

Aus dem
Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
Charité-Universitätsmedizin Berlin

eingereicht über das Institut für Veterinär Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Histologische Analyse des knöchernen und knorpeligen Einheilverhaltens eines metallischen Implantats in einen osteochondralen Defekt

Eine Studie im Schafsmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Elisabeth Zimpfer/ geb. Schulz
Tierärztin aus Potsdam

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4000

Aus dem
Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
Charité-Universitätsmedizin Berlin

eingereicht über das Institut für Veterinär Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Histologische Analyse des knöchernen und knorpeligen Einheilverhaltens eines metallischen Implantats in einen osteochondralen Defekt

Eine Studie im Schafsmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Elisabeth Zimpfer/ geb. Schulz
Tierärztin aus Potsdam
Berlin 2018
Journal-Nr.:4000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ing. G. N. Duda
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnenberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep, animal models, experimental surgery, bones, implantation,
transplants, histology

Tag der Promotion: 04.07.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-911-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

1	EINLEITUNG.....	7
2	STAND DES WISSENS.....	9
2.1	DER GELENKKNORPEL	9
2.2	STRUKTURELEMENTE DES HYALINEN KNORPELS	10
2.2.1	<i>Die Chondrozyten und Chondrone.....</i>	<i>10</i>
2.2.2	<i>Die extrazelluläre Matrix.....</i>	<i>11</i>
2.2.3	<i>Kollagene.....</i>	<i>12</i>
2.2.4	<i>Proteoglykane.....</i>	<i>13</i>
2.2.5	<i>Subchondrale Knochenplatte.....</i>	<i>14</i>
2.3	KARTILAGINÄRE REPARATURMECHANISMEN.....	15
2.4	KONSERVATIVE THERAPIEKONZEPTE.....	17
2.4.1	<i>Physikalisch-physiotherapeutische Therapie.....</i>	<i>17</i>
2.4.2	<i>Konservative-medikamentöse Maßnahmen.....</i>	<i>17</i>
2.5	CHIRURGISCHE UND BIOLOGISCHE THERAPIEKONZEPTE	18
2.5.1	<i>Lavage, Debridement und Shaving.....</i>	<i>20</i>
2.5.2	<i>Subchondrale Bohrungen, Mikrofrakturierung, Abrasionsarthoplastik.....</i>	<i>20</i>
2.5.3	<i>Biologische Methoden: Osteochondrale Transplantationen, Transplantation von Periost und Perichondrium, autologe Chondrozytentransplantation.....</i>	<i>22</i>
2.6	ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN.....	25
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	TIERE UND VERSUCHSANORDNUNG.....	27
3.2	IMPLANTAT.....	28
3.3	VERSUCHSABLAUF	29
3.3.1	<i>Operationsvorbereitungen.....</i>	<i>29</i>
3.3.2	<i>Operationstechnik, Setzung des Defekts und des Implantats.....</i>	<i>30</i>
3.3.3	<i>Postoperatives Vorgehen.....</i>	<i>34</i>
3.3.4	<i>Euthanasie.....</i>	<i>34</i>
3.4	PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG	35
3.4.1	<i>Klinische und radiologische Untersuchung.....</i>	<i>35</i>
3.4.2	<i>Sägen.....</i>	<i>36</i>
3.5	PRÄPARATE HERSTELLUNG	38
3.5.1	<i>Dünnschliffpräparate.....</i>	<i>38</i>
3.5.2	<i>Paraffinschnitte.....</i>	<i>39</i>
3.5.3	<i>Färbungen.....</i>	<i>40</i>
3.5.4	<i>Immunhistochemie.....</i>	<i>43</i>
3.6	AUSWERTUNG	46
3.6.1	<i>ICRS-Klassifikation.....</i>	<i>46</i>

3.6.2	<i>Makroskopische Auswertung</i>	48
3.6.3	<i>Deskriptive Auswertung</i>	51
3.6.4	<i>Histologische Auswertung</i>	52
3.6.5	<i>Modifizierter Score für die histologische Auswertung</i>	54
3.6.6	<i>Histomorphometrische Bildanalyse</i>	56
3.6.7	<i>Auswertung der mit α-Kollagen vom Typ II markierten Präparate</i>	58
3.6.8	<i>Statistik</i>	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	59
4.1.1	<i>Gruppe 1: Implantat mit rauer HA- Beschichtung</i>	60
4.1.2	<i>Gruppe 2: Implantat mit glatter HA- Beschichtung</i>	61
4.1.3	<i>Gruppe 3: unbeschichtetes Implantat</i>	63
4.2	ZUSAMMENFASSUNG DER MAKROSKOPISCHEN AUSWERTUNG	66
4.3	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	68
4.3.1	<i>Gruppe 1: raue HA- Beschichtung</i>	68
4.3.2	<i>Gruppe 2: glatte HA- Beschichtung</i>	70
4.3.3	<i>Gruppe 3: unbeschichtetes Implantat</i>	71
4.3.4	<i>Ergebnisse semiquantitativer Score</i>	73
4.3.5	<i>Ergebnisse Histomorphometrie</i>	74
4.4	ZUSAMMENFASSUNG DER HISTOLOGISCHEN AUSWERTUNGEN	77
4.5	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOLOGIE.....	78
4.6	ZUSAMMENFASSUNG IMMUNHISTOLOGIE.....	79
5	DISKUSSION	80
5.1	TIERMODELL FÜR OSTEOCHONDRALE DEFEKTHEILUNG	81
5.2	OPERATION UND OPERATIONSTECHNIK.....	84
5.3	IMPLANTAT UND INSTRUMENTARIUM.....	85
5.4	PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG	88
5.5	HISTOMORPHOMETRIE.....	89
5.6	SEMIQUANTITATIVER SCORE.....	90
5.7	ERGEBNISSE	93
5.7.1	<i>Makroskopie</i>	93
5.7.2	<i>Histologie</i>	94
5.7.3	<i>Modifizierter Score Dünnschliffpräparate</i>	97
5.7.4	<i>Immunhistologie</i>	98
5.8	SCHLUSSFOLGERUNG.....	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
7	SUMMARY	102
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105

10	TABELLENVERZEICHNIS	112
11	LITERATURVERZEICHNIS	113
12	PUPLIKATIONSVERZEICHNIS.....	131
13	DANKSAGUNG	132
14	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	133

1 Einleitung

Die Häufigkeit von degenerativen Erkrankungen am Kniegelenk hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Gründe dafür sind eine steigende Lebenserwartung, Überbelastung durch Übergewicht und sportliche Überbeanspruchung durch Extremsportarten (Salzmann 2001). In der Bundesrepublik Deutschland wurden 2011 216.000 Patienten wegen einer Kniegelenks- oder Hüftarthrose in einer Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtung behandelt (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2013a). Auch unter den 20 Hauptdiagnosen reiht sich die Kniegelenksarthrose auf den 3. Platz ein (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2015). Arthroskopische Eingriffe am Gelenkknorpel und den Menisken waren im Jahr 2012 die zweithäufigste Operation, die bei vollstationären Patienten durchgeführt worden ist (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2013b). Allein diese Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit von Therapiekonzepten, die einerseits für das Gesundheitssystem kostensenkend sind und die andererseits für den Patienten eine schnelle Genesung ohne Einschränkungen im Alltag bedeuten. Bis heute gibt es keine Möglichkeiten diese Erkrankung zu heilen. Nur ein Voranschreiten des Erkrankungsprozesses bis zu einer endgültigen Prothesenimplantation kann verlangsamt werden. Gerade bei jüngeren Patienten sollte diese Zeitspanne deutlich ausgedehnt werden, da die Lebenszeit einer Prothese in der Regel auf 12-15 Jahre beschränkt ist (Hube und Reichel 2003). Jede Revision der Prothese bedeutet steigende Kosten, Verlust von gesunder Knochensubstanz und erneute physische sowie psychische Belastung für den Patienten. Eine Möglichkeit, den Erkrankungsprozess bei lokal begrenzten Knorpelschäden zu verlangsamen, besteht im Einsatz einer Mini-Prothese (Episealer®), die den degenerierten Knorpel ersetzt und vor der Synovia schützt. Die Einheilung des metallenen Implantats in den Knorpel- und Knochenbereich ist eine Herausforderung. Diese kann durch Beschichtungen verbessert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, das ossären und chondralen Einheilverhalten eines metallischen Implantats (Episealer®) im Hinblick auf die unterschiedlichen Hydroxylapatit (HA)-Oberflächenstrukturierungen zu verbessern. Im Tierversuch wurde das Einheilverhalten des Implantats in einen osteochondralen Defekt in der medialen Femurkondyle der rechten Hinterextremität untersucht. Die Implantate bestehen aus einem Titangrundkörper und waren entweder ohne Beschichtung, mit einer glatten HA-Beschichtung oder mit einer rauen HA-Beschichtung versehen. Das Ausmaß der Reaktion nach der Implantation im osteochondralen Defekt sollte mittels histologischer, immunhistologischer und histomorphometrischer

Parameter evaluiert werden. Des Weiteren wurde das Einheilverhalten mit Hilfe von semiquantitativen Scores bewertet.

Im Tiermodell wurden folgende Arbeitshypothesen überprüft:

1. Alle Implantattypen zeigen ein gutes bis sehr gutes Einheilungsverhalten in den subchondralen Knochen
2. Die Integration des Implantats in den umliegenden Gelenkknorpel ist am besten bei der rauen HA-Beschichtung, weniger gut bei der glatten HA-Beschichtung und am schlechtesten bei dem reinen Titanimplantat.

Als Ergebnis zeigt sich eine bessere Einheilung im benachbarten Gelenkknorpel durch signifikant weniger Risse, Clusterbildung und Entfärbung des hyalinen Knorpels. Die Spaltbildung zwischen Implantat und hyalinen Gelenkknorpel ist minimal. Es bildet sich ein mechanisch belastbares Gewebe im Spalt zwischen Knorpel und Implantat aus.

2 Stand des Wissens

2.1 *Der Gelenkknorpel*

Der Gelenkknorpel ist ein Stützgewebe mesenchymalen Ursprungs, welches außergewöhnliche Fähigkeiten besitzt (Marlovits und Vécsei 2000a; Newman 1998). Im Laufe der Entwicklung wird der Gelenkknorpel noch durch Blutgefäße versorgt, während der adulte Knorpel sich als avaskuläres, alymphatisches und nicht innerviertes Gewebe darstellt (Rudert und Tillmann 1993). Er ist bedeutend bei der chondralen Ossifikation, dem epiphysären Längenwachstum und der Frakturheilung. Er bedeckt alle großen Gelenkoberflächen und ermöglicht dadurch eine reibungsfreie Gelenkfunktion. Des Weiteren toleriert der hyaline Knorpel physikalische Belastungen und vereint Materialeigenschaften, die bis heute kein industriell hergestellter Werkstoff erreicht hat (Buckwalter und Mankin 1998b; Martinek 2003). Insbesondere an den großen Gelenken ist der hyaline Knorpel Druckbelastungen von bis zu 400 kg/cm² ausgesetzt (Martinek 2003). Der bei Bewegung entstehende Reibungskoeffizient des intakten Gelenkknorpels beträgt 0,02 bis 0,002 und ist damit wesentlich niedriger als der von künstlich hergestellten Ersatzmaterialien (Mankin 1994; Rudert und Wirth 1998; Mow et al. 1984). Der hyaline Knorpel widersteht diesen Extrembelastungen durch eine hoch komplexe Organisation und Interaktion von soliden und fluiden Komponenten. Dabei ändert sich die Struktur und Zusammensetzung des hyalinen Knorpels in Abhängigkeit von der Entfernung zur Gelenkoberfläche. Dies ermöglicht trotz einer stetigen Kontinuität eine zonale Gliederung des Knorpels (Buckwalter und Mankin 1997). Der Gelenkknorpel besitzt nur eine begrenzte Fähigkeit zur Regeneration und Reparatur.

2.2 *Strukturelemente des hyalinen Knorpels*

2.2.1 *Die Chondrozyten und Chondrone*

Der hyaline Knorpel besteht aus nur einer einzigen Zellpopulation, den Chondrozyten, welche komplex in ein Matrixwerk von Strukturelementen integriert sind. Sie verändern ihre Größe, Form, Lage und metabolische Aktivität in den verschiedenen Zonen des Knorpels (Quinn et al. 2005). In ihrer ausgereiften ovalen Form verbleiben sie über Jahrzehnte in ihrer Position und halten das Strukturwerk somit stabil (Martinek 2003). Eine Migration durch das Matrixkonstrukt ist nicht möglich (Kinner et al. 2005). Auch fehlen jegliche Versorgungsstrukturen wie Nervenfasern, Blut- oder lymphatische Gefäße, wodurch ernährende Substanzen nur per Diffusion zu den Zellen gelangen können. Die Chondrozyten registrieren über in die Matrix hineinragende Zilien mechanische Veränderungen (Archer und Francis-West 2003; Buckwalter und Mankin 1998a). Zugleich stehen die Proteoglykane der extrazellulären Matrix mit der dreischichtigen Plasmamembran der Chondrozyten über die gesamte Oberfläche in Kontakt (Arsenault und Kohler 1994). Es entsteht eine Abhängigkeit der Knorpelzelle von ihrer umgebenden Matrix, da eine Kommunikation oder Stoffaustausch zwischen den Zellen durch Zellkontakte nicht möglich ist (Buckwalter und Mankin 1998b; Archer und Francis-West 2003; Marlovits und Vécsei 2000a). Die Chondrozyten besitzen ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum und einen vergrößerten Golgi-Apparat sowie viele Vesikel, die Zeichen einer sekretorischen Tätigkeit sind (Welsch und Sobotta 2003; Vollmar-Hesse 2000). Ihre Funktion ist die Synthese von neuer extrazellulärer Matrix und der Abbau degradierter Matrixkomponenten (Marlovits und Vécsei 2000a). Die Stoffwechselrate der Chondrozyten ist nahezu genauso hoch wie im vaskularisierten Gewebe. Chondrozyten sind nur in ca. 1-3% des Knorpelvolumens enthalten (Martinek 2003). Die metabolische Rate der adulten Chondrozyten ist somit als niedrig einzustufen (Archer und Francis-West 2003; Buckwalter und Mankin 1998b; Marlovits und Vécsei 2000a). Die höchste Stoffwechselaktivität besitzen Chondrozyten in der Phase der Skelettentwicklung. Mit dem Abschluss der Ossifikation und steigendem Alter sinkt diese auf ein Minimum ab und begrenzt die Fähigkeit der Chondrozyten auf Verletzungen oder Belastungsänderungen im Bereich des Gelenkknorpels ausreichend zu reagieren (Marlovits und Vécsei 2000a).

Nach der Teilung aus einer Mutterzelle liegen die Chondrozyten in kleinen Gruppen, den isogenen Zellgruppen, zusammen (Welsch und Sobotta 2003). Um einzelne oder mehrere Chondrozyten wird die Matrix in mittleren und tiefen Knorpelschichten in konzentrisch angeordnete Regionen klassifiziert: eine perizelluläre, eine territoriale und eine interterritoriale Region (Aigner und Stove 2003; Poole et al. 1984). Wiederum liegt innerhalb der perizellulären und territorialen Region eine perizelluläre Kapsel, die geschlossen mit der perizellulären Matrix und den darin enthaltenden Chondrozyten eine funktionelle Einheit, die Chondrone, bilden. Ein Chondron kann einen oder mehrere Chondrozyten enthalten (Muir 1995). In den tieferen Knorpelschichten sind die Chondrone multipel linear angeordnet und bestehen aus einer Gruppe von drei bis acht Chondrozyten (Poole et al. 1988). Durch den hohen Proteoglykan- und Flüssigkeitsgehalt (Módis et al. 1995) innerhalb der Chondrone entstehen inkompressible Strukturelemente mit hydrodynamischem Verhalten, welche die innen liegenden Chondrozyten vor Druckbelastungen schützen (Youn et al. 2006; Módis et al. 1995; Mayne 1989). Die Chondrone tragen bei Matrixverformungen zur Weiterleitung von mechanischen Signalen bei und wandeln chemisch und/oder osmotische Signale in Stimuli um, die die Chondrozyten benötigen, um ihre Syntheseaktivität anzupassen (Poole et al. 1987). Die Chondrone arbeiten synergistisch mit der territorialen und interterritorialen Matrix, um das gebundene Wasser innerhalb der Matrix zu regulieren und einem Deformierungsprozess zu widerstehen (Poole et al. 1991).

2.2.2 *Die extrazelluläre Matrix*

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein dreidimensionales Netzwerk von unlöslichen Kollagenfasern, in denen lösliche Komponenten wie Proteoglykane und Glykoproteine, vernetzt, integriert oder auch chemisch gebunden sind (Kuettner 1992). Die EZM des hyalinen Knorpels besteht aus Wasser und Makromolekülen wie Kollagenen, Proteoglykanen, nicht kollagenen Proteinen und Glykoproteinen (Marlovits und Vécsei 2000a). Die Kollagenfasern geben dem Gewebe die Zugfestigkeit und Form (Buckwalter und Mankin 1998b). Proteoglykane und nicht-kollagene Proteine binden sich an das kollagene Strukturwerk oder interagieren mit diesem. Einige nicht-kollagene Proteine helfen einerseits das Gerüst zu stabilisieren und unterstützen andererseits die Bindung der Chondrozyten an die Makromoleküle der extrazellulären Matrix. In das gebildete Konstrukt lagern sich Wassermoleküle ein (Buckwalter und Mankin 1998b). Wasser stellt mit bis zu 80% die größte Komponente dar. Diese Gewebsflüssigkeit enthält Gase, kleine Proteine, Stoffwechselprodukte und hohe Anteile an Kationen, um eine Balance zu den negativ geladenen Proteoglykanen

herzustellen. Der Gehalt an Wasser nimmt mit der Tiefe der Knorpelzonen prozentual ab (von 80% auf 75%) (Martinek 2003). Die Interaktion zwischen Wasser und den Makromolekülen ermöglicht die gewebetypischen mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes (Marlovits und Vécsei 2000a; Buckwalter und Mankin 1998b). Zudem erfolgt die Übertragung mechanischer Signale von der Matrix auf die Chondrozyten während belastungsbedingter Matrixverformung (Marlovits und Vécsei 2000a).

2.2.3 Kollagene

Kollagene sind die häufigsten Proteine, die im Körper vorkommen (Eyre 1980). Der Hauptbestandteil der Kollagenfasern und immerhin 90-95% der Kollagene im Knorpelgewebe macht das Strukturprotein Kollagen Typ II aus (Newman 1998; Martinek 2003). Des Weiteren enthält der Gelenkknorpel die Kollagentypen VI, IX, X und XI. Die Funktion von IX und XI ist der Aufbau und ihre Verankerung mit den umliegenden Makromolekülen (Takaishi et al. 1997; Marlovits und Vécsei 2000a). Typ VI hat eine wichtige Funktion im Bereich der interterritorialen Matrixzone, die direkt die Chondrone umgibt. Es verbindet durch den fibrillären Anteil die Zellen mit der Matrix (Buckwalter und Mankin 1998b). Den Kollagen Typ X findet man hauptsächlich in der mineralisierten tiefen Knorpelzone und ihm wird die Funktion der Knorpelmineralisation zugeschrieben (Buckwalter und Mankin 1998b; Martinek 2003). Das hoch organisierte Strukturgeflecht von Kollagenen verteilt sich in unterschiedlichen Konzentrationen im hyalinen Knorpel (Clark 1985). Es entsteht ein zonaler Charakter (Abbildung 1), der in mindestens drei Schichten gegliedert werden kann (Lane und Weiss 1975). Diese unterscheiden sich hauptsächlich durch die Kollagenausrichtung und -konzentration. In der Tangentialzone (10-20% der Gesamtschichtdicke) sind die Fibrillen sehr eng gepackt und richten sich parallel zur Knorpeloberfläche aus (van Mow und Guo 2002). Es entsteht eine kompakte Kollagenmembran, die die darunter liegenden Knorpelschichten während der Kompression schützt (van Mow und Guo 2002). In der Übergangszone (40–60 % der Gesamtschichtdicke) biegen sich die Fibrillen in eine senkrechte Formationen, sie sind homogener als in der Tangentialzone verteilt und ihr Abstand zueinander vergrößert sich (van Mow und Hung 2001). Unter der mittleren Zone beginnt die Radiärzone (30% der Gesamtschichtdicke). Hier bündeln sich die Fibrillen und orientieren sich radiär zur subchondralen Knochenlamelle. Eine Verbindung von hyalinem Knorpel mit der Knochenlamelle entsteht (Redler et al. 1975). Häufig wird in der Literatur eine weitere, vierte kalzifizierte Zone, die Tidemark beschrieben. Diese Zone variiert bei einigen Arten oder auch in unterschiedlichen Bereichen des Gelenkknorpels und dient der festen Verzahnung von

Gelenkknorpel und Knochen (Xia et al. 2003). Wie bereits oben erwähnt verlaufen in der Gesamtheit die Kollagenfibrillen arkadenförmig durch die Knorpelschichten hindurch. In den tieferen Schichten senkrecht zum subchondralen Knochen angeordnet und in höheren Schichten zum Bogen verbunden. (Benninghoff 1925). Ihre Funktion dient dazu, Belastungen und Stöße aus allen Richtungen zu dämpfen (Bruckner und van der Rest, M 1994).

2.2.4 *Proteoglykane*

Die Proteoglykane machen 25-35% des Knorpel-Trockengewichts aus und werden von den Chondrozyten und Synoviozyten intrazellulär synthetisiert (Martinek 2003). Das sogenannte Core-Protein bildet das zentrale Protein, an dem Polysaccharide gebunden sind. Über Bindungsproteine (link-proteins) verbinden sich die Proteoglykane mit den langen fädigen Hyaluronsäuremolekülen und bilden unterschiedlich große Aggregate, an die sich unzählige Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten anlagern. Als wichtigste Proteoglykane sind das große Aggrecan- und das wesentlich kleinere Decorinmolekül zu nennen. Aggrecan spielt als Hauptproteoglykan vor allem bei der Wasserbindung die entscheidende Rolle (Buckwalter und Mankin 1998a). Hingegen ist die Funktion von Decorin weitestgehend unklar. Es wird jedoch angenommen, dass Decorinmoleküle morphologische und zytoskelettale Veränderungen von Fibroblasten verursachen (Lazaroski 2011). Die negativen Ladungen der gebundenen Glykosaminoglykane (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat) sind letztendlich für den Quellungsdruck verantwortlich, dem das Kollagennetzwerk in seiner dreidimensionalen Ausrichtung entgegenwirkt, das Gebilde unter Spannung bringt und die Verformungsfestigkeit bewirkt (Lu et al. 2006). Durch die Integration in das kollagene Netzwerk liegen die Proteoglykane nur komprimiert und teilhydratiert vor (siehe Abb. 3). Dieses Modell einer partiell hydratierten komprimierten Matrix ermöglicht eine besondere mechanische und metabolische Eigenschaften des hyalinen Knorpels (Marlovits und Vécsei 2000a).

2.2.5 *Subchondrale Knochenplatte*

Die Basis für den Gelenkknorpel bildet die subchondrale Knochenplatte. Sie dient als Stoßdämpfer und ist wichtig für die Versorgung der darüber liegenden Knorpellagen (Imhoff et al. 2000; Gomoll et al. 2010). Der Knorpel erscheint verzahnt, wie ein Schlüssel zu seinem Schloss (Imhoff et al. 2000), mit der Oberfläche des darunter subchondralen Knochens. Dieser ist im Aufbau leicht verändert als Knochen an anderen Lokalisationen des Körpers. Die Knochenplatte ist wesentlich dünner und 10-mal höher vaskularisiert als im Lamellenkochen (Clark und Huber 1990). Die intensive Vaskularisation der subchondralen Lamelle ermöglicht eine Versorgung des hyalinen Knorpels mit bis zu 50 % der benötigten Grundstoffe wie Glukose, Sauerstoff, Kohlendioxid und Wasser (Imhoff et al. 2000). Die Belastungs- und Entlastungsphasen des subchondralen Knochens dienen der Ernährung des Knorpels und stimulieren die Bildung von Kollagenen und Proteoglykanen. Dies wird von Imhoff als Trainings-Effekt beschrieben (Imhoff et al. 2000). Bei einer akuten Fehlbelastung kommt es zu Mikrorissen, Ödemen und Blutungen in der subchondralen Knochenplatte (Imhoff et al. 2000). Die Selbstheilung solcher Defekte ist wesentlich effektiver als im Knorpel, jedoch sklerosiert das Knochengewebe. Der so geschädigte Knochen verändert seine Vaskularisation und versteift. Daraus folgen eine verminderte Durchblutung und eine weniger effektive Absorption von Druckbelastungen. Der hyaline Knorpel ist somit schutzlos den Belastungen ausgesetzt. Die oberen Knorpelschichten fasern auf (Fibrillisation) und ein Defekt entsteht. Bei anhaltender Belastung kann daraus ein osteochondraler Defekt mit anschließender Osteoarthrose resultieren. Schäden der subchondralen Platte haben somit eine direkte Auswirkung auf die hyaline Knorpelschicht (Imhoff et al. 2000; Kawcak et al. 2001; Madry 2010).

2.3 *Kartilaginäre Reparaturmechanismen*

Die Knorpelheilung und darauf folgende Reparaturmechanismen hängen von der Tiefe des Defektes ab (Mankin 1982; Twyman et al. 1991). Man unterscheidet dabei Defekte, die sich in der avaskulären Oberfläche befinden und tiefe Läsionen, die einen Anschluss an das Gefäßsystem haben (Marlovits und Vécsei 2000a; Bruns und Steinhagen 2000). Es werden dadurch grundlegend unterschiedliche Reparaturvorgänge initiiert. Bei Mikroverletzungen und partiellen Gelenkknorpeldefekten, die nur die oberflächlichen Schichten betreffen, ist eine klassische dreiphasige Wundheilung wie im vaskularisiertem Gewebe nicht möglich. (Marlovits und Vécsei 2000a). Durch die fehlende Blutversorgung ist eine Migration von Entzündungszellen und Freisetzung von Gefäßinhibitoren in Defektbereich eingeschränkt (Mankin 1982; Marlovits und Vécsei 2000a). Eine inflammatorische Reaktion bleibt somit aus. Nur die chondralen intrinsischen Mechanismen sind im begrenzten Maß möglich, da die Chondrozyten fest in der extrazellulären Matrix integriert sind (Bruns und Steinhagen 2000; Kinner et al. 2005; Marlovits und Vécsei 2000a). Formal bestehen die intrinsischen Reparationen aus einer gesteigerten Proliferation in Chondrozyten-Clustern und einem erhöhten Chondrozytenstoffwechsel mit gesteigerter Proteoglykansynthese (Bruns und Steinhagen 2000; Buckwalter und Mankin 1998b). Die Defektränder werden abgerundet und die Knorpelmasse fließt („Cartilage-flow-Phänomen“) in das Defektzentrum ein (Bruns et al. 1997). Je nach Defektgröße, Matrixverlust, Patientenalter und Zeitpunkt kann die Knorpeloberfläche zu einem gewissen Maß wiederhergestellt werden (Martinek und Imhoff 2003; Buckwalter 2002; Bruns und Steinhagen 2000). Bei größeren oberflächlichen Defekten ist dieser Reparaturmechanismus überfordert. Die tieferen Schichten werden eröffnet und bei anhaltender Belastung bis auf die Basalschicht zerstört (Bruns und Steinhagen 2000). Eine entzündliche Kaskade folgt, die den Zellstoffwechsel der Chondrozyten vermindert und die Lastübertragung im Gelenk stört. Zusätzlich verliert der subchondrale Knochen seine Elastizität und versteift (Radin et al. 1970). Dauerschäden an der umliegenden Knorpeloberfläche und tieferen Schichten, die in eine Arthrose münden, sind die Folge (Martinek und Imhoff 2003). Dabei bleibt offen, ob die Versteifung in der subchondralen Knochenplatte oder der Funktionalitätsverlust der darüber liegenden Knorpelschichten ursächlich für die Dysfunktion ist (Bruns und Steinhagen 2000; Buckwalter 1998). Bei tiefen Knorpelverletzungen oder subchondralen Gelenkknorpeldefekten, die das Gefäßsystem penetrieren, ist der Reparaturmechanismus ähnlich wie in anderen Geweben. Durch den Blutaustritt und Bildung eines Fibrinpflops können pluripotente mesenchymale Stammzellen in den Defektbereich

gelangen. Sie sind in der Lage sich zu Chondrozyten zu differenzieren und ein narbiges Ersatzgewebe innerhalb von 8 Wochen zu bilden (Marlovits und Vécsei 2000a; Shapiro et al. 1993; Bruns und Steinhagen 2000). Jedoch zeigt dieses bereits nach 3 Monaten erste Degenerationszeichen, da eine vollständige Verbindung mit den angrenzenden Kollagenfasern nicht stattfindet (Burkhart und Imhoff 1999). Nach 6-12 Monaten werden die neu gebildete Matrix und deren Zellen in Faserknorpel umgewandelt. Dieser ist weicher und weist nicht die biomechanischen Eigenschaften wie der originäre Knorpel auf (Burkhart und Imhoff 1999; Marlovits und Vécsei 2000a). Es folgt eine schlechte Lastverteilung und erhöhte Friktion in dem Defektbereich. Der mit Ersatzgewebe ausgefüllte Defekt sinkt ein und splittert auf (Marlovits und Vécsei 2000a). Mangelhafte Reparationsvorgänge, die mikromechanische und biomechanische Störungen im Kniegelenk verursachen, sowie ein weiterer Substanzverlust der umliegenden gesunden Knorpelmatrix sind die Folge. Diese tiefgreifenden Veränderungen enden zwangsläufig in einer Präarthrose (Bruns und Steinhagen 2000; Martinek und Imhoff 2003). Eine Regeneration mit originärem Gewebe erfolgt, nach dem heutigen Wissenstand, durch die begrenzte Fähigkeit des Knorpels zur Selbstheilung nicht (Bruns und Steinhagen 2000).

2.4 Konservative Therapiekonzepte

Die konservativen Maßnahmen sind weit verbreitete Therapieoptionen, die Beschwerden lindern und das Fortschreiten der beginnenden Arthrose verlangsamen (Martinek und Imhoff 2003; Steinmeyer 2001). Die Ätiologie der Symptome wird dabei nicht entscheidend beeinflusst (Erggelet et al. 2000).

2.4.1 Physikalisch-physiotherapeutische Therapie

Zu diesen Therapiemöglichkeiten gehören die Krankengymnastik, Physiotherapie, Balneotherapie sowie Wärme- und Kälteapplikationen (Martinek und Imhoff 2003). Sie werden immer häufiger initial nach einem Knorpelschaden oder einer beginnenden Arthrose genutzt. Sie alle ermöglichen eine Entzündungsreduktion, Schmerzlinderung und Funktionsverbesserung (Hackenbroch 2001). Des Weiteren beinhaltet dieses Therapiekonzept eine Gewichtsreduktion und eine Belastungsoptimierung durch Arthrose-Orthesen am Kniegelenk (Steinmeyer 2001). Der Knorpelschaden wird nicht repariert, aber ein Fortschreiten oder weitere Degenerationen sollen verhindert werden (Martinek und Imhoff 2003).

2.4.2 Konservative-medikamentöse Maßnahmen

Konservative-medikamentöse Maßnahmen umfassen systemische, oberflächliche oder intraartikuläre Applikationen von Medikamenten (Höher J., Erggelet Ch. 2003). Als Stoffklassen stehen steroidale und nicht-steroidale Antiphlogistika, Hyaluronsäurepräparate, Glykosaminoglykane oder aufbereitete körpereigene Entzündungshemmer zur Verfügung. In der oralen Therapie finden schnell wirksame, nicht-steroidale Antiphlogistika (z.B. Diclofenac, Ibuprofen, Rofecoxib) und Analgetika (z.B. Opioide) Anwendung (Steinmeyer 2001). Intraartikuläre Injektionen ins Kniegelenk haben ihren Stellenwert in der Therapie von Knorpelpathologien und Arthrosen (Martinek und Imhoff 2003). Die Applikation von Steroiden hat bei der Behandlung von Knorpelschäden keine Relevanz (Martinek und Imhoff 2003). Nur in Fällen von sehr fortgeschrittener Arthrose können vier intra-artikuläre Injektionen in zwei bis vier wöchigem Abstand indiziert sein (Hackenbroch 2001). Der Wirkungseintritt beginnt bereits nach 14 Tagen (Bannuru et al. 2009). Die Gefahren bei einer Steroid-Applikation sind häufig eine Reduktion der intraartikulären Immunabwehr und ein daraus resultierendes Infektionsrisiko.

Die Hyaluronsäure ist eine natürlich vorkommende Substanz und Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit. Hyaluronsäure-Präparate sind angezeigt zur Behandlung von Schmerzen und eingeschränkter Gelenkfunktion. Sie haben neben einer antiphlogistischen auch eine anabole Wirkung und erhöhen die Viskosität im Gelenk (Altman und Moskowitz 2002). In der Regel wird ein Behandlungsintervall von drei bis fünf intraartikulären Injektionen im wöchentlichen Abstand empfohlen (Martinek und Imhoff 2003). Im Vergleich zur intraartikulären Injektion von Steroiden setzt die Wirkung von Hyaluronpräparaten erst nach 10-13 Wochen ein (Berenbaum et al. 2012; Bannuru et al. 2009). Ein dauerhafter Effekt ist in den meisten Fällen nicht zu erwarten, und die Injektionen müssen nach sechs Monaten wiederholt werden (Felson und Anderson 2002).

2.5 Chirurgische und biologische Therapiekonzepte

Im Gegensatz zu den konservativen Maßnahmen werden die Ursachen der Beschwerden durch einen chirurgischen Eingriff entscheidend beeinflusst und führen mittelfristig zur objektiven und subjektiven Besserung der Symptome (Martinek und Imhoff 2003). Dabei sollte zwischen einer Reparatur und einer Regeneration des Gelenkknorpels unterschieden werden (Marlovits und Vécsei 2000b). Die Reparatur bezieht sich auf die Heilung oder den Ersatz von verlorenem Knorpelgewebe durch Zellproliferation und Matrixsynthese (Marlovits und Vécsei 2000b). Dabei gelingt es meistens nicht, die Struktur und Funktionalität von originärem Gelenkknorpel nachzubilden. Die Regeneration stellt hingegen die vollständige Bildung einer neuen Gelenkfläche dar, die im Wesentlichen ein Duplikat der alten Gelenkoberfläche ist. Dies liegt jedoch jenseits der zurzeit zur Verfügung stehenden operativen Maßnahmen (Marlovits und Vécsei 2000b).

Die Wahl der aktuellen Behandlungsoptionen von Knorpeldefekten unterliegen therapeutischen Leitlinien mit folgenden Kriterien wie Ätiologie, Lokalisation, Läsionstiefe, Ausdehnung, Alter und Ausmaß der Begleitverletzungen (Schewe et al. 2008; Shetty et al. 2014; Erggelet und Steinwachs 2001). Umschriebene Läsionen bei jüngeren sportlichen Patienten, die oft zu Gelenkschmerz führen, stellen die Hauptindikation für biologische Techniken dar, während osteoarthrotische Veränderungen dem Fachgebiet der alloplastischen Gelenkschirurgie zugeordnet werden (Marlovits und Vécsei 2000b; Erggelet und Steinwachs 2001). Nach Marlovits und Vécsei stehen zwei mögliche Strategien zur Knorpelreparation zu Verfügung (Marlovits und Vécsei 2000b). Die erste Möglichkeit besteht in der Stärkung der intrinsischen Kapazitäten des hyalinen Knorpels. Eine Alternative ist die Wiederherstellung einer neuen

Gelenkfläche mittels körpereigenen oder körperfremden Transplantaten mit chondrogenem Potential (Marlovits und Vécsei 2000b).

Auch O'Driscoll teilte die Therapieoptionen in Wiederherstellungstechniken (Restoration), Ersatztechniken (Replacement), operative Eingriffe zur Gelenkentlastung (Relieving) und die finale Resektion (Resection) ein (O'Driscoll 1998). Um eine Wiederherstellung (Restoration) bzw. Heilung der Gelenkoberfläche des Knorpels und des subchondralen Knochens zu erreichen, stehen zwei Therapieformen zu Verfügung. Zum einem können die intrinsischen Reparaturmechanismen stimuliert werden, zum anderen wird der Defekt mit einem Medium gefüllt, das die Fähigkeit besitzt, die Knorpelregeneration zu unterstützen. Operationen, die das Knochenmark stimulieren (Abrasion, Mikrofrakturierung und subchondrale Bohrungen) sowie Techniken, die bioaktiven Medien zur Stimulation nutzen (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zellen, Scaffolds), werden dieser Gruppe zugeordnet (O'Driscoll 1998). Als Ersatz (Replacement) der Gelenkoberfläche stehen die Transplantation von Geweben und Zellen in den Knorpeldefekt zur Verfügung. Dabei unterscheidet man in körpereigene (Allografts) und körperfremde (Autografts) Transplantate (Erggelet und Steinwachs 2001). Nach Marlovits, Imhoff und Burkhart zählen sämtliche Behandlungen zur biologischen Knorpelheilung wie osteochondrale Autografts, Transplantationen von Periost oder autologe Chondrozytentransplantation dazu (Marlovits und Vécsei 2000b; Burkhart und Imhoff 1999).

Hingegen nimmt O'Driscoll eine klare Abgrenzung zwischen vollschichtigen Transplantaten wie osteochondralen Zylindern, welche er zum Replacement zählt und autogenen Zellen, die eine intrinsische Reparatur (Restoration) fördern, vor (O'Driscoll 1998). Zur Vervollständigung sind die Umstellungsosteotomie (Relieving) und der Gelenkersatz (Resection) als zwei weitere Therapiemöglichkeiten zu nennen. Die Umstellungsosteotomie ist eine Technik, die bei Achsenfehlstellung genutzt wird. Dadurch wird der überbelastete Gelenkbereich geschont. Eine Kombination aus der Umstellungsosteotomie und knorpelchirurgischen Maßnahmen erhöht laut Burkhart und Imhoff die Chancen der Knorpelreparation (Burkhart und Imhoff 1999). Sind jedoch die Schäden am Knorpel zu weit vorangeschritten oder kommt es zu einem Substanzverlust nach starkem Trauma der Femurkondyle, ist nur noch ein Gelenkersatz (Resection) als alloplastische Therapieoption möglich (Dornacher et al. 2014).

2.5.1 *Lavage, Debridement und Shaving*

Diese Techniken werden bei sehr kleinen Läsionen zur symptomatischen Therapie genutzt. Grundsätzlich wird durch diese Techniken das Gelenk arthroskopisch eröffnet, bei der Lavage mit Kochsalzlösung gespült oder bei Debridement freie Knorpelfragmente mit einer Faszange entfernt. Die Gelenkoberfläche wird geglättet und Irritationen wie fibrillierter Knorpel oder Meniskusfragmente abgetragen (Brittberg 2014). Es wird kein Regenerationsgewebe gebildet und die Entwicklung einer Arthrose nicht gebremst. Die Erfolgsrate weist kurzfristig 80 % und mittelfristig 50 % zufriedenstellende Resultate bis zu fünf Jahren auf (Burkhart und Imhoff 1999). Beim Shaving werden gelöste Knorpelteile, die ein mechanisches Problem verursachen, abgelöst und entfernt. Dies führt ebenfalls nicht zur Bildung eines Regenerationsgewebes. Experimentell und klinisch wurden auch Nekrosen und Auffaserungen im gesunden Knorpel gefunden (Jackson und Dieterichs 2003; Schmid, A., Schmid, F. 1987). Generell erscheinen diese Therapieoptionen aufgrund der nur kurzfristigen Erfolge für junge sportlich aktive Patienten mit einem chondralen Defekt als ungeeignet (Burkhart und Imhoff 1999).

2.5.2 *Subchondrale Bohrungen, Mikrofrakturierung, Abrasionsarthoplastik*

Das gemeinsame Prinzip dieser Techniken ist die Eröffnung der subchondralen Knochenplatte, um eine gefäßassoziierte Heilung zu fördern (Marlovits und Vécsei 2000b; Brittberg 2014). Es kommt zur Ausbildung eines Fibrinpfropfs, in diesen pluripotenten Stammzellen einwandern und sich zu Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren. Ein faserknorpeliges Ersatzgewebe wird gebildet, welches nach kurzer Zeit degeneriert (Burkhart und Imhoff 1999). Bei der subchondralen Bohrung wird der Defekt mit einem Draht bis zur Vaskularisationszone punktförmig mehrfach angebohrt. Dabei wird die Bildung einer glatten Faserknorpeloberfläche angeregt (Burkhart und Imhoff 1999). Eine andere Therapieoption zur Eröffnung des vaskularisierten Markraumes stellt die Mikrofrakturierung dar. Hierbei werden arthroskopische Stößel genutzt, die etwa 3-4 Perforationen/cm² erzeugen. Die neu gebildete raue Oberfläche ermöglicht eine stabilere Anheftung des Fibrinpfropfs und besseres Einheilverhalten gegenüber anderen Techniken. (Burkhart und Imhoff 1999). Des Weiteren wird für den Chirurgen eine kontrollierbare Arbeit ermöglicht und schwer zugängliche Areale durch abgewinkelte Stößel sicher erreicht (Marlovits und Vécsei 2000b). In klinischen Studien zeigten sich drei bis fünf Jahre postoperativ 75 % der Patienten in ihrer Schmerzsituation verbessert und bei 67% der Patienten wurde eine Verbesserung im täglichen Leben und bei körperlicher Arbeit erzielt (Steadman, J. R. et al. 1999).

Bei der Abrasionsarthoplastik wird der Knorpeldefekt bis zum angrenzenden gesunden Knorpel debridiert. Der subchondrale Knochen wird mittels eines Bohrers oberflächlich maximal drei Millimeter abgetragen. Es entsteht dadurch ein hämorrhagisches Exsudat mit nachfolgender Bildung eines bindegewebigen Reparationsgewebes, welches für sechs bis acht Wochen vor Belastungen geschützt werden muss (Burkhart und Imhoff 1999). Das anfänglich hyalinartige Narbengewebe wandelt sich nach vier bis sechs Monaten in faserknorpeliges Gewebe um und ein degenerativer Prozess schließt sich an (Marlovits und Vécsei 2000b). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich mindestens 15 % der Patienten nach einer Abrasionsarthoplastik verschlechtern (Burkhart und Imhoff 1999) und in ca. 60 % eine vorübergehende Besserung eintrat (Friedman et al. 1984). Aus der Sicht von Goymann bzw. Johnson ist die Abrasionsarthoplastik nicht als knochenmarksstimulierendes Verfahren zur Behandlung von Knorpelschäden etabliert und wird eher im Rahmen der Arthrosetherapie eingesetzt (Goymann 1999; Johnson 2001).

2.5.3 *Biologische Methoden: Osteochondrale Transplantationen, Transplantation von Periost und Perichondrium, autologe Chondrozytentransplantation*

Bei diesen biologischen Techniken kann durch die Transplantation von Geweben oder Zellen mit chondrogenem Potenzial das limitierte Heilungspotential des Gelenkknorpels überwunden werden (Marlovits und Vécsei 2000b). Dabei umfasst dieses Gebiet die Transplantation von Perichondrium, Periost, Knorpel- und Knochengewebe von Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen (Marlovits und Vécsei 2000b). Die osteochondrale Transplantation eignet sich optimal bei kleinen tiefen chondralen Defekten zwischen 10-20 mm Tiefe (Resinger et al. 2004). Bei dieser Technik werden intakte Knorpel-Knochen-Zylinder aus einer nicht belasteten Gelenkzone entnommen und in Abhängigkeit von Größe und Ausmaß des Defektes ein oder mehrere Zylinder transplantiert. Als Entnahmestellen werden häufig die äußere Kante des lateralen Femurkondylus und der Fossa intercondylaris femoris genutzt (Simonian et al. 1998). Die Knorpel-Knochen-Zylinder können aus allogenen oder autologem Material gewonnen werden, jedoch besteht bei allogenen Gewebe immer ein erhöhtes Infektionsrisiko. Aus diesem Grund sollte immer eine patientenorientierte Abwägung erfolgen und auf Fälle beschränkt bleiben, in denen alternative Verfahren nicht mehr möglich sind (Resinger et al. 2004). Das Hauptproblem der Methode stellt die Langzeitstabilität und die exakte Integration der Zylinder in den umgebenden Knorpel dar. Eine Integration in die Spongiosa und subchondralen Knochen findet immer statt, jedoch bleibt eine Einheilung auf Knorpelzebene bei schlechter Kongruenz ohne Spalt nicht aus. (Lane et al. 1977; Desjardins 1991). Trotz einer Auffüllung der Zwischenräume mit Faserknorpel entstehen Stufen und Inkongruenzen zwischen den Zylindern und den Defekträndern. Es folgen pathologische Belastungsdrücke im Defektbereich und eine Transplantatdegeneration (Hunziker 2002). In klinischen Studien von Outerbridge et al. konnte 6,5 Jahre postoperativ eine Verbesserung der Kniegelenkfunktion und Schmerzsymptomatik festgestellt werden. In Biopsien aus der Region der Transplantation konnte nach sieben Jahren makroskopisch und histologisch hyaliner Knorpel identifiziert werden (Outerbridge et al. 1995). Vorteile dieser Methode sind der direkte Transfer von hyalinem Knorpel und eine Wiederherstellung der originären Gelenkoberfläche. Nachteilig sind die begrenzte Verfügbarkeit, das Infektionsrisiko bei allogenen Transplantat, die fehlende Integration der chondralen Transplantatanteile, anhaltende Schmerzen im Entnahmebereich sowie die unterschiedliche Topologie mit der Translokation von Gewebe aus einer Zone mit geringer Belastung in eine Zone mit hoher Belastung (Resinger et al. 2004; Marlovits und Vécsei 2000b). Neuste Entwicklungen im Bereich Knorpel-Knochen-Transplantate beinhalten gewebeschonendere Instrumente, die eine Gewebeentnahme und die Einbringung ohne

mechanische Kompression erleichtern, sowie die Nutzung von Wachstumsfaktoren die eine schnelle Integration des Knorpels an der Empfängerfläche ermöglicht (Marlovits und Vécsei 2000b). Mit einer Transplantation von Perichondrium bzw. Periost stehen chondrogen aktive Gewebe mit einer biologischen Proliferationsfähigkeit zur Verfügung (Marlovits und Vécsei 2000b). Das Perichondrium wird an der Rippenknochen-Knorpel-Grenze nahe dem Sternum und das Periost von der medialen Tibiafläche entnommen (Marlovits und Vécsei 2000b). Beide Gewebearten besitzen Zellen, die sich unter bestimmten Umgebungsbedingungen am Knorpelgewebe wandeln. Die Bedeutung des Periosts als Transplantat geht auf Ham zurück. Er konnte zeigen, dass die Kambiumschicht chondrogenes Potential aufweist (Ham 1930). Das Perichondrium besitzt ebenfalls eine tieferliegende zellreiche Schicht, das Stratum cellulare, in dem unter bestimmten Bedingungen Knorpelgewebe gebildet werden kann (Bruns et al. 1992; Werner et al. 2003). Im Vergleich zu osteochondralen Transplantaten wird bei dieser Technik der Defekt nur mit dem Gewebe überdeckt und mit Hilfe von Klebern oder Nähten an den umgebenden Knorpel fixiert. Es bildet sich erst postoperativ ein Ersatzgewebe unterhalb des Transplantats aus. Die Hauptgefahr ist eine Ossifikation und die Ablösung des Transplantats aufgrund mangelnder Fixation am umgebenden gesunden Knorpel (Resinger et al. 2004; Marlovits und Vécsei 2000b; Wakitani et al. 2002). Bisher ist die Überlegenheit der Periosttransplantation gegenüber osteochondralen Implantat noch nicht bewiesen. Sie erfordern eine genau definierte Indikationsstellung mit Beachtung des Patientenalters, der Lokalisation und Ausdehnung des Defektes (Marlovits und Vécsei 2000b).

Die autologe Chondrozytentransplantation ist eine Methode zur Behandlung von lokalisierten, vollschichtigen Knorpelschäden, die im Vergleich zu osteochondralen Transplantationverfahren höhere Kosten produziert (Niemeyer et al. 2013; Meenen und Rischke 2003; Brittberg et al. 1994). Auch für die Patienten handelt es sich um ein aufwendigeres zweizeitiges Verfahren, bei dem arthroskopisch Knorpelzellen entnommen und zu einem späteren Zeitpunkt reimplantiert werden. Diese Zeitspanne ist notwendig, da die gewonnenen Knorpelzellen im Zellkulturlabor unter sterilen Bedingungen gezüchtet und anschließend in einem zweiten Eingriff unter einen Periostlappen in den Knorpeldefekt injiziert werden (Resinger et al. 2004). Die Indikation zur autologen Knorpelzelltransplantation stellt ein symptomatischer großer Knorpelschaden Grad III ab einer Größe von $>3-4 \text{ cm}^2$ dar (Niemeyer et al. 2013). Eine Weiterentwicklung dieser Technik ist die matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT). Hierbei erfolgen dieselben Schritte wie bei der herkömmlichen autologen Chondrozytentransplantation (ACT), jedoch werden die gewonnenen

Zellen auf ein Trägermaterial aufgetragen und in den Defekt implantiert. Eine Fixation durch einen Periostlappen bleibt aus. Sowohl bei der ACT als auch bei der MACT müssen Kriterien erfüllt werden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen (Niemeyer et al. 2013). Hierbei sollten eine individuelle Abwägung von Defektgröße, Patientenalter, Schädigungsmuster der umliegenden Strukturen, Achsenfehlstellung und Bandverhältnisse erfolgen (Niemeyer et al. 2013; Resinger et al. 2004). Nach Outerbridge et al. ist die Knorpelzelltransplantation bei umschriebenen Defekten von Grad III und IV indiziert und zeigt die besten Ergebnisse bei posttraumatischen Knorpeldefekten (Outerbridge et al. 1995). In klinischen 10-Jahres Ergebnissen konnte die ACT bei Knorpelschäden über 3-4 cm² Defektfläche signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden als bei einer Mosaikplastik oder Mikrofrakturierung (Niemeyer et al. 2013).

2.6 Zukunftsperspektiven

Zukünftig liegt ein besonderes Interesse an der Transplantation von *in vitro* kultivierten Zellen, welche mit extrazellulären Komponenten biologischer oder synthetischer Art kombiniert werden (Vogt S, Imhoff AB 2007). Diese neuen teils synthetisch hergestellten Konstrukte werden in die Defektregion implantiert und formen dort eine neue Gelenkoberfläche. Zusammenfassend wird in der Literatur dafür der Oberbegriff „Tissue Engineering“ genutzt (Martinek und Imhoff 2003). Es werden Verfahren entwickelt, die das komplexe hyaline Knorpelgewebe durch synthetische dreidimensionale Konstrukte, sogenannte Scaffolds, nachahmen. Zusätzlich können Zellsuspensionen mit Wachstumsfaktoren hinzugefügt werden. Es entstehen dadurch bioartifizielle Regenerate, die nicht nur biologisch, sondern auch biophysikalisch die Oberfläche reparieren bzw. im besten Fall regenerieren (Martinek und Imhoff 2003). Ein Vorreiter dieser Technik stellt die autologe Chondrozytentransplantation dar. Zurzeit wird intensiv in tierexperimentellen Studien an Scaffolds investiert. Scaffolds sind dreidimensionale Konstrukte, die aus synthetischem oder biologischem Material hergestellt werden. Der strukturelle Bau ahmt die extrazelluläre Matrix nach und erhöht somit die Oberfläche für eine Zellmigration, Zelladhäsion und Differenzierung (Panseri et al. 2012). Das Risiko bei natürlichen Scaffolds liegt in einer Immunreaktion. Ein natürlicher Scaffold birgt aber eine Reihe an Vorteilen, da diese ein natürliches Abbild zur originären Knorpelmatrix darstellen. Synthetische Materialien aus Kunststofffasern, Keramik oder Hydroxylapatit haben den Vorteil, dass sie leicht herzustellen sind und die Übertragung von pathogenen Erregern nicht stattfindet (Panseri et al. 2012). Sie müssen aber auch die Eigenschaften besitzen, sich kontrolliert aufzulösen, ohne eine starke Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe auszulösen. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, Scaffolds multiphasisch zu schichten und mit verschiedenen Materialien (Chondrozyten, Kollagengels) zu beladen (Frenkel et al. 1997; Erggelet et al. 2000; Noguchi et al. 1994). Dies bringt den Vorteil, dass die Anatomie des Gelenkknorpels weitestgehend respektiert wird und heilungsfördernde Zellen oder Stoffe im Defektbereich platziert werden können. Problematisch bleibt weiterhin die Fixation ohne eine Beschädigung des Scaffolds im Defektbereich und die Vermeidung von Mikrobewegungen zwischen dem Transplantat und dem originären Gewebe (Panseri et al. 2012). Es erschließt sich in diesem Forschungsbereich ein breites Feld neuer Methoden mit zukünftigen Perspektiven. Der Einsatz am Menschen ist jedoch klinischen Studien vorbehalten, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine konstanten Behandlungsergebnissen und standardisierten Verfahren entwickelt wurden (Erggelet et al. 2000; Johnstone et al. 2013). Eine neue Perspektive bietet hierbei die in

dieser Studie angewandte, neuartige „Mini-Prothese“ (Episealer®) zur Abdichtung eines osteochondralen Defektes. Das metallische Implantat kann durch MRT/CT-gestützte Messung exakt und patientenspezifisch angepasst werden. Dabei können selbst größere Defekte schonend chirurgisch versorgt werden und die Zeit bis zu einer Endoprothese hinausgezögert werden. Dieses Implantat wird bereits in der Humanmedizin angewendet. Dabei handelt es sich nicht um ein regeneratives Implantat, wie Scaffolds oder osteochondrale Zylinder (OATS), die eine Gelenkfläche wiederherstellen sollen, sondern um ein Implantat zur Schmerzlinderung und Mobilitätssteigerung. Ein großer Vorteil gegenüber den anderen Techniken ist, dass auch bei älteren Patienten, Patienten mit beginnender Arthrose oder großen osteochondralen Defekten diese Operationstechnik zur Schmerzlinderung angewendet werden kann. Dabei besteht beim Episealer® wie auch bei regenerativen Implantaten ein Forschungsbedarf im Hinblick auf eine bessere Chondrointegration im Defektbereich.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere und Versuchsanordnung

Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie wurden standardisierte osteochondrale Defekte in die mediale Femurkondyle des rechten Kniegelenkes von 24 Schafen der Rasse Merino-Mix gesetzt. Die Tiere waren weiblich, mindestens 2 Jahre alt und klinisch gesund. Vor dem Versuchsbeginn erfolgte eine tierärztliche Eingangsuntersuchung, die den einwandfreien Gesundheits- und Pflegezustand der Tiere dokumentierte. Im Zuge der Untersuchung wurde das Gewicht der Tiere ermittelt sowie eine präventive Behandlung gegen Ekto- und Endoparasiten durchgeführt. Die Unterbringung der Schafe erfolgte präoperativ in den Ställen mit Stroheinstreu, Holzspänen, Wassertränken und Heu ad libitum. Ab dem zehnten Tag post OP erfolgte in den Sommermonaten die Freilandhaltung auf der Weide und in den Wintermonaten die Stallhaltung im Institut. Die 24 Tiere werden randomisiert den 3 Versuchsgruppen zugeteilt. Je Gruppe werden acht Tiere operiert, um eine hinreichende Gruppengröße für die statistische Auswertung zu erreichen. Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere mit Kunststoffohrmarken markiert. Der Tierversuch wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (G 0217/13).

Tabelle 1: Versuchsanordnung

<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Beschichtung der Implantate</i>
1	8	raues HA
2	8	glattes HA
3	8	Titan

3.2 Implantat

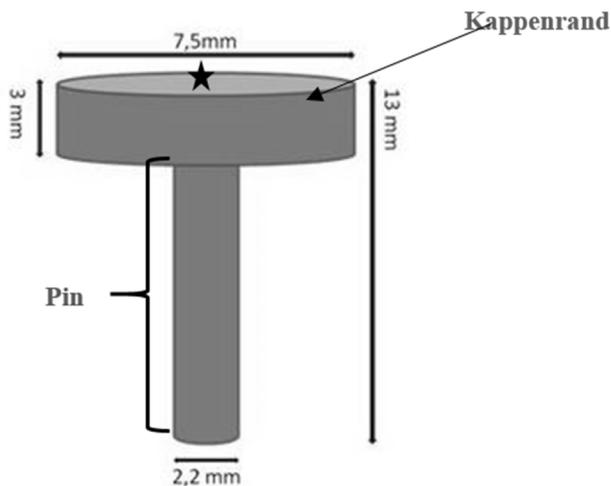


Abbildung 1: Schematische Skizze des Implantats (Episealer®). Der dunkelgraue Bereich wurde mit zwei differierenden Oberflächenstrukturierungen an den Kappenrändern (Pfeil) beschichtet. Die dem Gelenk zugewandte Seite, hellgrauer Bereich, blieb unbeschichtet und ist der Oberflächenkrümmung des Gelenknorpels entsprechend konvex (Stern).

Es wurden bei den Versuchstieren drei sich in der Oberflächenstruktur differierende Implantate (Episealer®) der Firma Episurf Medical AB implantiert. Zum einem wurde ein unbeschichteter Implantattyp und zum anderen zwei Implantattypen mit sich unterscheidenden Hydroxylapatitbeschichtungen verwendet. Die Implantate wurden im Bereich des Kappenrandes (siehe Abb. 1 Pfeil bzw. dunkelgrauer Bereich) beschichtet. Die dem Gelenk zugewandte Kappenoberfläche (siehe Abb. 1: Stern) blieb ohne Beschichtung (siehe Abb. 1, hellgrauer Bereich) und war konvex gewölbt. Durch diese Wölbung passte sich das Implantat der Gelenkkurvatur an. Die Implantate wurden mittels Press-Fit-Verfahren verankert. Die Press-Fit-Verankerung wird erreicht durch ein Übermaß des Implantates zu seinem Implantatlager von 0,2 mm (im Implantatkörperbereich) bzw. 0,4 mm (im Ankerbereich).

Die Oberfläche der Implantate, die im Klinikbereich an menschlichen Patienten angewendet werden, wird anhand von CT-Daten personalisiert und individuell hergestellt. Für den hier durchgeführten Tierversuch wurden CT-Daten verschiedener Schafknie gemittelt und pseudoindividualisierte Implantate für das Schafknie hergestellt.

3.3 *Versuchsablauf*

3.3.1 *Operationsvorbereitungen*

Die Schafe wurden 12 Stunden vor Narkoseeinleitung nüchtern gehalten, jedoch war ihnen freier Zugang zum Wasser gestattet. Für die Narkoseeinleitung wurden die Tiere fixiert und ein venöser Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt. Über diesen wurde das Tier mit Thiopental 2,5 % (10mg/kg) (Trapanal Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland) sediert. Unmittelbar nach der Narkoseeinleitung wurde das Tier mit einem Tubus (Größe neun) intubiert und der Tubus geblockt, um eine Aspiration von Speichel oder regurgitiertem Pansensaft zu verhindern. Anschließend wurde eine Magenschlundsonde zur Vermeidung einer Pansentympanie und zum kontrollierten Abfluss des Pansensafts gelegt. Zur Narkoseerhaltung wurde das Tier anschließend an die Beatmungsmaschine angeschlossen. Die Beatmung erfolgte mit einem Isofluran 2,0%-Lachgas 60%-Sauerstoff 40%-Gemisch (Isofluran Ciramed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland). 20 Minuten vor dem ersten Eingriff am Knochen erhielt das Tier den ersten Fentanylbolus (0,25mg/75kg) zur Analgesie und parallel zur Inhalationsnarkose alle 30 Minuten einen weiteren Bolus (Fentanyl-Janssen®, Janssen GmbH, Neuss, Deutschland). Zusätzlich erhielt das Tier während der Operationsvorbereitung ein 75µg-Fentanylpflaster 1-2µg/kg/h (Durogesic 75µg/h, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) auf die geschorene Haut der rechten Vorderextremität sowie eine präoperative intravenöse Single-Shot-Antibiose mit Sulbactam-Natrium und Ampicillin-Natrium (Unacid 3g Pulver in 100 ml NaCl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland). Anschließend folgte eine perioperative Dauertropfinfusion mit einer isotonen Kochsalzlösung (Sterofundin ISO Infusionslösung, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland). Die perioperative Überwachung der Kreislaufsituation erfolgte während der Narkose durch Beurteilung von Pulsfrequenz, Pulsqualität sowie der Sauerstoffsättigung mittels eines Pulsoxymeters.

3.3.2 Operationstechnik, Setzung des Defekts und des Implantats

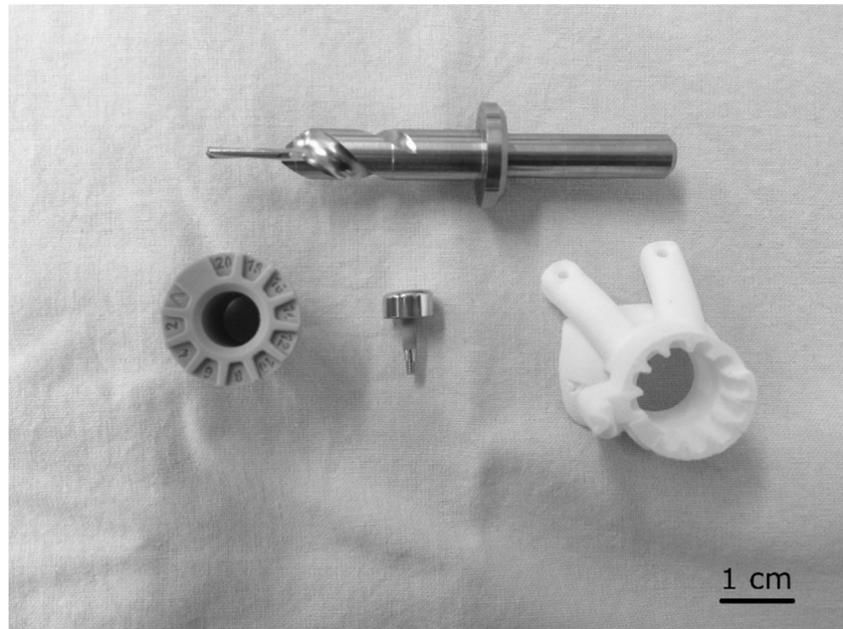


Abbildung 2: Instrumentarium, oben: Bohrkopf; unten von links nach rechts: Sockel für die Bohrtiefe, Implantat (Episealer[®]) und Schablone für die mediale Kondyle



Abbildung 3: Instrumentarium von oben nach unten: Stößel, Implantatattrappe und Knorpelschneider

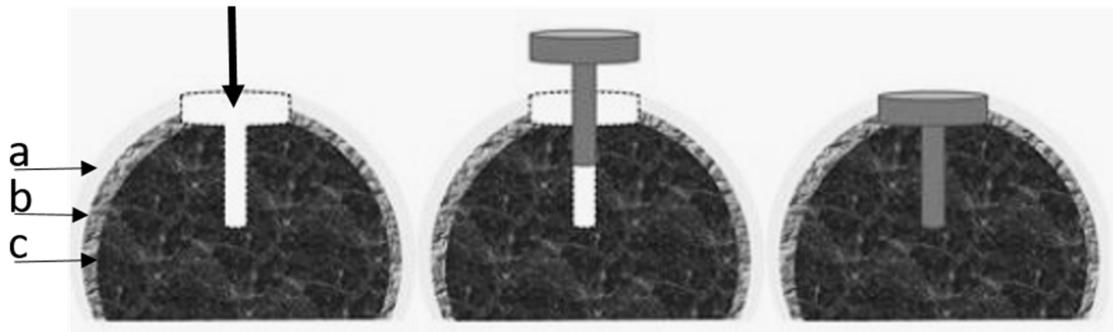


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte. In das vorgebohrte Implantatlager wird nach Prüfung mittels Implantatattrappe das metallische Implantat eingesetzt. Gelenkknorpel (a) mit subchondraler Lamelle (b) und spongiöser Knochen (c), Bewegungsrichtung= schwarzer Pfeil, Implantatlager= weiß, Implantat= hellgrau

Nach der Fixation in Rückenlage wurde die rechte Hinterextremität geschoren und die Haut mit Seifenlösung gereinigt. Die rechte Hintergliedmaße wurde mit einer Jodlösung (Braunol, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Das Tier wurde bis auf das OP-Feld mit sterilen Tüchern und die Klauen mit Handschuhen abgedeckt. Über einen parapatellaren Zugang wurde nach sorgfältiger schichtweiser Freipräparation die Patella nach lateral luxiert. Für die Defektsetzung und anschließende Implantation des Implantats wurde das Instrumentarium (Abb. 2 und 3) durch die Firma Episurf Medical® eigens hergestellt. Um den Defekt in einem Durchmesser von 7,3 mm zu setzen, wurde im lasttragenden zentralen Bereich der medialen Femurkondyle eine Schablone (Abb. 6) mit Kirschner- Draht medial und lateral fixiert. Diese diente als Führung für die nachfolgenden Arbeitsschritte (Abb. 4). Ihre Kontur war der natürlichen Wölbung der medialen Femurkondyle nachempfunden. Dadurch wurde einer Dislokation des scharfen Knorpelschneiders (Abb. 3) beim Einschneiden des Knorpels und des Bohrkopfes während des Bohrvorgangs entgegengewirkt. Für die Bohrung des ossären Implantatlagers wurde zusätzlich ein Sockel für die Bohrtiefe aufgesetzt. Zuerst wurde ein 13 mm tiefes und 1,8 mm durchmessendes Loch senkrecht in die Tiefe gebohrt. Dieses diente als Führung für das 3mm tiefe ossäre Implantatlager. Während des gesamten Bohrvorgangs und auch danach wurde der Defektbereich mit einer sterilen Kochsalzlösung umspült. Nach der Bohrung wurde durch Testung mit der Implantatattrappe (Abb. 3) die optimale Passform überprüft. Des Weiteren wurde mit einem sterilen Stift die optimale Lage des Implantats punktuell auf der Femurkondyle markiert (Abb. 5 B, Pfeil). Die Schablone wurde entfernt und das Implantat über eine Verankerungstechnik (Press-Fit-Verfahren) in das Implantatlager eingepasst (Abb. 5 B). Abschließend wurde die Operationswunde schichtweise verschlossen. Als zusätzliche Analgesie wurde den Tieren ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (Finadyne,

MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) postoperativ entsprechend ihres Gewichts (2,2ml/50 kg) subkutan injiziert.

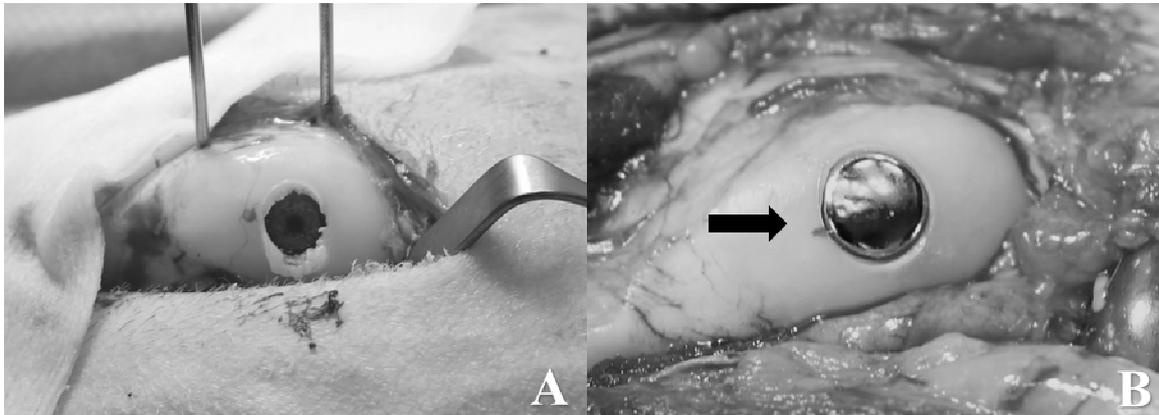


Abbildung 5: Ansicht intraoperativ auf die mediale Femurkondyle der rechten Hinterextremität. A: Implantatlager nach Bohrung; B: Implantat in der medialen Femurkondyle, Pfeil: hellgrauer Punkt (schwarzer Pfeil) dient als Justierhilfe für die Platzierung des Implantats

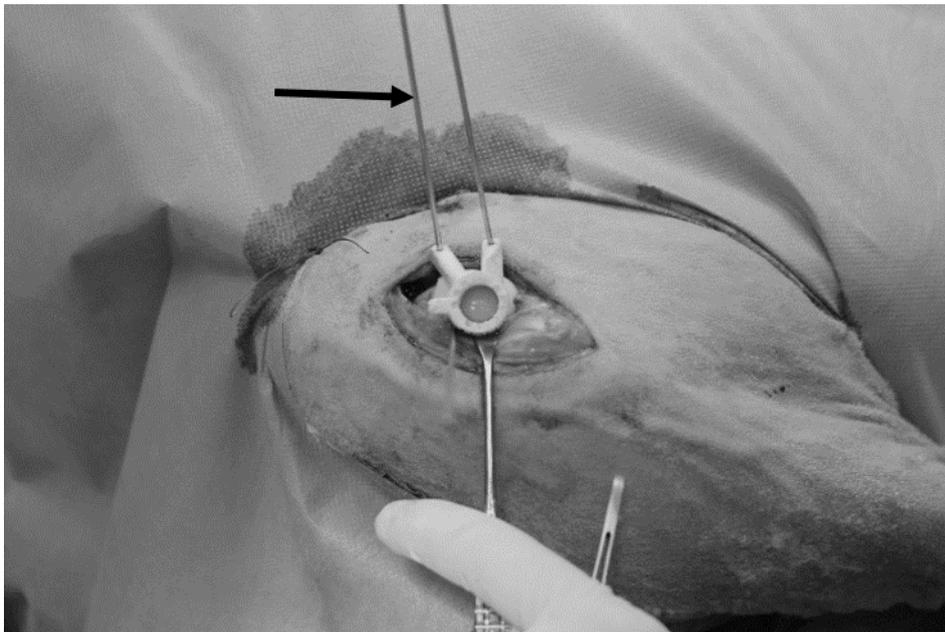


Abbildung 6: Ansicht intraoperativ auf die eröffnete rechte Hinterextremität und Zugang parapatellar. Vorbereitung der Bohrung mit Hilfe der mit Kirschner-Drähten (Pfeil) fixierten Schablone.

Die Operationen verliefen komplikationslos und die durchschnittliche Operationszeit betrug 60 Minuten. Durch die Platzierung der Schablone erfolgte die Implantation auf der medialen Femurkondyle bei allen Tieren identisch. In manchen Fällen der Gruppe 2 fehlte produktionsbedingt die Implantationsmarkierung auf der Implantatkappe. In diesen Fällen wurde die optimale Implantationsrichtung anhand der Gelenkkurvatur bestimmt.

3.3.3 Postoperatives Vorgehen

Die Tiere zeigten eine geringe Lahmheit in die ersten 3 Tage nach der Operation. Täglich wurden die Tiere aspektorisch auf ihren Gesundheitszustand hin überprüft. Dabei wurde besonders auf eine ungestörte Futteraufnahme, Belastung der Gliedmaßen und Anzeichen von Schmerzen geachtet. Die Tiere erhielten des Weiteren für 7 Tage ein Antiphlogistikum (2,2ml/50 kg Finadyne, Finadyne, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) zur Analgesie subkutan injiziert. Am 10 Tag post OP erfolgte das Ziehen der Fäden. Bei allen Tieren verlief der Heilungsprozess ohne Komplikationen, bis auf ein Tier aus der Gruppe 3. Dieses Tier zeigte eine progressiv bestehende Lahmheit, die weder auf eine antibiotische noch antiphlogistische Therapie ansprach. Aufgrund der anhaltenden schweren Lahmheit wurde dieses Tier 4 Wochen post OP euthanasiert und aus der Studie ausgeschlossen. Die Tiere haben die Sommermonate auf der Weide verbracht.

3.3.4 Euthanasie

Drei Monate nach der Operation wurden die Tiere schmerzlos und stressarm getötet. Die Tiere wurden durch intravenöse Applikation von Thiopental (2,5g) (Trapanal, Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg im Breisgau, Deutschland) in tiefe Narkose versetzt und mit Kaliumchlorid (100 ml, 1M Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) getötet. Der Tod wurde durch Auskultation des Herzens sichergestellt. Die rechte Hintergliedmaße wurde präpariert.

3.4 Probengewinnung und Aufbereitung

Die erste makroskopische Inspektion der medialen Femurkondyle wurde vor Eröffnung des Gelenkes durchgeführt. Hierbei wurde auf Auffälligkeiten (Entzündungszeichen und Dehiszenz) im Kniegelenk, insbesondere im Bereich des chirurgischen Eingriffs, geachtet.

3.4.1 Klinische und radiologische Untersuchung

Nach sorgfältiger Präparation der Weichteilgewebe vom Knochen wurde das Kniegelenk der rechten Hintergliedmaße eröffnet. Es folgte eine makroskopische Inspektion und standardisierte fotografische Dokumentation der Femurkondylen und Tibiakondylen *in situ*. Anhand der angefertigten digitalen Fotoaufnahmen wurde jeweils zentral und peripher des Implantats das Ausmaß der Implantat-Integration mit Hilfe eines Bewertungsbogens bewertet. Vor der histologischen Untersuchung wurden die entnommenen Proben mittels eines Mikrofokusröntgengerätes (Faxitron Cabinet X-Ray: Faxitron Bioptics, LLC, Tucson, Arizona USA) auf feinzeichnendem Röntgenfilm (Kodak Xomat, Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland) in 2 Ebenen (latero/lateral und anterior/posterior) sowie 2 Belichtungsstärken (Knochenaufnahme 35kV/50mAs und Knorpelaufnahme 15kV/0,5mAs) abgebildet (Abb. 7). Diese Röntgenuntersuchung wurde durchgeführt, um ausreichend integrierte Implantate (direkter Kontakt zum umliegenden ossären und hyalinen Gewebe) von unzureichend integrierten Implantaten (Aufhellung im Bereich des Implantats) zu unterscheiden

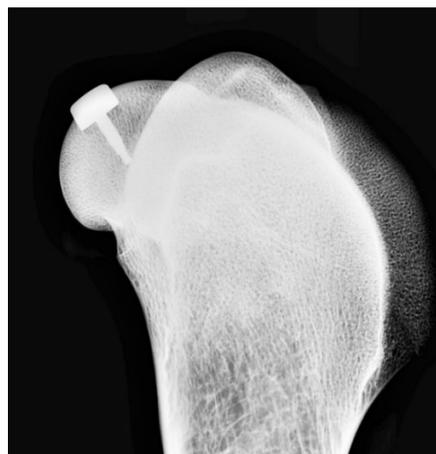


Abbildung 7: Röntgenaufnahme rechte Femurkondylen, mediale Kondyle implantattragend, latero/laterale Knochenaufnahme, Belichtung 35 mAS und 50kV, 2-fache Vergrößerung

3.4.2 Sägen

Als Säge wurde ein Trennschleifsystem (Makro-Trennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH & CO.KG, Norderstedt, Deutschland) mit einem 0,2 mm dicken Sägeband verwendet. Zuerst wurde der distale Femurschaft in eine Zwinge eingespannt und die mediale Femurkondyle senkrecht zum Sägeband ausgerichtet. Das Implantat wurde dezentral durchgesägt, um zwei Probenhälften zu erhalten (Abb. 8 und 9), welche im Anschluss fotografisch dokumentiert wurden. Aufgrund der aufwendigen Probenaufarbeitung der Dünnschliffpräparate gelangten die größeren Probenhälften in die Polymethylmethacryleinbettung (PMMA) und die kleineren Probenhälften in die Paraffineinbettung (Abb. 9).

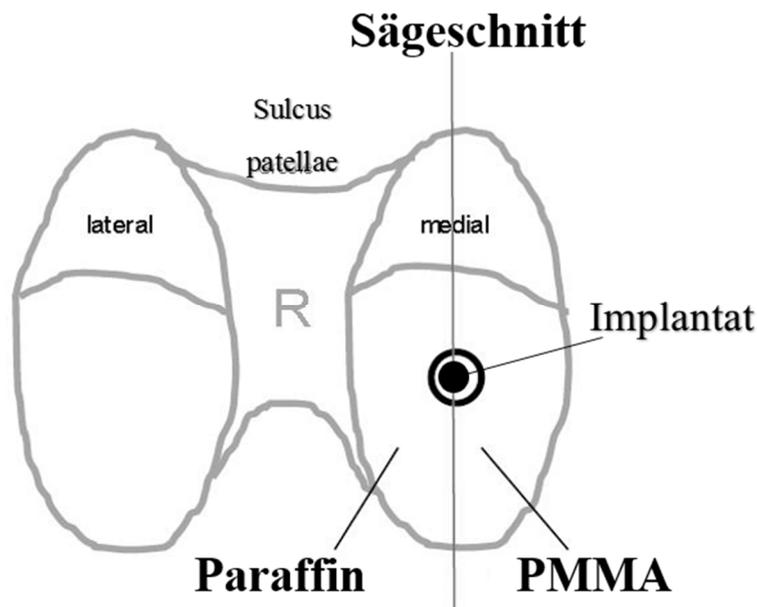


Abbildung 8: Skizze des Sägeschnitts in einer dezentralen Schnittführung durch das Implantat der rechten Femurkondyle. Der mediale Teil der medialen Kondyle (PMMA-Einbettung) umfasst einen Teil der medialen Kondyle und zwei Drittel des Implantats + Pin (schwarzer Kreis) der das Implantat im Knochen verankert. Der laterale Teil (Paraffin-Einbettung) umfasst die mediale Kondyle und etwa ein Drittel des Implantats, das hier nur noch aus der Kappe besteht.

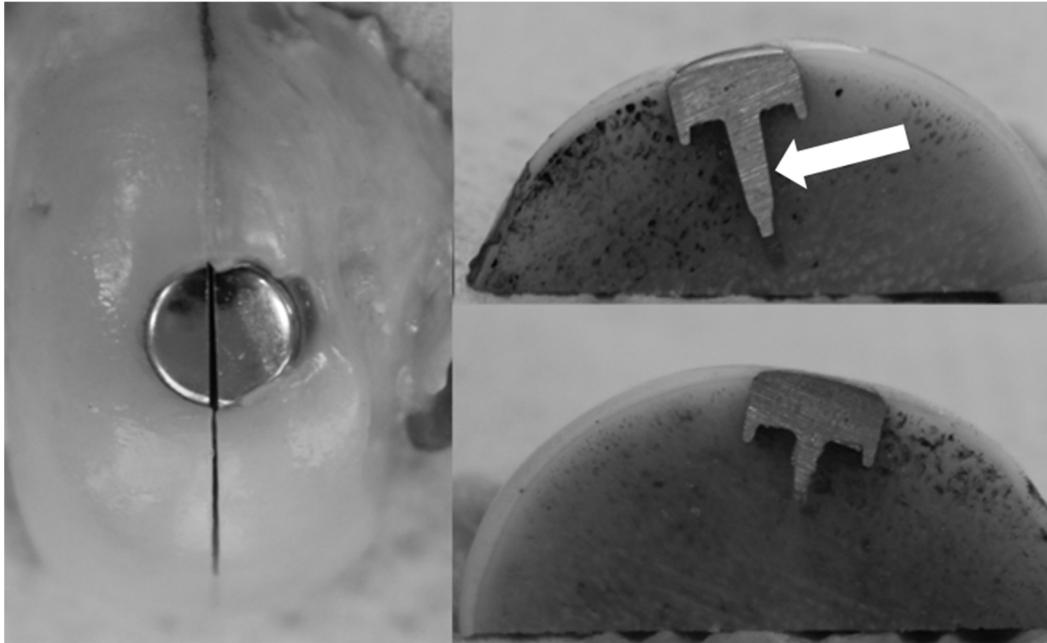


Abbildung 9: Links: Darstellung des dezentralen Sägeschnitts durch Implantat und mediale Kondyle. Identisch zur Skizze des Sägeschnitts in Abb. 16 enthält der Teil für die PMMA-Einbettung etwa zwei Drittel des Implantats, der für die Paraffin-Einbettung etwa ein Drittel des Implantats. Rechts: Aufsicht auf die Schnittflächen der Kondyle. Oben wiederum der PMMA-Teil mit dargestelltem Pin (Pfeil), unten der Paraffin-Teil, der nur die Implantatkappe enthält. Die schwarzen Verfärbungen des Knochens unter dem Implantat sind Metallabrieb, der beim Sägen des Metallimplantates trotz ständiger Wasserspülung entstanden ist. Er wird im Rahmen der weiteren histologischen Verarbeitungen ausgewaschen.

3.5 Präparate Herstellung

Nach der fünftägigen Fixierung in gepufferter Fixierlösung, bestehend aus 36%igem Formaldehyd, 100%igem Ethylalkohol, Barbitol-Natrium-Puffer (pH 7,4) und Glucose wurden nach gründlichem Spülen unter laufendem Leitungswasser die Probenhälften voneinander getrennt weiterverarbeitet.

3.5.1 Dünnschliffpräparate

Die Herstellung der Präparate erfolgte in Anlehnung an die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath (Donath 1988). Diese Methode erlaubt eine Herstellung dünner Schliffe zwischen 10 und 20 μm von nichtschneidbarem Gewebe wie Implantatwerkstoffen (z.B. Stahl oder Keramik). Für die Kunststoffeinbettung folgte nach dem Fixierbad die Entwässerung für sieben Tage in 70%igem Alkohol, sowie die jeweils zwei Mal durchgeführte siebentägige Lagerung in 80%igem und 96%igem Alkohol. Danach wurden die Präparate drei Mal für jeweils sieben Tage in 100%igem Alkohol entwässert und entfettet. Im Abschluss wurden die Proben in 100%igem Xylol für 12 Stunden nochmals entfettet. Nach der Entfettung folgte die Infiltration der Proben in 250 ml flüssigem lichthärtendem Kunststoff auf Methacrylatbasis (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) für einen Zeitraum von 4 Wochen, mit einem Lösungswechsel von Technovit 7200 nach 14 Tagen. Die Probengefäße (Glasgefäß mit Kunststoffdeckel mit max. Inhalt von 400 ml) wurden während der gesamten Infiltrationsphase mit Aluminiumfolie abgedeckt, um eine Reaktion mit dem Umgebungslicht zu vermeiden. Die Polymerisation der Proben erfolgte im Photopolymerisationsgerät (Exakt-Lichtpolymerisationsgerät, Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) für vier Stunden unter gelbem und vier Stunden unter blauem Licht. Die so vorbereiteten Präparate wurden auf einem Schleifteller getrimmt, um sie möglichst planparallel mit einem 3-Komponenten-Kleber (Technovit 4000, Kulzer, Wehrheim, Deutschland) auf einem Objektträger mit einer Vakuumklebepresse (Vakuumklebepresse 40, Exakt Apparatebau GmbH & CO.KG, 22851 Norderstedt, Deutschland) zu fixieren. Im nächsten Arbeitsschritt wurde ein zweiter Objektträger mit einem Präzisionskleber (Technovit 7210 VLC, Kulzer, Wehrheim, Deutschland) mit Hilfe einer Präzisionsklebepresse (Präzisionsklebepresse 402, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) unter Vakuum und ultraviolettem Licht an der Oberseite des Präparates fixiert. Das entstandene Probensandwich wurde in das Trennschleifsystem (Makro-Trennschleifensystem, Exakt Apparatebau GmbH & CO.KG, Norderstedt, Deutschland) eingespannt und in sagittaler Schnittrichtung Scheiben einer Dicken

von 200 bis 400 µm hergestellt. Im Anschluss wurden die Proben auf die gewünschte Dicke von unter 100 µm planparallel mit einem Mikroschleifgerät (Mikroschleifgerät 400 CS, Exakt Apparatebau GmbH & CO.KG, Norderstedt, Deutschland) und Nassschleifpapier in aufsteigender Körnung (Fa. PSI-Grünwald-Exakt; Laudenbach; Deutschland Körnung P 800 – P 2500) angeschliffen, bis der gewünschte Dicke des Präparates erreicht war). Das mehrstufige Polieren mit feinem Schleifpapier (P 4000) bildete den Abschluss.

3.5.2 Paraffinschnitte

Die Proben für die Paraffineinbettung wurden in einem Zeitraum von 3 Monaten in einer 5%igen Entkalkungslösung (Ethylendiamin-Tetraacetat-Lösung, EDTA Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) bei 37°C im Wärmeschrank entkalkt. Die EDTA-Lösung wurde während des gesamten Zeitraumes jeden dritten Tag gewechselt. Nach Abschluss der Entkalkung wurden die Präparate für eine halbe Stunde unter fließendem Wasser gespült. Anschließend wurden sie im Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Leica Instruments GmbH, Nußloch, Deutschland) mehrstufig in 70%, 80%, 96%, 100%- igem Alkohol entwässert, in ein Übergangsmedium Xylol verbracht und in flüssiges Paraffin (Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical CO., St.Louis, MO, USA) eingebettet. Die gekühlten Paraffinproben wurden mit einem Rotations-Mikrotom (Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) mit einem Einweg- Mikrotom- Messer (Feather, Japan) in eine Dicke von 6 µm geschnitten. Diese Gewebeschnitte wurden in einem 20 °C warmen Wasserbad geglättet. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger (SupeRior Marienfeld, Deutschland) aufgezogen und danach für einen Tag im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.5.3 Färbungen

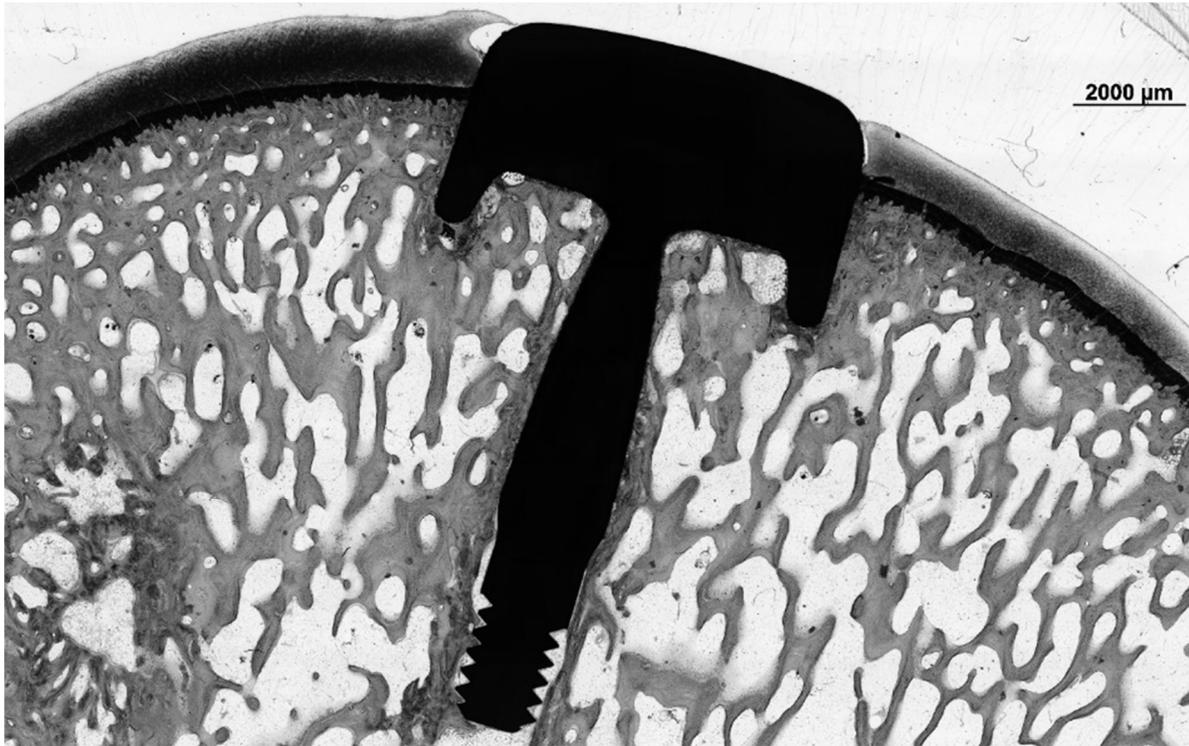


Abbildung 10: Dünnschliffpräparat mediale Femurkondyle, gefärbt nach Giemsa, hyaliner und kalzifizierter Knorpel: violett, Knochenbälkchen: rosa, Implantat: schwarz

3.5.3.1 Giemsa

Die Dünnschliffpräparate wurden mit einer Übersichtsfärbung nach Giemsa (3%ige Lösung aus der Stammlösung, mit 1-2 Tropfen 1%- ige Essigsäure versetzt, Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt (Abb. 10). Die Oberfläche der Dünnschliffpräparate wurde mit 0,25% Ameisensäure (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zwei Minuten lang angeätzt und unter Leitungswasser für fünf Minuten abgespült. Nach zwei Minuten in Aquadest wurde die auf Raumtemperatur vorgewärmte Farblösung für 30 Minuten auf die Präparate aufgeträufelt. Die Schriffe wurden kurz in 100%igen Ethanol (Art.-Nr. 1.00983; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht und unter mikroskopischer Kontrolle differenziert. Für eine stärkere Farbintensität wurde der Vorgang wiederholt. Bei geeigneter Farbintensität wurden zum Abschluss die Proben zweimal für zwei Minuten in Xylol gespült und danach mit Technovit 7200 VLC (Art.-Nr. 5100; Fa. PSI/Grünwald, Laudenbach) abgedeckt. Die Knorpelmatrix erschien violett, mineralisierte Matrix färbte sich rosa und Osteoid zartrosa. Entsprechend wirkte der Knorpel an der Oberfläche eher hellviolett mit Übergang in ein Tiefviolett im Bereich der Radiärzone (siehe Abb. 10).

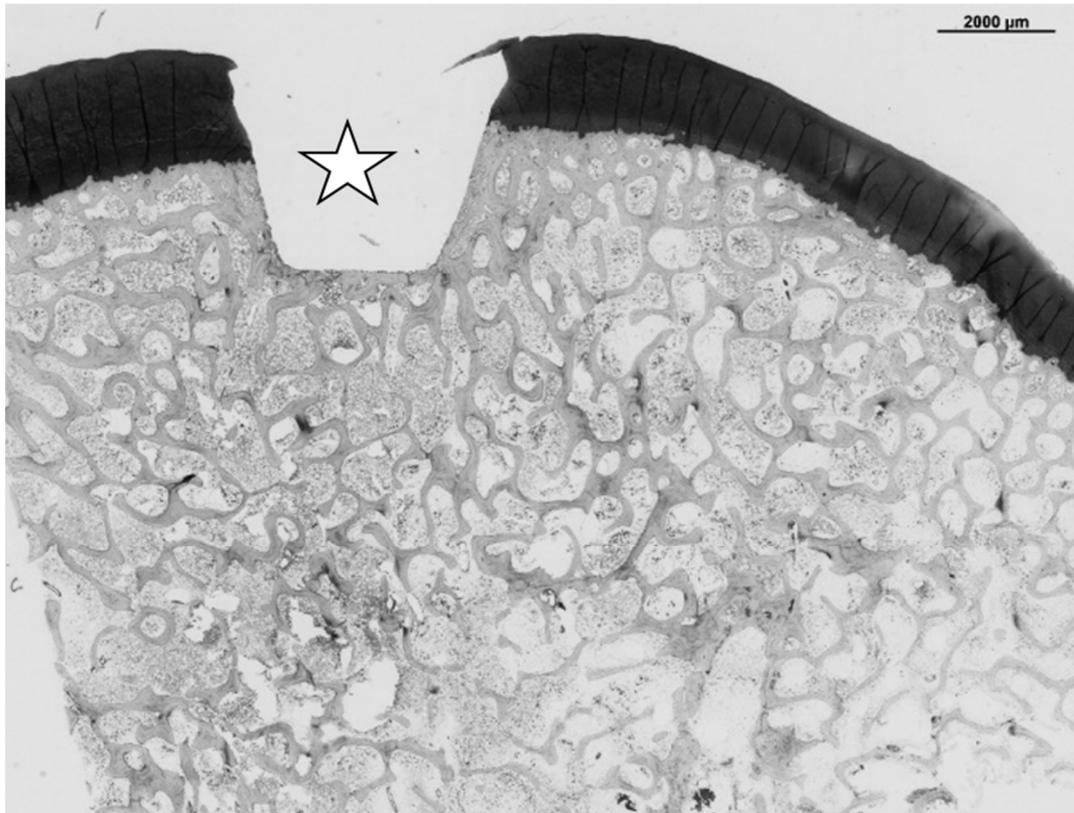


Abbildung 11: Paraffinpräparat mediale Femurkondyle, das Implantat wurde während der Präparatherstellung herausgelöst (Stern), Färbung: Toluidinblau, hyaliner Knorpel: blau-violett, mineralisierter Knochen: hellblau, Aufnahme in 2,5-facher Vergrößerung

3.5.3.2 Toluidinblau

Zur Übersichtsfärbung für die Schnittpräparate wurde Toluidinblau gewählt (Abb.11). Toluidin bindet sich an saure Glykosaminoglykane, wie sie in der Matrix von hyalinem Knorpel zu finden sind (Thomas 2006). Die Intensität der Färbung ist in einem gewissen Maße proportional zur Konzentration der sauren Glykosaminoglykane. Somit erlaubt die Färbung Rückschlüsse auf die Qualität der hyalinen Knorpelmatrix (Abb. 11). Auch in anderen Studien wurde diese Färbung zur Darstellung der Kontaktfläche zwischen Implantat und umliegenden Gewebe genutzt (Koch et al. 2010; Hoffmann et al. 2008). Die Paraffinschnitte wurden 2-mal für 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%,96%,80%,70% Ethanol) rehydriert. Die Präparate wurden anschließend in ein Färbepad mit Toluidinblau für 10 min

getaucht. Um die Reaktion zu beenden wurden die Präparate kurz in Aquadest getaucht und durch vorsichtiges Schwenken in Ethanol unter mikroskopischer Kontrolle differenziert.

Wenn die Farbintensität des Gewebes dem Färbeergebnis (Zellen/Weichteil: unterschiedliche Blaufärbungen, Knorpelmatrix rotviolett, Knochen: blassrosa) entsprach, folgte ein 2- mal 2- minütiges Bad in 100%ig Ethanol. Zum Abschluss wurden die gefärbten Präparate in Xylol getaucht und mit Vitroclud (Fa. R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

3.5.4 Immunhistochemie

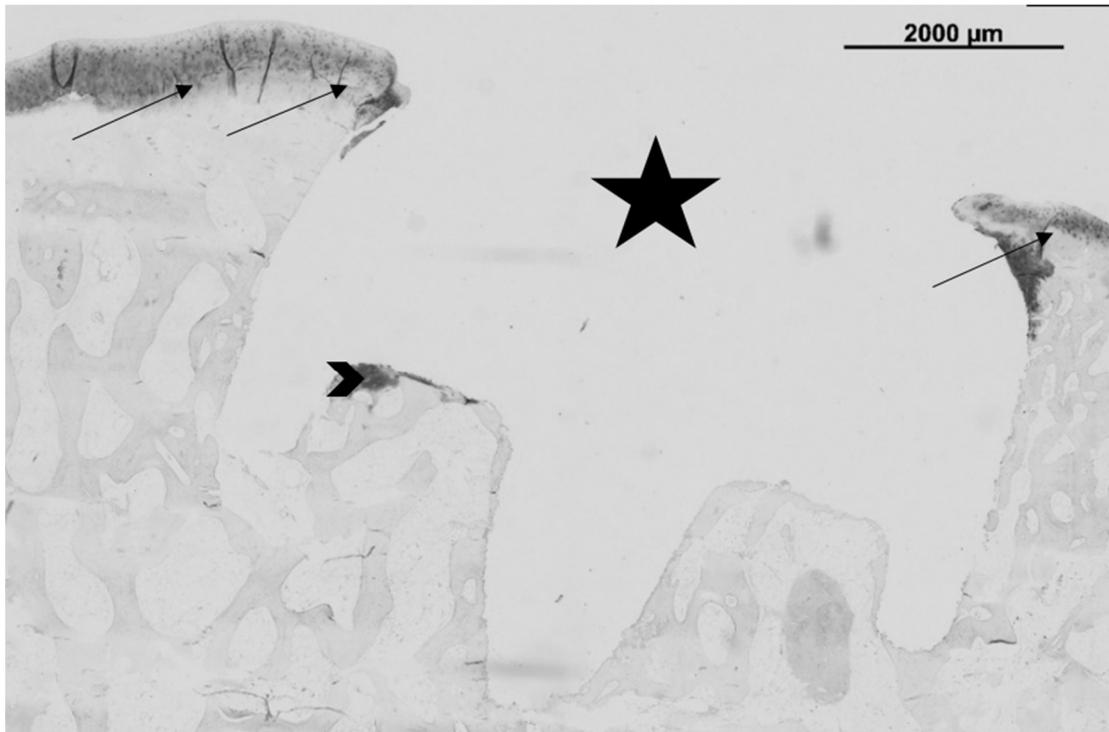


Abbildung 12: Paraffinpräparat mit herausgelöstem Implantat (Stern), immunhistologische Markierung mit α -Kollagen-II. Das mit α -Kollagen-II markiertes Gewebe stellt sich in der immunhistochemischen Nachweis rot dar. In diesem Präparat ist eine erhöhte Konzentration an Kollagen II im hyalinen Knorpel (Pfeil) und im unteren Kappenbereich (Pfeilspitze) markiert. Der Knochen stellt sich in diesem Nachweisverfahren blass-rosa dar.

Die immunhistochemische Markierung erfolgte mittels Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC), welches einen biotinylierten Zweitantikörper benötigt. Für diese Methode wurden das equine Normalserum (Blockierungsserum vom Pferd), ein biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG), sowie ABC-Komplex (hochgereinigtes Avidin und alkalische Phosphatase) verwendet. Die Färbung ermöglicht durch eine hochspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion Kollagen II nachzuweisen, um die Qualität des Gelenkknorpels bewerten zu können (Abb. 12).

Es wurden ABC-Elite-Kits (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) mit folgenden Gebrauchslösungen verwendet:

- equines Normalserum (1 Tropfen auf 5 ml Phosphatpuffer, Verdünnung 1:100, Horse Serum Biozol Diagnostica, Hauptstraße 10b, 85386 Eching, Deutschland)
- biotinylierter Sekundärantikörper (2 Tropfen Normalserum und biotinylierter AK auf 5 ml Phosphatpuffer, Biotinylated Anti-Mouse IgG; Biotinylates Anti-Mouse IgG, BA-2001, Verdünnung 1:100 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)
- ABC-Komplex in Tropfflaschen (1 Tropfen Reagenz A und B auf 5ml Phosphatpuffer, Vectastain ABC AP Kit AK 5000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

Wenn in den folgenden Abschnitten von Normalserum, Primärantikörper, Sekundärantikörper und ABC-Komplex gesprochen wird, handelt es sich um diese Ansätze.

Durchführung:

Reihenfolge der Reagenzien- Applikation:

- Primärantikörper α -Mouse-Collagen II im Verhältnis 1:50 (Quartett Immunodiagnostika, Biotechnologie + Kosmetik Vertriebs GmbH, 12307 Berlin, Deutschland)
- Avidin-Biotin-Enzymkomplex Substratlösung; ABC-AP-KIT von Vector (Vectastain Elite ABC-Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH; 97877 Wertheim, Deutschland)
- Alkalische Phosphatase (Vector®Red Alkaline Phosphatase Substrat, Vektor Laboratories, Inc. Burlingame, CA94010, USA)

Die Paraffinschnitte wurden 2-mal für 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 80%, 70%) für jeweils 2 min rehydriert. Im Anschluss erfolgte eine Spülung mit einem Phosphatpuffer (pH: 7,5) für 5 min. Danach wurden die Präparate waagrecht in eine feuchte Kammer gelegt. Nun folgte die Demaskierung des Antigens mit 0,02% Hyaluronidase für 2 Stunden und mit 0,1% Pepsin in 0,01 N HCL bei 37°C für 30 min. Erneut wurden die Präparate mit Aquadest und Phosphatpuffer gespült und der Flüssigkeitsüberstand auf dem Objektträger verworfen. Es schloss sich die Inkubation mit dem Normalserum für 30 min bei Raumtemperatur an, um unspezifische Bindungen zwischen hydrophoben Gewebeproteinen und dem Antikörper zu verhindern. Nach der Inkubation mit

dem Normalserum wurde der Primärantikörper zur immunhistochemischen Markierung aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde der Flüssigkeitsüberstand abgekippt und mit Phosphatpuffer für 5 min gespült. Die Präparate wurden mit ca. 150 µl Zweitantikörper für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte im Anschluss eine Spülung mit Phosphatpuffer für 2-mal für 5 min. Nach der Spülung wurden die Präparate mit dem ABC-Komplex, der zum Nachweis verwendet wurde, für 50 min inkubiert. Ein erneuter Spülvorgang mit PBS für 5 min und Chromogenen Puffer für 2 x 5min schlossen sich an. Danach wurden die Präparate letztmalig in einem AP-Substrat für 10-25 min inkubiert. Als letzter Schritt folgte die Kern-Gegenfärbung mit Methylgrün für 5 min und das Eindeckeln mit Vitroclud (Art.-Nr. 5100; Fa. PSI/Grünwald, Laudenbach, Deutschland). Zur Differenzierung einer nicht spezifischen Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Bindungsstellen wurden in jeder Versuchsreihe Negativkontrollen mit Phosphatpuffer (pH: 7,5) statt mit Primärantikörper bei sonst gleichen Arbeitsabläufen inkubiert.

3.6 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte zunächst makroskopisch. Es wurden Makroaufnahmen von der medialen Femurkondyle und den Tibiakondylen *in situ* angefertigt. Mit Hilfe eines modifizierten semiquantitativen Auswertungsbogens (Score-Sheets) wurde die Implantatintegration beurteilt. Für die makroskopische Begutachtung wurde ein Bewertungssystem (Clinical Cartilage Injury Evaluation) der International Cartilage Repair Society (Brittberg und et. al 2000) herangezogen.

Die Bewertung der Dünnschliffpräparate erfolgte deskriptiv, histomorphometrisch und semiquantitativ. Für die semiquantitative Auswertung wurde ein modifiziertes Score System nach O'Driscoll et. al. (1988) und ein Score System nach ICRS-Visual Histological Richtlinien (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003) herangezogen. Des Weiteren wurde für die histomorphometrische Bildanalyse ein Programm (Makro) konstruiert, welches die Gewebekontaktflächen zum Implantat misst und berechnet. Die Auswertung der Paraffinschnitte erfolgte ausschließlich deskriptiv. Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte semiquantitativ in Anlehnung an Rudert (Rudert 2000).

3.6.1 ICRS-Klassifikation

Die „ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation“ ist ein Bewertungssystem, das im Jahr 2000 von den Teilnehmern anlässlich eines Workshops im Schloss Münchenwiler in der Schweiz diskutiert und entwickelt worden ist (Brittberg, Chairman Mats et al. 2000). Der Score dient zur Klassifizierung von chondralen und osteochondralen Defekten nach einem chirurgischen Eingriff und Beurteilung der cartilaginären Reparaturmechanismen. Für die ICRS-Klassifizierung der Reparaturmechanismen werden 3 Parameter beurteilt: I.) Grad der Reparatur nach Operationstechnik, II.) Integration bis zur Grenzschicht und III.) makroskopisches Aussehen. Die höchste Punktzahl (4) des Bewertungssystems beschreibt ein dem hyalinen Knorpel entsprechendes Regenerationsgewebe nach erfolgter chirurgischer Intervention. Der niedrigste Wert liegt bei 0 und steht für keine Defektfüllung und abnormale Regeneration. Summiert man die Punkte, so könnte eine maximale Gesamtpunktzahl von 12 Punkten erreicht werden. Für die Einzelparameter sind die Kriterien für die Beurteilung in Abbildung 13 dargestellt.

CARTILAGE REPAIR ASSESSMENT

Criteria	Points		
Degree of Defect Repair I Protocol A ⁽¹⁾	* In level with surrounding cartilage	4	
	* 75% repair of defect depth	3	
	* 50% repair of defect depth	2	
	* 25% repair of defect depth	1	
	* 0% repair of defect depth	0	
I Protocol B ⁽²⁾	* 100% survival of initially grafted surface	4	
	* 75% survival of initially grafted surface	3	
	* 50% survival of initially grafted surface	2	
	* 25% survival of initially grafted surface	1	
	* 0% (plugs are lost or broken)	0	
II Integration to Border zone	* Complete integration with surrounding cartilage	4	
	* Demarcating border < 1mm	3	
	* 3/4 of graft integrated, 1/4 with a notable border >1mm width	2	
	* 1/2 of graft integrated with surrounding cartilage, 1/2 with a notable border > 1mm	1	
	* From no contact to 1/4 of graft integrated with surrounding cartilage	0	
III Macroscopic Appearance	* Intact smooth surface	4	
	* Fibrillated surface	3	
	* Small, scattered fissures or cracs	2	
	* Several, small or few but large fissures	1	
	* Total degeneration of grafted area	0	
Overall Repair Assessment	Grade I	normal	12 P
	Grade II	nearly normal	11-8 P
	Grade III	abnormal	7-4 P
	Grade IV	severely abnormal	3-1 P

Cartilage Blospy

Location _____

(1) Protocol A:	(2) Protocol B:
autologous chondrocyte implantation (ACI); periosteal or perichondrial transplantation; subchondral drilling; microfracturing; carbon fibre implants; others:	Mosaicplasty; OAT; osteochondral allografts; others:

Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Original-Bewertungsbogen des ICRS Score nach (Brittberg et. al 2000). Für die Bewertung der Reparaturmechanismen werden 3 Parameter visuell beurteilt: I) Grad der Reparatur nach Protokoll A oder B. II) Integration bis zur Grenzschicht und III.) makroskopisches Aussehen. Die höchste Punktzahl (4) des Bewertungssystems steht für ein dem hyalinen Knorpel entsprechendes Regenerationsgewebe nach erfolgter chirurgischer Intervention. Der niedrigste Wert liegt bei 0 und steht für keine Defektfüllung und abnormale Regeneration. Summiert man die Punkte, so könnte eine maximale Gesamtpunktzahl von 12 Punkten erreicht werden

3.6.2 Makroskopische Auswertung

Nach Explantation und sorgfältiger Präparation des Weichteilgewebes vom Knochen, wurde das Kniegelenk der rechten Hintergliedmaße eröffnet. Es folgte eine makroskopische Inspektion und fotografische Dokumentation der Femur- und Tibiakondylen *in situ* (Abb. 22). Die Bewertung erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Bewertungsbogens in Anlehnung an das Clinical Cartilage Injury Evaluation System (Brittberg und et. al 2000). Dabei wurde das Kriterium (I) „Grad der Reparatur“ aus dem Score entfernt und durch den Parameter der Defekttiefe ersetzt (Brittberg und et. al 2000). Grund für diese Entscheidung war, dass es sich um ein palliatives Osteoarthroseimplantat handelt, welches den Defektbereich abdeckt. Eine Regeneration des osteochondralen Defekts wurde in dieser Studie nicht angestrebt. Die Kriterien II + III wurden 1:1 in den Score übernommen und für die visuelle Beurteilung des angrenzenden hyalinen Knorpels genutzt. Die mediale Femurkondyle wurde wie in dem ICRS-Bewertungssystem empfohlen, in 4 Sektionen eingeteilt und jeder Sektion anhand des Bewertungsbogens unabhängig von 2 Untersuchern beurteilt (Abb. 15). Die Bewertung konzentrierte sich auf die Lokalisation, der ICRS-Grad, die Integration und makroskopische Veränderungen des hyalinen Knorpels in 4 Sektoren (Abb. 14). Die Score Befunde wurden mittels Student-T-Test für unabhängige normalverteilte Daten statistisch ausgewertet (IBM SPSS Statistics 22) und als Mittelwert±Standardabweichung dargestellt. Somit konzentrierte sich die Bewertung auf folgende Parameter:

1. *Lokalisation des Implantats in der medialen Femurkondyle*
2. *ICRS-Grad des angrenzenden hyalinen Knorpels*
3. *Integration des Implantats*
4. *Makroskopische Veränderungen*

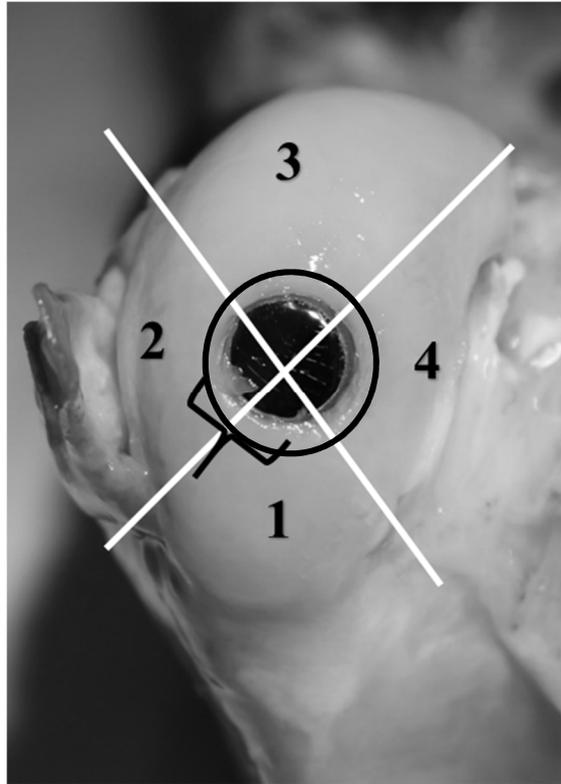


Abbildung 14: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder). Aufsicht frontal auf die Implantat tragende mediale Femurkondyle. Zu beachten ist hier die Fibrillation (schwarze Klammer) des hyalinen Knorpels vom 4. Sektor bis 2. Sektor und die Spaltbildung im Sektor 4. Die Zone innerhalb des roten Kreises beschreibt die Region central= 2mm um das Implantat. Alles was Außerhalb dieser Markierung liegt, beschreibt die periphere Zone=> 2mm um das Implantat.

Die Einteilung des ICRS-Grades erfolgte von **4 bis 0 Punkten**. Dabei lag bei der höchsten Punktzahl (4 Punkte) ein normaler hyaliner Knorpel und bei der niedrigsten Punktzahl (0 Punkte) eine Verletzung des Knorpels bis zur subchondralen Lamelle vor. In den Kriterien Integration und Makroskopie war die höchste Punktzahl 4 Punkte. Diese wurden bei einer sehr guten Integration und einer glatten Oberfläche des umliegend hyalinen Knorpels erreicht. Die niedrigste Punktzahl (0 Punkte) beschreibt keinen Kontakt zwischen Implantat und umgebendem hyalinen Knorpel, sowie eine Degeneration im Implantationsbereich.

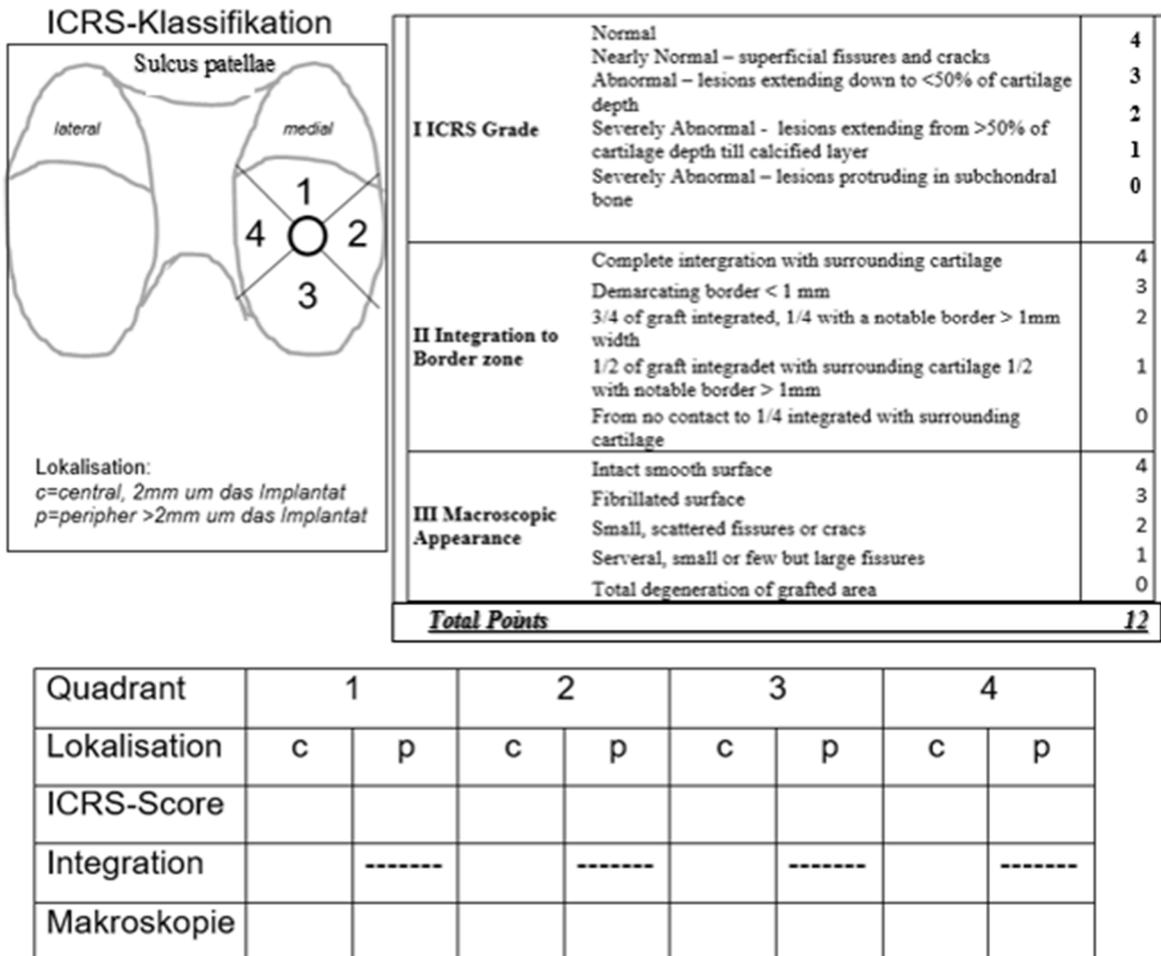


Abbildung 15: Modifizierter Bewertungsbogen in Anlehnung an die ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation (Brittberg et al.) zur makroskopischen Beurteilung der Präparate in der Sektion. rotes Rechteck: Schematischen Darstellung der Femurkondylen der rechten Hinterextremität und deren Einteilung in 4 Sektionen sowie die Einteilung der Region um das Implantat in central und peripher. Die Auswertung konzentrierte sich auf die Lokalisation des Implantats, der ICRS-Grad, die Integration und die makroskopische Veränderungen des hyalinen Knorpels. Die Höchstpunktzahl (4 Punkte) beschreibt ein sehr gute Intergration des metallischen Implantats in das angrenzenden Gewebe. Die niedrigste Punktzahl (0 Punkte) beschreibt eine schlechte Integration mit einer Degeneration des angrenzenden Gewebes.

3.6.3 Deskriptive Auswertung

Für die deskriptive Histologie wurden die nach Giemsa gefärbten Schliffpräparate unter dem Mikroskop durchgemustert und beurteilt (Abb. 16). Dabei wurde der Gesamteindruck analysiert und auf die Implantat Integrität, die Kontaktflächen (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen, Knochen) und Degenerationsanzeichen im Gewebe geachtet.

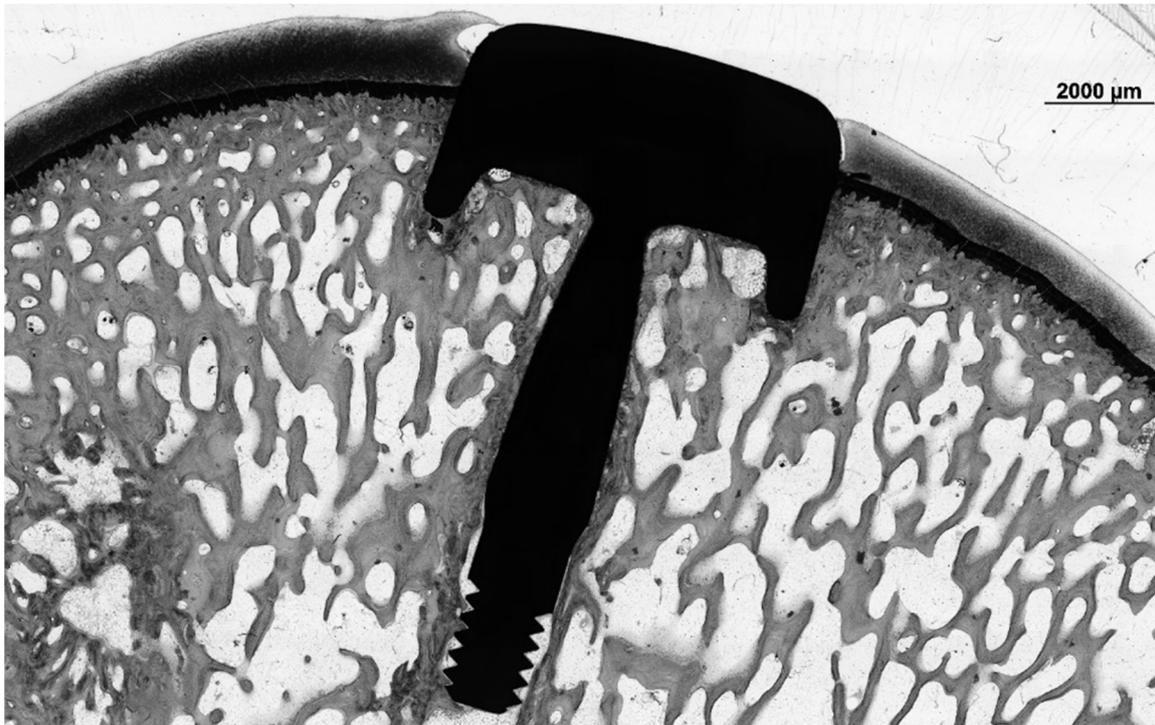


Abbildung 16: Überblick eines Schliffpräparats gefärbt nach Giemsa. Bildmitte: Implantat mit Pin, das unter dem Mikroskop aufgrund der Lichtundurchlässigkeit des Metalls schwarz erscheint. Im unteren Bereich des Pins ist das Gewinde sehr gut zu erkennen, welches aus produktionstechnischen Gründen für die Beschichtung notwendig ist, für die Verankerung des Implantates im Knochenlager aber keine Rolle spielt. Der spongiöse Knochen der Femurkondyle ist einheitlich rosa gefärbt, unterhalb des violett gefärbten hyalinen Knorpels komprimiert sich der spongiöse Knochen zur subchondralen Knochenlamelle. Zwischen diesem subchondralen Knochen und hyalinem Gelenkknorpel liegt der kalzifizierte Knorpel, hier dunkel-violett dargestellt. Der kalzifizierte Knorpel hat zum Knochen und Knorpel eine ungleichmäßige mäanderförmige Kontaktgrenze, wodurch die beiden Gewebetypen miteinander verbunden werden. Der hyaline Gelenkknorpel auf der rechten Seite des Bildes ist dünner und weniger farbintensiv als auf der gegenüberliegende linken Seite. Dies liegt daran, dass das Gelenk an dieser Stelle weniger Last trägt als links vom Implantat. Im Gelenk liegt die linke Seite anterior, die rechte Seite posterior. Maßstabsbalken=2000µm

3.6.4 *Histologische Auswertung*

Die histologische Auswertung der Dünnschliffpräparate erfolgte mittels semiquantitativem Score in Anlehnung an O'Driscoll (O'Driscoll et al. 1988) und dem Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003). Der von O'Driscoll (O'Driscoll et al. 1988) eingeführte Score wird häufig bei der histologischen Auswertung von Knorpelregeneraten verwendet (Rudert 2000; Wilms 2002). Er enthält eine Vielzahl von Beurteilungskriterien wie Zellmorphologie, Oberflächenbeschaffenheit, strukturelle Charakteristika, die Dicke des Knorpelregenerats und deren Bindung zum angrenzenden Knorpel sowie zelluläre Veränderungen als Anzeichen einer Degeneration. Die maximale Punktzahl von **24 Punkten** konnte bei einem sehr guten Einheilverhalten und Integration des Knorpelregenerats erreicht werden. Der Visual-Histological-Score ist ein Bewertungssystem, das 2002 vom „Histological End Point Committee“ infolge der Jahrestagung in Toronto präsentiert wurde (Brittberg und et. al 2000). Nach diesem Bewertungsschema werden sechs Parameter visuell beurteilt:

- I) *Knorpeloberfläche*
- II) *Knorpelmatrix*
- III) *Zellverteilung*
- IV) *Zellvitalität in der Population*
- V) *Subchondraler Knochen*
- VI) *Mineralisation*

Die detaillierte Bewertung und Punktevergabe ist in der Tabelle 2 ersichtlich. Es empfohlen die einzelnen Kriterien für sich stehen zu lassen. Summiert man diese, wird eine Gesamtpunktzahl von 13 Punkten erreicht, was für ein Regenerat ähnlich dem hyalinen Knorpel spricht.

Tabelle 2: Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003). Nach diesem Bewertungsschema werden sechs Parameter visuell beurteilt: I) Knorpeloberfläche, II) Knorpelmatrix, III) Zellverteilung, IV) Zellvitalität in der Population und V) subchondraler Knochen und VI) die Mineralisation. Wird eine Gesamtpunktzahl von 13 Punkten erreicht, entspricht das neu gebildete Regenerationsgewebe annähernd hyalinem Knorpel.

Morphologische Kriterien	Bewertung	Punkte
Oberfläche	glatt	1
	diskontinuierlich	0
Matrix	hyaline	4
	Mischung hyaliner/ Faserknorpel	3
	Faserknorpel	1
	Bindegewebe	0
Zellverteilung	Säulenartig	3
	Mischung Säule/Cluster	2
	Cluster	1
	unorganisiert	0
Zellvitalität	überwiegend vitale Zellen	2
	>10% vitale Zellen	1
	<10% vitale Zellen	0
Subchondraler Knochen	normal	2
	vermehrtes Remodeling	1
	Nekrose	0
Mineralisation des Knorpels	normal	1
	heterotroph	0
Gesamtpunktzahl		13

3.6.5 *Modifizierter Score für die histologische Auswertung*

Für diese Studie wurden einige Parameter vom Score nach O'Driscoll (O'Driscoll et al. 1988) und dem Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003) übernommen und zu einem gemeinsamen Bewertungsbogen zusammengefügt. Des Weiteren wurde der Parameter „Gesamteindruck“ hinzugefügt. Die Beurteilungskriterien sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Beurteilt wurden neben dem Gesamteindruck, die Implantatintegrität, die Qualität (Zellularität, Anfärbbarkeit und Zellverteilung) des umliegenden Gewebes, mit besonderem Hinblick auf die Vitalität des hyalinen Knorpels und die Kontaktflächen des Implantates zum umliegenden Gewebe (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen). Die Score-Tabelle besteht aus maximal 17 erreichbaren Punkten, wobei 17 die höchste und 0 Punkte die schlechteste zu erreichende Punktzahl war. Dabei hing die zu erreichende Punktzahl von dem Einheilverhalten des Implantats von den einzelnen Tieren ab. Auch hier wurden die Präparate unabhängig von 2 Untersuchern beurteilt

Tabelle 3: Modifizierter Score für die histologische Auswertung der nach Giemsa gefärbten Dünnschliffpräparaten in Anlehnung an Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003) und O'Driscoll et. al. (O'Driscoll et al. 1988). Beurteilt wurden neben dem Gesamteindruck, die Implantatintegrität, die Qualität (Zellularität, Anfärbbarkeit und Zellverteilung) des umliegenden Gewebes, mit besonderem Hinblick auf die Vitalität des hyalinen Knorpels und die Kontaktflächen des Implantates zum umliegenden Gewebe (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen)

Kriterien	Bewertung	Punkte
Gesamteindruck makroskopisch	ruhig	1
	unruhig	0
Implantat Integrität	normal	2
	leichte Unterbrechung, Zysten	1
	schwere Desintegration	0
Bindung an angrenzenden Knorpel	bindet an beiden Seiten des Ersatzes	2
	Bindet an einer Seite oder partiell an beiden Seiten	1
	Keine Bindung	0
Bindung an kalzifizierten Knorpel	Bindet an beiden Seiten des Ersatzes	2
	Bindet an einer Seite oder partiell an beiden Seite	1
	Keine Bindung	0
Zellverteilung	Säulenartig	3
	Mischung Säule/ Cluster	2
	Cluster	1
	unorganisiert	0
Subchondraler Knochen	normal	3
	vermehrtes Remodeling	2
	Nekrosen/ Granulationsgewebe	1
	Kallus	0
Implantat-Knochenkontakt	Anhaftung von Trabekeln \leq 350 μ m	1
	nicht vorhanden	0
Veränderungen im angrenzenden Knorpel	normale Zelldichte, keine Nester, normale Färbung	3
	normale Zelldichte, keine Nester, moderate Färbung	2
	geringe oder moderate Hypozellularität, leichte Färbung	1
	schwere Hypozellularität, schlechte oder keine Färbung	0
Total		17

3.6.6 Histomorphometrische Bildanalyse

Die Paraffinschnitte und Dünnschliffpräparate wurden mit einer hochauflösenden Kamera (Spiegelreflex-Digital-Kamera 56, Nikon D70 Digitalkamera, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) fotografiert und gespeichert. Die Auswertung der Dünnschliffpräparate in der Bildanalyse erfolgte mit einem Computer und einer speziellen Bildanalysesoftware. Es wurde eigens für diese Studie ein Programm (Makro) erstellt, womit die Gewebegrenzen gemessen und berechnet werden konnten, welche das Implantat umgaben. Folgende Gewebegrenzen (Abb.17) wurden wie folgt definiert:

- mineralisierten Knochen: blaue Linie
- hyaliner Knorpel: grüne Linie
- mineralisierter Knorpel: rote Linie
- keine Kontaktfläche: gelbe Linie
- Bindegewebe: violette Linie

3.6.6.1 Messung

Die Region of Interest (ROI) wurde durch ein Rechteck (Abb. 17) standardisiert an der Kappenunterseite für jedes Präparat angelegt. Damit entsprach die gesamte ROI der Gesamtlänge der Implantat-Gewebegrenze des jeweiligen Schliffes. Für die Berechnung wurde die Gesamt-ROI in eine innere und äußere ROI aufgeteilt (Abb.17). Die **äußere ROI** umfasste die Seitenkanten der Implantatkappe und zeigte die Gewebegrenzen zwischen Implantat zum hyalinen und mineralisierten Knorpel sowie einem dezenten Knochenkontakt. Die **innere ROI** umfasste nur den Pin und die Kappenunterseite. Diese umfasste die Gewebegrenzen in der das Implantat von mineralisiertem Knochengewebe umgeben war. Die Daten wurden anhand der absoluten Längen der Gewebegrenzen zum Implantat in Millimetern evaluiert. Zum Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurden die relativen Werte des Gesamtumfanges berechnet und in Prozent ausgedrückt.

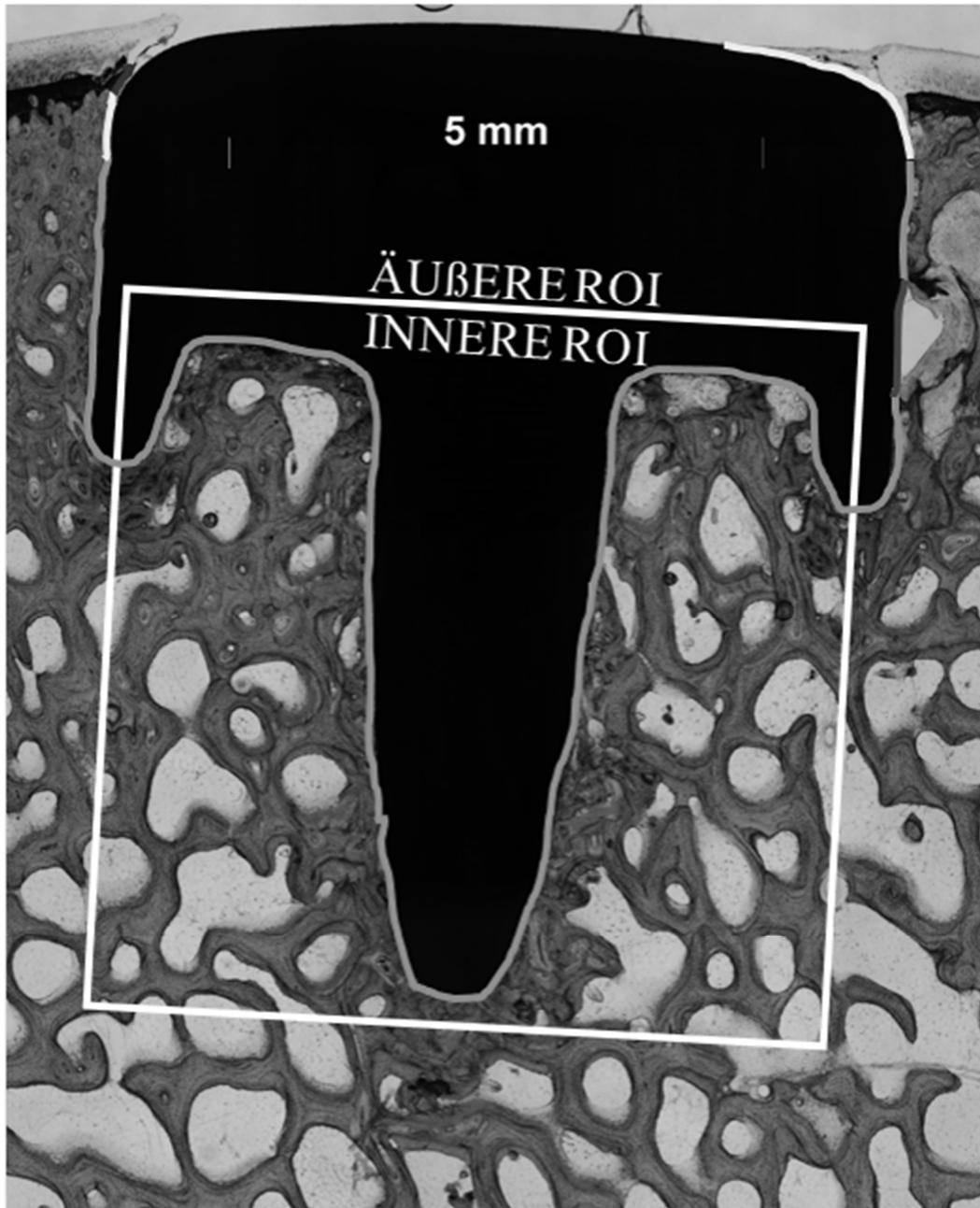


Abbildung 17: Darstellung der histomorphometrische Auswertung der Dünnschliffpräparate. Die Region innerhalb des weißen Vierecks bildete die innere Region of Interest. Außerhalb des weißen Vierecks lag die äußere Region of Interest. Die farbigen Linien definieren die Kontaktflächen zwischen Implantat und anliegenden Gewebe. Legende: blau: mineralisierter Knochen, grün: hyaliner Knorpel, rot: mineralisierter Knorpel, gelb: kein Kontakt, violett: Bindegewebe

3.6.7 Auswertung der mit α -Kollagen vom Typ II markierten Präparate

Die Auswertung der mittels Kollagen-II-Antikörper markierten Paraffinschnitte erfolgte in Anlehnung an ein einfaches Punktschema nach Rudert (Rudert 2000). Dazu wurde die Anfärbarkeit des hyalinen Knorpels im Bereich der Kontaktfläche zum Implantat mikroskopisch beurteilt. Das Punkteschema reicht von minimal 1 Punkt bis maximal 3 möglich erreichbaren Punkten. Keine Anfärbarkeit erhielt 1 Punkt. Wurde nur eine Seite gut angefärbt oder beidseitig nur 50 % angefärbt, erhielt die Probe 2 Punkte. Eine vollständige Anfärbarkeit beidseitig erhielt 3 Punkte. Als Gesamtwert pro Implantat wurde der Mittelwert der beurteilten Schnitte verwendet. Für die Auswertung wurden 4 Schnitte pro Probe untersucht. Der Mittelwert aus allen Schnitten bildete das Ergebnis für die Probe.

3.6.8 Statistik

Alle im Folgenden erhobenen Ergebnisse wurden zunächst mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Excel 2013, Microsoft Corporation, Redmond, USA) dokumentiert und anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics 22) übertragen. Zur Darstellung der quantitativen Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Verglichen wurde die Gruppe mit dem unbeschichteten Implantat mit der Gruppe der beschichteten Implantate (Gruppe 3 vs. 1+2) mit einer Standzeit von 3 Monaten. Die Daten wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Wurde beim Kolmogorow-Smirnow-Test eine Normalverteilung festgestellt, wurde der Student-T-Test für unabhängige normalverteilte Daten durchgeführt. Die Score Befunde wurden mittels Student-T-Test für unabhängige normalverteilte Daten statistisch ausgewertet (IBM SPSS Statistics 22) und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei den histomorphometrisch erhobenen Daten lag keine Normalverteilung vor. Für diese statistische Auswertung wurde deshalb der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Alle erhobenen statistischen Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie an der FU Berlin geprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische Auswertung

Alle Tiere zeigten bis auf vereinzelte Abweichungen eine sehr gute Implantatintegration im osteochondralen Defekt. Die Gelenkoberfläche war glatt und glänzend, die Synovia wies eine physiologische Textur auf und bis auf wenige Ausnahmen stellte sich die gegenüberliegende Tibiakondyle ohne degenerative Anzeichen (Abrasion, Fibrillation oder Traumata) dar (Abb. 18).

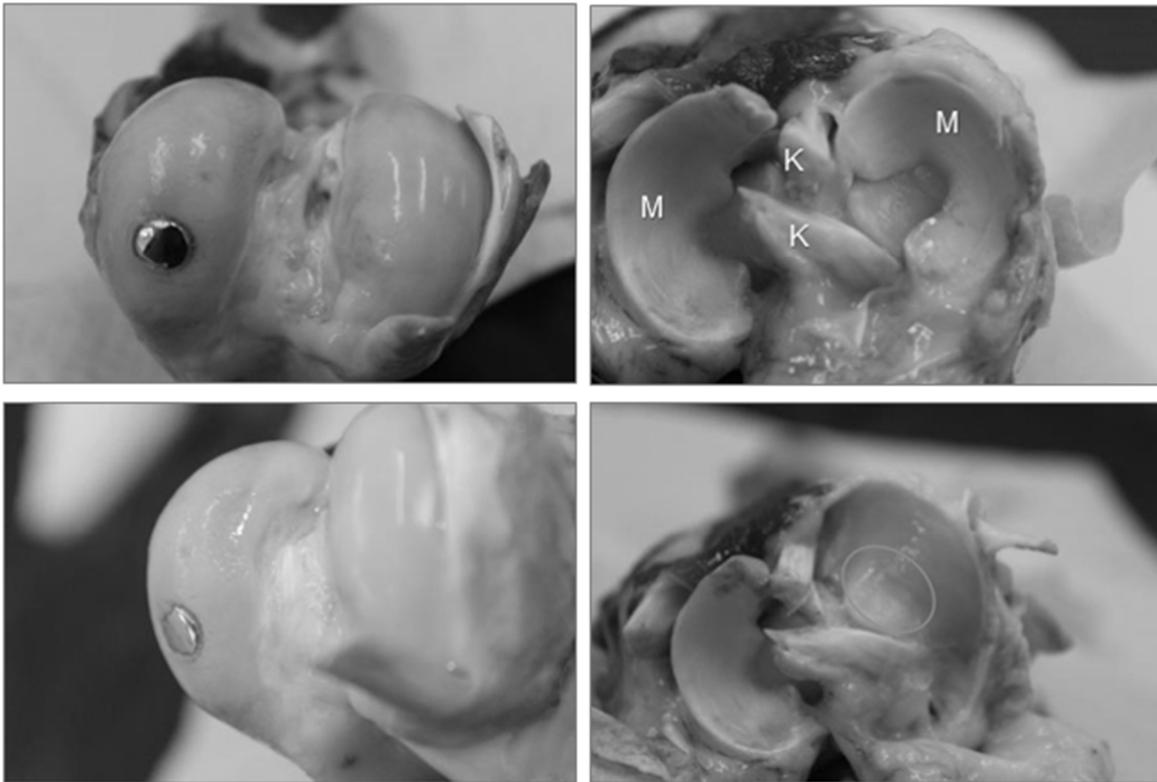


Abbildung 18: Darstellung der Femurkondylen (links) und Tibiakondylen (rechts) nach der Entnahme, links oben: das Implantat zeigt eine sehr gute Implantation in die mediale Femurkondyle, der Knorpel stellt sich glatt und glänzend dar, links unten: seitliche Aufnahme mit Aufblick auf die Gelenkfläche, rechts oben: Tibiakondyle bedeckt von dem medialen und lateralen Meniskus (M) und durchtrennten Kreuzbändern (K), rechts unten: Entfernung des medialen Meniskus und Aufsicht auf Gelenkoberfläche der medialen Tibiakondyle mit Abrasion (orangefarbener Kreis).

4.1.1 Gruppe 1: Implantat mit rauer HA- Beschichtung

Die Präparate der Gruppe 1 zeigten ein sehr gutes Einheilverhalten. Die Gelenkoberfläche erschien glatt, glänzend und zentral ($c = < 2\text{mm}$ um das Implantat) sowie peripher ($p = > 2\text{mm}$ um das Implantat) mit einer sehr guten Knorpelqualität. Die Kriterien Integration und Makroskopie waren in allen Präparaten gut bis sehr gut. Nur in einem Präparat stellte sich eine punktuelle Einschmelzung gelenkflächenseitig in der Peripherie des 4. Sektors im hyalinen Knorpel makroskopisch dar. Nur 2 von 8 Präparate erhielten einen Punktabzug in den Kriterien ICRS-Score, Integration und Makroskopie. Dies war bedingt durch einen Spalt vom 4. bis 2. Sektor (Abb.19) sowie durch eine Divergenz zwischen Gelenkkurvatur und Kappenwinkel.

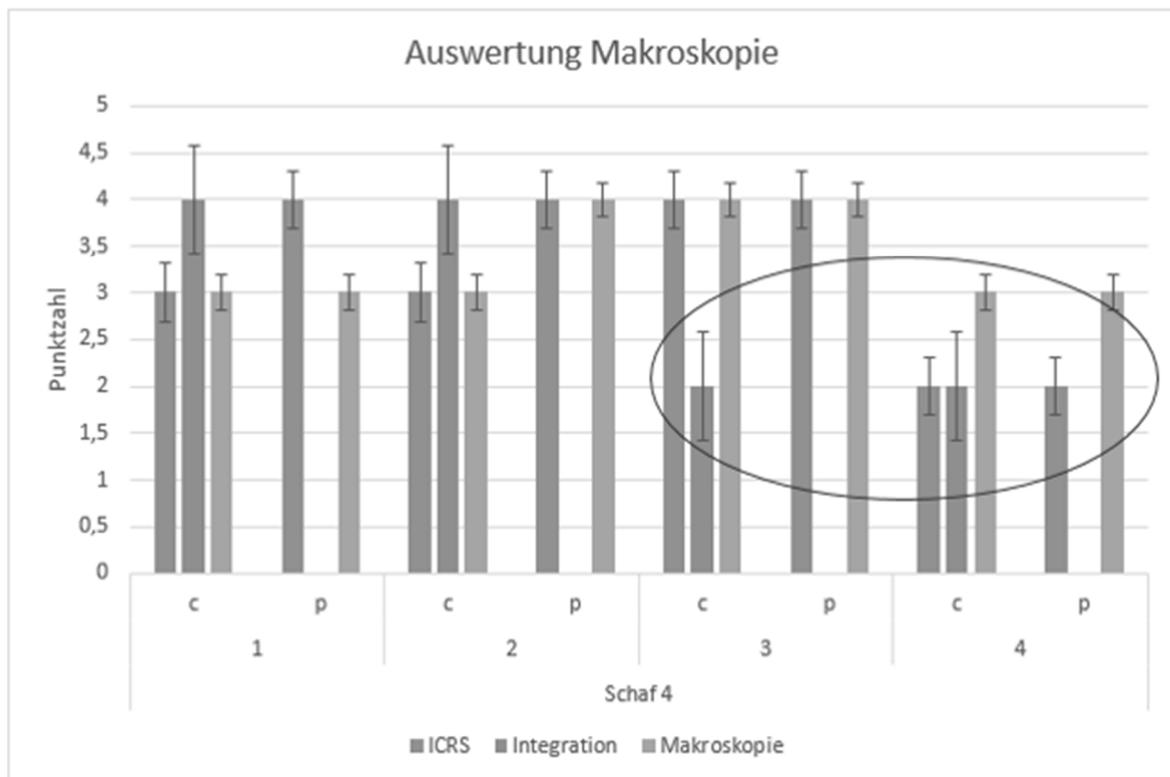


Abbildung 19: Grafische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 4 (Gruppe 1). Bei diesem Tier war die niedrige Punktzahl (orangefarbener Balken) vom 4. bis 2. Sektor markant (roter Kreis). Dies war durch eine Spaltbildung zwischen dem hyalinen Knorpel und der Implantatkappe, sowie einer Fibrillation des hyalinen Knorpels im Sektor 4, 1 und 2 bedingt.

4.1.2 Gruppe 2: Implantat mit glatter HA-Beschichtung

In der Gesamtheit zeigten alle Präparate ein gutes bis sehr gutes Einheilverhalten (Abb. 20). Der hyaline Knorpel zeigte bei allen Präparaten eine glatt glänzende Oberfläche. Die Menisken stellten sich in allen Präparaten in ihrer Lage und Struktur physiologisch dar. Ein Implantatüberstand kam in keinem Präparat von der Gruppe 2 vor. In 4 von 8 Proben stellte sich der hyaline Knorpel geringgradig aufgewölbt dar. In einem Präparat war die Aufwölbung nur in einem Sektor, in den anderen Präparaten in mehreren Sektoren zu beobachten. Zudem zeigten nur 2 Präparate eine dezente Spaltbildung in mehreren Sektoren (Abb. 21). Wie auch in der Gruppe 1 zeigte hier ein Präparat in der Peripherie eine punktuelle Einschmelzung im 1. Sektor.

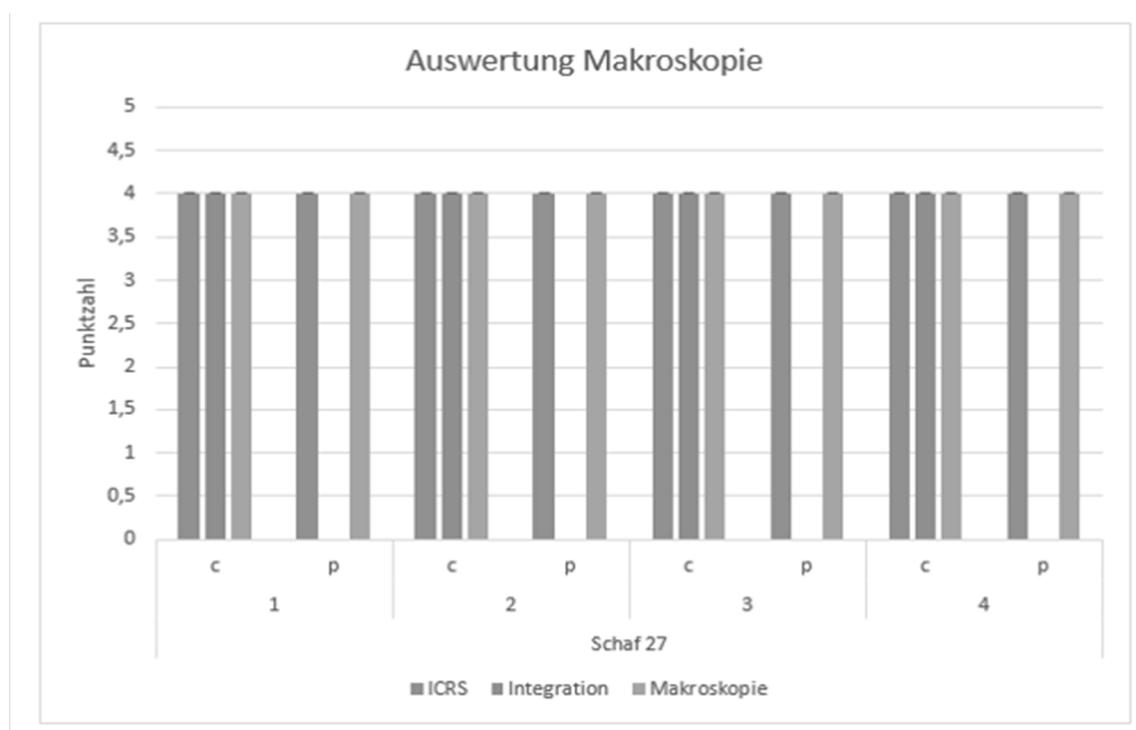


Abbildung 20: Grafische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 27 (Gruppe 2), mit dem besten Ergebnis in dieser Gruppe. Die Knorpelqualität zentral (c=2mm um das Implantat) und peripher (p=>2mm um das Implantat) war ausgezeichnet. Es gab keine Abzüge in der Wertung im Kriterium "ICRS Score" (blaue Balken). Es überwiegte eine hohe Punktwertung in den Kriterien Makroskopie und Integration, aufgrund des sehr guten Einheilverhaltens in das chondrale und ossäre Gewebe

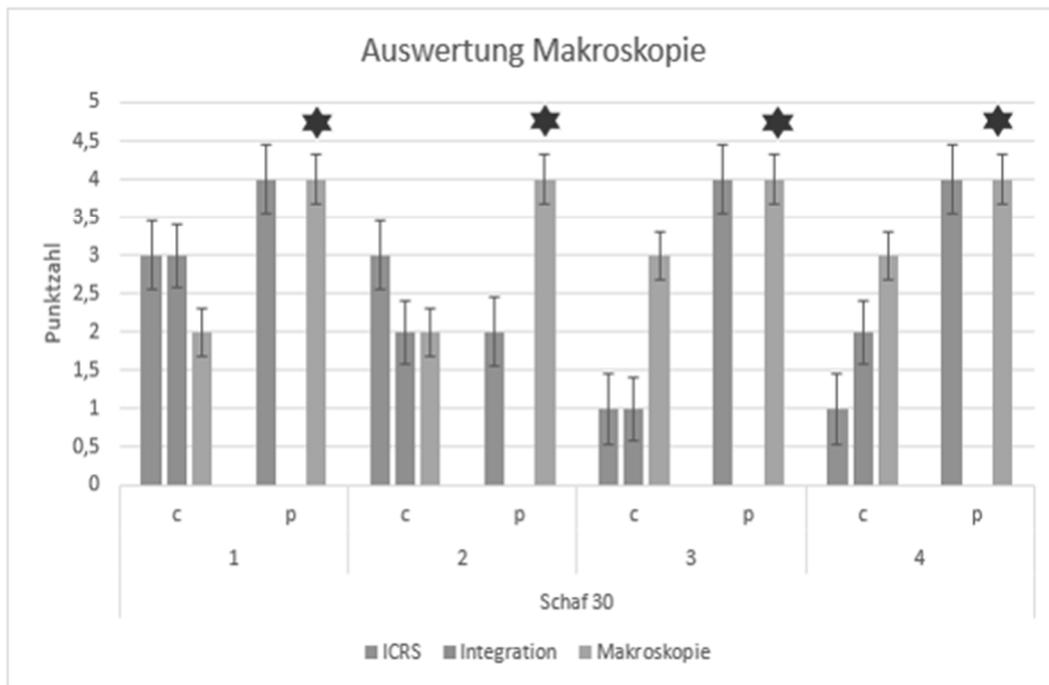


Abbildung 21: Grafische Dartsellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 30 (Gruppe 2) mit dem schlechtestes Ergebniss dieser Gruppe und niedrigerer Punktzahl zentral (c=2mm um das Implantat) aufgrund der Spaltbildung von Sektor 1 bis 4 um das Implantat. Der Knorpel steht nicht im direkten Kontakt zum Implantat und ist fibrilliert. Der ICRS Score (blaue Balken) ist infolge der schlechten Knorpelqualtiät in allen Sektoren mit einer niedrigen Punktzahl bewertet worden. Im umliegenden Gewebe (p=>2mm um das Implantat) erhält das Präparat eine sehr gute Bewertung und entsprechend hohe Punktzahlen (rote Sterne) im Kriterium Makroskopie (graue Balken) mit zwei bis vier Punkten.

4.1.3 Gruppe 3: unbeschichtetes Implantat

In allen Präparaten der Gruppe 3 (unbeschichtete Implantate) zeigten die Implantate ein gutes Einheilverhalten (Abb. 24). Der hyaline Knorpel stellte sich bei allen Tieren in der Peripherie ($p = > 2\text{mm}$ um das Implantat) physiologisch dar. Dabei war bei 5 von 7 Tieren zentral ($c = 2\text{mm}$ um das Implantat) der hyaline Knorpel aufgewölbt, fibrilliert oder demarkiert (Abb. 14). Die Veränderungen waren überwiegend im 2. Sektor zu finden (Abb. 14). Ein Präparat zeigte im 3. und 4. Sektor einen gravierenden Implantatüberstand (Abb. 22, 23 und 25). Im Vergleich zu den anderen Präparaten, die einen dezenten Überstand aufwiesen, stellte sich bei diesem Tier eine tiefe Läsion in der gegenüberliegenden Gelenkfläche dar. In einem Tier erfolgte die Implantation tiefer als bei den anderen Schafen. Dadurch wölbte sich der hyaline Knorpel weit über die Implantatkappe vor und bedeckte diese fast vollständig.

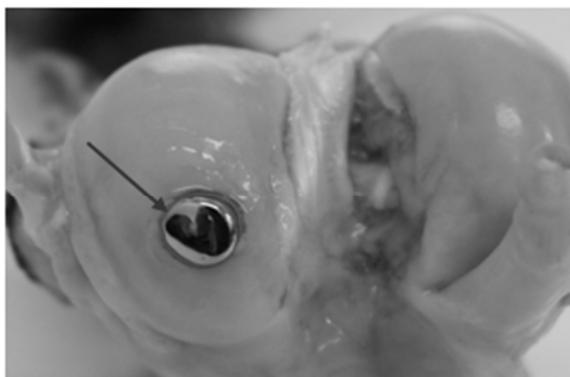


Abbildung 22: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder), Aufsicht frontal auf die Implantat (Pfeil) tragende mediale Femurkondyle

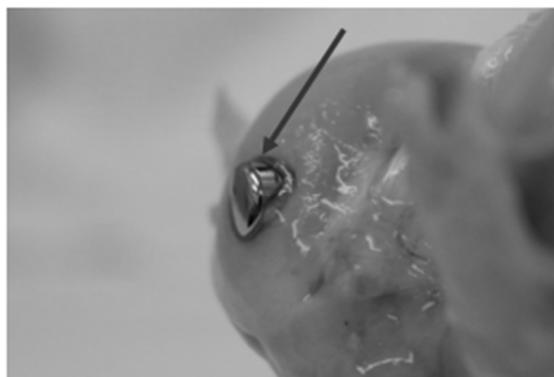


Abbildung 23: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder). Die Seitenaufsicht der Implantat tragende mediale Femurkondyle zeigt einen deutlichen Implantatüberstand (roter Pfeil)

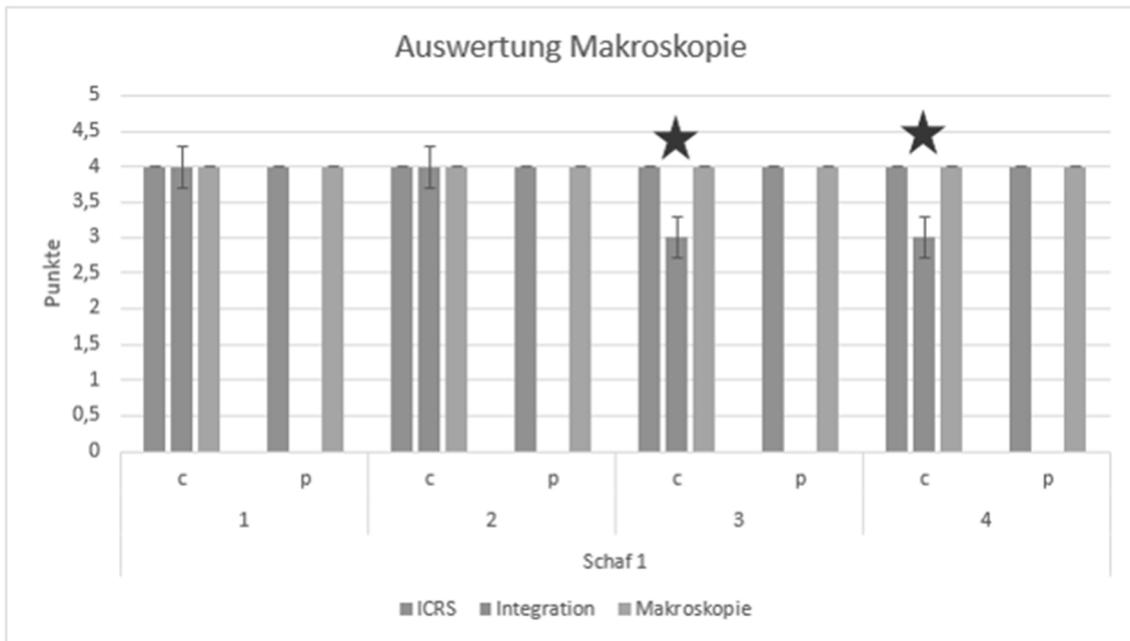


Abbildung 24: Graphische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 1 (Gruppe 3). Das Implantat zeigte in den Kriterien Integration (orangefarbener Balken) und Makroskopie (grauer Balken) eine hohe Punktzahl. Im 3. und 4. Sektor gab es jeweils einen Punktabzug (roter Stern) aufgrund des Implantatüberstandes und einer schlechten Integration. Im Kriterium ICRS-Score (blauer Balken) wurden keine Punkte abgezogen, was auf eine sehr gute Knorpelqualität zentral (c=2mm um das Implantat) und peripher (p \geq 2mm um das Implantat) deutet.

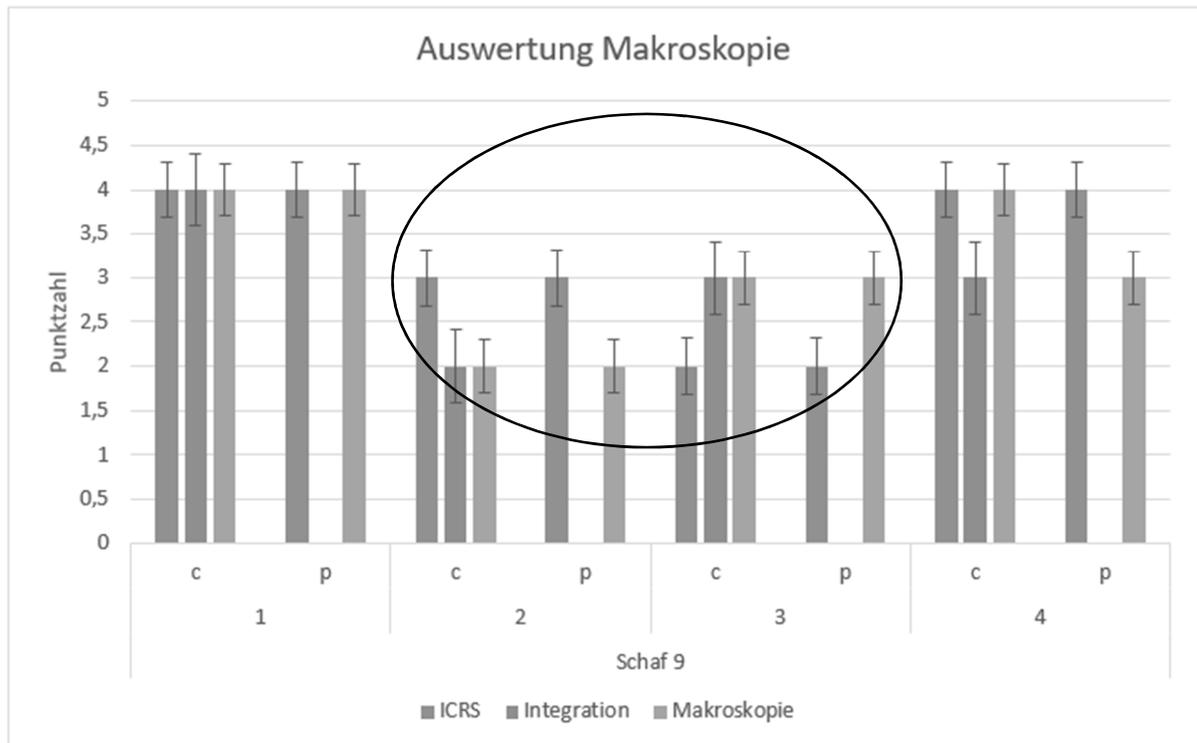


Abbildung 25: Graphische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 9 (Gruppe 3). Durch den einseitigen Implantatüberstand im Sektor 2 bis 3 resultiert eine niedrige Punktzahl (roter Kreis) in den Kriterien Makroskopie (graue Balken) und Integration (orangefarbener Balken). Damit verbunden ist eine schlechte Knorpelqualität im ICRS-Score (blaue Balken). Der hyaline Knorpel hat zentral (c= 2mm um das Implantat) im Sektor 2 und 3 keinen Kontakt zur Implantatkappe aufgrund des deutlichen Implantatüberstandes in diesen Sektoren.

4.2 Zusammenfassung der makroskopischen Auswertung

In keiner Gruppe lag ein Anzeichen einer Entzündungsreaktion vor. Das Gelenk war bei allen Tieren physiologisch gefüllt und die Synovia war honigfarben und klar und wies eine leicht fadenziehende Konsistenz auf. In der Zusammenschau aller makroskopischen Beurteilungen konnten somit, bis auf wenige Ausnahmen, in allen Gruppen ein gutes bis sehr gutes Einheilverhalten erreicht werden. Insgesamt schnitten alle Gruppen ähnlich in den Kriterien Integration, Makroskopie und Knorpelqualität (ICRS-Grad) ab. Dabei zeigten 22 der 24 Tiere eine glatte, glänzende Gelenkoberfläche, sowohl im Bereich der Femurkondylen als auch der Tibiakondylen. Die makroskopische Knorpelqualität war bei allen Gruppen ähnlich gut, es wurden durchschnittlich über 3,5 Punkte erteilt. Die einzige Ausnahme bildet hier der zentrale 2. Quadrant, der durch einen exzentrischen Knorpelschnitt bei zwei Tieren etwas, aber nicht signifikant schlechter abschnitt. Die Integration des Implantats wurde in allen untersuchten Quadranten als komplett oder mit Spalt <1mm bewertet. Eine Ausnahme bildete nur die Gruppe 1, die im 4. Quadranten eine etwas größere Spaltbildung (>1mm) aufwies und signifikant ($p=0,01$) weniger Punkte erreichte als Gruppe 2. Bei nur 5 Präparaten von Gruppe 1 war die Spaltbildung durch eine Divergenz zwischen dem Oberflächenwinkel des Implantats und der physiologischen Gelenkkurvatur bedingt. Die Tiere mit Läsionen oder einem Implantatüberstand zeigten während der Standzeit, verglichen zu Tieren ohne Läsion, keine vermehrte Lahmheit oder Schmerzhaftigkeit. Die Läsion (Spaltbildung, Fibrillation oder Aufwölbung) war nicht ideal, behinderte aber die Auswertung nicht, da dennoch eine auswertbare Kontaktfläche zum Implantat bestand (Abb. 26).

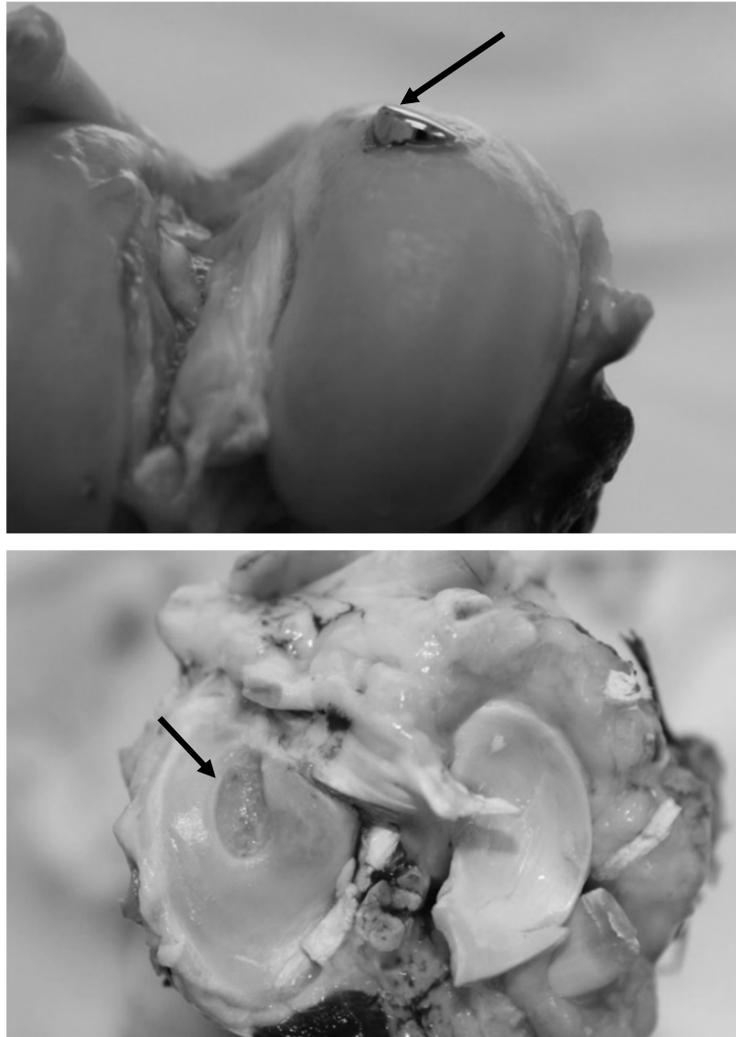


Abbildung 26: Links: Aufnahme nach Entnahme des rechten Femurs. Die mediale Femurkondyle zeigte einen ausgeprägten Implantatüberstand (schwarzer Pfeil). Rechts: Aufsicht Tibiakondylen nach Entnahme, deutliche Läsion (schwarzer Pfeil) unter dem medialen Meniskus bedingt durch Implantatüberstand auf der gegenüberliegenden Seite.

4.3 Histologische Auswertung

4.3.1 Gruppe 1: raue HA-Beschichtung

Die Gruppe 1 zeigte Chondrozytencluster im hyalinen Knorpel in 5 von 8 Proben. Der hyaline Knorpel war hypo- bis azellulär in 3 von 8 Proben, die Anfärbbarkeit des hyalinen Knorpels war überwiegend gut (4 aus 8) und moderat bis schlecht in je zwei Proben. Ein Spalt zwischen Knorpel und Implantat war in zwei Präparaten zu sehen. Zwei Implantate waren zu tief implantiert, wodurch kein Kontakt zwischen Knorpel und den Seitenrändern der Implantat Kappe bestand (Abb. 27). Im Allgemeinen zeigte sich eine gute Anheftung des mineralisierten Knorpels an das beschichtete Implantat (Abb. 28). In 3 von 8 Proben zeigte der kalzifizierte Knorpel keinen Kontakt zum Implantat. Entweder stellte sich der kalzifizierte Knorpel im direkten Implantatkontakt frakturiert und der Kontakt war durch eine zu tiefe Implantation nicht gewährleistet, oder nur eins traf zu.

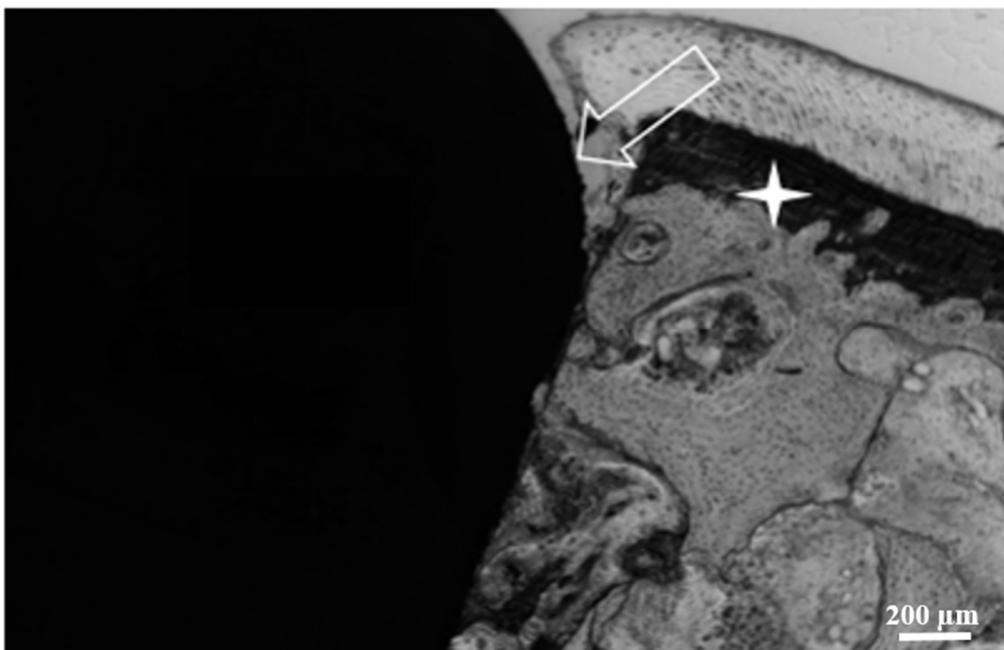


Abbildung 27: Darstellung einer zu tiefen Implantation in Gruppe 1. Der intakte kalzifizierte Knorpel (Stern) zeigte keinen Kontakt zur Implantatkappe aufgrund einer zu tiefen Implantation. Durch die mechanische Belastung wird der frakturierte hyaline Knorpel in den Spaltraum gedrückt (Pfeil). Die Folgen sind eine Degeneration des einfließenden Knorpels und darauffolgende Frakturierung des kalzifizierten Knorpels.

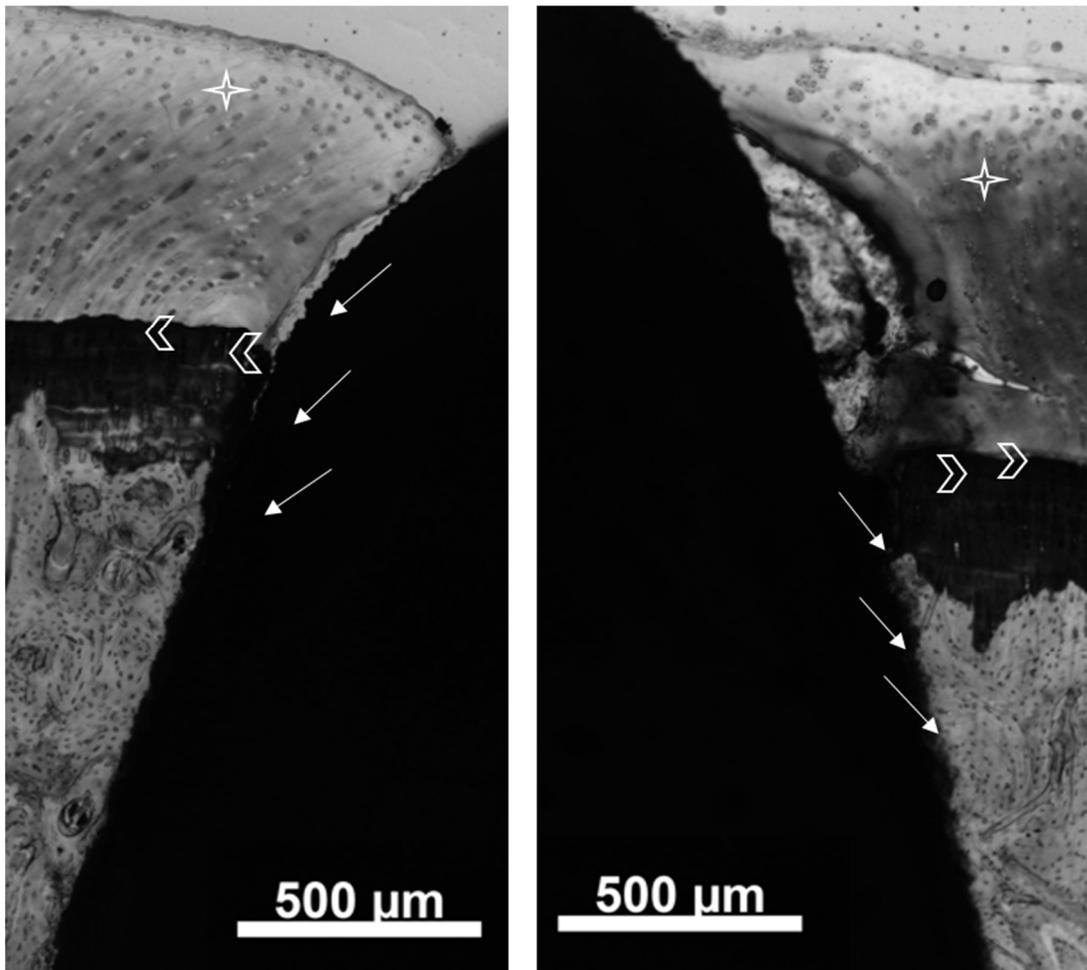


Abbildung 28: Charakteristisches Bild für die Gruppe 1 (raue HA-Beschichtung). Aufsicht auf die Kappenränder mit einer guten Implantatintegration und Kontakt der Implantatbeschichtung (Pfeile, grau-schwarz) an den angrenzenden kalzifizierten Knorpel (Pfeilköpfe, tief-violett), posterior (links) und anterior (rechts). Der darüberliegende hyaline Knorpel (Stern, blass-violett) zeigt keine feste Bindung zur Implantatkappe, wird aber durch die Bindung basal an den kalzifizierten Knorpel eng angeheftet (keine Spaltbildung). Der darunterliegende Knochen zeigt auch einen sehr guten Kontakt zum Implantat ohne Anzeichen einer Degeneration oder Lyse.

4.3.2 Gruppe 2: glatte HA- Beschichtung

In der Gruppe 2 zeigte der hyaline Knorpel bei allen Präparaten Chondrozytencluster und stellt sich in 5 aus 8 Präparaten hypo- bis azellulär dar. Die Anfärbung des hyalinen Knorpels war in vier Präparaten gut, in drei moderat und in einem Präparat schlecht. Der kalzifizierte Knorpel zeigte im Bereich der linken Kappenränder in 6 von 8 Präparaten einen sehr guten Kontakt und keine Spaltbildung. Ein Spalt zwischen Implantat und umliegendem Gewebe war nur in zwei Präparaten erkennbar. Des Weiteren war nur in einem Präparat (Schaf 30) die Implantation zu tief, wodurch ein direkter Kontakt zum Implantat nicht gegeben war (Abb. 29).

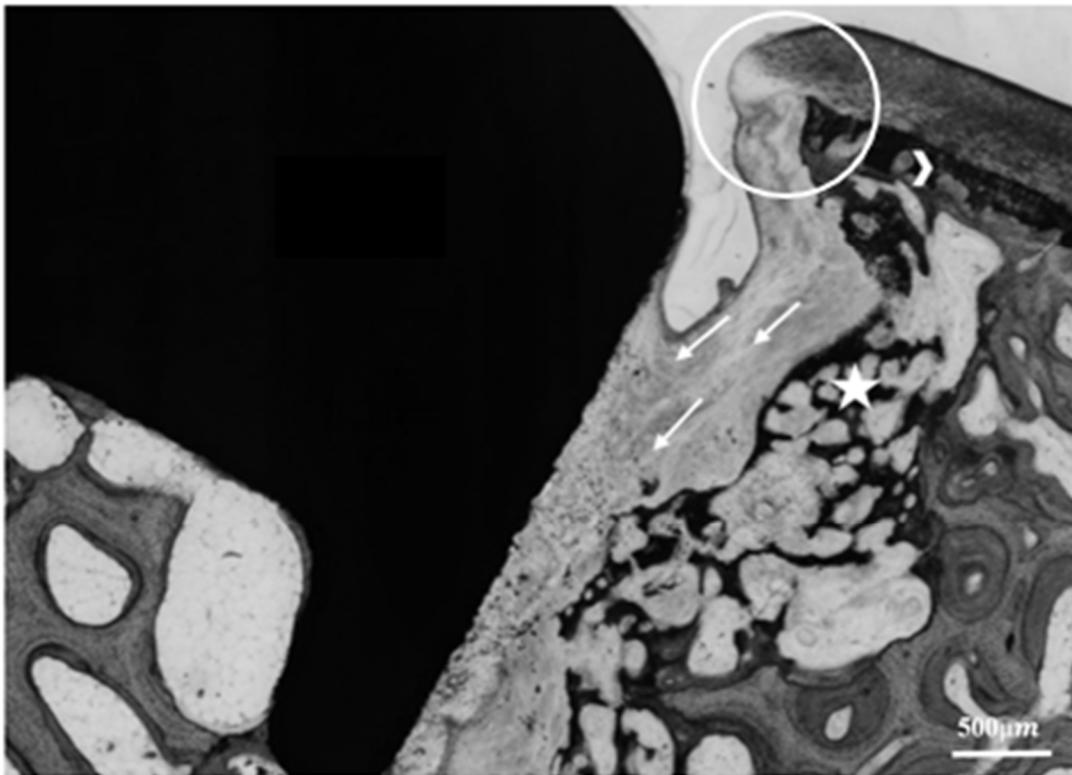


Abbildung 29: Darstellung einer zu tiefen Implantation in Gruppe 2: Das umliegende Gewebe wird durch einen 1mm breiten Spalt vom Implantat getrennt. Der darüberliegende hyaline Knorpel ist in den Spalt vorgefallen (Kreis: Cartilage flow Phänomen). Der subchondrale Knochen ist nekrotisch (Stern). Der Spalt ist mit Bindegewebe gefüllt (Pfeile) und der kalzifizierte Knorpel (Pfeilspitze, dunkelviolet) hat sich durch Resorption zurückgezogen. Die Stabilität des Implantats ist durch eine Implantatlockerung gefährdet. Der zeitliche Ablauf einer solchen Degeneration ist individuell, aber auch von der Ausgangssituation abhängig (Größe des initialen Spalts, Tiefe der Implantation u.a.).

4.3.3 Gruppe 3: unbeschichtetes Implantat

Die Gruppe 3 zeigte in allen Präparaten Chondrozytencluster (7 von 7) und eine moderate (3 aus 7) bis schlechte (4 aus 7) Anfärbbarkeit des hyalinen Knorpels. Die Chondrozytencluster und die moderate Anfärbbarkeit sind ein Zeichen einer beginnenden Degeneration des hyalinen Knorpels (Abb. 30 Bild rechts unten). Die Degenerationsanzeichen waren ausschließlich im direkten Implantatkontakt mit dem hyalinen Knorpel zu finden. Ein weiteres Zeichen der cartilaginären Degeneration war eine Hypo-/Azellulärität in allen Präparaten dieser Gruppe (Abb. 30, unten rechts). Ein Spalt zwischen Implantat und umliegendem Gewebe konnte in allen Präparaten beobachtet werden (Abb. 30, unten links). Eine Spaltbildung war bei 5 von 7 Präparaten beidseitig und bei 2 Präparaten (Schaf 1 und 9) nur einseitig (rechts, entspricht der posterioren Seite) vorzufinden. Dieser Spalt begann zwischen hyalinen Knorpel und Implantatkappe und reichte bis zur tiefen ossären Schicht bei 50 % der betroffenen Tiere. Zudem konnte in allen Proben dieser Gruppe ein verstärktes Vorkommen von Osteozyten und Osteoblasten im Bereich vom Pin und Kappenrändern nachgewiesen werden (Abb. 30 Bild rechts oben).

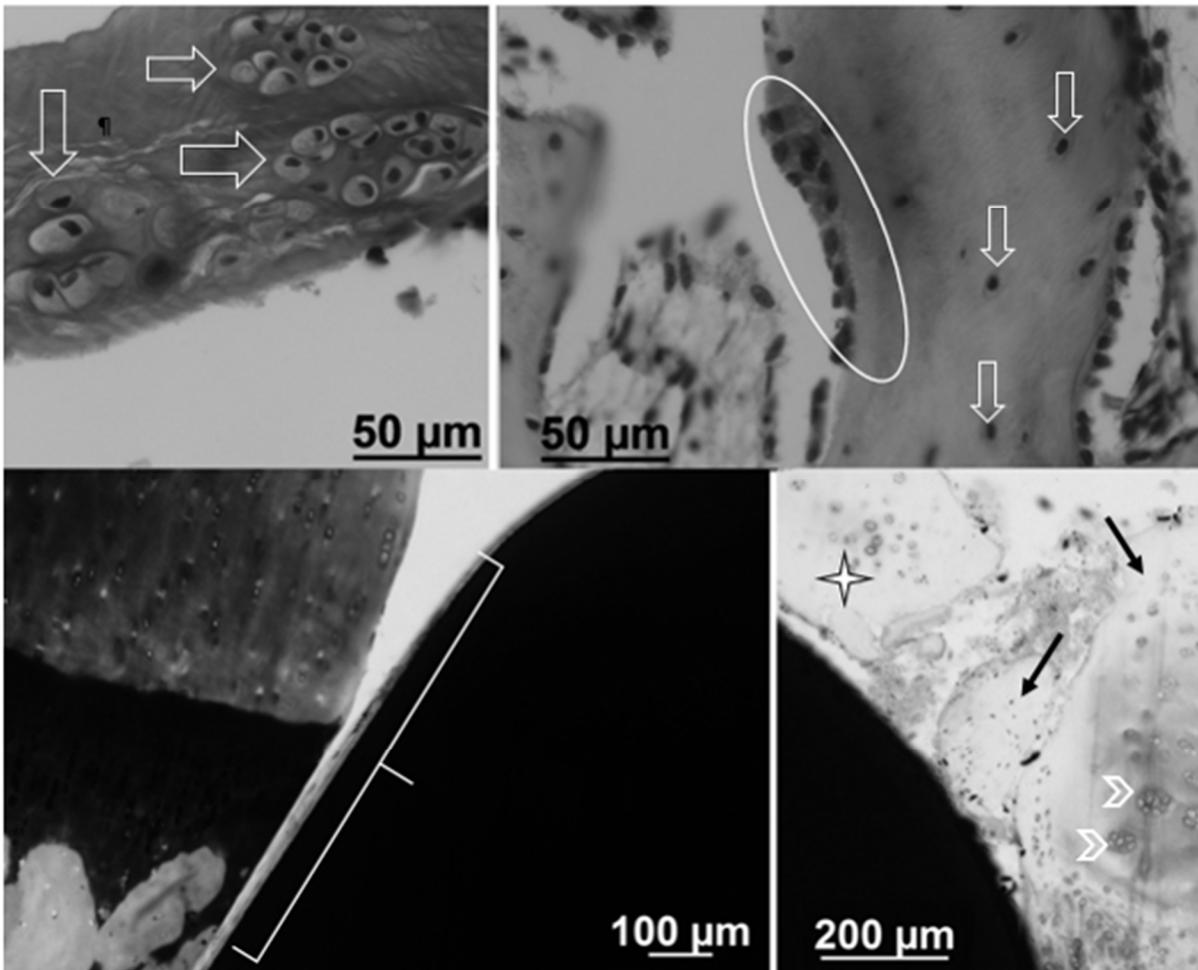


Abbildung 30: oben links Paraffinschnitt in Toluidinfärbung: Chondrozytencluster im hyalinen Knorpel (Pfeile) der auf der Implantatkappe aufliegt. Chondrozytenclustern (Pfeile) sind ein Anzeichen einer Degeneration und sprechen für eine erhöhte Mitoseaktivität der Chondrozyten. Die Chondrozyten liegen nicht mehr angeordnet in der Matrix vor (Vergleich Bild unten links) sondern lagern sich in ungeordneten Gruppen zusammen. Oben rechts: Bild von einem Knochenumbauprozess im Bälkchenknochen unterhalb der Gelenkfläche. Entlang der Knochenbälkchen ist ein knochenaufbauender Osteoblastentensaum (Kreis) mit eingeschlossenen Osteozyten (Pfeile) dargestellt. Unten links Dünnschliffpräparat nach Giemsa: Eine deutliche Spaltbildung (Klammer) zwischen umliegendem Gewebe und der linken Implantatkappe (schwarz). Der hyaline Knorpel zeigte eine sehr gute Anfärbbarkeit und Zellulärität (violett) und der darunter liegende kalzifizierter Knorpel (tiefviolett) ist intakt. Unten rechts: Hyaliner Knorpel der der Gelenkflächenseits auf der Implantatkappe aufliegt. Der Knorpel zeigt Degenerationsanzeichen in Form von Chondrozytenclustern (Pfeilköpfe), eine Hypo-/Azellularität (Stern) und einer schlechten Anfärbbarkeit (schwarze Pfeile), d.h. die Knorpelmatrix zeigt eine schwache violette Färbung statt einem intensiven Violett (vgl. Bild links unten)

4.3.4 Ergebnisse semiquantitativer Score

Die Gruppe 2 (glatte HA-Beschichtung) zeigte eine tendenziell ($p=0,059$) höhere und damit bessere Punktzahl im Kriterium Veränderung im angrenzenden Knorpel, als die unbeschichtete Gruppe 3 (Tab. 4). Die Implantat-Integrität wurde in allen Gruppen als gut bewertet. Der hyaline Knorpel war komplett oder partiell gebunden, der kalzifizierte Knorpel jedoch zeigte in der Gruppe 3 eine einseitige Bindung an die Kappenränder, wohingegen die beiden beschichteten Gruppen 1 und 2 tendenziell eine beidseitige Implantatbindung aufzeigten. Der hyalinen Knorpel stellte sich in allen Gruppen in einer Mischung aus säulenförmig angeordneten Chondrozyten und Chondrozytenclustern dar. Die subchondrale Knochenlamelle zeigte sich in allen drei Gruppen intakt und mit operationsbedingten Umbauprozessen (Remodeling). Der Implantat-Knochenkontakt war gekennzeichnet von einem guten Anwachsen von starken Knochentrabekeln an das Implantat (Tab. 4). Das Kriterium Implantat-Knochenkontakt erhielt in Gruppe 1 und 2 die volle Punktzahl. Veränderungen im angrenzenden Knorpel konnte in allen Gruppen in unterschiedlicher Stärke beobachtet werden. In allen Gruppen wurde in diesem Kriterium nur eine geringe Punktzahl erreicht. Maßgeblich für dieses Ergebnis waren die moderate oder schlechte Anfärbbarkeit und die geringe bis moderate Hypozellularität des hyalinen Knorpels. Die erreichte Gesamtpunktzahl der jeweiligen Gruppen lag bei 62 % (Gruppe 1), 71% (Gruppe 2) und 61% (Gruppe 3) von maximal erreichbaren 17 Punkten. Die prozentualen Werte erschienen unterschiedlich, sind aber aufgrund der Streuung der Daten nicht statistisch signifikant.

Tabelle 4: Darstellung der durchschnittlichen Punktzahlen±Standardabweichung der einzelnen Gruppen in den Score-Kriterien. Nur Gruppe 2 (glatte HA-Beschichtung) zeigte eine tendenziell ($p=0,059$) höhere Punktzahl im Kriterium “Veränderung im angrenzenden Knorpel”, als die Gruppe 3. Die rechte Spalte zeigt die theoretisch erreichbare Gesamtpunktzahl, welche der bestmöglichen Gewebequalität entspricht.

Kriterien	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gesamtpunktzahl
Gesamteindruck	0,5±0,5	1,0±0,0	0,9±0,4	1
Implantat Integrität	1,4±0,5	1,6±0,5	1,3±0,5	2
hyaliner Knorpel	1,4±0,4	1,5±0,5	1,3±0,5	2
kalzifizierter Knorpel	1,09±0,9	1,3±0,5	0,7±0,8	2
Zellverteilung	1,8±0,7	2,0±0,5	1,6±0,8	3
Subchondraler Knochen	2,4±0,7	2,0±0,8	2,3±0,8	3
Implantat Knochenkontakt	1±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1
Veränderung im angrenzenden Knorpel	1,1±1,0	1,8±0,7#	1,1±0,4#	3
Summe Mittelwerte	10,5±4,2	12,1±2,3	9,9±2,4	17

4.3.5 Ergebnisse Histomorphometrie

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass der überwiegende Anteil des Gewebes, welches am Implantat anlag, Knochengewebe war. Dieses lag überwiegend als Bälkchen vor mit variierendem Bindegewebeanteil. Der gemessene Anteil von Bindegewebe enthielt sowohl das Bindegewebe, welches physiologisch zwischen den Knochenbälkchen lokalisiert ist, als auch Bindegewebe, welches sich zwischen Knochenlager und Implantat gebildet hatte. Dieser Bindegewebsanteil bewegte sich je nach Präparat zwischen null und siebzig Prozent, wobei der höchste prozentuale Anteil zu einem Tier der Gruppe 2 gehörte.

Die Werte der histomorphometrischen Auswertung sind in Tabelle 5 dargestellt. Deutlich erkennbar wies die Gruppe 1 (raue HA-Beschichtung) signifikant weniger Leerfläche auf als die Gruppe 3 (unbeschichtetes Implantat). Auch der statistische Vergleich zeigte, dass bei den Präparaten der Gruppe 1 (raue HA-Beschichtung) signifikant weniger Leerfläche gemessen wurde als in denen der Gruppe 3 (unbeschichtetes Implantat). Des Weiteren wurden in der Histomorphometrie in der Gruppe 1 und 2 ein höherer Anteil an hyalinem Knorpel,

mineralisiertem Knorpel und mineralisiertem Knochen und ein geringerer Anteil an Leerfläche im Vergleich zu Gruppe 3 gemessen. Der bindegewebige Anteil war in beiden Gruppen (1 und 2) gleich. Ein Vergleich im Kriterium Leerfläche zwischen Gruppe 1 und 2 zeigten keine statistischen Unterschiede. Die Gruppe 3 zeigt eine geringere Kontaktfläche zum hyalinem Knorpel, mineralisiertem Knorpel und mineralisiertem Knochen sowie eine höhere Leerfläche als die Gruppen 1 und 2. Ein Vergleich zwischen der Implantatbeschichtungen (Gruppe 1 und 2 im Vergleich zu Gruppe 3) zeigte eine deutliche Spaltbildung bei den unbeschichteten Implantaten im Gegensatz zu den beschichteten Implantaten (siehe Abb. 31).

Tabelle 5: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile, die in der äußeren ROI an das Implantat grenzen. Bezüglich hyalinem, mineralisiertem Knorpel und Bindegewebe gibt es keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die Gruppen mit den beschichteten Implantaten (1 und 2) haben tendenziell einen höheren Knochenanteil als Gruppe 3, der Leerraum ist in Gruppe 1 signifikant (*p=0,037) geringer als Gruppe 3.

Parameter in %	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe3
hyaliner Knorpel	23±7	19±7	23±7
mineralisierter Knorpel	4±3	4±2	3±3
Knochen	57±16	56±22	45±17
Bindegewebe	15±16	17±22	20±12
Leerfläche	2±4*	4±10	9±7*

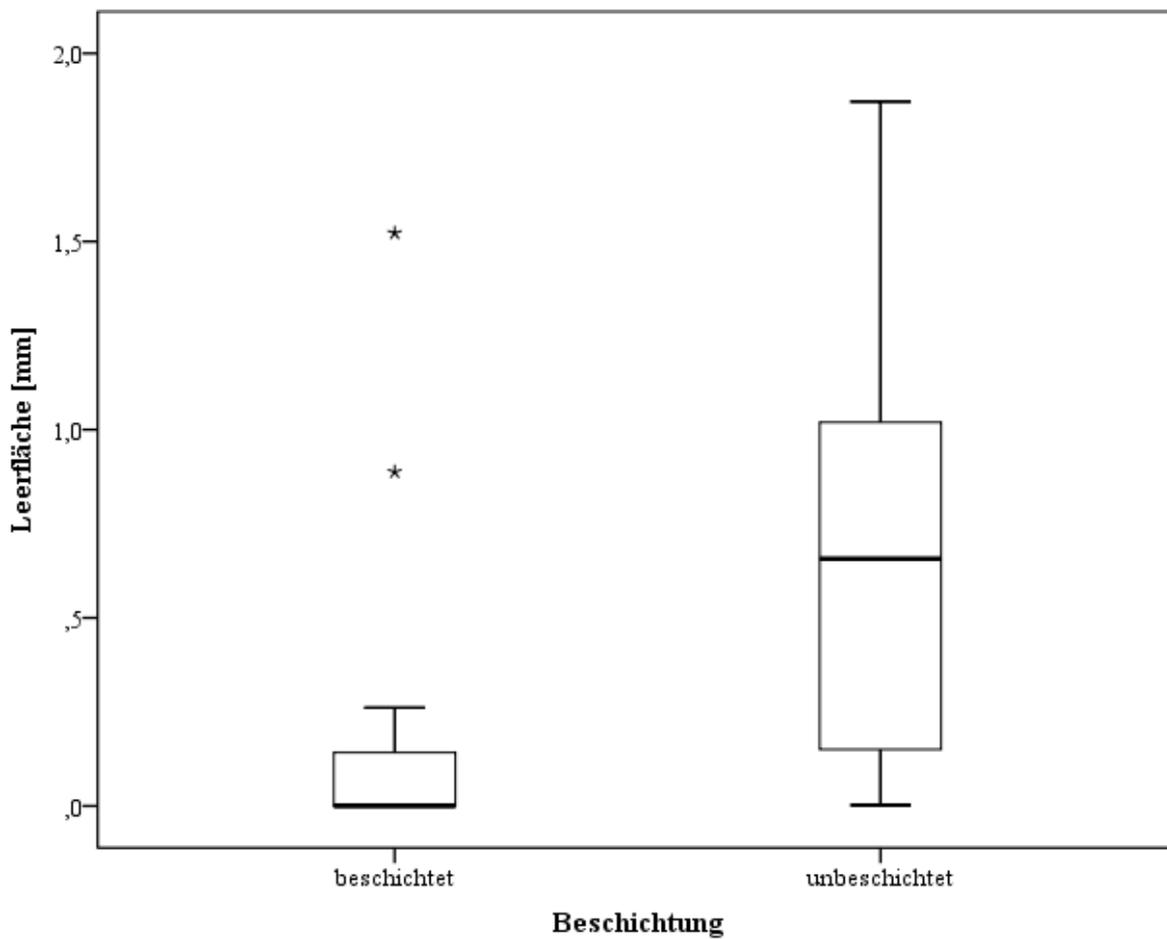


Abbildung 31: Darstellung der Leerfläche in den Gruppen (beschichtet (n=16) vs. unbeschichtet (n=7)). Der Median bei den beschichteten Gruppen ist 0 (0/1,5 Min/Max) und deutlich niedriger als in der unbeschichteten Gruppe mit 0,65 (0/2 Min/Max). Dieser Vergleich zwischen den Beschichtungen (Gruppe 1+2 zu Gruppe 3) zeigte, dass die unbeschichteten Implantate signifikant weniger Kontaktfläche zum umliegenden Gewebe aufwiesen als die beschichteten Implantate. (Sternchen* sind Extremwerte)

4.4 Zusammenfassung der histologischen Auswertungen

Die beschichteten Implantate zeigten (unabhängig ob raue oder glatte HA-Beschichtung) nach 3 Monaten Standzeit in der histomorphometrischen Auswertung eine signifikant geringere Leerfläche zwischen Implantat und Gewebe, als die unbeschichteten Implantate (Gruppe 3 siehe Abb. 31). Die Strecke der gemessenen Kontaktflächen (hyaliner Knorpel, mineralisierter Knorpel, Knochen und Bindegewebe) zwischen Implantat und umliegenden Gewebe war bei den beschichteten Implantaten (unabhängig ob raue oder glatte HA Beschichtung) länger. Eine Spaltbildung war somit wesentlich seltener und die darauffolgende Leerfläche in Millimetern kürzer als in der Gruppe 3. Wenn ein Spalt in Gruppe 1 oder 2 gemessen wurde, dann war dieser auf eine zu tiefe Implantation zurückzuführen. In der deskriptiven Histologie zeigten die Gruppen mit Implantatbeschichtung ein stabiles Implantat-Gewebe-Interface im chondralen und ossären Gewebe. Ebenfalls konnten in der deskriptiven histologischen Untersuchung in Gruppe 2 tendenziell weniger degenerative Veränderungen (schlechte Anfärbbarkeit, Risse oder Clusterbildung) im angrenzenden Knorpel festgestellt werden als in der Gruppe 3.

4.5 Auswertung der Immunhistologie

Der hyaline Knorpel zeigte an der Kontaktfläche zur Implantatkappe im überwiegenden Anteil eine gute bis sehr gute Anfärbbarkeit durch Hämatoxylin. In der Gruppe 1 (raues HA) erhielt 1 von 8 Präparaten die volle Punktzahl, in der Gruppe 2 (glatte Beschichtung) traf dies auf 5 der 8 Präparate zu und in der Gruppe 3 (keine Beschichtung) auf 3 von 7 Präparaten. Im Mittel erhielten Gruppe 1 $2,0 \pm 0,5$, die Gruppe 2 $2,5 \pm 0,8$ Punkte und die Gruppe 3 $2,3 \pm 0,8$ Punkte (Abb. 32). Die Ergebnisse der Gruppen unterschieden sich statistisch nicht.

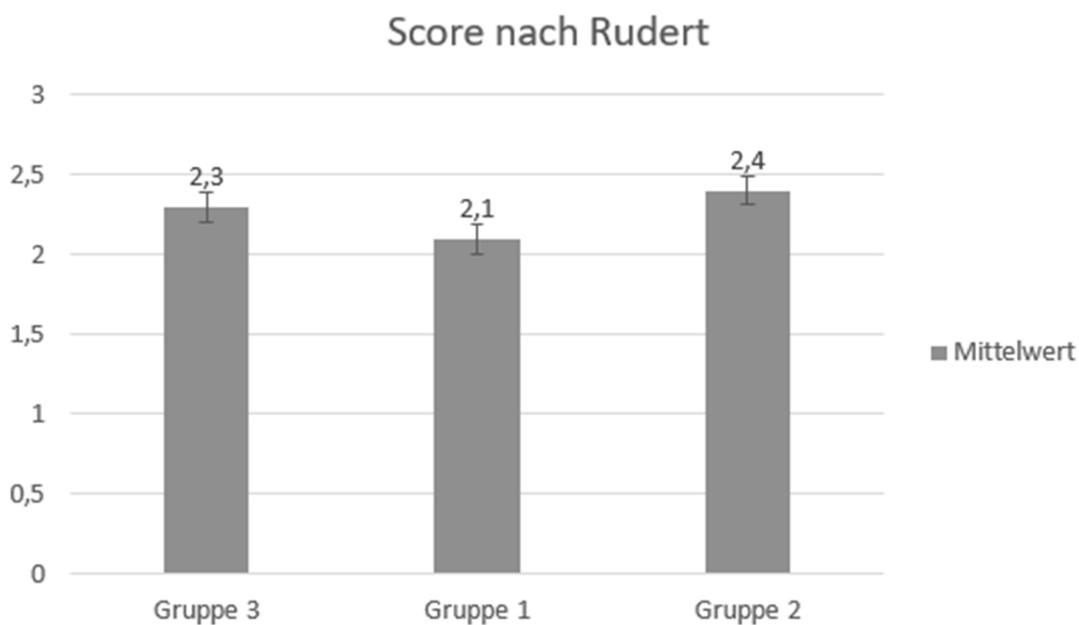


Abbildung 32: Auswertung der immunhistologischen Färbungen mittels Score nach Rudert (Rudert 2000). Dargestellt ist der Vergleich der Mittelwerte zwischen den 3 Gruppen. Die Gruppe 2 (glatte Beschichtung) erzielte das beste Ergebnis, jedoch ohne eine statistische Signifikanz.

4.6 Zusammenfassung Immunhistologie

Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zeigten, dass der hyaline Knorpel eine gute Anfärbarkeit der Knorpelmatrix aufwies. Wenn ein Kontakt zwischen Implantat und umliegenden Gewebe bestand, konnte an der jeweiligen Seitenkappe eine deutliche Markierung von α -Kollagen-II gemessen werden. Sobald eine zu tiefe Implantation oder eine Spaltbildung den Kontakt verhinderte, wurde entweder an einer Kappenseite oder an beiden Kappenseiten eine deutlich reduzierte Markierung detektiert. Entweder erschien der hyaline Knorpel blassrosa oder zeigte keine Färbung. Das beste Ergebnis erzielte die Gruppe 2. Hierbei zeigten alle Präparate an beiden Kappenrändern eine rote Markierung mit α -Kollagen-II. Nach 3 Monaten Standzeit bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Beschichtungen bezüglich des α -Kollagen-II- Anteils in den 3 Gruppen.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, das Einheilverhalten im ossären und chondralen Gewebe eines metallischen Implantats (Episealer®) in einen lokal begrenzten osteochondralen Defekt zu eruieren. Das chondrale und ossäre Einheilverhalten, unter verschiedenen Beschichtungen (raue-HA-Beschichtung und glatte HA-Beschichtung) bei identischem Titgrundkörper, wurde im Tierversuch histologisch, histomorphometrisch und immunhistologisch untersucht.

Die Überprüfung einer verbesserten Integration der beschichteten Implantate erfolgte anhand der eingangs aufgestellten Hypothesen:

1. Alle Implantattypen zeigen ein gutes bis sehr gutes Einheilungsverhalten in den subchondralen Knochen.
2. Die Integration des Implantats in dem umliegenden Gelenkknorpel ist am besten bei der rauhen HA-Beschichtung, weniger gut bei der glatten HA-Beschichtung und am schlechtesten bei dem reinen Titanimplantat. Die bessere Einheilung zeigt sich einerseits im benachbarten Gelenkknorpel (signifikant weniger Risse, Clusterbildung, Entfärbung, Spaltbildung), aber auch andererseits in der Ausbildung eines mechanisch belastbaren Gewebes im Spalt zwischen Knorpel und Implantat.

5.1 Tiermodell für osteochondrale Defektheilung

Um in dieser Studie das Einheilverhalten des Implantats in einem osteochondralen Defekt beurteilen zu können, muss das Implantat in ein vitales Gelenk eingebracht werden. Nur durch das Wechselspiel zwischen Knorpel, Knochen, Synovia und Implantat unter natürlichen Bedingungen und physiologischen Belastungen konnte das Einheilverhalten analysiert werden. Das Zusammenspiel dieser Faktoren lässt sich in einem *in vitro* Modell nicht nachahmen. Die Durchführung eines *in vivo* Versuchs ist also unabdingbar, um den tatsächlichen Ablauf der Implantationseinheilung im Bereich des subchondralen Knochens, und vor allem im Bereich des Gelenkknorpels, analysieren zu können. Um die Variablen in diesem Zusammenspiel möglichst konstant zu halten, ist ein Tierversuch mit standardisierten Bedingungen unumgänglich.

In zahlreichen Studien zur osteochondralen Defektheilung werden aufgrund von geringeren Versuchskosten Tiermodelle wie kleinere Nagetiere (Maus, Ratte) und Kaninchen bevorzugt (Nam et al. 2004; Spahn et al. 2015; Rudert 2002; Nam et al. 2004; Ito et al. 2005). Mäuse- und Rattenmodelle eignen sich für die Forschung für degradierbare Bioimplantate, die subkutan oder intramuskulär implantiert werden (Spahn et al. 2015). Jedoch sind für diese Studie, die oben genannten Tiermodelle ungeeignet aufgrund der geringen Größe des Gelenks, der geringen Knorpeldicke, einer höheren Regenerationsfähigkeit und des geringen Körpergewichts (Spahn et al. 2015; Gelse et al. 2003; Madry 2010).

Die Auswahl von Schafen als Versuchstiere begründete sich wie folgt:

- Das Schaf ist als Modelltier in der osteochondralen Forschung etabliert und für die traumatologischen und orthopädischen Forschung geeignet (Ahern et al. 2009).
- Die Zusammensetzung des ovinen Knochens ist nahezu identisch mit humanem ossärem Gewebe (Stützle et al. 1998).
- Der operative Zugang ist unkompliziert, das Instrumentarium, das chirurgische Vorgehen und das Implantatdesign kann analog zu humanen Operationen gewählt werden (Allen et al. 1998).
- Der Regenerationsprozess bei adulten Schafen lässt sich mit dem des Menschen vergleichen (Wissing et al. 1990; Morris et al. 2001).
- Es existieren bereits umfangreiche Studien zur Untersuchung des osteochondralen Heilungsverhaltens. Mit der Wahl derselben Spezies schafft man die Voraussetzung, Studien miteinander vergleichen zu können (Nunamaker 1998).
- Schafe haben eine variable Knorpeldicke von 0,7 bis max. 1,4 mm und somit eine stärkere Knorpeldicke als Kaninchen oder kleinere Nagetiere (0,3 mm) (Lu et al. 2000; Frisbie et al. 2006; Moran et al. 2016), diese entspricht bestenfalls 50% der Dicke beim Menschen (2 - 2,5 mm), was entscheidend für die Implantation ist, um einen glatten Übergang zwischen Implantat und hyalinen Knorpel (Shortkroff et al. 1996) zu schaffen.
- Die Wissenschaftler im Julius-Wolff-Institut haben langjährige Erfahrungen mit Schafen als Versuchstieren, was sowohl die Arbeit mit dem Tier (Anästhesie, Analgesie, perioperative Betreuung) als auch mit den postmortalen Proben (histologische und immunhistologische Analyseverfahren) vereinfacht und standardisiert.

Des Weiteren finden sich in der osteochondralen Defektforschung andere Tiermodelle wie Pferde (Barnewitz et al. 2006) und Hunde (Breinan et al. 2000; Breinan et al. 2001), bei denen das Regenerationsverhalten verglichen mit dem Menschen nicht gut dokumentiert ist (Convery et al. 1972b; Breinan et al. 2000; Breinan et al. 2001; Barnewitz et al. 2006). Außerdem ist die operative und post operative Versorgung beim Pferd im Vergleich zu Schafen um ein Vielfaches teurer. Das Tiermodell „Hund“ hat den Nachteil, dass die Tiere auch unter Analgesie die Gliedmaße über längere Zeit schonen. Schafe hingegen belasten als Herdentier/ Fluchttier sofort nach der Operation unter einer guten Analgesie die operierte Gliedmaße (Breinan et al. 2001; Breinan et al. 2000).

Für diese Studie wurden 24 weibliche Merino-Mix-Schafe im Alter von 2 Jahren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75,8 kg ausgewählt. Das Schaf gilt mit einem Alter von 12 Monaten als ausgewachsen. In einem Alter von 2 Jahren ist das Wachstum abgeschlossen und hat somit keinen Einfluss mehr auf das Regenerationsverhalten des hyalinen Knorpels. Die Auswahl weiblicher Tiere lag im Gruppenverhalten und der Konfliktvermeidung in der postoperativen Phase der gemeinschaftlichen Haltung begründet. Eine mögliche Trächtigkeit der Tiere wurde durch die Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin im Vorfeld mittels sonographischer Untersuchung ausgeschlossen. In der Gesamtheit ist das gewählte Tiermodell als geeignet zu betrachten, jedoch kann man die gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen. Dabei müssen die Grenzen einer strukturellen und anatomischen Vergleichbarkeit zwischen humanen und ovinen Kniegelenk in der Forschung beachtet werden. Auch die geringen Fallzahlen von $n=7$ in Gruppe 3 und jeweils $n=8$ in Gruppe 1 und 2 Tieren wirft die Frage der statistischen Aussagekraft auf. In dieser Studie kann ausschließlich eine Aussage über die beginnende Einheilung nach 3 Monaten Standzeit getätigt werden. Diese Resultate müssen in weiteren Studien durch eine längere Standzeit und größeren Gruppenzahlen überprüft werden.

5.2 *Operation und Operationstechnik*

Das Studiendesign ermöglicht einen standardisierten Ablauf. Der operative Zugang erfolgte bei jedem Tier identisch an der rechten Hinterextremität. Die Operationsmethode wurde analog zur humanen Operationsmethode übernommen und durchgeführt. Der Defekt wurde in der lasttragenden medialen Femurkondyle des rechten Kniegelenks platziert. Die Dimension des Defektes orientiert sich zum einen an den aktuell verfügbaren, klinisch etablierten Werkzeugen für den Einsatz des Implantats und zum anderen an der repräsentativen Defektgröße in Relation zum gesamten lasttragenden Bereich. Die mediale Femurkondyle wurde aufgrund des leichteren operativen Zugangs gewählt, da durch schaftypische anatomische Gegebenheiten (Fettkörper, Ligamenta) die laterale Kondyle schwerer zugänglich ist (Allen et al. 1998). Aufgrund der individuellen anatomischen Gegebenheiten konnte das Implantat nicht immer zentral in die mediale Femurkondyle platziert werden. Die kreierte osteochondralen Defekte unterschieden sich in ihrer Defekttiefe (Median 14 mm \pm 3 mm). Der Durchmesser des osteochondralen Defekts war auf 7,5 mm festgelegt. Die für die Studie verwendete Defektgröße wurde für eine Standardgröße des Implantats und im kritischen Bereich gewählt. Das bedeutet, dass bei dieser Defektgröße keine Spontanheilung mehr möglich ist (Lind et al. 2008). Die Defekttiefe gewährleistet eine gute Verankerung des Implantats mittels Press-Fit-Verfahren in das ossäre Lager und ermöglicht einen bündigen Abschluss mit dem hyalinen Gelenkknorpel (Outerbridge et al. 1995; Martinek 2003; Burkart et al. 2001). Nicht bei allen Tieren konnte dieser bündige Abschluss erreicht werden. Ein minimaler Implantatüberstand und eine Spaltbildung waren die Folge. Auf einen Leerdefekt wurde bewusst verzichtet, da bereits in vielen Studien (Convery et al. 1972b; Depalma et al. 1966; Jackson et al. 2001) nachgewiesen wurde, dass ein Defekt in diesem Ausmaß nicht spontan heilt. Außerdem verursacht ein ungefüllter Defekt aufgrund der offenliegenden Knochensubstanz, in der zahlreiche Nerven verlaufen, mehr Schmerzen als ein gefüllter Defekt. Daher wurde entschieden, dass eine Studie ohne Leerdefekt wissenschaftlich vertretbar ist. Auch auf weitere chirurgische Manipulationen in Gelenk, wie z.B. ein weiteres Implantat in der lateralen Femurkondyle, wurde bewusst verzichtet. Die postoperative Versorgung und Haltung war für alle Tiere gleich. Einen Einfluss auf die Einheilung dürfte es nicht geben.

5.3 *Implantat und Instrumentarium*

Die Verwendung einer „Mini-Prothese“ zum Verschluss großer osteochondraler Defekte zur Schmerzreduktion zeigt einen neuen alternativen Weg, um einen massiven Gewebsverlust durch ein künstliches Kniegelenk zu verhindern. Ein Vorteil des Episealers® in Vergleich mit anderen Studien die das Einheilverhalten von regenerativen Implantaten (Scaffold, OATS, Chondrozyten) untersuchten ist, dass in diesem Verfahren keine Spenderregion oder ein Anzuchtmedium benötigt wird. Im Vergleich zu anderen Studien (Christensen 2016; Kazemnejad et al. 2016; Christensen et al. 2012), die eine Füllung des Defektes mit regenerationsfördernden Materialien (körpereigen oder körperfremd) untersuchen, ist der Ansatz der vorliegenden Studie einen lokalen osteochondralen Defekt mittels eines Titanimplantats abzudichten, um das Fortschreiten der Osteoarthritis zu verlangsamen. Dafür wurden eigens für diese Studie die Implantate und Instrumente für die Implantation durch die Firma Episurf © Medical AB hergestellt. In der Humanmedizin werden patientenspezifische Implantate nach einer MRT-Untersuchung des Knies hergestellt. In dieser Studie wurde durch CT-Auswertungen die Gelenkkurvatur der medialen Femurkondyle von Schafen gemessen und anhand dieser Daten die Oberflächenkurvatur des Implantats zur Gelenkkurvatur angepasst. Final entstand ein Implantat mit einem Durchmesser von 7,5 mm und 13 mm Länge. Durch das Press-Fit-Verfahren wird eine optimale Integration ermöglicht, ohne eine zusätzliche Fixierung (z.B. Periostlappen bei Chondrozytentransplantation). Eine Schädigung des umliegenden Gewebes ist mit diesem Verfahren nahezu ausgeschlossen. In annähernd allen Fällen war die Passform ideal, jedoch stellte sich bei einigen Tieren eine Divergenz zwischen Gelenkkurvatur und Implantatoberfläche ein. Die Folge war eine Spaltbildung oder ein Implantatüberstand, der bei einem Tier der Studie eine Verletzung der gegenüberliegenden Gelenkoberflächen verursachte. Ob die falsche Wölbung der Kappe oder die dezentrale Platzierung Grund für diese Problematik ist, bleibt unklar. Für zukünftige Untersuchungen sollte, wenn möglich, die Passform pro Tier individuell angepasst werden.

Ein weiterer beeinflussender Faktor ist die Fixation des Epiguids (Schablone) mittels Fixierungsdrähten in die mediale Femurkondyle. In der makroskopischen Beurteilung befand sich im Sektor 1 eine punktuelle Einschmelzung, die vermutlich durch die Gewebetraumatisierung durch den Fixierungsdraht bedingt war. In histologischen Präparaten konnten in der Peripherie Knochenzysten detektiert werden, die mit der Lokalisation der Fixierungsdrähte vereinbar sind. Die Knochenzysten hatten keinen Einfluss auf die Integrität

des Implantats, da sie nicht im unmittelbaren örtlichen Zusammenhang mit dem Implantat standen. Jedoch sollte bei weiteren Studien eine andere Fixationsmethode angewendet werden, um eine Langzeitschädigung in der Peripherie zu vermeiden.

Für diese Studie wurde eine Implantatbeschichtung mit Hydroxylapatit verwendet. Eine HA-Beschichtung verbessert die Einheilung in den Knochen (Schmidmaier et al. 2002). Alle Implantate hatten eine HA-Beschichtung im Bereich des Pins, nur Gruppe 1 (raue Beschichtung) und Gruppe 2 (glatte Beschichtung) wiesen eine HA-Beschichtung auch an den Seitenrändern der Kappe auf. Die HA-Beschichtungen unterscheiden sich nur in ihrer Rauigkeit, andere Parameter wie Ca/P-Verhältnis, Kristallinität und Porosität, die die Heilung ebenfalls beeinflussen, waren identisch, um wirklich nur den Einfluss der Rauigkeit auf die Implantateinheilung untersuchen zu können. Im Gesamtbild war die Integration des Pins bei allen Tieren im ossären Bereich sehr gut. Eine Osteolyse oder Lockerung des Implantats wurde bei keinem Tier beobachtet. Somit bestätigte sich, dass die HA-Beschichtung im ossären Gewebe das Einheilverhalten fördert. Die Wirkung der Beschichtung auf den Gelenkknorpel ist bis zum heutigen Zeitpunkt kaum untersucht. Hydroxylapatit beschichtete Scaffolds scheinen in osteochondralen Defekten auch die Knorpelregeneration zu fördern (Kon et al. 2010a; Kon et al. 2010b; Taniyama et al. 2015; Wei et al. 2015). Durch die Beschichtung gelingt eine Verzahnung des umliegenden Gewebes mit der Implantatbeschichtung. Der Verzahnungseffekt trägt dazu bei, eine „gewebige“ Verbindung zwischen Knorpel und Implantat entstehen zu lassen. Aufgrund des geringen Proliferationspotentials des hyalinen Gelenkknorpels besteht dieses Gewebe zwischen Knorpel und Implantat nicht aus hyalinem Knorpel, sondern eher bindegewebigen oder faserknorpelartigen Fasern. Die feste Anheftung der Kollagenfasern dieses neugebildeten Gewebes sowohl an den Knorpel als auch an den Implantatkörper schirmt den darunterliegenden Knochen gegen die aggressive Synovia ab und ist zugleich elastisch genug um die Relativbewegungen zwischen Knorpel und Implantat auszuhalten. Tendenziell zeigten die Implantate mit Beschichtung einen ausfüllenden Charakter. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungen gefunden werden. Lediglich zeigte die Gruppe 2 ein tendenziell besseres Ergebnis als die unbeschichtete Gruppe.

In zukünftigen Studien sollten die Ergebnisse durch eine größere Proben- und Gruppenzahl verifiziert oder negiert werden. Des Weiteren gestaltete sich der Knorpelschnitt nicht bei jeder Operation optimal. Intraoperativ zeigte sich der hyaline Knorpel in wenigen Fällen fibrilliert. Post mortem zeigte sich im makroskopischen Bild, dass ein halbmondförmiger oberflächlicher Einschnitt in den hyalinen Knorpel außerhalb des gesetzten Defektes erfolgt war. Für folgende Studien sollte der Knorpelschneider im Design durch eine präzisere Schneidefläche optimiert werden. Die Verankerung mittels Press-Fit-Verfahren des Implantats in das ossäre Lager war bei allen Tieren, wie in anderen Studien, ohne Komplikationen durchführbar (Laprell und Petersen 2001; O'Driscoll und Fitzsimmons 2001).

5.4 Probengewinnung und Aufbereitung

Die Gewinnung der Proben verlief bis auf einige Ausnahmen ohne Probleme. Die Lage des Pins im Präparat musste beim Sägen geschätzt werden, da die Implantatkappe die Ausrichtung überdeckte. Dadurch enthielten einige Präparathälften nur die Implantatkappe ohne den Pin. Für die weitere Aufarbeitung der Präparate war dies nicht weiter Relevant. Die Auswertung der Präparate konzentrierte sich auf das Einheilverhalten im Bereich der Seitenkappen. Die Einbettung in einem Medium auf Methylmethacrylatbasis (Technovit) funktionierte reibungslos. Hierbei war darauf zu achten, dass sich keine Lufteinschlüsse während des Auffüllens im Kunststoff bildeten. Die weitere Aufarbeitung (Schleifvorgang) war trotz des Metallimplantats ohne Probleme möglich. Auch der Materialverlust hielt sich in Grenzen, lediglich von 48 hergestellten Schlifften musste bei 2 Präparaten der Dünnschliff erneut hergestellt werden. Anders verhielt sich das bei den Paraffinblöcken. Diese waren teilweise mit dem Mikrotom nicht schneidbar. Es stellte sich heraus, dass sich durch den Sägeschnitt freiliegende Metallsplinter an der Sägekante angesammelt hatten. Dadurch zerrissen einige Präparate während des Schneidens. Diese Paraffinblöcke mussten wieder aufgelöst und erneut eingebettet werden. Möglicherweise kam es während dieses Prozesses zu strukturellen Veränderungen im Bereich des Knochens und Knorpels. Hierbei flossen neben den Standardfärbungen Giemsa-Färbung und Toluidinblau-Färbung noch die immunhistologische Markierung von α -Kollagen-II in die histologische Bewertung mit ein. Die angefertigten Färbungen eigneten sich zur Darstellung von Knorpelgewebe, mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe sowie verschiedener Zell- und Gewebeanteile (Koch et al. 2010; Hoffmann et al. 2008). Die oben genannten Färbeprotokolle werden oft zur Beurteilung der Regeneratqualität eingesetzt und gelten aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit und Selektivität als bewährte Methoden (Shapiro et al. 1993; O'Driscoll et al. 1986). Die Toluidinblau-Färbung findet häufig in der Knorpelhistologie Anwendung. Der Gehalt an Proteoglykanen lässt sich anhand der Intensität seiner Anfärbung schätzen und ermöglicht somit einen Vergleich verschiedener Präparate miteinander (Koch et al. 2010; Hoffmann et al. 2008). Bei der Immunhistologie zeigten die verwendeten Antikörper eine positive Markierung. Mit jedem Durchgang wurde eine Negativkontrolle gefärbt, die die Spezifität der AK sicherte.

5.5 Histomorphometrie

Für die Histomorphometrie wurden pro Tier je zwei nach Giemsa gefärbte Dünnschliffpräparate ausgewertet. Die Identifizierung der einzelnen Gewebeanteile erfolgte auf Grund der differenzierenden Färbung. Für die histomorphometrische Untersuchung wurde ein eigens für diese Studie entwickeltes Computerprogramm (Makro) erstellt. Durch die computergestützte Auswertung konnte eine objektive und standardisierte Auswertung der Gewebeanteile (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen, Bindegewebe und ossäres Gewebe) erfolgen. Die histomorphometrische Auswertung bezog sich nur auf den Bereich der lateralen ROI, die ausschließlich die Seitenkanten der Implantatkappe enthielt, wo sich hyaliner Knorpel, mineralisierter Knorpel und Knochengewebe zeigte. In dieser Region wurden die Kontaktflächen zwischen Seitenkappe und umliegendem Gewebe gemessen und beurteilt. Die innere ROI wurde gemessen, aber in der Bewertung vernachlässigt, da alle Implantate eine sehr gute ossäre Integration aufwiesen. Alle Implantate waren mit derselben Beschichtung im Bereich des Pins versehen und zeigten in dieser Region sowie der Kappenunterseite keine Unterschiede. Im Vergleich mit Studien die das Einheilverhalten von regenerativen Scaffolds (Jansen 2009) untersuchten, gestaltete sich das Einzeichnen der verschiedenen Kontaktflächen in der vorliegenden Studie problemlos. Es lag in der vorliegenden Studie eine gute Abgrenzung zwischen Implantat und umliegendem Gewebe vor. Zu den Fehlerquellen der Histomorphometrie zählen nachträgliche manuelle Korrekturen und ungenaue Messungen der Kontaktflächen, die zur Verfälschung der tatsächlichen Gewebekontaktflächen führen könnten. Eine weitere Fehlerquelle bestand aus der subjektiven Beurteilung der Untersucher im Hinblick auf die nicht gut abgegrenzten Kontaktflächen zwischen Implantat/hyalinen Knorpel und Implantat/Leerfläche. Eine geringe Abweichung der ermittelten Werte von den tatsächlichen Werten ist denkbar. Strukturen oder Prozesse, die sich außerhalb der ROI befanden, wurden als degenerative Veränderung gesondert gewertet. Dazu zählten hauptsächlich ein verändertes Färbeverhalten, periphere Knochenzysten oder periphere Veränderungen in der Knochenstruktur.

5.6 *Semiquantitativer Score*

Ein Bewertungssystem sollte grundsätzlich valide und reproduzierbar sein, auch bei Benutzung durch verschiedene Untersucher. Der Schwachpunkt von semiquantitativen Scores ist, dass hierbei biologisches Verhalten in ein starres Punktesystem eingeordnet wird. Fließende Übergänge können dabei nicht berücksichtigt werden. Jedoch hat sich auf Dauer die Score-Auswertung zur Bewertung von biologischem Verhalten sowie zum Studienvergleich in der Medizin etabliert. Die Beurteilung von histologischen Übersichtsfärbungen erfolgte in früheren Studien ausschließlich deskriptiv (Convery et al. 1972a). Im Laufe der Zeit fügten einige Autoren immunhistologische Untersuchungen hinzu (Tägil und Aspenberg 1999; Franceschi et al. 2005). Um jedoch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurden unterschiedlichste semiquantitative Scores eingeführt (Rudert 2000; O'Driscoll 1998; Moojen et al. 2002). Neben ersten einfachen Scores wie z.B. nach Pineda, die den natürlichen Heilungsprozess des Regenerats in nur 4 Kriterien nutzten, wurden im Laufe der Zeit umfangreichere und detailliertere Bewertungssysteme aufgestellt (Pineda et al. 1992). Ein umfangreiches Scoresystem mit 9 Beurteilungskriterien wurde 1988 von O'Driscoll et al. erstellt (O'Driscoll et al. 1988). Alle Bewertungssysteme haben die Schwäche, dass der zu untersuchende Bereich (Defektrand, Defektmitte etc.) nicht eindeutig definiert ist. Somit können bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn nur der Defektrand beurteilt wurde, wo hingegen die Defektmitte deutlich schlechtere Ergebnisse ergab. Um die Knorpelläsion rein **makroskopisch** beurteilen zu können, wurde von der International Cartilage Repair Society (Brittberg et al. 2000a; Brittberg et al. 2000b) ein Bewertungssystem ausgearbeitet. Der Score dient zur Klassifizierung von chondralen und osteochondralen Defekten nach einem chirurgischen Eingriff und bewertet die cartilaginären Reparaturmechanismen. Für die ICRS-Klassifizierung der Reparaturmechanismen werden 3 Parameter beurteilt: I.) Grad der Reparatur nach Operationstechnik, II.) Integration bis zur Grenzschicht und III.) das makroskopische Aussehen des hyalinen Knorpels. Die höchste Punktzahl (4 Punkte) des Bewertungssystems beschreibt ein dem hyalinen Knorpel entsprechendes Regenerationsgewebe nach erfolgter chirurgischer Intervention. Der niedrigste Wert liegt bei 0 Punkten und steht für keine Defektfüllung mit abnormaler Regeneration. Summiert man die Punkte, so könnte eine maximale Gesamtpunktzahl von 12 Punkten erreicht werden.

Für die **makroskopische Auswertung** wurde der Bewertungsbogen in Anlehnung an das ICRS-Bewertungssystem (Brittberg et al.) modifiziert. Dabei wurde das Kriterium (I)“Grad der Reparatur“ aus dem Score entfernt und durch den ICRS-Einteilung der „Defekttiefe“ ersetzt (Brittberg et. al 2000). Der Grund für diese Entscheidung war, dass es sich um ein palliatives Osteoarthroseimplantat handelte, welches den Defektbereich verschließt. Eine Regeneration des osteochondralen Defekts wird in dieser Studie nicht angestrebt. Die Kriterien II und III wurden in den Score übernommen und für die visuelle Beurteilung des angrenzenden hyalinen Knorpels genutzt. Aufgrund des Studiendesigns wurde der osteochondrale Defekt iatrogen immer in derselben Region gesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Implantatbeschichtungen zu gewährleisten. Die Wahl der Lokalisation eines „künstlich gesetzten“ osteochondralen Defekts unterscheidet sich maßgeblich von natürlichen Defekten, die nicht an standardisierten Lokalisationen im Knie entstehen. Dieser Umstand wurde in der Untersuchung und Auswertung berücksichtigt. Neben den Dünnschliffpräparaten wurden auch die Paraffinschnitte zur deskriptiven histologischen Beurteilung des Einheilverhaltens herangezogen. Dabei ist zu bedenken, dass die Schnitte nur aus einer Probenhälfte und aus unterschiedlichen Ebenen des Paraffinblocks stammten.

Die **histologische Bewertung** der Dünnschliffpräparate erfolgte in Anlehnung an den Score von O’Driscoll et. al. (O’Driscoll et al. 1988) und dem Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003). Der von O’Driscoll et. al. (O’Driscoll et al. 1988) eingeführte Score wird häufig bei der **histologischen Auswertung eines Knorpelregenerats** (biologische und synthetische Trägersubstanzen) verwendet (Rudert 2000; Wilms 2002). Er enthielt eine Vielzahl von Beurteilungskriterien wie die Zellmorphologie, die Oberflächenbeschaffenheit, die strukturellen Charakteristika des Knorpelregenerats, die Bindung zum angrenzenden Knorpel und die zellulären Veränderungen als Anzeichen einer Degeneration. In dieser Studie konzentrierten sich die Untersuchungen auf **die Gewebe-Implantat-Kontaktflächen** im Bereich der Seitenkappen und des Pins. Im Kriterium hyaliner Knorpel wurde besonders die Knorpelqualität im direkten Implantatkontakt untersucht. Eine Zusammenhangstrennung, Hyperzellularität und schlechte Färbbarkeit wurden mit einem Punktabzug gewertet. Wurde eine einseitige oder beidseitige Spaltbildung festgestellt, wurde dies ebenfalls als ungünstig für das Einheilverhalten gewertet. Dabei wurde unterschieden, ob die Gefahr einer Implantatlockerung bestand oder der Spalt sich mit Bindegewebe gefüllt hatte. Weitere Punktabzüge folgten, wenn der kalzifizierte Knorpel frakturiert war und daraus ein Synoviaeinstrom erfolgte. Fand sich eine gute Adaptation zwischen der Implantatbeschichtung

und dem umliegenden Gewebe, so wurde dies als positiv gewertet. Auch eine starke Trabekelanhaftung der Spongiosa wurde als positiv gewertet. Veränderungen, die nicht die Kontaktflächen betrafen, wurden nur aufgeführt und als degenerative Veränderungen gesondert betrachtet.

Es ist aber zu beachten, dass in anderen Studien die Scoresysteme von O'Driscoll und Mainil-Varlet zur Beurteilung von regenerativen Implantaten genutzt wurden (Mainil-Varlet et al. 2003; Mainil-Varlet et al. 2010; O'Driscoll et al. 1988). Der Schwerpunkt lag dabei nicht nur auf der Beurteilung der Kontaktflächen zum Implantat, sondern auch auf der Regeneratshomogenität und Oberfläche. Das verwendete Implantat in dieser Studie lässt sich nur bedingt mit regenerativen Implantaten anderer Studien vergleichen (Christensen 2016; Kazemnejad et al. 2016; Christensen et al. 2012). Es können jedoch Parallelen bei der Beurteilung der Kappenträger gezogen werden. Hierbei sind das Einheilverhalten, die Integration und die Gewebereaktion an den Randflächen vergleichbar. Durch den Verzicht des Kriteriums der Regeneratqualität im osteochondralen Defekt konnten die Scoresysteme von O'Driscoll und Mainil-Varlet modifiziert für diese Studie genutzt werden (O'Driscoll et al. 1988; Mainil-Varlet et al. 2003; Mainil-Varlet et al. 2010). In Zukunft sollten für nicht regenerative Implantate weitere Modifikationen von etablierten Scoresystemen erfolgen. Dadurch kann das starre Scoresystem weiter an eine zukünftige Studie angepasst werden.

5.7 Ergebnisse

5.7.1 Makroskopie

In der makroskopischen Beurteilung schnitten alle 3 Gruppen ähnlich gut ab. Der hyaline Knorpel stellte sich in der makroskopischen Untersuchung nach der 3-monatigen Standzeit unauffällig dar. Durch das Implantatdesign und den standardisierten Operationsvorgang konnten nur dezente Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Abzüge in der Bewertung wurden bei einer Spaltbildung, Fibrillation oder Aufwölbung des hyalinen Knorpels sowie ein Implantatüberstand vorgenommen. Bei mehreren Präparaten stellte sich ein exzentrischer Knorpelschnitt im 2. Quadranten dar, welcher durch den Knorpelschneider induziert wurde. Bedingt war diese Verletzung durch das Design des Knorpelschneiders, wodurch ein Fehlschnitt im 2. Quadranten provoziert worden war. In zukünftigen Studien muss das Design überdacht werden, um eine zusätzliche Verletzung des Knorpels zu vermeiden. Die Integration des Implantats war in allen Quadranten komplett oder wurde mit einem Spalt $< 1\text{mm}$ bewertet. Die Spaltbildung war entweder durch eine zu tiefe Implantation oder durch ein Missverhältnis zwischen Gelenkkurvatur und Oberflächenkrümmung der Implantatkappe bedingt. Eine zu tiefe Implantation beeinflusste die Implantatintegration und makroskopische Beurteilung negativ, was zur Folge hatte, dass die umliegenden cartilaginären Strukturen aufgewölbt waren. Es bildete sich ein Spalt zwischen Implantat und Gewebe. Diese Reaktionen des hyalinen Knorpels konnten auch in Studien, die das Einheilverhalten von regenerativen Implantaten untersuchten, beobachtet werden (Jansen 2009). Nur ein Tier in Gruppe 1 bildet die Ausnahme. Die Spaltbildung war $> 1\text{mm}$ und erreichte signifikant weniger Punkte als die Gruppe 2. In diesem Fall war die niedrige Wertung auch durch einen starken Implantatüberstand bedingt. Allein durch die makroskopische Bewertung konnten keine ausreichenden Aussagen über das Einheilverhalten der Implantate und das Verhalten des umliegenden Gewebes auf die Implantatbeschichtung getroffen werden (Jansen 2009). Zukünftig sollte der standardisierte Vorgang zur Ermittlung der Bohrtiefe optimiert werden, um eine exakte Implantattiefe zu gewährleisten.

5.7.2 Histologie

Der Fokus der Studie lag auf der HA-Beschichtung mit verschiedenen Oberflächenstrukturierungen und der Reaktion des umliegenden Gewebes. Hydroxylapatit wird häufig zur Beschichtung von Endoprothesen genutzt und ist aufgrund eines knochenneubildenden Effekts in der Chirurgie etabliert (Schmidmaier et al. 2002; Groot et al. 1987; Søballe et al. 1992). In dieser Studie übten die unterschiedlichen Oberflächenstrukturierungen der HA-Beschichtung einen positiven Effekt nicht nur auf das ossäre Gewebe, sondern auch auf das chondrale Gewebe aus. Dieser bisher nicht beschriebene Effekt war in der deskriptiven Histologie darstellbar und in der Histomorphometrie anhand der Länge der Gewebegrenzen messbar. Der hyaline Knorpel im direkten Implantatkontakt stellte sich überwiegend in der Gruppe 3 in der deskriptiven Beurteilung entfärbt, hypozellulär und mit Clustern dar. Dies begründet sich zum einem durch die fehlende Beschichtung auf der Implantatkappe und zum anderem durch den iatrogenen Defekt. Das Trauma führte zu Störungen im Knorpelmetabolismus. Dies wurde in der vorliegenden Studie geplant, da hierdurch ein realer Defekt nachgeahmt wurde. In dieser Studie wurden geringe Veränderungen im hyalinen Knorpel akzeptiert. Punktabzüge fanden sich bei fehlendem Kontakt zum Implantat (Spaltbildung) oder Anzeichen einer starken Degeneration des hyalinen Knorpels. Hierzu zählten ein vermehrtes Auftreten von Chondrozytenclustern, keine Anfärbung des hyalinen Knorpels, deutliche Hyperzellularität bis Azellularität oder strukturelle Veränderungen der Oberfläche (Convery et al. 1972a).

In den beschichteten **Gruppen 1 und 2** konnte in nahezu allen Präparaten ein enger Kontakt ohne Spaltbildung zwischen ossärem Gewebe/ kalzifiziertem Knorpel und dem Implantat beobachtet werden. Entlang des Pins und Kappenunterseite bildete sich eine feste Trabekelstruktur nach 3 Monaten Standzeit aus. In der **deskriptiven Histologie** der Paraffinschnitten wurden vermehrt Osteozyten und Osteoblasten im ossären Gewebe vorgefunden, welche für eine Knochenumbildung (Bone Remodeling) sprachen (Frost et al. 1969; Swieszkowski et al. 2007). Somit bestätigt die Studie, dass die Oberfläche der HA-Beschichtung eine sehr gute Kontaktfläche für das umliegende ossäre Gewebe bietet (Moroni et al. 1994). Entscheidend für die Stabilität des Implantats im Implantatlager stellt sich auch die kalzifizierte Knorpelamelle dar. Es stellte sich in der Studie heraus, dass eine intakte Lamelle eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Einheilung spielt. Besteht ein fester Kontakt zwischen Implantat und kalzifiziertem Knorpel, wird ein Einstrom von Gelenkflüssigkeit verhindert und die darunterliegenden Gewebe geschützt. Zusätzlich bleiben die

biomechanischen Eigenschaften des subchondralen Knochen, wie die Vaskularisation und Funktion eines Stoßdämpfers (Imhoff et al. 2000; Gomoll et al. 2010) erhalten. Entscheidend ist hierfür nicht nur die Beschichtung, sondern auch die Implantationsrichtung/-tiefe. Eine falsche Implantationstiefe führt dazu, dass zum einen die Gelenkkurvatur nicht exakt nachgebildet wird und zum anderen fehlt der Kontakt zum umliegenden Gewebe. Gerade bei einer zu tiefen Implantation konnte ein exakter Anschluss an die kalzifizierte Knorpellamelle nicht erfolgen. Die Folge daraus ist ein vermehrter Einstrom von Gelenkflüssigkeit und dem Cartilage Flow Phänomen im Randbereich (Jackson et al. 2001). Dies scheint ein mechanisch induziertes Phänomen zu sein, das zur Verminderung der Defektgröße beiträgt (Bruns et al. 1997). Des Weiteren zeigten die Präparate, bei denen die Implantation zu tief oder zu hoch war, in der deskriptiven Histologie einen höheren Anteil an Fibrozyten im Bereich der Seitenkappen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass kein Kontakt zum ossären Gewebe innerhalb der Einheilungsphase gegeben war. Es hat sich dabei ein mechanisch belastbares Bindegewebe ausgebildet. In einem Präparat der Gruppe 2 stellte sich ein starker Gelenkflüssigkeitseinbruch mit umliegenden nekrotischen Knochengewebe dar. Dieser Verlauf spricht für diese zerstörende Kraft der eindringenden Synovialflüssigkeit. Die Vaskularisation im ossären Gewebe, welcher Grundvoraussetzung für die Remodelingprozesse des Knochens ist, wird dadurch gestört (Swieszkowski et al. 2007).

Die **histomorphometrische Auswertung** zeigte ebenfalls, dass der überwiegende Anteil an ossärem Gewebe dem Implantat anlag. Dies erklärte sich zum einem durch die anatomischen Gegebenheiten und war somit zu erwarten. Zum anderem reichte der Anteil an gemessener Kontaktfläche von Bindegewebe zum Implantat von 0-70%. Der höchste Wert wurde bei einem Tier der Gruppe 2 gemessen, das an den seitlichen Kappenrändern keinen ossären Kontakt zum Implantat aufwies. In diesem Präparat sind eine Instabilität und ein schrittweiser Ersatz durch Bindegewebe denkbar. Bei den Präparaten, die einen ossären Kontakt mit dem Implantat zeigten, lag immer ein gewisser Anteil an Bindegewebe zwischen den Knochen trabekeln. Dies ist charakteristisch für den subchondralen Bälkchenknochen und essentiell für die Absorption von Stößen sowie für die ossäre Versorgung (Imhoff et al. 2000). Die histomorphometrische Auswertung zeigte signifikant weniger Leerfläche in Gruppe 1 (raue HA-Beschichtung) als in Gruppe 3 (unbeschichtetes Implantat). Dies war auf die geringere Spaltbildung zwischen beschichtetem Implantat und umliegendem Gewebe zurückzuführen. In den Gruppen 1 und 2 wurde mehr Kontaktfläche zum hyalinen und kalzifizierten Knorpel, mineralisierten Knochen und weniger Leerfläche gemessen. Eine statistische Signifikanz zwischen den Beschichtungen

in den einzelnen Parametern konnte nicht vorgefunden werden. Hingegen stellte sich bei einem Vergleich zwischen Gruppe 3 und den zusammengefassten Gruppen 1+2 eine statistische Signifikanz im Parameter Leerfläche heraus. Somit konnte die eingangs aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Alle anderen Ergebnisse unterschieden sich nicht oder nur tendenziell. In zukünftigen Studien sollten diese Tendenzen durch eine größere Probenzahl weiter untersucht und in ihrer Aussagekraft verifiziert werden.

5.7.3 Modifizierter Score Dünnschliffpräparate

Die Auswertung der einzelnen Parameter wurde mit Hilfe eines modifizierten Scores in Anlehnung an O'Driscoll (O'Driscoll et al. 1988) und dem Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003) durchgeführt. Die Modifikation wurde auf die Besonderheiten des Studiendesigns und des Implantats angepasst. Beurteilt wurden neben dem Gesamteindruck auch die Implantatintegrität und die Qualität (Zellularität, Anfärbbarkeit und Zellverteilung) des umliegenden Gewebes, mit besonderem Augenmerk auf die Vitalität des hyalinen Knorpels und die Kontaktflächen des Implantates zum umliegenden Gewebetyp (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen).

Die Punkteverteilung für die einzelnen Kriterien und der Gesamtscoresumme waren in allen 3 Gruppen annähernd gleich. Dieses Ergebnis spricht für das Implantatdesign, welches durch seine Form eine gute Integration, ein gutes Einheilverhalten und damit eine homogene Punkteverteilung begünstigt. Die **Gruppe 2** zeigt tendenziell eine höhere Punktzahl im Kriterium Abwesenheit degenerativer Veränderungen im Vergleich zu Gruppe 3. Die Präparate der Gruppe 2 zeigten sowohl im chondralen als auch im ossären Gewebe ein stabiles Implantat Interface, was für ein gutes Einheilverhalten spricht. Wie bereits in anderen Studien bestätigt, übt auch in dieser Studie die HA-Beschichtung durch die Oberflächenstruktur einen osteoinduktiven Effekt aus (Gunther, et al. 1998). Ist durch eine ideale Implantationstiefe der direkte Kontakt zum umliegenden Gewebe gegeben, so wird die Anheftung des subchondralen Knochens und der kalzifizierten Knorpellamelle durch die Oberflächenstrukturierung begünstigt. Dies hatte wiederum die Folge, dass der hyaline Knorpel weiterhin den Druckbelastungen standhalten konnte und somit geringere Degenerationsanzeichen aufwies. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Implantatbeschichtung das subchondrale Gewebe intakt blieb und dadurch die Vitalität des Knorpels begünstigt wird. Dafür spricht die tendenziell bessere Knorpelqualität der Gruppe 2 verglichen mit Gruppe 3. In der Gruppe 2 wurde somit der positive Effekt der Beschichtung auf den hyalinen Knorpel histologisch durch geringere degenerative Veränderungen im hyalinen Knorpel (weniger Risse, Clusterbildung und Entfärbung) nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch in der Scorebewertung keine statistische Signifikanz. In zukünftigen Studien sollte diese Tendenz der Gruppe 2 mit größeren Versuchsgruppen validiert oder auch negiert werden.

5.7.4 Immunhistologie

In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich eine homogene Markierung des hyalinen Knorpels. Daraus konnte in der vorliegenden Studie die geringe Degeneration des hyalinen Knorpels nach 3 Monaten Einheilzeit dargestellt werden. Ein hoher Kollagen-II-Gehalt gibt Aufschluss über die Vitalität des hyalinen Knorpels (Rudert 2002). Dabei schnitten im Score nach Rudert die Präparate der beschichteten Gruppen 1 und 2 geringfügig, jedoch nicht signifikant besser ab, als die Gruppe mit den unbeschichteten Implantaten. Der Score von Rudert konnte gut angewendet werden. Ein Nachteil des semiquantitativen Scores bestand in der Ungenauigkeit und in der begrenzten Möglichkeit an Abstufungen. Bei sogenannten Grenzfällen könnten zwischen den Untersuchern die Bewertungen des Scores differieren. Besonders bei den immunhistologischen Präparaten bestand ein höherer Anteil an sogenannten Grenzfällen. Dabei könnten einige Präparate schlechter bzw. besser abgeschnitten haben. In der Gesamtheit konnte ein Zusammenhang zwischen Implantatkontakt und hyalinen Knorpel vermutet werden. Bestand kein Kontakt zwischen Implantat und umliegenden Gewebe, zeigte sich die jeweilige Seite deutlich geringer mit α -Kollagen II markiert. Des Weiteren wurden in der α -Kollagen II Markierung kleine Knorpelinseln im ossären Gewebe markiert. Dies bestätigt wiederum den bereits histologisch nachgewiesenen Umbauprozess (Bone Remodeling) im ossären Gewebe (Swieszkowski et al. 2007; Imhoff et al. 2000).

5.8 Schlussfolgerung

Die Studie ermöglicht, eine Aussage über das Einheilverhalten eines metallischen Implantats mit differierenden Oberflächenbeschichtungen in einen osteochondralen Defekt zu treffen. Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass alle Implantattypen ein gutes bis sehr gutes Einheilverhalten in den subchondralen Knochen zeigten, hat sich bestätigt. Die zweite Hypothese, dass die Integration in den umliegenden Gelenkknorpel am besten bei der rauhen HA-Beschichtung, weniger gut als bei der glatte HA-Beschichtung und am schlechtesten bei dem reinen Titanimplantat ist, konnte zum Teil bestätigt werden.

Es stellte sich in der Studie heraus, dass die Implantationstiefe, der Erhalt der kalzifizierten Knorpellamelle, ein vitaler subchondrale Knochen und die Hydroxylapatit-Beschichtung, unabhängig von der Rauigkeit, essentiell für eine gute Einheilung waren. Ein Zusammenspiel dieser Faktoren begünstigt und erhält weitestgehend die Vitalität des darüberliegenden hyalinen Knorpels. Auch in den histologischen Untersuchungen stellten sich deutlich weniger Clusterbildungen und eine gute bis sehr gute Anfärbbarkeit im hyalinen Knorpel dar.

Die Hydroxylapatit-Beschichtung spielte als direktes Bindeglied zwischen metallischen Implantat und umliegenden Gewebe die entscheidende Rolle. Dies konnte sowohl in der histomorphometrischen Messung der Kontaktflächen in Millimetern als auch in der deskriptiven Histologie nachgewiesen werden.

Die Hydroxylapatitbeschichtung des Episealers® übte somit einen positiven Effekt auf die Integration und Einheilverhalten in das umliegende Gewebe aus. In Folgestudien am Schaf sollte die Anpassung an die individuelle Gelenkkurvatur und die operative Installation des Episealers® optimiert werden.

6 Zusammenfassung

Die Verletzungen des hyalinen Knorpels, ob traumatisch oder degenerativ bedingt, gehen für den Patienten immer mit Schmerzen, einer Bewegungseinschränkung und einer Minderung der Lebensqualität einher. Es stehen zwar eine Vielzahl von nicht invasiven und invasiven Methoden zur Verfügung, jedoch ist nicht jede Therapiemethode für alle chondralen Läsionen geeignet. Die Therapie hängt vom Alter der Patienten und auch von der Art und Lokalisation der Läsion ab. Bleibt die Läsion lange Zeit unbemerkt, führt dies immer zu einer Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels und mündet in einer Osteoarthrose (Spahn et al. 2015). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es weder klinisch noch experimentell gelungen, den hyalinen Knorpel anatomisch, histologisch und biomechanisch wiederherzustellen.

Ziel dieser Arbeit war es, das ossäre und chondrale Einheilverhalten eines metallischen Implantats (Episealer®) im Hinblick auf die unterschiedlichen Beschichtungen (raue HA-Beschichtung und glatte HA-Beschichtung) zu untersuchen. Das Ausmaß der Reaktion nach der Implantation im osteochondralen Defekt wurde mittels histologischer, immunhistologischer und histomorphometrischer Parameter evaluiert.

Bei 24 weiblichen Merinomix-Schafen wurde auf dem medialen Condylus ossis femoris des rechten Knies ein osteochondraler Defekt gesetzt und durch die Press-Fit-Implantation des Episealers® abgeschlossen. Bei der Gruppe 1 wurde ein Episealer® mit einer rauen HA-Beschichtung implantiert. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten ein Episealer® mit einer glatten HA-Beschichtung. Diesen Gruppen wurden die Tiere der Gruppe 3 ohne Beschichtung gegenübergestellt. Die postoperative Heilungsdauer betrug 3 Monate. Nach der Euthanasie wurde der Femur entnommen und makroskopisch, immunhistochemisch, histologischen und histomorphometrisch untersucht und beurteilt.

Unsere Untersuchungen konnten beweisen, dass die beschichteten Implantate einen kontinuierlichen Kontakt zum mineralisierten Knorpel aufwiesen als die unbeschichteten Implantate. Daraus resultierten eine geringere Spaltbildung und eine geringere Leerfläche zwischen Implantat und umliegenden Gewebe.

Die Hypothese dieser Studie konnte zum Teil bestätigt werden. Die Beschichtung verstärkt den Kontakt zwischen mineralisierten Knorpel und metallischen Implantat und schützt die darunterliegenden ossären Strukturen vor der Gelenkflüssigkeit. Dieser Schutz ist wesentlich, um eine vorzeitige Knochenresorption zu verhindern. Die abdichtende Wirkung des Implantats durch die feste Verankerung zum mineralisierten Knorpel und dem Schutz darunterliegenden ossären Gewebes, ist ein vielversprechendes Ergebnis dieser Studie. Die feste Verbindung wird auf längere Sicht gesehen zu einer besseren subchondralen Knochenqualität führen, was wiederum die Qualität des darüberliegenden Knorpels positiv beeinflusst. Diesen Mechanismus konnte im Rahmen dieser Studie noch nicht geklärt werden. Zukünftige Langzeitstudien könnten diesen Unterschied weiter herausstellen.

7 Summary

Histological analysis of the bone and cartilage healing process of a metallic implant in an osteochondral defect

The aim of this study was to investigate cartilage and bone healing potential of a palliative osteoarthritis implant with Hydroxyapatite-coatings in a locally defined osteochondral defect. The hypothesis was that chondrointegration of the implant can be improved by a HA coating and enhance the overall-healing outcome. A standardized osteochondral defect was induced in 24 female Merinomix sheep on the medial femoral condyle of the right knee joint and three different metallic implant types were inserted in 8 animals/each: an uncoated implant, implants with 2 HA-coatings (rough, smooth). After 3 months, the animals were sacrificed and the tissue-implant contact was analyzed histological, histomorphometrical and immunohistochemical. Histological evaluation of the cartilage and bone tissue was carried out after embedding in PMMA (with implant) or Paraffin (without implant) and staining with giemsa or toluidinblue. Histomorphometrical analysis measured the occurrence of tissue types at the implant border. The results of the study showed a significant better contact to the adjacent bony/chondral tissue in the groups with coated implants compared to the group of the uncoated implants. This was proven histomorphometrically by a lesser gap formation and less space between the implants and the surrounding tissue. As hypothesized, the coated implants showed a better chondrointegration in the mineralized cartilage and subsequently lesser gap formation. This resulted in an improved attachment of hyaline cartilage and prevented the underlying bone from contact with the aggressive synovial fluid. Through the firm contact of the tissue surfaces with the coating, a gap formation and subsequent loosening of the implant is prevented. Sealing against the aggressive synovial fluid is possible after a 3-months healing period.

The sealing effect of the attached mineralized cartilage and the subsequent preservation of the bone stock is a promising finding, even though we were not able to clarify the mechanism behind it in the context of this study. In the long run the better contact should result in better subchondral bone quality, which again affects the quality of the overlying cartilage positively. Future studies with longer healing times could emphasize the differences. Thus, HA-coated implants for focal osteoarthritis represent an alternative to relieve pain and prevent further damage in osteoarthritic joints.

8 Abkürzungsverzeichnis

- ACT autologe Chondrozytentransplantation
- bzw. beziehungsweise
- c zentral
- d.h. das heißt
- etc. etcetera
- EZM extrazelluläre Matrix
- Fa. Firma
- HA Hydroxylapatit
- ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation System
- MACT matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation
- min. Minuten
- p Peripherie
- ROI Region of Interest
- vgl Vergleich

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Skizze des Implantats (Episealer®). Der dunkelgraue Bereich wurde mit zwei differierenden Oberflächenstrukturierungen an den Kappenrändern (Pfeil) beschichtet. Die dem Gelenk zugewandte Seite, hellgrauer Bereich, blieb unbeschichtet und ist der Oberflächenkrümmung des Gelenknorpels entsprechend konvex (Stern)..... 28
- Abbildung 2: Instrumentarium, oben: Bohrkopf; unten von links nach rechts: Sockel für die Bohrtiefe, Implantat (Episealer®) und Schablone für die mediale Kondyle 30
- Abbildung 3: Instrumentarium von oben nach unten: Stößel, Implantatattrappe und Knorpelschneider 31
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte. In das vorgebohrte Implantatlager wird nach Prüfung mittels Implantatattrappe, das metallische Implantat eingesetzt. Gelenknorpel (a) mit subchondraler Lamelle (b) und spongiöser Knochen (c), Bewegungsrichtung= schwarzer Pfeil, Implantatlager= weiß, Implantat= hellgrau..... 32
- Abbildung 5: Ansicht intraoperativ auf die mediale Femurkondyle der rechten Hinterextremität. A: Implantatlager nach Bohrung; B: Implantat in der medialen Femurkondyle, Pfeil: hellgrauer Punkt (schwarzer Pfeil) dient als Justierhilfe für die Platzierung des Implantats..... 33
- Abbildung 6: Ansicht intraoperativ auf die eröffnete rechte Hinterextremität und Zugang parapatellar. Vorbereitung der Bohrung mit Hilfe der mit Kirschner-Drähten (Pfeil) fixierten Schablone. 33
- Abbildung 7: Röntgenaufnahme rechte Femurkondylen, mediale Kondyle implantattragend, latero/laterale Knochenaufnahme, Belichtung 35 mAS und 50kV, 2-fache Vergrößerung..... 35
- Abbildung 8: Skizze des Sägeschnitts in einer dezentralen Schnittführung durch das Implantat der rechten Femurkondyle. Der mediale Teil der medialen Kondyle (PMMA-Einbettung) umfasst einen Teil der medialen Kondyle und zwei Drittel des Implantats + Pin (schwarzer Kreis) der das Implantat im Knochen verankert. Der laterale Teil (Paraffin-Einbettung) umfasst die mediale Kondyle und etwa ein Drittel des Implantats, das hier nur noch aus der Kappe besteht..... 36

Abbildung 9: Links: Darstellung des dezentralen Sägeschnitts durch Implantat und mediale Kondyle. Identisch zur Skizze des Sägeschnitts in Abb. 16 enthält der Teil für die PMMA-Einbettung etwa zwei Drittel des Implantats, der für die Paraffin-Einbettung etwa ein Drittel des Implantats. Rechts: Aufsicht auf die Schnittflächen der Kondyle. Oben wiederum der PMMA-Teil mit dargestelltem Pin (Pfeil), unten der Paraffin-Teil, der nur die Implantatkappe enthält. Die schwarzen Verfärbungen des Knochens unter dem Implantat sind Metallabrieb, der beim Sägen des Metallimplantates trotz ständiger Wasserspülung entstanden ist. Er wird im Rahmen der weiteren histologischen Verarbeitungen ausgewaschen..... 37

Abbildung 10: Dünnschliffpräparat mediale Femurkondyle, gefärbt nach Giemsa, hyaliner und kalzifizierter Knorpel: violett, Knochenbälkchen: rosa, Implantat: schwarz..... 40

Abbildung 11: Paraffinpräparat mediale Femurkondyle, das Implantat wurde während der Präparatherstellung herausgelöst (Stern), Färbung: Toluidinblau, hyaliner Knorpel: blauviolett, mineralisierter Knochen: hellblau, Aufnahme in 2,5-facher Vergrößerung 41

Abbildung 12: Paraffinpräparat mit herausgelöstem Implantat (Stern), immunhistologische Markierung mit α -Kollagen-II. Das mit α -Kollagen-II markiertes Gewebe stellt sich in der immunhistochemischen Nachweis rot dar. In diesem Präparat ist eine erhöhte Konzentration an Kollagen II im hyalinen Knorpel (Pfeil) und im unteren Kappenbereich (Pfeilspitze) markiert. Der Knochen stellt sich in diesem Nachweisverfahren blass-rosa dar. 43

Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Original-Bewertungsbogen des ICRS Score nach (Brittberg et. al 2000). Für die Bewertung der Reparaturmechanismen werden 3 Parameter visuell beurteilt: I) Grad der Reparatur nach Protokoll A oder B. II) Integration bis zur Grenzschicht und III.) makroskopisches Aussehen. Die höchste Punktzahl (4) des Bewertungssystems steht für ein dem hyalinen Knorpel entsprechendes Regenerationsgewebe nach erfolgter chirurgischer Intervention. Der niedrigste Wert liegt bei 0 und steht für keine Defektfüllung und abnormale Regeneration. Summiert man die Punkte, so könnte eine maximale Gesamtpunktzahl von 12 Punkten erreicht werden 47

Abbildung 14: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder). Aufsicht frontal auf die Implantat tragende mediale Femurkondyle. Zu beachten ist hier die Fibrillation (schwarze Klammer) des hyalinen Knorpels vom 4. Sektor bis 2. Sektor und die Spaltbildung (schwarzer Pfeil) im Sektor 4. Die Zone innerhalb des roten

Kreises beschreibt die Region central= 2mm um das Implantat. Alles was Außerhalb dieser Markierung liegt, beschreibt die periphere Zone=> 2mm um das Implantat..... 49

Abbildung 15: Modifizierter Bewertungsbogen in Anlehnung an die ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation (Brittberg et al.) zur makroskopischen Beurteilung der Präparate in der Sektion. rotes Rechteck: Schematische Darstellung der Femurkondylen der rechten Hinterextremität und deren Einteilung in 4 Sektionen sowie die Einteilung der Region um das Implantat in central und peripher. Die Auswertung konzentrierte sich auf die Lokalisation des Implantats, der ICRS-Grad, die Integration und die makroskopische Veränderungen des hyalinen Knorpels. Die Höchstpunktzahl (4 Punkte) beschreibt ein sehr gute Intergration des metallischen Implantats in das angrenzenden Gewebe. Die niedrigste Punktzahl (0 Punkte) beschreibt eine schlechte Intergration mit einer Degeneration des angrenzenden Gewebes..... 50

Abbildung 16: Überblick eines Schliffpräparats gefärbt nach Giemsa. Bildmitte: Implantat mit Pin, das unter dem Mikroskop aufgrund der Lichtundurchlässigkeit des Metalls schwarz erscheint. Im unteren Bereich des Pins ist das Gewinde sehr gut zu erkennen, welches aus produktionstechnischen Gründen für die Beschichtung notwendig ist, für die Verankerung des Implantates im Knochenlager aber keine Rolle spielt. Der spongiöse Knochen der Femurkondyle ist einheitlich rosa gefärbt, unterhalb des violett gefärbten hyalinen Knorpels komprimiert sich der spongiöse Knochen zur subchondralen Knochenlamelle. Zwischen diesem subchondralen Knochen und hyalinem Gelenkknorpel liegt der kalzifizierte Knorpel, hier dunkel-violett dargestellt. Der kalzifizierte Knorpel hat zum Knochen und Knorpel eine ungleichmäßige mäanderförmige Kontaktgrenze, wodurch die beiden Gewebetypen miteinander verbunden werden. Der hyaline Gelenkknorpel auf der rechten Seite des Bildes ist dünner und weniger farbintensiv als auf der gegenüberliegende linken Seite. Dies liegt daran, dass das Gelenk an dieser Stelle weniger Last trägt als links vom Implantat. Im Gelenk liegt die linke Seite anterior, die rechte Seite posterior. Maßstabsbalken=2000µm..... 51

Abbildung 17: Darstellung der histomorphometrische Auswertung der Dünnschliffpräparate. Die Region innerhalb des weißen Vierecks bildete die innere Region of Interest. Außerhalb des weißen Vierecks lag die äußere Region of Interest. Die farbigen Linien definieren die Kontaktflächen zwischen Implantat und anliegenden Gewebe. Legende: blau: mineralisierter Knochen, grün: hyaliner Knorpel, rot: mineralisierter Knorpel, gelb: kein Kontakt, violett: Bindegewebe 57

Abbildung 18: Darstellung der Femurkondylen (links) und Tibiakondylen (rechts) nach der Entnahme, links oben: das Implantat zeigt eine sehr gute Implantation in die mediale Femurkondyle, der Knorpel stellt sich glatt und glänzend dar, links unten: seitliche Aufnahme mit Aufblick auf die Gelenkfläche, rechts oben: Tibiakondyle bedeckt von dem medialen und lateralen Meniskus (M) und durchtrennten Kreuzbändern (K), rechts unten: Entfernung des medialen Meniskus und Aufsicht auf Gelenkoberfläche der medialen Tibiakondyle mit Abrasion (orangefarbener Kreis)..... 59

Abbildung 19: Grafische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 4 (Gruppe 1). Bei diesem Tier war die niedrige Punktzahl (orangefarbener Balken) vom 4. bis 2. Sektor markant (roter Kreis). Dies war durch eine Spaltbildung zwischen dem hyalinen Knorpel und der Implantatkappe, sowie einer Fibrillation des hyalinen Knorpels im Sektor 4, 1 und 2 bedingt..... 60

Abbildung 20: Grafische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 27 (Gruppe 2), mit dem besten Ergebnis in dieser Gruppe. Die Knorpelqualität zentral ($c=2\text{mm}$ um das Implantat) und peripher ($p\geq 2\text{mm}$ um das Implantat) war ausgezeichnet. Es gab keine Abzüge in der Wertung im Kriterium "ICRS Score" (blaue Balken). Es überwiegte eine hohe Punktwertung in den Kriterien Makroskopie und Integration, aufgrund des sehr guten Einheilverhaltens in das chondrale und ossäre Gewebe..... 61

Abbildung 21: Grafische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 30 (Gruppe 2) mit dem schlechtesten Ergebnis dieser Gruppe und niedrigerer Punktzahl zentral ($c=2\text{mm}$ um das Implantat) aufgrund der Spaltbildung von Sektor 1 bis 4 um das Implantat. Der Knorpel steht nicht im direkten Kontakt zum Implantat und ist fibrilliert. Der ICRS Score (blaue Balken) ist infolge der schlechten Knorpelqualität in allen Sektoren mit einer niedrigen Punktzahl bewertet worden. Im umliegenden Gewebe ($p\geq 2\text{mm}$ um das Implantat) erhält das Präparat eine sehr gute Bewertung und entsprechend hohe Punktzahlen (rote Sterne) im Kriterium Makroskopie (graue Balken) mit zwei bis vier Punkten..... 62

Abbildung 22: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder), Aufsicht frontal auf die Implantat (Pfeil) tragende mediale Femurkondyle .. 63

Abbildung 23: Aufnahme nach Explantation des rechten Femurs (Gruppe 3 unbeschichtete Kappenränder). Die Seitenaufsicht der Implantat tragende mediale Femurkondyle zeigt einen deutlichen Implantatüberstand (roter Pfeil)..... 63

Abbildung 24: Graphische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 1 (Gruppe 3). Das Implantat zeigte in den Kriterien Integration (orangefarbener Balken) und Makroskopie (grauer Balken) eine hohe Punktzahl. Im 3. und 4. Sektor gab es jeweils einen Punktabzug (roter Stern) aufgrund des Implantatüberstandes und einer schlechten Integration. Im Kriterium ICRS-Score (blauer Balken) wurden keine Punkte abgezogen, was auf eine sehr gute Knorpelqualität zentral ($c=2\text{mm}$ um das Implantat) und peripher ($p\geq 2\text{mm}$ um das Implantat) deutet..... 64

Abbildung 25: Graphische Darstellung der makroskopischen Auswertung von Schaf 9 (Gruppe 3). Durch den einseitigen Implantatüberstand im Sektor 2 bis 3 resultiert eine niedrige Punktzahl (roter Kreis) in den Kriterien Makroskopie (graue Balken) und Integration (orangefarbener Balken). Damit verbunden ist eine schlechte Knorpelqualität im ICRS-Score (blaue Balken). Der hyaline Knorpel hat zentral ($c= 2\text{mm}$ um das Implantat) im Sektor 2 und 3 keinen Kontakt zur Implantatkappe aufgrund des deutlichen Implantatüberstandes in diesen Sektoren..... 65

Abbildung 26: Links: Aufnahme nach Entnahme des rechten Femurs. Die mediale Femurkondyle zeigte einen ausgeprägten Implantatüberstand (schwarzer Pfeil). Rechts: Aufsicht Tibiakondylen nach Entnahme, deutliche Läsion (schwarzer Pfeil) unter dem medialen Meniskus bedingt durch Implantatüberstand auf der gegenüberliegenden Seite..... 67

Abbildung 27: Darstellung einer zu tiefen Implantation in Gruppe 1. Der intakte kalzifizierte Knorpel (Stern) zeigte keinen Kontakt zur Implantatkappe aufgrund einer zu tiefen Implantation. Durch die mechanische Belastung wird der frakturierte hyaline Knorpel in den Spaltraum gedrückt (Pfeil). Die Folgen sind eine Degeneration des einfließenden Knorpels und darauffolgende Frakturierung des kalzifizierten Knorpels..... 68

Abbildung 28: Charakteristisches Bild für die Gruppe 1 (raue HA-Beschichtung). Aufsicht auf die Kappenränder mit einer guten Implantatintegration und Kontakt der Implantatbeschichtung (Pfeile, grau-schwarz) an den angrenzenden kalzifizierten Knorpel (Pfeilköpfe, tief-violett), posterior (links) und anterior (rechts). Der darüberliegende hyaline Knorpel (Stern, blass-violett) zeigt keine feste Bindung zur Implantatkappe, wird aber durch die Bindung basal an

den kalzifizierten Knorpel eng angeheftet (keine Spaltbildung). Der darunterliegende Knochen zeigt auch einen sehr guten Kontakt zum Implantat ohne Anzeichen einer Degeneration oder Lyse. 69

Abbildung 29: Darstellung einer zu tiefen Implantation in Gruppe 2: Das umliegende Gewebe wird durch einen 1mm breiten Spalt vom Implantat getrennt. Der darüberliegende hyaline Knorpel ist in den Spalt vorgefallen (Kreis: Cartilage flow Phänomen). Der subchondrale Knochen ist nekrotisch (Stern). Der Spalt ist mit Bindegewebe gefüllt (Pfeile) und der kalzifizierte Knorpel (Pfeilspitze, dunkelviolet) hat sich durch Resorption zurückgezogen. Die Stabilität des Implantats ist durch eine Implantatlockerung gefährdet. Der zeitliche Ablauf einer solchen Degeneration ist individuell, aber auch von der Ausgangssituation abhängig (Größe des initialen Spalts, Tiefe der Implantation u.a.). 70

Abbildung 30: oben links Paraffinschnitt in Toluidinfärbung: Chondrozytencluster im hyalinen Knorpel (Pfeile) der auf der Implantatkappe aufliegt. Chondrozytenclustern (Pfeile) sind ein Anzeichen einer Degeneration und sprechen für eine erhöhte Mitoseaktivität der Chondrozyten. Die Chondrozyten liegen nicht mehr angeordnet in der Matrix vor (Vergleich Bild unten links) sondern, lagern sich in ungeordneten Gruppen zusammen. oben rechts: Bild von einem Knochenumbauprozess im Bälkchenknochen unterhalb der Gelenkfläche. Entlang der Knochenbälkchen ist ein knochenaufbauender Osteoblastentensaum (Kreis) mit eingeschlossenen Osteozyten (Pfeile) dargestellt. unten links Dünnschliffpräparat nach Giemsa: Eine deutliche Spaltbildung (Klammer) zwischen umliegenden Gewebe und der linke Implantatkappe (schwarz). Der hyaline Knorpel zeigte eine sehr gute Anfärbbarkeit und Zellzulärität (violett) und der darunter liegende kalzifizierter Knorpel (tiefviolett) ist intakt. unten rechts: Hyaliner Knorpel der Gelenkflächenseits auf der Implantatkappe aufliegt. Der Knorpel zeigt Degenerationsanzeichen in Form von Chondrozytenclustern (Pfeilköpfe), eine Hypo-/Azellularität (Stern) und einer schlechten Anfärbbarkeit (schwarze Pfeile), d.h. die Knorpelmatrix zeigt eine schwache violette Färbung statt einem intensiven Violett (vgl. Bild links unten)..... 72

Abbildung 31: Darstellung der Leerfläche in den Gruppen (beschichtet (n=16) vs. unbeschichtet (n=7)). Der Median bei den beschichteten Gruppen ist 0 (0/1,5 Min/Max) und deutlich niedriger als in der unbeschichteten Gruppe mit 0,65 (0/2 Min/Max). Dieser Vergleich zwischen den Beschichtungen (Gruppe 1+2 zu Gruppe 3) zeigte, dass die unbeschichteten

Implantate signifikant weniger Kontaktfläche zum umliegenden Gewebe aufwiesen als die beschichteten Implantate. (Sternchen* sind Extremwerte) 76

Abbildung 32: Auswertung der immunhistologischen Färbungen mittels Score nach Rudert (Rudert 2000). Dargestellt ist der Vergleich der Mittelwerte zwischen den 3 Gruppen. Die Gruppe 2 (glatte Beschichtung) erzielte das beste Ergebnis, jedoch ohne eine statistische Signifikanz. 78

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsanordnung.....	27
Tabelle 2: Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003). Nach diesem Bewertungsschema werden sechs Parameter visuell beurteilt: I) Knorpeloberfläche, II) Knorpelmatrix, III) Zellverteilung, IV) Zellvitalität in der Population und V) subchondraler Knochen und die Mineralisation. Wird eine Gesamtpunktzahl von 13 Punkten erreicht, entspricht das neu gebildete Regenerationsgewebe annähernd hyalinem Knorpel.....	53
Tabelle 3: Modifizierter Score für die histologische Auswertung der nach Giemsa gefärbten Dünnschliffpräparaten in Anlehnung an Visual-Histological-Score (Mainil-Varlet et al. 2010; Mainil-Varlet et al. 2003) und O'Driscoll et. al. (O'Driscoll et al. 1988). Beurteilt wurden neben dem Gesamteindruck, die Implantatintegrität, die Qualität (Zellularität, Anfärbbarkeit und Zellverteilung) des umliegenden Gewebes, mit besonderem Hinblick auf die Vitalität des hyalinen Knorpels und die Kontaktflächen des Implantates zum umliegenden Gewebe (hyaliner Knorpel, kalzifizierter Knorpel, subchondraler Knochen).....	55
Tabelle 4: Darstellung der durchschnittlichen Punktzahlen±Standardabweichung der einzelnen Gruppen in den Score-Kriterien. Nur Gruppe 2 (glatte HA-Beschichtung) zeigte eine tendenziell ($p=0,059$) höhere Punktzahl im Kriterium "Veränderung im angrenzenden Knorpel", als die Gruppe 3. Die rechte Spalte zeigt die theoretisch erreichbare Gesamtpunktzahl, welche der bestmöglichen Gewebequalität entspricht.	74
Tabelle 5: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile, die in der äußeren ROI an das Implantat grenzen. Bezüglich hyalinem, mineralisiertem Knorpel und Bindegewebe gibt es keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die Gruppen mit den beschichteten Implantaten (1 und 2) haben tendenziell einen höheren Knochenanteil als Gruppe 3, der Leerraum ist in Gruppe 1 signifikant ($*p=0,037$) geringer als Gruppe 3.	75

11 Literaturverzeichnis

Ahern, B. J.; Parvizi, J.; Boston, R.; Schaer, T. P. (2009): Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 17 (6), S. 705–713. DOI: 10.1016/j.joca.2008.11.008.

Aigner, T.; Stove, J. (2003): Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. In: *Adv Drug Deliv Rev* 55 (12), S. 1569–1593.

Allen, Matthew.; Houlton, John.; Adams B.; Rushton, Neil (1998): The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. In: *Veterinary Surgery* 27 (6), S. 596–605.

Altman, Roy; Moskowitz, Roland (2002): Hyaluronate sodium injections for osteoarthritis: the truth. In: *Archives of internal medicine* 162 (21), S. 2498.

Archer, Charles W.; Francis-West, Philippa (2003): The chondrocyte. In: *Int J Biochem Cell Biol* 35 (4), S. 401–404.

Arsenault, A. Larry; Kohler, Derek M. (1994): Image analysis of the extracellular matrix. In: *Microscopy research and technique* 28 (5), S. 409–421.

Bannuru, Raveendhara R.; Natov, Nikola S.; Obadan, Isi E.; Price, Lori L.; Schmid, Christopher H.; McAlindon, Timothy E. (2009): Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. In: *Arthritis Care & Research* 61 (12), S. 1704–1711.

Barnewitz, Dirk; Endres, Michaela; Krüger, Ina; Becker, Anja; Zimmermann, Jürgen; Wilke, Ingo et al. (2006): Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. In: *Biomaterials* 27 (14), S. 2882–2889.

Benninghoff, Alfred (1925): Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. In: *Cell and Tissue Research* 2 (5), S. 783–862.

Berenbaum, Francis; Grifka, Joachim; Cazzaniga, Sara; D'Amato, Massimo; Giacobelli, Giampaolo; Chevalier, Xavier et al. (2012): A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 71 (9), S. 1454–1460.

Breinan, H. A.; Hsu, H-P; Spector, M. (2001): Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. In: *Clinical orthopaedics and related research* 391, S. S219-S230.

Breinan, Howard A.; Martin, Scott D.; Hu-Ping, Hsu; Spector, Myron (2000): Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. In: *Journal of orthopaedic research* 18 (5), S. 781.

Brittberg, Chairman Mats; Aglietti, Paolo; Gambardella, Ralph; Hangody, Laszlo; Hauselmann, Hans Jörg (Hg.): ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. B Surgeons Part. ICRS-Cartilage Repair Assessment system. Göteborg, Schweden, Friday 28, 2000.

Brittberg, Chairman Mats; et. al (2000): ICRS Evaluation Package. B: Surgeons Part. ICRS-Osteochondritis dissecans classification. In: *ICRS 2000 Standards Workshop at Schloss Münchenwiler, Switzerland*, S. 13, zuletzt geprüft am 26.08.2014.

Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. In: *The New England journal of medicine* 331 (14), S. 889–895. DOI: 10.1056/NEJM199410063311401.

Brittberg, Mats (2014): The History of the Treatment of Cartilage Injuries. In: A. Ananthram Shetty, Seok-Jung Kim, Norimasa Nakamura und Mats Brittberg (Hg.): *Techniques in Cartilage Repair Surgery*: Springer Berlin Heidelberg, S. 3-16. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41921-8_1.

Brittberg, Chairman Mats et al. 2000 (Hg.) (2000): ICRS clinical cartilage injury evaluation system. 3rd ICRS Meeting Göteborg, Sweden.

Bruckner, P.; van der Rest, M (1994): Structure and function of cartilage collagens. In: *Microsc Res Tech* 28 (5), S. 378–384. DOI: 10.1002/jemt.1070280504.

Bruns, J.; Kersten, P.; Lierse, W.; Silbermann, M. (1992): Autologous rib perichondrial grafts in experimentally induced osteochondral lesions in the sheep-knee joint: morphological results. In: *Virchows Archiv A* 421 (1), S. 1–8.

Bruns, J.; Kersten, P.; Silbermann, M.; Lierse, W. (1997): Cartilage-flow phenomenon and evidence for it in perichondrial grafting. In: *Arch Orthop Trauma Surg* 116 (1-2), S. 66-73. DOI: 10.1007/BF00434104.

Bruns, Juergen; Steinhagen, Joern (2000): Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität–Biologische Grundlagen. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2), S. 42–47.

Buckwalter, J. A. (1998): Articular cartilage: injuries and potential for healing. In: *J Orthop Sports Phys Ther* 28 (4), S. 192–202. DOI: 10.2519/jospt.1998.28.4.192.

Buckwalter, J. A. (2002): Articular cartilage injuries. In: *Clinical orthopaedics and related research* 402, S. 21–37.

Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1997): Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons-Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions*†. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 79 (4), S. 600–611.

Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998a): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. In: *Instr Course Lect* 47, S. 487–504.

Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998b): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. In: *Instr Course Lect* 47, S. 477–486.

Burkart, A. C.; Schoettle, P. B.; Imhoff, A. B. (2001): Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage. In: *Der Unfallchirurg* 104 (9), S. 798–807.

Burkhart, A.; Imhoff, A. B. (1999): Therapie des Knorpelschadens. Heute und Morgen. In: *Arthroskopie* 12, S. 279-288.

Christensen, Bjorn Borsoe (2016): Autologous tissue transplantations for osteochondral repair. In: *Danish medical journal* 63 (4).

Christensen, Bjorn Borsoe; Foldager, Casper Bindzus; Hansen, Ole Moller; Kristiansen, Asger Albaek; Le, Dang Quang Svend; Nielsen, Agnete Desiree et al. (2012): A novel nano-structured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen type I/III scaffold: in vitro and in vivo studies. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 20 (6), S. 1192–1204. DOI: 10.1007/s00167-011-1692-9.

Clark, J. M. (1985): The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. In: *J Orthop Res* 3 (1), S. 17–29. DOI: 10.1002/jor.1100030102.

Clark, J. M.; Huber, J. D. (1990): The structure of the human subchondral plate. In: *J Bone Joint Surg Br* 72 (5), S. 866–873.

Convery, F. R.; Akeson, W. H.; Keown, G. H. (1972a): The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. In: *Clinical orthopaedics and related research* 82, S. 253–262.

Convery, Richard; Akeson, Wayne.; Keown, Gordon (1972b): The Repair of Large Osteochondral Defects An Experimental Study in Horses. In: *Clinical orthopaedics and related research* 82, S. 253–262.

DEPALMA, ANTHONY F.; MCKEEVER, C. DICKSON; SUBIN, DAVID K. (1966a): 23 Process of Repair of Articular Cartilage Demonstrated by Histology and Autoradiography with Tritiated Thymidine. In: *Clinical orthopaedics and related research* 48, S. 229–242.

DEPALMA, ANTHONY F.; MCKEEVER, C. DICKSON; SUBIN, DAVID K. (1966b): 23 Process of Repair of Articular Cartilage Demonstrated by Histology and Autoradiography with Tritiated Thymidine. In: *Clinical orthopaedics and related research* 48, S. 229–242.

Online verfügbar unter

http://journals.lww.com/corr/Fulltext/1966/09000/23_Process_of_Repair_of_Articular_Cartilage.28.aspx.

Desjardins, et. al. (1991): Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. In: *Veterinary Surgery* 20 (6), S. 434–445.

Donath, Karl (1988): Die trenn-dünnschliff-technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. In: *Der Präparator* 34 (1), S. 197–206.

Dornacher, D.; Kappe, T.; Reichel, H. (2014): Die Gonarthrose des jüngeren Patienten--wen sollte man knieendoprothetisch versorgen, wen nicht? In: *Z Orthop Unfall* 152 (3), S. 270–275. DOI: 10.1055/s-0034-1368532.

Erggelet, Christoph; Mandelbaum, Bert; Lahm, Andreas (2000): Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe-Klinische Grundlagen. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2), S. 48–54.

Erggelet, Christoph; Steinwachs, Matthias (Hg.) (2001): Gelenkknorpeldefekte: Steinkopff.

Eyre, David R. (1980): Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. In: *Science* 207 (4437), S. 1315–1322.

Felson, David T.; Anderson, Jennifer J. (2002): Hyaluronate sodium injections for osteoarthritis: hope, hype, and hard truths. In: *Archives of internal medicine* 162 (3), S. 245–247.

Franceschi, Luciana de; Grigolo, Brunella; Roseti, Livia; Facchini, Andrea; Fini, Milena; Giavaresi, Gianluca et al. (2005): Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 75A (3), S. 612–622. DOI: 10.1002/jbm.a.30471.

Frenkel, SALLY R.; Toolan, BRIAN; Menche, David; Pitman, MARK I.; Pachence, JAMES M. (1997): Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. In: *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 79 (5), S. 831–836.

Friedman, Marc J.; BERASI, CARL C.; Fox, James M.; DEL PIZZO, WILSON; Snyder, Stephen J.; Ferkel, Richard D. (1984): Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. In: *Clinical orthopaedics and related research* 182, S. 200–205.

Frisbie, D. D.; Cross, M. W.; McIlwraith, C. W. (2006): 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. In: *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology: V.C.O.T* 19 (3), S. 142–146.

Frost et. al (1969): Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. In: *Calcified tissue international* 3 (1), S. 211–237.

Gelse, Kolja; von der Mark, Klaus; Aigner, Thomas; Park, Jung; Schneider, Holm (2003): Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor–producing mesenchymal cells. In: *Arthritis & Rheumatism* 48 (2), S. 430–441. DOI: 10.1002/art.10759.

Gomoll, Andreas H.; Madry, Henning; Knutsen, Gunnar; van Dijk, Niek; Seil, Romain; Brittberg, Mats; Kon, Elizaveta (2010): The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18 (4), S. 434–447.

Goymann, V. (1999): Abrasive arthroplasty. In: *Der Orthopäde* 28 (1), S. 11–18.

Groot, K. de; Geesink, R.; Klein, CPAT; Serekian, P. (1987): Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. In: *Journal of biomedical materials research* 21 (12), S. 1375–1381.

Gunther, K. P., Scharf, H-P, Pesch, H-J, Puhl, W. (1998): Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen: Tierexperimentelle Untersuchung. In: *Der Orthopäde* 27 (2), S. 105–117.

Hackenbroch, M. H. (2001): Periphere Arthrosen. In: *Praxis der Orthopädie* 1, S. 641–658.

Ham, Arthur W. (1930): A histological study of the early phases of bone repair. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 12 (4), S. 827–844.

Hoffmann, Oliver; Angelov, Nikola; Gallez, Fabrice; Jung, Ronald E.; Weber, Franz E. (2008): The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. In: *The International journal of oral & maxillofacial implants* 23 (4), S. 691.

Höher J., Erggelet Ch. (2003): Overview of therapy forms in the treatment of osteoarthritis. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (6). Online verfügbar unter <http://www.zeitschrift-sportmedizin.de>, zuletzt geprüft am 22.05.2014.

Hube, R.; Reichel, H. (2003): Modulare Revisionsysteme in der Knieendoprothetik. In: *Orthopäde* 32 (6), S. 506-515. DOI: 10.1007/s00132-003-0480-8.

Hunziker, E. B. (2002): Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. In: *Osteoarthritis Cartilage* 10 (6), S. 432–463. DOI: 10.1053/joca.2002.0801.

Imhoff, Herwig; SULZBACHER, IRENE; GRAMPP, STEFAN; CZERNY, CHRISTIAN; Youssefadh, Soraya; KAINBERGER, FRANZ (2000): Subchondral Bone and Cartilage Disease: A Rediscovered Functional Unit 35. Online verfügbar unter http://journals.lww.com/investigativeradiology/Fulltext/2000/10000/Subchondral_Bone_and_Cartilage_Disease__A.4.aspx.

Ito, Yohei; Ochi, Mitsuo; Adachi, Nobuo; Sugawara, Katsura; Yanada, Shinobu; Ikada, Yoshito; Ronakorn, Panjaphongse (2005): Repair of osteochondral defect with tissue-engineered chondral plug in a rabbit model. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 21 (10), S. 1155–1163.

Jackson, D. W.; Simon, T. M.; Aberman, H. M. (2001): Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium. In: *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl), S. S14-25.

Jackson, Robert W.; Dieterichs, Chad (2003): The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 19 (1), S. 13–20.

- Jansen, Dorothea (2009): Untersuchung der Regeneration osteochondraler Defekte im Kniegelenk unter histologischen und histomorphometrischen Gesichtspunkten zu ausgewählten Zeitpunkten. Freie Universität Berlin.
- Johnson, L. L. (2001): Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. In: *Clin Orthop Relat Res* (391 Suppl), S. S306-17.
- Johnstone, Brian; Alini, Mauro; Cucchiari, Magali; Dodge, George R.; Eglin, David; Guilak, Farshid et al. (2013): Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. In: *Eur Cell Mater* 25, S. 248–267.
- Kawcak, Christopher E.; McIlwraith, C. Wayne; Norrdin, R. W.; Park, R. D.; James, S. P. (2001): The role of subchondral bone in joint disease: a review. In: *Equine veterinary journal* 33 (2), S. 120–126.
- Kazemnejad, Somaieh; Khanmohammadi, Manijeh; Mobini, Sahba; Taghizadeh-Jahed, Masoud; Khanjani, Sayeh; Arasteh, Shaghayegh et al. (2016): Comparative repair capacity of knee osteochondral defects using regenerated silk fiber scaffolds and fibrin glue with/without autologous chondrocytes during 36 weeks in rabbit model. In: *Cell and Tissue Research* 364 (3), S. 559–572. DOI: 10.1007/s00441-015-2355-9.
- Kinner, B.; Capito, R. M.; Spector, M. (2005): Regeneration of Articular Cartilage. In: Ioannis V Yannas (Hg.): *Regenerative Medicine II*, Bd. 94: Springer Berlin Heidelberg (Advances in Biochemical Engineering), S. 91-123. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/b100001>.
- Koch, F. P.; Weng, D.; Krämer, S.; Biesterfeld, S.; Jahn-Eimermacher, A.; Wagner, W. (2010): Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. In: *Clinical oral implants research* 21 (3), S. 350–356.
- Kon, E.; Delcogliano, M.; Filardo, G.; Pressato, D.; Busacca, M.; Grigolo, B. et al. (2010a): A novel nano-composite multi-layered biomaterial for treatment of osteochondral lesions: technique note and an early stability pilot clinical trial. In: *Injury* 41 (7), S. 693–701. DOI: 10.1016/j.injury.2009.11.014.

Kon, Elizaveta; Delcogliano, Marco; Filardo, Giuseppe; Fini, Milena; Giavaresi, Gianluca; Francioli, Silvia et al. (2010b): Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. In: *Journal of orthopaedic research* 28 (1), S. 116–124.

Kuettner, Klaus E. (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. In: *Clinical Biochemistry* 25 (3), S. 155–163. DOI: 10.1016/0009-9120(92)90224-G.

Lane, J. M.; Brighton, C. T.; Ottens, H. R.; LIPTON, MITCHEL (1977): Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 59 (2), S. 218–222.

Lane, Joseph M.; Weiss, Charles (1975): Review of articular cartilage collagen research. In: *Arthritis & Rheumatism* 18 (6), S. 553–562.

Laprell, H.; Petersen, W. (2001): Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6-12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. In: *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 121 (5), S. 248–253.

Lazaroski, S. (2011): The role of small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, in podocytopathy and albuminuria. Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg (310155533).

Lind, Martin; Larsen, Allan; Clausen, Christian; Osther, Kurt; Everland, Hanne (2008): Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 16 (7), S. 690–698. DOI: 10.1007/s00167-008-0522-1.

Lu, Y.; Hayashi, K.; Hecht, P.; Fanton, G. S.; Thabit, G. 3rd; Cooley, A. J. et al. (2000): The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. In: *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 16 (5), S. 527–536. DOI: 10.1053/jars.2000.7690.

Lu, Y.; Parker, K. H.; Wang, W. (2006): Effects of osmotic pressure in the extracellular matrix on tissue deformation. In: *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 364 (1843), S. 1407–1422. DOI: 10.1098/rsta.2006.1778.

Madry, Henning (2010): The subchondral bone: a new frontier in articular cartilage repair. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18 (4), S. 417–418.

Mainil-Varlet, Pierre; Aigner, Thomas; Brittberg, Mats; Bullough, Peter; Hollander, Anthony; Hunziker, Ernst et al. (2003): Histological assessment of cartilage repair. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 85 (suppl 2), S. 45–57.

Mainil-Varlet, Pierre; van Damme, Boudewijn; Netic, Dobrila; Knutsen, Gunnar; Kandel, Rita; Roberts, Sally (2010): A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. In: *The American journal of sports medicine* 38 (5), S. 880–890. DOI: 10.1177/0363546509359068.

Mankin, H. J. (1982): The response of articular cartilage to mechanical injury. In: *J Bone Joint Surg Am* 64 (3), S. 460–466.

Mankin, Henry J. (1994): Chondrocyte Transplantation -- One Answer to an Old Question. In: *New England Journal of Medicine* 331 (14), S. 940–941. DOI: 10.1056/NEJM199410063311410.

Marlovits, S.; Vécsei, V. (2000a): Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten - Teil 1: Grundlagen der Knorpelbiologie und der Heilung von Knorpeldefekten*). In: *Acta Chirurgica Austriaca* 32 (3), S. 124–129. DOI: 10.1046/j.1563-2563.2000.00124.x.

Marlovits, S.; Vécsei, V. (2000b): Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten — Teil 2: Chirurgische Behandlungsoptionen zur biologischen Knorpelreparatur. In: *Acta Chir. Austriaca* 32 (4), S. 185-194. DOI: 10.1007/BF02949262.

Martinek (2003): Anatomy and pathophysiology of articular cartilage. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (6), S. 166–170.

- Martinek; Imhoff, Andreas B. (2003): Treatment of cartilage defects. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (54). Online verfügbar unter <http://www.zeitschrift-sportmedizin.de>, zuletzt geprüft am 24.06.2014.
- Mayne, Richard (1989): Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? In: *Arthritis & Rheumatism* 32 (3), S. 241–246.
- Meenen, Norbert Michael; Rischke, Burkhard (2003): Autogene osteochondrale transplantation (AOT) bei Knorpeldefekten am femurkondylus. In: *Operative Orthopädie und Traumatologie* 15 (1), S. 38–56.
- Módis, L.; Botos, A.; Kiviranta, I.; Lukácskó, L.; Helminen, H. J. (1995): Differences in submicroscopic structure of the extracellular matrix of canine femoral and tibial condylar articular cartilages as revealed by polarization microscopical analysis. In: *Acta biologica Hungarica* 47 (1-4), S. 341–353.
- Moojen, D. J.F.; Saris, D. B.F.; Auw Yang, K. G.; Dhert, W. J.A.; Verbout, A. J. (2002): The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. In: *Tissue engineering* 8 (4), S. 627–634.
- Moran, Conor J.; Ramesh, Ashwanth; Brama, Pieter A. J.; O’Byrne, John M.; O’Brien, Fergal J.; Levingstone, Tanya J. (2016): The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. In: *Journal of Experimental Orthopaedics* 3 (1), S. 1.
- Moroni, A.; Caja, V. L.; Egger, E. L.; Trinchese, L.; Chao, E. Y.S. (1994): Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants. In: *Biomaterials* 15 (11), S. 926–930.
- Morris et. al. (2001): The choice of the animal model of articular cartilage repair significantly affects outcomes and conclusions. Unter Mitarbeit von Morris E.A., D. Peluso, T. J. Gill, J. Powers und C. Glasso. Transactions of the 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the U.S.A, Canada, Europe and Japan (Nr. p 260).
- Mow, V. C.; Holmes, M. H.; Lai, W. M. (1984): Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. In: *J Biomech* 17 (5), S. 377–394.

Muir, Helen (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. In: *Bioessays* 17 (12), S. 1039–1048.

Nam, Ellis K.; Makhsous, Mohsen; Koh, Jason; Bowen, Mark; Nuber, Gordon; Zhang, Li-Qun (2004): Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model. In: *The American journal of sports medicine* 32 (2), S. 308–316.

Newman, A. P. (1998): Articular cartilage repair. In: *Am J Sports Med* 26 (2), S. 309–324.

Niemeyer, P.; Andereya, S.; Angele, P.; Ateschrang, A.; Aurich, M.; Baumann, M. et al. (2013): Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks—Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. In: *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 151 (1), S. 38–47.

Noguchi, Takashi; Oka, Masanori; Fujino, Madoka; Neo, Masashi; Yamamuro, Takao (1994): Repair of Osteochondral Defects With Grafts of Cultured Chondrocytes: Comparison of Allografts and Isografts. In: *Clinical orthopaedics and related research* 302, S. 251–258.

Nunamaker, D. M. (1998): Experimental models of fracture repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* 355, S. S56-S65.

O'Driscoll, S. W.; Fitzsimmons, J. S. (2001): The role of periosteum in cartilage repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl), S. S190-207.

O'Driscoll, Shawn W. (1998): Current concepts review—the healing and regeneration of articular cartilage*. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 80 (12), S. 1795–1812.

O'Driscoll, Shawn W.; Keeley, FRED W.; Salter, R. B. (1986): The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 68 (7), S. 1017–1035.

O'Driscoll, Shawn W.; Keeley, FRED W.; Salter, ROBERT B. (1988): 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. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 70 (4), S. 595–606.

Outerbridge, H. K.; Outerbridge, A. R.; Outerbridge, R. E. (1995): The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. In: *Journal of Bone and Joint Surgery-A-American Volumes* 77 (1), S. 65–72.

Panseri, Silvia; Russo, Alessandro; Cunha, Carla; Bondi, Alice; Di Martino, Alessandro; Patella, Silvia; Kon, Elizaveta (2012): Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. In: *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20 (6), S. 1182–1191. DOI: 10.1007/s00167-011-1655-1.

Pineda, S.; Pollack, A.; Stevenson, S.; Goldberg, V.; Caplan, A. (1992): A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. In: *Acta anatomica* 143 (4), S. 335–340.

Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. (1984): Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. In: *J Anat* 138 (Pt 1), S. 113–138.

Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. (1987): Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. In: *J Orthop Res* 5 (4), S. 509–522. DOI: 10.1002/jor.1100050406.

Poole, C. A.; Glant, T. T.; Schofield, JR (1991): Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 39 (9), S. 1175–1187.

Poole, C. Anthony; Flint, Michael H.; Beaumont, Brent W. (1988): Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. In: *Journal of orthopaedic research* 6 (3), S. 408–419.

Quinn, Thomas M.; Hunziker, Ernst B.; Häuselmann, Hans-Jörg (2005): Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (8), S. 672–678.

Radin, E. L.; Paul, I. L.; Lowy, M. (1970): A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage. In: *J Bone Joint Surg Am* 52 (3), S. 444–456.

Redler, I.; Mow, V. C.; Zimny, M. L.; Mansell, J. (1975): The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. In: *Clin Orthop Relat Res* (112), S. 357–362.

Resinger, C.; Vécsei, V.; Marlovits, S. (2004): Therapieoptionen zur Behandlung von Knorpelschäden: Techniken und Indikationen. In: *Der Radiologe* 44 (8), S. 756–762.

Rudert, M.; Wirth, C. J. (1998): [Cartilage regeneration and substitution] (27) (5). Online verfügbar unter <http://www.biomedsearch.com/nih/Cartilageregeneration-substitution/9646324.html>.

Rudert, Maximilian (2000): Herstellung von Knorpelgewebe in vitro und Transplantation in osteochondrale Knorpeldefekte: eine experimentelle Untersuchung am Kaninchen. Habilitation. Medizinische Hochschule Hannover, Hannover.

Rudert, Maximilian (2002): Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. In: *Cells Tissues Organs* 171 (4), S. 229–240.

Rudert, Maximilian; Tillmann, Bernhard (1993): Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods. In: *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 175 (3), S. 237–242.

Salzmann, G. (2001): Patientenauswahl und Differentialindikation. In: *Praxis der Knieendoprothetik*: Springer Berlin Heidelberg, S. 1-5. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59518-9_1.

Schewe, B.; Fritz, J.; Weise, K. (2008): Knorpelverletzungen am Kniegelenk. In: *Orthopädie und Unfallchirurgie Update* 3 (2), S. 77.

Schmid, A., Schmid, F. (1987): Results after cartilage shaving studied by electron microscopy. In: *Sports Med* (15), S. 386–387.

Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Schwabe, P.; Stange, R.; Hoffmann, J.; Südkamp, N. P. et al. (2002): A new electrochemically graded hydroxyapatite coating for osteosynthetic implants promotes implant osteointegration in a rat model. In: *Journal of biomedical materials research* 63 (2), S. 168–172.

Shapiro, F.; Koide, S.; Glimcher, M. J. (1993): Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 75 (4), S. 532–553.

Shetty, A. Ananthram; Kim, Seok-Jung; Nakamura, Norimasa; Brittberg, Mats (Hg.) (2014): *Techniques in Cartilage Repair Surgery*: Springer Berlin Heidelberg.

Shortkroff, S.; Barone, L.; Hsu, H-P; Wrenn, C.; Gagne, T.; Chi, T. et al. (1996): Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. In: *Biomaterials* 17 (2), S. 147–154.

Simonian, Peter T.; Sussmann, Patrick S.; Wickiewicz, Thomas L.; Paletta, George A.; Warren, Russell F. (1998): Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. In: *The American journal of sports medicine* 26 (4), S. 491–494.

Søballe, Kjeld; Hansen, Ebbe S.; B-Rasmussen, Helle; Jørgensen, Peter H.; Bünger, Code (1992): Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. In: *Journal of orthopaedic research* 10 (2), S. 285–299.

Spahn, G.; Hofmann, G.; Dornacher, I.; Schmitt, V.; Jerosch, J. (2015): Arthroscopic treatment of knee osteoarthritis. In: *OUP* 5, S. 000.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2013a): Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtungen - Fachserie 12 Reihe 6.2.2 - 2011 2011, S. 8. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de>, zuletzt geprüft am 01.04.2014.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (Hg.) (2013b): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik), Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern, zuletzt aktualisiert am 01.04.2014, zuletzt geprüft am 01.04.2014.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2015): Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtungen. Hg. v. Statistisches Bundesamt (Destatis). Wiesbaden.

Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Briggs, K. K.; Rodrigo, J. J. (1999): The microfracture technique to treat full thickness articular cartilage defects of the knee. In: *Orthopädie* 28 (1), S. 26-32. DOI: 10.1007/PL00003545.

Steinmeyer, J. (2001): [Drug therapy of arthrosis]. In: *Der Orthopäde* 30 (11), S. 856–865.

Stützle, H.; Hallfeldt, K.; Mandelkow, H.; Keßler, S.; Schweiberer, L. (1998): Bone substitutes and bone formation. In: *Orthopäde* 27 (2), S. 118-125. DOI: 10.1007/PL00003477.

Swieszkowski, Wojciech; Tuan, Barnabas Ho Saey; Kurzydowski, Krzysztof J.; Hutmacher, Dietmar W. (2007): Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. In: *Biomolecular engineering* 24 (5), S. 489–495.

Tägil, Magnus; Aspenberg, per (1999): Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. In: *J. Orthop. Res.* 17 (2), S. 200–204. DOI: 10.1002/jor.1100170208.

Takaishi, H.; Nemoto, O.; Shiota, M.; Kikuchi, T.; Yamada, H.; Yamagishi, M.; Yabe, Y. (1997): Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc. In: *J Orthop Res* 15 (4), S. 528–538. DOI: 10.1002/jor.1100150408.

Taniyama, Takashi; Masaoka, Tomokazu; Yamada, Tsuyoshi; Wei, Xuetao; Yasuda, Hiroaki; Yoshii, Toshitaka et al. (2015): Repair of osteochondral defects in a rabbit model using a porous hydroxyapatite collagen composite impregnated with bone morphogenetic protein-2. In: *Artificial organs* 39 (6), S. 529–535. DOI: 10.1111/aor.12409.

Thomas, Carlos (2006): Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik: Schattauer Verlag.

Twyman, R. S.; Desai, K.; Aichroth, P. M. (1991): Osteochondritis dissecans of the knee. A long-term study. In: *J Bone Joint Surg Br* 73 (3), S. 461–464.

van Mow, C.; Guo, X. Edward (2002): Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. In: *Annu Rev Biomed Eng* 4, S. 175–209. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.110701.120309.

van Mow, C.; Hung, Clark T. (2001): Biomechanics of articular cartilage. In: *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*, S. 31–54.

Vogt S, Imhoff AB (2007): Tissue-engineering in the knee joint-what is secured. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 58 (4), S. 98–105. Online verfügbar unter <http://www.zeitschrift-sportmedizin.de>, zuletzt geprüft am 22.05.2014.

Vollmar-Hesse, Ilse (2000): HistoNet 2000. Bindegewebe. Unter Mitarbeit von Jörg Bihlmayr, Christian Esser, Sibylle Etter, Robert Fintelman, Florian Fintelman, Michael Froneberg, Bodo Hübner. Hg. v. Universität Ulm medizinische Fakultät. Online verfügbar unter <http://www.histonet2000.de>, zuletzt geprüft am 15.05.2014.

Wakitani, S.; Imoto, K.; Yamamoto, T.; Saito, M.; Murata, N.; Yoneda, M. (2002): Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. In: *Osteoarthritis Cartilage* 10 (3), S. 199–206. DOI: 10.1053/joca.2001.0504.

Wei, Bo; Yao, Qingqiang; Guo, Yang; Mao, Fengyong; Liu, Shuai; Xu, Yan; Wang, Liming (2015): Three-dimensional polycaprolactone-hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow cells for cartilage tissue engineering. In: *Journal of biomaterials applications* 30 (2), S. 160–170. DOI: 10.1177/0885328215575762.

Welsch, Ulrich; Sobotta, Johannes (2003): Lehrbuch Histologie. Mit 21 Tabellen; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 1. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer.

Werner, Andreas; Fuß, Martin; Krauspe, Rüdiger (2003): Operative gelenkerhaltende Verfahren bei Gelenkknorpelschäden–Knorpel induzierende Techniken und Knorpeltransplantation: Schlusswort. In: *Dtsch Arztebl* 100 (27), S. 1886.

Wilms, U. (2002): WILMS, U. (2002): Histologische Untersuchung osteochondraler Defekte am Kniegelenk von Kaninchen nach Therapie mit allogenen Chondrozyten auf

unterschiedlichen biologischen und synthetischen Trägersubstanzen. Hannover. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, Hannover. Orthopädischen Klinik. Online verfügbar unter <http://d-nb.info/968456049/34>.

Wissing, H.; Stürmer, K. M.; Breidenstein, G. (1990): Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. In: *Hefte zur Unfallheilkunde* 212, S. 479-488.

Xia, Yang; Moody, Jonathan B.; Alhadlaq, Hisham; Hu, Jiani (2003): Imaging the physical and morphological properties of a multi-zone young articular cartilage at microscopic resolution. In: *J Magn Reson Imaging* 17 (3), S. 365–374. DOI: 10.1002/jmri.10269.

Youn, Inchan; Choi, Jae-Bong; Cao, L.; La Setton; Guilak, F. (2006): Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 14 (9), S. 889–897.

12 Publikationsverzeichnis

Poster:

E. Zimpfer, H. Schell, L. Ryd, M. O. Quevedo, G. N. Duda, (22.09.2017): Histological analysis of the bone and cartilage healing process of metallic implant in a osteochondral defect, 10. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences", Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

13 Danksagung

Ich möchte mich im besonderen Maß für die Unterstützung durch meine Familie und meinen Ehemann bedanken. Ein großer Dank gilt ebenfalls meiner Betreuerin, Hanna Schell, die nicht nur fachlich, sondern auch menschlich immer ein Ohr für mich hatte. Natürlich möchte ich auch den fleißigen medizinisch-technischen Assistentinnen im Julius Wolff Institut danken, die mich sehr gut in alle Arbeitstechniken eingewiesen haben. Auch meiner Doktormutter, Frau Prof. Plendl, möchte ich danken, die mir immer alle Freiheiten als externe Doktorandin gewährt hatte.

Des Weiteren möchte ich mich für die Unterstützung durch Herrn Dr. König und meine ehemaligen Kolleginnen vom Praxisteam bedanken. Ohne Eure Zustimmung hätte ich mit der Dissertation nicht starten können.

Das Projekt wurde im Rahmen des europäischen Programms "Euro Stars" und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten deutschen Partnern (E! 7914 PIK) durchgeführt.

14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin den, 04.07.2018

Elisabeth Zimpfer



mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-911-2