

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik – Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

# **Erprobung resorbierbarer Implantate zur Knorpelregeneration am Kniegelenk – eine tierexperimentelle Studie am Schaf**

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

vorgelegt von Markus Markart  
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Denitsa Docheva  
Prof. Dr. Andreas Krödel

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Bernd Wegener

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2013

gewidmet meiner geliebten Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	<i>Bedeutung der Arthrose</i> .....	1
1.2.	<i>Morphologie des Gelenkknorpels</i> .....	2
1.3.	<i>Aktuelle Therapiemöglichkeiten der Arthrose</i> .....	7
1.3.1.	Konservative Behandlungsansätze .....	7
1.3.2.	Gelenksarthroskopie mit Lavage, Débridement und Abrasionschondroplastik .....	7
1.3.3.	Pridie-Bohrung.....	8
1.3.4.	Mikrofrakturierung.....	8
1.3.5.	OATS – das osteochondrale autologe Transplantations-System.....	9
1.3.6.	Allogene osteochondrale Transplantation .....	10
1.3.7.	Autologe Chondrozytentransplantation.....	11
1.3.8.	Endoprothetik.....	13
1.4.	<i>Aktuelle experimentelle Therapieansätze</i> .....	14
1.4.1.	Chondrogenese und Auswahl des Zelltypus.....	14
1.4.2.	Kulturformen .....	16
1.4.3.	Trägersubstanzen .....	17
1.4.4.	Mechanische Stimulation .....	19
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.1.	<i>Die Bioimplantate</i> .....	24
3.1.1.	Erläuterungen zu den verwendeten Implantaten und Materialien ..	24
3.1.2.	Instrumentarium .....	26
3.2.	<i>Tiermodell</i> .....	28
3.3.	<i>Operation</i> .....	29
3.4.	<i>Gewinnung der Präparate und Entkalkung</i> .....	34
3.5.	<i>Histologische Aufarbeitung</i> .....	35

3.6.	<i>Auswertung der Präparate</i> .....	36
3.6.1.	O´Driscoll-Score .....	36
3.6.2.	Modifizierter O´Driscoll-Score .....	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
4.1.	<i>Intra- und postoperativer Verlauf</i> .....	44
4.2.	<i>Makroskopische Beurteilung der Präparate</i> .....	44
4.2.1.	Leerlochgruppe.....	45
4.2.2.	PGA-Vlies und Mikrofrakturierung .....	45
4.2.3.	Kollagen I-Vlies mit Mikrofrakturierung .....	46
4.2.4.	PGA-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch .....	47
4.2.5.	Kollagen-I-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch .....	48
4.2.6.	ACT-Implantate.....	49
4.2.7.	Zusammenfassung der makroskopischen Auswertung .....	49
4.3.	<i>Mikroskopische Beurteilung der Präparate</i> .....	51
4.3.1.	Leerlochgruppe.....	51
4.3.2.	PGA-Vlies und Mikrofrakturierung .....	53
4.3.3.	Kollagen-I-Vlies und Mikrofrakturierung .....	55
4.3.4.	PGA-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch .....	57
4.3.5.	Kollagen-I-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch .....	59
4.3.6.	ACT-Implantate.....	61
4.4.	<i>Beurteilung der Ergebnisse mittels O´Driscoll-Score</i> .....	63
4.4.1.	Originaler O´Driscoll-Score .....	63
4.4.2.	Modifizierter O´Driscoll-Score .....	64
4.4.3.	Statistische Auswertung .....	68
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>70</b>
5.1.	<i>Bioimplantate</i> .....	72
5.2.	<i>Chondrale Defekte im Tiermodell</i> .....	77
5.3.	<i>Beurteilungsschema</i> .....	80
5.4.	<i>Ergebnisse</i> .....	82
5.5.	<i>Ausblick</i> .....	89

<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>A Reduzierung und Alkylierung der Präparate für die Aggrecanmarkierung .....</b>	<b>110</b>
<b>B Immunmarkierung (Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan).....</b>	<b>111</b>
<b>C Toluidinblau-Färbung mit Metachromasie .....</b>	<b>113</b>
<b>D Safranin-O-Färbung .....</b>	<b>114</b>
<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>115</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>116</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>117</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung der Arthrose

Im Jahr 2010 wurden in den deutschen Vorsorge- und Rehabilitationseinrichtungen am häufigsten Arthrosen behandelt. An erster Stelle standen dabei mit rund 114000 behandelten Patienten die Kniegelenksarthrosen gefolgt von den Hüftgelenksarthrosen mit etwa 108000 Patienten [1]. Beliefen sich die Gesundheitsausgaben in Deutschland für das Jahr 2004 noch auf rund 234 Milliarden Euro, so stiegen diese in einer Veröffentlichung des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden, im Jahr 2010 auf 287,3 Milliarden Euro [2]. Davon entfielen 277,25 Milliarden Euro auf die laufenden Gesundheitsausgaben. Von den insgesamt 1,7 Millionen vollstationären Patientinnen und Patienten in deutschen Rehabilitationseinrichtungen bildeten die Fachrichtungen Orthopädie (mit 37,1% aller Fälle) und Innere Medizin (mit 27,6% aller Fälle) fast zwei Drittel aller behandelten Fälle ab. Die höchsten Gesundheitsausgaben verursachten dabei Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 37 Milliarden Euro gefolgt von Krankheiten des Verdauungssystems mit 34,8 Milliarden Euro. An dritter Stelle lagen psychische und Verhaltensstörungen mit 28,7 Milliarden Euro und Platz vier der Rangfolge belegten Erkrankungen des Skeletts, der Muskeln und der Bindegewebe mit insgesamt 28,5 Milliarden Euro. Umgerechnet bedeutete dies eine finanzielle Belastung der Krankenkassen von mehr als 8 Milliarden Euro. In der Altersklasse der 30- bis 84-jährigen Patienten litten durchschnittlich 12,1% an Krankheiten des muskuloskelettalen Systems. Gerade bei den Patienten in den Altersstufen von 45 bis 64 Jahren waren diese Erkrankungen im Vergleich zu den Vorjahresuntersuchungen in den Vordergrund getreten. Natürlich bedeutet die Arthrose immense Kosten für das Gesundheitssystem, hat aber auch aufgrund der schmerzhaften Bewegungseinschränkungen bis hin zur Immobilität weitreichende Folgen für die Lebensqualität der Patienten und bedeutet auf diese Weise weitere volkswirtschaftliche Einbußen sowohl für die Patienten selbst als auch deren Arbeitgeber. Hieraus wird ersichtlich, dass durch eine Heilung von Knorpelschäden ein enormer finanzieller Nutzen erreicht werden könnte.

## 1.2. Morphologie des Gelenkknorpels

Grundsätzlich können drei verschiedene Arten von Knorpelgewebe unterschieden werden: Elastischer Knorpel, der z.B. am Kehlkopf, der Epiglottis oder in der Ohrmuschel vorkommt, Faserknorpel wie in den Menisci oder Bandscheiben und zuletzt der hyaline Knorpel aller Gelenkflächen. Letztgenannter bildet die Grundlage dieser Dissertation.

Hyaliner Knorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches und nervenloses Gewebe, das sich an allen gelenkbildenden Knochenenden findet [3]. Es werden vier unterschiedliche Zonen unterschieden [4]:

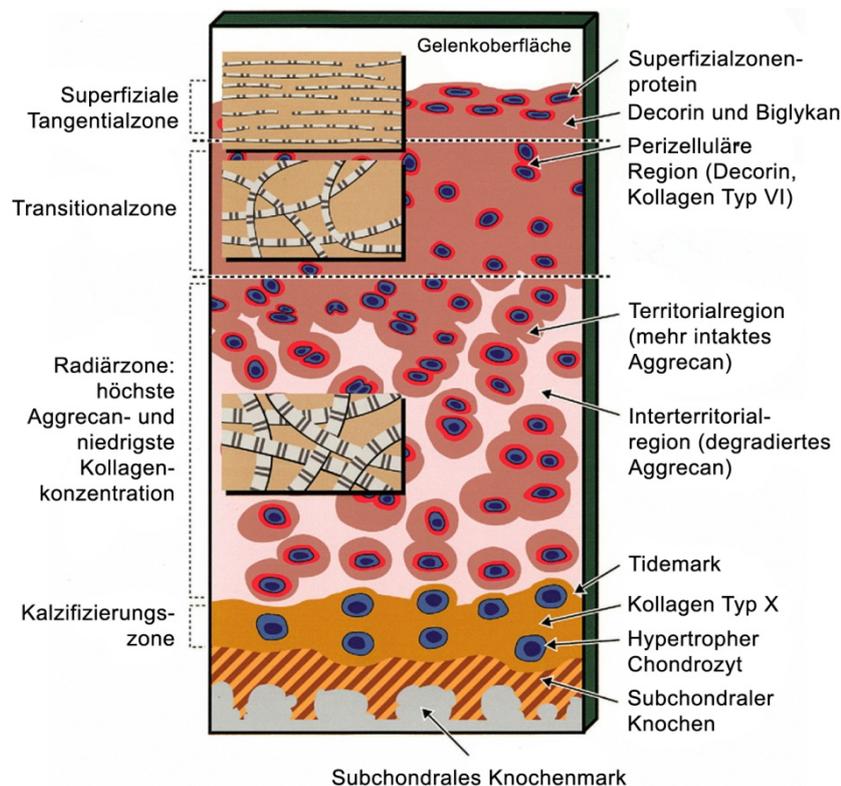


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Knorpelschichten eines Gelenks beim Erwachsenen (entnommen aus [4])

In der oberflächlichen Tangentialzone, die etwa 10% der Knorpeldicke ausmacht, findet sich dem Gelenk zugewandt eine zellfreie Schicht aus kleinen Fibrillen und wenigen Polysacchariden, welche die gleitende Gelenkoberfläche bildet. Darunter finden sich parallel zur Oberfläche ausgerichtete spindelförmige

Chondrozyten, die das sogenannte Superficialzonenprotein sezernieren, das für eine verbesserte und fast reibungslose Bewegungsfähigkeit in Zusammenarbeit mit der Synovialflüssigkeit verantwortlich ist [5]. Dabei dient die Superficialschicht mit ihrer großen Fläche als Puffer zur gleichmäßigen Verteilung der einwirkenden Kräfte [6] und fungiert dadurch als druckstabile Membran [3].

Darunter liegt die Transitionalzone mit einer hohen Konzentration an Proteoglykanen. Im Vergleich zur Superficialzone besitzen dort die Chondrozyten eine runde bis sphärische Form und sowohl der Wasser- als auch der Kollagengehalt sind niedriger [7, 3]. Im Anschluß findet sich die Radiärzone mit dem höchsten Gehalt an Aggrecan und der niedrigsten Kollagenkonzentration. Die Chondrozyten sind säulenartig angeordnet. Die letzte Zone bildet die Kalzifizierungszone mit mineralisiertem Knorpel und niedrigem bis kaum nachweisbarem Proteoglykangehalt. Zwischen den beiden letztgenannten Schichten bildet eine sog. Tidemark die Grenzfläche von unmineralisiertem und mineralisiertem Knorpel.

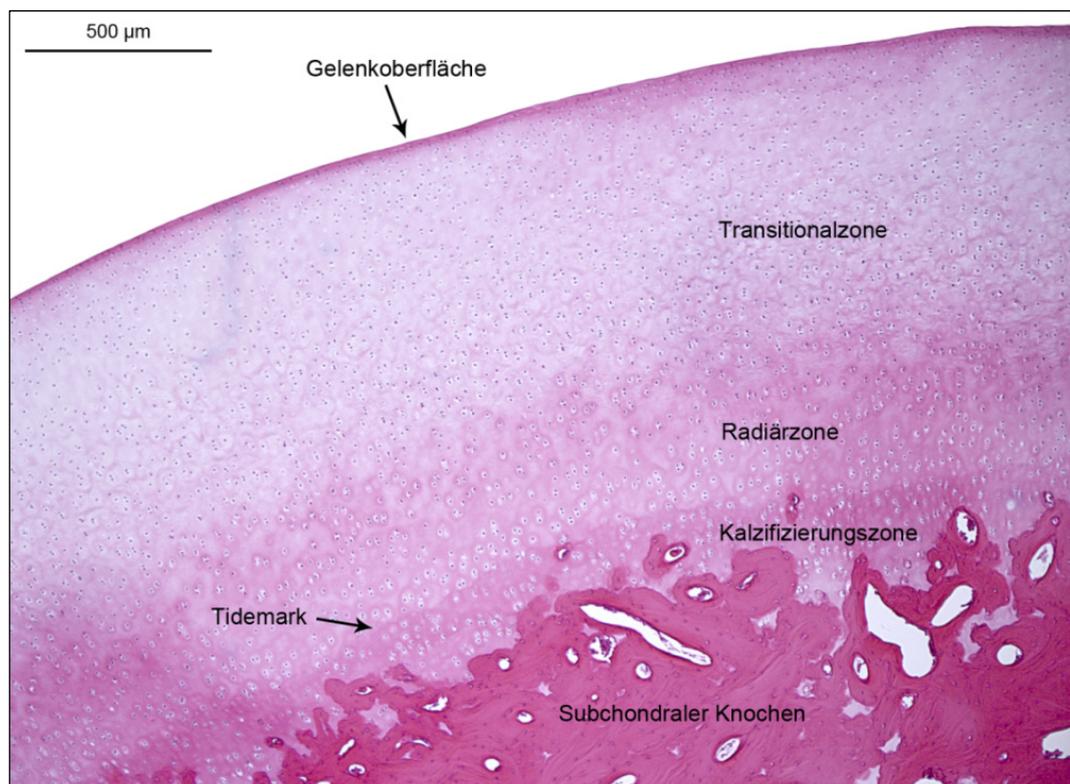


Abbildung 1.2: Präparat eines gesunden Hyalinknorpels. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.

Die Aufgabe des Gelenkknorpels besteht darin, die Kraft, die auf das Gelenk wirkt, gleichmäßig über die Gelenkfläche zu verteilen und Stoßbelastungen abzdämpfen. Zusammen mit der Synovialflüssigkeit werden Reibungskräfte minimiert und eine beinahe reibungslose Gelenkbewegung erzielt [8]. Der Anteil an Chondrozyten, welche die extrazelluläre Matrix synthetisieren, beträgt nur noch knapp 2% des gesamten Knorpelvolumens beim Erwachsenen, wohingegen dieser beim Neugeborenen und Kleinkind um ein vielfaches höher ist [9]. Der geringste Zellanteil findet sich in der Radiärzone.

Um seiner Aufgabe gerecht zu werden, besitzt der Gelenkknorpel die Fähigkeit, nach starker Deformierung durch Druck, der bis zum 8-fachen des Körpergewichts betragen kann, zu seiner Ausgangsform zurückzukehren [10]. Sieht man sich die Zusammensetzung der Interzellulärschubstanz genauer an, so finden sich zu 60-80% Wasser und Elektrolyte. Den Rest bildet die extrazelluläre Matrix, die ihrerseits zu 50% aus Kollagenfasern, zu 30% aus makromolekularen Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen und zu 20% aus Glykoproteinen besteht. Die Elastizität beruht in erster Linie auf einem ausgedehnten Netzwerk aus Kollagenfibrillen, die in ihrem Durchmesser je nach Knorpelzone von 20 nm bis 120 nm variieren. Den Hauptanteil bildet dabei mit etwa 90% Kollagen Typ II. Jenes Molekül ist aus drei identischen  $\alpha_1$ -Ketten aufgebaut, die zusammen eine Trippelhelix bilden, von der an jedem Ende kleine Amino- und Kohlenstofftelopeptide herausragen [11], über welche sich die Ketten untereinander verbinden. Neben Kollagen Typ II finden sich noch in geringen Mengen Kollagen Typ V, VI, IX und XI. Im Faserknorpel hingegen finden sich zusätzlich große Mengen an Kollagen Typ I, das, ganz im Gegensatz dazu, in hyalinem Knorpel definitionsgemäß nicht vorkommt. Die Bindung des Wassers im Kollagenetzwerk erfolgt an Proteoglykane. Als Wichtigste unter ihnen sind das große Aggrecan- und das wesentlich kleinere Decortinmolekül zu nennen. Aggrecan spielt als Hauptproteoglykan vor allem bei der Wasserbindung die entscheidende Rolle.

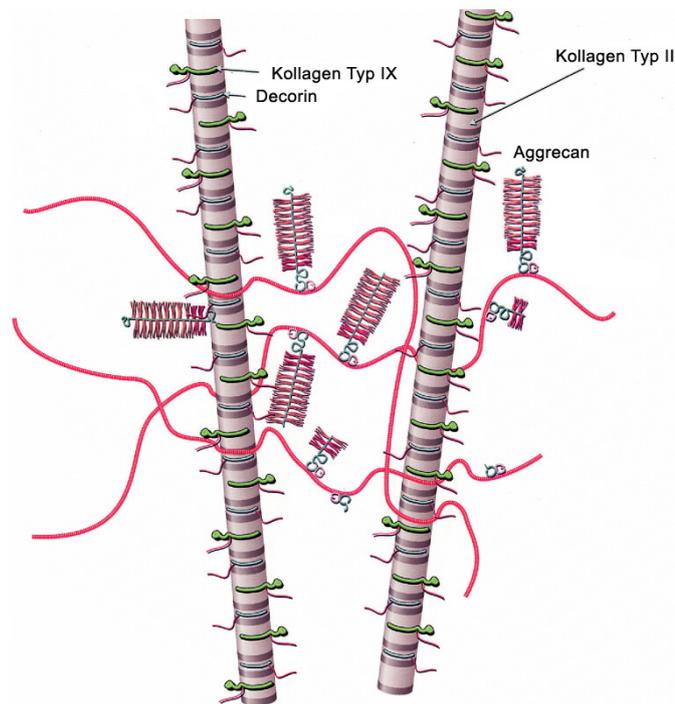


Abbildung 1.3: Darstellung des makrofibrillären Kollagennetzwerkes  
(entnommen aus [4])

Das Grundgerüst der Proteoglykane besteht aus langen Hyaluronsäuremolekülen, an die sich unzählige Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten anlagern. Die negativen Ladungen der Glykosaminoglykane sind letztendlich für den Quellungsdruck verantwortlich, dem das Kollagennetzwerk in seiner dreidimensionalen Ausrichtung entgegenwirkt, das Gebilde unter Spannung bringt und die Verformungsfestigkeit bewirkt [12].

Wie weiter oben im Text bereits erwähnt, weist ausdifferenzierter Knorpel keine Blutgefäße mehr auf, so dass der Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten durch reine Diffusion erfolgt. Deshalb erstaunt es auch wenig, dass Gelenkknorpel aufgrund seiner biologischen Zusammensetzung nur eine geringe Fähigkeit zur Regeneration besitzt. So werden oberflächliche Knorpeldefekte, welche die subchondrale Lamelle nicht durchbrechen, kaum heilen und in eine Degeneration der Gelenkfläche fortschreiten [13, 14]. Anders sieht es bei Ulzerationen aus, welche den subchondralen Knochen eröffnen und damit direkten Kontakt mit dem Knochenmark bieten, wodurch es zur Einblutung und damit zur Einschwemmung unterschiedlichster Zellen in den Defekt kommt [15, 16, 17]. Zudem werden auch große Mengen an Wachstumsfaktoren

freigesetzt [18, 19]. Die unter anderem ausgewanderten mesenchymalen Stammzellen differenzieren sich in unterschiedliche Zelllinien, abhängig von den lokalen Gegebenheiten [20, 21]. Allerdings kommt es dadurch nicht wie gewünscht zur Ausbildung von neuem, hyalinem Knorpel sondern in erster Linie zu Faserknorpel, der weder die Architektur noch die mechanische Stabilität des hyalinen Knorpels aufweist und innerhalb kürzester Zeit degeneriert [22, 15, 4, 23].

Schon Mitte des 18. Jahrhunderts erkannte Hunter diese Problematik [24]:

*From Hippocrates to the present age  
it is universally allowed that  
ulcerated cartilage is a troublesome thing and that,  
once destroyed,  
it is not repaired.*

Im Laufe der folgenden Jahrhunderte versuchten Mediziner mit teils sehr innovativen Techniken zerstörten Gelenkknorpel zu ersetzen oder besser noch, zur Regeneration anzuregen. In der Literatur findet sich erstmals im Jahre 1865 eine Knorpeltransplantation – bei subkutan implantierten Rattenschwänzen konnten in Metachromfärbung intakte Chondrozyten nachgewiesen werden [25]. Gerade in den letzten 30 bis 40 Jahren haben die Behandlungsmöglichkeiten der Arthrose zugenommen. Im nächsten Abschnitt soll ein kurzer Überblick der aktuellen Therapieformen gegeben werden.

### **1.3. Aktuelle Therapiemöglichkeiten der Arthrose**

#### **1.3.1. Konservative Behandlungsansätze**

Ziel einer konservativen Arthrosebehandlung ist das Erreichen einer weitestgehenden Schmerzfreiheit oder zumindest das Verhindern eines weiteren Fortschreitens der Erkrankung. Dafür ist jedoch ein Patient mit guter Compliance notwendig, der über den Krankheitsverlauf der Arthrose aufgeklärt wurde und sich dessen bewusst ist, dass er selbst viel zum Gelingen der Therapie beiträgt. Zunächst sollten eine Verbesserung der Lebensweise, eine Gewichtsreduktion und physikalische Maßnahmen im Vordergrund stehen. Unterstützend kann mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR, z.B. Ibuprofen® oder Voltaren®) oder selektiven COX-2-Inhibitoren eine medikamentöse Schmerztherapie durchgeführt werden [26, 27, 28]. Um lokale Entzündungsreaktionen eines Gelenkes auszuschalten können intraartikulär Corticosteroide injiziert werden. Mit Hyaluronsäurepräparaten und chondroprotektiven Agenzien wird versucht, die Gleitfähigkeit des Knorpels zu erhalten und regional wieder aufzubauen. Viele Patienten berichten auch über eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik mit Hilfe von Akupunktur [29, 30].

#### **1.3.2. Gelenkarthroskopie mit Lavage, Débridement und Abrasionschondroplastik**

Die Gelenkarthroskopie wurde in erster Linie für Verletzungen im Kniegelenk entwickelt. Neben der Versorgung von Meniskusschäden und Kreuzbandverletzungen kann auch die Gelenksarthrose effektiv behandelt werden [31]. Typischerweise wird dabei das Gelenk gespült (Lavage), débridiert (Lösung von Verklebungen, Entfernung von freien Gelenkkörpern) und von einzelnen Autoren eine sog. Abrasionschondroplastik empfohlen, bei welcher der degenerierte Knorpel bis zum subkortikalen Bereich abgetragen und die Gelenkfläche geglättet wird [32]. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass bis zu 87% der Patienten von einer Kniegelenksarthroskopie - abhängig vom Arthrostadium - profitierten [33]. Allerdings stehen diesen Ergebnissen

auch Studien gegenüber, die genau das Gegenteil zeigen konnten, nämlich dass der Knorpel durch die Abrasionschondroplastik verstärkt degeneriert [34].

### **1.3.3. Pridie-Bohrung**

Diese von Pridie im Jahre 1959 beschriebene Technik basiert auf einer „vaskulär“ bedingten Regeneration des Knorpels [35]. Bei diesem Verfahren werden arthroskopisch mehrere Bohrungen von 2 mm Durchmesser und etwa 4 cm Tiefe im Abstand von idealerweise 5 mm im Knorpeldefekt angelegt [36]. Dadurch wird der subchondrale bis in den spongiösen Knochen mit gut durchblutetem Knochenmark durchbohrt. Durch die darauf folgende Einblutung entsteht ein Fibringerinnsel auf der Oberfläche des Defektes, das unter anderem pluripotente Stammzellen enthält. Diese mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks haben die Fähigkeit, sich durch entsprechende mechanische und biologische Reize in Knochen oder Knorpelzellen zu differenzieren. Und eben diese Differenzierung zu knorpelartigem Ersatzgewebe macht man sich zu nutze. Der dadurch entstehende Faserknorpel ist allerdings von minderer Qualität und mit dem hyalinen Knorpel nicht vergleichbar, da dieser in erster Linie Typ-I-Kollagen und nicht wie im hyalinen Knorpel vorliegend Typ-II-Kollagen enthält. Auch der Gehalt an Proteoglykanen ist deutlich geringer. Dennoch ist diese Technik weltweit sehr verbreitet [37], da sie eine schnelle Schmerzlinderung verspricht, leicht durchführbar ist und keine aufwendigen Zusatzinstrumente notwendig sind. An allen großen Gelenken kann der Eingriff in der Regel arthroskopisch angewendet werden und spätere Folgeeingriffe sind uneingeschränkt möglich. In zahlreichen Studien wurde jedoch belegt, dass die Erfolge meist nur von kurzer Dauer sind, da der aus biomechanischer Sicht minderwertige Faserknorpel schnell wieder degeneriert [38].

### **1.3.4. Mikrofrakturierung**

Ein mit der Pridie-Bohrung vergleichbares Prinzip stellt die Mikrofrakturierung dar. Mit einem speziell entwickelten Stößel werden dabei ebenfalls mehrere sehr dicht beieinander liegende Löcher (Abstand der Löcher ca. 3-4 mm) gesetzt [39], so dass ebenfalls ein Einströmen von Blut in den

Defekt ermöglicht wird [33]. Die Vorteile gegenüber der oben beschriebenen anterograden Anbohrung des Defektes liegen darin, dass durch die ausbleibende Hitzeentwicklung auch die Nekrosenbildung reduziert wird. Unterschiedliches Instrumentarium ermöglicht einen Zugang zu beinahe allen Arealen innerhalb des Kniegelenks, wohingegen diese Möglichkeiten bei der Verwendung von geraden Bohrern limitiert sind. Desweiteren gestattet die durch die Mikrofrakturierung entstandene rauere Oberfläche ein festeres Anhaften des Blutgerinnsels [40]. Natürlich bildet sich auch bei diesem Verfahren lediglich ein Faserknorpel mit unzureichenden biomechanischen Eigenschaften aus. Langzeitstudien konnten allerdings zeigen, dass mehr als 10 Jahre nach dem Eingriff noch bis zu 33% beschwerdefrei und bis zu 54% der Patienten nur leichte Schmerzen verspürten [41, 42].

### **1.3.5. OATS – das osteochondrale autologe Transplantations-System**

Die Technik der autologen osteochondralen Transplantation wurde erstmals unabhängig voneinander von Müller und Wagner im Jahre 1964 vorgestellt [43]. Mit ihr war es nun möglich, gesunden hyalinen Knorpel an einen Defekt zu bringen und zudem auch den darunter liegenden Knochen zu ersetzen. Aufgrund der noch unausgereiften technischen Möglichkeiten konnte dieses Verfahren zunächst nur offen angewendet werden, wurde aber im Laufe der Zeit weiter verbessert, so dass auch ein arthroskopisches Vorgehen möglich wurde [44, 45]. Hierbei wird ein Knorpel-Knochen-Zylinder aus einem weniger belasteten Bereich des Kniegelenks, insbesondere der proximalen anterolateralen und anteromedialen Trochlea, die ein dem der Belastungszone der Femurkondylen ähnliches Oberflächenrelief besitzen, an einen Knorpeldefekt der Hauptbelastungszone transferiert. Strittig ist bisher, ob Knorpel überhaupt an unbelasteten Stellen existiert oder ob die Problematik lediglich von den belasteten in die weniger belasteten Bereiche verlagert wird. Garretson konnte jedoch in Untersuchungen nachweisen, dass gerade in den oben genannten Bereichen weniger Druckbelastung zu finden ist [46]. Empfohlen wird die OATS-Plastik bei osteochondralen Defekten, die eine Größe von 2 x 2 cm nicht überschreiten. Ist der Schaden größer, kann ein Defekt bis zu einer Fläche von

knapp 9 cm<sup>2</sup> mit der Mega-OATS-Technik versorgt werden, bei welcher die posteriore Femurkondyle in maximaler Beugung des Kniegelenks entnommen und daraus ein Knorpel-Knochen-Zylinder mit maximal 35 mm Durchmesser gefräst wird. Abhängig von der Defektgröße stellt auch die Wiederherstellung der Gelenkflächenkongruenz durch ein unregelmäßiges Knorpelniveau mitunter große Probleme dar, die eine vorzeitige Degeneration des Transplantates begünstigen. Aus diesem Grund wird von einigen Autoren die Mosaikplastik, d.h. das Transplantieren mehrerer kleinerer osteochondraler Zylinder, favorisiert [47]. Auch wenn in einigen Studien eine frühzeitige Degeneration des Transplantates gezeigt werden konnte [48], so ist diese Methode bei richtiger Indikationsstellung eine durchaus sinnvolle Therapiemöglichkeit mit guten Langzeitergebnissen [49, 50, 17].

### **1.3.6. Allogene osteochondrale Transplantation**

Bei der allogenen osteochondralen Transplantation werden bestehende Knorpeldefekte durch gesundes Knorpelgewebe aus Leichen befüllt. Hierbei handelt es sich in aller Regel um größere Läsion (> 2,5 cm<sup>2</sup>) wie sie unter anderem nach Tumorresektionen oder traumatischen Verletzungen entstehen können [51]. Etabliert wurde dieses Verfahren Mitte der 70-er Jahre [52]. Der große Vorteil gegenüber der OATS-Technik besteht in der Bereitstellung voll ausgeformter Knorpel-Knochen-Transplantate in beinahe unlimitierter Größe. In aktuellen Studien wurden Defekte bis zu einer Größe von 6 cm<sup>2</sup> behandelt. Wichtig für ein gutes postoperatives Ergebnis scheint eine möglichst zeitnahe Knorpelentnahme am Leichnam und eine möglichst rasche Implantation beim Empfänger zu sein. So sollte im Idealfall versucht werden, das Transplantat innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod des Spenders zu transplantieren. Ging man noch vor kurzer Zeit davon aus, dass eine sterile Lagerung des Transplantates bei 4°C nach 4 Wochen zu keiner signifikanten Änderung der Zellmorphologie oder der biomechanischen Eigenschaften führen würde, so konnte in einer aktuellen Studie nachgewiesen werden, dass nach Ablauf von 45 Tagen nur noch 64,6%, nach 60 Tagen sogar nur noch 51,6% der Chondrozyten überlebensfähig sind [53]. So ist es auch kaum verwunderlich, dass die Implantation von frischen Transplantaten bessere Langzeitergebnisse zeigt als

gefriergetrocknete oder nach Entnahme frisch eingefrorene Transplantate [54]. Ein weiteres Problem stellt die Immunreaktion des Empfängers dar. Scheinen initial keine Unterschiede zur autologen Chondrozytentransplantation zu bestehen, zeigen sich im Verlauf jedoch deutlich weniger aktive Chondrozyten [55]. Der größte Nachteil dieser Methode scheint allerdings die Gefahr der Übertragung von HIV oder Hepatitis zu sein. Gerade an frischen Transplantaten kann nur durch einen hohen zeitlichen und materiellen Aufwand das Risiko einer Infektion minimiert werden. Die klinischen Ergebnisse nach einer allogenen osteochondralen Transplantation zeigen jedoch durchweg gute bis sehr gute Ergebnisse mit einer Erfolgsquote von bis zu 80% nach 10 Jahren und noch 65% nach 15 Jahren [56]. Wie in den letzten Jahren angenommen wurde, scheinen die immunologische Antwort auf den implantierten Fremdkörper, ein fehlender Einbau des fremden Knochens, das daraus resultierende Absterben der Knorpelzellen und dem damit verbundenen Einbruch der Knorpelmatrix nicht primär ursächlich für ein Scheitern der Transplantation zu sein [57].

### **1.3.7. Autologe Chondrozytentransplantation**

Die Methode der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) wurde erstmals 1987 in Tierversuchen am Kaninchen beschrieben [58, 59]. Erst sieben Jahre später wurde dieses Verfahren von Brittberg et al am menschlichen Kniegelenk verwendet und publiziert. Damals waren 23 Personen mit tiefen Knorpeldefekten operativ versorgt worden [60]. In den folgenden Jahren wurde die ACT durch weitere Tierversuche verbessert [61, 62]. Diese Therapie eignet sich vor allem für Defekte, die größer als 4 cm<sup>2</sup> sind. Das Prinzip besteht darin, dass während einer ersten Gelenksarthroskopie die Knorpelläsion begutachtet und in ihrer Größe vermessen wird. In der gleichen Sitzung werden Chondrozyten aus einer wenig belasteten Gelenksregion entnommen (idealerweise zwischen 150-200 mg) und in ein Nährmedium überführt. Die Knorpelzellen werden dann bei 37°C bebrütet und unterschiedlichen Behandlungen unterzogen. Nach zwei bis drei Wochen können die Zellen dann in einem zweiten operativen Eingriff nach vorheriger Präparation und wasserdichter Abdeckung des Knorpeldefektes mit einem Periostlappen aufgebracht werden [63, 64, 65]. Mittlerweile wurden unterschiedliche

Modifikationen an diesem Verfahren vorgenommen, nachdem erkannt wurde, dass eine dreidimensionale Zellanordnung in einer Matrix für die phänotypische Stabilität von großer Bedeutung ist. So werden unter anderem Matrixsubstanzen wie Alginat, Fibrin oder Polymere als Trägersubstanzen erprobt bzw. bereits verwendet [66, 67, 68, 20]. Die Weiterentwicklung der ACT in eine matrix-assoziierte Transplantation (MACT), in der während der letzten Kultivierungsphase die Einbettung der Chondrozyten in eine dreidimensionale Matrix erfolgt, wurde erstmals 1999 von Behrens et al. beschrieben [69]. Seine Arbeitsgruppe setzte die Chondrozyten im letzten Kultivierungsschritt in eine Kollagen-I/III-Membran. Die Membran wurde nach dem Einbringen in den Defekt zusätzlich mit Fibrinkleber fixiert. Eine wasserdichte Naht zur Verankerung der Matrix, wie dies bei der klassischen ACT durch intakten Knorpel durchgeführt werden musste, war deshalb nicht mehr notwendig. So wurde dadurch eine einfachere intraoperative Handhabung mit einer Verkürzung der Operationszeit erreicht [70].

So interessant diese Technik auch erscheinen mag, hat sie doch nicht zu verachtende Nachteile: der Patient muss sich zweimal einem chirurgischen Eingriff unterziehen (Knorpelzellentnahme und Replantation), es sind lange Perioden der postoperativen Behandlung notwendig (Entlastung der betroffenen Extremität bis zu 6 Wochen mit darauf folgendem langsam beginnendem Belastungsaufbau), es entstehen hohe Kosten (zwei Operationen, Zellkultivierung in einem externen Institut) und es wird ein Knorpeldefekt an der Chondrozytenentnahmestelle gesetzt [71].

Langzeitergebnisse liegen bisher nicht vor. Peterson et al. werteten insgesamt 101 Patienten im Zeitraum zwischen zwei und sieben Jahren nach durchgeführter ACT am Kniegelenk bezüglich der klinischen, arthroskopischen und histologischen Ergebnisse aus. Eine Besserung der Beschwerden bis hin zur Beschwerdefreiheit konnte abhängig von der Lokalisation des Knorpeldefekts in 65-92% der Fälle erreicht werden. In den 37 arthroskopisch entnommenen Biopsien konnte hyalinartiger Knorpel nachgewiesen werden [72]. Eine weitere Studie aus den USA an 45 Fußballspielern, die sich 41 +/- 4 Monaten zuvor einer ACT unterzogen hatten, berichteten 72% von ihnen über gute bis exzellente Ergebnisse. 33% der Spieler kehrten zum Fußballspiel zurück, 80% davon

konnten auch insgesamt knapp 54 Monate nach der Operation wieder in ihrer alten Liga spielen. Diejenigen, die ihren Beruf wieder aufgreifen konnten, waren jedoch signifikant jünger und hatten vor dem Eingriff eine deutlich kürzere Schmerzanamnese als die Vergleichsgruppe [73]. In unabhängigen Studien konnte über einen Zeitraum von 2 bis 5 Jahren eine Besserung bis hin zur Schmerzfreiheit bei 71% der Patienten erreicht werden [74, 75].

Die aktuelle Entwicklungstendenz geht in Richtung Implantation zellfreier Gerüststoffe. Bei der AMIC – der sog. autologen matrixinduzierten Chondrogenese – wird die bekannte Mikrofrakturierung mit einer Kollagenmembran und Fibrinkleber kombiniert. Dabei entfällt ein zweizeitiges operatives Vorgehen. In ein und demselben Eingriff wird der Knorpeldefekt saniert, eine Mikrofrakturierung durchgeführt, der Defekt im Anschluss daran mit einem Kollagengerüst bedeckt und mittels Fibrinkleber fixiert. Erste mittelfristige Studien mit guten Ergebnissen wurden bereits veröffentlicht [76, 77].

### **1.3.8. Endoprothetik**

Als ein letzter Ausweg bleibt nach Ausschöpfung aller o.g. Möglichkeiten nur noch die Implantation einer Endoprothese. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland laut statistischem Bundesamt 213.935 Hüftendoprothesen und 158.207 Knieendoprothesen eingesetzt [78]. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass weltweit mit steigender Tendenz mehr als 500.000 Knieendoprothesen jährlich implantiert werden [79]. Derzeit haben Endoprothesen am Kniegelenk eine 10-Jahres-Überlebensrate von mehr als 90% [80]. Gründe für das Versagen bzw. einen Revisionseingriff stellen u.a. die septische und aseptische Lockerung und der Materialverschleiß dar [81], wobei die aseptische Lockerung als Hauptursache eines Prothesenwechsel angesehen werden kann [82]. Aus den bereits erwähnten Gründen lässt sich ganz klar ersehen, dass die Endoprothesenimplantation gerade bei jüngeren, aktiven Patienten nicht die Methode der Wahl darstellt. Gerade bei septischen Prothesenlockerungen bleibt nach einer ausreichenden Sanierung des Infektes als letzter Ausweg manchmal nur noch die Arthrodesse des betroffenen Gelenks [83]. Auch wenn durch diese Maßnahme eine dauerhafte Belastbarkeit, erhöhte Stabilität und niedrige Reinfektionsrate mit einer insgesamt verbesserten Lebensqualität resultiert, so

bedeutet sie dennoch eine nicht unerhebliche Alltagseinschränkung für den einzelnen Patienten.

## 1.4. Aktuelle experimentelle Therapieansätze

Aus den zuvor genannten Punkten lässt sich ersehen, dass es aus medizinischer und sozioökonomischer Sicht außerordentlich wichtig wäre, eine einfache, kostengünstige, langfristig wirksame, minimalinvasive und vor allem schnelle Möglichkeit zu finden, Knorpel zu regenerieren. Mit der autologen Chondrozytentransplantation ist es erstmals gelungen, ein Verfahren des Tissue Engineerings klinisch erfolgreich einzusetzen. Dieser Begriff steht als Überbegriff eines neuen, multidisziplinären Arbeitsfeldes, das aktuelle zell- und molekularbiologische Aspekte, Material- und Technikwissenschaften sowie Chemie- und Medizinwissenschaften mit dem Ziel vereint, Knorpelersatzpräparate zu erschaffen, die sich in ihrer zellulären und biologischen Struktur in die Biomechanik des Menschen vollständig integrieren [84]. Dabei werden unterschiedliche Wege eingeschlagen: zum einen die Chondrogenese *in vitro* mit einer späteren Injektion der Chondrozyten an die Defektstelle, das Aufbringen der *in vitro* gezüchteten Chondrozyten auf Trägermaterialien oder die intraoperative Mikrofrakturierung mit anschließendem Einsetzen eines Vlieses [85].

### 1.4.1. Chondrogenese und Auswahl des Zelltypus

Um Chondrozyten *in vitro* zu züchten, werden ausdifferenzierte Zellen verwendet, die sich nach einer Zellisolation expandieren lassen und die benötigten Matrixmoleküle, Kollagen Typ II und Aggrecan produzieren. Diese Art der Zellkultivierung aus autologen Ausgangszellen wird bei der ACT (autologen Chondrozytentransplantation) verwendet [86]. Dafür gibt es jedoch einige Einschränkungen. Chondrozyten aus hyalinem Knorpel sind nur in einem begrenzten Rahmen im menschlichen Körper verfügbar und müssen erst durch einen gesonderten operativen Eingriff gewonnen werden [87]. Wenngleich gute Langzeiterfahrungen damit nachgewiesen werden konnten, machen das Verfahren zwei operative Eingriffe und eine Kultivierung der Zellen für die

Versorgung von Knorpeldefekten unkomfortabel für den Patienten und ökonomisch gesehen sehr teuer. Eine Chondrozytenbank, von welcher allogene Zellen bestellt werden könnten, existiert derzeit nicht, was sicherlich auch in den bisher unbefriedigenden Ergebnissen allogener gegenüber autologer Zelltransplantationen begründet liegt [88, 89].

Im Idealfall einer Züchtung entsprechen sich Ausgangs- und Endzelle. Die Chondrozyten der verschiedenen Knorpelschichten sind aber nicht alle identisch, sondern haben, eben den Knorpelschichten angepasste, unterschiedliche Eigenschaften. Wird ein über alle Schichten gewonnenes Knorpelpräparat enzymatisch gespalten, so erhält man Einzelschichten mit vier unterschiedlich differenzierten Chondrozyten. Zwar können durch verschiedene Nährmedien einzelne Subpopulationen selektiv gegenüber den anderen Zellen vermehrt werden, es bleiben aber dennoch alle vier Zellreihen erhalten. Bei der späteren Transplantation finden sich dann vier enddifferenzierte Chondrozytenpopulationen an unterschiedlichen Stellen im dreidimensionalen Defekt [90]. Zudem kommt es durch die Amplifizierung in Monolayerkulturen zu einer Dedifferenzierung der Zellen mit fibroblastenähnlichem Aussehen und deutlich verminderter Expression von Kollagen Typ II, die derzeit nur in ersten experimentellen Ansätzen wieder redifferenziert werden können [91]. Entscheidend für die spätere Güte des Regeneratgewebes mit – im Idealfall – hyalinem Knorpel sind jedoch nicht die differenzierten Zellpopulationen selbst, sondern die umgebende Matrix, die von den differenzierten Chondrozyten produziert werden müsste.

Unter Berücksichtigung aller oben genannten Gründe würde die Verwendung undifferenzierter Zellen, die im menschlichen Körper in Form von Stammzellen vorhanden sind und sich erst *in vitro* oder *in vivo* zu Chondrozyten differenzieren würden, beträchtliche Vorteile mit sich bringen. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass sich menschliche Stammzellen unterschiedlicher Herkunft in Chondrozyten differenzieren lassen [92, 93, 94, 95, 96]. Caplan prägte daher den Begriff der mesenchymalen Stammzelle [97] und konnte nachweisen, dass diese sich unter bestimmten äußeren Bedingungen über die Chondroprogenitorzelle, den Chondroblasten, die Chondrozyten I und II zum hypertrophen Chondrozyten entwickeln kann [98, 99, 100]. Finden sich beim

Neugeborenen noch etwa  $10^2$  MSCs (mesenchymale Stammzellen) pro  $10^6$  kernhaltige Zellen, so sind es beim Fünfzigjährigen nur noch etwa 2 pro  $10^6$  [98]. In unterschiedlichen Tiermodellen wurden die gewonnenen MSCs bisher eingesetzt, um Gelenkknorpeldefekte zu heilen. Nach neuerer Studienlage scheinen mesenchymale Stammzellen neben dem Bewegungsapparat auch für Kardiomyozyten, Endothelzellen, Perizyten und sogar für Zellen mit neuronalem Charakter zuständig zu sein, was auch für andere Fachdisziplinen in der Zukunft von Bedeutung sein könnte und die Pluripotenz dieser Zellen unterstreicht [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107].

Mittlerweile beschäftigen sich weltweit viele Forschungsgruppen mit der Differenzierung von Chondrozyten aus mesenchymalen Stammzellen. Bisher ist es jedoch nur gelungen, einen hyalinartigen Knorpel zu züchten, der bei weitem nicht die Qualität eines hyalinen Knorpels besitzt [108, 109, 110, 111, 20].

#### **1.4.2. Kulturformen**

Die Art der Kultivierungsmethode hängt essentiell von der Art der verwendeten Zellpopulation ab. Die einfachste Form stellt die Monolayerkultur dar, auf welcher die aus einer Biopsie gewonnenen Chondrozyten ausgesät werden. Unglücklicherweise sind Monolayerzüchtungen mit einer Chondrozytendedifferenzierung verbunden, die eine Zunahme der Expression von Kollagen Typ I bei gleichzeitiger Abnahme von Kollagen Typ II, Integrinen, Wachstumsfaktoren und Proteoglykanen bewirken [112, 113]. Deshalb werden den Kulturen verschiedene Substrate und Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF-2 (fibroblast growth factor-2) zugefügt, welche die Chondrozyten davor schützen oder zumindest den Prozess verlangsamen, sich zu dedifferenzieren [114, 115, 116]. Im Vergleich zu den Monolayerkulturen erzielen Pelletkulturen eine höhere mRNA-Rate für Kollagen Typ II und produzieren deutlich mehr GAG [114, 108]. Der Grund hierfür scheint eine höhere Zelldichte und ein hoher Zellkontakt zu sein. Weiterhin wurden dreidimensionalen Kulturen, wie z.B. Agarose, Alginate-Perlen und Fibrinkleber entwickelt, die den Chondrozyten vor einer Dedifferenzierung schützen sollen [117, 118]. Es wurde eine Vielzahl an Versuchen unternommen, diese Systeme stetig zu verbessern. Neben weiteren 3-D-Gerüsten wurden auch sog. Bioreaktoren entwickelt, als deren Ziel ein

möglichst gleichmäßiges Nährstoffangebot bei ausgeglichenem Kontakt jeder Zelle zum Kulturmedium und ein gleichförmiger Gasaustausch angestrebt wurde. Als einfachste Form können dabei in rotierenden Reaktoren zentripetale Kräfte auf die Chondrozyten wirken, die eine bessere Differenzierung und Matrixproduktion der Knorpelzellen erreichen [119]. Zudem wurden Versuche unternommen, die zeigten, dass bei erniedrigtem O<sub>2</sub>-Partialdruck [120] und der Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF-β (transforming growth factor-β) [121, 122], FGF (fibroblast growth factor) [115] oder IGF (insuline-like growth factor) [123, 124] in Verbindung mit den zuvor genannten Systemen eine höhere Ausbeute intakter Chondrozyten möglich war. Eine neuere Gruppe der Wachstumsfaktoren stellen die „cartilage-derived morphogenetic proteins (CDMPs) dar, die auf der Suche nach selektiven Wachstumsfaktoren entdeckt wurden [125, 126].

### 1.4.3. Trägersubstanzen

Es wurden bereits viele unterschiedliche Trägermaterialien verwendet, um den chondralen sowie den osteochondralen Defekt zu beheben. Um die Systematik zu erleichtern, können diese Stoffe in drei große Gruppen gegliedert werden.

#### *Natürliche Polymere*

Zu diesen zählen in erster Linie Proteine, Polypeptide, Polysaccharide und Polyhydroxyalkanoide wie z.B. Agarose, Alginat, Cellulose und Kollagen. Obwohl im hyalinen Knorpel kein Kollagen Typ I vorkommt, wird als Trägerstoff doch oft Kollagen Typ I verwendet. Der große Vorteil gegenüber Kollagen Typ II liegt darin, dass Kollagen Typ I aufgrund der geringeren Anzahl an Glykosidgruppen, dem Fehlen von Tryptophan und dem eher seltenen Auftreten von Tyrosin weniger immunologische Reaktionen hervorruft [127]. Mitunter ist jedoch die mechanische Belastbarkeit erniedrigt und die Beeinflussung durch enzymatische Abbauvorgänge erhöht [94].

### *Synthetisierte Polymere*

Dies führte zur Entwicklung synthetischer Polymere. Diese Systeme bieten eine große Vielfalt an chemischer und verarbeitbarer Bandbreite. Die populärsten unter ihnen beinhalten Poly- $\alpha$ -Hydroxysäure, wie z.B. PLA (poly lactid acid) oder PGA (poly glycolic acid), Poly- $\epsilon$ -Caprolactone, Polydioxanone, Polycarbonate oder Polyphosphate [128]. Eine sehr elegante Form synthetischer Polymere stellen die Hydrogele dar [129]. Diese bilden ein durch Wasser aufgequollenes Netzwerk, das mit Zellen und Agenzien jeglicher Art beladen werden kann. Sie können dann als Grundgerüst injiziert oder minimal-invasiv im Defekt platziert werden. Dabei spielen Größe und Form des Knorpeldefektes eine untergeordnete Rolle. Obwohl deren mechanische Eigenschaften durch weitere Vernetzung verbessert werden können, sind diese doch limitiert und scheinen die Hauptursache der eher zurückhaltenden Verwendung zu sein [130].

Ein Vergleich der natürlichen gegenüber den synthetischen Polymeren zeigt, dass es sowohl innerhalb derselben als auch der beiden Polymergruppen untereinander große Unterschiede gibt. Als ein Beispiel sei die signifikant höhere Chondrozytenproliferation auf PGA- bzw. PLA- im Vergleich zu Kollagenvliesen genannt. Aus aktueller Sicht muss den künstlich synthetisierten Polymeren derzeit der Vorzug gegeben werden [131]. Kontrovers diskutiert wird dabei jedoch immer wieder das Auftreten von Fremdkörperreaktionen durch die sauren Abbauprodukte von PGA- bzw. PLA-Polymeren, die bereits 1987 erstmals von Böstman et al. nach Implantationen von PGA-Stiften an Sprunggelenken beschrieben wurden [132]. Dabei können die Reaktionen von klinisch stummen osteolytischen Veränderungen bis hin zu intensiven entzündlichen Weichteilveränderungen reichen [133, 134, 135].

### *Keramik, Glas und Verbundstoffe*

Bei osteochondralen Defekten ist aber neben der Knorpelersatzschicht auch ein Knochenersatz notwendig, der durch Keramik, z.B. Hydroxyapatit oder andere kalziumphosphathaltige Keramikarten, oder bioaktives Glas, z.B. Bioglass<sup>®</sup>, aufgefüllt werden kann. Diese Materialien werden seit längerem als Knochenersatzstoffe in der Chirurgie und Orthopädie verwendet. Sie sind dafür bekannt eine knochenähnliche Apatitschicht auf der Oberfläche zu bilden und

sich fest mit dem umliegenden Knochen zu verbinden [136]. Nun können diese anorganischen Stoffe noch mit den natürlichen oder synthetisch hergestellten Polymeren kombiniert werden und vereinen dadurch die Vorteile beider Systeme [128].

Alle aufgeführten Materialien lassen sich durch strukturelle Modifikationen als Netz, in Form eines Gerüsts oder Schwämme verwenden. Derzeit finden primär dreidimensionale, poröse Implantate und Hydrogele Verwendung.

#### **1.4.4. Mechanische Stimulation**

Bereits im Jahre 1827 erkannte Andral den Einfluss eines mechanischen Stimulus auf die Differenzierung und den Metabolismus von Zellen. Er beschrieb die chondrogene Transformation mesenchymalen Gewebes am Beispiel der fibrocartilaginären Differenzierung der Aorta [137]. Knapp 60 Jahre später wurde diese Beziehung zwischen Knochenumbau und mechanisch wirkenden Kräften von Wolff wieder aufgegriffen, der aufzeigte, wie sich Knochendichte und Spongiosaarchitektur abhängig von der auftretenden Belastung verändern und formulierte daraus das „Gesetz der Transformation der Knochen“ [138]. Basierend auf den Erkenntnissen von Andral und Wolff postulierte schließlich Pauwels die Theorie der „Kausalen Histiogenese“ [139].

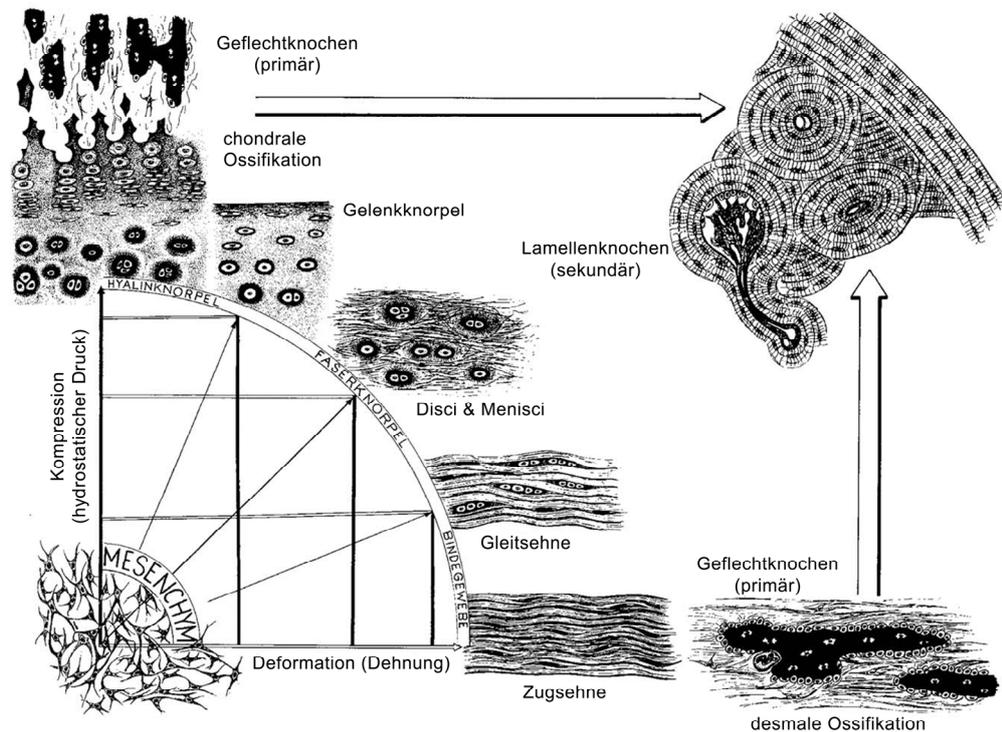


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Theorie der „Kausalen Histiogenese“ nach Pauwels [140]

Er vermutete, dass Zellen zwischen einer Deformation ohne Druckanstieg und einem Druckanstieg ohne Deformation unterscheiden und auf unterschiedliche Weise reagieren können. Die von Pauwels nur aus der Beobachtung formulierte Theorie konnte von Kummer mathematisch bestätigt und untermauert werden. Er konnte nachweisen, dass sich durch die Anwendung von Pauwels Überlegungen die Knochendichteverteilung bei gegebener Form und Belastung mit hinreichender Genauigkeit den natürlichen Bedingungen annähern lässt [140].

In umfangreichen Untersuchungen wurde als chondrogener Stimulus sowohl der Einfluss des hydrostatischen Drucks als auch der dynamischen Kompression nachgewiesen [141, 142, 143]. Abgesehen von den mittlerweile umfassend vorliegenden *in vitro* Befunden vermutete Gomar-Sancho bereits 1987 die pluripotente mesenchymale Stammzelle als Regenerationsursprung. Es konnte gezeigt werden, dass iatrogen gesetzte, osteochondrale Defekte an belasteten Stellen im Kniegelenk eines Kaninchens nach vier Wochen lichtmikroskopisch hyalinartige Knorpelanteile aufwiesen, welche aber vor einer

weiteren Reifung zu tatsächlichem hyalinem Knorpel innerhalb von zwölf Wochen degenerierten und zu tiefen Ulzerationen des neugebildeten Knorpels führten [144]. Vermutet wurde dahinter, dass der neu gebildete Knochen in der Tiefe noch keine ausreichende Festigkeit besaß, um den auftretenden Belastungen standzuhalten und somit die physikalischen Bedingungen für die Ausbildung von normalem hyalinem Knorpel nicht gegeben waren. Bestätigt wurden diese Beobachtungen bei der Verwendung resorbierbarer Knorpel-Knochen-Ersatztransplantate, die ebenfalls am Kaninchenmodell eingesetzt wurden [20]. 8 Wochen nach dem Setzen einer Knorpel-Knochen-Läsion konnte bei den Leerlochpräparaten im betroffenen Areal eine bindegewebige Narbe nachgewiesen werden, wohingegen bei den Tieren, die mit dem Knorpel-Knochen-Ersatztransplantat versorgt worden waren, eine komplette Durchbauung der Knochenersatzschicht aufgezeigt wurde.

Doch die mechanische Belastung führt nicht nur zu einer Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, sondern gleichzeitig auch zur Biosynthese der extrazellulären Matrix [145]. Abhängig von der Art und Ausprägung der aufgewendeten Kräfte kann aber auch eine Verminderung der Genexpression erreicht werden [146, 147, 148]. In einer aktuellen Studie konnte sogar gezeigt werden, dass die Genexpression unterschiedlicher Matrixbestandteile von einer zuvor durchgeführten Dehnung der Chondrozyten beeinflusst werden kann. So wurde z.B. durch eine Zelldehnung um 3% an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils zwei Stunden *in vitro* eine Reduzierung von Aggrecan bis zu 21-fach, Lubricin bis zu 5-fach, Kollagen Typ I bis zu 10-fach und Kollagen Typ II bis zu 2,9-fach festgestellt. Eine nur leichte Streckung um 0,5% dagegen führte zu einer bis 3,8-fachen Verminderung von Aggrecan, Kollagen Typ I und Kollagen Typ II und zu einer 2-fachen Steigerung der Expression von Lubricin [149].

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es durch die mechanische Beeinflussung der Zellen *in vitro* zu einer besser steuerbaren Differenzierung der gezüchteten Zelllinie kommen und dadurch möglicherweise eine Verbesserung der Matrix erreicht werden könnte.

## 2. Aufgabenstellung

Alle bisherigen Ausführungen haben gezeigt, dass zwar bereits gute Ansätze *in vitro* und *in vivo* vorhanden sind, osteochondrale Defekte zu reparieren, dass es aber bisher noch nicht möglich ist, eine suffiziente und vor allem dauerhafte Versorgung der Knorpeldefekte zu erreichen. In den obengenannten Studien wurde in erster Linie der osteochondrale Defekt durch Bioimplantate mit dreidimensionalen Gerüsten verwendet, für die zuvor ein dem Implantat entsprechender, zylindrischer Defekt gesetzt werden musste. In unzähligen Arbeiten konnte in erster Linie *in vitro* eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aufgrund unterschiedlicher Einflussfaktoren wie mechanische Belastung, unterschiedliches Kulturmilieu oder verschiedenartige Trägersubstanzen in Chondrozyten nachgewiesen werden. Allerdings waren die Erfahrungen an Versuchstieren bis dato wenig erfolgreich, da sich zwar in den ersten Wochen durchaus hyalinartiger Knorpel gebildet hatte, dieser sich aber innerhalb kürzester Zeit in mechanisch deutlich schlechteren Faserknorpel umdifferenziert hatte [144, 20]. Sollten die bisherigen Misserfolge tatsächlich von den belastungsinstabilen Situationen im osteochondralen Defekt abhängen, so müsste ein rein chondraler Schaden, bei dem die subchondrale Platte noch intakt ist, theoretisch ideale Voraussetzungen für eine Regeneration des Knorpels bieten, da somit eine belastungsstabile Situation gegeben wäre.

Ziel dieser Dissertation sollte deshalb die Untersuchung eines Implantates sein, welches die Proliferation und Differenzierung von Zellen ermöglicht und gleichzeitig eine Induktion von hyalinem Knorpel bei mechanischer Belastung zulässt. Verglichen wurden die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Trägersubstanzen mit dem bereits etablierten Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation und einer Leerlochgruppe. Um den Nachteil eines Zweiteingriffs zur Entnahme der Chondrozyten, wie dies bei der ACT notwendig ist, zu umgehen, sollten die Implantate direkt und indirekt mit mesenchymalen Stammzellen in Kontakt kommen.

Folgende Anforderungen wurden an die verwendeten Implantate gestellt:

1. Das Material durfte die Dicke von 1 mm nicht überschreiten, um nicht über das Knorpelniveau des Kniegelenks beim Schaf herauszuragen und durch Inkongruenzen ungleiche Druckbelastungen auszulösen, die dadurch möglicherweise die Induktion von Knorpel verhindern würden.
2. Die Implantate sollten offenporig sein, um den einwandernden Zellen genug Ankerplatz zum Einwachsen zu bieten.
3. Die dreidimensionale Struktur sollte ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweisen, um für die Proliferation, Zelladhäsion und Matrixproduktion ausreichend Raum zu liefern.
4. Die Fixierung sollte möglichst wenig invasiv sein, um den umliegenden Knorpel und die subchondrale Platte zu schonen.
5. Sowohl die Trägersubstanz als auch das Fixierungsmaterial sollten biokompatibel und resorbierbar sein, um Entzündungs- und möglicherweise dadurch auftretende Degenerationsprozesse zu vermeiden.

Für unsere Anforderungen erschienen zwei Trägerstoffe zweckmäßig: Vliese aus Kollagen Typ I und aus Polyglycol-Säure, die in früheren Studien an Kaninchen bereits erfolgreich eingesetzt wurden [20]. Nun sollte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Regeneration der Gelenkfläche allein durch biomechanische Induktion in Zusammenarbeit mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgen kann, wobei die Stammzellen bei einem Teil der Tiere durch die subchondrale Platte einwandern, bei dem anderen Teil dagegen durch direkte Beimpfung der Trägersubstanzen mit intraoperativ gewonnenem Knochenmark erfolgen sollte [150]. Abschließend sollten die Präparate hinsichtlich der Regeneratergebnisse verglichen werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Die Bioimplantate**

#### **3.1.1. Erläuterungen zu den verwendeten Implantaten und Materialien**

Es wurden bei den Versuchstieren zwei unterschiedliche Polymere implantiert. Zum einen fand ein natürliches Vlies aus Kollagen I, zum anderen aus synthetisch hergestelltem PGA (poly glycolic acid) Verwendung. Die Implantate wurden so konstruiert, dass die weiche Knorpelersatzschicht den zuvor gesetzten chondralen Defekt vollständig abdeckt.

Der Kollagenschwamm wird durch einen Lyophilisationsprozess aus equinen Kollagen Typ I-Fasern hergestellt. Eine Vernetzung der Fasern wird durch eine ultraviolette Bestrahlung erreicht, die dadurch Poren von 120-200 µm entstehen lässt. Durch eine abschließende radioaktive Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen wird die Sterilität des Produktes gewährleistet. 1 cm<sup>2</sup> des fertigen Kollagenpräparates besteht aus etwa 2,8 mg Kollagen Typ I. Das Nettovolumen entspricht 7/10 des Ausgangsvolumens. Ohne eine Vernetzung würden amorphe Hydrogele entstehen, in die keine Zellen einwandern könnten. Morphologisch lassen sich zwei Seiten bezüglich der Oberflächenstruktur unterscheiden: eine glatte Seite, welche während des Lyophilisationsprozesses der Verpackungsschale anliegt, und eine raue Seite mit höherer Porosität. Die Präparate wurden von der Fa. B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland, bereits als kreisrunde, 8 mm im Durchmesser und maximal 1 mm in der Dicke messende Implantate geliefert. Beim Einsetzen der Präparate wurde darauf geachtet, dass die raue Oberfläche der osteochondralen Platte auflag, um das Einwandern von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Poren des Vlieses zu ermöglichen.

Das PGA-Vlies wird aus der Polyglycol-Säure hergestellt, die den einfachsten linearen, aliphatischen Polyester darstellt. PGA ist bereits seit 1954 als hartes Faser-Polymer bekannt, wurde aber aufgrund seiner zunächst hydrolytischen Instabilität nur begrenzt verwendet. Die Synthese erfolgt durch

eine Ringöffnung der Glykolide (zyklischer Diester der Glycolsäure) und anschließenden Polymerisation. Dadurch wird ein Produkt mit hohem Molekulargewicht und großen Poren erzeugt. Die vollständige Polymerresorption vom Organismus wird in einem Zeitraum von etwa 6 Monaten erzielt. Das 3-dimensionale Vlies besteht aus 14 µm großen Filamenten. Auch hier betrug der kreisrunde Durchmesser 8 mm, die Dicke knapp 1 mm. Diese wurden ebenfalls von der Fa. B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland, als sterilisierte, gebrauchsfertige Produkte geliefert. Bei diesen Implantaten musste keine Seitenzuordnung beachtet werden.

Die Fixierung der jeweiligen Bioimplantate im subchondralen Knochen erfolgte durch einen zentralen Pin mit aufgesetztem Kopf aus Polylactid LDL Co 70/30 mit einer standardisierten Länge von 8,7 mm, einem Dart-Durchmesser von 0,5 mm und einem Kopfdurchmesser von knapp 1 mm. Die Resorptionszeit beträgt im Organismus 1½ bis 2 Jahre. Hergestellt wird dieses Co-Polymer aus 70 % L-Lactid und 30 % DL-Lactid. Die Sterilisation erfolgte mit Ethylenoxid. Das gebrauchsfertige Produkt wurde von der Fa. B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland, geliefert.

Zur Fixierung von Stammzellen wurde zusätzlich Fibrinkleber benutzt. Dieser findet seit langer Zeit als physiologischer Zweikomponentenklebstoff biologischen Ursprungs in der Medizin zum Wundverschluss, zur Nahtsicherung, zur Blutstillung, u. ä. Verwendung. Die beiden Bestandteile sind zum einen Fibrinogen, Faktor XIII und Aprotinin, zum anderen Thrombin und Kalziumchlorid. Der Klebstoff wird erst unmittelbar vor Gebrauch aus den beiden Komponenten gemischt. Dabei spaltet Thrombin das Fibrinogen in Fibrin und aktiviert gleichzeitig den Faktor XIII zu Faktor XIIIa, welcher zu einer Vernetzung des Fibrins führt. Aprotinin verzögert die Fibrinolyse, die Kalziumionen im Kalziumchlorid sind für eine intakte Gerinnung unerlässlich. Gewonnen werden Fibrinogen, Thrombin und Faktor XIII aus menschlichem Blutplasma, das Aprotinin aus Rinderlungen. Der während der Versuche verwendete Fibrinkleber (Beriplast P Combi-Set) wird vertrieben von der Fa. CSL Behring GmbH, Marburg.

Für die ACT wurde das von der Firma TETEC® AG vertriebene NOVOCART®3D verwendet. Dieses System besteht aus einer Kombination von

autologen Knorpelzellen und einer biphasischen, dreidimensionalen kollagenbasierten Matrix aus Kollagen Typ II. Es wird heute häufig zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte benutzt, besitzt eine hohe Vitalität, ermöglicht eine einfachere operative Versorgung im Vergleich zur zellsuspensionsbasierten ACT und muss drei Wochen nach der Knorpelentnahme wieder implantiert werden.

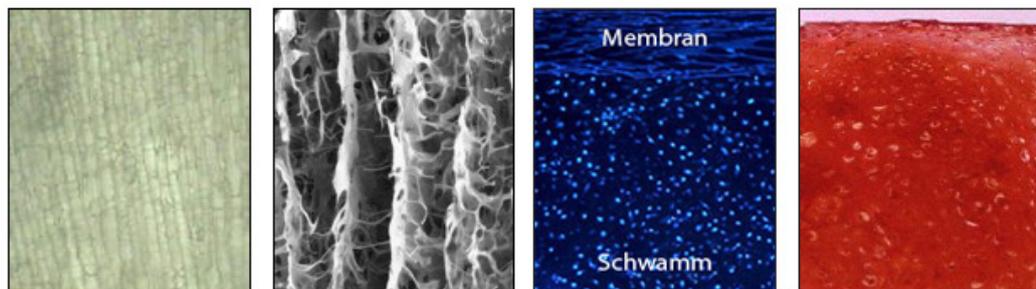


Abbildung 3.1: Darstellung der ACT-Implantate. Ganz links: lichtmikroskopische Abbildung des Kollagenschwammes. Links: elektronenmikroskopische Abbild. Rechts: Im Schwamm lässt sich eine homogene dreidimensionale Zellverteilung einstellen. Ganz rechts: Nach Einsaat phänotypisch stabiler humaner Chondrozyten in die biphasische Matrix erfolgt die Regeneration von hyalinem Knorpelgewebe (Safranin-O-Färbung) [151].

### 3.1.2. Instrumentarium

Für das Setzen der chondralen Defekte, die Mikrofrakturierung und die Fixierung von Bioimplantaten und ACT-Präparaten wurden von der Fa. B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland, drei unterschiedliche Instrumentarien eigens für diesen Zweck gefertigt.

Zunächst erfolgte das Abtragen der Knorpelschicht. Mit Hilfe einer 8 mm messenden Konkavfräse mit zentralem Führungsdorn konnte der chondrale Defekt ohne Verletzung der osteochondralen Platte manuell unter vorsichtigem Drehen gesetzt werden. Der Führungsdorn verhinderte dabei das Verrutschen des Instruments während des Fräsvorgangs. Außerdem hatte dieser mit 1,6 mm Durchmesser und einer Länge von 18 mm dieselben Maße wie der später zur Verankerung genutzte Pin, so dass die durch den Führungsdorn verursachte Verletzung der osteochondralen Platte damit wieder verschlossen wurde.

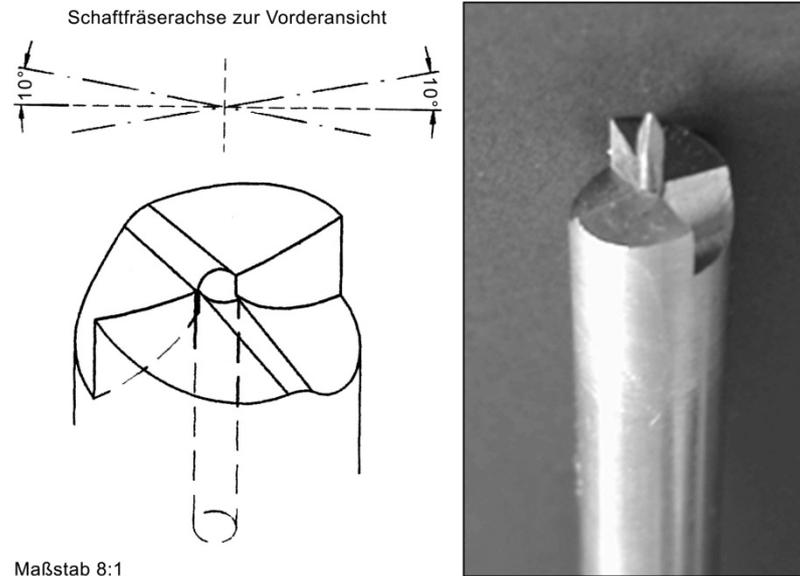


Abbildung 3.2: Instrumentarium zum vorsichtigen Abtragen der Knorpelschicht unter Schonung der osteochondralen Platte. Zur genaueren Führung und besseren Fixierung wurde ein zentraler Führungsdorn eingesetzt [152].

Danach wurden mit einem Schlagwerkzeug die für die Mikrofrakturierung notwendigen Durchbrechungen der subchondralen Platte vorgenommen. Es handelte sich dabei um insgesamt vier Dorne, die fest an einem Metallstab verankert waren. Zentral lag wieder ein Führungsdorn, der denselben Durchmesser wie jener der Konkavfräse aufwies. Dieser Dorn war auch 18 mm lang. Die symmetrisch darum angeordneten Dorne hatten eine Länge von 10 mm und einen Durchmesser von ebenfalls 1,6 mm.

Die Fixierung der Implantate wurde durch einen zentralen Pin erreicht. Dafür wurde das Bioimplantat in eine eigens gefertigte Haltevorrichtung eingelegt, in welche zuvor der Dart eingesetzt worden war. Das beladene Instrument wurde mittig auf den Defekt gesetzt und mit vorsichtigen Hammerschlägen konnte der Pin in das zentrale Führungsloch eingestößelt werden. Durch den Dartkopf wurde das Vlies letztendlich fest mit der subchondralen Platte verbunden, wobei der Kopf nicht über das Vliesniveau herausragte.

### 3.2. Tiermodell

Es wurden insgesamt 15 mindestens 1-jährige, weibliche Merino-Schafe für diese Versuche ausgewählt. Die Tiere waren von Größe und Statur in etwa ähnlich ausgesucht worden.

Ebenso wie beim Menschen handelt es sich beim Schaf um einen langsamen Knorpel- und Knochenbildner. Daher besitzt es einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Kaninchen als Tiermodell [153]. Die meist stehende Lebensweise der Schafe erlaubt eine gleichmäßigere und vor allem bessere mechanische Belastung der Bioimplantate zur Induktion der Knorpelbildung.

Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Tiere, wie dies von der Kommission vorgegeben war, von einer Veterinärgynäkologin auf eine mögliche Schwangerschaft hin untersucht, da die Tiere bis zur Aufnahme in die Reihe der Versuchsschafe in einer großen Schafherde beider Geschlechter direkt beim Züchter aufgewachsen waren. Bei zwei Tieren wurde eine Schwangerschaft diagnostiziert, so dass diese noch ausgetauscht werden mussten.

Es wurden 5 Vergleichsgruppen gebildet. Auf eine sechste Gruppe als Kontrollgruppe konnte verzichtet werden, da hier auf die Ergebnisse aus einer vorangegangenen Versuchsreihe der eigenen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson zurückgegriffen werden konnte [152, 154, 155].

Die nachfolgend geschilderten chirurgischen Eingriffe wurden vor Beginn der Versuchsreihe unter der Nummer 55.2-1-54-2531-74-04 von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 3.3. Operation

Präoperativ wurden alle 15 Schafe in einem Stall mit Freilaufgehege gehalten. Die Eingriffe wurden im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt. 24 Stunden vor dem Eingriff wurden die Tiere nüchtern gehalten, bekamen jedoch Wasser ad libitum. Am ersten Operationstermin wurden insgesamt 12 Schafe operiert, wobei an den Tieren 7 bis 9 lediglich Knorpel am rechten Kniegelenk für die geplante ACT entnommen wurde.

Präoperativ bekamen die Schafe eine Kombinationsinjektion von Diazepam 0,2mg/kg (Diazepam® Desitin Injektionslösung 10 mg, Desitin Arzneimittel, Hamburg, Deutschland), Xylazin 0,1-0,2mg/kg und Ketaminhydrochlorid 15mg/kg (Ketavet®, Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) intramuskulär. 5 Minuten nach der Erstinjektion konnten die Tiere in den Operationssaal gebracht werden. Präoperativ erfolgte eine Markierung der Tiere mit Ohrplomben, die mit einer individuellen Nummer zur späteren Identifizierung beschriftet wurden. Die Schafe wurden auf dem Operationstisch auf die rechte Körperseite gelegt und der linke Hinterlauf in Abduktionsstellung fixiert. Das linke Kniegelenk wurde großflächig enthaart und entfettet. Danach wurde das Operationsgebiet mit Skinsept (Fa. ECOLAB®, Österreich) desinfiziert und mit Hilfe eines Lochtuches kreisförmig abgedeckt. Am OP-Tisch stand ein Operateur zusammen mit einem Assistenten. Ein weiterer Assistent fungierte als Helfer zum sterilen Anreichen der notwendigen Utensilien. 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 ein anteriorer und ein posteriorer, kreisrunder chondraler Defekt unter Schonung der osteochondralen Platte von acht Millimetern Durchmesser gesetzt. Zentral wurde mit einem eigens angefertigten Instrumentarium ein Loch für den zur Fixierung vorgesehenen Pin geschlagen.

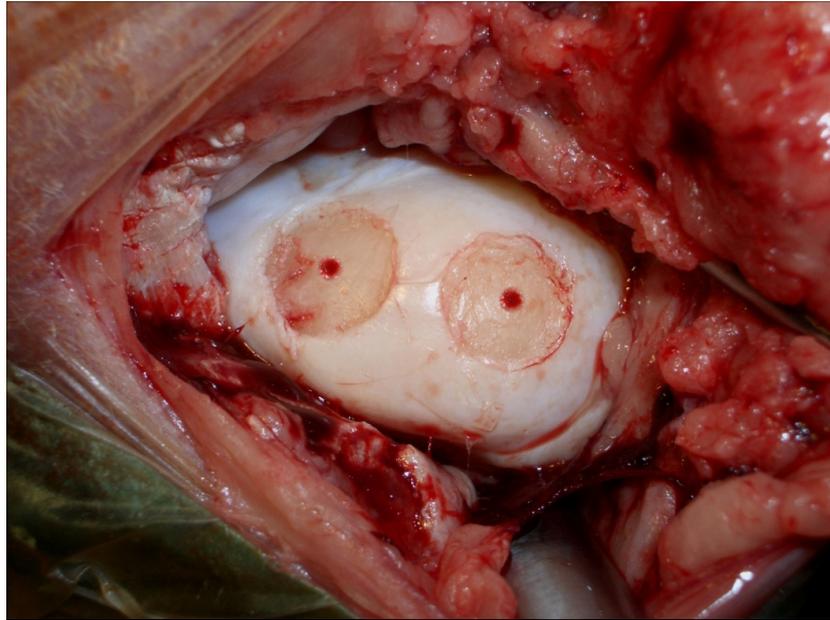


Abbildung 3.3: Darstellung der subchondralen Platte nach dem Abtragen des Gelenkknorpels und dem Setzen der zentralen Dart-Stelle an der medialen Femurkondyle des linken Kniegelenks.

Für die ersten drei Tiere, die mittels Mikrofrakturierung versorgt werden sollten, wurden danach zusätzlich zur zentralen Pin-Stelle vier weitere, kleine Löcher durch die osteochondrale Platte gestoßen. Zu diesem Zweck war ebenfalls ein Instrumentarium vorgefertigt worden. Danach konnten die Vliese aus PGA aufgesetzt und mit dem Pin zentral fixiert werden.

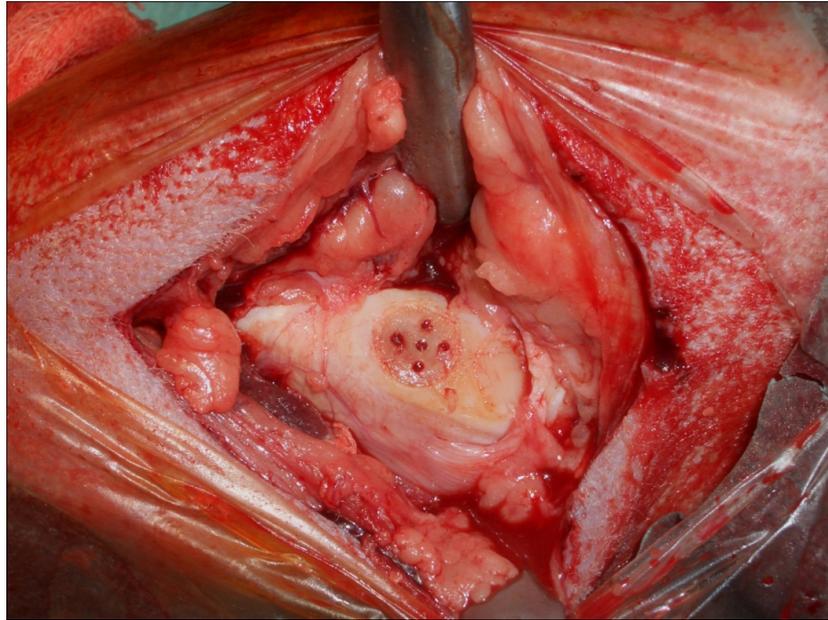


Abbildung 3.4: Ein mittels Mikrofrakturierung vorbereitetes Kniegelenk mit zentraler Pin-Stelle und vier zirkulär angeordneten Defekten in der subchondralen Platte.

Für die Schafe vier bis sechs wurde anstatt des PGA-Vlieses das Vlies aus Kollagen verwendet. Das Operationsvorgehen war identisch zum oben genannten Eingriff.

Bei den Schafen sieben bis neun wurden die Tiere nicht auf der rechten sondern auf der linken Körperseite gelagert und das rechte Bein in Abduktionsstellung fixiert. Das sterile Abwaschen und der operative Zugang zum rechten Kniegelenk blieb derselbe. Bei diesen Tieren wurde lediglich Knorpel zur Herstellung von ACT-Implantaten gewonnen. Der Knorpel wurde aus der Notch, einer wenig belasteten Region des Kniegelenks, entnommen.

Für die Schafe zehn bis zwölf wurden ebenfalls Kollagen-Vliese angewandt. Die Vliese wurden jedoch zusätzlich mit Knochenmarkszellen beimpft. Hierfür wurde Fibrinkleber mit zuvor aus der Tibia gewonnenem Knochenmark gemischt und erst danach auf das Kollagenvlies aufgetragen. Ziel der Beimpfung der Vliese mit Knochenmarkszellen war es, den Zellanteil auf dem Trägerstoff zu erhöhen. Eine Mikrofrakturierung fand bei diesen Tieren nicht statt, da die Stammzellen bereits im Fibringemisch vorhanden sein sollten.

Anschließend wurden bei allen Tieren sowohl die Gelenkkapsel als auch die Haut mit 2-0 Vicryl®-Fäden (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

verschlossen. Nach Beendigung der Hautnaht wurde ein Sprühverband aus Methacrylsäureethoxyethylester und Thiram (Nobecutan® Spray, Fa. Astra GmbH, Wedel, Deutschland) aufgebracht.

Die operativen Eingriffe der mit Vliesen versorgten Schafe dauerten durchschnittlich 37,8 Minuten, für die Chondrozytenentnahme wurden durchschnittlich 13 Minuten benötigt. Nach einer OP-Dauer von 30 Minuten war eine Nachinjektion des Narkosemittels Ketaminhydrochlorid notwendig. Dies wurde in gleicher Konzentration wie oben angegeben (15mg/1kg Körpergewicht) erneut intramuskulär verabreicht. Für die gesamte Dauer des Eingriffs war ein Veterinärmediziner anwesend, der sowohl die Narkoseeinleitung als auch die Aufrechterhaltung der Narkose überwachte.

Zudem bekamen die Tiere intraoperativ vor Eröffnung des Kniegelenks einmalig die Gabe von 2,2 g Amoxicillin-Natrium – entsprechend 2 g Amoxicillin – und 238,25 mg Clavulansäure (Augmentan® i.v. 2,2 g, Fa. SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland) als intramuskuläre Injektion zur Infektionsprophylaxe.

Nach dem operativen Eingriff wurden die Schafe zurück zu den anderen Tieren in den am OP-Trakt angeschlossenen Stall gebracht. 30 Minuten nach Beendigung der Operation waren die Tiere bereits wieder erwacht und konnten auf allen vier Läufen stehen und laufen. Eine postoperative Analgesie war nicht notwendig, da die Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 Wochen weder eine Schonung des operierten Hinterlaufes noch eine andere Auffälligkeit im Vergleich zu gesunden, nicht operierten Tieren zeigten. Am Abend wurden alle neun Schafe zurück zu den restlichen gebracht und bekamen noch am selben Tag Wasser und feste Nahrung.

Am zweiten OP-Tag, der drei Wochen nach den ersten Eingriffen angesetzt war, wurden sechs Schafe operiert. Drei von den Tieren (Schafe 7 bis 9), erhielten die im Labor gezüchteten ACT-Implantate, die ebenso wie bei den anderen Schafen mit einem zentralen Dart fixiert wurden.

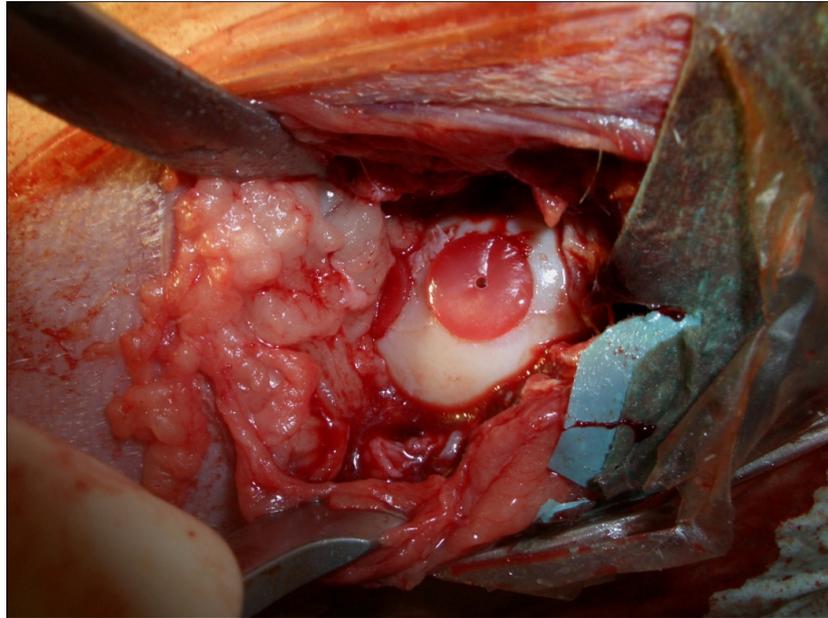


Abbildung 3.5: Durch den zentralen Pin fixiertes ACT-Präparat.

Die Schafe 13 bis 15 erhielten mit Fibrin-Kleber und Knochenmark beimpfte  
PGA-Vliese.



Abbildung 3.6: Ein mit Knochenmark mit Hilfe von Fibrin-Kleber beimpftes  
PGA-Vlies.

Die Operationstechnik, die intraoperative Antibiose und die postoperative Nachbehandlung waren identisch zu den o.g. Verfahren.

### 3.4. Gewinnung der Präparate und Entkalkung

Die Merino-Schafe wurden jeweils zwölf Wochen nach dem operativen Eingriff vom Versuchsgut in die Versuchstierschlachtereier in Poing (Landesanstalt für Landwirtschaft Poing-Grub, Professor-Zorn-Str. 19, 85586 Poing) transportiert. Dort wurden die Tiere euthanasiert und enthäutet. Von allen Tieren wurden die operierten Hinterläufe abgetrennt. Noch vor Ort wurden die Kniegelenke mit distalem Femur und proximaler Tibia entfernt und die gewonnenen Präparate einzeln in Plastikbehälter verpackt. Jeder Plastikbehälter wurde unter Angabe der Versuchstiernummer gekennzeichnet, um eine spätere Verwechslung auszuschließen.

Im Labor für Biomechanik der Orthopädie der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden die gewonnenen Kniegelenke präpariert. Zunächst wurden Fotografien der makroskopischen Ergebnisse in situ angefertigt.



Abbildung 3.7: Knorpeldefekte an einer Femurkondyle eines Kniegelenks, das mit Kollagen-Vlies und Mikrofrakturierung behandelt wurde.

Danach wurden die Knorpeldefekte mit Hilfe einer oszillierenden Säge ausgefräst, nochmals einzeln im Maßstab 1:1 abfotografiert, nach Markierung des anterioren und posterioren Defektes in 100% Methanol eingelegt und bei +5°C gelagert. Die Präparate wurden dann in das AO Research Institute Davos zu Prof. Dr. med. Milz zur weiteren Aufbereitung gebracht.

Zur Entkalkung der Knorpel-Knochen-Präparate 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 etwa vier Wochen regelmäßig alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Präparate wurden über diese Zeitspanne weiterhin in einem Kühlschrank bei +5°C gelagert. Nach Abschluss der Entkalkung wurden die Blöcke für 24 Stunden in 5%-ige Saccharose-Lösung überführt, um einen Zellschutz bei gleichzeitiger Minimierung von Gefrierartefakten für die folgende weitere Bearbeitung mit einem Kryomikrotom (Microm HM 500 OM-Kryomikrotom) zu erhalten. Es wurden jeweils mindestens 20 Schnitte mit einer Dicke von 14 µm durch die Defektstellen angefertigt. Die gewonnenen Präparate wurden daraufhin auf spezielle Objektträger (Superfrost-Plus Objektträger, Menzel, München) aufgebracht und bei -20°C gelagert.

### **3.5. Histologische Aufarbeitung**

Die so gewonnenen Gefrierschnitte der Knorpeldefekte wurden dann zur histologischen Beurteilung mit unterschiedlichen Färbungen aufgearbeitet. Als Übersichtsfärbung wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin behandelt [156]. Des Weiteren wurde Safranin-O und Toluidinblau verwendet [157, 158]. Die Wirkungsweise von Safranin-O lässt sich durch seine Bindung an saure Glykosaminoglykane erklären. Diese Glykosaminoglykane kommen in der Matrix des hyalinen Knorpels vor. Die Färbeintensität der Präparate ist direkt proportional zu den vorhandenen sauren Glykosaminoglykanen und lässt hierdurch den Anteil des hyalinen Knorpels im Bereich des Defektes errechnen. Als Gegenfärbung der Safranin-O-Präparate wurde Echtgrün und Weigertsches Eisenhämatoxylin verwendet, das sich nicht an die sauren Glykosaminoglykane bindet und somit den hyalinen Knorpel ausspart. Die Wirkung der Toluidinblaufärbung besteht ebenso wie Safranin-O-Färbung in einer Bindung an

saure Glykosaminoglykane, jedoch kommt es hierbei ab einer bestimmten Konzentration zur Entwicklung einer metachromatischen Farbreaktion mit rotvioletter Färbung des hyalinen Knorpels.

Die Erklärung der immunhistochemischen Einzelschritte wird im Anhang genauer erläutert. Darauf soll deshalb an dieser Stelle nicht gesondert eingegangen werden.

Ferner wurden immunhistochemische Markierungen von Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan angefertigt.

### **3.6. Auswertung der Präparate**

Die Auswertung der einzelnen Präparate erfolgte zunächst makroskopisch. Dabei wurden von den Knorpeldefekten Makroaufnahmen angefertigt und diese unter Auszählung der prozentualen Knorpel-Defekt-Fläche beurteilt. Zusätzlich flossen hierbei auch die Anbindung an den Defektrand, der Verbleib des zentralen Fixierungs-Pins, die Struktur und die Oberflächenkongruenz in die Gesamtbeurteilung mit ein. Die histologischen Übersichtspräparate dienten zur Beurteilung der prozentualen Deckung des knorpeligen Regeneratgewebes. Zur histologischen Begutachtung der Knorpelpräparate wurde der von O´Driscoll et al. im Jahre 1988 aufgestellte Score herangezogen. In diesen fließt jedoch lediglich die Färbung mit Safranin-O ein. Die in unserer Auswertung zusätzlich durchgeführten immunhistochemischen Markierungen von Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan machten eine Modifizierung des O´Driscoll-Score um weitere Punkte notwendig.

#### **3.6.1. O´Driscoll-Score**

Zum besseren Verständnis des aufgestellten Beurteilungsschemas soll der Score im Folgenden kurz erläutert werden. O´Driscoll stellte ein Punktesystem zur Präparatbeurteilung auf [159, 160]. Insgesamt kann dabei eine Gesamtpunktzahl von 24 erreicht werden. Zunächst werden die Zellmorphologie und die Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix mit Safranin-O beurteilt. Die Beurteilung reicht vom Vorhandensein hyalinen Knorpels (4 Punkte) bis hin zu Bindegewebe oder Knochen (0 Punkte). Durch Safranin-O kann die Anwesenheit von sauren

Glykosaminoglykanen, wie sie in hyalinem Knorpel vorkommen, nachgewiesen werden. Die Skala reicht von normaler (3 Punkte) bis hin zu keiner Anfärbbarkeit (0 Punkte).

Danach wird die strukturelle Eigenschaft des Knorpels unter Beurteilung der Oberflächengleichmäßigkeit, der strukturellen Integrität, seiner Dicke und seiner Verbindung zum angrenzenden Knorpel bewertet. Auch hierfür gelten festgelegte Kriterien mit zugehöriger Punktezahl. Die Beurteilung der Oberfläche wird in vier Stufen unterteilt. Eine glatte und vollkommen intakte „Defektoberfläche“ wird mit drei Punkten bewertet, die bereits bei einer oberflächlich horizontalen Schichtung auf zwei Punkte zurückgesetzt wird. Beim Vorhandensein von Rissen, die mehr als 25% der Knorpeldicke überschritten, wird nur noch ein Punkt vergeben. Keine Punktvergabe erfolgt bei einer schweren Störung der Knorpel-eigenschaft einschließlich bestehender Fibrillation. Die strukturelle Integrität des Gesamtregenerates wird bei unauffälligem Aufbau mit 2 Punkten bewertet. Eine leichte Störung einschließlich aufgetretener Zystenbildung führt zu einer Punktreduktion auf nurmehr 1 Punkt. Das Auftreten schwerster Zerstörung wird mit 0 Punkten beurteilt. Bei der Defektdicke gibt es ebenfalls maximal 2 Punkte, wobei diese nur bei einer 100%-igen Defektdeckung genau im Knorpelniveau vergeben werden. Bis 50% der Knorpeldicke des angrenzenden normalen Knorpels wird der Defekt mit 1 Punkt beurteilt, alle darunter liegenden Präparate bekommen in dieser Disziplin 0 Punkte. Zuletzt wird in dieser Gruppe noch die Verbindung des Defektknorpels zum angrenzenden Knorpel kategorisiert.

Die nächste Bewertungskategorie widmet sich dem Degenerationsgrad des neu gebildeten Knorpelregenerates. Hierbei prüft man die Zellularität und die Bildung von Chondrozytenclustern. Die Zellpopulation reicht von normaler Zellzahl (3 Punkte) über leichte (2 Punkte) und mittelschwere (1 Punkt) Hypopopularität bis hin zu schwerer Hypozellularität (0 Punkte). Die Anwesenheit von Chondrozytenclustern, die in gesundem Knorpelgewebe nicht vorkommen, spricht ebenfalls für eine Degeneration. Hier wurden prozentuale Clusteranteile im Vergleich zur normalen Chondrozytenzahl als Beurteilungskriterien einbezogen. Allerdings reicht bereits ein Anteil von 25% aus, um unter diesem

Aspekt keinen Punkt zu vergeben. Eine weitere Abstufung, falls sich im gesamten Präparat keine Chondrozyten fanden, war nicht vorgesehen.

Der letzte Gesichtspunkt beleuchtet nicht die Defektzone selbst, sondern widmet sich dem angrenzenden Knorpel. Bei der Beurteilung spielen dabei drei Kriterien eine entscheidende Rolle: die Zellzahl, die Clusterbildung und die Anfärbarkeit des Präparates. Die Punkteverteilung reicht von einer normalen Zellzahl ohne Cluster mit normaler Anfärbarkeit (3 Punkte) bis hin zur schwerer Hypozellularität mit schlechter oder gar keiner Anfärbarkeit (0 Punkte) in vier Schritten.

<b>Vorherrschendes Gewebe</b>	<b>Punkte</b>
<i>Zellmorphologie</i>	
Hyaliner Gelenknorpel	4
Unvollständig differenziertes Mesenchym	2
Bindegewebe oder Knochen	0
<i>Anfärbarkeit der Matrix mit Safranin-O</i>	
Normal oder fast normal	3
Mittel	2
Schwach	1
Keine	0
<b>Strukturelle Eigenschaft des Knorpels</b>	<b>Punkte</b>
<i>Gleichmäßigkeit der Oberfläche</i>	
Glatt und intakt	3
Oberflächlich horizontale Schichtung	2
Risse 25 - 100% der Dicke	1
Schwere Störung, einschließlich Fibrillation	0
<i>Strukturelle Integrität</i>	
Normal	2

Leichte Störung einschließlich Zysten	1
Schwere Zerstörung	0
<hr/>	
<i>Dicke</i>	
100% des angrenzenden normalen Knorpels	2
50 - 100% des angrenzenden Knorpels	1
0 - 50% des normalen Knorpels	0
<hr/>	
<i>Verbindung mit angrenzendem Knorpel</i>	
An beiden Enden des Implantats verbunden	2
An einem Ende oder an beiden Enden teilweise verbunden	1
Keine Anbindung	0
<b>Degenerationszeichen</b>	<b>Punkte</b>
<hr/>	
<i>Zellularität</i>	
Normale Zellzahl	3
Leichte Hypozellularität	2
Mittelschwere Hypozellularität	1
Schwere Hypozellularität/Hyperzellularität	0
<hr/>	
<i>Bildung von Chondrozytenclustern</i>	
Keine Cluster	2
< 25 % der Zellen	1
25 - 100% der Zellen	0

<b>An den Defekt angrenzender Knorpel</b>	<b>Punkte</b>
Normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit	3
Normale Zellzahl, leichte Clusterbildung, mittlere Anfärbbarkeit	2
Leichte bis mittelschwere Hypozellularität, schwache Anfärbbarkeit	1
Schwere Hypozellularität, schlechte oder keine Anfärbbarkeit	0

Tabelle 3.1: Beurteilungsscore nach O'Driscoll

### 3.6.2. Modifizierter O´Driscoll-Score

Nach dieser kurzen Ausführung des Original-Bewertungsschemas nach O´Driscoll soll nun in gleichem Maß auf die Modifizierung und Erweiterung des Scores eingegangen werden [154]. Eine immunhistologische Beurteilung, die in unserem Fall durch eine Auswertung von Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan notwendig wurde, musste eingearbeitet werden. Hierfür galt bei allen Färbungen, dass im Idealfall, d.h. ohne Nachweis von Kollagen I und der Nachweis von Kollagen II und Aggrecan im gesamten Regenerat jeweils 2 Punkte vergeben wurden. Konnte der Nachweis nur anteilig erbracht werden, wurde lediglich 1 Punkt vergeben. Konnte dagegen weder Kollagen II oder Aggrecan, dafür aber Kollagen I im gesamten Regenerat nachgewiesen werden, wurden jeweilig 0 Punkte vergeben. Außerdem wurde das Regenerat auf vorhandene Gefäße untersucht. Konnten wie im gesunden Knorpelgewebe keine Gefäße gefunden werden, wurden 2 Punkte vergeben. Waren dagegen Gefäße im Regeneratgewebe vorhanden, so wurde unterschieden, ob die Gefäße Kontakt zur Oberfläche haben oder unterhalb der Gelenkoberfläche liegen. Die Färbung mit Toluidinblau bewirkt ab einer bestimmten Konzentration eine metachromatische Farbreaktion des hyalinen Knorpels. War diese Reaktion im gesamten Regenerat vorhanden, wurden 2 Punkte vergeben. Konnte die Wirkung nicht überall nachgewiesen werden, erhielt das Präparat noch 1 Punkt.

Zeigte sich keine Metachromasie, musste man von einem hyalinfreien Gewebe ausgehen. In diesem Fall konnte kein Punkt vergeben werden.

Zuletzt wurden zwei weitere Kriterien in der Gesamtauswertung berücksichtigt: Da es sich bei den gesetzten Knorpeldefekten um ausschließlich chondrale Defekte handelte und die subchondrale Grenzlamelle während der Operation unverändert belassen wurde, wurde auch der Einfluss des Defektes auf diese untersucht. Befand sich die im Defektbereich vorhandene osteochondrale Platte im gleichen Niveau wie die angrenzende subchondrale Grenzlamelle des unveränderten Knorpels, wurden 2 Punkte vergeben. Im Gegensatz dazu erhielt eine stark eingesunkene wie auch angehobene Lamelle 0 Punkte.

Auch der zentral eingebrachte Pin zur Fixierung des Implantates hatte einen Einfluss auf die Knorpelbildung. Dabei beschränkten wir uns bei der Auswertung auf nur zwei Kriterien. War der Dart unterhalb des Regeneratgewebes wurden 2 Punkte vergeben. Befand sich der Pin im Knorpelniveau und bewirkte dadurch eine Störung des Regenerats, erhielt das Präparat 1 Punkt. Ragte der Dart über das Knorpelniveau heraus und führte zu einer vollständigen Regeneratunterbrechung wurde kein Punkt zugewiesen.

<b>Erweiterter O'Driscoll-Score</b>	<b>Punkte</b>
<hr/>	
<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 knöchernen Oberfläche	0
<hr/>	
<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 knöchernen Oberfläche	0
<hr/>	

<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 Toluidinblau</i>	
Vorhanden	2
Nicht überall vorhanden	1
Nicht vorhanden	0
<b>Subchondraler Defekt</b>	<b>Punkte</b>
<i>Niveau der subchondralen Grenzlamelle</i>	
Im gleichen Niveau wie angrenzende Grenzlamelle	2
Leicht eingesunken oder angehoben	1
Stark eingesunken oder angehoben	0
<b>Einfluss des zentralen Darts</b>	<b>Punkte</b>
<i>Darts</i>	
Unter Knorpelniveau	2
Im Knorpelniveau	1
Über Knorpelniveau mit vollständiger Regeneratunterbrechung	0

Tabelle 3.2: Modifizierter O'Driscoll-Score

Mit den Erweiterungen wird für ein Präparat somit eine Gesamtpunktzahl von 38 statt der durch den originalen Score erreichbaren 24 Punkte erzielt. Um bei der Auswertung ein standardisiertes Ergebnis zu erhalten, wurden zur Begutachtung des Regeneratgewebes jeweils Schnitte durch die Mitte des ehemaligen Defektes herangezogen. Nach einer ersten Auswertung bekamen zwei weitere in histologischen Fragestellungen erfahrene Untersucher die Präparate zur Beurteilung. Diese mussten sich strikt an den oben aufgeführten Richtlinien orientieren und erhielten die Präparate ohne Kenntnisse über das jeweils verwendete Implantat.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Intra- und postoperativer Verlauf**

Während des festgelegten Versuchszeitraums von 12 Wochen konnten keine Komplikationen bei den Tieren festgestellt werden.

Intraoperativ gestaltete sich insbesondere die Verankerung und optimale Platzierung der Vliese als schwierig. Der Umgang mit dem hierfür vorgesehenen Instrumentarium war aufgrund der geringen Pin-Größe und den beengten intraartikulären Verhältnissen beeinträchtigt. Weiterhin zeigten sich individuelle Unterschiede im Knorpelniveau der Tiere, so dass bei einigen Präparaten das Vlies über das Knorpelniveau herausragte. Diese Problematik zeigte sich vor allem bei den ACT-Präparaten. Das komplette Versenken der Fixierungspins im Bioimplantat konnte bei allen Tieren erreicht werden.

Der postoperative Verlauf war bei allen Versuchstieren unauffällig. Die Wundheilung erfolgte per primam ohne Infektzeichen, so dass eine wiederholte Antibiotikagabe nicht notwendig wurde. Das in den ersten Stunden nach dem Eingriff aufgetretene Schonhinken mit teilweiser Entlastung des operierten Kniegelenks konnte bereits am nächsten Tag nicht mehr beobachtet werden. Im weiteren Verlauf kam es zu keinerlei Fress- oder Trinkauffälligkeiten, auch das Sozialverhalten der Tiere untereinander war unauffällig. Über den gesamten postoperativen Zeitraum konnten keine Schmerzäußerungen der Tiere wie z.B. Zähneknirschen festgestellt werden.

### **4.2. Makroskopische Beurteilung der Präparate**

Es wurden von den Knorpeldefekten Makroaufnahmen angefertigt und diese unter Auszählung der prozentualen Knorpel-Defekt-Fläche bewertet. Ferner flossen auch die Anbindung an den Defektrand, der Verbleib des zentralen Fixierungspins, die Struktur und die Oberflächenkongruenz in die Gesamtbeurteilung mit ein.

#### 4.2.1. Leerlochgruppe

Die Ergebnisse der Leerlochkontrollgruppe konnten aus einer vorangegangenen Versuchsreihe der eigenen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson übernommen werden.

Am Ende des Versuchszeitraumes wiesen alle chondralen Defekte, die nicht mit einem Bioimplantat versorgt worden waren, eine Knorpelglatze auf. Makroskopisch konnte kein Regeneratgewebe erkannt werden. Die Übergangszone der Knorpelglatze zum gesunden Knorpel war unregelmäßig begrenzt und zeigte Risse in unterschiedlichen Schweregraden. Auf dem korrespondierenden Tibiaplateau fanden sich leichte Schleifartefakte sowie beginnende Arthrosezeichen [154, 152, 150].



Abbildung 4.1: Darstellung einer Knorpelglatze in der Leerlochgruppe 12 Wochen nach Setzen des Defekts. Die Bildung von Regeneratgewebe lässt sich hier nicht nachweisen [154].

#### 4.2.2. PGA-Vlies und Mikrofrakturierung

Alle Knorpeldefekte, die durch eine Mikrofrakturierung und PGA-Vlies versorgt worden waren, zeigten eine durchschnittliche Defektdeckung von 62,13% (46,5-85,33%, SD 14,07) mit makroskopisch knorpeligem Regeneratgewebe. Auffällig war, dass vor allem an den hinteren Knorpelschäden der zentrale Pin noch bei allen Präparaten nachzuweisen war und sogar über das Defektniveau herausragte, wohingegen bei den vorderen Defekten die Grenze zu neu gebildetem Knorpel oder Knorpelglatze bereits nur noch unscharf abzugrenzen war. Bei allen Präparaten konnte der intraoperativ gesetzte Knorpelschaden in seinem kreisrunden Verlauf noch deutlich erkannt werden,

wobei auch hier in 50% der Fälle die Grenze schon begann, undeutlich zu werden.

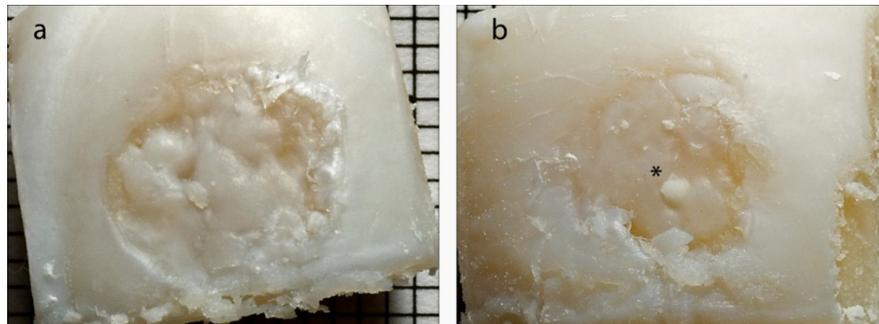


Abbildung 4.2: Makroskopische Aufnahmen von zwei Defekten, die mit PGA und Mikrofrakturierung versorgt wurden. a: Anteriorer Defekt, der Pin ist nicht mehr nachzuweisen. b: Posteriorer Schaden, in welchem der zentrale Pin (\*) noch gut sichtbar ist.

#### 4.2.3. Kollagen I-Vlies mit Mikrofrakturierung

Bei den Kollagenimplantaten konnte eine durchschnittliche Defektdeckung von 71,75% (46,25-88,61%, SD 17,12) beobachtet werden. Dabei waren die vorderen Regenerate besser als die posterior gelegenen mit 87,31% (86,3-88,6%, SD 0,98) gegenüber 56,19% (46,3-70%, SD 10,07). Der zentrale Pin konnte hier in den meisten Präparaten nur als kleine Mulde ausgemacht werden. Ein über das Knorpelniveau ragender Dart, wie er bei den PGA-Implantaten beobachtet worden war, fehlte. Ein Präparat (Schaf 4, posteriorer Defekt) zeigte im Bereich des Knorpelschades tiefe Ulzerationen. Im Vergleich zu den PGA-Implantaten waren die Grenzen von Knorpelschaden und gesundem Knorpel deutlich schwächer zu erkennen, obgleich auch dort noch der kreisrunde Defekt nachvollziehbar war.

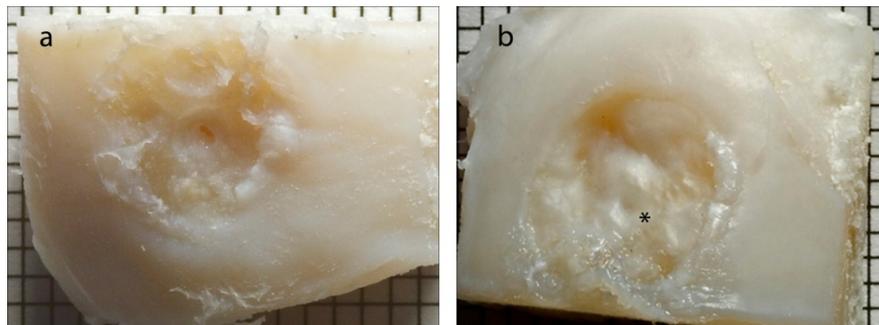


Abbildung 4.3: Darstellung zweier Knorpeldefekte, die mit Kollagen und Mikrofrakturierung versorgt wurden. a: Tiefe Ulzeration eines ventral gesetzten Knorpelschadens. b: Im Zentrum des Defektes (links neben \*) ist noch eine kleine Vertiefung zu sehen, die vermutlich als Rest des zentralen Fixierungspins übrig geblieben ist.

#### 4.2.4. PGA-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch

Die prozentuale Defektdeckung der mit PGA-Implantaten und mit Knochenmarkszellen angereicherten Fibrin-Kleber betrug im Durchschnitt 54,14% (28,57-72,86%, SD 14,02). Auch hier zeigten die anterioren gegenüber den posterioren Schäden mit einer durchschnittlichen Defektdeckungsrate von 64,19% (58,73-72,86%, SD 6,20) zu 44,10% (28,57-58,82%, SD 12,36) das bessere Ergebnis. In einem Präparat kam es ebenfalls zu einer tiefen Ulzeration, die aber makroskopisch von knorpelähnlichem Gewebe ausgefüllt schien. Der Durchmesser des Knorpeldefektes hatte sich bei fast allen Präparaten um 1 mm verkleinert, bei einem Präparat hatte sich so gut wie kein Regeneratknorpel gebildet (28,57% Defektdeckung) und die Grenzen zum gesunden Knorpel waren noch deutlich festzusetzen.

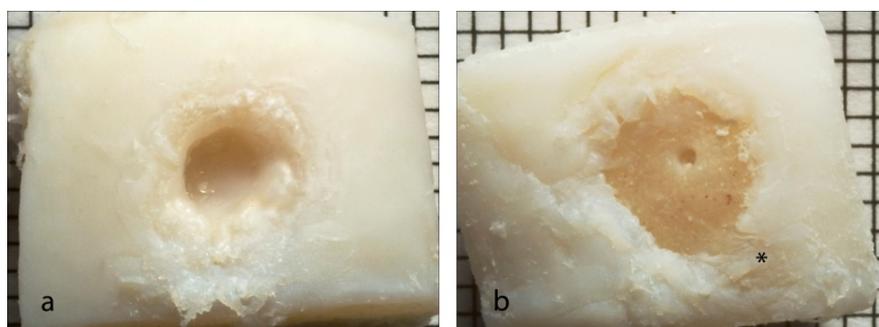


Abbildung 4.4: Darstellung von zwei Präparaten nach Versorgung mit PGA-Implantaten und Beimpfung mit Fibrin und

Knochenmarkszellen. a: Eine tiefe Ulzeration eines ventralen Defektes, der aber makroskopisch doch mit knorpelähnlichem Gewebe ausgekleidet scheint. b: Knorpelglätze; nach unten hat sich der Knorpeldefekt vergrößert und den gesunden Knorpel angegriffen (\*).

#### 4.2.5. Kollagen-I-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch

Die Knorpelläsionen, die mittel Kollagen-Vlies und Beimpfung mit Fibrin und Knochenmarkszellen versorgt wurden, wiesen eine Defektdeckung von 68,99% (51,81-86,81%, SD 12,30) auf. Diesmal fanden sich aber in den posterioren Schäden bessere Ergebnisse. Mit einer Defektdeckung von 63,51% (51,81-72,06%, SD 8,56) gegenüber 74,47% (56,45-86,67%, SD 13,01) war die Defektheilung der hinteren Läsionen schlechter. Zwei der vorderen Präparate zeigten vom Zentrum ausgehend erneut tiefergehende Ulzerationen, die aber auch wieder mit knorpelähnlichem Gewebe ausgekleidet schienen. Bei einem posterioren Defekt fand sich zwar ebenfalls zentral gelegen eine kleine, flache Vertiefung, die Läsion war aber insgesamt fast auf Knorpelniveau und der gesetzte kreisrunde Knorpeldefekt konnte nur noch wage definiert werden. Ein zentraler Dart konnte in allen Präparaten nicht mehr gefunden werden.

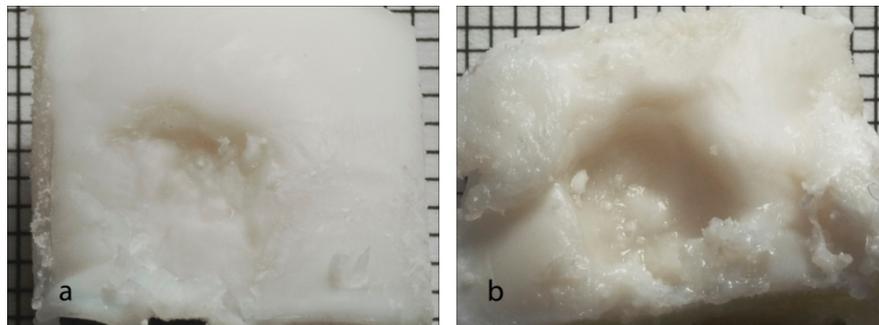


Abbildung 4.5: Zwei Fotografien von Defekten mit Kollagen und Fibrin-Knochenmark-Beimpfung. a: Die Grenze des ursprünglichen Defektes lässt sich nur noch schwer erkennen; zentral liegt die vermutlich durch den Dart verursachte Vertiefung. b: Ein ventraler Defekt mit tiefer Ulzeration; auch hier scheint sich aber knorpelartiges Gewebe gebildet zu haben.

#### 4.2.6. ACT-Implantate

Die zumindest makroskopisch schlechtesten Ergebnisse wurden durch die ACT-Präparate erzielt. Durchschnittlich kam es bei allen Präparaten zu einer Defektregeneration von 47,54% (24,68-69,86%, SD 16,21). In allen Präparaten konnte der gesetzte Knorpelschaden noch problemlos vom umgebenden Knorpel abgegrenzt werden. Die Grenze war scharf abgesetzt und in weiten Teilen fand sich eine Knorpelglatte. Nur an manchen Stellen lagen vereinzelt Knorpelinseln. Die zentralen Darts hatten vielfach tiefere Ulzerationen ausgelöst, waren aber nur noch in einem Defekt sichtbar. Doch auch dort lag dieser unterhalb des restlichen Knorpelniveaus bei sonst unauffälliger subchondraler Platte. Das Verhältnis vorderer zu hinterer Läsion war annähernd ausgeglichen. Die Defektdeckung der vorderen Defekte betrug 44,20% (32,05-60%, SD 11,70), die der hinteren 50,88% (24,68-69,86%, SD 19,14).

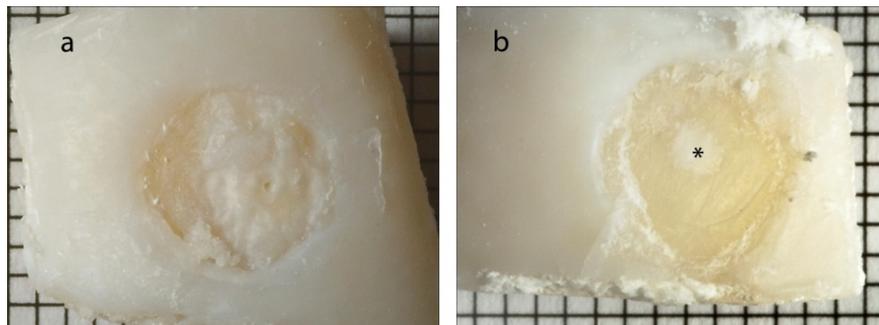


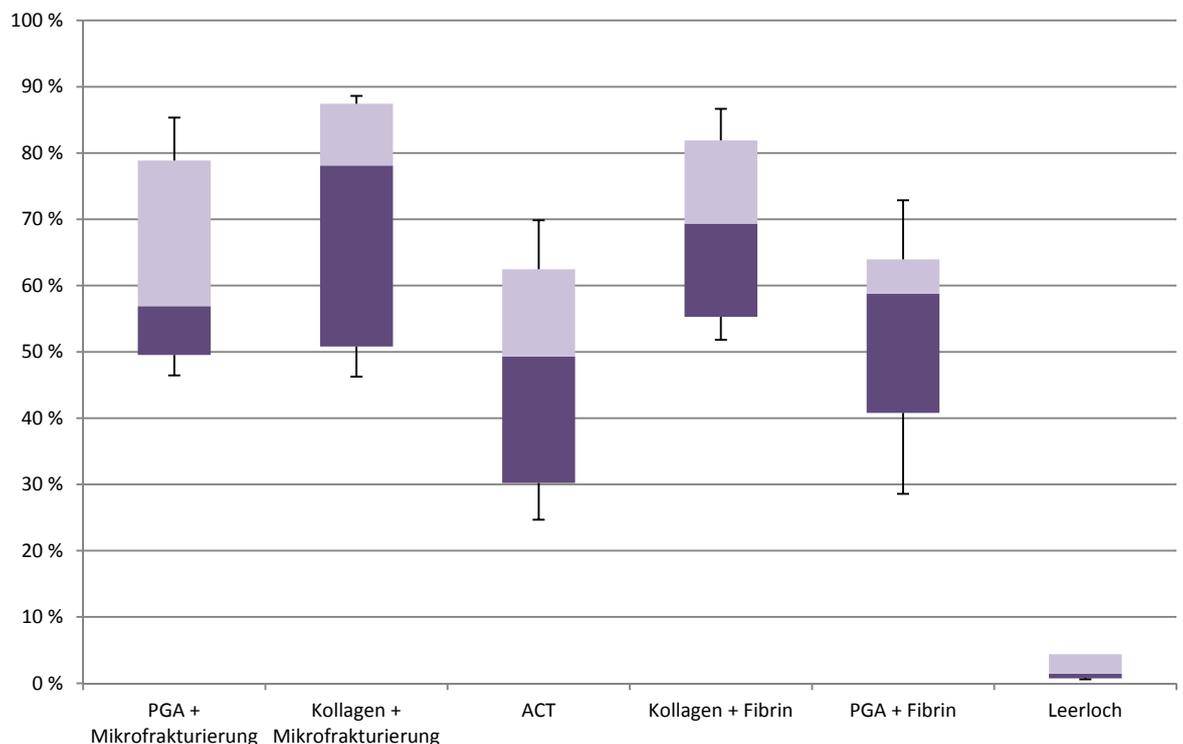
Abbildung 4.6: Hier werden zwei Defekte nach ACT-Implantation dargestellt. a: Der kreisrunde, 8 mm messende Knorpeldefekt lässt sich mühelos nachweisen, die Grenze zu gesundem Knorpel ist scharf abgegrenzt. b: Im Zentrum findet sich der Dartkopf (\*) inmitten einer wie mühevoll präpariert wirkenden Knorpelglatte.

#### 4.2.7. Zusammenfassung der makroskopischen Auswertung

In der Zusammenschau aller makroskopischen Beurteilungen lässt sich das beste Ergebnis mit 71,75% (46,25-88,61%, SD 17,12) durch die Kombination Kollagen und Mikrofrakturierung erreichen. Durch die scheinbar bis auf wenige Ausnahmen immer innerhalb oder unter dem Knorpelniveau gelegenen Fixierungsdots konnten an den tibialen Gelenkanteilen keine verfrühten Arthrosezeichen oder Schleifspuren nachgewiesen werden. Die Menisci aller

Tiere waren unbeschädigt. Zur Beurteilung eines signifikanten Unterschiedes der verwendeten Implantatgruppen (PGA+Mikrofrakturierung, PGA+Fibrin, Kollagen+Mikrofrakturierung, Kollagen+Fibrin, ACT) wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser Test ergab mit einem p-Wert von 0,084 keinen Signifikanzunterschied.

Anhand der vorliegenden Datenlage wurde abschließend noch zwischen vorderem und hinterem Knorpeldefekt verglichen. Dabei wurde ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser ergab jedoch mit einem p-Wert von 0,30 ebenfalls keinen Signifikanzunterschied. Damit lässt sich keine Korrelation zwischen besserer Knorpeldeckung und Lage des gesetzten Defektes im Kniegelenk herstellen.



Grafik 4.1: Darstellung der prozentualen Defektdeckung aller verwendeten Implantate. Das beste Ergebnis mit  $71,75\% \pm 17,12$  bei einer Variationsbreite von  $46,25\% - 88,61\%$  wurde durch die Kombination Kollagen-Vlies und Mikrofrakturierung erreicht. Mit  $68,99\% \pm 12,30$  und einer Variationsbreite von  $51,81\% - 86,67\%$  schnitten Kollagenimplantat mit Fibrin-Knochenmark-Gemisch nur unwesentlich schlechter ab. Das zumindest makroskopisch schlechteste Ergebnis entfiel mit  $47,54\% \pm 16,21$  und einer Variationsbreite von  $24,68\% - 69,86\%$  auf die ACT-Implantate. Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis

ergab keinen Signifikanzunterschied innerhalb der Implantate ( $p=0,084$ ). Wie anhand der Grafik bereits zu erwarten, zeigte sich ein Signifikanzunterschied im Vergleich der Bioimplantate gegenüber der Leerlochgruppe mit  $p < 0,05$ . Auch hinsichtlich ACT- und PGA/Fibrin-Gruppe im Vergleich zu den restlichen Bioimplantaten konnte ein Signifikanzunterschied mit  $p < 0,05$  festgestellt werden.

### **4.3. Mikroskopische Beurteilung der Präparate**

Alle Präparate wurden fotografisch dokumentiert und anschließend im AO Research Institut Davos bei Prof. Dr. med. Milz entkalkt, nach Anfertigung von Gefrierschnitten histologisch angefärbt und von mir unter einem Mikroskop der Carl Zeiss AG, Göttingen, begutachtet und abfotografiert. Von Prof. Dr. med. Milz wurden die Ergebnisse kontrolliert und validiert.

#### **4.3.1. Leerlochgruppe**

Die Präparate der Leerlochgruppe zeigten mikroskopisch bei allen Tieren eine fehlende Regeneration des gesetzten Defektes. Nur im Randbereich fanden sich einige knorpelähnliche Regenerate. Morphologisch bestand bei diesem Regeneratgewebe keine Ähnlichkeit mit hyalinem Knorpel. Im ehemals gesunden Knorpel im Randbereich des Defektes fanden sich in der oberen Gelenkschicht Fissuren. Die Chondrozyten hatten Cluster gebildet. Weiterhin zeigte sich im angrenzenden Knorpel ein beginnender Proteoglykanverlust mit gleichzeitiger Kollagen-I-Bildung als Hinweis auf eine beginnende Degeneration. Die Tidemark, die stückweise noch vorgefunden werden konnte, war durch einzelne Gefäßeinsprossungen mit umgebender Knochenmanschette unterbrochen. Im übrigen Defektbereich konnte teilweise eine dünne Schicht mit mineralisiertem Knorpel nachgewiesen werden. Dies schien Knorpel zu sein, der beim intraoperativen Fräsvorgang nicht vollständig entfernt wurde. Auch dieses Gewebe wies einen starken Proteoglykanverlust als Zeichen beginnender Degeneration auf. An jenen Arealen, an welchen der subchondrale Knochen eröffnet worden war, zeigte sich ein dünnes undifferenziertes bindegewebiges Regenerat [150, 154, 161, 152].

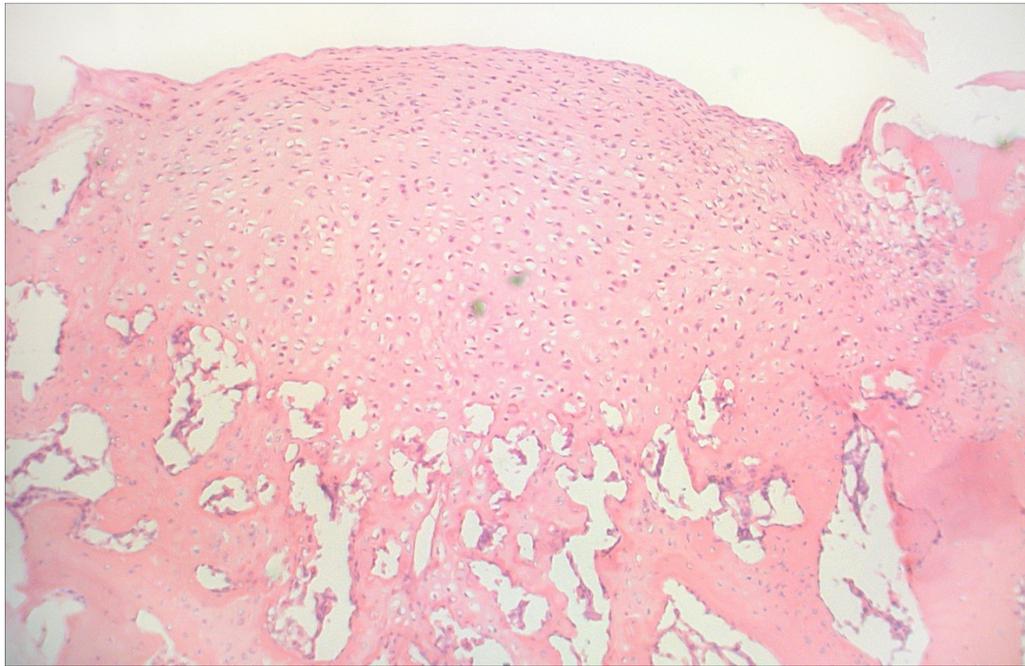
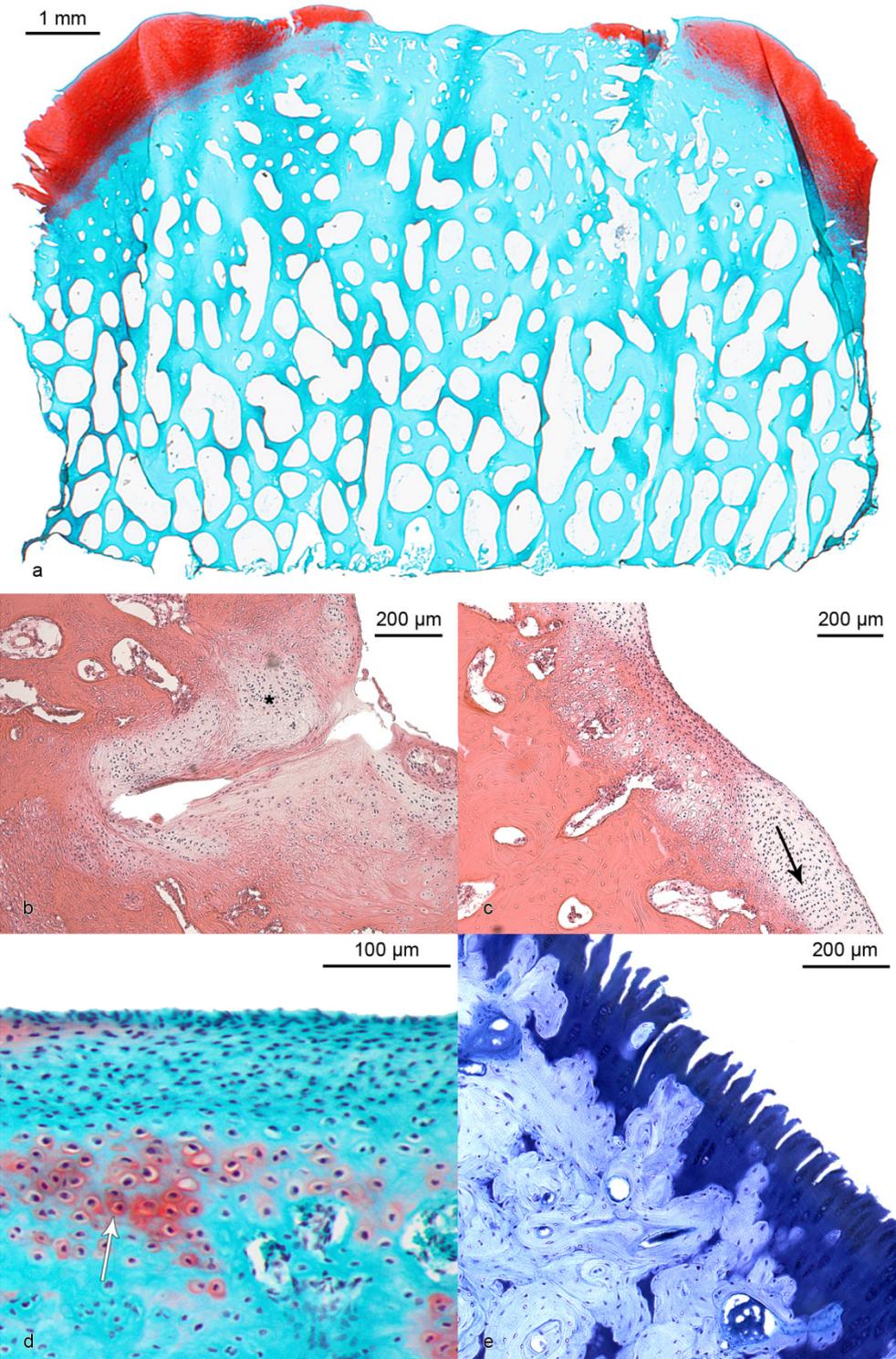


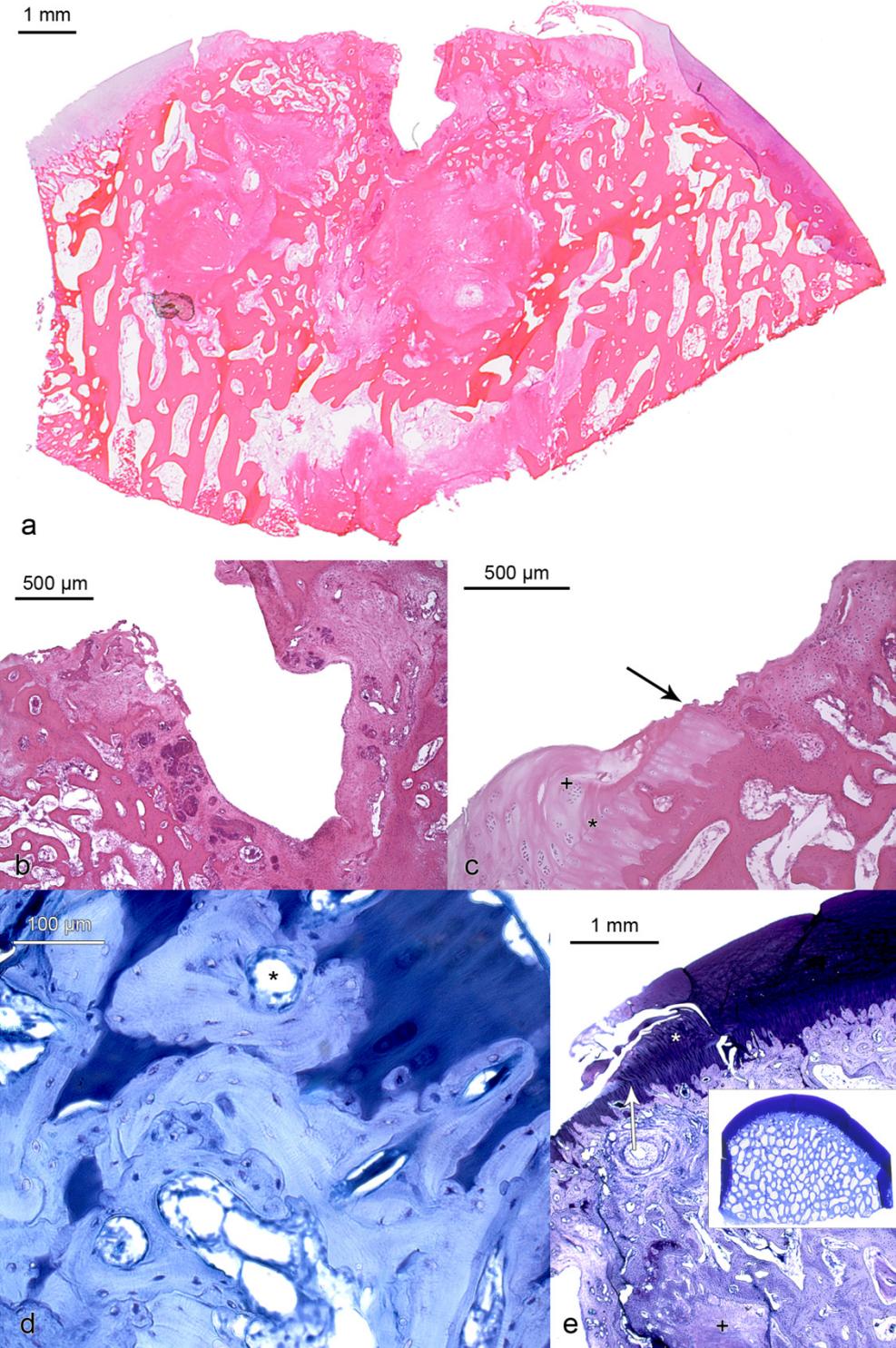
Abbildung 4.7: Darstellung eines Leerlochpräparates. Es findet sich bindegewebiges, hyperzelluläres Regeneratgewebe [155].

### 4.3.2. PGA-Vlies und Mikrofrakturierung



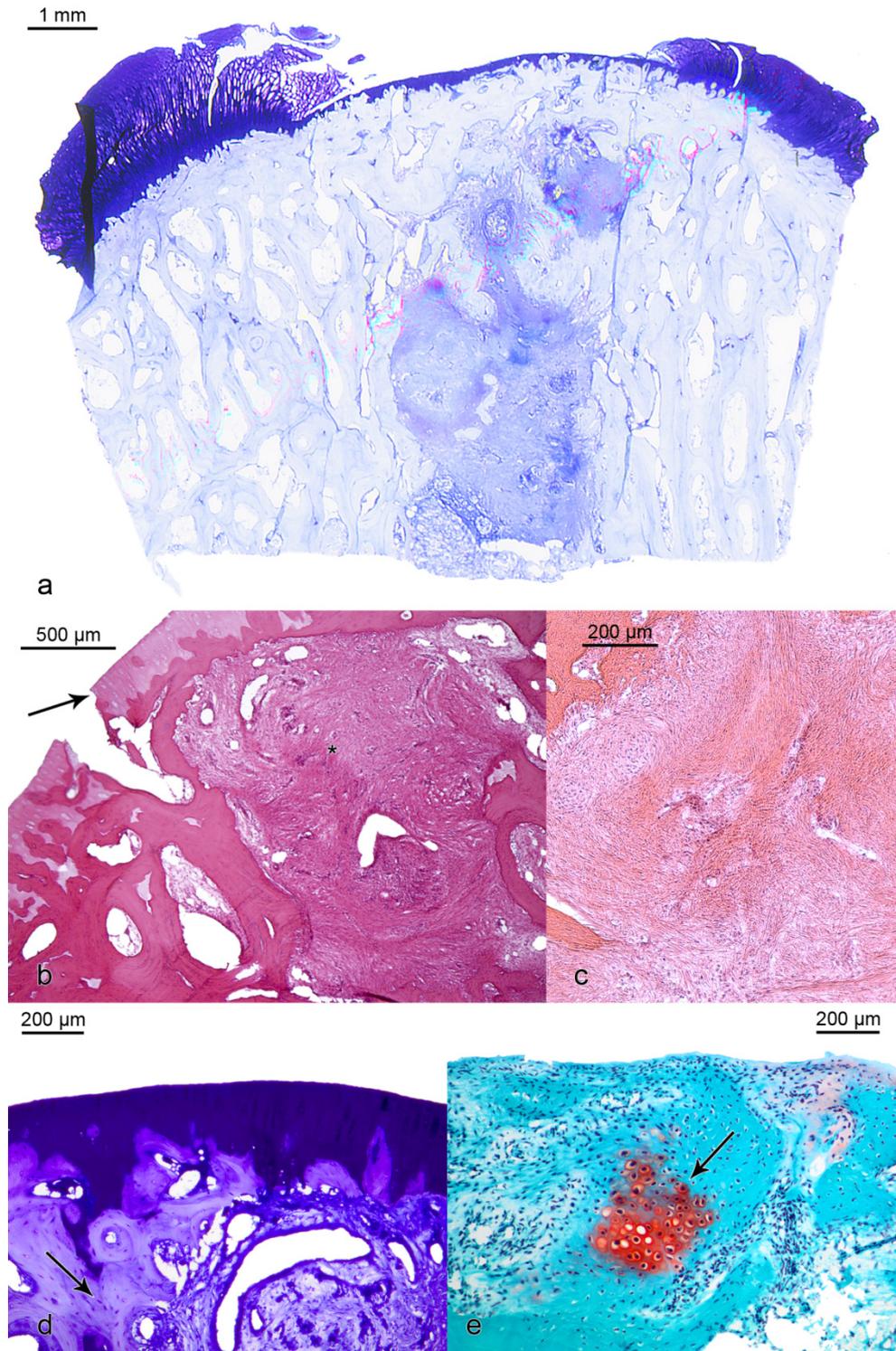
- a) Übersichtsaufnahme der medialen Femurkondyle eines mit PGA-Vlies und Mikrofrakturierung versorgten Kniegelenks. Es lässt sich deutlich ein Knorpeldefekt etwa in der Größe des Vlieses erkennen. Die Knochenstruktur scheint jedoch unverändert vorhanden zu sein, da sich die Spongiosa unter dem Knorpel nicht von der Defektstelle unterscheidet. Eine Unterbrechung der Knochenstruktur durch den zentralen Fixierungspin ist nicht nachweisbar. Dies könnte entweder an einer nicht mittig verlaufenden Schnitfführung oder einem kompletten Abbau des Pins liegen. Safranin-O-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.
- b) 10-fache Vergrößerung der zentralen Pinstelle eines anderen Präparates. Im Gegensatz zur vorherigen Darstellung wird hier der Defekt des Fixierungsarts im subchondralen Knochen deutlich. Um das gesamte Pinareal finden sich im Randbereich Knorpelzellen mit stellenweiser Clusterbildung (\*). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.
- c) Es handelt sich bei diesem Präparat ebenfalls um die 10-fache Vergrößerung der zentralen Pinstelle. Auffällig ist hier jedoch, dass sich ein Regeneratgewebe über der Knochenlamelle gebildet hat. Das neu entstandene Knorpelgewebe ist deutlich hyperzellulär. Die Knorpelzellen sind zentrumsfern in longitudinaler Richtung ausgerichtet (→). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.
- d) Hochauflösende Darstellung aus dem Defektzentrum. Auch in diesem Präparat findet sich eine Hyperzellularität des Regeneratgewebes. Da sich Knorpelgewebe in dieser Färbung rot darstellen würde, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um ein bindegewebiges Regenerat handelt. Unter der Deckschicht zeigen sich in etwa 150 µm Tiefe eingestreute Knorpelzellen mit Clusterbildung (→). Safranin-O-Färbung. Referenzstrecke 100 µm.
- e) Ausschnitt eines Knorpeldefekts in 10-facher Vergrößerung. Die Kalzifizierungszone scheint erhalten geblieben zu sein. Der subchondrale Knochen kommt unbeschadet zur Darstellung. Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.

4.3.3. Kollagen-I-Vlies und Mikrofrakturierung



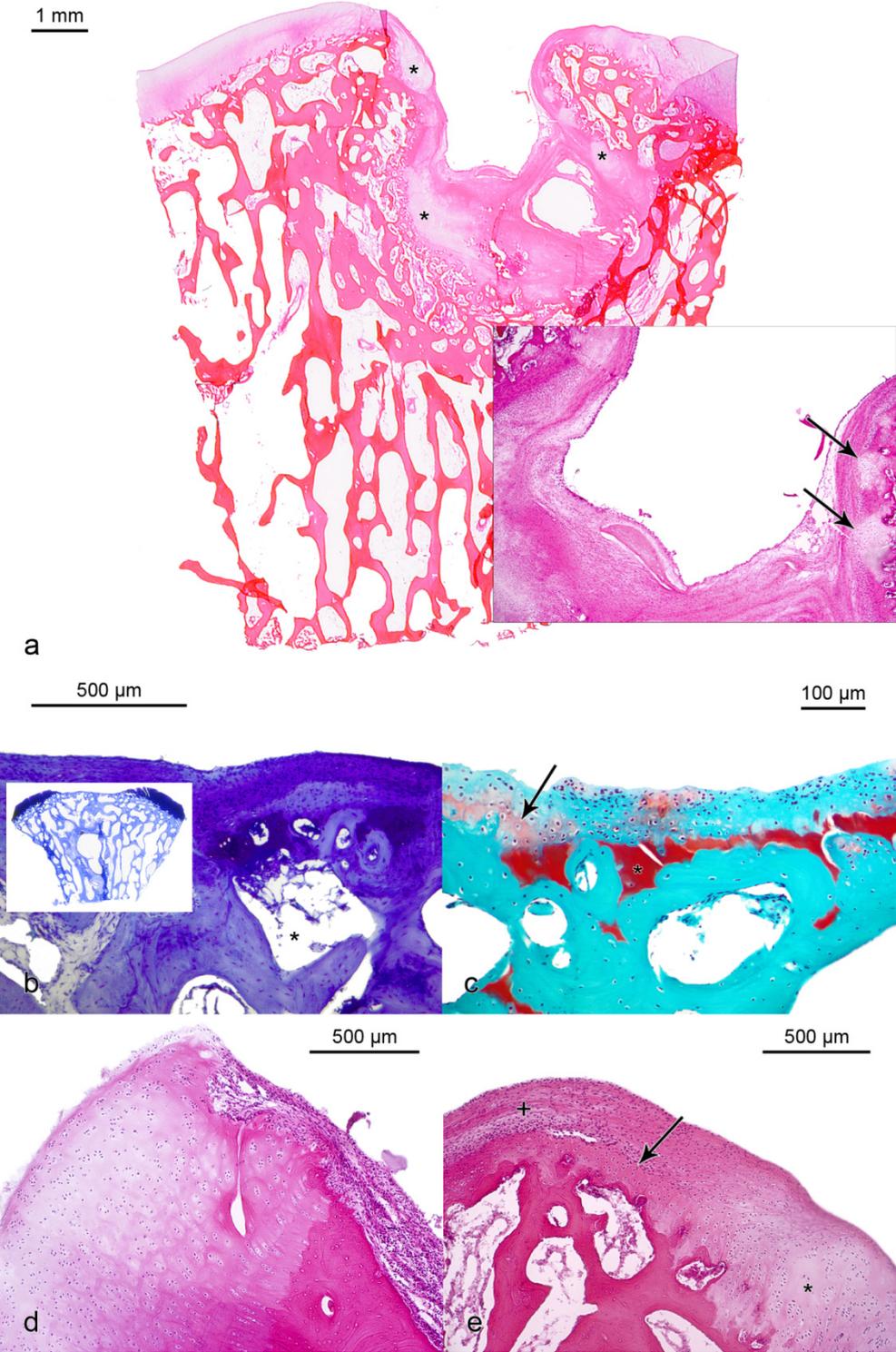
- a) Übersichtsaufnahme der medialen Femurkondyle eines mittels Kollagenvlies und Mikrofrakturierung versorgten Kniegelenks. Es zeigt sich noch deutlich ein sichtbarer Defekt etwa in der Mitte des gesetzten Knorpeldefekts. Dies entspricht dem ehemaligen Fixierungsart. Der subchondrale Knochen ist im Bereich des gesunden Knorpels unversehrt, im Defektareal dagegen zeigt er gravierende Veränderungen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.
- b) Vergrößerung des durch den Fixierungsart verursachten Defekts im subchondralen Knochen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- c) Dargestellt ist eine Ausschnittsvergrößerung des Übergangs vom hyalinen Knorpel zum Defekt. Die Kalzifizierungszone geht kontinuierlich in das Regeneratgewebe über (→). In dem angeschnittenen gesunden Knorpel finden sich Chondrozytencluster (+). Die Tidemark (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel) lässt sich deutlich abgrenzen (\*). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- d) Hochauflösendes Präparat aus dem Defektareal eines mit Kollagenvlies und Mikrofrakturierung versorgten chondralen Defekts. Es zeigt sich dunkelblau angefärbter hyalinartiger Knorpel im rechten oberen Bildrand. Die subchondrale Matrix ist durch hyalinartige Inseln unterbrochen, es zeigen sich viele einsprossende Blutgefäße (\*). Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 100 µm.
- e) Vergrößerung des Randbezirks eines chondralen Defekts (links) zum gesunden hyalinen Knorpel (rechts). Deutlich zu erkennen ist im Randbereich die Tidemark (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel, →). Das Knorpelregenerat zeigt eine longitudinale Ausrichtung der Zellverbände (\*). Das gesamte subchondrale Gewebe ist im Vergleich zu normalem subchondralem Knochen (kleines Bild) extrem zell- und matrixreich (+). Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.

#### 4.3.4. PGA-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch



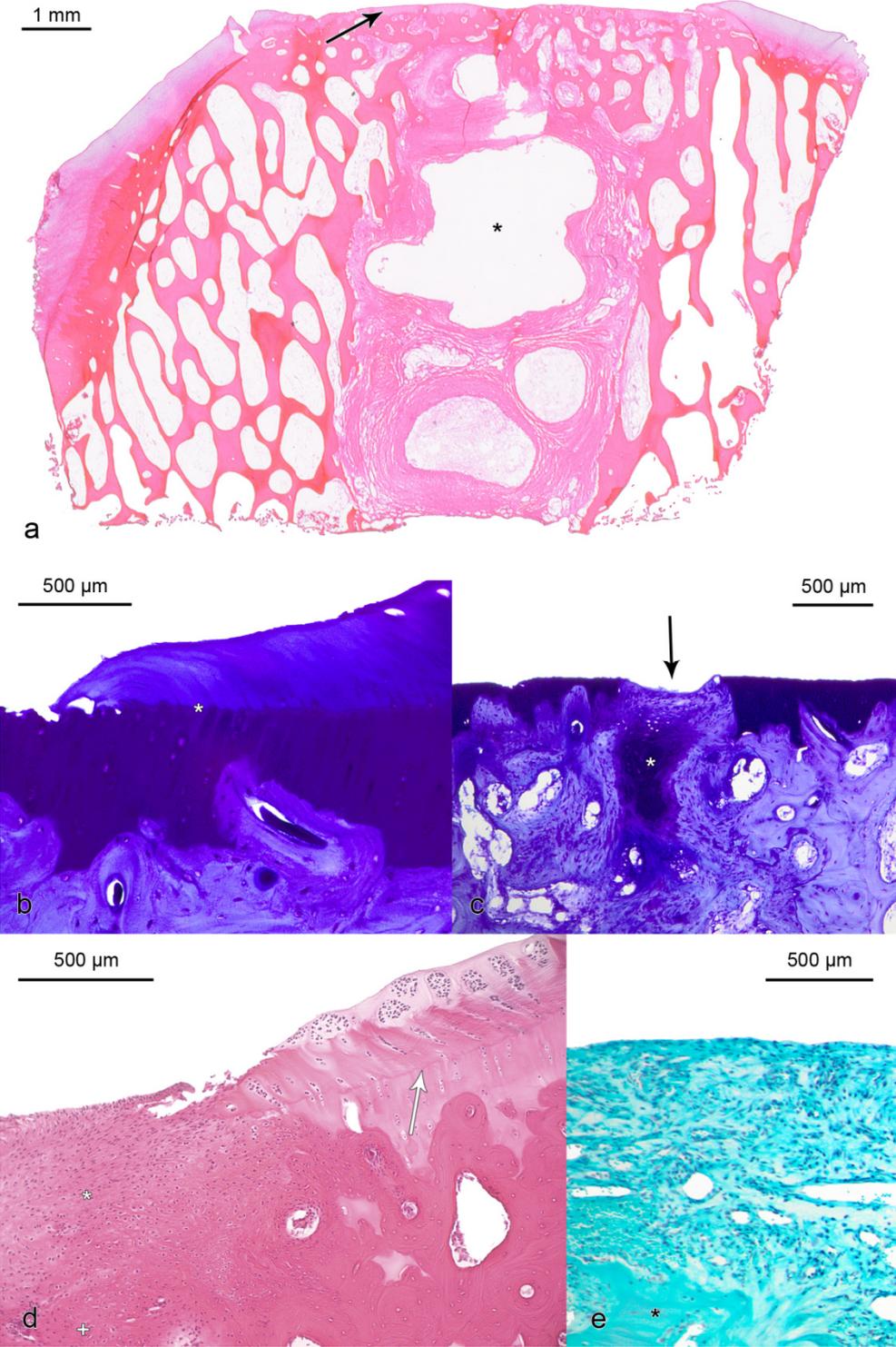
- a) Übersichtsaufnahme einer mit PGA-Vlies und Fibrin versorgten medialen Femurkondyle. An diesem Präparat lässt sich noch deutlich der gesetzte Knorpeldefekt nachweisen. Die osteochondrale Platte wurde beim Fräsen nicht eröffnet, stattdessen ist die Kalzifizierungsschicht als Defektabschluss vorhanden. Die Bildung von Regeneratknorpel fand nicht statt. Im subchondralen Knochen erfolgten drastische Veränderungen. Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.
- b) In 5-facher Vergrößerung zeigt dieses Präparat das Defektzentrum. Wie im vorhergehenden Schnitt ist der subchondrale Knochen durch den Fixierungspin zerstört und durch Bindegewebe ersetzt (\*). Die Kalzifizierungszone ist ebenfalls erhalten (→). Links neben dem Pfeil zeigt sich eine tiefe Fissur, an der die Knochenlamelle durchbrochen ist. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- c) Hochauflösende Darstellung der zentralen Pinstelle. Ganz deutlich kommt hier die bindegewebige Veränderung des subchondralen Knochens mit Hyperzellularität gepaart mit unstrukturiertem Gewebeaufbau zum Ausdruck. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.
- d) Dargestellt ist ebenfalls die zentrale Pinstelle eines Defekts. Die Kalzifizierungszone bedeckt die osteochondrale Platte. Links im Präparat zeigt sich unveränderter subchondraler Knochen mit eingeschlossenen Osteozyten (→), rechts liegt anstatt der normalen Spongiosa ein faserreiches Bindegewebe vor, das in Strängen und Wirbeln angeordnet ist. Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.
- e) Ausschnitt eines Knorpeldefekts in 10-facher Vergrößerung. Normale Spongiosa kann lediglich im linken unteren Bildrand gefunden werden. Das restliche Gewebe ist unstrukturiert und hyperzellulär. Auch in diesem Präparat findet sich eine Hyperzellularität des Regeneratgewebes. Unter der Regeneratschicht finden sich in etwa 300 µm Tiefe eingestreute Knorpelzellen mit Clusterbildung (→). Safranin-O-Färbung. Referenzstrecke 200 µm.

4.3.5. Kollagen-I-Vlies und Fibrin-Knochenmark-Gemisch



- a) Übersichtsaufnahme der medialen Femurkondyle eines mittels Kollagenvlies und Fibrin versorgten Kniegelenks. In der Defektmittte findet sich eine Ulzeration von mindestens 3 mm Tiefe. Am Defektrand und in der Defekttiefe lassen sich Areale mit unauffälligen Knorpelzellen in hyalinartiger Interzellulärsubstanz entdecken (\*). In der Ausschnittsvergrößerung aus dem Defektgrund (kleine Abbildung rechts unten) zeigt sich hyperzelluläres Regeneratgewebe. Die mit den beiden Pfeilen markierten Areale zeigen mehrere zweikernige Chondrone. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.
- b) In 5-facher Vergrößerung kommt in diesem Präparat das Regeneratgewebe zur Darstellung. Deutlich zu erkennen ist eine höhere Zellzahl. Das kleine Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme mit Knorpelglatte. Der subchondrale Knochen stellt sich unauffällig dar. Der große zystische Defekt in der Präparatmitte ist durch das Herausbrechen des Darts beim Schneiden des histologischen Präparates artifiziell entstanden (\*). Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- c) Dargestellt ist eine Ausschnittsvergrößerung des Defektzentrums. Die Deckschicht besteht aus einem zellreichen Regeneratgewebe mit eingestreuten Knorpelzellen und nur geringem Glykosamingehalt (lachsfarbene Färbung, →). Unterhalb des Regenerats dagegen zeigt sich ein erhöhter Glykosamingehalt mit tieferer Färbung (\*). Safranin-O-Färbung. Referenzstrecke 100 µm.
- d) 10-fache Vergrößerung der Knorpel-Defekt-Grenze. Deutlich sichtbar ist die normale Schichtung des Gelenkknorpels im linken Bildanteil. Der Übergang vom normalen Gelenkknorpel zum Regeneratgewebe zeigt einen abrupten Abbruch der Knorpelschichten mit maximal erhöhter Zelldichte und steil in einen Krater abfallender Ulzeration. Hamatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- e) Hochauflösender Ausschnitt aus der Übersichtsaufnahme a. Das Präparat zeigt wie die Voraufnahme die Randzone des Defekt-Knorpel-Übergangs mit erhöhter Zelldichte (+) und normalem Gelenkknorpel (\*). Die Kalzifizierungszone ist noch anteilig im Randbereich vorhanden (→). Hämatoxylin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.

4.3.6. ACT-Implantate



- a) Übersichtsaufnahme der medialen Femurkondyle eines mittels ACT-Implantat versorgten Kniegelenks. Der gesetzte Defekt lässt sich noch über seine gesamte Größe nachweisen. Der große zentrale zystische Defekt entstand artifiziell durch das Herausbrechen des zentralen Fixierungsdatums beim Schneiden des Präparates (\*). Die Knochenstruktur mit ihren Trabekeln wurde durch den Pin komplett zerstört. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass die Kalzifizierungszone noch vorhanden ist (→). Die Bildung von Regeneratgewebe ist unterblieben. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 1 mm.
- b) Dargestellt ist hier der Übergang vom normalen Gelenkknorpel (rechts im Bild) zum Defekt (links im Bild). Deutlich zu erkennen ist die Tidemark, die die Kalzifizierungszone von der Radiärzone abgrenzt (\*). Die Kalzifizierungszone ist im Defektbereich noch vorhanden. Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- c) In diesem Präparat in 5-facher Vergrößerung wird die Defektmitte abgebildet. Mit dem Pfeil ist die zentrale Pinstelle, an der das ACT-Vlies intraoperativ fixiert wurde, markiert. Dort ist die sonst vorhandene Kalzifizierungszone unterbrochen. Während sich im rechten Bildanteil normaler lamellärer Knochen zeigt, findet sich links eine deutlich erhöhte Zellzahl in faserreichem Bindegewebe, das in Strängen und Wirbeln angeordnet ist. In der Tiefe zeigt sich ein erhöhter Toluidinblaugehalt, der für einen erhöhten Proteoglykangehalt wie in gesundem Knorpelgewebe spricht (\*). Toluidinblau-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- d) Detailaufnahme aus dem Defekt-Knorpel-Bereich. Der Übergang vom normalen Gelenkknorpel zum Regeneratgewebe ist kontinuierlich (von rechts nach links). Im gesunden Knorpel lassen sich Radiärzone, Tidemark (→) und Kalzifizierungszone abgrenzen. Dagegen findet sich im Defekt nur faserreiches, hyperzelluläres Bindegewebe (\*). Auch die normale Struktur des Lamellenknochens ist in diesem Bereich durch zellreiches Ersatzgewebe ausgetauscht (+). Hämatoxylin-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.
- e) In 10-facher Vergrößerung eines Defektzentrums erkennt man deutlich, dass sich ein zellreiches bindegewebiges Regenerat gebildet hat.

Besonders schön wird in diesem Präparat das in Strängen und Wirbeln angeordnete Bindegewebe demonstriert. In 1 mm Tiefe beginnt die normale Spongiosa (\*). Safranin-O-Färbung. Referenzstrecke 500 µm.

#### **4.4. Beurteilung der Ergebnisse mittels O´Driscoll-Score**

Die histologischen Präparate wurden anhand des modifizierten O´Driscoll-Scores ausgewertet. Dabei wurden die histologischen Präparate von zwei verblindeten Untersuchern beurteilt, die beide mit histologischen Fragestellungen vertraut sind.

##### **4.4.1. Originaler O´Driscoll-Score**

Im originalen O´Driscoll-Score erreichte die Leerlochgruppe einen mittleren Punktwert von  $5,6 \pm 3,7$  bei einer Spannweite von 2-12 Punkten. Die PGA-Implantate erreichten in Zusammenhang mit der Mikrofrakturierung einen Mittelwert von 0,83 (0-5 Punkte, SD 2,04). Die Kollagen-Vliese mit Mikrofrakturierung erreichten einen mittleren Punktwert von 1,67 (0-4 Punkte, SD 1,97). Bei den chondralen Defekten, die mit den Fibrin-Knochenmark beimpften PGA-Vliesen versorgt worden waren, wurde ein Mittelwert von 1,83 (0-6 Punkte, SD 2,14), bei jenen mit Kollagen-Implantaten behandelten Läsion wurde ein mittlerer Punktwert von 3,17 (0-9 Punkte, SD 3,82) erzielt. Das beste histologische Ergebnis erreichten die ACT-Implantate mit einem Mittelwert von 5,00 (1-9 Punkte, SD 2,76).

#### 4.4.2. Modifizierter O´Driscoll-Score

Die Ergebnisse des modifizierten O´Driscoll-Scores werden zusammenfassend in der nachstehenden Tabelle dargestellt.

Chondrale Defekte	Leerloch	PGA + Mikro	Kollagen + Mikro	PGA + Fibrin	Kollagen + Fibrin	ACT
Zellmorphologie	1,3	0	0,33	0	0,33	1,00
Anfärbarkeit der Matrix mit Safranin-O	1,2	0,17	0	0,17	0,33	0,33
Gleichmäßigkeit der Oberfläche	0,3	0,17	0,33	0,17	0,50	0,67
Strukturelle Integrität	0,2	0	0,17	0	0,33	0,33
Dicke	0	0,17	0,17	0,17	0,33	0,17
Verbindung mit angrenzendem Knorpel	0,3	0,17	0,33	0,33	0,33	0,67
Zellularität	0,3	0	0	0	0	0,33
Bildung von Chondrozytenclustern	0,2	0	0	0	0	0,17
Freiheit des angr. Knorpels von deg. Erscheinungen	1,8	0,17	0,33	1,00	1,00	1,33
Anwesenheit von Kollagen I	0,2	0,17	0,33	0,33	0,50	0,67
Anwesenheit von Kollagen II	0,5	0,17	0,33	0,33	0,50	0,33
Anwesenheit von Aggrecan	0,5	0,17	0,50	0,33	0,50	0,67
Blutgefäße im Regenerat	0,8	0,17	0,17	0,17	0,33	0,50
Metachromasie bei Toluidinblau	0,7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gesamtsumme	8,3	1,50	3,00	3,00	5,00	7,17

Tabelle 4.1: Verteilung der durchschnittlichen Punktbewertung der einzelnen Präparate auf die Kriterien des erweiterten O´Driscoll-Scores. Die in der Tabelle dargestellten Werte entsprechen den auf zwei Stellen gerundeten Mittelwerten der einzelnen Präparate. In der rechten Spalte werden die maximal erreichbaren Punkte angegeben, die bei gesundem, hyalinem Knorpel erzielt werden.

In der vergleichbaren Leerlochgruppe fand sich im modifizierten Score ein Punktwert von  $8,3 \pm 4,7$  mit einer Spannweite von 0-13 Punkten. Die PGA-Implantate mit Mikrofrakturierung erreichten einen Mittelwert von 1,50 (0-9 Punkte, SD 3,67). Bei den Kollagen-Vliesen mit Mikrofrakturierung konnte ein mittlerer Punktescore von 3,00 (0-8 Punkte, SD 3,58) erreicht werden. Im Vergleich von PGA-Implantat mit Fibrin-Knochenmark-Beimpfung und Kollagen-Fibrin-Knochenmark-Vlies erreichten die PGA-Implantate einen

durchschnittlichen Score von 3,00 (0-9 Punkte, SD 3,41), wohingegen die Kollagen-Implantate im Mittel 5,00 (0-14 Punkte, SD 5,72) erzielten. Die ACT-Präparate erreichten, wie dies nicht anders zu erwarten war, mit 7,17 (1-13 Punkte, SD 4,26) den höchsten Durchschnittsscore. Diese Implantate waren somit auch die einzigen, bei welchen in keinem einzigen Fall in der Gesamtsumme 0 Punkte vergeben werden mussten.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Score-Wertungen eingegangen. Die Beurteilung der Zellmorphologie des Regenerates auf das Vorhandensein hyalinen Gelenkknorpels erbrachte bei keinem Präparat die maximale Punktzahl von 4. In 50% der ACT-Implantate konnte zumindest unvollständig differenziertes Mesenchym nachgewiesen werden. Bei den PGA-Vliesen, unabhängig von den zusätzlich durchgeführten Maßnahmen, wurde nur Bindegewebe oder Knochen nachgewiesen. Einzig bei zwei Kollagen-Präparaten, jeweils ein Implantat mit Mikrofrakturierung und eines mit Fibrin-Knochenmark, konnte unvollständig differenziertes Mesenchym beobachtet werden.

Bei der Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-O konnten demnach in allen Regeneraten maximal schwache Farbintensitäten dokumentiert werden. Kein einziger Farbnachweis gelang in den Kollagen-Implantaten mit Mikrofrakturierung. Jeweils ein positiver Nachweis konnte bei den PGA-Präparaten, jeweils zwei Nachweise bei den ACT- und den Kollagen-Fibrin-Implantaten erbracht werden.

Bei der Oberflächenbeschaffenheit konnte keines der Regenerate die volle Punktzahl erreichen. Nur bei einem anterioren Defekt der Kollagen-Fibrin-Gruppe konnte eine oberflächlich horizontale Schichtung gesehen werden. Bis auf jeweils eine Ausnahme mit ausgeprägter Rissbildung des Gewebes wurden unter den PGA-Implantaten nur schwerste Oberflächenstörungen gefunden. In 4 von 6 Fällen fanden sich bei den ACT-Gruppen ebenfalls Risse, die 25% des Regenerates überschritten, schwerste Störungen fielen nur bei zwei Präparaten auf.

Ebenso wie bei der Beurteilung der Zellmorphologie konnten auch bei der strukturellen Integrität des neugebildeten Gewebes bei ausnahmslos allen PGA-Gruppen nur schwere Zerstörungen entdeckt werden und somit nur 0 Punkte vergeben werden. Bei den ACT- und Kollagen-Fibrin-Präparaten fanden sich

jeweils zwei, bei der Gruppe der Kollagen-Implantate mit Mikrofrakturierung lediglich ein vorderer Defekt mit nur leichten Störungen. Alle anderen wiesen ebenfalls eine schwere Zerstörung der strukturellen Integrität auf.

Die Begutachtung der Regeneratdicke zeigte nur bei den mit Kollagen und Fibrin versorgten Gelenkdefekten in zwei Präparaten eine Knorpelschicht von mehr als 50% des angrenzenden gesunden Knorpels, in allen anderen Gruppen konnte dies nur bei jeweils einem Präparat festgestellt werden. Bei allen anderen Defektarealen lag die Knorpeldicke immer unterhalb der 50%.

Zuletzt wurde im Zusammenhang mit der strukturellen Eigenschaft des Knorpels die Anbindung des neugebildeten Gewebes mit dem angrenzenden Knorpel beurteilt. Eine Anbindung an beide Enden des Implantats ließ sich in keinem der Präparate nachweisen. Lediglich ein PGA-Vlies mit Mikrofrakturierung schaffte zumindest eine Anbindung an einem Ende, bei allen anderen Gruppen wurden wenigstens zwei Läsionen gefunden, die teilweise an beiden Enden angebunden waren. In der ACT-Gruppe konnte dies an vier Präparaten belegt werden.

Als nächste Einheit wurden Degenerationszeichen anhand der Zellularität und Bildung von Chondrozytenclustern bewertet. Bis auf in der Gruppe der ACT-Implantate konnten zu etwa gleichen Teilen ausschließlich schwere Hypozellularitäten und auch Hyperzellularitäten nachgewiesen werden. Bei den mittels ACT versorgten Knorpeldefekten konnte in zwei Fällen eine mittelschwere Hypozellularität erfasst werden. Normale Zellzahlen oder nur leichte Hypozellularitäten traten in keinem Präparat auf. Chondrozytencluster, die in gesundem, hyalinem Knorpel nicht vorkommen, fanden sich in durchgehend allen histologischen Präparaten. Während die Clusterbildung in 29 Präparaten 25-100% der Zellen betrug und somit jeweils kein Punkt vergeben werden konnte, lag diese in nur einem vorderen Defekt der ACT-Gruppe unter 25%.

Der letzte Aspekt des originalen O'Driscoll-Scores beleuchtet nicht den Defekt selbst, sondern den angrenzenden Knorpel. Am schlechtesten schnitten dabei diejenigen Läsionen ab, die mit PGA-Implantaten und Mikrofrakturierung versorgt worden waren. Lediglich ein Präparat zeigte in der Übergangszone von Defekt und gesundem Knorpel eine leichte Hypozellularität und schwache Anfärbbarkeit und diese Gruppe erreichte damit nur eine durchschnittliche

Bewertung von 0,17 Punkten. Wenig besser war die Kollagengruppe mit Mikrofrakturierung. Dort fand sich die eben genannte Ausprägung bei zwei Präparaten mit einem dadurch errechneten Mittel von 0,33 Punkten. Zu einem weitaus besseren Ergebnis führten die Auswertungen der PGA- und Kollagen-Gruppe mit Fibrin-Knochenmark-Beimpfung. Dort konnte ein Durchschnitt von 1,00 Punkten ermittelt werden. Dabei fand sich in jeder Gruppe zumindest ein Präparat, in dem eine normale Zellzahl mit leichter Clusterbildung und mittlerer Anfärbbarkeit vorlag. Die besten Resultate erzielten die ACT-Defekte. Eine schwere Hypozellularität trat in keinem Fall auf und es konnten sogar in zwei Präparaten eine normale Zellzahl und eine nur leichte Clusterbildung am dem Defekt angrenzenden gesunden Knorpel nachgewiesen werden. Somit ergab sich in dieser Gruppe ein Mittelwert von 1,33 Punkten bei einer möglichen Gesamtpunktzahl von 3 Punkten.

In der Modifizierung des Bewertungsschemas wurde zunächst die Anwesenheit von Kollagen I im Defektregenerat beurteilt. In 18 Präparaten konnte Kollagen I in der gesamten Läsion nachgewiesen werden. Kein einziges Präparat war Kollagen-I-frei. Dies lässt sich auch deutlich an den in der oben aufgeführten Tabelle eingetragenen Mittelwerten erkennen. Bei einer maximal möglichen Summe von 2 Punkten erreichten die ACT-Präparate durchschnittlich 0,67 Punkte, die PGA-Präparate mit Mikrofrakturierung erzielten nur 0,17 Punkte.

Die Beurteilung der Defekte auf Kollagen II ergab ein noch ernüchternderes Resultat. Bei 25% der Kollagen-Fibrin-Implantate fand sich wenigstens in Teilen des Regenerates Kollagen vom Typ II, während sich in 20 Knorpelläsion überhaupt kein Nachweis dieses Kollagentyps erbringen lies. Dies bedeutet, dass nicht einmal in 17% aller Präparate Kollagen II nachgewiesen werden konnte.

Als nächster Punkt wurde die Anwesenheit von Aggrecan beurteilt. Als Hauptbestandteil der Proteoglykane der Knorpelmatrix ist es für die Bindung des Wassers verantwortlich und macht etwa 10% des Knorpelgewichtes aus. Auch hier lieferten die PGA-Implantate mit Mikrofrakturierung mit nur 0,17 Punkten das schlechteste Ergebnis. Bei nur einem Präparat fand sich eine teilweise positive Markierung. In beiden Kollagen-Gruppen konnte in jeweils drei Präparaten zumindest in Anteilen des Defektes Aggrecan angetroffen werden. Ein

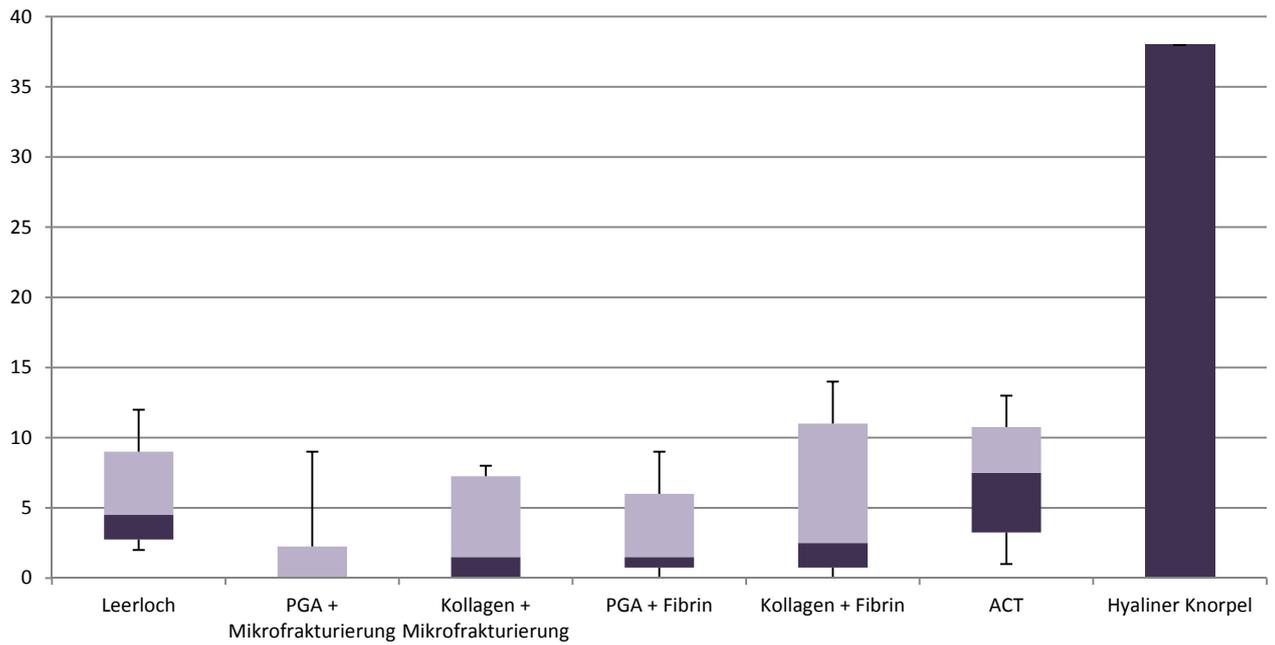
immunhistologischer Aggregatnachweis im ganzen Regenerat fand sich bei keiner einzigen Läsion.

Da sich in gesundem hyalinem Knorpel keine Blutgefäße befinden, wurde auch deren Anwesenheit im Regenerat zur Erweiterung des O'Driscoll-Scores herangezogen. Lediglich in einem untersuchten Präparat konnten keine Gefäße gesehen werden und somit die volle Punktzahl vergeben werden. Dies war in einem vorderen Defekt der Kollagen-Fibrin-Gruppe der Fall. In dieser Gruppe hatten dafür aber im Gegenzug alle weiteren Regenerate Blutgefäße, die bis zur Gelenkoberfläche reichten, so dass trotz des einen Präparates nur ein Durchschnittswert von 0,33 Punkten erreicht werden konnte. Interessanterweise waren in dieser Kategorie unter den 6 mit zumindest einem Punkt bewerteten Defekten 5 vordere und nur 1 hintere Läsion. Am besten schnitten wieder die ACT-Implantate mit einem Mittelwert von 0,5 Punkten ab.

Zuletzt erfasste das modifizierte Schema noch die Metachromasie bei Toluidinblau. Ab einer bestimmten Konzentration des Toluidinblaus bewirkt dieses eine Metachromasie des hyalinen Knorpels.

#### **4.4.3. Statistische Auswertung**

Nach der Berechnung der einzelnen Punktwerte wurden die Ergebnisse aller fünf Versuchsgruppen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Hierzu fand der Kruskal-Wallis-Test Verwendung. Der von William Kruskal und W. Allen Wallis 1952 entwickelte Test ist eine Erweiterung des Mann-Whitney U-Tests auf mehr als zwei Stichproben [162]. Dabei vergleicht das auch als H-Test bekannte Verfahren statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten. Voraussetzung für diese Varianzanalyse sind lediglich unabhängige Stichproben, eine stetige Verteilung der Daten und mindestens ordinalskalierte Variablen. Die Nullhypothese dieses Tests lautet, dass zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied besteht. Zur Berechnung werden die Originaldaten durch die entsprechenden Rangplätze ersetzt, die sich bei der Ordnung der Datenwerte der Größe nach über die Gruppen hinweg ergeben. Das Vorgehen während der Auswertung und auch die Verwendung dieser einfaktoriellen Varianzanalyse wurden zusammen mit einem Statistiker ausgearbeitet.



Grafik 4.2: Darstellung der durchschnittlichen Gesamtpunktzahl der einzelnen Bioimplantate nach Auswertung des modifizierten O'Driscoll-Scores im Vergleich zur Auswertung der Leerlochgruppe und eines gesunden Knorpelgewebes.

## 5. Diskussion

Trotz intensiver Auseinandersetzung unzähliger weltweiter Forschungsgruppen mit dem Thema Knorpelregeneration und Fertigung von hyalinen Knorpelersatzpräparaten stellt ein isolierter Knorpeldefekt die Mediziner bis heute vor ein nur bedingt lösbares Problem. Durch seine biologische Zusammensetzung als avaskuläres, alymphatisches und nervenloses Gewebe fehlt ihm die Fähigkeit, sich selbst zu regenerieren [3]. Die in typischerweise drei Stadien verlaufende Wundheilung, angefangen beim entstanden Defekt über die Entzündungsreaktion bis hin zur Proliferations- und Reparaturphase kann bei hyalinem Knorpel nicht stattfinden, da die Entzündungsantwort als Exsudationsphase eines Gewebes auf das Vorhandensein von Blut- und Lymphgefäßen angewiesen ist. Zum anderen scheint auch die geringe Anzahl an Chondrozytenvorläuferzellen eine entscheidende Rolle zu spielen [163, 164]. Beim Erwachsenen beträgt der Anteil an Chondrozyten nur noch knapp 2% des gesamten Knorpelvolumens [9]. Zwar gehen manche Autoren davon aus, dass bereits eine Clusterbildung in Randarealen von Defekten eine gewisse Proliferationstendenz anzeigt, doch eine weitere Reparatur der Läsion schließt sich daran nicht an [165, 166].

Ganz anders verhält es sich da mit den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks und der inneren Zellschicht von Periostlappen [63, 64]. Ebenso wie die Stammzellen besitzen auch diese Zellen des Periosts, der sog. „cambium layer“ [167], die Fähigkeit, sich zu Chondrozyten zu differenzieren und hyalinen oder hyalinähnlichen Knorpel zu bilden [168].

Die Erkenntnis, dass durch das Einströmen von Knochenmarkszellen und dem Einwirken von mechanischen Stimuli eine Differenzierung von Zellen in Chondrozytenvorläuferzellen möglich ist, führte zu den bereits Anfang der sechziger Jahre durchgeführten Pridie-Bohrungen mit einer Eröffnung des subchondralen Raumes und somit der operativen Herstellung eines Anschlusses an das darunter liegende Knochenmark [35, 37, 169, 36]. Ein ähnliches Vorgehen wurde etwas später mit der Mikrofrakturierung verfolgt [39, 40, 33]. Bei beiden Verfahren war es das Ziel, durch die Bildung eines Blut-Fibrin-Gerinnseis eine reparative Antwort des Defektes mit damit assoziierter Vaskularisierung

einzuweisen, die aufgrund der hyalinen Avaskularität nicht erreicht werden würde. Allerdings konnte damit nur minderwertiger Faserknorpel, der in erster Linie Kollagen Typ I enthielt, erzeugt werden. Die Forschergruppe um Brittberg und Peterson versuchte, mit Hilfe von *in vitro* gezüchteten Chondrozyten, die später auf die Knorpelläsion replantiert wurden, diese fehlende Proliferationstendenz auszugleichen. Doch auch dieses Regeneratgewebe stellte allenfalls einen Mix aus fibrösen, fibrocartilaginären und hyalinartigen Anteilen dar und degenerierte aufgrund der unzureichenden biomechanischen Stabilität innerhalb kürzester Zeit [61].

So wurden im Laufe der Zeit beständig neue Modifikationen der oben genannten Verfahren erprobt. Unter Zugabe von Wachstumsfaktoren, Testen unterschiedlicher Trägermaterialien und gezielte mechanische Belastung wurde versucht, die Differenzierung zu beeinflussen [114, 115, 128, 129, 136]. Zwar wurden hierdurch deutlich bessere Ergebnisse erzielt, rein hyaliner und belastungsstabiler Gelenknorpel konnte dadurch aber bisher nicht gezüchtet werden.

Die am menschlichen Organismus von allen Vorgehensweisen bislang am erfolgreichsten eingesetzte Methode stellt die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) sowohl auf einem Periostlappen als auch auf natürlichen Polymeren dar [60, 61, 86]. Der zweizeitige operative Eingriff, die langwierige postoperative Nachbehandlung und die hohen Kosten zwingen aber zu einer engen Indikationsstellung. Allerdings muss dem entgegengehalten werden, dass die Arbeitsgruppe um Knutsen et al. in einem ein Jahr postoperativem, klinischem Vergleich zwischen der autologen Chondrozytentransplantation und der Mikrofrakturierung an 80 Patienten sowohl klinisch als auch histologisch keinen Unterschied in beiden Therapiegruppen finden konnte [170]. Auch nach einem Zeitraum von fünf Jahren konnten in beiden Gruppen bei 77 % der Patienten zufriedenstellende Ergebnisse erhoben werden und bei einem Drittel jeder Gruppe wurden radiologische Zeichen der Arthrose nachgewiesen [171].

Eine Lösung, die wenig invasiv, kostengünstig und vor allem langfristig wirksam ist, wäre deshalb wünschenswert.

## 5.1. Bioimplantate

Mit der oben aufgeführten Methode der ACT war es erstmals gelungen, *in vitro* vermehrte Chondrozyten für die Knorpelregeneration zu nutzen. Zusammen mit der Erkenntnis, dass es möglich ist, aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen zu Chondrozyten zu differenzieren, konnten neue Wege eingeschlagen werden. Würden sich autologe Chondrozyten aus zuvor gewonnenem Knochenmark *in vitro* züchten lassen, wäre es nicht mehr notwendig, einen Defekt außerhalb der Hauptbelastungszone von Gelenken zu setzen, um bereits differenzierte Chondrozyten für eine Vermehrung *in vitro* und spätere Replantation zu gewinnen. Gemeinsam mit den Erfahrungen der Mikrofrakturierung könnte möglicherweise sogar bei der Verwendung geeigneter Implantate eine Regeneration *in vivo* erreicht und damit die mangelhaften Eigenreparaturmechanismen hyalinen Knorpels mit der damit verbundenen inkompletten „*restitutio ad integrum*“ umgangen werden [14, 13, 15, 155]. Entscheidend für die Verwendung eines geeigneten Bioimplantates waren deshalb grundlegende Erkenntnisse aus der Literatur.

Die Aufgabe des gesunden hyalinen Knorpels besteht darin, die Stoßkräfte, die auf ein Gelenk wirken, abzdämpfen und gleichmäßig auf die Gelenkfläche zu verteilen [8]. Dafür muss er die Fähigkeit besitzen, nach starker Deformierung durch Druck wieder in seine Ausgangsform zurückzufinden [10]. Ermöglicht wird dies durch ein ausgedehntes dreidimensionales Netzwerk aus Kollagenfibrillen, deren Hauptanteil zu etwa 90% das Kollagen Typ II bildet. Die Proteoglykane und die daran gebundenen Wassermoleküle sorgen für den notwendigen Quellungsdruck, dem das Kollagenetzwerk entgegenwirkt und das Gebilde unter Spannung hält [12]. Aus diesem Grund haben sich viele Forschungen auf diese dreidimensionalen Gerüste fokussiert, welche die physiologischen Gegebenheiten nachbilden sollen [128, 94, 131]. Dabei muss die Möglichkeit dahingehend bestehen, die Differenzierung direkt in eine Zelllinie zu beeinflussen, die Nährstoff- und Abfalldiffusion uneingeschränkt zuzulassen, den Defekt in seiner kompletten Größe auszufüllen und sich den vorherrschenden mechanischen Belastungen anzupassen. Zudem sollten die dreidimensionalen Konstrukte eine ausreichende Offenporigkeit besitzen, um eine gute Zellintegration zu gewährleisten.

Die im Rahmen der matrix-assoziierten ACT aus gesundem hyalinem Knorpel gewonnenen Chondrozyten werden *in vitro* vermehrt und später auf geeignete Scaffolds, die wieder replantiert werden, aufgeimpft. Chondrozyten könnten somit die augenscheinlich besten Zellen zur Züchtung neuen Gelenkknorpels darstellen, da sie selbst in natürlichem Knorpel vorkommen. Allerdings bringen diese auch große Probleme mit sich: Der Anteil an matrixproduzierenden Chondrozyten ist sehr begrenzt, deren Mitoserate und folglich deren Proliferationsfähigkeit ist äußerst niedrig und die Bioaktivität ist gering [94]. Um jedoch mechanisch stabiles Knorpelgewebe zu produzieren sind eben genau diese Faktoren von enormer Wichtigkeit. Ausreichendes Zellmaterial bietet dagegen die menschliche Haut. Mit ihren reichlich vorhandenen Fibroblasten stellen sie ein gewaltiges Potential an möglichen Zellen zur Verfügung. Zwar bilden diese nach einer Beimpfung auf PLA-Netze und direkte Implantation auf einen chondralen Defekt fibrösen Knorpel, können aber unter geeigneten Bedingungen in einen knorpeligen Phänotyp differenziert werden [172]. Werden sie in entmineralisiertem Knochen kultiviert, erlangen sie die Fähigkeit, Aggrecan und Kollagen Typ II zu produzieren [173]. Ein noch viel besseres Leistungsvermögen besitzen aber mesenchymale Stammzellen, wie sie im menschlichen Knochenmark vorkommen [92, 93, 96]. Diese Vorläuferzellen besitzen die Anlage, sich bei geeigneten äußeren Gegebenheiten den Anforderungen anzupassen und sich so z.B. in Chondrozyten zu differenzieren [139, 140]. Das Einströmen dieser mesenchymalen Stammzellen kann entweder durch eine Eröffnung der subchondralen Platte mittels Pridie-Bohrung oder Mikrofrakturierung oder durch eine intraoperative Zellanreicherung erfolgen, so dass nur noch ein operativer Eingriff notwendig ist. Um ein Verschleppen der eingewanderten Stammzellen zu verhindern, sind Fixierungsmaßnahmen notwendig, wie sie u.a. durch einen Fibrin-Zell-Mix erreicht und der Oberfläche des gesunden Knorpels angepasst werden können. Nachteile birgt jedoch die unzureichende mechanische Stabilität des Konstrukts und der bei höheren Fibrin- und Thrombinkonzentrationen auftretende negative Einfluss auf die Proliferation der Zellen [174, 175].

Die Theorie der „Kausalen Histiogenese“ von Pauwels besagt, dass sich Zellen ihren umgebenden Bedingungen anpassen und sich dadurch in

Abhängigkeit von der Umgebung und den einwirkenden Kräften unterschiedlich differenzieren können [139]. So konnte als chondrogener Stimulus der Einfluss des hydrostatischen Drucks als auch der dynamischen Kompression nachgewiesen werden [141, 142]. Als Widerlager für die Stoßkräfte, die bei einer Belastung wirken, muss also bei einem Knorpeldefekt der subchondrale Knochen eine entscheidende Rolle spielen. Ist dieser zerstört und kann den mechanisch wirkenden Kräften nicht entgegenhalten, so kann auf die auf dem Implantat oder im Fibrin-Zell-Mix befindlichen Stammzellen kein ausreichender Druck ausgeübt werden, um zur Differenzierung in eine chondrogene Zelllinie beizutragen [176, 177, 178]. Dies bedeutet, dass eine suffiziente Unterstützung des Implantates dringend erforderlich ist, um dieser Theorie Folge zu leisten. Zudem muss das verwendete Material gerade im Hinblick auf die postoperative Belastungsmöglichkeit ausreichend stabil sein.

Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Punkt stellt eine vollständige biologische Abbaubarkeit des verwendeten Implantates dar, um eine komplette Ausheilung des Knorpeldefektes nicht zu gefährden. Nichtresorbierbare Implantatreste könnten das Remodelling des Knorpels in seiner typischen arkadenförmigen Faserarchitektur verhindern. Auch das Auslösen einer inflammatorischen oder immunologischen Reaktion durch bioinkompatible Materialien könnte die Regeneration stören und dadurch vielleicht sogar eine Degeneration bis hin zur Arthrose bewirken [132, 133, 135, 179].

So waren die Anforderungen an die zu verwendenden Implantate hoch. Das Material sollte aufgrund der geringen Knorpelhöhe beim Schafsknie eine Dicke von 1 mm nicht überschreiten, um dadurch Irritationen aufgrund der unterschiedlichen Knorpelhöhe zu vermeiden. Zur Wahl standen damit Vliese aus dem Bereich der natürlichen und synthetisierten Polymere. Den bekanntesten Vertreter der natürlichen Polymere stellen die Trägerstoffe mit Kollagen Typ I dar. Auch wenn im hyalinen Knorpel selbst kein Kollagen Typ I vorkommt, so werden dadurch weniger häufig immunologische Reaktionen als bei Kollagen Typ II hervorgerufen [127]. Der Kollagenschwamm entsteht durch einen Lyophilisationsprozess aus equinen Kollagen-I-Fasern und erhält durch eine anschließende ultraviolette Bestrahlung seine Poren von 120-200µm durch eine Vernetzung der Fasern untereinander. Der bei dem Lyophilisationsprozess

entstehende Unterschied der Oberflächenbeschaffenheit wurde als Vorteil bei der Implantation genutzt, da die raue Seite mit erhöhter Porösität auf die subchondrale Platte aufgesetzt wurde, um das Einströmen der mesenchymalen Stammzellen aus den Mikrofrakturierungen zu erleichtern und eine bessere Haftung auf dem Knochen zu erreichen. Die Resorptionszeit dieses Trägerstoffes wird zwischen 2 Monaten und 1 Jahr angegeben [180, 181, 182].

Dem gegenüber stehen die synthetisierten Polymere aus resorbierbaren Estern, wie z.B. Polylactid- (PLA) oder Polyglykolsäure (PGA), Polycaprolactone oder Polyphosphate. Der bekannteste unter den eben genannten Werkstoffen ist die Polylactidsäure, die zu 70% aus L-Lactid und zu 30% aus DL-Lactid besteht. Sie kann durch einen Gärungsprozess aus Maisstärke oder Rohrzucker gewonnen werden und stellt ein langkettiges Polymer aus dem zyklischen Ester der Milchsäure dar. Dieser Grundstoff wird schon seit längerer Zeit zur Herstellung von selbstauflösendem Nahtmaterial, resorbierbarem Osteosynthesematerial oder für Stents in der Chirurgie verwendet. Aber auch im täglichen Leben kann dieser Polyester sinnvoll eingesetzt werden. So findet sich PLA u.a. in Bekleidungsstoffen, Biomülltüten oder Babywindeln. Im menschlichen Organismus wird das Material hydrolytisch in einzelne Lactatmoleküle abgebaut, die auch als natürliche Metaboliten z.B. beim Abbau von Zucker im Rahmen der anaeroben Glykolyse entstehen. Diese  $\alpha$ -Hydroxysäuren werden in den normalen Stoffwechsel eingebunden. Allerdings kann es bei einem langsameren Abtransport zu einer Anhäufung des sauren Abfallproduktes und auf diese Weise zu einer Verschiebung des pH-Wertes mit damit verbundener Proliferationsstörung der Stammzellen kommen [183, 184]. Das könnte die Erfolgsdifferenzen zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Studien erklären, da in den optimierten Laborbedingungen mit einem schnellen Abtransport der sauren Metabolite stets ein konstantes pH-Milieu gehalten werden kann. Bei der Degradation scheinen allenfalls geringe immunologische oder inflammatorische Reaktionen aufzutreten, wobei einige Autoren in ihren histologischen Präparaten Fremdkörperriesenzellen nachweisen konnten, die eine Chondrogenese nachteilig beeinflusst hatten [185, 186, 187]. Die Resorptionszeit des PLA wird in der Literatur mit 40-50 Wochen angegeben, manche Autoren konnten jedoch zeigen, dass der Umbau dieser Polymere auch mehr als zwei Jahre betragen

kann [188]. Verwendet wurde dieses Polymer zur zentralen Fixierung der Implantate.

Neben dem bereits beschriebenen Kollagenvlies bestand das zweite Implantat aus Polyglykolsäure, einem weiteren Vertreter der langkettigen Polymere der  $\alpha$ -Hydroxysäure. Die PGA ist das hydrophilste Polymer dieser Gruppe und besitzt im Unterschied zum PLA keine zusätzliche Methylgruppe. Deshalb kann es auch deutlich schneller abgebaut werden und weist eine Resorptionszeit von lediglich 8-16 Wochen auf [189]. Die Eignung dieser Vliese wurde bereits in mehreren Studien bestätigt [190, 88, 191, 155, 20]. Der Faserabstand in diesen Implantaten beträgt zwischen 40 $\mu$ m und 150 $\mu$ m und sorgt somit für eine gute Adhärenz von Zellen an den Fasern, ohne dabei die Matrixproduktion zu behindern.

All diesen synthetisch hergestellten Polymerschwämmen gemeinsam ist jedoch die quantitativ geringe Haftung der Zellen an den Vliesstrukturen. Durch die bei Belastung wirkenden mechanischen Kräfte kommt es zu einem Verlust an Zellen, die nicht an den Vliesstrukturen haften bleiben. Diesem sollte durch geeignete Maßnahmen entgegengewirkt werden. Eine Möglichkeit wäre es, eine adhäsivere Faserstruktur zu schaffen, wie dies z.B. durch die Zugabe von Adhäsionsfaktoren geschehen könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Beimengung von viskösen Suspensionen wie z.B. Agarose, Alginat oder das in einem Teil dieser Versuche verwendete Fibrin-Thrombin-Gemisch [192]. In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass derartige Suspensionen eine eher geringere biomechanische Stabilität besitzen [175, 193, 194]. Demgegenüber stehen aber auch aktuelle *in vivo*-Studien, die dieser Annahme entgegentreten und zeigen, dass eine Versiegelung des Knorpeldefektes mit Fibrin durchaus zu positiven Ergebnissen führen kann [195, 196, 197]. Im Gegensatz dazu interagieren natürliche Polymere mit den Zellen über Oberflächenrezeptoren und regulieren oder dirigieren deren Zellfunktion. Eine Interaktion der Zellen mit dem Bioimplantat ist jedoch für die phänotypische Entwicklung der Zellen und deren synthetisierten Matrix nicht zwingend erforderlich. Viel wichtiger scheint dagegen die Bindung und Anordnung der Zellen in einer dreidimensionalen Struktur zu sein, um die für hyalinen Knorpel typische Zonenbildung zu imitieren und eine Dedifferenzierung der Chondrozyten

zu verhindern. Die Zellen müssen sich demnach nur an die Fasern binden, um ihre Position zu behalten. Ob diese Bindung dabei nur auf Zell-zu-Zell-Interaktionen beruht, ist unerheblich. Mehrere Studien konnten zeigen, dass sich das Verhalten von Chondrozyten in Monolayerkulturen durch eine Abnahme der Proteoglykan- und Kollagen-II-Synthese und eine Zunahme der Kollagen-I-Synthese auszeichnet [198, 112, 113]. Zusammen mit der initial vorhandenen Zelldichte könnte dies die Ursache für die inhomogene Verteilung des Regeneratgewebes im Bioimplantat sein, da eine höhere Zelldichte die Bildung der extrazellulären Matrix fördert [199, 200].

## 5.2. Chondrale Defekte im Tiermodell

Zur Überprüfung der Differenzierungshypothese mesenchymaler Stammzellen in hyalines Knorpelgewebe durch mechanische Belastung unter Verwendung resorbierbarer Bioimplantate wurde als Versuchstier das Schaf gewählt. Das am häufigsten gewählte Versuchstier für Untersuchungen der Knorpelregeneration scheint das Kaninchen zu sein [201, 172, 202, 203, 204, 205, 62, 110, 206]. Dieses weist jedoch abgesehen von seiner geringen Größe und damit einfacheren und kostengünstigeren Haltung im Vergleich zum Schafsmodell einige Nachteile auf. Während die Knorpeldicke beim Kaninchen 0,2 - 0,3 mm aufweist, findet sich beim menschlichen Gelenkknorpel eine Dicke von durchschnittlich 2 - 2,5 mm [207]. Zwar liegt im Gelenkknorpel des Schafes auch nur eine Knorpeldicke von annähernd 0,5 - 1,0 mm vor und stellt somit bestenfalls nur maximal 50 % der Dicke beim Menschen dar, so ist dennoch die Verankerung des Bioimplantates mit einem glatten Übergang zum gesunden Knorpel vereinfacht, da die verwendeten Implantate ebenfalls eine Dicke von knapp 1 mm aufweisen. Kleinste Inkongruenzen der künstlichen Gelenkschicht sowie Abweichungen vom angestrebten Gelenkniveau könnten Druckspitzen erzeugen, die eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und damit die Induktion von Knorpel verhindern [208]. Eine aber noch viel entscheidendere Rolle scheint das Regenerationspotential des Gelenkknorpels beim Kaninchen zu spielen. So konnte demonstriert werden, dass hyaliner Knorpel beim Kaninchen eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit besitzt, so lange die subchondrale Platte nicht eröffnet wird [153, 207]. Demgegenüber reagiert der

Gelenkknorpel des Kaninchens sehr empfindlich auf eine Eröffnung des Markraumes, ganz im Gegensatz zum menschlichen Gelenk, bei dem die Eröffnung des Markraumes sogar gewollt ist und zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse führt [35, 41]. Doch auch hier konnte in der eigenen Arbeitsgruppe eine verbesserte Defektheilung unter Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen bei Kaninchen nachgewiesen werden [150]. Möglicherweise scheinen kleinste Inkongruenzen der artifizierten Gelenkschicht, sowie Abweichungen vom angestrebten Gelenkniveau Druckspitzen zu erzeugen, welche eine Differenzierung der Stammzellen und damit die Induktion von Knorpel verhindern. Dies könnte eine mögliche Erklärung der teilweise großen Diskrepanzen der zahlreichen Knorpeldefektstudien am Kaninchenmodell sein.

Vergleichende tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass sich der hyaline Knorpel des Schafes ähnlich dem des Menschen verhält [153]. Neben den Schafen und Kaninchen finden sich in der Literatur noch zusätzlich der Hund, das Pferd, die Ziege und das Schwein als mögliches Versuchstier [209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 13]. Eine dem Menschen etwa ebenbürtige Knorpeldicke findet sich am Kniegelenk des Pferdes mit Werten zwischen 1,5 bis 2 mm [216]. Doch auch wenn sich dort sehr ähnliche Knorpelverhältnisse finden lassen, so ist der operative Aufwand bei diesen Tieren um ein vielfaches höher als an den Schafen. Der Vorteil von Schafen gegenüber Hunden als Versuchsmodell beruht darin, dass Schafe ganztätig stehen und eine verletzte Extremität unter ausreichender Analgesie sofort voll belasten. Hunde ruhen sich dagegen während eines Tages mitunter stundenlang liegend aus und schonen eine verletzte Extremität unabhängig von der aktuellen Schmerzsituation.

Für die Versuche wurden ausgewachsene, etwa 1 Jahr alte weibliche Merino-Schafe mit einem Gewicht um ca. 70 kg ausgewählt. Die Wahl ausschließlich weiblicher Tiere lag im Kohabitationsverhalten und der sozialen Konfliktvermeidung in der postoperativen Phase der gemeinschaftlichen Stallhaltung begründet. Eine mögliche Schwangerschaft der Tiere wurde durch eine Veterinärmedizinerin im Vorfeld sonographisch ausgeschlossen. Das Schaf gilt mit einem Alter von 12 Monaten als ausgewachsen, so dass das Alter keinen Einfluss mehr auf das Regenerationsverhalten des Defektes haben kann.

Um eine mit dem Knorpelschaden am menschlichen Kniegelenk vergleichbare Ausgangssituation zu schaffen, wie sie z.B. nach einem Trauma oder einer Nekrose entstehen, wurden an der medialen Femurkondyle zwei chondrale Defekte mit einem Durchmesser von je 8 mm geschaffen [217, 218, 13]. Nur durch diese „kritischen“ Defekte in der Hauptbelastungszone konnte eine Vergleichbarkeit mit klinisch relevanten Knorpelläsion erreicht werden [219]. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass noch ausreichend gesunde Knorpelzone um den gesetzten Defekt erhalten blieb. Zudem wird kleineren Defekten von 3 bis 4 mm eine deutlich bessere Heilungstendenz zugeschrieben als Defekten mit einem größeren Durchmesser [220].

Entscheidend für eine relevante Regeneration des Knorpeldefekts war das Vorhandensein mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark [97, 145, 92, 93]. Dies wurde zum einen durch eine Mikrofrakturierung der subchondralen Platte, zum anderen durch die Beimpfung der Bioimplantate mit zuvor gewonnenem Knochenmark erreicht [41]. Im Vergleich dazu sollte die bereits beim Menschen erfolgreich eingesetzte autologe Chondrozytentransplantation Verwendung finden. Alle Implantate wurden durch einen Dart im zentralen Verankerungsloch des Defekts fixiert. Es wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass der Dartkopf nicht über das Defektniveau herausragte, um eine Irritation des gegenüberliegenden Knorpels bei Bewegungen des Gelenks zu vermeiden.

Das Setzen von zwei Knorpeldefekten mit jeweils einem Durchmesser von 8 mm an der medialen Femurkondyle gestaltete sich aufgrund der geringen Gelenkfläche als schwierig. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Defektfräsung beider Läsionen ausreichend weit voneinander entfernt erfolgte und dazwischen ein mindestens 5 mm breiter Steg gesunden Knorpels verblieb. Dadurch sollte vermieden werden, dass aus beiden Defekten eine große Knorpelläsion entstehen konnte. Es war in keinem der Präparate zu einer Verbindung beider Defektareale gekommen. Ob die Belastung in der Hauptbelastungszone des Kniegelenks tatsächlich an allen Stellen identisch ist, lässt sich nur schwer nachweisen, muss aber als Faktum angenommen werden.

### 5.3. Beurteilungsschema

Die grundlegende Forderung an ein Bewertungsschema stellt die Validität und Reproduzierbarkeit einer Beurteilung dar.

In den Anfängen erfolgte diese zunächst als rein deskriptive Beschreibung der histologischen Übersichtsfärbungen [220, 144, 59]. Diese wurden im Verlauf von einigen Autoren um immunhistochemische Färbungen erweitert [221, 127, 96]. Um diese Ergebnisse untereinander vergleichbar zu machen, wurden diverse semiquantitative Scores eingeführt [222, 223, 224]. Den einfachsten unter ihnen repräsentiert der Score nach Pineda, der insgesamt 4 Kriterien zur Beurteilung der Regeneratgüte heranzieht: die prozentuale Defektdeckung, die Wiederherstellung der osteochondralen Grenze, die Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix mit Safranin-O und die Zellmorphologie [224]. Insgesamt werden maximal 14 Punktwerte vergeben. Angewendet wurde dieser Score erstmalig zur Beurteilung der Defektheilung bei iatrogen gesetzten osteochondralen Defekten am Kniegelenk von Kaninchen. Ein sehr viel umfangreicheres Bewertungsschema wurde 1988 von O'Driscoll et al. aufgestellt [160]. Neben der Beurteilung der Safranin-O-Anfärbbarkeit und der Zellmorphologie wie bei Pineda muss hier zusätzlich die Oberflächenbeschaffenheit, die strukturelle Integrität, die Knorpeldicke, die Verbindung zum angrenzenden Knorpel, die Zellularität, die Bildung von Chondrozytenclustern und die Freiheit des angrenzenden Knorpels von degenerativen Erscheinungen begutachtet werden. Allen Bewertungsscores gemeinsam ist die Problematik, dass nicht eindeutig festgelegt ist, an welcher Stelle, d.h. zum Beispiel am Defektrand, im Zentrum oder im äußeren Drittel die Beurteilung des Knorpelregenerates erfolgen sollte. So können sich völlig unterschiedliche Ergebnisse ergeben, da sich am Defektrand oftmals ein besseres Resultat als in den zentralen Defektanteilen findet. Um den Knorpeldefekt rein makroskopisch und somit klinisch relevant zu beurteilen, wurden zwei weitere Bewertungssysteme ausgearbeitet: der International Cartilage Repair Score (ICRS) und der Oswestry Arthroscopy Score (OAS) [72, 225]. Im ICRS werden die Defektdeckung mit Knorpel, die Integration der Defektgrenze, das makroskopische Erscheinungsbild der Oberfläche und eine Gesamtbeurteilung der Regeneration bewertet. Insgesamt können maximal 24 Punkte oder im schlechtesten Fall 1 Punkt erreicht werden. Im OAS fließen die

Defekthöhe, die Integration des Defekts mit dem umgebenden Knorpel, die Oberflächenbeschaffenheit, die Farbe des Regenerats und seine Eigenschaft beim Sondieren mit ein. Es kann dadurch eine Gesamtpunktzahl von 0 bis 10 Punkten erreicht werden. In klinischen Studien zeigten sich beide Scores als effektive Werkzeuge in der Beurteilung der Knorpelregenerate in arthroskopischen Operationen [226, 227].

Für diese Arbeit wurde ein modifizierter O'Driscoll-Score zur Auswertung herangezogen, weil dadurch eine bessere Spezifizierung des Gewebetyps erreicht werden konnte. Neben den Kriterien des originalen Beurteilungsschemas wurde dieses durch immunhistochemische Nachweismethoden für Kollagen-I, Kollagen-II und Aggrecan erweitert und zudem um die Färbung mit Toluidinblau ergänzt. Auch die Anwesenheit von Blutgefäßen ebenso wie der subchondrale Defekt und der Einfluss des zentralen Darts flossen in die Beurteilung ein. Auch eine Auswertung der prozentualen Defektdeckung wie im Score nach Pineda wurde berücksichtigt [224]. Um die mitunter auftretende Variationsbreite des Knorpelregenerates mit Bereichen von fehlendem Regenerat über bindegewebige Narben bis hin zu faserknorpelähnlichen und hyalinartigen Strukturen zu standardisieren, erfolgte die Beurteilung jeweils durch einen histologischen Schnitt im Zentrum des Defektes. So wurde gleichzeitig gewährleistet, dass auch die Beurteilung des zentralen Verankerungspins möglich war. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen verblindeten Untersuchern kontrolliert, die in histologischen Fragestellungen ausreichende Erfahrungen besitzen. Zusätzlich wurde die Hyperzellularität des Regeneratgewebes ebenfalls als ein negatives Merkmal gewertet, so dass einem hyperzellulären Gewebe der jeweils ungünstigste Punktwert zugewiesen wurde. Dies entspricht auch der Meinung anderer Autoren [228].

Fand sich bei der Beurteilung des neu gebildeten Gewebes Knorpelgewebe am Boden eines tiefen, mit ansonsten faserreichem Material gefüllten Defektes, so wurde dies als nicht günstig gewertet und stattdessen der gelenknahe, oberflächliche Anteil beurteilt. Clusterbildungen im unmittelbaren Randbereich des Defektes und im weiter entfernt liegenden, gesunden Knorpel wurden als pathologische, degenerative Veränderung gesondert betrachtet. Fand sich eine knorpelartige Anbindung des Defektes an den gesunden Knorpel, wurde dies als

günstig bewertet. Lag jedoch eine faserreiche, bindegewebige Anbindung vor, wurde dies als negativer Befund ausgelegt. Eine Gewebsinhomogenität wurde immer als ungünstig beurteilt.

Aus den genannten Merkmalen lässt sich erkennen, dass eine objektive und reproduzierbare Beurteilung des Defektgewebes nur bei einem homogenen Regenerat möglich ist. Nachteilig erscheint es außerdem, dass inhomogene Präparate im Score nach O'Driscoll bereits verhältnismäßig schlecht abschneiden, da speziell auf strukturelle Charakteristika wie die Gleichmäßigkeit der Oberfläche, die strukturelle Integrität oder die Dicke des neu entstandenen Knorpels bereits 50 % der Gesamtpunkte entfallen. Zwangsläufig führt natürlich eine strenge Begutachtung unter Berücksichtigung aller aufgeführten Kriterien zu schlechteren Ergebnissen. Durch die Erweiterung des Original-Scores wurde zumindest versucht, eine bessere Trennschärfe zwischen einem guten und einem schlechten Regenerat zu erreichen.

## **5.4. Ergebnisse**

Anhand dieser Promotionsarbeit sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch die Wahl geeigneter Bioimplantate isolierte chondrale Defekte im lasttragenden Knorpelanteil des Kniegelenks beim Schaf zur Ausheilung zu bringen. Es wurden zwei unterschiedliche Trägermaterialien mit zwei verschiedenen Operationstechniken verglichen. Daneben wurde die bereits beim Menschen etablierte Methode der ACT angewandt.

Zunächst wurde die prozentuale Deckung des Defektes mit Knorpelgewebe beurteilt. Es fand sich die schlechteste makroskopische Regeneratbildung in den ACT-Präparaten mit einem Mittelwert von 47,5%, wobei sich bei einem Tier sowohl im anterioren als auch im posterioren Defekt eine sehr schlechte Deckung mit nur 32,1% bzw. 24,1% nachweisen ließ. Würde dieses Tier in der Berechnung nicht berücksichtigt, dann ergäbe sich eine durchschnittliche Deckung von 57,1%. Das makroskopisch beste Ergebnis lieferte die Gruppe der Kollagen-Vliese in Verbindung mit der Mikrofrakturierung. Dort konnte eine Defektdeckung von durchschnittlich 71,77% bei einer Varianzbreite von 46,3-87,1% erreicht werden.

Der Original-Score nach O'Driscoll führte bei den PGA-Implantaten mit Mikrofrakturierung zur schlechtesten Gesamtpunktzahl von nur 0,83 Punkten. Das beste Ergebnis hingegen wurde durch die ACT-Präparate mit durchschnittlich 5,0 Punkten erreicht. Im modifizierten Score erhielten die PGA-Mikrofrakturierungs-Implantate eine Gesamtsumme von 1,50 Punkten, bildeten damit aber weiterhin die Gruppe mit der schlechtesten Gesamtwertung. Die mittels ACT versorgten Defekte erreichten hier eine Gesamtpunktzahl von 7,17 Punkten.

Im Original-Score nach O'Driscoll zeigte ein Vergleich aller Bioimplantate gegenüber der ACT einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,01$ . Durch die Modifizierung des Scores blieb auch weiterhin ein Signifikanzunterschied von  $p < 0,05$  bestehen.

Auch bei der histologischen Auswertung zeigten sich die beiden bereits makroskopisch auffälligen Präparate der ACT-Reihe als Ausreißer. Mit einer durchschnittlichen Gesamtwertung von 9,5 Punkten für die makroskopisch überzeugenderen Ergebnisse standen diesen lediglich 2,5 Punkte des schlechten makroskopischen Regenerationsbefundes gegenüber. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen mit Leerlochpräparaten, wie sie auch aus der Literatur nach Leerlochversuchen bekannt sind, in welchen es nach dem Setzen von chondralen Defekten ohne weitere Versorgung zu einer mittleren Defektdeckung von 27% kam [229, 230]. Arøen et al. setzten in ihrer Studie an 34 Neuseelandkaninchen an beiden Kniegelenken jeweils einen 4mm messenden chondralen Defekt, von welchen ein Defekt ohne weitere Behandlung, der andere mittels Mikrofrakturierung und einem Periostlappen behandelt wurde. Nach einem Beobachtungszeitraum von 36 Wochen konnte nachgewiesen werden, dass es bei den unbehandelten Defekten zu einer Deckung von 33%, bei den Defekten mit Anschluss an das Knochenmark zu einer Deckung von 50% kam. Dorotka et al. verglich vier unterschiedlich behandelte Gruppen von chondralen Defekten am Kniegelenk von Schafen: in einer Gruppe wurden die Defekte mittels Mikrofrakturierung und einer mit Chondrozyten beimpften Kollagenmatrix, in einer weiteren Gruppe mittels Mikrofrakturierung und Kollagenmatrix, in einer dritten Gruppe lediglich mit Mikrofrakturierung und in einer letzten Gruppe unbehandelt versorgt. Auch hier

zeigte sich in der unbehandelten Kontrollgruppe nach 16 Wochen eine Defektdeckung von durchschnittlich 22%. Allerdings muss dazu gesagt werden, dass es sich bei den o.g. Versuchen um Knorpeldefekte mit einer Größe zwischen 4mm und 5mm handelte und bei den erstgenannten als Versuchstiere Kaninchen verwendet wurden. Das etwas bessere Abschneiden der Leerlochgruppe unter den Kaninchen kann möglicherweise durch den längeren Nachbeobachtungszeitraum (36 Wochen gegenüber 16 Wochen) und dem ohnehin höheren Regenerationspotential von Kaninchen gegenüber Schafen erklärt werden [153].

Für die Berechnung eines signifikanten Unterschiedes der Bioimplantate wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei einem Vergleich aller Gruppen untereinander ergab sich weder nach dem Original-Score noch nach dem modifizierten Score ein Signifikanzunterschied mit  $p=0,09$  bzw.  $p=0,20$ .

De Franceschi und Mitarbeiter veröffentlichten 2005 eine Studie, in welcher eine Kollagen-I-Matrix aus equinen Fasern einmal mit autologen Chondrozyten beimpft wurde und einmal unbehandelt an einen lasttragenden Teil des medialen Kaninchenfemurs beidseits implantiert wurde [127]. Verglichen wurden die Ergebnisse mit einer Leerlochgruppe. Die gesetzten Defekte hatten eine Größe von 5x6mm. Dabei wurden die Kniegelenke zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht: nach 1 und 3 Monaten konnten in keinem der untersuchten Defekte wesentliche Neubildungen von knorpelähnlichen Strukturen nachgewiesen werden. Nach 6 Monaten dagegen waren in den mit Chondrozyten beimpften Bioimplantaten erste Regenerationen mit fibrocartilaginären Veränderungen sichtbar. Nach einem Zeitraum von 12 Monaten fand sich unter diesen Präparaten ein deutlich organisierteres Gewebe. In den Vergleichsgruppen konnte keine signifikante Neubildung erzielt werden. Zur histologischen Auswertung wurde in dieser Arbeit ebenfalls der Score nach O'Driscoll angewendet, hier jedoch in einer etwas abgewandelten Form des Original-Scores. Beurteilt wurden die Zellmorphologie, die Matrixanfärbbarkeit, die Oberflächenbeschaffenheit, die Defektauffüllung, die Knorpeldicke und die Verbindung des Knorpelregenerates mit dem angrenzenden Knorpel mit einer Gesamtpunktzahl von 18. Dabei erreichte die Kombination Bioimplantat und autologe Chondrozyten nach 12 Monaten eine durchschnittliche Punktwertung

von 9,5, wohingegen die Leerloch-Gruppe und die alleinige Implantation der Bioimplantate nur zu einem Mittel von 5,7 bzw. 5,5 Punkten führten. Aus dieser Studie könnte sich ableiten lassen, dass der Beobachtungszeitraum unserer Tiere mit 3 Monaten zu kurz war, um eine bessere Defektheilung zu erreichen.

Wei et al. untersuchten die Spontanheilung osteochondraler Defekte an ausgewachsenen Kaninchen im Vergleich zu Defekten an jungen und heranwachsenden Tieren [231]. Im Original-Score nach O'Driscoll erreichten die Regenerate bei adulten Tieren nach 24 Wochen einen durchschnittlichen Punktwert von 10, nach 48 Wochen von 11 Punkten. Die makroskopische Auswertung ergab eine prozentuale Deckung mit Knorpel von 75,5% nach 6 Monaten, die zu einer Abnahme auf 61,1% nach Ablauf der 48 Wochen führte. Demnach scheint das Knorpelregenerat bei adulten Tieren erst nach einem längeren Zeitraum eine optimale Defektdeckung zu bilden. Dies würde die Hypothese des zu kurzen Beobachtungszeitraums erhärten, da in unserer Versuchsreihe die rein osteochondralen Defekte ohne Versorgung durch ein Bioimplantat nur eine Defektdeckung von 2,3% mit einem mittleren Punktescore von  $8,3 \pm 4,7$  bei einer Spannweite von 0 bis 13 Punkten erreichten. Eine mögliche Erklärung könnte auch das höhere Regenerationspotential vom Kaninchen gegenüber dem Schaf sein [153, 232].

Ob die Dauer des Beobachtungszeitraums allerdings tatsächlich Einfluss auf die Regeneratgüte hat, lässt sich mit einer Studie aus dem Jahr 2008 wieder in Frage stellen. Die Arbeitsgruppe um Schlichting et al. konnte einen signifikanten Rückgang der Regeneratdicke in einem Zeitraum zwischen 3 und 6 Monaten feststellen [233]. Es wurde an insgesamt 24 Merino-Schafen ein osteochondraler Defekt mit einem Durchmesser von 7,3mm und einer Tiefe von 10mm an der medialen und lateralen Femurkondyle gesetzt, von welchen jeweils ein Defekt mit einem Bioimplantat behandelt, der andere Defekt als Leerloch belassen wurde. 12 Defekte wurden mit einem starren, 12 Defekte dagegen mit einem weichen Bioimplantat als subchondraler Ersatz behandelt. Eine Beimpfung der Implantate mit Stammzellen oder Chondrozyten fand dabei nicht statt. Jeweils sechs Tiere jeder Gruppe wurde nach 3 Monaten, die anderen nach 6 Monaten euthanasiert. Nach 3 Monaten entsprach die Dicke des neu gebildeten Knorpels in etwa der Dicke des gesunden Knorpelgewebes, wobei sich kein

Unterschied zwischen weichem und starrem Bioimplantat feststellen ließ. Dagegen zeigte sich nach 6 Monaten ein Rückgang der Knorpeldicke im weichen Implantat auf 58%, im starren Implantat auf 70%.

Insgesamt scheint es aber problematisch, die Studien untereinander zu vergleichen, auch wenn bei der Auswertung aller Studien ein standardisierter Score (Original- oder modifizierter O´Driscoll) verwendet wurde. Fast ausnahmslos beschreiben die Autoren aller Arbeitsgruppen eine Inhomogenität des Regeneratgewebes, welches auch die Ergebnisse unserer Studie widerspiegelt. Es erfolgt jeweils die histologische Beurteilung eines repräsentativen Regenerates ohne eine Angabe über die genaue Lokalisation im Defekt zu machen. Stattdessen wird ein „repräsentatives“ Regenerat oder eine „ROI“ (region of interest) beurteilt [61, 160, 231, 233]. Bei der Betrachtung unserer Defekte fanden sich sowohl Bereiche mit fehlendem Regenerat über bindegewebige Narben bis hin zu faserknorpelähnliche und hyalinartige Formationen. Dies verdeutlicht, wie subjektiv eine Auswertung dadurch wird und wie wichtig vor allem eine einheitliche Lokalisation des zu beurteilenden Schnittes durch den Defekt wäre.

Die Arbeitsgruppe um Perka et al. untersuchte osteochondrale Defekte am Kaninchenmodell [67]. Den 6-monatigen Tieren wurde ein 4mm messender Defekt an der femoralen Patellagleitbahn gesetzt und als Implantat ein biodegradierbares Polymervlies aus PGLA/Polydioxanon, ähnlich zu den hier verwendeten Vliesen, eingebracht. Diese waren zuvor mit *in vitro* amplifizierten, autologen Chondrozyten mit einem Fibrin-Thrombin-Gemisch beimpft und vor der Implantation noch für zwei Wochen kultiviert worden. Als Vergleichsobjekte wurden eine Leerlochgruppen und eine Gruppe mit Polymervlies ohne Chondrozyten herangezogen. Entscheidend für die Wertigkeit dieser Ergebnisse war die Eröffnung des subchondralen Raumes, um den Einfluss einströmender, mesenchymaler Stammzellen auf die Defektheilung zu beurteilen. Ausgewertet wurden die histologischen Präparate anhand des Wakitani-Scores, bei dem insgesamt 15 Punkte erreicht werden können und im Gegensatz zur Punkteverteilung bei O´Driscoll ein Wertung von 0 Punkten gesundem, hyalinem Knorpel entspricht [222]. Die Wertung erfolgt anhand der Zellmorphologie, der Matrixfärbung, der Oberflächenregularität, der Knorpeldicke und der Integration

des Transplantats im Empfängerknorpel. Bei der experimentellen Gruppe konnte sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen ein signifikanter Unterschied (3,2/2,8 Punkte gegenüber 11,1/9,2 Punkten in der Kontrollgruppe ohne Chondrozyten und 12,9/10,6 Punkten in der Leerlochgruppe) festgestellt werden. Das Regenerat in den Kontrollgruppen bestand lediglich aus minderwertigem Faserknorpel, wofür die Autoren den nicht zielgerichteten Reparaturmechanismus eingeströmter Mesenchymzellen verantwortlich machten. In der experimentellen Gruppe dagegen konnte nach 12 Wochen eine 100%-ige Deckung des Defektes mit hyalinartigem Knorpel erreicht werden. Doch auch in dieser Arbeit lässt sich nicht nachvollziehen, welches Regeneratareal zur Beurteilung verwendet wurde.

Im Gegensatz zu Perka kam die Forschungsgruppe um Müller zu einer ganz anderen Schlussfolgerung [150]. Auch in dieser Studie wurden an Kaninchenmodellen Bioimplantate in osteochondrale Defekte implantatiert. Diese bestanden jedoch aus einer Knochen- (Poly-DL-Laktid) und einer Knorpelschicht (Polyglactin/Polydioxanon). Analog zu den Versuchen bei Perka wurden 4mm messende osteochondrale Defekte gesetzt, diesmal jedoch im Bereich der Hauptbelastungszone des medialen Femurkondylus. Neben einer Leerlochgruppe erhielt eine weitere Kontrollgruppe Implantate, in welchen Knorpel- und Knochenschicht durch resorbierbaren Knochenzement getrennt waren, um das Einwandern mesenchymaler Stammzellen in die Knorpelersatzschicht zu verhindern. Die Auswertung erfolgte anhand des Bewertungsschemas nach Pineda nach 8 und 12 Wochen [224]. Müller erhielt dabei signifikant bessere Ergebnisse in der Gruppe ohne Knochenzementtrennschicht. Folglich mussten für dieses Ergebnis unter anderem die Knochenmarkszellen verantwortlich gemacht werden, da die Defekte mit Trennschicht tendentiell sogar eine schlechtere Regeneratbildung als die Leerlöcher zeigten.

In der Zusammenschau beider Ergebnisse scheint das schlechte Abschneiden der Implantate ohne Chondrozytenbeimpfung bei Perka auf einem fehlenden mechanischen Stimulus zu beruhen, wie er in der kausalen Histiogenese von Pauwels gefordert wird [139]. Auch die Untersuchungen von Tägil und Aspenberg oder Davisson et al. über den Einfluss statischer,

dynamischer und zyklischer Kompression mit definiertem Druck auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knorpelzellen würden sich hierbei bestätigen [221, 142]. Perka implantierte seine Bioimplantate an mechanisch wenig belasteten Stellen im femoropatellaren Gleitlager, wohingegen Müller diese bewusst im Bereich der Hauptbelastungsareale einsetzte. Die bereits entdifferenzierten Chondrozyten benötigten aufgrund ihrer *in vitro* durchgeführten Amplifizierung und Kultivierung im Vlies keinen mechanischen Reiz zu einer weiteren Differenzierung.

Insgesamt bleibt allerdings ein Vergleich der Studienergebnisse von Perka, Müller und unseren aufgrund der unterschiedlichen Scores sowie des höheren Regenerationspotentials von Kaninchen gegenüber Schafen problematisch [232, 153].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch die autologe Chondrozytentransplantation zu einer zwar nicht signifikanten, aber dennoch tendenziell besseren Defektheilung gekommen ist. Verglichen mit den histologischen Ergebnissen der ACT-Präparate mit den Kollagen- und PGA-Vliesen muss davon ausgegangen werden, dass den *in vitro* gezüchteten Chondrozyten immer noch eine große Rolle zur Knorpelregeneration beigemessen werden muss. Dass die Mikrofrakturierung durch das Einströmen mesenchymaler Stammzellen in das Defekt-Implantat-Areal das Ergebnis entscheidend gelenkt hat, kann an dieser Stelle nicht bewiesen werden. Sicher ist jedoch, dass die Regeneratbildung durch die Kombination von Vliesen mit direkter Zellbeimpfung, sei es durch das Fibrin-Thrombin-Knochenmark-Gemisch intraoperativ oder durch eine Chondrozytenbeimpfung *in vitro*, positiv beeinflusst wurde. Tendenziell schneiden in unserer Versuchsreihe die Vliese aus Kollagen besser ab als jene aus PGA. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es in den Kollagenimplantaten zu einer besseren Zelladhärenz und im Fall der ACT-Vliese vom Kollagen-II-Typ zu einer weniger störenden Stammzellendifferenzierung und Matrixsynthese kommt, da sich im gesunden, hyalinen Knorpel ohnehin nur Kollagen vom Typ II nachweisen lässt.

## 5.5. Ausblick

Vergleicht man die in der Literatur vorhandenen Angaben über die derzeit verfügbaren Möglichkeiten, Knorpeldefekte zu regenerieren, so fällt auf, dass durch das Tissue Engineering bisher keine eindeutige Verbesserung gegenüber den Spontanverläufen osteochondraler Defekte erzielt werden konnte [170, 234, 235]. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Bioimplantaten (natürliche und synthetisierte Polymere, Keramik, Glas und Verbundstoffe) wird deutlich, dass eine optimale Kombination aus Trägermaterial, Defektlokalisation und möglicher Zugabe von Stammzellen, Wachstumsfaktoren oder bereits differenzierter Chondrozyten noch nicht gefunden wurde. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass keines der verwendeten Bioimplantate dem anderen überlegen ist. Zwar ist das Outcome der Gruppe, die mittels autologer Chondrozytentransplantation versorgt worden ist, minimal besser als das aller anderen Gruppen, insgesamt sind die Ergebnisse jedoch – verglichen mit der Leerlochgruppe – ernüchternd schlecht. Dies mag an einem möglichen Versagen der Implantatverankerung liegen, die aus den mit Bioimplantaten versorgten osteochondralen Defekte praktisch Leerlochgruppen entstehen ließen.

Die bereits seit Jahren etablierte autologe Chondrozytentransplantation hat einen wesentlichen Nachteil: für die Versorgung eines osteochondralen Defektes ist die Verwendung autologen Materials notwendig, zu deren Gewinnung derzeit immer noch ein Zweiteingriff und damit das Setzen eines weiteren chondralen Defektes in einem zwar wenig belasteten, aber dennoch gesundem Knorpelareal notwendig ist [66, 72]. Benötigt wird also eine Zellpopulation, die es ermöglicht, die metabolischen Forderungen, die an eine Knorpelregeneration gestellt werden, zu erfüllen und dies ohne dabei einen weiteren Schaden in einem ohnehin bereits geschwächten Gelenk anzurichten. Große Erwartungen werden dabei in die körpereigenen, mesenchymalen Stammzellen gesetzt, deren Fähigkeit, sich als Vorläuferzelle unter bestimmten Bedingungen in unterschiedlichste Zelltypen zu differenzieren, einen unschätzbaren Wert darstellt [98, 99]. Desweiteren muss ein Trägerstoff gefunden werden, der aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur eine große Oberfläche bietet, um eine gute Zelladhäsion und -verankerung zu ermöglichen, gleichzeitig aber die Diffusion

und damit die Versorgung mit Nährstoffen nicht behindert und weder Entzündungs- noch Degenerationsprozesse auslöst.

Wie sich in unseren Versuchen gezeigt hat, sollte möglicherweise der Implantatfixierung besonderes Augenmerk gewidmet werden. Da sich die Ergebnisse der Bioimplantate kaum von den Leerlochpräparaten unterscheiden wäre als Ursache denkbar, dass sich die implantierten Vliese bereits kurze Zeit nach der Implantation von dem Defekt gelöst haben und somit keine ausreichende Fixierung vorgelegen haben könnte. Die Bioimplantate sind enormen Kräften während den Bewegungsphasen am Kniegelenk ausgesetzt. Im Vergleich zu härteren bzw. starren Implantaten, die im pressfit-Verfahren eingebracht werden können, wurden die Vliese mit nur einem zentralen Dart verankert und lagen damit dem Defekt in vielen Bereichen nur lose auf [233]. Gleichzeitig darf aber der Reparatursprozess durch z.B. saure Abbauprodukte der Fixierungsvorrichtung nicht gestört werden.

Als Gerüststoffe für Biopimplantate werden derzeit einschichtige (z.B.  $\beta$ -TCP, Fibrin, PGA- und Kollagenvliese unserer Versuche) oder zweischichtige (z.B. Hyaluron/Calciumphosphat, PGA/PLGA, PGA/Kollagen) Materialien verwendet. Eine intraoperative Anreicherung der Implantate mit mesenchymalen Stammzellen wird zunehmend diskutiert [155, 150]. So scheint eine Erhöhung der Zellbeladung eine große Rolle bei der Knorpelregeneration zu spielen [67]. Die Verwendung semipermeabler Membranen soll dabei einerseits die Ernährung per Diffusion aus dem Gelenkspalt ermöglichen, gleichzeitig aber das Ausschwemmen eingewanderter Zellen aus dem Knochenmark verhindern. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF (fibroblast growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) oder IGF (insuline-like growth factor) konnte *in vitro* bereits eine erhöhte Rate an funktionsfähigen Chondrozyten nachgewiesen werden [121, 122, 123, 124, 115]. Besonderes Augenmerk sollte auf die erst in den letzten Jahren entdeckte Gruppe der CDMPs (cartilage-derived morphogenetic proteins) und BMPs (bone morphogenetic proteins) gerichtet werden [126]. CDMP-1, CDMP-2, BMP-7, und BMP-6 induzieren als Wachstumsfaktoren die Matrixsynthese in Fibroblasten und haben *in vitro* die Fähigkeit, die Differenzierung eines Fibroblasten aus dem Bandapparat in einen knorpeligen Phänotyp zu induzieren. Damit wäre es

möglich, Fibroblasten aus dem Bandapparat als Lieferant für die Chondrogenese zu gewinnen [236, 237]. Wünschenswert wäre natürlich eine intraoperative Anwendung dieser Faktoren, um die Proliferation, Differenzierung und Synthese der extrazellulären Matrix positiv zu beeinflussen.

## 6. Zusammenfassung

Aufgrund seiner biologischen Zusammensetzung besitzt der Gelenkknorpel kein ausreichendes Selbstheilungsvermögen, so dass sich isolierte Knorpelschäden nur eingeschränkt regenerieren können und fast unabwendbar in einer Arthrose des Gelenks münden. Abgesehen von den Einschränkungen des Einzelnen für dessen Lebensqualität bedeuten Erkrankungen des skelettalen Systems auch enorme volkswirtschaftliche Einbußen. So ist es kaum verwunderlich, dass der Arthrose und ihrer Behandlung in der heutigen Zeit viel Aufmerksamkeit gewidmet wird. Mit zahlreichen Verfahren wurde in den letzten Jahrzehnten begonnen, dem Fortschreiten einer einmal begonnenen Arthrose entgegenzuwirken oder besser noch, diese möglichst zur Regeneration und Reparatur der Knorpelläsion anzuregen. Mit Hilfe der Mikrofakturierung, der Pridie-Bohrung oder einer Chondrozytentransplantation wurde versucht, eine Heilung des Defektes zu erreichen. All diese Methoden haben jedoch eines gemeinsam: in den meisten Läsionen entwickelt sich im günstigsten Fall ein Regenerat aus Faserknorpel, das aber den Belastungen, die an das Gelenk im Laufe eines Lebens gestellt werden, nicht standhalten kann und daher ebenfalls beginnt, zu degenerieren.

Nachdem in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Therapieansätzen zur Knorpelregeneration *in vivo* und *in vitro* teils beachtliche positive Ergebnisse durch Scaffolds nachgewiesen werden konnten, sollte nach der Wahl geeigneter Bioimplantate anhand einer tierexperimentellen Studie am Merino-Schaf gezeigt werden, dass es möglich ist, einen chondralen Defekt zu regenerieren. Hierfür wurde zum einen die von Pauwels formulierte Theorie der „Kausalen Histiogenese“ und zum anderen die Pluripotenz der von Caplan beschriebenen „mesenchymalen Stammzelle“ zugrunde gelegt.

Zum Vergleich wurden jeweils ein Präparat aus dem Kreis der natürlichen und der synthetischen Polymere verwendet und diese in den lasttragenden Bereich des medialen Femurkondylus nach dem Setzen eines vorderen und hinteren chondralen Defektes implantiert. Dabei wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen angewandt. Bei jeweils drei Schafen einer Gruppe (PGA- und Kollagenvlies) wurde zusätzlich zu den Bioimplantaten die subchondrale Platte

im Sinne einer Mikrofrakturierung an vier Stellen durchbrochen, um so den Knochenmarkszellen ein Einströmen in das Defektareal zu ermöglichen. Bei weiteren drei Schafen jeder Gruppe (PGA- und Kollagenvlies) wurden die Bioimplantate dagegen vor der Implantation mit Knochenmarkszellen aus der Tibia zusammen mit einem Fibrin-Thrombin-Gemisch beimpft. Weitere drei Schafe erhielten eigens hergestellte ACT-Implantate, die bereits bei umschriebenen Knorpelschäden beim Menschen verwendet werden. Die zur Herstellung dieser Präparate notwendigen Chondrozytenpopulationen wurden den Tieren in einem gesonderten operativen Eingriff aus dem kontralateralen Kniegelenk drei Wochen zuvor entnommen. Insgesamt zwölf Wochen nach der Implantation der Bioimplantate erfolgte die makroskopische, histologische und immunhistochemische Auswertung der entstandenen Defektregenerate. Zur Beurteilung der histologischen Präparate wurde der von O'Driscoll 1988 aufgestellte Score herangezogen und durch zusätzliche histologische Färbungen zum Nachweis von Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan und zudem mit der Anwesenheit von Blutgefäßen im Regenerat und der Metachromasie bei Toluidinblau erweitert.

Eine Gegenüberstellung der verwendeten Bioimplantate untereinander zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der makroskopischen Defektdeckung, wohl aber konnte ein Vergleich aller PGA- und Kollagen-Vliese gegenüber den verwendeten ACT-Implantaten einen signifikanten Unterschied mit  $p=0,035$  beweisen. Die Auswertung des modifizierten O'Driscoll-Scores führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Ein Punktvergleich aller Präparatgruppen gegeneinander ergab mit einem p-Wert von 0,212 keinen statistisch signifikanten Unterschied der histologischen Güte des entstandenen Regeneratgewebes. Einzig der erneute Vergleich aller PGA- und Kollagen-Implantate gegenüber den mit autologen Chondrozyten beimpften Präparaten konnte einen Signifikanzunterschied zugunsten der ACT-Vliese mit  $p=0,041$  belegen. Wurden die ACT-Implantate vernachlässigt und nur die restlichen Bioimplantate beurteilt, so konnte zwar keine signifikante Verbesserung durch die Anwendung eines der beiden Vliese festgestellt werden, aber es zeigte sich dennoch eine Tendenz zu einem besseren histologischen sowie makroskopischen Ergebnis bei

Verwendung der Kollagenimplantate, unabhängig von den zusätzlichen Maßnahmen wie Mikrofrakturierung oder Fibrin-Thrombin-Gemisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei den hier vorgestellten Bioimplantaten nicht zu einer erwarteten signifikanten Verbesserung der Knorpelregeneration an chondralen Defekten kam. Es wurden zwei Implantatvarianten mit zusätzlichen Maßnahmen mit der klinisch bereits erprobten autologen Chondrozytentransplantation verglichen. Histologisch konnten die Regenerate, die mit den ACT-Vliesen versorgt worden waren, mit dem höchsten Punktwert des O'Driscoll-Scores von 7,17 Punkten aufwarten. Das zweitbeste Ergebnis erzielten die Kollagen-Implantate in Zusammenhang mit dem Fibrin-Thrombin-Gemisch mit einem durchschnittlichen Score von 5,0. Bei einer maximal erreichbaren Punktezahl von 38 können diese Werte jedoch nicht überzeugen. Vielmehr scheint die Fixierung der Bioimplantate ein zentrales Problem unserer Experimente gewesen zu sein. Werden die erreichten Punktzahlen der Bioimplantate mit den erzielten Werten der Leerlochgruppe verglichen, so lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied mit  $p=0,374$  nachweisen. Das würde bedeuten, dass die Implantate bereits in einer sehr frühen Phase aus dem Defektareal gerissen wurden und somit eigentlich eine Leerlochgruppe darstellten.

Möglicherweise könnten eine Modifizierung der Implantatfixierung, die Verwendung von Kollagen-II-Vliesen (da Kollagen Typ II mit einem Anteil von etwa 90% das Grundgerüst des hyalinen Knorpels bildet) und ein Fibrin-Knochenmark-Mix in weiteren tierexperimentellen Untersuchungen zu einem größeren Erfolg führen.

## Literaturverzeichnis

- [1] S. B. Wiesbaden, 2012. [Online]. Available: <http://www.destatis.de>.
- [2] S. Bundesamt, „Gesundheitsausgaben in Deutschland nach Ausgabenträgern, Leistungsarten und Einrichtungen,“ Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2010.
- [3] C. A. Poole, „Articular cartilage chondrons: form, function and failure,“ *J. Anat.*, Nr. 191: pp 1-13, 1997.
- [4] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi und S. Lavery, „Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair,“ *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 391 S: pp 26-33, 2001.
- [5] B. L. Schumacher, C. E. Hughes, K. E. Kuettner, B. Caterson und M. B. Aydelotte, „Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints,“ *J Orthop Res*, Nr. 17: pp 110-120, 1999.
- [6] W. Wilson, „A composition-based cartilage model for the assessment of compositional changes during cartilage damage and adaptation,“ *OsteoArthritis and Cartilage*, Nr. 14; pp: 554-560, 2006.
- [7] J. A. Buckwalter und H. J. Mankin, „Articular cartilage. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions,“ *Instr Course Lect*, Nr. 47: pp 477-486, 1998.
- [8] M. E. Blewis, G. E. Nugent-Defus, T. A. Schmidt, B. L. Schumacher und R. L. Sah, „A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints,“ *Eur Cell Mater*, Nr. 13: pp 26-39, 2007.
- [9] R. A. Stockwell und G. Meachin, „The Chondrocytes,“ in *Adult Articular Cartilage. 2nd Edition*, Philadelphia, Pitman Medical, 1979.
- [10] J. E. Scott, „Elasticity in extracellular matrix "shape modues" of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model,“ *J Physiol*, Nr. 553(Pt 2): 335-343, 2003.
- [11] D. J. Prockop und K. I. Kivirikko, „Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy,“ *Annu Rev Biochem*, Nr. 64: pp 403-434, 1995.
- [12] Y. Lu, K. H. Parker und W. Wang, „Effects of osmotic pressure in the extracellular matrix on tissue deformation,“ *Phil. Trans. R. Soc. A*, Nr. 364: pp 1407-1422, 2006.
- [13] D. W. Jackson, P. A. Lalor, H. M. Aberman und T. M. Simon, „Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study,“ *J Bone Joint Surg Am.*, Nr. 83-A(10): pp 1591-1592, 2001.
- [14] A. E. Beris, M. G. Lykissas, C. D. Papageorgiou und A. D. Georgoulis, „Advances in articular cartilage repair,“ *Injury*, Nr. 36 Suppl 4: pp 14-23, 2005.
- [15] A. P. Newman, „Articular cartilage repair. Current concepts,“ *Am J Sports Med*, Nr. 26: pp 309-324, 1998.
- [16] H. J. Mankin, V. C. Mow, J. A. Buckwalter, J. Iannotti und A. Ratcliffe, „Form and function of articular cartilage,“ *AAOS Orthopaedic Basic Science*, Nr. pp 3-41, 1994.
- [17] J. C. Y. Chow, M. E. Hantes, J. B. Houle und C. G. Zalavras, „Arthroscopic Autogenous Osteochondral Transplantation for Treating Knee Cartilage Defects: A 2- to 5-Year Follow-up Study,“ *Arthroscopy*, Nr. 20 (7): pp 681-90, 2004.
- [18] A. O. Oshin und M. C. Stewart, „The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair,“ *Vet Comp Orthop Traumatol*, Nr. 20 (3): pp 151-158, 2007.
- [19] C. H. Lohmann, Z. Schwartz, G. G. Niederauer und B. D. Boyan, „Der

- Differenzierungsgrad von Chondrozyten und ihre Vorbehandlung mit "platelet-derived-growth-factor", *Orthopäde*, Nr. 29 (2): pp 120-128, 2000.
- [20] V. Jansson, P. E. Müller, S. Thal, C. Arnholz, S. Milz, K. U. Koch und H. J. Refior, „Ein neues resorbierbares Knorpel-Knochen-Ersatztransplantat: Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie“, *Orthopäde*, Nr. 29: pp 151-157, 2000.
- [21] W. Swieszkowski, B. H. Tuan, K. J. Kurzydowski und D. W. Hutmacher, „Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints“, *Biomol Eng*, Nr. Aug; Epub, 2007.
- [22] W. Richter, „Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis“, *Curr Opin Rheumatol*, Nr. 19: pp 451-456, 2007.
- [23] T. Furukawa, D. R. Eyre, S. Koide und M. J. Glimcher, „Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee“, *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 62: pp 79-89, 1980.
- [24] W. Hunter, „On the structure and diseases of articulating cartilage“, *Philos Trans R Soc Lond*, Nr. 42b: pp 514-521, 1743.
- [25] P. Bert, „Sur la greffe animal“, *C R Acad Sci*, Nr. 61: p 587, 1865.
- [26] R. Theiler, H. A. Bischoff, M. Good und D. Uebelhart, „Rofecoxib improves quality of life in patients with hip or knee osteoarthritis“, *Swiss Med Wkly*, Nr. 132(39-40): pp 566-573, 2002.
- [27] G. P. Geba, A. L. Weaver, A. B. Polis, M. E. Dixon und T. J. Schnitzer, „Efficacy of rofecoxib, celecoxib, and acetaminophen in osteoarthritis of the knee: a randomized trial“, *JAMA*, Nr. 287(1): pp 64-71, 2002.
- [28] A. Gibofsky, G. W. Williams, F. McKenna und G. Fort, „Comparing the efficacy of cyclooxygenase 2-specific inhibitors in treating osteoarthritis: appropriate trial design considerations and results of a randomized, placebo-controlled trial“, *Arthritis Rheum*, Nr. 48(11): pp 3102-3111, 2003.
- [29] E. Tukmachi, R. Jubb, E. Dempsey und P. Jones, „The effect of acupuncture on the symptoms of knee osteoarthritis - an open randomised controlled study“, *Acupunct Med.*, Nr. 22(1): pp 14-22, 2004.
- [30] D. K. Weiner, T. E. Rudy, N. Morone, R. Glick und C. K. Kwok, „Efficacy of periosteal stimulation therapy for the treatment of osteoarthritis-associated chronic knee pain: an initial controlled clinical trial“, *J Am Geriatr Soc*, Nr. 55(10): pp 1541-1547, 2007.
- [31] G. F. Dervin, I. G. Stiell, K. Rody und J. Grabowski, „Effect of arthroscopic débridement for osteoarthritis of the knee on health-related quality of life“, *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 85-A(1): pp 10-19, 2003.
- [32] R. K. Aaron, A. H. Skolnick, S. E. Reinert und D. M. Ciombor, „Arthroscopic débridement for osteoarthritis of the knee“, *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 88(5): pp 936-943, 2006.
- [33] J. R. Steadman, A. J. Ramappa, R. B. Maxwell und K. K. Briggs, „An Arthroscopic Treatment Regimen for Osteoarthritis of the Knee“, *Arthroscopy*, Nr. 23(9): pp 948-955, 2007.
- [34] J. M. Bert und K. Maschka, „The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic débridement and arthroscopic débridement alone“, *Arthroscopy*, Nr. 5: pp 25-32, 1989.
- [35] A. H. Pridie, „The method of resurfacing osteoarthritic joints“, *J Bone Joint Surg*, Nr. 41B: pp 618-623, 1959.
- [36] B. Müller und D. Kohn, „Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method“, *Orthopäde*, Nr. 28(1): pp 4-10, 1999.

- [37] J. Jerosch, I. Hoffstetter und R. Reer, „Current treatment modalities of osteochondritis dissecans of the knee joint: Results of a nation-wide german survey,“ *Acta Orthop Belg*, Nr. 62: pp 83-89, 1996.
- [38] D. S. Menche, S. R. Frenkel, B. Blair, N. F. Watnik, B. C. Toolan, R. S. Yaghoubian und M. I. Pitman, „A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit,“ *Arthroscopy*, Nr. 12(3): pp 280-286., 1996.
- [39] J. R. Steadman, W. G. Rodkey und S. B. Singleton, „Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results,“ *Oper Tech Orthop*, Nr. 7: pp 300–304, 1997.
- [40] J. R. Steadman, W. G. Rodkey, K. K. Briggs und J. J. Rodrigo, „The microfracture technique to treat full thickness articular cartilage defects of the knee,“ *Orthopäde*, Nr. 28: pp 26-32, 1999.
- [41] J. R. Steadman, B. S. Miller, S. G. Karas, T. F. Schlegel, K. K. Briggs und R. J. Hawkins, „The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players,“ *J Knee Surg*, Nr. 16(2): pp 83-86, 2003.
- [42] J. R. Steadman, K. K. Briggs, J. J. Rodrigo, M. S. Kocher, T. J. Gill und W. G. Rodkey, „Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up,“ *Arthroscopy*, Nr. 19(5): pp 477-484, 2003.
- [43] H. Wagner, „Surgical treatment of osteochondritis dissecans, a cause of arthritis deformans of the knee,“ *Rev Chir Or thop Re pa ra tri ce Ap par Mot*, Nr. 50: pp 335–352, 1964.
- [44] Y. Matsusue, T. Yamamuro und H. Hama, „Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with antecruciate ligament disruption,“ *Arthroscopy*, Nr. 9(3): pp 318–321, 1993.
- [45] L. Hangody, G. Kish, Z. Kárpáti, I. Szerb und I. Udvarhelyi, „Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report,“ *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, Nr. 5(4): pp 262–267, 1997.
- [46] R. B. Garretson, L. I. Katolik, N. Verma, P. R. Beck, B. R. Bach und B. J. Cole, „Contact pressure at osteochondral donor sites in the patellofemoral joint,“ *Am J Sports Med*, Nr. 32(4): pp 967-974, 2004.
- [47] L. Bartha, A. Vajda, Z. Duska, H. Rahmeh und L. Hangody, „Autologous osteochondral mosaicplasty grafting,“ *J Orthop Sports Phys Ther*, Nr. 36(10): pp 739-750., 2006.
- [48] M. Rittmeister, K. Hochmuth, S. Kriener und J. Richolt, „Five-year results following autogenous osteochondral transplantation to the femoral head,“ *Orthopäde*, Nr. 34(4): pp 320-326, 2005.
- [49] R. Gudas, R. J. Kalesinskas, V. Kimtys, E. Stankevicius, V. Toliusis, G. Bernotavicius und A. Smailys, „A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes,“ *Arthroscopy*, Nr. 21(9): pp 1066-1075, 2005.
- [50] L. Hangody, G. Kish, L. Módis, I. Szerb, L. Gáspár, Z. Diószegi und Z. Kendik, „Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients,“ *Foot Ankle Int*, Nr. 22(7): pp 552-558, 2001.
- [51] G. C. Fanelli und D. J. Tomaszewski, „Allograft use in the treatment of the multiple ligament injured knee,“ *Sports Med Arthrosc*, Nr. 15(3): pp 139-148, 2007.
- [52] A. E. Gross, E. A. Silverstein, J. Falk, R. Falk und F. Langer, „The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee,“ *Clin*

*Orthop*, Nr. 108: pp 273-290, 1975.

- [53] R. J. Williams, J. C. Dreese und C.-T. Chen, „Chondrocyte Survival and Material Properties of Hypothermically Stored Cartilage - An Evaluation of Tissue Used for Osteochondral Allograft Transplantation,“ *American Journal of Sports Medicine*, Nr. 32(1): pp 132-139, 2004.
- [54] N. Shasha, S. Krywulak, D. Backstein, A. Pressman und A. E. Gross, „Long-term follow-up of fresh tibial osteochondral allografts for failed tibial plateau fractures,“ *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 85A (Suppl. 2): pp 33-39, 2003.
- [55] C. R. Fraitzl, R. J. Egli, C. Wingenfeld, R. Ganz, W. Hofstetter und M. Leunig, „Time course of biological activity in fresh murine osteochondral allografts paralleled to the recipient's immune response,“ *J Invest Surg.*, Nr. 21(3): pp 109-117, 2008.
- [56] A. E. Gross, N. Shasha und P. Aubin, „Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects,“ *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 435: pp 79-87, 2005.
- [57] S. K. Williams, D. Amiel, S. T. Ball, R. T. Allen, W. L. Tontz jr., B. C. Emerson, N. M. Badlani, S. C. Emery, P. Haghighi und W. D. Bugbee, „Analysis of Cartilage Tissue on a Cellular Level in Fresh Osteochondral Allograft Retrievals,“ *Am J Sports Med*, Bd. Epub ahead of print, Nr. 27, 2007.
- [58] D. A. Grande, I. J. Singh und J. Pugh, „Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation,“ *Anat Rec* 218: 142–148, Nr. 218: pp 142–148, 1987.
- [59] D. A. Grande, M. I. Pitman, L. Peterson, D. Menche und M. Klein, „The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation,“ *J Orthop Res*, Nr. 7: pp 208–218, 1987.
- [60] 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*, Nr. 331(14): pp 889-895, 1994.
- [61] M. Brittberg, A. Nilsson, A. Lindahl, C. Ohlsson und L. Peterson, „Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes,“ *Clin Orthop*, Nr. 326: pp 270–283, 1996.
- [62] H. A. Breinan, T. Minas, H. P. Hsu, S. Nehrer, C. B. Sledge und M. Spector, „Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model,“ *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 79(10): pp 1439-1451, 1997.
- [63] M. Marcacci, E. Kon, S. Jaffagnini, G. Filardo, M. Delcogliano, M. P. Neri, F. Iacono und A. P. Hollander, „Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation,“ *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, Nr. 15: pp 610-619, 2007.
- [64] T. Minas und R. Chiu, „Autologous chondrocyte implantation,“ *Am J Knee Surg*, Nr. 13(1): pp 41-50, 2000.
- [65] M. H. Baums, G. Heidrich, W. Schultz, H. Steckel, E. Kahl und H. M. Klinger, „Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus,“ *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 88: pp 303-308, 2006.
- [66] M. Aurich, J. Anders, E. Liesaus, A. Wagner und R. Venbrocks, „Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) in "Sandwich"-Technik,“ *Unfallchirurg*, Nr. 110: pp 176-179, 2007.
- [67] C. Perka, O. Schultz, M. Sittlinger und H. Zippel, „Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen,“ *Orthopäde*, Nr. 29: pp 112-119, 2000.
- [68] S. Zelle, T. Zantop, S. Schanz und W. Petersen, „Arthroscopic Techniques for the Fixation of a Three-Dimensional Scaffold for Autologous Chondrocyte Transplantation: Structural Properties in an In Vitro Model,“ *Arthroscopy*, Nr. 23(10): pp 1073-1078, 2007.

- [69] P. Behrens, E. Ehlers, K. Köchermann, J. Rohwedel, M. Russlies und W. Plötz, „New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation,“ *MMW Fortschr Med.*, Nr. 141(45): pp 49-51, 1999.
- [70] M. Brittberg, „Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure,“ *Am J Sports Med.*, Nr. 38(6): pp 1259-1271, 2010.
- [71] N. B. Kock, E. v. Tankeren, W. J. Oyen, A. B. Wymenga und J. L. v. Susante, „Bone scintigraphy after osteochondral autograft transplantation in the knee: 13 patients followed for 4 years.,“ *Acta Orthop*, Nr. 81(2): pp 206-210, 2010.
- [72] L. Peterson, T. Minas, M. Brittberg, A. Nilsson, E. Janssen und A. Lindahl, „Two to Nine Year Outcomes After Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee,“ *Clin Orthop*, Nr. 374: pp 212-234, 2000.
- [73] K. Mithöfer, L. Peterson, B. R. Mandelbaum und T. Minas, „Articular cartilage repair in soccer players with autologous chondrocyte transplantation: functional outcome and return to competition,“ *Am J Sports Med*, Nr. 33(11): pp 1639-1646, 2005.
- [74] T. Minas und T. Bryant, „The Role of Autologous Chondrocytes Implantation in the Patellofemoral Joint,“ *Clinical Orthopaedics and related Research*, Nr. 436: pp 30-39, 2005.
- [75] J. E. Browne, A. F. Anderson, R. Arciero, B. Mandelbaum, J. B. Moseley jr., L. J. Micheli, F. Fu und C. Erggelet, „Clinical Outcome of Autologous Chondrocyte Implantation at 5 Years in US Subjects,“ *Clinical Orthopaedics and related Research*, Nr. 436: pp 237-245, 2005.
- [76] J. Gille, E. Schuseil, J. Wimmer, J. Gellissen, A. Schulz und P. Behrens, „Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee,“ *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, Nr. 18(11): pp 1456-1464, 2010.
- [77] T. Kusano, R. P. Jakob, E. Gautier, R. A. Magnussen, H. Hoogewoud und M. Jacobi, „Treatment of isolated chondral and osteochondral defects in the knee by autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC),“ *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, Nr. Epub ahead of print, 2011.
- [78] N. Siegmund-Schultze, „Endoprothesenimplantation: Herzinfarktrate nach Gelenkersatz bei bestimmten Subgruppen erhöht,“ *Dtsch Arztebl*, Nr. 109(50): A-2525 / B-2067 / C-2023, 2012.
- [79] J. D. Agneskirchner und P. Lobenhoffer, „Endoprothetik des Kniegelenks,“ *Unfallchirurg*, Nr. 107: pp 219-231.
- [80] S. Hofmann, J. Romero, E. Roth-Schiffel und T. Albrecht, „Rotationsfehlstellungen der Komponenten als Ursache chronischer Schmerzen und vorzeitigem Prothesenversagen bei Knieendoprothesen,“ *Orthopäde*, Nr. 32: pp 469-476, 2003.
- [81] R. Bader, W. Mittelmeier und E. Steinhauser, „Versagensanalyse von Knieendoprothesen. Grundlagen und methodische Ansätze zur Schadensanalyse,“ *Orthopäde*, Nr. 35: pp 896-903, 2006.
- [82] H. Malchau, P. Herberts, P. Söderman und A. Odén, „Prognosis of total hip replacement,“ *67th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Nr. Orlando, 2000.
- [83] T. v. Stein, H. Gollwitzer, C. Kruis und V. Bühren, „Arthrodesen nach Knieendoprothetik am Beispiel der septischen Lockerung,“ *Orthopäde*, Nr. 35: pp 946-955, 2006.
- [84] R. Langer und J. P. Vacanti, „Tissue engineering,“ *Science*, Nr. 260: pp 920-926, 1993.

- [85] C. T. Laurencin, A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden und J. A. Cooper, „Tissue engineering: orthopedic applications,“ *Annu Rev Biomed Eng*, Nr. 1: pp 19-46, 1999.
- [86] M. Brittberg, „Autologous chondrocyte transplantation,“ *Clin Orthop*, Nr. 367: pp 147-155, 1999.
- [87] J. Lee, E. Lee, H. Y. Kim und Y. Son, „Comparison of articular cartilage with costal cartilage in initial cell yield, degree of dedifferentiation during expansion and redifferentiation capacity,“ *Biotechnol Appl Biochem*, Nr. 48(Pt 3): pp 149-158, 2007.
- [88] D. A. Grande, A. S. Breitbart, J. Mson, C. Paulino, J. Laser und R. Schwartz, „Cartilage Tissue Engineering: Current Limitations and Solutions,“ *Clin Orthop Rel Res*, Nr. 376S: pp 176-185, 1999.
- [89] J. S. Douchis, R. D. Coutts und D. Amiel, „Cartilage repair with autogenic perichondrium cell/polylactic acid grafts: a two-year study in rabbits,“ *J Orthop Res*, Nr. 18(3): pp 512-515, 2000.
- [90] R. A. Kandel, J. Boyle, G. Gibson, T. Cruz und M. Speagle, „In vitro formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes,“ *In Vitro Cel Dev Biol Anim*, Nr. 33: pp 174-181, 1997.
- [91] Y. A. Lee, S. S. Kang, S. H. Baek, J. C. Jung, E. J. Jin, E. N. Tak und J. K. Sonn, „Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes on chitosan membranes and involvement of PKC $\alpha$  and P38 MAP kinase,“ *Mol Cells*, Nr. 24(1): pp 9-15, 2007.
- [92] Y. G. Suzdal'tseva, V. V. Urunova, I. V. Vakhrushev, V. N. Yarygin und K. N. Yarygin, „Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin,“ *Bull Exp Biol Med*, Nr. 143(1): pp 114-121, 2007.
- [93] A. T. Mehlhorn, P. Niemeyer, K. Kaschte, L. Muller, G. Fineknzeller, D. Hartl, N. P. Sudkamp und H. Schmal, „Differential effects of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 on chondrogenic differentiation of adipose deried stem cells,“ *Cell Prolif*, Nr. 40(6): pp 809-823, 2007.
- [94] C. Chung und J. A. Burdick, „Engineering cartilage tissue,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, Nr. e-pub ahead of print, 2007.
- [95] C. K. Kuo, W.-J. Li, R. L. Mauck und R. S. Tuan, „Cartilage Tissue Engineering: its potential and uses,“ *Curr Opin Rheumatol*, Nr. 18(1): pp 64-73, 2006.
- [96] C. Miyamoto, T. Matsumoto, K. Sakimura und H. Shindo, „Osteogenic protein-1 with transforming growth factor- $\beta$ 1: potent inducer of chondrogenesis of synovial mesenchymal stem cells in vitro,“ *J Orthop Sci*, Nr. 12: pp 555-561, 2007.
- [97] A. I. Caplan, „Mesenchymal stem cells,“ *J Orthop Res*, Nr. 9: pp 641-650, 1991.
- [98] A. I. Caplan, „The mesengenic process,“ *Clin Plast Surg*, Nr. 21: pp 429-435, 1994.
- [99] B. A. Ashton, T. D. Allen, C. R. Howlett, C. C. Eaglesom, A. Hattori und M. Owen, „Formatin of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo,“ *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 151: pp 294-307, 1980.
- [100] X. Yang, R. S. Tare, K. A. Partridge, H. I. Roach, N. M. Clarke, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff und R. O. Oreffo, „Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering,“ *J Bone Miner Res*, Nr. 18(1): pp 47-57, 2003.
- [101] C. Y. Wong, S. K. Cheong, P. L. Mok und C. F. Leong, „Differentiation of human mesenchymal stem cells into mesangial cells in post-glomerular injury murine model,“ *Pathology*, Nr. 40(1): pp 52-57, 2008.

- [102] K. Fukuda und J. Fujita, „Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice,“ *Kidney Int*, Nr. 68: pp 1940-1943, 2005.
- [103] S. Gojo und A. Umezawa, „Plasticity of mesenchymal stem cells - regenerative medicine for diseased hearts,“ *Hum Cell*, Nr. 16: pp 23-30, 2003.
- [104] D. E. Atsma, W. E. Fibbe und T. J. Rabelink, „Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair,“ *Curr Opin Lipidol*, Nr. 18(6): 645-649, 2007.
- [105] S. G. Ball, C. A. Shuttleworth und C. M. Kielty, „Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors,“ *J Cell Mol Med*, Nr. 11(5): pp 1012-1030, 2007.
- [106] S. J. Greco, C. Zhou, J. H. Ye und P. Rameshwar, „An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells,“ *Stem Cells Dev*, Nr. 16(5): pp 811-826, 2007.
- [107] L. R. Zhao, W. M. Duan, M. Reyes, C. D. Keene, C. M. Verfaillie und W. C. Low, „Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats,“ *Exp Neurol*, Nr. 174: pp 11-20, 2002.
- [108] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg und J. U. Yoo, „In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells,“ *Exp Cell Res*, Nr. 238: pp 265-272, 1998.
- [109] F. Dell'Accio, J. Vanlauwe, J. Bellemans, J. Neys, C. D. Bari und F. P. Luyten, „Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation,“ *J Orthop Res*, Nr. 21: pp 123-131, 2003.
- [110] S. Waktiani, T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan und V. M. Goldberg, „Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage,“ *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 76(4): pp 579-592, 1994.
- [111] S. Grad, K. Gorna, S. Gogolewski, A. M. Wimmer und M. Alini, „Effects of Cyclic Compression and Surface Motion on Gene Expression of Chondrocytes seeded on 3D Scaffolds,“ *European Cells and Materials*, Nr. 4(1): p 26, 2002.
- [112] U. R. Goessler, P. Bugert, K. Bieback, H. Sadick, A. Baisch, K. Hormann und F. Riedel, „In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins and growth factors in cultured human chondrocytes,“ *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, Nr. 134: pp 510-515, 2006.
- [113] E. M. Darling und K. A. Athanasiou, „Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations,“ *J Orthop Res*, Nr. 23: pp 425-432, 2005.
- [114] A. Barbero, S. P. Grogan, P. Mainil-Varlet und I. Martin, „Expansion on specific substrates regulates the phenotype and differentiation capacity of human articular chondrocytes,“ *J Cell Biochem*, Nr. 98: pp 1140-1149, 2006.
- [115] I. Martin, G. Vunjak-Novakovic, J. Yang, R. Langer und L. E. Freed, „Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue,“ *Exp Cell Res*, Nr. 253: pp 681-688, 1999.
- [116] H. Schmal, J. Zwingmann, M. Fehrenbach, G. Finkenzeller, G. B. Stark, N. P. Südkamp, D. Hartl und A. T. Mehlhorn, „bFGF influences human articular chondrocyte differentiation,“ *Cytotherapy*, Nr. 9(2): pp 184-193, 2007.
- [117] M. D. Buschmann, Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky, J. H. Kimura und E. B. Hunziker, „Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix,“ *J Orthop Res*, Nr. 10: pp 745-758, 1992.

- [118] Z. Lin, C. Willers, J. A. Xu und M. H. Zheng, „The chondrocyte: biology and clinical application,“ *Tissue Engineering*, Nr. 12: pp 1971-1984, 2006.
- [119] L. E. Freed, A. P. Hollander, I. Martin, J. R. Barry, R. Langer und G. Vunjak-Novakovic, „Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system,“ *Exp Cell Res*, Nr. 240: pp 58-65, 1998.
- [120] B. Kurz, C. Domm, M. S. Jin, R. Sellckau und M. Schunke, „Tissue engineering of articular cartilage under the influence of collagen I/III membranes and low oxygen tension,“ *Tissue Engineering*, Nr. 10: pp 1277-1286, 2004.
- [121] A. Spagnoli, L. O’Rear, R. L. Chandler, F. Granero-Molto, D. P. Mortlock, A. E. Gorska, J. A. Weis, L. Longobardi, A. Chytil, K. Shimer und H. L. Moses, „TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis,“ *J Cell Biol*, Nr. 177(6): pp 1105-1117, 2007.
- [122] S. J. Choi, K. Na, S. Kim, D. G. Woo, B. K. Sun, H. M. Chung und K. H. Park, „Combination of ascorbate and growth factor (TGF beta-3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes for neocartilage formation,“ *J Biomed Mater Res A*, Nr. 83(4): pp 897-905, 2007.
- [123] T. Kurth, E. Hedbom, N. Shintani, M. Sugimoto, F. H. Chen, M. Haspl, S. Martinovic und E. B. Hunziker, „Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate,“ *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. 15(10): 1178-1189, 2007.
- [124] M. Shakibaei, C. Seifarth, T. John, M. Rahmzadeh und A. Mobasheri, „Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and Erk1/2,“ *Biochem Pharmacol*, Nr. 72(11): 1382-1395, 2006.
- [125] X. Bai, Z. Xiao, Y. Pan, J. Hu, J. Pohl, J. Wen und L. Li, „Cartilage-derived morphogenic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes,“ *Biochem Biophys Res Commun*, Nr. 325(2): pp 453-460, 2004.
- [126] J. Li, K. S. Kim, J. S. Park, W. A. Elmer, W. C. Hutton und S. T. Yoon, „BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan,“ *J Orthop Sci*, Nr. 8(6): pp 829-835, 2003.
- [127] L. d. Franceschi, B. Grigolo, L. Roseti, A. Facchini, M. Fini, G. Giavaresi, M. Tschon und R. Giardino, „Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits,“ *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Nr. 75A: pp 612-622, 2005.
- [128] J. F. Mano und R. L. Reis, „Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches,“ *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Nr. 1: pp 261-273, 2007.
- [129] M. R. Lutolf, F. E. Weber, H. G. Schmoekel, J. C. Schense, T. Kohler, R. Müller und J. A. Hubbell, „Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices,“ *Nat Biotechnol*, Nr. 21(5): pp 513-519, 2003.
- [130] S. J. Bryant und D. S. Anseth, „Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels,“ *Journal of Biomedical Materials Research*, Nr. 59: pp 63-72, 2002.
- [131] R. Tuli, W.-J. Li und R. S. Tuan, „Current state of cartilage tissue engineering,“ *Arthritis Res Ther*, Nr. 5: pp 235-238, 2003.
- [132] O. Böstman, S. Vainionpää, E. Hirvensalo, A. Mäkelä, K. Vihtonen und P. Rokkanen, „Biodegradable internal fixation for malleolar fractures,“ *JBone Joint Surg*, Nr. 69: pp. 615–619, 1987.
- [133] O. Böstman, J. Viljanen, S. Salminen und H. Pihlajamäki, „Response of articular cartilage and subchondral bone to internal fixation devices made of poly-L-lactide: a histomorphometric and microradiographic study on rabbits,“ *Biomaterials*, Nr. 21(24): pp. 2553-2560, 2000.

- [134] E. J. Rozema, F. R. Bergsma, R. R. M. Bos und W. C. d. Bruijn, „Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures,“ *J Oral Maxillofac Surg*, Nr. 51: pp. 666-670, 1993.
- [135] R. Hoffmann, A. Weiler, H. J. Helling, C. Krettek und K. E. Rehm, „Lokale Fremdkörperreaktionen auf biodegradierbare Implantate. Eine Klassifikation,“ *Unfallchir*, Nr. 100: pp 658-666, 1997.
- [136] J. A. Dyson, P. G. Genever, K. W. Dalgarno und D. J. Wood, „Development of Custom-Built Bone Scaffolds Using Mesenchymal Stem Cells and Apatite-Wollastonite Glass-Ceramics,“ *Tissue Eng*, Nr. Epub ahead of print, 2007.
- [137] G. Andral, Précis d'anatomie pathologique, 1827.
- [138] J. Wolff, „Über die Bedeutung der Architektur der spongiösen Substanz,“ *Centralblatt der Medizinischen Wissenschaft*, Nr. 54: pp 849-851, 1869.
- [139] F. Pauwels, „A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The 10th contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure,“ *Z Anat Entwicklungsgesch*, Nr. 121: pp 478-515, 1960.
- [140] B. Kummer, „Grundlagen zur Pauwels-Theorie der funktionellen Anpassung des Knochens,“ *Orthopäde*, Nr. 24: pp 387-393, 1995.
- [141] J. C. Hu und K. A. Athanasiou, „The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs,“ *Tissue Engineering*, Nr. 12: pp 1337-1344, 2006.
- [142] T. Davisson, S. Kuning, A. Chen, R. Sah und A. Ratcliffe, „Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage,“ *Journal of Orthopaedic Research*, Nr. 20: pp 842-848, 2002.
- [143] P. Angele, D. Schumann, M. Angele, B. Kinner, C. Englert, R. Hente, B. Fuchtmeier, M. Nerlich, C. Neumann und R. Kujat, „Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds,“ *Biorheology*, Nr. 41: pp 335-346, 2004.
- [144] F. Gomar-Sancho und O. E. Gastaldi, „Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit's knee. The use of autologous osteochondral and meniscal grafts,“ *Int Orthop*, Nr. 11(1): pp 65-69, 1987.
- [145] M. D. Buschmann, Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky und E. B. Hunziker, „Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture,“ *J Cell Sci*, Nr. 108(4): pp 1497-1508, 1995.
- [146] S. Grad, S. Gogolewski, M. Alini und A. M. Wimmer, „Effects of simple and complex motion patterns on gene expression of chondrocytes seeded in 3D scaffolds,“ *Tissue Eng*, Nr. 12(11): pp 3171-3179, 2006.
- [147] J. Y. Kim, J. A. Grodzinsky und H. A. Plaas, „Compression of cartilage results in differential effects on biosynthetic pathways for aggrecan, link protein, and hyaluronan,“ *Arch Biochem Biophys*, Nr. 328(2): pp 331-340, 1996.
- [148] E. G. Nugent, A. T. Schmidt, L. B. Schumacher, S. M. Voegtline, C. W. Bae, D. K. Jadin und L. R. Sah, „Static and dynamic compression regulate cartilage metabolism of PRoteoGlycan 4 (PRG4),“ *Biorheology*, Nr. 43(3-4): pp 191-200, 2006.
- [149] H. R. Das, H. A. Jahr, J. Verhaar, J. C. van der Linden, J. G. van Osch und H. Weinans, „In vitro expansion affects the response of chondrocytes to mechanical stimulation,“ *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. [Epub ahead of print], 2007.
- [150] P. E. Müller, F. Schimpf, S. Milz, J. Kircher, H. R. Dürr, B. Wegener, C. Pellengahr und V. Jansson, „Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model,“ *Acta Orthop*, Nr. 77(6): pp 981-985., 2006.

- [151] „TETEC - Tissue Engineering Technologies AG,“ TETEC AG, 2008. [Online]. Available: <http://www.tetec-ag.de/de/aerzte/produkte/matricart.htm>. [Zugriff am 5 Februar 2008].
- [152] P. E. Müller, „Therapie von chondralen und osteochondralen Defekten durch resorbierbare Bioimplantate – eine tierexperimentelle Untersuchung,“ *Habilitationsarbeit*, pp. 58-62, 2003.
- [153] E. A. Morris, D. Peluso, T. J. Gill, J. Powers und C. Glasso, „The choice of the animal model of articular cartilage repair significantly affects outcomes and conclusions,“ *Transactions of the 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of The U.S.A, Canada, Europe and Japan*, Nr. p 260, 2001.
- [154] B. Wegener, F. M. Schrimpf, M. F. Pietschmann, S. Milz, M. Berger-Lohr, P. Bergschmidt, V. Jansson und P. E. Müller, „Matrix-guided cartilage regeneration in chondral defects,“ *Biotechnol Appl Biochem*, Nr. 53(1): pp 63–70, 2009.
- [155] B. Wegener, F. Schrimpf, P. Bergschmidt, M. Pietschmann, S. Utzschneider, S. Milz, V. Jansson und P. Müller, „Cartilage regeneration by bone marrow cells-seeded scaffolds,“ *J Biomed Mater Res A*, Nr. 95(3): pp. 735-740, 2010.
- [156] Sobotta und Hammersen, *Histologie*, München: Urban & Schwarzenberg, 1994.
- [157] C. Thomas, *Histopathologie*, Stuttgart: Schattauer, 1992.
- [158] K. L. Camplejohn und S. .. Allard, „Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies,“ *Histochemistry*, Nr. 89(2): pp 185-188, 1988.
- [159] S. W. O'Driscoll und R. B. Salter, „The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit,“ *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 7(208): pp 131-140, 1986.
- [160] S. W. O'Driscoll, F. W. Keeley und R. B. 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*, Nr. 70(4): pp 595-606, 1988.
- [161] P. Bergschmidt, „Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf,“ *Promotionsarbeit*, p. 44, 2007.
- [162] W. H. Kruskal und W. A. Wallis, „Use of ranks in one-criterion variance analysis,“ *J. Amer. Stat. Ass.*, Nr. 47: pp 583-621, 1952.
- [163] L. A. Solchaga, J. S. Temenoff, J. Gao, A. G. Mikos, A. I. Caplan und V. M. Goldberg, „Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds,“ *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. 13(4): pp 297-309, 2005.
- [164] L. A. Solchaga, J. U. Yoo, M. Lundberg, J. E. Dennis, B. A. Huibregtse, V. M. Goldberg und A. I. Caplan, „Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects,“ *J Orthop Res.*, Nr. 18(5): pp 773-80, 2000.
- [165] K. Mesner, „Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks,“ *J Biomed Mater Res.*, Nr. 27(12): pp. 1527-32, 1993.
- [166] R. A. Calandruccio und W. S. Gilmer, „Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals,“ *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 44: pp. 431-455, 1962.
- [167] G. Augustin, A. Antabak und S. Davila, „The periosteum. Part 1: anatomy, histology and molecular biology,“ *Injury*, Nr. 38(10): pp 1115-1130, 2007.
- [168] H. Alfredson und R. Lorentzon, „Autologous periosteum transplantation for the

- treatment of full thickness patellar cartilage defects," *Ortop Traumatol Rehabil.*, Nr. 3(2): pp 216-23, 2001.
- [169] R. Gudas, R. Simonaityte, L. Riauba, G. Pocius und R. Kalesinskas, „Treatment of joint surface pathology by Pridie drilling," *Medicina (Kaunas)*, Nr. 38(7): pp. 720-729, 2002.
- [170] G. Knutsen, L. Engebretsen, T. C. Ludvigsen, J. O. Drogset, T. Grøntvedt, E. Solheim, T. Strand, S. Roberts, V. Isaksen und O. Johansen, „Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial," *J Bone Joint Surg Am*, Nr. 86-A(3): pp. 455-464, 2004.
- [171] G. Knutsen, J. O. Drogset, L. Engebretsen, T. Grøntvedt, V. Isaksen, T. C. Ludvigsen, S. Roberts, E. Solheim, T. Strand und O. Johansen, „A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years," *J Bone Joint Surg Am.*, pp. 89(10): pp. 2105-2112, 2007.
- [172] H. Yan und C. Yu, „Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model," *Arthroscopy*, Nr. 23: pp 178-187, 2007.
- [173] K. E. Yates, R. L. Forbes und J. Glowacki, „New chondrocyte genes discovered by representational difference analysis of chondroinduced human fibroblasts," *Cells Tissues Organs*, Nr. 176(1-3): pp 41-53, 2004.
- [174] J. Chang, J. J. Rasamny und S. S. Park, „Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin sealant," *Arch Facial Plast Surg*, Nr. 9(3): pp 161-166, 2007.
- [175] J. L. v. Susante, P. Buma, L. Schuman, G. N. Homminga, W. B. v. d. Berg und R. P. Veth, „Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat," *Biomaterials*, Nr. 20(13): pp 1167-1175, 1999.
- [176] S. Castañeda, J. A. Roman-Blas, R. Largo und G. Herrero-Beaumont, „Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment," *Biochem Pharmacol*, Nr. Epub ahead of print, 2011.
- [177] M. A. Karsdal, D. J. Leeming, E. B. Dam, K. Henriksen, P. Alexandersen, P. Pastoureau, R. D. Altman und C. Christiansen, „Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis?," *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. 16(6): pp. 638-646, 2008.
- [178] Y. Henrotin, L. Pesesse und C. Sanchez, „Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives," *Biomed Mater Eng*, Nr. 19(4-5): pp. 311-316, 2009.
- [179] M. Vert, S. Li und H. Garreau, „New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids," *Clin Mater*, Nr. 10: pp. 3-8, 1992.
- [180] P. Buma, J. S. Pieper, T. v. Tienen, J. L. C. v. Susante, P. M. v. d. Kraan, J. H. Veerkamp, W. B. v. d. Berg, R. P. H. Veth und T. H. v. Kuppevelt, „Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects—A study in rabbits," *Biomaterials*, Nr. 24(19): pp. 3255-3263, 2003.
- [181] K. D. Johnson, K. E. Frierson, T. S. Keller, C. Cook, R. Scheinberg, J. Zerwekh, L. Meyers und M. F. Sciadini, „Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects," *J Orthop Res*, Nr. 14: pp. 351–369, 1996.
- [182] X. Wang, S. P. Grogan, F. Rieser, V. Winkelmann, V. Maquet, M. L. Berge und P. Mainil-Varlet, „Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study," *Biomaterials*, Nr. 25(17): pp. 3681-3688, 2004.
- [183] J. S. Temenoff und A. G. Mikos, „Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering," *Biomaterials*, Nr. 21: pp. 2405–2412, 2000.

- [184] P. Mainil-Varlet, B. Rahn und S. Gogolewski, „Long-term in vivo previous termdegradation and bone reaction to various polylactides. 1. One-year results,“ *Biomaterials*, Nr. 18: pp. 257–266, 1997.
- [185] J. C. Britt und S. S. Park, „Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material,“ *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, Nr. 124(6): pp 671-677, 1998.
- [186] H. P. v. Schroeder, M. Kwan, D. Amiel und R. D. Coutts, „The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects,“ *J Biomed Mater Res*, Nr. 25(3): pp 329-339, 1991.
- [187] I. Kallela, R. Tulamo, J. Hietanen, T. Pohjonen, R. Suuronen und C. Lindqvist, „Fixation of mandibular body osteotomies using biodegradable amorphous self-reinforced (70L:30DL) polylactide or metal lag screws: an experimental study in sheep,“ *J Craniomaxillofac Surg*, Nr. 27(2): pp 124-133, 1999.
- [188] J. C. Middleton und A. J. Tipton, „Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices,“ *Biomaterials*, Nr. 21: pp. 2335–2346, 2000.
- [189] Y. Tanakaa, H. Yamaokaa, S. Nishizawaa, S. Nagatab, T. Ogasawarac, Y. Asawaa, Y. Fujiharaa, T. Takatoc und K. Hoshi, „The optimization of porous polymeric scaffoldsnext term for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered previous termcartilagenext term,“ *Biomaterials*, Nr. 31(16): pp. 4506-4516, 2010.
- [190] L. E. Freed, J. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos und R. Langer, „Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers,“ *J Biomed Mater Res*, Nr. 27: pp 11-23, 1993.
- [191] D. A. Grande, C. Halberstadt, G. Naughton, R. Schwartz und R. Manji, „Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts,“ *J Biomed Mater Res*, Nr. 34(2): pp 211-220, 1997.
- [192] D. Hannouche, H. Terai, J. Fuchs, S. Terada, S. Zand, B. Nasser, H. Petite, L. Sedel und J. Vacanti, „Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells,“ *Tissue Eng*, Nr. 13(1): pp 87-99, 2007.
- [193] G. N. Homminga, P. Buma, H. W. Koot, P. M. v. d. Kraan und W. B. v. d. Berg, „Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro,“ *Acta Orthop Scand*, Nr. 64(4): pp 441-445.
- [194] S. Knecht, C. Erggelet, M. Endres, M. Sittlinger, C. Kaps und E. Stüssi, „Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts,“ *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, Nr. 83(1): pp 50-57, 2007.
- [195] C. Chanlalit, C. Kasemkijwattanamd und V. Varavit, „Autologous chondrocyte implantation for traumatic large cartilage defect,“ *J Med Assoc Thai*, Nr. 90(7): pp 1435-1442, 2007.
- [196] E. V. Dare, S. G. Vascotto, D. Carlsson, M. T. Hincke und M. Griffith, „Differentiation of a fibrin gel encapsulated chondrogenic cell line.,“ *Int J Artif Organs*, Nr. 30(7): pp 619-627, 2007.
- [197] T. S. Johnson, J. Xu, V. V. Zaporozhan, J. M. Mesa, C. Weinand, M. A. Randolph, L. J. Bonassar, J. M. Winograd und M. J. Yaremchuk, „Integrative repair of cartilage with articular and nonarticular chondrocytes,“ *Tissue Eng*, Nr. 10(9-10): pp 1308-1315, 2004.
- [198] U. R. Goessler, P. Bugert, K. Bieback, A. Baisch, H. Sadick, T. Verse, H. Klüter, K. Hörmann und F. Riedel, „Expression of collagen and fiber-associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation,“ *Int J Mol Med*, Nr. 14(6): pp 1015-1022, 2004.
- [199] C. Y. Huang, P. M. Reuben, G. D’Ippolito, P. C. Schiller und H. S. Cheung, „Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in

- agarose culture," *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, Nr. 278(1): pp 428-436, 2004.
- [200] J. Iwasa, M. Ochi, Y. Uchio, K. Katsube, N. Adachi und K. Kawasaki, „Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel," *Artif Organs*, Nr. 27(3): pp 249-255, 2003.
- [201] E. J. Jansen, P. J. Emans, L. W. Van Rhijn, S. K. Bulstra und R. Kuijer, „Development of partial-thickness articular cartilage injury in a rabbit model," *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 466(2): pp 487-494, 2008.
- [202] Y. Ito, M. Ochi, N. Adachi, K. Sugawara, S. Yanada, Y. Ikada und P. Ronakorn, „Repair of osteochondral defect with tissue-engineered chondral plug in a rabbit model," *Arthroscopy*, Nr. 21(10): pp 1155-1163, 2005.
- [203] S. Wakitani, T. Goto, R. G. Young, J. M. Mansour, V. M. Goldberg und A. I. Caplan, „Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel," *Tissue Eng*, Nr. 4(4): pp 429-444, 1998.
- [204] S. Nehrer, H. Breinan, A. Ramappa, H. Hsu, T. Minas, S. Shortkroff, C. Sledge, I. Yannas und M. Spector, „Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model," *Biomaterials*, Nr. 19(24): pp 2313-2328, 1998.
- [205] C. R. Lee, A. J. Grodzinsky, H. P. Hsu und M. Spector, „Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model," *J Orthop Res*, Nr. 21(2): pp 272-281, 2003.
- [206] M. Kubo, S. Imai, M. Fujimiya, E. Isova, K. Ando, T. Mimura und Y. Matsusue, „Exogenous collagen-enhanced recruitment of mesenchymal stem cells during rabbit articular cartilage repair," *Acta Orthop*, Nr. 78(6): pp 845-855, 2007.
- [207] S. Shortkroff, L. Barone, H. P. Hsu, C. Wrenn, T. Gagne, T. Chi, H. Breinan, T. Minas, C. B. Sledge, R. Tubo und M. Spector, „Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage," *Biomaterials*, Nr. 17(2): pp 147-154, 1996.
- [208] H. M. Frost, „Perspectives: a vital biomechanical model of synovial joint design," *Anat Rec*, Nr. 240(1): pp 1-18, 1994.
- [209] R. E. J. Glenn, E. C. McCarty, H. G. Potter, S. F. Juliao, J. D. Gordon und K. P. Spindler, „Comparison of fresh osteochondral autografts and allografts: a canine model," *Am J Sports Med*, Nr. 34(7): pp 1084-1093, 2006.
- [210] H. A. Breinan, H. P. Hsu und M. Spector, „Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines," *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 391(Suppl): pp S219-S230, 2001.
- [211] H. A. Breinan, S. D. Martin, H. P. 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*, Nr. 18(5): pp 781-789, 2000.
- [212] D. Barnewitz, M. Endres, I. Krüger, A. Becker, J. Zimmermann, I. Wilke, J. Ringe, M. Sittinger und C. Kaps, „Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts," *Biomaterials*, Nr. 27(14): pp 2882-2889, 2006.
- [213] T. G. Koch und D. H. Betts, „Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model," *Expert Opin Biol Ther*, Nr. 7(11): pp 1621-1626, 2007.
- [214] W. Brehm, B. Aklin, T. Yamashita, F. Rieser, T. Trüb, R. Jakob und P. Mainil-Varlet, „Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results," *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. 14(12): pp 1214-1226, 2006.
- [215] H. Chiang, T. F. Kuo, C. C. Tsai, M. C. Lin, B. R. She, Y. Y. Huang, H. S. Lee, C. S.

- Shieh, M. H. Chen, J. A. Ramshaw, J. A. Werkmeister, R. S. Tuan und C. C. Jiang, „Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation,“ *J Orthop Res*, Nr. 23(3): pp 584-593, 2005.
- [216] D. D. Frisbie, M. W. Cross und C. W. McIlwraith, „A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee,“ *Vet Comp Orthop Traumatol*, Nr. 19(3): pp 142-146, 2006.
- [217] N. A. Sgaglione, A. Miniaci, S. D. Gillogly und T. R. Carter, „Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee,“ *Arthroscopy*, Nr. 18(2 Suppl. 1): pp 9-32, 2002.
- [218] M. Schinhan, M. Gruber, P. Vavken, R. Dorotka, L. Samouh, C. Chiari, R. Gruebl-Barabas und S. Nehrer, „Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee,“ *J Orthop Res*, Nr. Doi: 10.1002/jor.21521. [Epub ahead of print], 2011.
- [219] K. Messner und W. Maletius, „The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes,“ *Acta Orthop Scand*, Nr. 67(2): pp. 165-168, 1996.
- [220] F. R. Convery, W. H. Akeson und G. H. Keown, „The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses,“ *Clin Orthop*, Nr. 82: pp 253-262, 1972.
- [221] M. Tägil und P. Aspenberg, „Cartilage inductin by controlled mechanical stimulation in vivo,“ *J Orthop Res*, Nr. 17: pp 200-204, 1999.
- [222] 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*, Nr. 71(1): pp 74-80, 1989.
- [223] D. J. Moojen, D. B. Saris, K. G. Auw Yang, W. J. Dhert und A. J. Verbout, „The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair,“ *Tissue Eng*, Nr. 8(4): pp 627-634, 2002.
- [224] S. Pineda, A. Pollack, S. Stevenson, V. Goldberg und A. Caplan, „A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair,“ *Acta Anat (Basel)*, Nr. 143(4): pp 335-340, 1992.
- [225] M. Brittberg und L. Peterson, „Introduction of an articular cartilage classification,“ *ICRS Newsletter*, Nr. 1: pp. 5-8, 1998.
- [226] G. Smith, J. Taylor, K. Almqvist, C. Erggelet, G. Knutsen, P. Garcia und e. al, „Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems,“ *Arthroscopy*, Nr. 21(12): pp. 1462-1467, 2005.
- [227] M. P. v. d. Borne, N. J. Raijmakers, J. Vanlauwe, J. Victor, S. N. d. Jong, J. Bellemans und D. B. Saris, „International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture,“ *Osteoarthritis Cartilage*, Nr. 15(12): pp. 1397-1402, 2007.
- [228] G. G. Niederauer, M. A. Slivka, N. C. Leatherbury, D. L. Korvick, H. H. Harroff, W. C. Ehler, C. J. Dunn und K. Kieswetter, „Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats,“ *Biomaterials*, Nr. 21(24): pp 2561-2574, 2000.
- [229] A. Arøen, S. Heir, S. Løken, L. Engebretsen und F. P. Reinholt, „Healing of articular cartilage defects. An experimental study of vascular and minimal vascular microenvironment,“ *J Orthop Res*, Nr. 24(5): pp 1069-1077, 2006.
- [230] R. Dorotka, U. Windberger, K. Macfelda, U. Bindreiter, C. Toma und S. Nehrer, „Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix,“ *Biomaterials*, Nr. 26(17): pp 3617-3329, 2005.

- [231] X. Wei und K. Messner, „Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint,“ *J Biomed Mater Res*, Nr. 46(4): pp 539-548.
- [232] C. R. Chu, M. Szczodry und S. Bruno, „Animal models for cartilage regeneration and repair,“ *Tissue Eng Part B*, Nr. 16(1): pp. 105-115, 2010.
- [233] K. Schlichting, H. Schell, R. U. Kleemann, A. Schill, A. Weiler, G. N. Duda und D. R. Epari, „Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing,“ *Am J Sports Med*, Nr. 36(12): pp. 2379-2391, 2008.
- [234] E. C. Rodríguez-Merchán, „The treatment of cartilage defects in the knee joint: microfracture, mosaicplasty, and autologous chondrocyte implantation,“ *Am J Orthop*, Nr. 41(5): pp. 236-239, 2012.
- [235] H. C. Lim, J. H. Bae, S. H. Song, Y. E. Park und S. J. Kim, „Current treatments of isolated articular cartilage lesions of the knee achieve similar outcomes,“ *Clin Orthop Relat Res*, Nr. 470(8): pp. 2261-2267, 2012.
- [236] K. Bobacz, R. Ullrich, L. Amoyo, L. Erlacher, J. Smolen und W. Graninger, „Stimulatory effects of distinct members of the bone morphogenetic protein family on ligament fibroblasts,“ *Ann Rheum Dis*, Bde. %1 von %265(2): pp. 169-177, 2006.
- [237] Y. Gu, Y. Wang, H. Dai, L. Lu, Y. Cheng und W. Zhu, „Chondrogenic differentiation of canine myoblasts induced by cartilage-derived morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in vitro,“ *Mol Med Report*, Bde. %1 von %25(3): pp. 767-772, 2012.

## A Reduzierung und Alkylierung der Präparate für die Aggrecanmarkierung

Vorbereitung der Schnitte 24 Stunden vor der geplanten Färbung

Herstellung des Reduktionspuffers (250 ml)

50 mM Tris (121,1 g/mol) > 1,51 g und 200 mM NaCl (58,4 g/mol) > 2,92 g  
in 200 ml Aqua dest auflösen.

Dann Messung des pH-Wertes, der mit Hilfe von Salzsäure anschließend  
auf 7,35 gesenkt wird.

Hinzufügen von destilliertem Wasser bis das Gesamtvolumen 250 ml  
beträgt. Die hergestellte Lösung kann für maximal 1 Woche im Kühlschrank  
aufbewahrt werden.

Arbeitslösung

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

Die zu färbenden Objektträger sofort in ein mit der Arbeitslösung gefülltes  
Schiffchen setzen und für 2 Stunden bei 37°C inkubieren.

Alkylierende Lösung (250 ml)

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

Die Lösung stabilisiert die gebrochenen Disulfid-Brücken. Dadurch können  
die Schnitte 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-gepufferter 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung mischen) setzen
4. Drei mal fünf Minuten in PBS mit Tween waschen
5. Schnitte für 30 Minuten bei 37. 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: CIIc1, 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-Kitmischen und für mindestens 30 Minuten bei 4. 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 15 Minuten
4. Filterpapier aufpressen und sofort mit DPX eindecken

## **D Safranin-O-Färbung**

1. Schnitte kurz in aqua dest abspülen
2. 7 Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylin einstellen
3. 10 Minuten fließend wässern
4. 3 Minuten in 0,02%-iges FCF (Echtgrün, Fa. Chroma, Best.-Nr. IA 304) einstellen
5. 15 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
11. Sofort mit DPX eindecken

## Selbständigkeitserklärung

„Ich, Markus Markart, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Verwendung von resorbierbaren Implantaten zur Knorpelregeneration am Kniegelenk – eine tierexperimentelle Studie am Merino-Schaf“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

München, den 8. Juni 2013

---

Markus Markart

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich in aller Form bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere gilt mein größter Dank Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller und Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Volkmar Jansson für die Annahme dieser Arbeit sowie deren hervorragende Betreuung. In zahlreichen Gesprächen erhielt ich nützliche Hinweise und Tipps, die das Abschließen meiner Promotion möglich machten. Gesondert hervorgehoben werden muss jedoch das Engagement und die Geduld von Herrn Dr. med. Bernd Wegener, der mir in jeder Situation mit bedachten Ratschlägen zur Seite stand und mich in zahlreichen Diskussionen in die Thematik einführte. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Milz für die Auswertung der Histologien und die gute Zusammenarbeit mit dem AO Research Institut der AO Foundation in Davos bedanken. Meinem ehemaligen Klinikdirektor Prof. Dr. med. Hans-Joachim Andress und meinem derzeitigen Klinikdirektor Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel gebührt ein ebenso großer und besonderer Dank für die ständige Motivation, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen hat.

Nicht vergessen werden darf Dr. med. vet. Stefan Nüske und seine Mitarbeiter des Lehr- und Versuchsguts der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München. Nur durch deren Hilfe waren die notwendigen Operationen an den Versuchstieren überhaupt möglich.

Auch allen Mitarbeitern des Labors für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, im Besonderen deren Leiter Prof. Dr. med. habil. Dr.-Ing. Wolfgang Plitz, müssen dankend erwähnt werden.

Abschließend möchte ich noch meinen Eltern und meiner Familie meinen ganz besonderen Dank zum Ausdruck bringen, ohne deren Beistand und Liebe meine Ausbildung und mein Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Markus Markart, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Erprobung resorbierbarer Implantate zur Knorpelregeneration am Kniegelenk - eine tierexperimentelle Studie am Schaf“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.“

München, den 8. Juni 2013

---

Markus Markart