestalteten Implantaten am Kaninchen konnten beispielsweise einzelne hyalinartige Knorpelinseln in der Knorpelersatzschicht bei gleichzeitigem Einwachsen von Knochen in die Knochenersatzschicht beobachtet werden. Bei einem Teil der Implantate wurde bei ansonsten

unverändertem Aufbau eine geschlossene Trennschicht zwischen die Knorpel- und die Knochenersatzschicht eingebracht. In diesen Fällen zeigte sich zwar weiterhin eine gute knöcherne Durchbauung der Knochenersatzschicht, eine Regeneration des Knorpels blieb jedoch vollständig aus. [32] Diese Beobachtung wird durch andere Arbeiten bestätigt. [37]

## 4.2. Das Tiermodell

Die Versuche der vorliegenden Studie wurden an weiblichen Merinoschafen mit einem Altern von mindestens anderthalb Jahren durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt gelten die Tiere bereits als ausgewachsen. Diese Beschränkung war notwendig, da das Regenerationspotential von nicht ausgewachsenen Tieren als höher angesehen wird als das von adulten Tieren.

Das noch in den Vorversuchen [32] verwendete Kaninchenmodell wurde hierzu verlassen. Für diesen Wechsel sprechen verschiedene Gründe. Der erste Grund liegt in der Dicke des gesunden Gelenkknorpels. Im Bereich des hier untersuchten Kniegelenks weist das Kaninchen eine Knorpeldicke im Bereich von 500µm auf. Beim Schaf findet sich an dieser Stelle eine Dicke von circa einem Millimeter. Auch wenn das immer noch einen deutlicher Unterschied im Vergleich zu den durchschnittlich drei Millimetern beim Menschen darstellt, ist dies eine Annäherung an die Verhältnisse beim Menschen. Aus der Knorpeldicke folgt ein wichtiger operationstechnischer Punkt. Hierbei handelt es sich um die für den Erfolg der Operation erforderliche schichtgenaue Platzierung des Bioimplantates. So ist es bei der deutlich geringeren Knorpeldicke des Kaninchens extrem schwierig, das Implantat so einzusetzen, dass sich ein glatter Übergang zum angrenzenden Knorpel ergibt, während ein solcher Übergang auf Grund der höheren Dicke des Knorpels beim Schaf deutlich einfacher herzustellen ist. Der entscheidende Grund für den Wechsel des Tiermodells liegt jedoch in der Art und Weise, in welcher der Gelenkknorpel auf erlittene Verletzungen reagiert. So konnte gezeigt werden, dass der Gelenkknorpel des Kaninchens zu erstaunlichen Regenerationsleistungen in der Lage ist, so lange der subchondrale Knochen nicht verletzt wurde. [34] Hierin unterscheidet er sich stark von menschlichem Knorpel, der rein chondrale Defekte nur schlecht toleriert. Gleichzeitig reagiert der Gelenkknorpel des Kaninchens sehr empfindlich auf eine Eröffnung des Markraumes; hier kommt es lediglich zu einem unbefriedigenden Regenerationsversuch des Knorpels. Eine Eröffnung des Markraumes führt jedoch beim Menschen zu einer deutlichen Verbesserung des Ergebnisses. Vergleichende tierexperimentelle Studien konnten belegen, dass

der hyaline Knorpel des Schafes in diesem Punkt ein mit dem Menschen vergleichbares Verhalten an den Tag legt. [34]

Im Bereich der Knorpelforschung findet eine weite Spanne verschiedener Tiermodelle Verwendung, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Gruppen leider beeinträchtigt. So finden sich beispielsweise Untersuchungen an Kaninchen [17, 39], Hunden [7], Schweinen [28], Ziegen [35] oder auch Pferden [12]. Während das Regenerationsverhalten von Kaninchen, Ziegen und Schafen im Vergleich zum Menschen gut dokumentiert ist, ist dies bei den anderen genannten Modellen nicht der Fall. Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Hunden oder Pferden spricht, liegt im Versuch selbst begründet. So ist der Aufwand für die Operation eines Pferdes um ein Vielfaches höher als beim Schaf; auch wenn man beim Pferd sicher eine mit dem Menschen durchaus vergleichbare Knorpeldicke finden sollte. Gegen das Hundemodell spricht das Verhalten der Tiere nach einer erlittenen Verletzung. So schonen Hunde eine verletzte Extremität unabhängig von der aktuellen Schmerzsituation, während Schafe das operierte Bein unter ausreichender Analgesie sofort voll belasten. Da in dem hier untersuchten Fall jedoch die sofortige postoperative Belastung nicht nur erlaubt, sondern sogar erforderlich war, konnte dieses Modell hier ebenfalls keine Anwendung finden. Die grundsätzliche Problematik der Verwendung des Kaninchens als Modell für die Reperaturleistung des menschlichen Gelenkknorpels wurde oben bereits dargestellt.

Die angeführten Probleme führten schließlich zu einem Wechsel des Tiermodells vom Kaninchen hin zu dem besser geeigneten Schaf.

### **4.3. Das Auswertungsschema**

Ein grundsätzliches Problem bei der Beurteilung einer Gewebsregeneration im Bereich des Knorpels liegt in der Reproduzierbarkeit der Bewertung. Hier 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 und die auch für eine gewisse Konstanz der Ergebnisse bei verschiedenen Bewertern sorgen. Ein Nachteil der Verwendung semiquantitativer Scores besteht in der Ungenauigkeit, die entsteht, wenn biologische Zustände durch ein starres System beschrieben werden. Die meist eng begrenzte Anzahl möglicher Abstufungen führt zu einer Unschärfe in der Bewertung, da Fälle, die ein

bestimmtes Kriterium gerade noch erfüllen, nicht mehr von Befunden unterschieden werden können, die die nächstbessere Bewertung lediglich knapp nicht mehr erreicht haben. Diesen Schwierigkeiten zum Trotz hat sich die Verwendung solcher definierter Kataloge zur Beurteilung verschiedener biologischer Sachverhalte in der Medizin und auch in der Forschung durchgesetzt. In der aktuellen Literatur finden sich daher zahlreiche Auswertungsschemata zur Beurteilung der Knorpelregeneration bei Menschen und Tieren. Erstere stützen sich in ihrer Beurteilung zum größten Teil auf makroskopische Beurteilungen des Knorpels hinsichtlich Farbe und Oberflächenstruktur sowie häufig ungenaue mechanische Untersuchungen und nur in seltensten Fällen auf ergänzende Histologien, während letztere überwiegend auf mikroskopische Untersuchungen an entnommenen Gelenken basieren. So existiert beispielsweise das Beurteilungsschema von Pineda [40]. Dieses Schema untersucht vier verschiedene Kriterien um eine Aussage über die Güte des Regeneratgewebes zu erhalten. Das erste Kriterium besteht in dem Ausmaß der Regeneration, wobei eine Gewebsbildung über die ursprüngliche Kondylenkontur negativ bewertet wird. Weitere Punkte stellen die Wiederherstellung der osteochondralen Grenze, die Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix mit Safranin-O sowie die Morphologie der Zellen im Regenerat dar. Von diesem Score abgeleitet ist das Schema nach Wakitani [54], der anstatt der osteochondralen Grenze den Grad der Integration des Regenerats mit dem umliegenden Knorpel bewertet und auf diesem Weg zu etwas abweichenden Ergebnissen führt. Dieser Score wird beispielsweise von Perka verwendet. [39] Umfassender ist der auch hier verwendete Score nach O'Driscoll [36], der ein breiteres Spektrum verschiedener Kriterien überprüft. So berücksichtigt dieser Score neben den rein morphologischen Kriterien des Regeneratgewebes auch Zeichen der Degeneration im defektfüllenden Gewebe und im angrenzenden, primär nicht geschädigten Knorpel. Der Score nach O'Driscoll berücksichtigt allerdings eine überschüssige Defektfüllung nicht. Eine neuere Abwandlung dieses Scores ist diejenige, die von Niederauer zur Beurteilung der Knorpelreparatur benutzt wird. [35] Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Verfahren werden hier auch Gewebserscheinungen wie eine Hyperzellularität gewertet, die im ursprünglichen Score nicht beschrieben sind. Ein Punkt ist jedoch allen genannten Beurteilungshilfen gemeinsam: es ist in keiner Quelle festgelegt, an welcher Stelle die Beurteilung vorgenommen werden soll. Abhängig davon, ob der Erfolg der Reparaturbemühungen des Organismus am Rand oder im Zentrum des gesetzten Defektes gewertet wird, können sich völlig unterschiedliche Ergebnisse ergeben. So findet sich am Defektrand oft ein besseres Ergebnis als in den zentralen Defektanteilen.

In dieser Arbeit fiel die Wahl auf den Score nach O'Driscoll. Für diese Entscheidung sprechen verschiedene Punkte. Zunächst bietet die Gruppierung der verschiedenen Kriterien die Möglichkeit, auch Aussagen über Teilaspekte der Regeneration zu treffen. Weiterhin trifft dieser Score auch eine Aussage über den Zustand des angrenzenden Knorpels, was die anderen oben angeführten Schemata nicht bieten. Schließlich besteht durch die große Anzahl an Kriterien innerhalb des Scores eine gewisse Widerstandsfähigkeit des Ergebnisses gegenüber einem Wechsel der Auswerter; insbesondere bei Auswertern, die mit dem Schema keine große Erfahrung haben. [33]

Obwohl der Score nach O'Driscoll eine umfangreiche Beurteilung des Regenerats erlaubt, wurde der Versuch gemacht, diesen Score durch weitere Bewertungskriterien zu erweitern, um so eine bessere Trennschärfe zwischen einem guten und einem schlechten Regenerat zu erreichen. Diese Kriterien umfassen die wesentlichen strukturellen Bestandteile des Knorpels wie Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan. So ist Kollagen I ein wesentlicher Bestandteil von Faserknorpel, findet sich jedoch auch in degenerierendem hyalinem Knorpel. Seine Anwesenheit ist also ungünstig zu bewerten, während seine Abwesenheit auf eine weitgehend physiologische Synthese der extrazellulären Matrix hinweist. Kollagen II hingegen ist nahezu ausschließlich in hyalinem Knorpel zu finden, seine Anwesenheit signalisiert also ein Gewebe, welches dem normalen Gelenkknorpel sehr nahe steht. Aggrecan hingegen ist ein großes Bindemolekül, das generell in Knorpel vorkommt und somit ein wichtiges immunhistologisches Unterscheidungsmerkmal zwischen knorpeligem Gewebe und gewöhnlichem Bindegewebe bietet. Ein weiterer Zusatzpunkt stellt die Anwesenheit von Blutgefäßen in der auf Knorpelzebene neugebildeten Gewebsschicht dar. Da gesunder Gelenkknorpel in keinem Fall Gefäße enthält, muss ihre Anwesenheit als Zeichen für pathologische, in der Regel resorptive Vorgänge gelten. Auf der anderen Seite finden sich in Granulationsgewebe zahlreiche neugebildete Gefäße, in deren Umgebung es zu einer Bindegewebsproliferation kommt. Die Anwesenheit von Blutgefäßen ist also ein Indikator für unerwünschtes Granulations- beziehungsweise Pannusgewebe und resorptive Vorgänge im Bereich des Gelenkknorpels und muss auch als solcher Eingang in die Bewertung des Regenerats finden. Als letztes Kriterium wurde das metachromatische Verhalten des Neoknorpels bei Färbung mit Toluidinblau eingeführt. Dieses Verhalten ist, wie das Färbeverhalten bei Safranin-O, abhängig von der Menge saurer GAG im gefärbten Gewebe. Doch während der Farbumschlag bei Safranin-O sich über eine breitere Spanne vollzieht, findet der Umschlag bei Toluidinblau sehr abrupt statt. Durch die Untersuchung der metachromatischen Farbreaktion bei Toluidinblau

lässt sich daher eine schärfere Trennung zwischen Geweben mit einem hohen Anteil an sauren GAG und solchen mit einem lediglich mittleren Anteil erreichen.

## 4.4. Das Defektmodell

In dieser Arbeit wurden osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von acht und einer Tiefe von zehn Millimetern untersucht. Durch zwei Defekte dieser Größe wird ein wesentlicher Teil der Kondyle zerstört, wobei während der Operation darauf geachtet wurde, dass um die gesetzten Defekte stets eine Knorpelzone erhalten blieb. Mit dieser Defektgröße wurde bewusst der obere Rand der vergleichbaren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gewählt (3 mm [35], 4 mm [7], 8 mm [28], 9 mm [12]). Der große Defektradius wurde auch gewählt, da es Untersuchungen gibt, die kleineren Defekten eine deutlich bessere Heilungstendenz zuschreiben. [12]

## 4.5. Die Ergebnisse

Die Verwendung der Bioimplantate führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Deckung mit knorpelartigem Gewebe von 59% gegenüber den Leerlochkontrollen mit 23%. Weiterhin zeigte sich eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Verbesserung im modifizierten Score nach O'Driscoll von 10,2 auf 15,8 Punkten durch den Einsatz der Bioimplantate. Bei der alleinigen Verwendung des Originalscores nach O'Driscoll zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied (6 gegenüber 11 Punkten). Es erscheint also möglich, dass der Score durch die vorgeschlagene Erweiterung noch genauere Aussagen bezüglich der Qualität des Regenerates machen kann. Es muss jedoch nochmals darauf hingewiesen werden, dass für den Score immer das schlechteste Gewebe in einem zentral im Defekt gelegenen Schnitt beurteilt wurde. Da in den verschiedenen Arbeiten anderer Gruppen hierzu keine genaue Aussage zu finden ist, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht ohne weiteres möglich. Auch O'Driscoll macht keine näheren Angaben, wo die Bewertung mit seinem Score durchzuführen ist. Den von ihm entwickelten Score stellte er erstmals in einer Arbeit über die Wirkung von "continuous passive motion" (CPM) im Vergleich zu aktiver Bewegung beziehungsweise Immobilisation auf die Regeneration osteochondraler Defekte vor. Im Rahmen der Untersuchung wurden Defekte mit einem Durchmesser von fünf Millimetern im Bereich des patellaren Gleitlagers von Kaninchen gesetzt, die anschließend mit einem Periosttransplantat versorgt wurden. [36] Zwar beschreibt der Autor, dass der Score anhand von zehn bis zwanzig

histologischen Schnitten pro gesetztem Defekt gebildet wurde, er gibt jedoch nicht an, welcher Gewebeanteil des als inhomogen beschriebenen Regenerates beurteilt wurde. Die in dieser Untersuchung erzielten Anteile an Knorpelgewebe lagen je nach Methode zwischen 45% und 77% bei einer Spannweite von 19 bis 11,2 Punkten im dort vorgestellten Score. Die erzielten prozentualen Deckungen mit Knorpelgewebe liegen also im Bereich der hier am Schaf durchgeführten Untersuchungen, während die erzielten Scorewerte höher sind. Leider wurde von O'Driscoll keine Leerlochkontrolle durchgeführt, was die Vergleichbarkeit mit anderen Studien vereinfacht hätte. Man muss jedoch die bessere Knorpelheilung beim Kaninchen im Vergleich zum Schaf bei der Betrachtung der verschiedenen Ergebnisse mit berücksichtigen; bessere Ergebnisse beim Kaninchen sind also auf Grund des Tiermodells zu erwarten.

Einen Therapieansatz, der mit dem hier vorgestellten vergleichbarer ist, verfolgte auch Niederauer. [35] In ihrer Untersuchung führten sie einen Vergleich verschiedener resorbierbarer Implantate durch. Die verwendeten Implantate bestanden aus einer Mischung aus Polylactid und Polyglycolsäure, der für die Knochenersatzschicht entweder 50% Calciumsulfat oder 20% Bioglas oder 20% zerkleinerte Polyglycolsäurefasern zugefügt wurden. Die Knorpelersatzschicht bestand aus Polylactid und Polyglycolsäure sowie 10% Polyglycolsäurefasern. Die so entstandenen Implantate wurden in künstlich angelegte Defekte im Bereich der patellaren Gleitrinne oder des medialen Kondylus mit einem Durchmesser von 2,8 Millimetern und einer Tiefe von vier Millimetern in "press-fit"-Technik eingebracht. Bei der Hälfte der Implantate erfolgte zuvor eine Beladung mit autologen Chondrozyten. Die Vollbelastung wurde unmittelbar postoperativ zugelassen; die Gelenke wurden nach sechzehn Wochen entnommen und unmittelbar nach der Entnahme durch Eindrücken mittels eines Handmessgerätes auf die Elastizität des Knorpels hin getestet. Die histologische Auswertung erfolgte über einen semiquantitativen Score, der dem Score nach O'Driscoll vergleichbar ist; der maximal erreichbare Punktwert liegt bei 25. Im Unterschied zu diesem wird allerdings der subchondrale Knochen mit bewertet. Makroskopisch erschienen die Defekte nahezu vollständig mit Regeneratgewebe gefüllt, mikroskopisch lassen sich jedoch in zahlreichen Präparaten zentral gelegene Fissuren nachweisen. Die mechanische Testung ergab eine geringe, wenn auch nicht signifikante, Reduzierung der Steifigkeit des Regeneratknorpels. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Implantaten oder eine Auswirkung einer vorherigen Zellbeladung konnte nicht festgestellt werden. Die histologische Auswertung ergab je nach Implantattyp einen Mittelwert von 15,3 bis 16 im Bereich der Kondylen. Die erzielten Ergebnisse

zeigen im Vergleich zu den hier beschriebenen zunächst eine bessere Reparatur der gesetzten Defekte. Bei einem prinzipiell vergleichbaren Tiermodell fällt jedoch auf, dass die Defektgrösse deutlich geringer ist. Während in dieser Arbeit am Schaf Defekte mit einem Durchmesser von acht Millimetern gesetzt wurden, betrug der Defektdurchmesser bei den Versuchen von Niederauer lediglich drei Millimeter. Bei dem relativ geringen Durchmesser der Defekte wäre der Spontanverlauf besonders interessant zur Beurteilung des Reparaturerfolges. Bedauerlicherweise hat Niederauer lediglich die verschiedenen Implantate miteinander verglichen und daher auf die Durchführung einer Leerlochkontrolle verzichtet. Ein wesentlicher Unterschied liegt jedoch in den Schlussfolgerungen beider Arbeitsgruppen. Niederauer geht davon aus, dass das Ausbleiben einer Einblutung aus dem Markraum wesentlich zu einer Verbesserung des Regeneratgewebes beigetragen hat. Dem entgegen stehen Erfahrungen aus der klinischen Therapie der Knorpelläsionen, die eine operative Eröffnung des Markraums mit zumindest punktueller Einblutung in den Defekt für die Verbesserung der Heilung notwendig erachten. Einig sind sich beide Gruppen allerdings in ihrer Einschätzung, dass resorbierbare Implantate eine günstige Wirkung auf die Reparaturfähigkeit osteochondraler Defekte ausüben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier untersuchte Methode zur Behandlung osteochondraler Defekte zu einer signifikanten Verbesserung der Reparatur im Vergleich zu dem Spontanverlauf führt. Dennoch fand sich in keinem Fall eine vollständige Deckung des Defektes, es blieben stets Restdefekte im Zentrum des gesetzten Schadens zurück. Hierfür gibt es verschiedene mögliche Ursachen. So erscheint es durchaus plausibel, dass die Anpassung des Implantates an die ursprüngliche Gelenkkontur nicht optimal war, was eine zu hohe oder zu geringe Druckbelastung im Zentrum des Defektes zu Folge hatte. Eine falsche Belastung könnte zu einer Degeneration eines entstandenen Knorpels geführt haben beziehungsweise die Ausbildung eines Regeneratknorpels verhindert haben. Möglicherweise lag das Problem auch in einer mangelhaften Versorgung des Defektzentrums mit Nährstoffen. So fanden sich in den in MMA eingebetteten Schnitten lediglich geringe Mengen an Knochen in der Knochenersatzschicht des Bioimplantates. Der Grund hierfür ist am ehesten in den bereits angesprochenen Schwierigkeiten bei der Herstellung der Implantate zu suchen, die zu einem weitgehenden Verlust der Offenporigkeit geführt haben. Andererseits führte die Anwesenheit der Implantate zu einer guten Abstützung des angrenzenden Knochens. Wie die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, fand bei den Leerlöchern eine heftige Knochenneubildung im unmittelbar angrenzenden Knochen statt, während nach Implantation eines Implan-

tes lediglich ein gering erhöhter Umsatz festzustellen war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Bioimplantat über eine ausreichende mechanische Stabilität verfügte, um den Kondylus ausreichend zu stabilisieren. Da weiterhin ein partielles Einwachsen von Knochengewebe in den Defekt nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass im Laufe der Zeit noch eine vollständige knöcherne Durchbauung stattgefunden hätte.

## 4.6. Ein Ausblick

Vergleicht man die verschiedenen Arbeiten, so fällt auf, dass mit den verschiedensten Arten von resorbierbaren Implantaten eine Verbesserung gegenüber dem Spontanverlauf osteochondraler Defekte erzielt werden konnte. Diese Vielfalt zeigt aber auch, dass die optimale Kombination aus Implantatmaterial, Defektlokalisierung und eventuellen weiteren Zusätzen wie Wachstumsfaktoren oder Chondrozyten bislang noch nicht gefunden wurde. Der wesentliche Vorteil einer Technik ohne die Verwendung zusätzlichen allo- oder autogenen Materials gegenüber den bisher gebräuchlichen Methoden wie der autologen Chondrozytentransplantation oder Verwendung freier osteochondraler Transplantate besteht in der Vermeidung eines weiteren Defektes in einem gesunden Areal des betroffenen Gelenkes. Gleichwohl ist die Verwendung solcher resorbierbarer Implantate im Augenblick noch keine ernsthafte Alternative zu den etablierten Methoden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass mit den beschriebenen Bioimplantaten eine Verbesserung der Defektheilung erzielt werden kann. Gleichwohl besteht Optimierungsbedarf im Bereich der Implantate und der damit verbundenen Techniken. Ein wichtiger Punkt scheint hier die Porigkeit der Knochenersatzschicht zu sein. Wie in Kapitel 4.1 diskutiert kam es verarbeitungsbedingt zu einer plastischen Verformung des Materials mit der Folge, dass die Offenporigkeit stark reduziert und in Teilen sogar aufgehoben war. Hier sollte versucht werden, ob es durch die Verwendung anderer Zuschnittstechniken wie der Hochdruckwasserstrahltechnik möglich ist, die Porigkeit der Bioimplantate besser zu erhalten, als dies hier der Fall war. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre das Sterilisationsverfahren, das ebenfalls zu einer Verformung der Implantate geführt hat. Durch die so gegebene verbesserte Porigkeit der Knochenersatzschicht ließe sich eventuell ein besseres Einwachsen von Knochengewebe in das Implantat erreichen, was möglicherweise auch zu einer besseren Ernährung des neu gebildeten Knorpels führen könnte. Ebenfalls sollte überprüft werden, ob es möglich ist, durch Aussparungen im Bereich der Knochenersatzschicht eine bessere Versorgung des

Knorpelregenerates mit Nährstoffen zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit, die Bildung von Knochen zu verbessern liegt in der möglichen Zugabe von Wachstumsfaktoren wie "Bone Morphogenetic Protein-2" (BMP-2). Es existieren bereits Untersuchungen für die Freisetzung von eingebettetem BMP-2 aus vergleichbaren Implantaten. Hierbei zeigt sich eine hochsignifikante Erhöhung der Knochenneubildung in den mit BMP-2 beladenen Implantaten gegenüber den unbehandelten Kontrollen. [55] Auch im Bereich der Knorpelersatzschicht bestehen Möglichkeiten, wie die Regeneration verbessert werden könnte. Ein Punkt ist hier sicherlich die Erhöhung der Beladung des Implantates mit mesenchymalen Stammzellen. Ein möglicher Ansatz liegt hier im Aufbringen einer semipermeablen Membran, die das Implantat zum Gelenk hin abschließt und so ein Abschwimmen eingewanderter Zellen verhindert, gleichzeitig jedoch eine Ernährung durch Diffusion aus dem Gelenkspalt zulässt. Auch kann der Versuch unternommen werden, durch die intraoperative Aspiration Stammzellen in das Implantat hinein zu ziehen und so eine bessere Regeneration zu erreichen. Ebenso ist es möglich, die Entwicklung der eingewanderten Zellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren zu beeinflussen und so Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu nehmen. So konnte in Kulturen von Rinderchondrozyten durch die Zugabe von 100 Nanogramm BMP-2 pro Milliliter Kulturmedium eine Zunahme sowohl des Gesamtgewicht um 121% und des prozentualen Anteils von sauren GAGn um 27% erzielt werden. [57] Die ebenfalls untersuchten BMP-12 und BMP-13 führten zu einer geringeren Zunahme. Eine Zugabe von "Transforming Growth Factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) zu Zellkulturen führte umgekehrt zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils von Kollagen im Vergleich zu den GAG. [4]

Weiterhin muss untersucht werden, ob das erzielte Regenerat haltbar ist, oder ob es im Laufe der Zeit zu einer Degeneration kommt, wie es von verschiedenen Autoren beschrieben wird. [12, 17]

Sollte es tatsächlich möglich sein, mit Hilfe einer Weiterentwicklung der hier vorgestellten Bioimplantate eine vollständige und haltbare Knorpelregeneration herbeizuführen, ergeben sich unter Umständen auch völlig neue Ansätze im Bereich der Arthrotherapie. So ist es mit des "Multiphase-jet-solidification-Verfahrens" möglich, auch komplexe Strukturen wie beispielsweise ein vollständiges Hüftgelenk als Bioimplantat zu konstruieren, was zu einer vollständigen Regeneration des geschädigten Gelenkes führen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Gelenkknorpel verfügt nicht über ein relevantes Selbstheilungsvermögen. Daher schreiten isolierte Knorpelschäden in aller Regel zur Gelenksarthrose fort. Auf Grund der damit verbundenen gravierenden Probleme für den Einzelnen und die Gesellschaft stellt die erfolgreiche Behandlung von Knorpelschäden eine ebenso wichtige wie auch schwierige Aufgabe für die heutige Medizin dar. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Verfahren wie die Mikrofrakturierung, die Perichondrium- oder die Chondrozytentransplantation entwickelt. Allen diesen Methoden ist jedoch eines gemein: es entsteht meist nur eine bindegewebige Narbe oder im günstigsten Falle ein Regenerat aus Faserknorpel. Dieses Regenerat ist den Belastungen im Gelenk nicht auf Dauer gewachsen und beginnt daher zu degenerieren. Die Folge ist eine Vergrößerung des Defektes und somit ein Fortschreiten der Arthrose.

Es bestehen jedoch theoretische Überlegungen, wie auch entsprechende Beobachtungen in der Praxis, wonach mesenchymale Stammzellen durch intermittierende Druckbelastungen zu Chondrozyten differenzieren können. Hieraus entstand die Idee, mit Hilfe von resorbierbaren Implantaten Stammzellen in Knorpeldefekten zu verankern und sie dort durch mechanische Belastung zu Chondrozyten zu differenzieren um so ein hyalinartiges Regenerat zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden Implantate mit einer Knorpelersatzschicht aus Polyglactin und Polydioxanon und einer offenporigen Knochenersatzschicht aus Poly-D,L-Lactid hergestellt. Diese "Bioimplantate" wurden in eigens angelegte osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von acht Millimetern und einer Tiefe von 10 Millimetern im lasttragenden Bereich von Kniegelenken ausgewachsener Merinoschafe implantiert. Nach einer Standzeit von zwölf Wochen wurden die Gelenke entnommen und die Ergebnisse mit denen der gleichzeitig durchgeführten Leerlochkontrollen verglichen. Hierfür wurde zunächst die prozentuale Deckung des Defektes mit Knorpelgewebe bestimmt sowie anschließend eine Auswertung bezüglich der Regeneratqualität anhand des semiquantitativen Scores nach O'Driscoll durchgeführt. Dieser Score wurde um die zusätzlichen Kriterien der Anwesenheit von Kollagen I, Kollagen II,

Aggrecan, Blutgefäßen im Regenerat sowie der Metachromasie bei der Färbung mit Toluidinblau erweitert.

Die Auswertung ergab eine statistisch signifikante Verbesserung der prozentualen Defektdeckung von 23% auf 59%. Gleichzeitig verbesserte sich das Ergebnis im Originalscore nach O'Driscoll signifikant von 6 auf 11 Punkte. In der hier verwandten Erweiterung des Scores nach O'Driscoll ergab sich lediglich eine tendenzielle jedoch nicht signifikante Verbesserung von 10,2 auf 15,8 Punkte.

Die hier vorgestellten Bioimplantate führen beim Schaf zu einer signifikanten Verbesserung der Knorpelregeneration im Vergleich zu den Leerlochkontrollen. Auch im Vergleich mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen erweisen sich die hier vorgestellten Implantate als ein vielversprechender Ansatz zur Therapie osteochondraler Läsionen. Jedoch müssen Modifikationen der Bioimplantate zeigen, ob eine homogene hyaline Knorpelregeneration erreicht werden kann.

# Literaturverzeichnis

- [1] W Attmenspacher, V Dittrich, und HW Stedtfeld. Erfahrungen in der artroskopischen Therapie von chondralen und osteochondralen Defekten am Kniegelenk mit dem OATS. *Zentralbl Chir*, 125(6):494–9, 2000.
- [2] J Benske, M Schünke, und B Tillmann. Polychrome Sequenzmarkierung des subchondralen Knochengewebes in frühen and fortgeschrittenen Stadien der Gonarthrose von männlichen STR/IN-Mäusen. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 127(5):616–619, 1989.
- [3] JM Bert und K Maschka. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy*, 5(1):25–32, 1989.
- [4] T. Blunk, AL. Sieminski, KJ Gooch, DL. Courter, AP. Hollander, AM Nahir, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, und LE. Freed. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*, 8(1):73–84, 2002.
- [5] P Bouwmeester, R Kuijer, E Terwindt-Rouwenhorst, T van der Linden, und S Bulstra. Histological and biochemical evaluation of perichondrial transplants in human articular cartilage defects. *J Orthop Res*, 17(6):843–849, 1999.
- [6] PS Bouwmeester, R Kuijer, GN Homminga, SK Bulstra, und RG Geesink. A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J Orthop Res*, 20(2):267–273, 2002.
- [7] HA. Breinan, Martin SD., H. Hsu, und M. Spector. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-ii collagen matrix or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res*, 18(5):781–789, 2000.

- [8] M Brittberg, A Lindahl, A Nilsson, C Ohlsson, O Isaksson, und L Peterson. treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331(14):889–895, 1994.
- [9] P Brucker, JD Agneskirchner, A Burkart, und AB Imhoff. Mega-OATS. Technik und Ergebnisse. *Unfallchirurg*, 105:443–449, 2002.
- [10] A Calabro, VC Hascall, und B Caterson. Monoclonal antibodies directed against epitopes within the core protein structure of the large aggregating proteoglycan (aggrecan) from the swarm rat sarcoma. *Arch Biochem Biophys*, 298(2):349–360, 1992.
- [11] DR Carter, Wong M, und TE Orr. Musculoskeletal ontogeny, phylogeny and functional adaptation. *J Biomech*, 24:3–16, 1991.
- [12] F.R. Convery, W.H. Akeson, und G.H. Keown. The repair of large osteochondral defects. an experimental study in horses. *Clin Orthop*, 82:253–262, 1972.
- [13] D Drenckhahn. *Allgemeine Gelenklehre, Arthrologie*, Kapitel 3.1.2 + 3.1.3, Seiten 217 – 218. In Band 1 von Drenckhahn and Zenker [14], 15. Auflage, 1994.
- [14] D Drenckhahn und W Zenker, Hrsg. *Benninghoff - Anatomie*. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore, 15. Auflage, 1994.
- [15] RP Ficat, C Ficat, P Gedeon, und JB Toussaint. Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop*, (144):74–83, 1979.
- [16] Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. Bericht des Arbeitskreises Arthrose. <http://www.dgrh.de/mitteilungen/arbeitskreise/ak-arthrose.html>.
- [17] F Gomar-Sancho und Orquin EG. Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit’s knee. *Int Orthop*, 11:65–69, 1987.
- [18] JO Hollinger. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (pla) and polyglycolide (pga). *J Biomed Mater Res*, 17:71–82, 1983.
- [19] R Holmdahl, K Rubin, L Klareskog, E Larsson, und H Wigzell. Characterisation of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum*, 29(3):400–410, 1986.

- [20] GN Homminga, SK Bulstra, PSM Bouwmeester, und AJ van der Linden. Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 72:1003–1007, 1990.
- [21] U Horas, R Schnettler, D Pelinkovic, G Herr, und T Aigner. Knorpelknochen transplantation versus autogene Chondrozytentransplantation. *Chirurg*, 71(9):1090–7, 2000.
- [22] W Hunter. On the structure and diseases of articulating cartilage. *Philosophical Transcripts of the Royal Society London*, B42:514–521, 1743.
- [23] V Jansson, PE Müller, S Thal, C Arnholz, S Milz, KU Koch, und HJ Refior. Ein neues resorbierbares Knochen-Knorpel-Ersatztransplantat. *Orthopade*, 29(2):151–157, 2000.
- [24] B Kummer. Grundlagen zur Pauwels-Theorie der funktionellen Anpassung des Knochens. *Orthopade*, 24:387–393, 1995.
- [25] J Löhnert und J Raunest. *Abrasionschondroplastik*, Kapitel 12, Seiten 143–49. In [26], 1990.
- [26] J Löhnert und J Raunest. *Arthroskopische Operationslehre des Kniegelenks*. Biermann GmbH, 1990.
- [27] J Löhnert und J Raunest. *Pridie-Bohrung*, Kapitel 14, Seiten 159–62. In [26], 1990.
- [28] Yanchun Liu, Fuguo Chen, und Wei Liu. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng*, 8(4):709–721, 2002.
- [29] RA Milch, DP Rall, und JE Tobie. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg*, 40-a(4):897–909, 1958.
- [30] S Milz, C McNeilly, R Putz, JR Ralphs, und M Benjamin. Fibrocartilages in the extensor tendons of interphalangeal joints of human toes. *Anat Rec*, 252:264–70, 1998.
- [31] S Milz, R Putz, JR Ralphs, und M Benjamin. Fibrocartilage in the extensor tendons of the human metacarpophalangeal joints. *Anat Rec*, 256:139–45, 1999.

- [32] P.E. Müller, F. Schimpf, S. Milz, J. Kircher, HR. Dürr, und V. Jansson. Repair of osteochondral defects by resorbable bioimplants in rabbit model. *Acta Orthop Scand*, eingereicht.
- [33] DJF Moojen, DBF Saris, KG Auw Yang, WJA Dhert, und AJ Verbout. The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. *Tissue Eng*, 8(4):627–634, 2002.
- [34] EA Morris, D Peluso, TJ Gill, J Powers, und S Glasson. The choice of the animal model of articular cartilage repair significantly affects outcomes and conclusions. In *Transactions of the 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the U.S.A., Canada, Europe, and Japan*, Seite 260, 2001.
- [35] GG Niederauer, MA Slivka, NC Leatherbury, DL Korvick, HH Harroff Jr., WC Ehler, CJ Dunn, und K Kieswetter. Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials*, 21(24):2561–2574, 2000.
- [36] SW O’Driscoll, FW Keeley, und RB Salter. 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. *J Bone Joint Surg Am*, 70(4):595–606, 1988.
- [37] Y Okubo, K Bessho, K Fujimura, K Kusumoto, Y Ogawa, und T Iizuka. Expression of bone morphogenetic protein in the course of osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Oral Implants Research*, 13(1):80–85, 2000.
- [38] F Pauwels. *Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte*. Springer, Berlin - Heidelberg - New York, 1973.
- [39] C Perka, O Schultz, M Sittinger, und H Zippel. Chondrozytentransplantation in pglA/polydioxanon-vliesen. *Orthopade*, 29(2):112–119, 2000.
- [40] S Pineda, A Pollack, S Stevenson, V Goldberg, und A Caplan. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anatomica*, 4(143):335–340, 1992.
- [41] H Pistner, R Gutwald, R Ordnung, J Reuther, und J Mühling. Poly(l-lactide): a long term degradation study in vivo. Part I: Biological results. *Biomaterials*, 14(9):671–677, 1993.

- [42] H Pistner, H Stallforth, R Gutwald, J Mühling, J Reuther, und Ch Michel. Poly(l-lactide): a long term degradation study in vivo. Part II: physico-mechanical behaviour of implants. *Biomaterials*, 15(6):439–450, 1994.
- [43] E Ploetz. Funktioneller Bau und funktionelle Anpassung der Gleitsehnen (D25). *Z Orthop*, 67:212–234, 1938.
- [44] HH Pässler. Die Mikrofrakturierung zur Behandlung von Knorpeldefekten. *Zentralbl Chir*, 125:500–4, 2000.
- [45] R Putz. *Systematik der Gewebe*, Kapitel 6.1.2, Seite 164. In Band 1 von Drenckhahn and Zenker [14], 15. Auflage, 1994.
- [46] P Redfern. On the healing of wounds in articular cartilage. *Monthly Journal of Medical Science*, 13:201–206, 1851.
- [47] Romeis. *Mikroskopische Technik*, Kapitel 25-3.3.1, Seiten 529–531. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore, 17. Auflage, 1989.
- [48] U Schneider, SJ Breusch, und K von der Mark. Aktueller Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 137:386–92, 1999.
- [49] PB Schöttle, GM Oettl, JD Agneskirchner, und AB Imhoff. Operative Therapie von osteochondralen Läsionen im Talus mit autologer Knorpel-Knochen-Transplantation. *Orthopade*, 30(1):53–8, 2001.
- [50] JR Steadman, WG Rodkey, und Rodrigo JJ. Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop*, (391 Suppl):S362–S369, 2001.
- [51] M Tägil und P Aspenberg. Cartilage formation by controlled mechanical stimulation. a titanium chamber study in rats. In *8th Annual Meeting, European Orthopaedic Research Society, Amsterdam*, 1998.
- [52] M Tägil und P Aspenberg. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation. a chamber study in rats. In *44th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, New Orleans, Louisiana*, 1998.
- [53] M Tägil und P Aspenberg. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res*, 17(2):200–4, 1999.

- [54] S Wakitani, T Kimura, A Hirooka, T Ochi, M Yoneda, N Yasui, H Owaki, und K Ono. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br*, 71-B:74–80, 1989.
- [55] K Whang, DC Tsai, EK Nam, M Aitken, SM Sprague, PK Patel, und KE Healy. Ectopic Bone Formation via rhBMP-2 Delivery from Porous Bioabsorbable Polymer Scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 42:491–499, 1998.
- [56] J Wolff. Über die Bedeutung der Architektur der spongiösen Substanz. *Centralblatt der Medizinischen Wissenschaft*, 54:849–851, 1869.
- [57] R Zakany, K Szucs, E Bako, S Felszeghy, G Czifra, T Biro, L Modis, und P Gergely. 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.

# A. Reduzierung und Alkylierung für Aggrecanmarkierung

Vorbereiten der Schnitte 24 Stunden vor der geplanten Färbung

## *Reduktions-Puffer (250ml):*

50 mM Tris (121,1 g/mol)  $\Rightarrow$  1,51 g und

200 mM NaCl (58,4 g/mol)  $\Rightarrow$  2,92 g in 200 ml Aqua dest auflösen.

pH-Wert messen und mit Salzsäure (HCl) auf einen pH-wert von 7,35 bringen.

Destilliertes Wasser zufügen, bis das Gesamtvolumen 250ml beträgt. Die Lösung kann für etwa eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

## *Arbeitslösung:*

10 mM 1,4-Dithiotretiol-Lösung aus 100ml des Reduktionspuffers 1,4-Dithiotretiol ansetzen.

Die zu färbenden Objektträger sofort in ein mit der Arbeitslösung gefülltes Schiffchen setzen und für zwei Stunden bei 37°C inkubieren.

## *Alkylierende Lösung (250 ml):*

40 mM Iodoacetamid-Lösung (Best.-Nr. I-1149, Fa. Sigma, München, Deutschland) aus Iodoacetamid und Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) herstellen.

Stabilisiert die gebrochenen Disulfid-Brücken. Die Schnitte können dadurch über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert werden.

## B. Immunmarkierung (Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan)

1. einzelne Schnitte mit Fettstift einkreisen
2. fünf Minuten in Phosphat-gepuffertes physiologischer Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) mit Tween rehydrieren
3. 30 Minuten in Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch (100 ml reines Methanol mit 1 ml 30%-iger Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )-Lösung mischen) setzen
4. drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen
5. Schnitte für 30 Minuten bei  $37^\circ C$  mit Hyaluronidase und Chondroitinase ABC inkubieren
6. drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen
7. Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 1 zu 20 Mischung aus Pferdeserum und PBS inkubieren
8. Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Primärantikörper inkubieren
  - Kollagen I: Col1 (Sigma), Verdünnung 1:200
  - Kollagen II: CIICI, Verdünnung 1:6
  - Aggrecan: 1C6, Verdünnung 1:5
  - Negativkontrollen: PBS mit Tween
9. drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen
10. Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper (Vectastain ABC-Kit Elite Anti-Maus (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), Verdünnung 1:200) inkubieren

11. In der Zwischenzeit ABC-Komplex ansetzen:

- 1 ml PBS ohne Tween
- 20 µl A-Reagenz aus ABC-Kit
- 20 µl B-Reagenz aus ABC-Kit

mischen und für mindestens 30 Minuten bei 4°C lagern

12. drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen

13. Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem vorbereiteten ABC-Komplex inkubieren

14. drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen

15. Schnitte für vier Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit DAB inkubieren

16. fünf Minuten in Leitungswasser waschen

17. Schnitte für circa 20 Sekunden in Mayer's Hämalaun färben

18. Schnitte für jeweils fünf Minuten durch eine von 60% an aufsteigende Alkoholreihe führen

19. Schnitte mit DPX eindecken

## **C. Toluidinblau-Färbung mit Metachromasie**

1. Schnitte kurz in aqua dest abspülen
2. drei Minuten in 1%-iges Toluidinblau O einstellen
3. drei Stunden in Leitungswasser einstellen, bis keine Farbschlieren mehr sichtbar sind. Wasserwechsel alle fünfzehn Minuten
4. Filterpapier aufpressen und sofort mit DPX eindecken

## D. Safranin-O-Färbung

1. Schnitte kurz in aqua dest abspülen
2. sieben Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylin einstellen
3. zehn Minuten fließend wässern
4. drei Minuten in 0,02%-iges FCF (Echtgrün, Fa. Chroma, Best.-Nr. IA 304) einstellen
5. fünfzehn Sekunden in Eisessig einstellen
6. in aqua dest abspülen
7. 10 Minuten in 0,1%-iges Safranin-O (Fa. Chroma, Best.-Nr. IB 463) einstellen
8. in aqua dest abspülen
9. Schnitte kurz in 96%-igem und in zwei Fraktionen 100%-igem Ethanol schwenken
10. Schnitte für jeweils zwei bis drei Minuten in zwei Fraktionen Xylol eintauchen und sofort mit DPX eindecken

## **E. Modifizierte Ladewig-Färbung für MMA-Schnitte**

1. Schnitte kurz zur Entfettung in Aceton/Ethanol 100% im Verhältnis 1:1 anätzen
2. Schnitte für 10 Minuten in Weigertschem Eisenhämatoxylin färben
3. zehn Minuten fließend wässern und anschließend in aqua dest umsetzen
4. fünf Minuten in 5%-iger Phosphorwolframsäure einstellen
5. in aqua dest abspülen
6. Schnitte für drei Minuten in filtrierter Ladewiglösung färben
7. in aqua dest abspülen
8. kurz in 96%-igem Ethanol differenzieren
9. Schnitte eventuell für einige Tage pressen
10. Schnitte in Xylol eintauchen und mit Eukitt eindecken

# Danksagungen

Danken möchte ich zunächst einmal Herrn Professor Dr.med. Dipl.Ing. Volkmar Jansson für die Annahme dieser Arbeit sowie seine sehr gute Betreuung. Besonders angenehm fand ich, dass ich ihn nahezu jederzeit aufsuchen und mit ihm das weitere Vorgehen besprechen konnte. Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Priv. Doz. Dr.med. Peter Müller bedanken, der es mir durch seine wirklich hervorragende Betreuung ermöglicht hat diese Arbeit so, wie sie hier liegt fertig zu stellen. Auch bei ihm hatte ich jederzeit den Eindruck, dass ich als junger Kollege ernst genommen und nicht nur als Klotz am Bein empfunden wurde. Besonderer Dank gebührt auch meiner Mitdotorandin Stefanie Schroedl, mit der ich unzählige Stunden in Operationsräumen und diversen Labors verbracht habe.

Ebenso möchte ich Frau Dinter und Frau Lippelt von der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität in München für die Hilfe beim Schneiden, Einbetten und Anfärben unserer Präparate danken. An dieser Stelle besonders erwähnen möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr.med. Stefan Milz (derzeit am AO-Institut in Davos), ohne dessen Hilfe die Färbung und Auswertung der Präparate so nie funktioniert hätte.

Weiterhin möchte ich Herrn Professor Messmer, Leiter des Instituts für Chirurgische Forschung (ICF) des Klinikums Großhadern für die Möglichkeit danken, unsere Operationen in seinem Haus durchführen zu können, den Mitarbeitern der Tierställe und Familie Geier für die Versorgung der Schafe, ebenso wie Herrn Dieter Müller, der dafür gesorgt hat, dass die Tiere ihren Weg von den Freigehegen in die Ställe des ICF gefunden haben.

Erwähnen muss ich an dieser Stelle auch noch Frau Dr. med. Sabine Blasenbrenn-Vogt, die sich gemeinsam mit Dr. Milz durch die Präparate durchgearbeitet und diese beurteilt hat.

Neben den oben genannten und mehr oder weniger direkt an der Erstellung dieser Arbeit beteiligten Personen, möchte ich an dieser Stelle noch einigen anderen Menschen danken, ohne die diese Arbeit nicht oder zumindest weniger angenehm entstanden wäre. Dies sind

Herr cand.med. Dipl.Ing. Robert Markwitz, der mich überzeugt hat, diese Dissertation mit  $\LaTeX$  zu schreiben, was mir sicher eine ganze Menge Ärger mit der Technik erspart hat, und der sich diese Arbeit auch noch auf allgemeine Verständlichkeit und sonstige Fehler hin durchgelesen hat. Herr Markus Keller und Herr Dipl.Ing. Bernhard Mehnert danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung.

**Vielen Dank!**

# Lebenslauf

- 20.12.1976: Geburt in Garmisch-Partenkirchen als Sohn von  
Dr.med. Monika Schrimpf, geb. Fürst, und Dr.med. Georg Schrimpf
- 19.03.1979: Geburt meiner Schwester Maria Susanne
- 12.08.1982: Geburt meiner Schwester Franziska Katharina
- Sommer 1983: Einschulung in die Eichrodt-Grundschule in Lahr im Schwarzwald
- Sommer 1985: Wechsel an die Georg-Monsch-Grund- und Hauptschule in Offenburg
- Sommer 1987: Wechsel an das Schiller-Gymnasium in Offenburg
- 21.06.1996: Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife am  
Schiller-Gymnasium in Offenburg
- 04.11.1996: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
- 26.07.1997: Eintritt in den Akademischen Seglerverein in München e.V.
- 09.09.1998: Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
- 23.03.2000: Bestehen des Ersten Teils der Ärztlichen Prüfung
- 05.04.2002: Bestehen des Zweiten Teils der Ärztlichen Prüfung
- 11.04.2003: Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung und  
Beendigung des Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität
- 01.11.2003: Beginn meiner Tätigkeit als Arzt im Praktikum  
an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
des Klinikums Großhadern
- 01.10.2004: Erteilung der Approbation als Arzt  
Beginn meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent  
an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
des Klinikums Großhadern