

Aus dem
Institut der Tierpathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut, Charité-Universitätsmedizin Berlin

**OSTEOCHONDRALE DEFEKTHEILUNG NACH CHIRURGISCHER VERSORGUNG
MITTELS BIODEGRADIERBARER SYNTHETISCHER IMPLANTATE IM
SCHAFSMODELL**

–

**EVALUATION DES HEILUNGSVERLAUFS MITTELS MR-ARTHROGRAPHIE UND
HISTOLOGISCHER UNTERSUCHUNGEN**

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

vorgelegt von
Liv Matz
Tierärztin aus Flensburg
Berlin 2009
Journal-Nr.: 3366

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Sterner-Kock
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. G. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K. Weyrauch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep, defects, cartilage, transplants, knees, lesions, joint diseases,
magnetic resonance imaging, surgical operations

Tag der Promotion: 28.04.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-797-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

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 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

***Inhaltsverzeichnis*.....I**

***1 Einleitung*..... 1**

 1.1 Zielsetzung 3

 1.2 Hypothesen..... 4

***2 Stand des Wissens* 5**

 2.1 Anatomie und Physiologie des hyalinen Knorpels..... 5

 2.2 Pathophysiologie des Gelenkknorpels 12

 2.3 Pathohistologie des Gelenkknorpels 16

 2.4 Therapieoptionen von Gelenkknorpeldefekten 17

 2.5 Magnetresonanztomographie..... 25

 2.6 Tierexperimentelle Versuche..... 29

***3 Material und Methoden* 31**

 3.1 Tiere und Tierhaltung..... 31

 3.2 Versuchsanordnungen 31

 3.3 Operationsvorbereitungen..... 32

 3.4 Operationen 33

 3.5 Indirekte MR-Arthrographie..... 35

 3.6 Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate 38

 3.7 Immunhistologisches Färben der Schnitte..... 41

 3.8 Safranin Orange-Färbung..... 42

 3.9 Auswertungen 43

***4 Ergebnisse* 49**

 4.1 Postoperativer Verlauf..... 49

 4.2 Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung nach Explantation 49

 4.3 Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung 51

 4.4 Ergebnisse der Auswertung der Gefäßdarstellung 64

4.5	Ergebnisse der quantitativen Gewebeauswertung	68
4.6	Ergebnisse der indirekten MR-Arthrographie.....	70
5	<i>Diskussion</i>	78
5.1	Diskussion der Methoden	78
5.2	Diskussion der Ergebnisse	88
5.3	Schlussfolgerung	103
6	<i>Zusammenfassung</i>	108
7	<i>Summary</i>	110
8	<i>Anhang</i>	113
8.1	Anhang I: Immunhistologische Färbungen	113
8.2	Anhang II: Safranin Orange-Färbung	115
8.3	Anhang III: Übersicht der histologische Bildmaterialien.....	116
9	<i>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</i>	119
10	<i>Literatur</i>	121
11	<i>Danksagung</i>	131
12	<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	132

1 Einleitung

Der hyaline Gelenkknorpel dient dem reibungsfreien Gleiten der artikulären Knochenendflächen bei Bewegungsabläufen. Diese Knorpelschicht bildet im Zusammenspiel mit der Gelenkkapsel, den Bändern und dem synovialen Kompartiment die artikuläre anatomische Einheit des Bewegungsapparates. Die spezifischen Eigenschaften des hyalinen Knorpelgewebes vereinigen Steifigkeit, Elastizität und Reibungsfreiheit, welche für die verschiedenen Belastungseinwirkungen, die auf die Gelenkflächen während des Bewegungsablaufes einwirken, essentiell sind.

Chondrale und osteochondrale Läsionen der Gelenkflächen zeigen eine hohe Prävalenz im orthopädischen und unfallchirurgischen medizinischen Fachbereich (Curl, Krome et al. 1997). Die Ätiologie dieser Verletzungsmuster ist degenerativen Ursprungs, meist vergesellschaftet mit der Koexistenz von anatomischen Abnormalitäten, oder Folge traumatisch bedingter Gelenkverletzungen. Diese Verletzungen sind besonders häufig an der medialen Femorkondyle des Kniegelenkes lokalisiert. In einer Studie zur Inzidenz von Gelenkknorpelläsionen wiesen fünf bis zehn Prozent der jungen sportlich aktiven Patienten mit traumatisch bedingter Hämarthrose im Kniegelenk fokale chondrale Verletzungen auf (Noyes, Bassett et al. 1980).

Bereits im Jahre 1743 beschrieb William Hunter in seiner Veröffentlichung, dass zerstörtes hyalines Gelenkknorpelgewebe keine Regenerationskapazität besitzt (Hunter 1995). Das intrinsische Heilungspotential des hyalinen Knorpelgewebes ist stark limitiert und stellt bis zum jetzigen Zeitpunkt ein erhebliches klinisches Problem dar. Diese fehlende oder geringe Heilungstendenz chondraler Defekte ist in der Avaskularität des Knorpelgewebes, der Immobilität der Chondrozyten und deren verminderten Proliferationsmöglichkeiten begründet (Caplan, Elyaderani et al. 1997). Die nutritive Versorgung der Chondrozyten erfolgt über Diffusion aus dem synovialen Kompartiment und vom subchondralen Knochengewebe aus. Die extrazelluläre Matrix, die die Knorpelzellen umscheidet, stellt dabei eine natürliche Grenzschicht dar. Aus diesen Gründen regeneriert insbesondere adulter Gelenkknorpel nach Verletzungen nur unvollständig. Diese partielle Gewebereparation chondraler Verletzungsmuster beinhaltet Bindegewebe- bzw. Faserknorpelbildung mit vorwiegender Produktion von Typ-I-Kollagenfasern. Das minderwertige Ersatzgewebe hält den physiologischen Belastungen nicht stand und es folgt eine progressive Degeneration und die Entwicklung einer Arthrose im weiteren Verlauf (Ulrich-Vinther, Maloney et al. 2003).

Der natürliche Regenerationsprozess osteochondraler Defekte basiert auf der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmarkraum und deren folgender Differenzierung zu chondrogenen Vorläuferzellen (Shapiro, Koide et al. 1993). Diese intrinsische Gewebereparation beinhaltet jedoch wiederum die Bildung von biomechanisch inadäquatem fibrösem Gewebe und Faserknorpelgewebe (O'Driscoll 1998).

Die Therapie dieser Gelenkflächendefekte stellt bis heute ein ungelöstes klinisches Problem dar. Grundsätzlich können Knorpelschäden konservativ und chirurgisch therapiert werden. Bei frühen Stadien können über die konservative Therapie durchaus Verbesserungen der Beschwerdesymptomatik erreicht werden. Überschreitet jedoch die Defektgröße ein kritisches Maß, müssen zusätzliche operative Behandlungen in Erwägung gezogen werden.

Die klinisch angewendeten operativen Therapieoptionen für Gelenkknorpeldefekte traumatischer und degenerativer Genese sind derzeit restorative Verfahren zur mesenchymalen Stammzellrekrutierung, wie die osteochondrale autologe Transplantation (OAT) und die autologe Chondrozytentransplantation (ACI) (Braun, Vogt et al. 2007). Die osteochondrale autologe Transplantation ist derzeit das einzige Verfahren, das den Knorpeldefekt mit hyalinem Knorpelgewebe deckt. Problematische Aspekte dieser Technik sind jedoch die Entnahmemorbidität und die begrenzte Verfügbarkeit von Transplantationsgewebe. Die insuffiziente Integration des transplantierten Knorpelgewebes verursacht eine biomechanische Instabilität im Defektrandgebiet, welche zu Degenerationserscheinungen im Heilungsverlauf führt (Shah, Kaplan et al. 2007). Die autologe Chondrozytentransplantation ist mit einem zusätzlichen chirurgischen Eingriff zur Gewebeentnahme verbunden. Die Heilungsergebnisse dieser Therapiemethode beinhalten die Bildung von faserknorpeligem Ersatzgewebe, das als Funktionsgewebe längerfristig wiederum zu Degenerationserscheinungen führt (Chen, Nagrampa et al. 1997).

In der Literatur wird eine Vielzahl über die Ergebnisse experimenteller Studien zur Versorgung chondraler und osteochondraler Defekte mit synthetischen resorbierbaren Implantaten berichtet. Die Materialzusammensetzungen der verwendeten Implantate und Zusätze chondrogener Zellpopulationen oder Wachstumsfaktoren weisen eine vielfältige Variationsbreite auf (Boyan, Lohmann et al. 1999; Woodfield, Bezemer et al. 2002; Frenkel und Di Cesare 2004; Kuo, Li et al. 2006; Lubiawski, Kruczynski et al. 2006). Diese restaurativen Therapieansätze, auch unter dem Begriff „Tissue-Engineering“ zusammengefasst, beinhalten die Regeneration von zwei verschiedenen Gewebespezies. Die Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle beinhaltet im basalen Defektbereich eine ossäre Geweberegeneration und an der Gelenkoberfläche die Regeneration von hyalinem Knorpelgewebe. Die limitierte Heilungstendenz des hyalinen Knorpelgewebes erfordert die chirurgische Penetration der subchondralen Knochenlamelle, um eine Einwanderung biologisch potenten Stammzellen und die anschließende Bildung von hyalin-ähnlichem oder hyalinem Knorpelgewebe zu ermöglichen. Um eine temporäre Stabilität im Defektareal zu schaffen und eine Geweberegeneration nach der Zellinfiltration in der initialen Heilungsphase zu unterstützen, wird der Defekt mit biodegradierbaren Scaffolds aufgefüllt (Niederauer, Slivka et al. 2000; von Rechenberg, Akens et al. 2003). Der von Pauwels 1960 postulierte Grundgedanke der „kausalen Histogenese“ wurde von Carter et al. weiterverfolgt (Pauwels 1960). Diese Hypothese besagt, dass die auf die undifferenzierten Zellen einwirkenden mechanischen Stimuli die Gewebedifferenzierung beeinflussen. Die physikalischen Faktoren, wie Druck, Scherkräfte und andere Krafteinwirkungen, bewirken die

gerichtete Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Carter, Blenman et al. 1988). Die mechanischen Eigenschaften der implantierten Scaffolds spielen somit eine Schlüsselrolle für den Heilungserfolg osteochondraler Defekte (Aspenberg, Tagil et al. 1996). Die zeitnahe Regeneration der subchondralen Knochenlamelle im Defektareal wird durch die Osteoinduktivität mechanischer und materialbedingter Stimuli der biodegradierbaren Implantate unterstützt (Aspenberg, Tagil et al. 1996; Tagil und Aspenberg 1999). Die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle wiederum bildet die mechanischen und nutritiven Rahmenbedingungen für eine Chondrogenese an der Gelenkoberfläche im Defektareal.

Der Heilungsverlauf nach Versorgung osteochondraler Defekte durch biodegradierbare Implantate wird durch folgende Kriterien beeinflusst:

- Biokompatibilität und Biodegradation der verwendeten synthetischen Materialien
- Biomechanik der Implantate
- Zellinfiltration und Zellproliferation
- Scaffolddesign und poröse Mikrostruktur
- Osteoinduktion, chondrale Geweberegeneration und die Integration zum umliegenden organischen Gewebe
- Angiogenese im Defektareal

Wenn gleich diese Einflussfaktoren bereits in einer Vielzahl von experimentellen Studien untersucht wurden, zeigen die Ergebnisse, dass weiterer Forschungsbedarf besteht (Swieszkowski, Tuan et al. 2007).

1.1 Zielsetzung

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit am Schaf werden iatrogen gesetzte osteochondrale Defekte an der Femorkondyle mit biodegradierbare Scaffolds in Zylinderform aus Poly(D,L)Laktid-co-Glykolid (85:15 PLG) versorgt. Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation des Heilungsverlaufs mittels histologischer, immunhistologischer und histomorphometrischer Auswertung nach 3 und 6 Monaten Standzeit. Nach 6 Monaten Standzeit werden zusätzlich indirekte MR-Arthrographien unter Kontrastmittelgabe durchgeführt und Korrelation zu den histologischen Ergebnissen gesucht. Im Allgemeinen ist die Zielsetzung dieser Arbeit, dem heutigen Wissensstand Aspekte zum Verständnis der osteochondralen Defektheilung hinzuzufügen. Insbesondere soll der Einfluss der biomechanischen Eigenschaften der Implantate auf die Geweberegeneration osteochondraler Defekte durch Verwendung von Scaffolds unterschiedlicher Steifigkeit untersucht werden.

Im Folgenden sind die zu untersuchenden Fragestellungen dieser Arbeit im Einzelnen dargestellt:

- Der Einfluss der biomechanischen Eigenschaften der Scaffolds auf die ossäre und chondrale Geweberegeneration
- Die Osteoinduktivität der verwendeten Scaffolds und somit der Beitrag zur qualitativen und quantitativen Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle und des spongiösen Knochengewebes
- Die strukturelle Qualität und Quantität des regenerierten Knorpelgewebes an der Gelenkoberfläche
- Die Biokompatibilität und die Biodegradation der implantierten PGLA-Scaffolds
- Die Sensitivität der indirekten MR-Arthrographie zur Beurteilung des Heilungsverlaufs chirurgisch versorgter osteochondraler Defekte

1.2 Hypothesen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Beurteilung des Einflusses der biomechanischen Eigenschaften der verwendeten Implantate auf die Geweberegeneration osteochondraler Defekte.

Es sind folgende Hypothesen zu überprüfen:

- Die initialen mechanischen Rahmenbedingungen in der osteochondralen Defektheilung werden von der Steifigkeit der verwendeten Scaffolds beeinflusst und wirken sich auf den Heilungsverlauf und das Heilungsergebnis aus
- Eine ausreichende strukturelle und mechanische Stabilität im knöchernen Defektareal während der initialen Heilungsphase fördert die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle
- Eine frühzeitige Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle ist die Voraussetzung für die schnelle und komplikationsarme Wiederherstellung der chondralen Gelenkfläche
- Die indirekte MR-Arthrographie stellt ein adäquates nichtinvasives Verfahren zur Kontrolle des Heilungsverlaufes chirurgisch versorgter osteochondraler Defekte dar

2 *Stand des Wissens*

In der Einleitung ist die klinische Problematik der Knorpelheilung bereits kurz dargestellt worden. Für das Verständnis der Pathophysiologie und die Entwicklung künftiger Therapiekonzepte von Knorpelschäden ist eine detaillierte Kenntnis der Anatomie und Physiologie des hyalinen Knorpelgewebes Grundvoraussetzung. Diese wissenschaftlichen Grundlagenkenntnisse werden im folgenden Abschnitt erläutert.

2.1 *Anatomie und Physiologie des hyalinen Knorpels*

Der hyaline Knorpel überzieht die Knochenendflächen der beweglichen Gelenke mit unterschiedlicher Schichtdicke. Die Schichtdicke des Knorpelgewebes im Kniegelenk variiert von Spezies zu Spezies und beträgt beim Kaninchen 0,5 mm, beim Schaf 0,8 mm und beim Menschen 1,5 mm. Im Zusammenspiel mit Gelenkkapsel, Bändern, Menisken, synovialem Gewebe und subchondralem Knochen bildet der hyaline Knorpel die Einheit des Kniegelenks. Die Materialeigenschaften der Knorpelschicht ermöglichen einen nahezu reibungsfreien Ablauf der Bewegungen. Diese Eigenschaften vereinigen Steifigkeit, Elastizität und Reibungsfreiheit, welche für die verschiedenen Belastungseinwirkungen, die auf die Gelenkflächen während des Bewegungsablaufes einwirken, essentiell sind. So beträgt der Reibungskoeffizient des hyalinen Knorpels 0,02 bis 0,002 und ist somit deutlich geringer als der Reibungskoeffizient industriell hergestellter Werkstoffe, wie beispielsweise Stahl mit einem Koeffizienten von 0,6 (Ding, Dalstra et al. 1998; Martinek, Ueblacker et al. 2003). Der hyaline Knorpel besitzt im frischen, unfixierten Zustand eine weiß-bläuliche Farbgebung und erscheint auf der Schnittfläche glasig opak.

In der embryonalen Entwicklung bildet der hyaline Knorpel die Skelettgrundlage und wird im Laufe der Entwicklung zu Knochengewebe umgebaut. Erhalten bleibt hyaliner Knorpel zunächst an den Epiphysenfugen, wo er dem Längenwachstum des Knochens dient. Auf Dauer ist der hyaline Knorpel an den Gelenkflächen als Gelenkknorpel zu finden. Zusätzlich kommt der hyaline Knorpel in den Wänden der Luftwege und am ventralen Rippenansatz vor. Das ausdifferenzierte Knorpelgewebe besitzt weder eine vaskuläre Versorgung, noch eine lymphatische Drainage und keine Nervenstrukturen. Die nutritive Versorgung des Gewebes erfolgt ausschließlich über Diffusionsvorgänge aus der synovialen Gelenkhöhle und zu einem geringeren Teil aus dem darunter liegenden Knochengewebe. Das Knorpelgewebe setzt sich zusammen aus den gewebespezifischen Zellen, den Chondrozyten, der von ihnen produzierten extrazellulären Matrix (EZM) und der gebundenen interstitiellen Flüssigkeit.

2.1.1 Chondrozyten

Die Chondrozyten sind die hochdifferenzierten Zellen des Gelenkknorpelgewebes und unterscheiden sich morphologisch, in der Zellgröße und in ihrer metabolischen Aktivität je nach Knorpelzone (siehe Abschnitt 2.1.3 Struktur des Gelenkknorpels). Die Chondrozyten umgeben sich mit der von ihnen produzierten viskoelastischen extrazellulären Matrix. Sie liegen, je nach Knorpelzone, in unterschiedlicher Anzahl in einem als Knorpelhof (perizelluläre und territoriale Region) bezeichneten Areal, welcher mit den Zellen gemeinsam die Einheit des Chondrons (auch Territorium genannt) bildet (siehe Abb. 2-1). Die Matrix stellt einen wesentlichen mechanischen Schutz der Chondrozyten vor äußeren Belastungen dar.

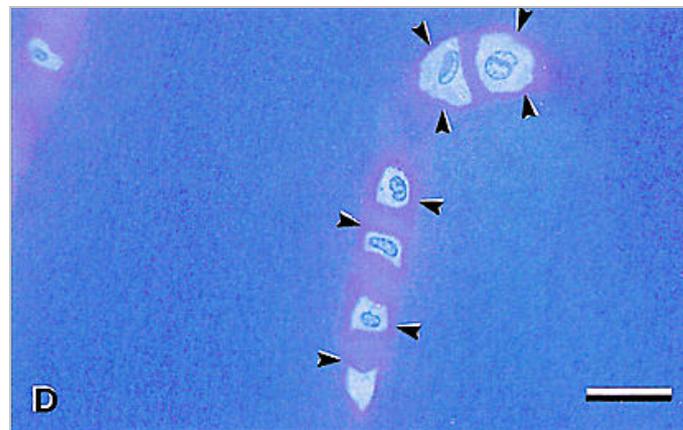


Abbildung 2-1: Chondrozyten in der radialen Knorpelzone, umgeben von der perizellulären Matrix (hellblau angefärbt) und der interterritorialen Matrix (Pfeile, violett angefärbt); Toluidinblau-Färbung ,übernommen aus Hunziker et al. (2002)

Der Zellmetabolismus erfolgt über Glykolyse, wobei Glukose zu Laktat metabolisiert wird. Da der Sauerstoffgehalt im Knorpelgewebe mit 1-3% sehr gering ist, erfolgt der Stoffwechsel zum größten Teil unter anaeroben Bedingungen. Wie bereits erwähnt, erfolgt die nutritive Versorgung der Chondrozyten ausschließlich über Diffusion. Hierzu sind intermittierend einwirkende mechanische Kräfte von großer Bedeutung. Unter Kompression diffundieren Stoffwechselprodukte über die permeable Kollagen-Proteoglykan-Matrix in den synovialen Gelenkraum und bei Entlastung diffundieren nutritive Stoffe, dem osmotischen Druckgradienten folgend, in die Knorpelmatrix. Die einwirkenden dynamischen Kräfte beeinflussen die metabolische Aktivität der Chondrozyten. Dieser Vorgang wird Mechanotransduktion genannt und stimuliert je nach Art der Belastung unterschiedliche Syntheseaktivitäten der Knorpelzellen, um die Homöostase des Knorpelgewebes zu erhalten. Die Signalübertragung erfolgt über Oberflächenproteine der Chondrozyten, den sogenannten Integrinen, welche eine Verbindung zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix darstellen.

Eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren wirkt zusätzlich über Zelloberflächenrezeptoren auf die anabolen und katabolen Zellaktivitäten ein. Diese werden von den Chondrozyten selbst in Form einer

autokrinen Funktion sezerniert oder sie wirken parakrin über die Synovia auf die Zellen ein (Ulrich-Vinther, Maloney et al. 2003; Locker, Kellermann et al. 2004).

2.1.2 Extrazelluläre Matrix

Die Matrix des hyalinen Knorpels setzt sich aus einem Netzwerk von Makromolekülen und der Gewebeflüssigkeit zusammen. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung dieser Komponenten sichert die mechanischen Materialeigenschaften des Knorpelgewebes. Zu diesen Makromolekülen gehören die Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Proteine, die in den folgenden Absätzen genauer beschrieben werden.

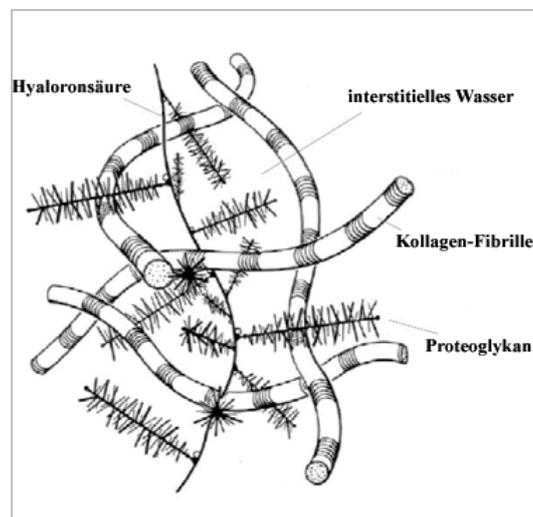


Abbildung 2-2: Grafische Darstellung der extrazellulären Matrixkomponenten des hyalinen Knorpelgewebes; übernommen aus M. Ulrich-Vinther et al. (2003)

Die Kollagene stellen den Hauptanteil der Gewebematrix dar (ca. 60% des Knorpeltrockengewichtes) und bilden mit ihrem Netzwerk das Grundgerüst des Knorpelgewebes. Diese Rahmenkonstruktion sichert die mechanischen Eigenschaften, wie Steifigkeit und Elastizität, des hyalinen Knorpels, sowie die Kohäsion der Gewebestandteile (Buckwalter und Mankin 1998). Die im hyalinen Knorpelgewebe vertretenden genetisch unterschiedlichen Kollagentypen sind Typ II, III, VI, IX, X, XI, XII und XIV.

Der Kollagentyp II ist mit 90-95% der Hauptvertreter und besteht aus drei α -1-Ketten (Tropokollagenmoleküle) die zu einer Tripelhelix gewunden sind. Kollagenfasern vom Typ II bilden mit den Typen IX und XI ein Heteropolymer, wobei die kovalent gebundenen Typ-IX-Fasern in die Knorpelmatrix ziehen und die Typ-XI-Fasern kovalente Quervernetzungen zwischen den einzelnen Typ-II-Fasern herstellen. Die genaue Funktion der Quervernetzungen ist noch weitgehend ungeklärt, es wird jedoch von einer Stabilisierung des dreidimensionalen Kollagengerüsts ausgegangen. Die Kollagen-Typ-III-Fasern sind ebenfalls gebunden an Typ-II-Fasern im Knorpelgewebe zu finden. Die Typ-III-Kollagene sind jedoch im gesunden hyalinen Knorpel nur in geringer Menge vertreten. Das

vermehrte Auftreten dieser Fasern in pathologisch verändertem Knorpelgewebe, besonders in den oberen Knorpelschichten, lässt eine erhöhte Synthese dieser Fasern von den Chondrozyten bei degenerativen Prozessen vermuten.

Kollagen vom Typ VI wird hauptsächlich in der Umgebung von den Chondrozyten nachgewiesen und fixiert die Zellen in der Gewebematrix. Dem Kollagentyp X, der in der kalzifizierten Knorpelzone und hypertrophen Zone der enchondralen Ossifikation vorkommt, wird eine Funktion in der Mineralisation des Knorpelgewebes zugeschrieben. Der Typ X wird ausschließlich von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert. Die Kollagentypen XII und XIV sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in einer Moleküldomäne. Sie binden nicht-kovalent auf dem physikalischen Wege an die Typ-II-Fibrillen und dienen vermutlich einer weiteren Stabilisierung des Kollagennetzwerkes (Eyre 2002).

Die Proteoglykane stellen ca. 25-35% des Knorpeltrockengewichtes dar und werden von den Chondrozyten produziert. Ihre vornehmliche Aufgabe ist es, die interstitielle Flüssigkeit zu binden. Die Proteoglykane setzen sich aus einem gestreckten zentralen Protein (protein core) und zahlreichen unverzweigten Glykosaminoglykan-Ketten zusammen (siehe Abb. 2-3). Zu den GAG des Knorpelgewebes zählen Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Die GAG-Ketten binden über eine nichtkovalente Bindung, welche durch ein „link-protein“ vermittelt wird, an die Hyaluronsäure (Buckwalter und Rosenberg 1988). Funktionell ist entscheidend, dass Polysaccharide der GAG negative elektrische Ladungen tragen. Diese negative Ladung führt zu einer Hydrathülle, die zum einen dem Stofftransport und zum anderen der Druckelastizität des Knorpelgewebes dient (Buckwalter und Mankin 1998).

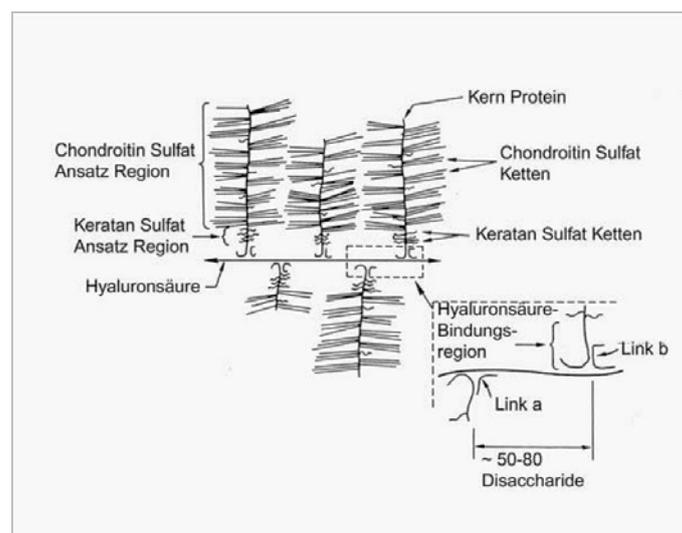


Abbildung 2-3: Molekularer Aufbau der Proteoglykane, die flaschenbürstenähnliche Struktur der GAG und deren Verbindung zur Hyaluronsäure schematisch dargestellt; übernommen aus Hascall V (1977)

Mit ca.15-20% des Knorpeltrockengewichtes sind die nicht-kollagenen Proteine die kleinste Fraktion der EZM. Die genaue Funktion der nicht-kollagenen Proteine ist noch weitgehend ungeklärt. Sie binden wie die GAG das interstitielle Wasser und stabilisieren die makromolekulare Struktur der EZM. Für die Verankerung der Chondrozyten im Matrixnetzwerk sind diese Proteine, neben den Proteoglykanen, ebenfalls von großer Bedeutung.

2.1.3 Struktur des Gelenkknorpels

Die beschriebenen Komponenten des hyalinen Gelenkknorpels variieren in Abhängigkeit von der Gelenkflächenentfernung in Quantität, Organisation, mechanischen Eigenschaften, Morphologie und Funktion (Buckwalter und Mankin 1998). Aufgrund der morphologischen Veränderungen der Chondrozyten und dem strukturellen Aufbau der EZM lässt sich der Gelenkknorpel in vier Zonen einteilen, wobei die Übergänge zwischen den Zonen kontinuierlich sind: oberflächliche Zone (auch als Tangentialzone bezeichnet), Transitionalzone, radiale oder tiefe Zone und die Zone des kalzifizierten Knorpels (siehe Abb. 2-4) (Martinek, Ueblacker et al. 2003; Swieszkowski, Tuan et al. 2007). Die sich anschließende subchondrale Knochenlamelle ist weiterhin funktionell bedeutend und somit in die Einheit des Gelenkknorpels mit einzuschließen.

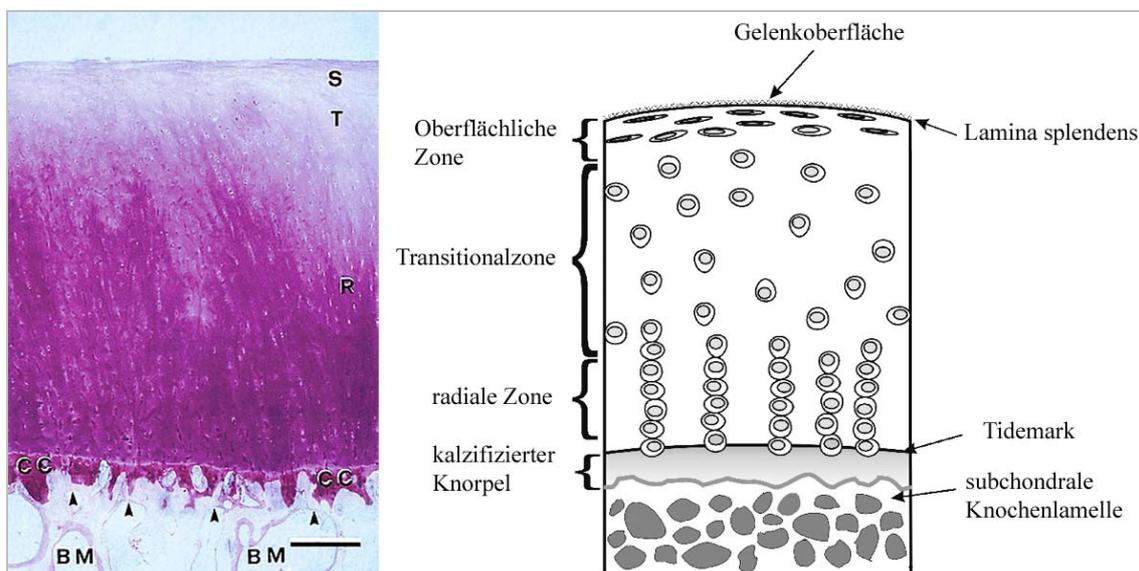


Abbildung 2-4: Struktur des Gelenkknorpels; histologische Toluidinblau-Fuchsin-Färbung (links) übernommen aus Hunziker et al. (2002), schematische Darstellung (rechts) aus Timothy et al. (2006)

Die oberflächliche Zone beinhaltet wichtige mechanische und biologische Eigenschaften. Die Schichtdicke ist mit 10-20% der Gesamtknorpeldicke am geringsten. Die oberflächliche Zone lässt sich weiterhin in zwei Schichten unterteilen. Eine dünne azelluläre Schicht, auch als „Lamina splendens“ bezeichnet, überzieht die Gelenkoberfläche filmartig und beinhaltet feine Fibrillen an denen kurzkettenige Polysaccharidketten gebunden sind. Darunter folgt eine kollagenreiche Schicht, wobei die Kollagenfasern charakteristisch tangential zur Gelenkoberfläche angeordnet sind. Die

spindelförmigen, ellipsoiden Chondrozyten liegen ebenfalls mit der Längsachse parallel zur Knorpeloberfläche in Einzel-Zell-Chondronen vor (Hunziker, Quinn et al. 2002; Alford und Cole 2005). Untersuchungen über den Zellmetabolismus haben ergeben, dass die Zellen der oberflächlichen Zone die Proteoglykane weniger synthetisieren und schneller abbauen als in den tieferen Knorpelzonen. Dies erklärt den hohen Gehalt an Kollagenen und interstitieller Flüssigkeit (Huber, Trattinig et al. 2000). Die dichte Anordnung der Kollagenfasern verleiht dieser Zone eine bedeutende Steifigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften und Kompressionen. Zusätzlich stellt diese Schicht eine Barriere für größere Makromoleküle dar und isoliert somit das Knorpelgewebe vom Immunsystem.

Die Kollagenfasern der Transitionalzone bilden in ihrer Anordnung einen Übergang zwischen der oberflächlichen und der tiefen Zone. Die Verlaufsrichtung der Matrixorganisation ändert sich fließend von parallel zur Oberfläche bis senkrecht in die Tiefe strahlend. Die Zone hat eine vergleichbare Schichtdicke zu der darüber liegenden Zone, jedoch unterscheidet sich die Matrixzusammensetzung durch einen bedeutend höheren Anteil an Proteoglykanen, sowie einen geringeren Anteil an Kollagenen und interstitieller Flüssigkeit. Zusätzlich haben die synthetisierten Kollagenfibrillen einen größeren Durchmesser als die Fibrillen der oberflächlichen Zone. Die sphäroidalen Chondrozyten zeigen eine hohe Syntheserate und sind folglich mit einer vermehrten Anzahl von Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat ausgestattet. Analog zur oberflächlichen Zone sind die Zellen einzeln in Chondrone eingebettet.

Die Schichtdicke der radialen Zone ist mit einem Anteil von ca. 60% an der gesamten Knorpeldicke am höchsten. Auch der Durchmesser der Kollagenfibrillen und der Gehalt der Proteoglykane sind im Vergleich zu den anderen Knorpelzonen weit höher. Die runden Zellen sind in Säulen perpendicular zur Gelenkoberfläche angeordnet und bilden mit mehreren Zellen pro Chondron Chondrozytencluster (siehe Abb. 2-1). Die senkrecht verlaufenden Kollagenfasern tauchen in die Grenze zwischen der nicht-kalzifizierten und der kalzifizierten Matrix ein. Diese Grenze, die so genannte „tidemark“, ist lichtmikroskopisch als basophile Linie erkennbar. Dieser dünnen Schicht wird bei mechanischer Beanspruchung eine vermittelnde Funktion zwischen dem darüberliegenden elastischen Knorpelgewebe und dem deutlich starrerem kalzifizierten Knorpel nachgesagt (Broom und Poole 1982).

Die dünne Zone des kalzifizierten Knorpels beherbergt Chondrozyten mit kleinem Zellvolumen und geringer metabolischen Aktivität. Diese Schicht des kalzifizierten Knorpels trennt den hyalinen Knorpel vom subchondralen Knochen. Die Kollagenfasern strahlen senkrecht in den subchondralen Knochen ein. Zusätzlich trägt die zapfenförmige Verzahnung mit der subchondralen Lamelle zur Stabilität des Knorpel-Knochenüberganges bei. Die Zellen erscheinen im histologischen Schnitt

eingebettet als Inseln in der Knorpelmatrix. Dies sind jedoch virtuelle Inseln, denn in die Zone des kalzifizierten Knorpels strahlen Kanäle aus der radialen Zone, gefüllt mit Knorpelmatrix und Chondrozyten, ein. Diese Kanäle stellen eine Verbindung zum subchondralen Knochen her. Die Bedeutung der nutritiven und metabolischen Versorgung des Knorpelgewebes über diese Verbindung wird diskutiert (Lyons, McClure et al. 2006).

Die subchondrale Knochenlamelle schließt sich, durch eine schmale Zementlinie getrennt, dem Gelenkknorpel an. Diese subchondrale Region ist stark vaskularisiert (arterieller und venöser subchondraler Plexus) und innerviert (siehe Abb.2-5). Über arterielle Sinusoide besteht eine direkte Verbindung zum kalzifizierten Knorpel und somit auch zum darüber liegenden Knorpelgewebe. Der Blutfluß im subchondralen Knochen ist bis zu zehnmal höher als im trabekulären Knochen. Das erklärt sich durch den hohen Nährstoffbedarf und dem vermehrten Anfall metabolischer Umwandlungsprodukte aus dem Knorpelgewebe. Bei mechanischer Gelenkbelastung ist die Stabilität der subchondralen Lamelle von großer Bedeutung. Sie schützt den hyalinen Knorpel besonders bei exzessiven Krafteinwirkungen, denn durch den zapfenförmigen Übergang werden die einwirkenden Scherkräfte als Kompressions- und Druckbelastungen auf die subchondrale Knochenlamelle übertragen (Ding, Dalstra et al. 1998; Imhof, Breitenseher et al. 1999).

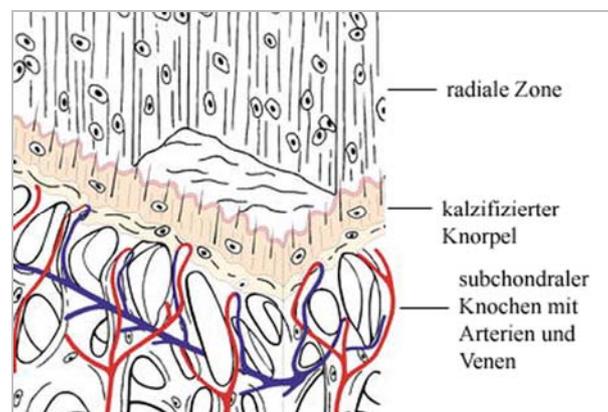


Abbildung 2-5: Subchondraler Knochen mit arteriellem und venösem Plexus und den darüber liegenden Knorpelzonen; übernommen aus Imhof et al. (2002)

2.2 Pathophysiologie des Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel zeigt bei Verletzungen und Degenerationserscheinungen nur eine limitierte Heilungstendenz. Die fehlende oder geringe Heilungstendenz des Knorpelgewebes ist in der Avaskularität des Gewebes, der Immobilität der Chondrozyten und deren verminderten Proliferationsmöglichkeiten begründet (Caplan, Elyaderani et al. 1997).

Ätiologisch für pathologische Veränderungen des Knorpelgewebes sind akute und chronische Traumata, biomechanische Fehlbelastungen der Gelenke sowie endogen genetische und entzündliche Ursachen. Die Degeneration und der Verlust der normalen Struktur und Funktion des Knorpelgewebes sind integrale Bestandteile des klinischen Syndroms der Osteoarthritis, einer degenerativ fortschreitenden Gelenkerkrankung. Klinisch im Vordergrund stehen Gelenkschmerzen, Krepitation und Gelenkeffusion, begleitet von Belastungseinschränkungen (Buckwalter und Mankin 1998).

Die heute am häufigsten verwendete klinische Klassifizierung der Knorpeldefekte besteht bereits seit dem Jahre 1961 und wurde von Outerbridge eingeführt (Outerbridge 1961). Diese klinische Stadieneinteilung orientiert sich am arthroskopischen Bild des Knorpelschadens. Dabei entspricht der Grad 0 dem physiologischen Bild des artikulären Knorpels und der Grad I einer Erweichung und Ödematisierung der betroffenen Knorpelregion. Die Grad-II-Läsionen zeichnen sich durch Erosionen der Knorpeloberfläche, Fissuren und Knorpelzusammenhangstrennungen mit einem Durchmesser von bis zu 1,5 cm aus. Der Grad III ist charakterisiert durch Fissuren, bzw. Risse die den subchondralen Knochen nicht involvieren, wohingegen Grad IV Defekte die gesamte Knorpelschicht und auch den subchondralen Knochen betreffen. In Erweiterung der 4-stufigen Outerbridge-Klassifikation wurde 2003 durch die International Cartilage Research Society das „ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System“ veröffentlicht (Brittberg und Winalski 2003). Diese Klassifikation wird anhand des arthroskopischen Bildes der bereits debridierten Läsion mit Beachtung von Tiefe und Ausdehnung vorgenommen (siehe Abb. 2-6).

Die traumatisch verursachten Knorpelverletzungen werden in Mikrotrauma, chondrale Fraktur und osteochondrale Fraktur unterschieden. Die Entstehung von Verletzungen des artikulären Knorpels lässt sich auf unphysiologisch einwirkende Rotations- und Scherkräfte zurückführen. Studien haben gezeigt, dass das Kniegelenk die am häufigsten betroffene anatomische Struktur darstellt. Besonders der Gelenkknorpel des medialen Femorkondylus zeigt eine hohe Prävalenz für Knorpelschäden (Willers, Partsalis et al. 2007). Die traumatisch bedingten Verletzungen des Gelenkknorpels sind häufig mit Verletzungen protektiver Gelenkstrukturen, wie beispielsweise dem Bandapparat und den Menisken, vergesellschaftet (Spindler, Schils et al. 1993).

Outerbridge	ICRS Grad	ICRS Beschreibung	
	0	keine erkennbaren Defekte	
I	1 a	intakte Oberfläche, fibrillationen und/oder leichte Erweichung	
	1 b	zusätzl. oberflächliche Risse/ Fissuren	
II	2	Läsionstiefe <50% der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)	
III	3 a	>50% Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierten Schicht (schwer abnormer Knorpel)	
	3 b	>50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierten Schicht	
	3 c	>50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte	
	3 d	>50% Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung	
IV	4 a/ b	vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte	 a b

Abbildung 2-6: Outerbridge- und ICRS-Klassifizierung von Knorpeldefekten im Vergleich; übernommen aus Braun et al (2007)

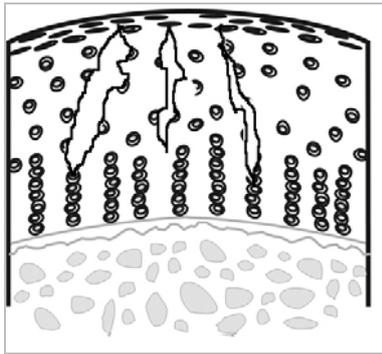


Abbildung 2-7: Mikrotrauma des Gelenkknorpels; modifiziert und übernommen aus Thimoty M et al. (2006)

Ein Mikrotrauma beinhaltet die Schädigung der Chondrozyten und der Matrixstruktur, wobei die Knorpeloberfläche vorerst intakt bleibt. Zusammenhangstrennungen im Netzwerk der Kollagenfibrillen führen zu einem Stabilitätsverlust des Gewebes. Im weiteren Verlauf ist ein Zelluntergang der Chondrozyten zu beobachten, assoziiert mit metabolischen Veränderungen und der Matrixzusammensetzung. Die vermehrte Apoptose und Nekrose der Knorpelzellen beinhaltet die Abnahme an Kollagenen und Proteoglykanen durch verminderte Neusynthese und vermehrten Abbau dieser Matrixbestandteile (D'Lima, Hashimoto et al. 2001). Folglich nimmt die Wasserbindungskapazität der extrazellulären Matrix ab und die mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes gehen in diesem Bereich verloren. Die mechanische Erweichung des Gewebes ist ein Resultat dieser zellulären und molekularen Veränderungen und zieht im weiteren Verlauf Degenerationserscheinungen nach sich. Es sind Erosionen in der vorerst intakten Knorpeloberfläche und Fibrillationen in der betroffenen Region zu beobachten und ein Verlust der Knorpelschichtdicke ist die Folge (Lohmander, Dahlberg et al. 1989).

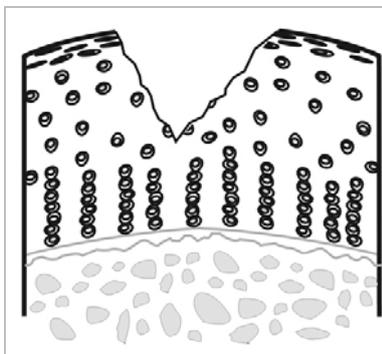


Abbildung 2-8: chondrale Fraktur; übernommen aus Thimoty et al. (2006)

Die chondrale Fraktur zeichnet sich durch die Verletzung der Knorpelschicht ohne Penetration der subchondralen Strukturen aus. Auch bei dieser Art der Verletzung ist das vaskuläre System nicht involviert, die reparative Proliferation von Chondrozyten ist somit stark limitiert. In der Defektperipherie kommt es zur Proliferation von Chondrozyten, welche sich zu pathohistologisch charakteristischen Zellclustern formieren. Jedoch ist im weiteren Verlauf keine Migration dieser Zellen in den Defektbereich zu beobachten. Die anfangs erhöhte metabolische und mitotische Aktivität sistiert. Die Zellen sterben ab und lassen die so genannten Geisterhöfe im histologischen Bild zurück. Die Defektränder zeigen keine Tendenz zur Vereinigung (Mankin 1982). Die folgenden Gewebereaktionen gleichen den bereits beschriebenen Vorgängen der Mikrotraumata. Der Verlust der Knorpelschichtdicke und der biomechanischen Eigenschaften sind Vorreiter einer progressiven Degeneration.

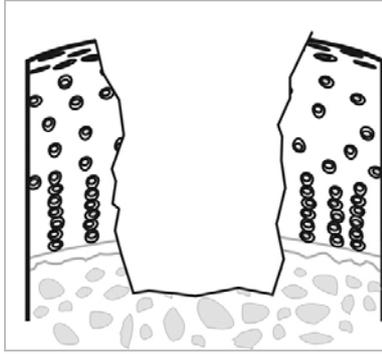


Abbildung 2-9: Osteochondrale Verletzung, übernommen aus Timoty et al. (2006)

Die osteochondrale Verletzung zeichnet sich durch eine Läsion aus, die durch die gesamte Knorpelschicht bis in den subchondralen Knochen und weiter reicht. Unmittelbar nach der Defektenstehung bildet sich durch das Einbluten aus dem vaskularisierten Knochengewebe ein Hämatom, welches sich daraufhin zu einem Fibringerinnsel organisiert. Im Folgenden entwickelt sich aus dem Fibringerinnsel ein fibroelastisches Reparatursgewebe, in welches Gefäße aus dem darunter liegenden Knochenmark einsprießen. Ebenfalls aus dem Knochenmark stammende eingewanderte, pluripotente mesenchymale Stammzellen proliferieren über Chondroblastenstadien zu Chondrozyten. Diese Chondrozyten synthetisieren Matrixbestandteile, wie Kollagenfibrillen und Proteoglykane (Goldberg und Caplan 1999). In der Defekttiefe bildet sich durch enchondrale Ossifikation eine subchondrale Knochenlamelle, welche (wie bereits beschrieben) für die Stabilität des darüberliegenden Knorpelgewebes von großer Bedeutung ist (Radin und Rose 1986; Imhof, Breitenseher et al. 1999).

Die Matrixzusammensetzung des neu gebildeten Knorpelgewebes ist jedoch nicht äquivalent zur Qualität und Quantität des originären hyalinen Knorpelgewebes und wird in der Literatur als hyalinähnliches Knorpelgewebe beschrieben. So ist der Anteil an Kollagen-Typ-II-Fasern deutlich geringer und ein höherer Gehalt an Kollagen-Typ-I-Fasern ist zu beobachten. Dieses Regeneratgewebe zeigt im weiteren Heilungsverlauf wesentliche Merkmale des Faserknorpels, welcher den biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels weit unterlegen ist (Furukawa, Eyre et al. 1980; Mankin 1982). Lichtmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass die Kollagenfibrillen des neu gebildeten Gewebes nicht in die Matrixstrukturen des angrenzenden Knorpelgewebes integriert werden (Shapiro, Koide et al. 1993). Längerfristig hält das Regenerationsgewebe den physiologisch einwirkenden Druck- und Scherkräften nicht stand und es kommt zu den bereits genannten Degenerationserscheinungen (Ulrich-Vinther, Maloney et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Verletzungen des Gelenkknorpels nur eine zweifelhafte Prognose zur Selbstheilungstendenz zu stellen ist. Das Knorpelgewebe zeigt keine klassische dreiphasige Wundheilung (Inflammationsphase, Granulationsphase und Regenerationsphase), bei der es zu einer vollständigen Herstellung der vorigen Gewebequalität kommt. Die Verletzung des Knorpelgewebes zeigt anfangs zwar Proliferationsvorgänge, welche aber im Folgenden zum Stillstand kommen. Im längerfristigen Verlauf sind Substanzverluste und Degenerationserscheinungen zu beobachten. Die limitierte Fähigkeit der Chondrozyten, Schädigungen der Matrixbestandteile auszugleichen, ist ein Zeichen für eine sehr empfindliche Homöostase zwischen Anabolismus und Katabolismus in diesem speziellen Gewebe. Die osteochondrale Defektheilung ist aufgrund der entstehenden Anbindung an das vaskuläre System durch Charakteristika der Wundheilung

gekennzeichnet, jedoch kommt es nicht zu einer Regeneration des verletzten Gewebes, sondern zur Bildung von minderwertigem Reparationsgewebe. Das entstandene Gewebe beinhaltet eine geringere Steifigkeit und eine höhere Gewebspermeabilität, sodass es sekundär aufgrund der wiederholten Belastung des Gelenkes zu degenerativen Prozessen kommt (Buckwalter und Mankin 1998; Redman, Oldfield et al. 2005).

2.3 Pathohistologie des Gelenkknorpels

Die bereits erwähnten pathophysiologischen Vorgänge des hyalinen Knorpelgewebes bei traumatisch oder chronisch-degenerativ bedingten Gewebeveränderungen führen zu definierten histologisch erkennbaren Reaktionsmustern. Diese histologisch evaluierbaren pathologischen Merkmale der zellulären und extrazellulären Knorpelbestandteile sollen in diesem Abschnitt näher dargestellt werden.

Die Reaktionen des hyalinen Knorpelgewebes auf die bereits beschriebenen Verletzungsmuster beinhalten eine Matrixdegradation durch die Aktivität endogener Enzyme und einen damit assoziierten Anstieg des Wassergehalts. Die veränderten biomechanischen Gewebeeigenschaften führen zu Instabilitäten der Fasernetzwerke der EZM und im histologischen Bild sind Zusammenhangstrennungen und Fibrillationen im Knorpelgewebe zu beobachten (D'Lima, Hashimoto et al. 2001). Spezifische Anfärbungen der Proteoglykane bestätigen deren Degradation und die insuffiziente Synthese dieser Matrixbestandteile durch die Chondrozyten (Frenkel, Bradica et al. 2005). Die verminderte Protektion und die nutritive Unterversorgung der Chondrozyten beinhaltet eine Zellapoptose und Zellnekrose (Lotz, Hashimoto et al. 1999). Morphologisch stellen sich die Zellen spindelförmig und der Knorpelhof vergrößert dar. Dieses pathologische Erscheinungsbild wird in der Literatur als Geisterhof bezeichnet. Der Zelluntergang beinhaltet die Erscheinungen der Kernpyknose, d.h. eine Verdichtung der Zellkerne mit zahlreichen Chromatinkörnchen und eine stärkere Färbbarkeit bei schrumpfenden Volumen als Zeichen des beginnenden Kernzerfalls. Im weiter fortgeschrittenen Stadium ist eine Karyolyse oder bereits die Abwesenheit von Zellkernen histologisch zu beobachten.

Die Gewebereparation führt zu einer erhöhten Mitose- und Replikationsaktivität der noch vorhandenen vitalen Chondrozyten und zur Formierung von charakteristischen Chondrozytenclustern. Dies beinhaltet einen Anstieg der Matrixsynthese und eine sich anschließende endogene Reorganisation. Die insuffiziente Regenerationskompetenz des hyalinen Knorpelgewebes ist mit der Bildung von Faserknorpelgewebe als Reparationsgewebe verbunden. Diese Gewebespezies zeigt einen hohen Gehalt an Kollagen-I-Fasern. Die Anordnung der runden Zellen ist ungeordnet und unterscheidet sich charakteristisch vom hyalinen Knorpelgewebe (Mainil-Varlet, Aigner et al. 2003).

Die Aussagekraft histologischer Untersuchungen zur osteochondralen Defektheilung ist durch die Verwendung semiquantitativer Scores verbessert. In der Literatur ist eine Vielfalt an histologischen

Beurteilungssystemen des hyalinen Gelenkknorpels und dessen Degenerationserscheinungen beschrieben (Mankin, Dorfman et al. 1971; O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Pineda, Pollack et al. 1992; Caplan, Elyaderani et al. 1997).

Für die klinische Beurteilung von degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels wurde von der ICRS (International Cartilage Repair Society) ein Score entwickelt (Mainil-Varlet, Aigner et al. 2003). Dieser Score ermöglicht die semiquantitative histologische Einteilung von Gewebebiopsaten. Die Kriterien beinhalten die Knorpeloberfläche, Matrixzusammensetzung, Zellmorphologie, Abnormalitäten der subchondralen Knochenlamelle und den Mineralisationsgrad des Knorpelgewebes. Frenkel et al. entwickelten auf der Grundlage von O'Driscolls Bewertungsskala einen Score für die Beurteilung von osteochondralen Regeneraten (Frenkel, Bradica et al. 2005). Zusätzliche Kriterien zu dem ICRS-Score sind der prozentuale Anteil hyalinen Knorpelgewebes, strukturelle Integrität des Regenerationsgewebes, zelluläre Degenerationen und die Anfärbung des Knorpelgewebes in der Safranin-Orange-Färbung.

2.4 Therapieoptionen von Gelenkknorpeldefekten

Der vorangestellte Überblick der Pathophysiologie des artikulären Knorpelgewebes verdeutlicht das klinische Problem der unzureichenden Heilungstendenz von Knorpeldefekten traumatischer sowie degenerativer Genese. Die Zielsetzung der knorpelchirurgischen Therapiemaßnahmen ist die Wiederherstellung der Integrität der Gelenkoberfläche mit dem Erreichen einer uneingeschränkten schmerzfreien Bewegung und das Verhindern einer progressiven Gewebedegeneration.

Die bisher entwickelten Behandlungsoptionen umfassen zum einen symptomatische Verfahren, sowie knochenmarkstimulierende Techniken zur Stimulation der intrinsischen Regeneration. Hinzu kommen restorative Techniken, welche die Transplantation von Geweben, Zellen und synthetischen Materialien beinhalten.

2.4.1 Symptomatische Verfahren

Die arthroskopische Gelenklavage stellte in der Vergangenheit eine häufig angewendete Therapieoption für schmerzhafte Gelenkerkrankungen dar. Kombiniert mit einem Debridement wurde eine deutliche Abnahme der Schmerzen und Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit beobachtet (Johnson 1986).

Ein pathologischer Knorpelabrieb führt zu einer Synovitis und nachfolgendem Gelenkerguss, während zusätzliche instabile Knorpelstückchen zu mechanischen Effekten wie Einklemmung und Krepitus führen. Die Lavage reduziert inflammatorische Symptome durch Ausschwemmung entzündlicher Mediatoren und freier Knorpelstückchen. Die Abtragung von aufgefaserten Knorpelbestandteilen führt zu einer Glättung der Gelenkoberfläche und damit zu einer Reduzierung der mechanischen Reize. Diese Therapiemaßnahmen sind heute als insuffiziente Behandlungsoptionen zu betrachten, da sie

nicht zu regenerativen Prozessen an der geschädigten Knorpelregion beitragen. Eine Verbesserung der klinischen Symptome ist nur temporär zu erwarten und fortschreitende degenerative Prozesse sind im weiteren Verlauf zu beobachten (Willers, Partsalis et al. 2007).

2.4.2 Knochenmarkstimulierende Techniken

Das gemeinsame Prinzip der knochenmarkstimulierenden Verfahren ist die Eröffnung des vaskularisierten Knochenmarkraumes durch die Penetration der subchondralen Kortikalis. Wie bereits beschrieben (in 2.2 Pathophysiologie des Gelenkknorpels), ermöglicht die Eröffnung des subchondralen Knochens sämtliche gefäßassoziierten klassischen Heilungsprozesse und die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (Goldberg und Caplan 1999). Im weiteren Verlauf wird ein faserknorpeliges Ersatzgewebe mit minderwertigen biomechanischen Eigenschaften generiert (Nehrer, Spector et al. 1999).

Die erst beschriebene Technik dieser Art sind die Pridie-Bohrungen aus dem Jahre 1959, wobei chondrale Defekte durch den subchondralen Knochen angebohrt werden (Muller und Kohn 1999). Die Abrasionschondroplastik beinhaltet das Abtragen und Glätten degenerativ veränderter Knorpelareale und wird durch Eröffnung des Markraumes ergänzt (Bert und Maschka 1989). Bei der multiplen Mikrofrakturierung wird die subchondrale Knochenlamelle mit einem spitzen Stößel mehrfach perforiert. Um den Zusammenhalt der subchondralen Knochenlamelle zu gewährleisten, wird ein Abstand zwischen den einzelnen Löchern von 3-4 mm empfohlen. Diese Technik erzeugt ebenfalls eine Knorpelreparatur über die Stimulation und Einwanderung von potenten Stammzellen aus dem Knochenmark. Der Zusammenhalt der subchondralen Knochenlamelle und somit auch die Gelenkkontur bleiben erhalten. Das Fehlen von Hitzenekrosen im angrenzenden Knorpelgewebe wird als Vorteil gegenüber den Pridie-Bohrungen gewertet. Des Weiteren ermöglichen die Stößel eine verbesserte Kontrolle über die Tiefe der Perforation. Klinische Ergebnisse behandelter Patienten berichten von Verbesserung der Schmerzsymptomatik und der körperlichen Aktivität (Steadman, Briggs et al. 2003). Das Knorpelersatzgewebe zeigt jedoch eine mindere Qualität und Strukturmerkmale des fibrösen Knorpelgewebes. Die degenerativen Gewebereaktionen des angrenzenden Knorpelgewebes infolge des operativen Eingriffs sind zudem kritisch zu beurteilen und schränken das Heilungsergebnis zusätzlich deutlich ein (Tew, Kwan et al. 2000; D'Lima, Hashimoto et al. 2001; Redman, Dowthwaite et al. 2004).

2.4.3 Restorative Techniken

Zur Überwindung des limitierten Heilungspotentials der bereits beschriebenen Behandlungsoptionen wurden Techniken entwickelt, welche die Transplantation von Geweben oder Zellen mit chondrogenem Potential beinhalten. Dabei ist die Zielsetzung der entwickelten Methoden die Ausbildung von minderwertigem Faserknorpel zu vermeiden und möglichst hyalinen Knorpel zu

reproduzieren, um die biomechanischen und physiologischen Eigenschaften des Gewebes wieder längerfristig herzustellen.

Der autologe Transfer von Knorpelknochenzylindern wurde 1994 erstmals unabhängig voneinander von Müller und Wagner beschrieben (Wagner 1964). Die Technik ist aktuell das einzige Verfahren, das die Defektzone mit hyalinem Knorpel deckt. Bei der osteochondralen autologen Transplantation (OAT) werden intakte Knorpelknochenzylinder, in offener oder arthroskopischer Technik, aus nichtbelasteten Regionen entnommen und in die Defektareale implantiert. Die bevorzugten Entnahmereale sind insbesondere die proximale anterolaterale und anteromediale Trochlea.

In Abhängigkeit von der Defektgröße und Lokalisation werden ein oder mehrere Zylinder in Form der Mosaikplastik transplantiert. Diese Technik ist limitiert durch die zur Verfügung stehenden Entnahmeregionen und durch die Defektgröße. Bei Defektgrößen über 4 cm² und einer Tiefe über 10 mm wird von dieser Methode abgeraten. Zunächst wird mit speziellen Hohlfräsen der Defektknorpel und der darunter liegende Knochen entfernt und ein zylinderförmiger Hohlraum als Implantationsbett geschaffen. Bei der Entnahme des definiert größeren Knorpelknochenzylinders aus der Spenderregion ist die geometrische Passform der Knorpeloberfläche zu beachten. Das Einbringen des Spenderzylinders unter der press-fit-Methode macht eine zusätzliche Fixation überflüssig, wobei die Stabilität in Abhängigkeit mit der Zylindergröße steht (Duchow, Hess et al. 2000).

Das Hauptproblem dieser Methode stellt die Integration der Knorpelknochenzylinder in der Knorpelregion dar. Während im Bereich der subchondralen Knochenlamelle und im darunter liegenden spongiösen Knochen eine vollständige Integration erfolgt, wird zwischen dem Zylinderknorpel und dem originären Knorpel eine faserknorpelige Defektauffüllung beobachtet. Im schlechtesten Falle bleibt im Knorpelbereich ein persistierender Spalt zurück. Diese inkomplette Fusion ist der Ansatzpunkt für eine darauf folgende Transplantatdegeneration (Horas, Pelinkovic et al. 2003). Des Weiteren wird diskutiert, dass das Knorpelgewebe aus weniger belasteten Gelenkregionen den höheren Belastungen in der Implantationsregion aufgrund der differentiellen Matrixzusammensetzung nicht standhält und somit einen weiteren Anhalt für degenerative Erscheinungen bietet (Hunziker 2002). Tierexperimentelle Langzeitstudien mit einer Laufzeit von einem Jahr haben ergeben, dass die Steifigkeit des transplantierten Knorpelgewebes in den ersten 12 postoperativen Wochen im Vergleich zum originären Gelenkknorpel deutlich abnimmt. Die biomechanischen Eigenschaften gleichen sich nach 12 Wochen post op jedoch den Eigenschaften des umgebenden Knorpelgewebes an. Dies zeigt die Vitalität des implantierten Gewebes und das Potenzial der Angleichung der biomechanischen Eigenschaften durch Matrixumbau zum umliegenden Knorpelgewebe (Nam, Makhsous et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten zusätzlich darauf hin, dass eine auf diese Ergebnisse abgestimmte Planung der Rehabilitation in den ersten 12 Wochen post op von besonderer Bedeutung ist (Kuroki, Nakagawa et al. 2007).

Die Transplantation von osteochondralen Allografts erlaubt die Defektbehandlung ohne Limitierung der Spenderkapazität. Die Indikation dieser Technik ist bei großen osteochondralen Defekten mit einer Defekttiefe über 10 mm gegeben (Gortz und Bugbee 2006). Weitere Vorteile sind die verhinderte Entnahmemorbidität und die Möglichkeit der Verwendung von Knorpel-Knochen-Zylindern jüngerer Spenderindividuen mit einer höheren Qualität des Transplantationsgewebes. Die Sterilisations- und Konservierungsverfahren der Spendergewebe verursachen jedoch Schädigungen der Matrixbestandteile und Chondrozyten (Williams, Dreese et al. 2004). Weitere schwerwiegende Nachteile dieser Technik sind auch, dass ein Infektionsrisiko nicht vollständig ausgeschlossen werden kann und die Gefahr immunologischer Abwehrreaktionen besteht.

Die Transplantation von Periost und Perichondrium bezieht sich auf die biologische Proliferationsfähigkeit chondrogen aktiver Vorläuferzellen des Transplantationsgewebes. Die zugrunde liegende Idee dieser Technik ist, dass sich die mesenchymalen Stammzellen in Abhängigkeit vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck des umgebenden Gewebes zu Knorpel- oder Knochenzellen differenzieren. Das Perichondrium wird von einer sternumnahen Rippe, das Periost von der medialen Tibiafläche entnommen. Die Knorpeldefektränder werden begradigt und anschließend wird das Transplantatgewebe auf den Defekt aufgenäht oder mittels Fibrinkleber fixiert. Die Ergebnisse klinischer Studien dieser Methode zeigen große Variationen. So wurde die Bildung von Faserknorpelgewebe, hyalin-artigem bis hyalinem Knorpelgewebe beschrieben. Jedoch sind die Langzeitergebnisse aufgrund früher Degenerationen des gebildeten Gewebes mangelhaft. Zudem sind Periosthypertrophien, Delaminationen und Ossifikationsprozesse beschrieben worden, die das Ergebnis deutlich verschlechtern und einen Revisionseingriff notwendig machen (O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Micheli, Browne et al. 2001).

Die Methode der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) wurde 1994 von Brittberg et al. als eine Alternative zur Behandlung chondraler Defekte publiziert (Brittberg, Lindahl et al. 1994). Dieses Verfahren benötigt einen vollständig intakten subchondralen Knochen im Defektareal. Bei dieser zweizeitigen Operationstechnik wird zunächst in arthroskopischer Technik Knorpelmaterial gewonnen. Das Gewebe wird äquivalent der OAT-Technik von weniger belasteten Gelenkregionen entnommen, wobei auch hier eine Penetration der subchondralen Knochenlamelle erfolgt, um eine Faserknorpelbildung zu induzieren. Anschließend werden in vitro die enzymatisch isolierten Chondrozyten steril kultiviert.

In einem zweiten Eingriff wird zunächst die Defektregion präpariert, pathologisch verändertes Knorpelgewebe wird entfernt, und die Defektränder werden begradigt. Der subchondrale Knochen wird bei dieser Technik nicht eröffnet, um eine Faserknorpelbildung im Defektareal zu unterbinden. Folgend wird ein zuvor entnommener Periostlappen auf den Defekt aufgenäht. Unter diesen fixierten Periostlappen wird abschließend die Zellsuspension injiziert. Die klinischen Ergebnisse zeigten

deutliche Symptomverbesserungen der Patienten und in entnommenen Biopaten wurde hyalinartiges Gewebe mit einem hohen Anteil an Typ-II-Kollagenen nachgewiesen. In einer Langzeitstudie über sieben Jahre zeigten 85% der behandelten Patienten gute bis exzellente Ergebnisse im Heilungsverlauf (Peterson, Brittberg et al. 2002). Trotz der in der Literatur angegebenen Erfolgsquoten von mehr als 70% ist die Technik aufwendig und technisch sehr anspruchsvoll (Minas und Peterson 1999; Bartlett, Skinner et al. 2005). Die zeitlich aufwendige Periostlappengewinnung und die Fixation des Transplantates erfordern einen größeren operativen Zugang, was zu Entstehung einer Arthrofibrose führen kann (Peterson, Brittberg et al. 2002).

Die matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT) ist ein konkurrierender Therapieansatz zur ACT in Suspension. Die Implantation der Chondrozyten in oder auf unterschiedlichen resorbierbaren dreidimensionalen Trägermaterialien bilden eine große Gruppe der matrixgekoppelten Chondrozytentransplantation. Die Anwendung dieser Matrices ermöglicht die gleichmäßige Verteilung der Zellen im Defektareal und vereinfacht die operative Technik (Gravius, Schneider et al. 2007). Eine Naht durch den angrenzenden intakten Knorpel zur Fixierung ist nicht mehr zwingend nötig und verhindert somit zusätzliche Gewebereaktionen. Die Trägermaterialien werden nach einem definierten Zeitraum resorbiert und lassen Raum für die korrespondierend verlaufende Synthese von Regeneratgewebe. Zu den klinisch verwendeten resorbierbaren Stoffgruppen gehören Kollagene tierischen Ursprungs (in Vlies-, Gel- oder Mebranform), Hyaluronsäurederivate und verschiedene synthetisch hergestellte Polymere (Polylactide und – glycolide). Es bestehen große Variationen in der technischen Gestaltung der Chondrozytenapplikation. Die kultivierte Zellen können analog zu der klassischen ACT-Technik unter eine zuvor aufgebrauchte Matrix injiziert werden, sie können kurz vor Implantation auf das Matrixmaterial aufgebracht werden oder sie werden vom Hersteller fertig integriert in oder auf der Matrix geliefert (Braun, Vogt et al. 2007).

Die Transplantation von autologen mesenchymalen Stammzellen erfolgt in Analogie zu der MACT. Verschiedenste Trägermaterialien werden mit zuvor entnommenen mesenchymalen Stammzellen bestückt und in dem Defektareal platziert. Diese Methode beinhaltet die homogene Verteilung dieser chondrogenen Zellen im Defektbereich. Die Differenzierung dieser Zellen zu matrixproduzierenden Chondrozyten konnte beobachtet werden (Mizuta, Kudo et al. 2004). Das gebildete Gewebe ist jedoch dem umliegenden hyalinen Knorpel nicht äquivalent. Experimentelle Ansätze dieser Methode mit Gentransduktionsvorgängen oder Zusätzen von Wachstumsfaktoren und anderen Botenstoffen sind weiterer Forschungsbestandteil (Wakitani 2007).

2.4.4 Biodegradierbare Implantate

Weitere Therapieansätze, in der Literatur unter dem Begriff „Tissue-Engineering“ beschrieben, stehen heute im Forschungsvordergrund (Frenkel und Di Cesare 2004; Simon und Jackson 2006). Die Methoden des Tissue-Engineering können als eine Anwendung von biologischen, chemischen und technischen Attributen für die Reparatur und Regeneration von vitalem Gewebe definiert werden. Dabei kommt es zur Verwendung von synthetischen Materialien, Zellen und anderen biologischen Faktoren in unterschiedlicher Kombination (Laurencin, Ambrosio et al. 1999). Die zuvor beschriebenen klinisch bereits angewandten Techniken der MACT und der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen gehören im engeren Sinne ebenfalls zu diesen Therapiemethoden. Es handelt sich um restorative Techniken unter Verwendung von resorbierbaren Stoffgruppen natürlicher oder synthetischer Herkunft in Scaffoldform. Diese Scaffolds werden entweder ohne Zusätze als Implantat verwendet, oder sie stellen zusätzlich Trägermaterialien für chondrogene Zellen, mesenchymale Stammzellen, embryonale Stammzellen oder diverse Wachstumsfaktoren dar (Martinek, Fu et al. 2001; Kaul, Cucchiari et al. 2006; Shah, Kaplan et al. 2007). In dieser Arbeit sind die Polyglykoxide (PGA) und Polylaktide (PLA) in Form von synthetischen Polymeren, den Poly(D,L)Laktid-co-Glykolid-Scaffolds (PLGA-Scaffolds), als verwendete Materialien von besonderem Interesse.

Der strategische Grundgedanke dieser Technik ist, eine temporäre Stabilität im Defektareal zu schaffen, um nach der Zellinfiltration die Gewebekonstruktion in der initialen Heilungsphase zu unterstützen (Niederauer, Slivka et al. 2000; von Rechenberg, Akens et al. 2003). Die anschließende kontinuierliche Biodegradation des synthetischen Materials und der Aufbau von Regeneratgewebe im Defektareal führen zu einer Wiederherstellung der Gelenkfunktion. Die Designkriterien dieser Scaffolds sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei Verwendung synthetischer Materialien zur Unterstützung der Geweberegeneration steht besonders die Biokompatibilität der Materialien im Vordergrund.

Entzündliche und immunogene Reaktionen sind Störfaktoren für eine optimale Integration in das umliegende native Gewebe und für die Bildung von regenerativem Ersatzgewebe (Remes und Williams 1992). Die Reaktionen zeigen sich in milden lokalen Fremdkörperreaktionen, wie dem Einwandern von Fremdkörperriesenzellen, mononukleären Rundzellen und Granulozyten. Jedoch sind auch osteolytische Prozesse und intensive entzündliche Weichteilveränderungen beschrieben worden (Stahelin, Weiler et al. 1997). Die Biokompatibilität beeinflussende Faktoren sind die strukturelle chemische Oberflächenbeschaffenheit, biochemische Bestandteile, sowie deren Degradationsprodukte und Resorptionsgeschwindigkeiten. Die Produktionsprozesse und Sterilisationsvorgänge nehmen ebenfalls einen großen Einfluss auf die Biokompatibilität der Materialien (Weiler, Hoffmann et al. 2000; Woodfield, Bezemer et al. 2002).

Biokompatibilität	Entzündungsreaktionen und immunogene Gewebereaktionen stören den Heilungsverlauf
Porosität, Permeabilität und dreidimensionaler Aufbau	Gewährleistung der Infiltration des Implantationsmaterials mit Regeneratgewebe, der Zelladhäsion, deren nutritiver Versorgung und der Einwirkung von Wachstumsfaktoren
Zelladhäsion und Zelltoxizität	Zytotoxische Inhaltsstoffe oder Abbauprodukte inhibieren die Zellvermehrung und –differenzierung
Biodegradation	Im Gleichgewicht zum Regenerationsprozess verlaufende Resorption und Metabolisierung der Scaffoldbestandteile unterstützt den Heilungsprozess
Biomechanische Integration	Schutz des nativen Gewebes, des Regeneratgewebes und der Zellen vor mechanischen Überbelastungen
Strukturelle Anisotropie	Um die native Anisotropie der Gewebestruktur zu ermöglichen
Größe und Form	Reproduktivität des Scaffoldimplantats in klinisch relevanter Größe und Form
Implantations-technik	Vorteilhaft ist eine möglichst minimalinvasive Applikationsform und eine Press-fit-Stabilität, um weitere Fixationsmaßnahmen zu umgehen

Tabelle 2-1: Übersicht zu den Designkriterien und Materialeigenschaften der biodegradierbaren Implantate

Die Scaffoldstruktur stellt ein weiteres wichtiges Kriterium dar. Eine suffiziente Porengröße erlaubt eine Infiltration und Migration von mesenchymalen Stammzellen und ermöglicht den dreidimensionalen Aufbau der extrazellulären Matrix (Hunziker 1999; Karageorgiou und Kaplan 2005; Nagura, Fujioka et al. 2007). Die minimale Porengröße wird in der Literatur mit 100 µm im Durchmesser beschrieben, wobei eine geringere Porengröße die Bildung von unmineralisiertem fibrösem Gewebe zur Folge hat (Hulbert, Young et al. 1970). Eine größere Porengröße erlaubt eine verstärkte Angiogenese im Defektareal und bietet somit optimale Bedingungen für die direkte Osteogenese. Kleinere Porengrößen bedingen durch hypoxische Konditionen eine geringere Vaskularisation im Defektgebiet. Dies induziert eine initiale Chondrogenese und wird von einer enchondralen Ossifikation gefolgt (Jin, Takita et al. 2000; Kuboki, Jin et al. 2001). Es besteht die Hypothese, dass ein diskontinuierliches Einwachsen des Knochengewebes in das poröse Scaffoldmaterial im Defektareal zu einem schnelleren Heilungsergebnis führt. Implantate mit einer soliden Phase hingegen ermöglichen eine Formation des Knochengewebes von den Defekträndern aus und zeigen im Defektzentrum eine geringere Stabilität (Simon, Roy et al. 2003).

Der Degradationsprozess von biodegradierbaren Implantaten wurde von Pistner et al. untersucht und in fünf Phasen eingeteilt (Pistner, Bendix et al. 1993; Pistner, Gutwald et al. 1993; Pistner, Stallforth et al. 1994). In der ersten Phase (Heilungsphase) formiert sich eine fibröse Gewebekapsel um das Implantat. Diese Phase wird von der zellärmeren latenten Phase gefolgt, in der die Kapsel aus lockeren Bindegewebsfasern besteht und das Implantat teilweise in direktem Kontakt zum umliegenden

Knochengewebe steht. In der dritten Phase (protrahierte Resorptionsphase) beginnt die Degradation der Implantatbestandteile. Es lässt sich eine moderate zelluläre Reaktivität und das Einwandern von Makrophagen und polynukleären Fremdkörperriesenzellen beobachten. Die sich anschließende progressive Resorptionsphase ist geprägt durch passiv hydrolytische, sowie zelluläre enzymatische Abbauprozesse. Zeitgleich ist eine Gewebeneubildung und –formierung im Implantatlager zu verzeichnen. Die fünfte Phase (Wiederherstellungsphase) beinhaltet die Bildung von Narben- oder Knochengewebe. Die Implantatsbestandteile sind vollständig degradiert.

In einer *vitro*-Studie wurden die Interaktionen der Chondrozyten mit dem PLGA-Material untersucht. Die Infiltration der Zellen in das poröse Material und die Proteoglykansynthese wurden beobachtet. Jedoch zeigten die Chondrozyten zwei verschiedene Zellmorphologien. Zellen die im direkten Kontakt zum synthetischen Material standen, waren im histologischen Bild spindelförmig, was eher der Morphologie fibroblastärer Zellen entspricht. Die Zellen, die keinen direkten Kontakt hatten, wiesen eine typisch sphäroide Zellmorphologie der Chondrozyten auf (Grande, Halberstadt et al. 1997). Der bei der *invitro*-Degradation von Polyhydroxysäuren anfallende saure Überstand aus niedermolekularen Abbauprodukten kann einen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben. Verschiedene *invivo*-Studien ließen keine zytotoxischen Reaktionen bei Verwendung von PGLA-Scaffolds unterschiedlicher Zusammensetzung feststellen (Boyan, Lohmann et al. 1999). Die Materialzusammensetzung der Scaffolds hat zudem einen bedeutenden Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften und die Biodegradation. Die Degradationskinetik der Polyglykolide verläuft wesentlich schneller als die der Polylaktide. Somit ist bei der Verwendung von langsam degradierenden Materialien eine längerfristige Defektstabilität gewährleistet. Zudem führt eine langsam protrahierte Freisetzung von Abbauprodukten zu einer adäquaten Resorption und verhindert eine toxische Kumulation dieser Produkte im Implantationslager (Hoffmann, Weller et al. 1997; Weiler, Hoffmann et al. 2000). Die Komposition der zwei Materialkomponenten in Form der PGLA-Scaffolds erlaubt eine Steuerung der Biodegradationskinetik und der biomechanischen Eigenschaften (Moran, Pazzano et al. 2003; Larsen, Pietrzak et al. 2005).

Die biomechanischen Eigenschaften der Implantate beeinflussen die Defektstabilität und Gewebedifferenzierung osteochondraler Defekte. Die auf die undifferenzierten Zellen einwirkenden mechanischen Stimuli wirken sich auf die gerichtete ossäre und chondrale Gewebedifferenzierung aus (Aspenberg, Tagil et al. 1996; Tagil und Aspenberg 1999; Guldberg, Butler et al. 2009). Weitere Studien belegen, dass die Steifigkeit der implantierten Scaffolds zur Versorgung osteochondraler Defekte die Regenerationsfähigkeit des Knochen- und Knorpelgewebes beeinflusst (Niederauer, Slivka et al. 2000). Der Einfluss der Defektstabilität wurde von Niederauer et al. untersucht (Niederauer, Slivka et al. 2000). In dieser Studie zeigten die Heilungsergebnisse osteochondraler Defekte, dass die Versorgung mit Scaffolds höherer Steifigkeit eine qualitativ und quantitativ hochwertigere Geweberegeneration impliziert. Zudem wird die Protektion der Zellen und des

gebildeten Gewebes durch die mechanische Integrität der Scaffolds bei physiologischen Krafteinwirkungen auf die Gelenkoberfläche gewährleistet (Frenkel und Di Cesare 2004).

Die biomechanischen Eigenschaften der Scaffoldimplantate werden anhand der Steifigkeit der synthetischen Konstrukte gemessen. Diese statische Größe beschreibt den Zusammenhang zwischen der Kraft, die auf einen Festkörper einwirkt und dessen Verformung. Die Steifigkeit wird durch den Elastizitätsmodul ausgedrückt, es gilt folgender Zusammenhang:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

(dabei ist σ die Spannung und ϵ die Dehnung)

Die Versorgung osteochondraler Defekte mit PLGA-Scaffolds erfordert die Regeneration zwei verschiedener Gewebe, den Aufbau des subchondralen Knochens und des hyalinen Gelenkknorpels. Die Wiederherstellung der subchondralen Knochenlammelle und des tiefer liegenden trabekulären Knochens sind Grundvoraussetzungen für die Regeneration der hyalinen Knorpelschicht an der Gelenkoberfläche (Frenkel, Bradica et al. 2005). Die Heilungsergebnisse unterschiedlicher Studien sind vielversprechend. Die Rekonstruktion des subchondralen Knochens und die Integration zum anliegenden Knochengewebe sind gewährleistet. Das Knorpelgewebe im Defektbereich zeigt mit vitalen Chondrozyten, Kollagen-Typ-II-Fasern und einem hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen deutliche Gewebemerkmale des hyalinen Knorpels. Der Übergangsbereich zum nativen Knorpelgewebe ist fließend (Simon und Jackson 2006). In den Randbereichen des Defektes wurde eine bessere Heilungstendenz beobachtet als im Defektzentrum (Kuo, Li et al. 2006).

Die bisherigen experimentellen Forschungsergebnisse zeigen, dass die Behandlung osteochondraler Defekte mit synthetischen Scaffolds durchaus eine Therapieoption darstellt. Im Bezug auf die optimale Materialzusammensetzung und die Biokompatibilität besteht weiterer Forschungsbedarf. Eine Etablierung dieser Methode in vergleichbaren Tiermodellen für die Evaluation klinisch anwendbarer Optionen steht noch aus (Muller, Schimpf et al. 2006).

2.5 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) gilt als eine bewährte nicht-invasive Methode für die Diagnostik von Gelenkknorpelverletzungen und für die Beurteilung des Heilungsverlaufs von Knorpelersatztherapien. Da Rearthroscopien als Standardnachuntersuchungen nicht durchzusetzen sind, ist die Kontrolle des Heilungsverlaufs über die MRT-Untersuchung als bestmögliche Option anzusehen. Der morphologische Status des Knorpelersatzgewebes, die benachbarte Subchondralregion und Reaktionen der umliegenden Gelenkstrukturen lassen sich im postoperativen Verlauf gut visualisieren (McCauley und Disler 2001; Moriya, Wada et al. 2007). Für die klinische Beurteilung einer Operationsmethode sind valide Kriterien und ein einheitliches MRT-Protokoll zur

Qualitätssicherung wünschenswert. Die bereits routinemäßig verwendeten Sequenzen für die Diagnostik von Gelenkknorpelveränderungen mittels MRT werden im Folgenden Abschnitt näher dargestellt.

Die protonengewichtete (PD) Fast-Spin-Echo-Sequenz (FSE) liefert eine hohe Auflösung, einen verbesserten Kontrast mittels Magnetisationstransfereffekts und die relative Erhaltung des hohen Signals des Knochenmarkfettes (Bredella, Tirman et al. 1999). Der Gelenkknorpel stellt sich hyperintens dar. Ein konsekutiv hoher Kontrast zwischen Knorpel, Gelenkflüssigkeit und Knochenmark erlaubt die morphologische Beurteilung des Gelenkknorpels und ermöglicht zusätzlich Untersuchungen der anderen Gelenkstrukturen, wie des subchondralen Knochenmarks, meniskaler und ligamentärer Strukturen. Die FSE-Sequenzen sind relativ unempfindlich auf magnetische Suszeptibilitätsartefakte, welche insbesondere bei Patienten mit vorausgegangener Kniegelenkchirurgie von Relevanz sind.

Die zweidimensionale (2D) und dreidimensionale (3D) fettsupprimierte (fs) T1-Gradientenechosequenz (GE) hat den Vorteil der relativ hohen Signalintensität des Gelenkknorpels im Kontrast zur niedrigen Signalintensität des benachbarten fettunterdrückten Gewebes wie Hoffa-Fettkörper, subkutanes Fettgewebe und Fettmark (Peterfy, Majumdar et al. 1994). Die dreidimensionale GE-Sequenz erlaubt dünne effektive Schichtdicken und höhere Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisse als bei der zweidimensionalen Akquisition. Diese Sequenzen sollten in zwei Ebenen, in sagittaler und coronarer Schnittführung, orthogonal auf den Defektbereich durchgeführt werden. Um das notwendige höhere Signal-zu-Rausch-Verhältnis in Standardscannern mit 1,5 Tesla Feldstärke zu erreichen, können Oberflächenspulen in Kombination mit einer knorpelsensitiven Sequenz verwendet werden. Die beschriebenen Sequenzen gelten als besonders knorpelsensitiv und sind in der klinischen Diagnostik bereits etabliert (Trattinig, Plank et al. 2004).

Die indirekte MR-Arthrographie beinhaltet die intravenöse Kontrastmittelgabe vor der Untersuchung. Der arthrographische Effekt nach intravenöser Gd-DTPA (Gadoliniumkomplex der Diäthylentriaminpentaessigsäure) Kontrastmittelgabe wird durch eine spezifische Kumulation in den Gelenkstrukturen eine Signalintensitätserhöhung bewirkt. Die Diffusion des Kontrastmittels in das hyaline Knorpelgewebe steht in Abhängigkeit mit dessen strukturellen Matrixzusammensetzung. Diese Technik basiert auf der Gegebenheit, dass sich das negativ geladene Gd-DTPA-Kontrastmittel in einer umgekehrten Relation zur Glykosaminoglykankonzentration im Knorpelgewebe verteilt (siehe Abb. 2-10). Somit kann die Gd-DTPA-Verteilung als Index für die Glykosaminoglykankonzentration verwendet werden und einen Aufschluss über den Aufbau von knorpeltypischen Matrixbestandteilen im Defektgewebe liefern (Burstein, Bashir et al. 2000; Gillis, Gray et al. 2002).

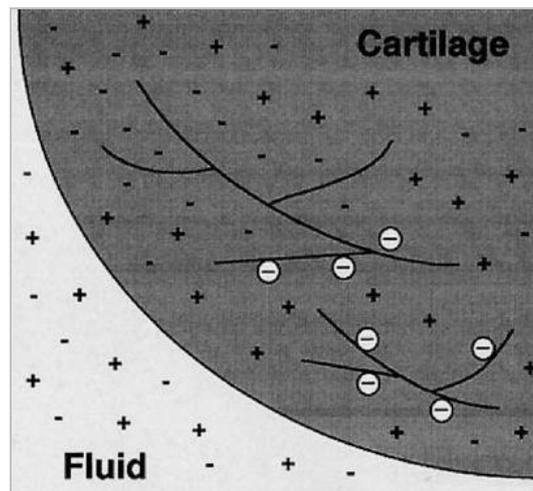


Abbildung 2-10: Graphische Darstellung der Ionenverteilung im Knorpelgewebe, weiß dargestellt die negative Ladung der Glykosaminoglykane; übernommen aus Imhof et al. 2002

Der Vorteil der MRT-Untersuchung gegenüber der Arthroskopie ist die Betrachtung des Kniegelenkes als gesamtes Organ. Zusätzlich zur Beurteilung der Knorpelschicht werden Abnormalitäten wie subchondrale Knochenmarködeme, subartikuläre Zysten, Meniskusläsionen, Veränderungen am Bandapparat, Gelenkergüsse, freie Gelenkkörper, Synovitis und periartikuläre Zysten dargestellt. Die MRT-Untersuchung erlaubt keine Aussage über die histologische Struktur des Knorpelersatzgewebes, dies ist nur durch Biopsieentnahme bei der Gelenkarthroskopie möglich (Ho, Stanley et al. 2007).

Für die postoperative Beurteilung der Defektregion ist die Signalintensität des Knorpelgewebes als Qualitätsmerkmal aussagekräftig. Das Signal ist isointens, hypointens oder hyperintens im Vergleich zum organären Knorpelgewebe. Die Auffüllung des Knorpeldefektes bezüglich Tiefe und Volumen in Prozentangaben sowie die Gelenkkongruenz können evaluiert werden. Die Auffüllung des Defektareals über die native Knorpelhöhe hinaus ist ein Zeichen der Hypertrophie des Regeneratgewebes (Abb.2-11 A). Die Gelenkoberfläche sollte glatt und in Kontinuität mit dem benachbarten nativen Knorpelgewebe sein.

Oberflächliche und tiefe Fissuren der Knorpelschicht sind als Degenerationserscheinungen zu deuten und sind prognostisch wertvolle Kriterien. Die Integration des Knorpelgewebes und des Knochengewebes zu umliegenden Gewebe geben Aufschluss über das Einheilungsverhalten des Knorpelersatzgewebes (Trattng, Millington et al. 2007). Eingesunkene Implantate führen zu Stufenbildungen an der Gelenkoberfläche, während Ablösungen von Teilen oder ganzen Implantaten als freie Gelenkkörper im Gelenkkavum disloziert sind. Eine Verdickung der Synovialmembran in Verbindung mit vermehrter Gelenkfüllung ist ein Hinweis auf eine Synovitis infektiöser oder steriler Genese. Moderate subchondrale Knochenmarksödeme werden in der frühen Heilungsphase als physiologische Reaktionen auf den operativen Eingriff gedeutet (Abb. 2-11 B) (Marlovits, Striessnig et al. 2004).

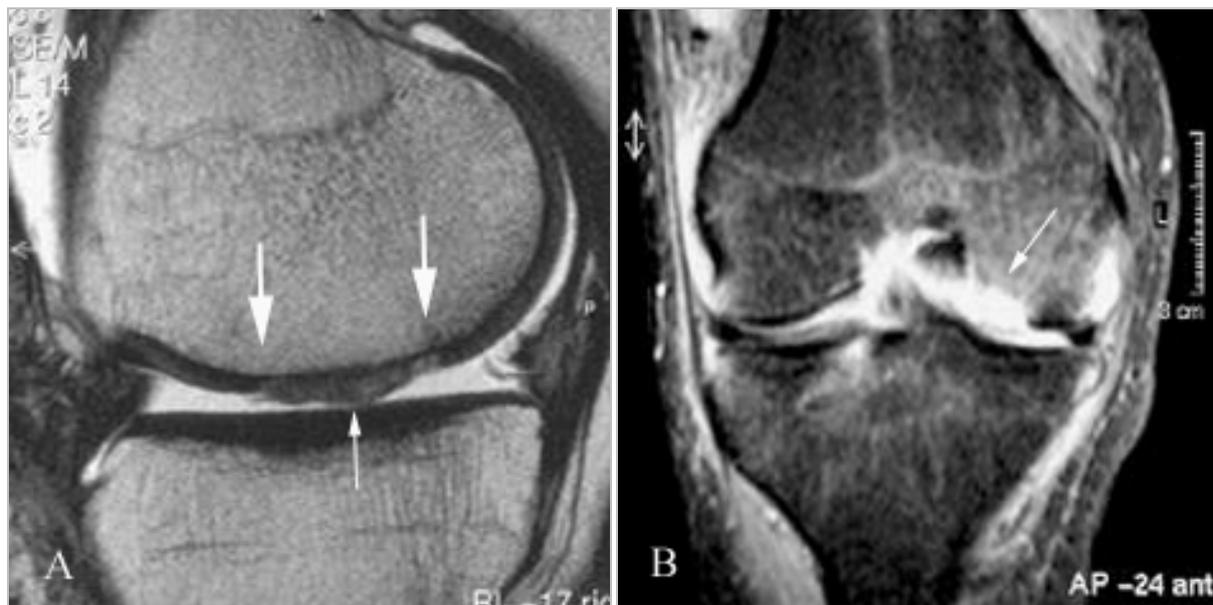


Abbildung 2-11: A) Hypertrophie des Regenerationsgewebes (kleiner Pfeil) und hypointenses Knorpelgewebe besonders an den Defekträndern (große Pfeile) nach ACT, sagittale FSE-Sequenz; B) subchondrales Knochenödem (Pfeil), koronale FSE-Sequenz; übernommen aus Trattnig et al. 2004

Die klinische Aussagekraft der MRT-Untersuchungsergebnisse ist durch die Verwendung von semiquantitativen Scores eindeutiger zu beurteilen. Auch der Vergleich von experimentellen und klinischen Studien ist mit Hilfe von einheitlichen Beurteilungssystemen deutlich einfacher. Eine einheitliche Klassifizierung der MRT-Kriterien zur Auswertung des Heilungsverlaufs nach der chirurgischen Therapie von osteochondralen Defekten besteht zurzeit nicht.

Von Kellgren und Lawrence wurde 1957 eine erste radiologische Einteilung von Gelenkveränderungen publiziert. Die radiologischen Befunde von Gelenken mit pathologischen Merkmalen der Osteoarthritis wurden in Grad 0 bis 4 eingeteilt (Kellgren und Lawrence 1957). Das von Peterfy et al. entwickelte Whole-Organ-MRT-Score-System (WORMS) umfasst verschiedenste pathologische Aspekte der Osteoarthritis (Knorpelsignalintensität und Knorpelmorphologie, subchondrale Abnormalitäten, zystoide Veränderungen, Osteophyten, Meniskusintegrität, Kreuzbandintegrität, Synovitis, Gelenkeffusion und freie Gelenkkörper) (Peterfy, Guermazi et al. 2004). Die folgende Abbildung (Abb. 2-12) zeigt eine schematische Einteilung der Knorpelveränderungen und deren Beurteilung nach dem WORMS-System.

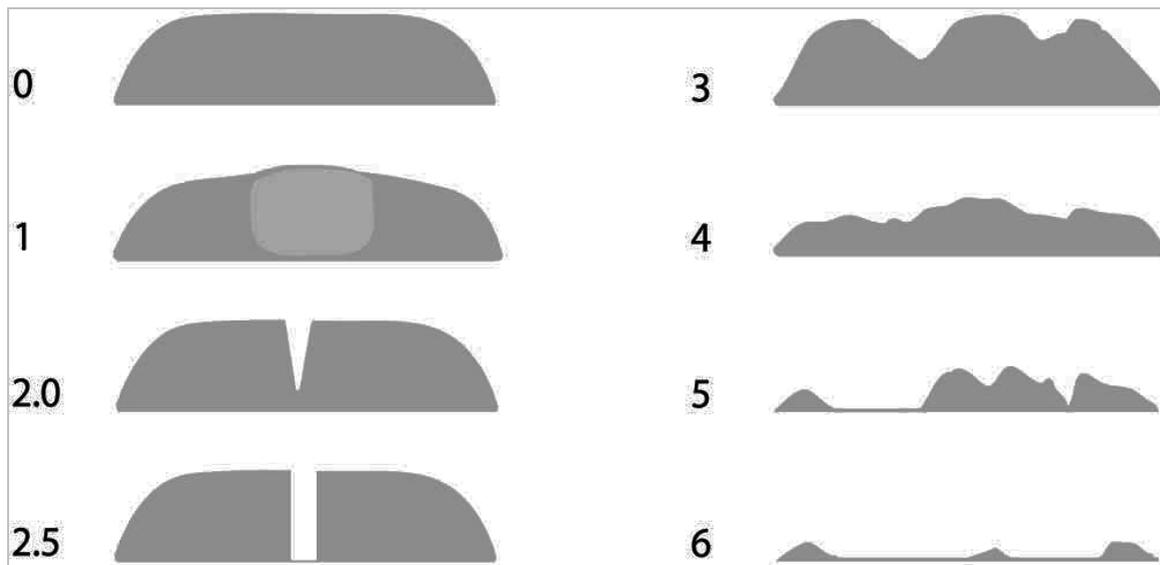


Abbildung 2-12: Schematische Darstellung der Knorpeldefekteinteilung nach Signalintensität und Morphologie (aus Peterfy CG et al. 2004)

Ebenfalls umfangreicher ist das Knie-Osteoarthritis-Scoring-System (KOOS) von Kornaat et al., in dem detaillierte Merkmale von pathologisch degenerativen Gelenkveränderungen definiert werden (Kornaat, Ceulemans et al. 2005). Diese Klassifikationen sind für die Beurteilung von pathologischen Gelenkveränderungen entwickelt worden und lassen sich ebenfalls für die Beurteilung des Heilungsverlaufs nach operativem Eingriff anwenden. Ein weiteres Score-System für die Beurteilung des Heilungsverlaufs von Knorpeldefekten nach chirurgischen Interventionen wurde von Marlovits et al. entwickelt und beinhaltet zusätzlich wichtige Aspekte der Geweberegeneration und -integration (Marlovits, Singer et al. 2006).

2.6 Tierexperimentelle Versuche

Die Evaluation unterschiedlicher Therapieoptionen setzt eine präklinische experimentelle Versuchsreihe im angemessenen Tiermodell voraus. Vor klinischer Anwendung ist eine Etablierung des therapeutischen Eingriffs und des Behandlungsprotokolls in tierexperimentellen Vergleichsstudien angezeigt, um das gewünschte Behandlungsziel bei der klinischen Umsetzung zu erreichen. Bei der Behandlung osteochondraler Defekte steht die Wiederherstellung der Gelenkfunktion mit Bildung von neuem funktionellem Knorpelgewebe im Vordergrund. Eine langfristige morphologische und funktionelle Stabilität des Regeneratgewebes ist ein weiteres Ziel der Therapie.

Die tierexperimentellen Modellversuche müssen eine möglichst kliniknahe Reproduzierbarkeit und spezifische Aspekte der klinischen Situation erfüllen. Dennoch können Ergebnisse aus tierexperimentellen Versuchen nicht ohne weiteres auf die klinische Anwendung übertragen werden.

Zu den wichtigsten Kritikpunkten zählen die Defektlokalisierung und –größe, die biologischen und mechanischen Gewebeeigenschaften, die anatomischen Strukturen, das Tieralter und die Tierspezies. Die Lokalisation des Knorpeldefektes sollte in Übereinstimmung mit der Prävalenz der klinischen Befunde stehen. Eine standardisierte Defektgröße ist in Relation zur Tiergröße zu setzen (Hunziker 1999).

In Studien zur Knorpeldefektheilung sind insbesondere analoge bioaktive Faktoren und Stammzellpopulationen von besonderem Interesse. Verschiedene Studien haben eine Variabilität der Stammzellkapazität unterschiedlicher Tierarten und in Abhängigkeit des Tieralters ergeben (Wei, Gao et al. 1997). Der anatomische Aufbau der Gelenkstrukturen sollte einen reproduzierbaren operativen Zugang und eine gute Erreichbarkeit der interessierenden Region ermöglichen. Der operative Eingriff ist unter Schonung angrenzender Gelenkstrukturen durchzuführen, um eine schnelle postoperative Wiederherstellung der Gelenkfunktion zu erlauben (Goldberg und Caplan 1999).

Die Anatomie des Kniegelenkes beim Schaf zeigt eine große Anzahl an morphologischen Übereinstimmungen zum humanen Kniegelenk. Der Knochen im Bereich des Kniegelenkes ist in Größe, Struktur und Regenerationsfähigkeit mit dem des Menschen vergleichbar. Die Umbauprozesse laufen beim Schaf z. T. schneller ab, als beim Menschen. Dies liegt u. a. in der unterschiedlichen metabolischen Aktivität der Spezies begründet (Hunziker 1999). Die laterale parapatellare Arthrotomie ergibt einen optimalen Zugang zu den Femurkondylen. Somit zeichnet sich das ovine Kniegelenk als ein ideales experimentelles Modell für orthopädische Behandlungsoptionen aus (Allen, Houlton et al. 1998; von Rechenberg, Akens et al. 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 24 weibliche Merinomix-Schafe mit einem Durchschnittsalter von 3 Jahren. Das Körpergewicht der Tiere betrug im Durchschnitt 72 kg ($\pm 7,8$) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns. Nach Anlieferung der Tiere wurden diese auf ihren einwandfreien Gesundheitsstatus und Pflegezustand überprüft. Es wurde insbesondere auf die Gliedmaßenstellung, Lahmfreiheit und gute Klauenbeschaffenheit geachtet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn entwurmt und eine Trächtigkeit wurde ausgeschlossen.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte während der gesamten Versuchsdauer in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Die Tiere wurden artgerecht in Gruppen gehalten, die Gruppengröße variierte zwischen acht und zwölf Tieren, wobei für jedes Tier mind. 1,4 m² Stallfläche zur Verfügung stand. Die Schafe standen auf Einstreu aus Stroh und Hobelspänen, welche zweimal wöchentlich erneuert wurde. Die Fütterung erfolgte morgens und nachmittags mit Heu ad libitum, zusätzlich wurden Minerallecksteine angeboten. Wasser erhielten die Tiere aus Selbsttränken ad libitum. Die Tränken wurden täglich gereinigt und auf ihre Funktion überprüft. Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 20°C und der Tag-Nacht-Rhythmus war dem natürlichen Licht entsprechend.

3.2 Versuchsanordnungen

Die Gruppeneinteilung erfolgte in vier Gruppen zu je sechs Schafen. Die Tiere wurden mittels Kunststoffohrmarken gekennzeichnet. Im Rahmen der tierexperimentalen Untersuchung wurden osteochondrale Defekte randomisiert in den medialen bzw. lateralen Femurkondylen des linken Knies gesetzt. Diese Defekte wurden mit PGLA-Scaffolds aufgefüllt (Abb. 3-1). In der kontralateralen Kondyle des linken Kniegelenks wurden Defekte ohne folgende Auffüllung geschaffen. Je nach Gruppenzugehörigkeit des Tieres entsprach die Steifigkeit der Implantate 55% oder 87% der Steifigkeit des intakten subchondralen Knochens. Die jeweiligen Gruppen unterschieden sich in der postoperativen Standzeit von drei und sechs Monaten.

Versuchsgruppen:

Gruppe 1: Scaffold weich 55%, 3 Monate Standzeit, 6 Tiere

Ohrmarkennr.: 33, 34, 35, 36, 37, 38

Gruppe 2: Scaffold hart 87%, 3 Monate Standzeit, 6 Tiere

Ohrmarkennr.: 21, 22, 23, 24, 25, 26

- Gruppe 3: Scaffold weich 55%, 6 Monate Standzeit, 6 Tiere
Ohrmarkennr.: 51, 52, 53, 54, 55, 56
- Gruppe 4: Scaffold hart 87%, 6 Monate Standzeit, 6 Tiere
Ohrmarkennr.: 44, 45, 47, 48, 27, 28

Der Tierversuch wurde mit Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit¹ durchgeführt.

3.3 Operationsvorbereitungen

Die Tiere wurden zwölf Stunden vor der Operation nüchtern gehalten, Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Nach Gewichtsüberprüfung des Tieres wurde ein Venenverweilkatheter in die Vena cephalica antebrachii gelegt. Unter ständiger Kontrolle der Reflexe wurden 0,5 g Thiopental-Natium² pro 50 kg KM zur Narkoseeinleitung intravenös appliziert. Anschließend wurde das narkotisierte Tier mit Hilfe eines Laryngoskopes mit einem Trachealtubus der Größe 9,0 intubiert. Der Tubus wurde zum Schutz vor Aspiration hinter dem Kehlkopf geblockt und das Tubusende mittels Klebeband an der Maulspalte fixiert. Daraufhin wurde das Tier mit einem Gemisch aus Isofluran³ mit einer Konzentration von 1,5 Vol.%, Lachgas und Sauerstoff beatmet. Die Atemfrequenz betrug 12 Züge pro Minute und das Atemzugvolumen je nach Gewicht 600 bis 800 ml. Unter Kontrolle der expiratorischen CO²-Konzentration (39 mmol/l, ±2) wurden die Parameter gegebenenfalls korrigiert. Das Tier erhielt eine Magen-Schlundsonde, um das Entweichen eventueller Gasansammlungen aus dem Vormagensystem während der Operation zu ermöglichen. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage gelagert. Es wurde zum Schutz vor Austrocknung der Kornea Panthenol-Augensalbe⁴ in den Konjunktivalsack gegeben. An den Karpalgelenken und dem rechten Tarsalgelenk wurden Klebeelektroden zur EKG-Aufzeichnung angebracht. Die Klauen wurden mit Mullbinden umwickelt, um eine Verschmutzung des Operationsbereiches zu vermeiden. Das Operationsfeld im Bereich des Kniegelenks wurde im Zuge der Operationsvorbereitungen weiträumig geschoren, rasiert, gesäubert und mit Jodlösung⁵ steril vorbereitet. Anschließend wurde das Tier mit sterilen Tüchern abgedeckt. Zur Überprüfung der Vitalfunktionen wurden Sauerstoffpartialdruckmessung, Kapnograph und das EKG an die Narkoseeinheit⁶ angeschlossen. Perioperativ wurden anfangs zur Infektionsprophylaxe 2,2

¹ Genehmigungsnummer 037/04 LAGetSi Berlin

² Trapanal®, Fa. Atlanta Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland

³ Isofluran®, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

⁴ Dexpanthenol®, Jenapharm GmbH, Jena, Deutschland

⁵ Braunol®, B.Braun, Melsungen, Deutschland

⁶ Isoflurane Vaporizer 711, Servo Ventilator, Siemens AG Elma, Schweden

g Amoxicillin/Clavulansäure⁷ und anschließend kontinuierlich Vollelektrolytlösung⁸ (1000 ml) intravenös infundiert.

3.4 Operationen

Der operative Zugang erfolgte über einen ca. 7 cm langen Hautschnitt anteromedial auf Höhe des linken Kniegelenkes mit folgender stumpfer Präparation parapatellar zum Kapselbandapparat. Unter partieller Längsspaltung der Ansatzsehne des M. quadriceps femoris, die beim kleinen Wiederkäuer das laterale gerade Kniescheibenband verkörpert, und nach Arthrotomie wurde die Patella nach lateral luxiert. Nach Entfernung von Anteilen des Hoffa-Fettkörpers und unter maximaler Extension des Kniegelenkes stellten sich die Femurkondylen optimal dar. Die Hämostase im Schnittbereich wurde durch den Einsatz eines Kauters⁹ erreicht. Im hauptlasttragenden Bereich der lateralen oder medialen Femurkondyle erfolgte die orthograde Entnahme von einem Knorpel-Knochen-Zylinder mit einer Tiefe von 10 mm. Dabei wurde eine dünnwandige Hohlfräse¹⁰ mit einem Innendurchmesser von 6,4 mm und einer Wandstärke von 0,5 mm verwendet (Abb. 3-1). Im Folgenden wurde der Defekt mittels press-fit-Technik mit dem Scaffold aufgefüllt, d.h. dass der eingesetzte Zylinder einen 0,05 mm größeren Durchmesser aufweist als der vorgegebene Defekt und somit das Implantat fest im Aufnahmetunnel impaktiert wurde (Abb. 3-1). Der Defekt wurde durch den Scaffold bis auf Höhe des subchondralen Knochens aufgefüllt, die Knorpelzone wurde nicht aufgefüllt. Um die Kongruenz der Gelenkfläche zu erhalten wurden die Scaffold-Zylinder vor Implantation mit Hilfe einer Luerzange der Konvexität der Gelenkoberfläche angepasst.

Bei dem Implantatmaterial handelt es sich um synthetisch hergestellte biodegradierbare Scaffolds in Zylinderform aus Poly(D,L)Laktid-co-Glykolid (85:15 PLG) als Basismaterial und einem Calciumsulphatzusatz zur Unterstützung des Knochenwachstums¹¹. Die quantitative Zusammensetzung der Polymere ergab die unterschiedliche biomechanische Eigenschaft von 55 und 87% Steifigkeit (im Folgenden als Scaffold weich und Scaffold hart bezeichnet). Die Steifigkeit des nativen Knochens und der Implantate wurde mit Hilfe eines biomechanischen Kompressionstest ermittelt¹².

Die Entnahme eines Knorpel-Knochen-Zylinders mit einem Durchmesser von 7,45 mm und einer äquivalenten Tiefe von 10 mm auf der Gegenseite stellte den Referenzdefekt dar. Dieser Defekt wurde nicht aufgefüllt.

⁷ Augmentan®, SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

⁸ Thomaejonin®, Boehringer Ingelheim, Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland

⁹ Kauter, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland

¹⁰ Zimmer GmbH, Freiburg, Deutschland

¹¹ OsteoBiologics, Inc., Texas, USA

¹² Zwick 1455®, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland

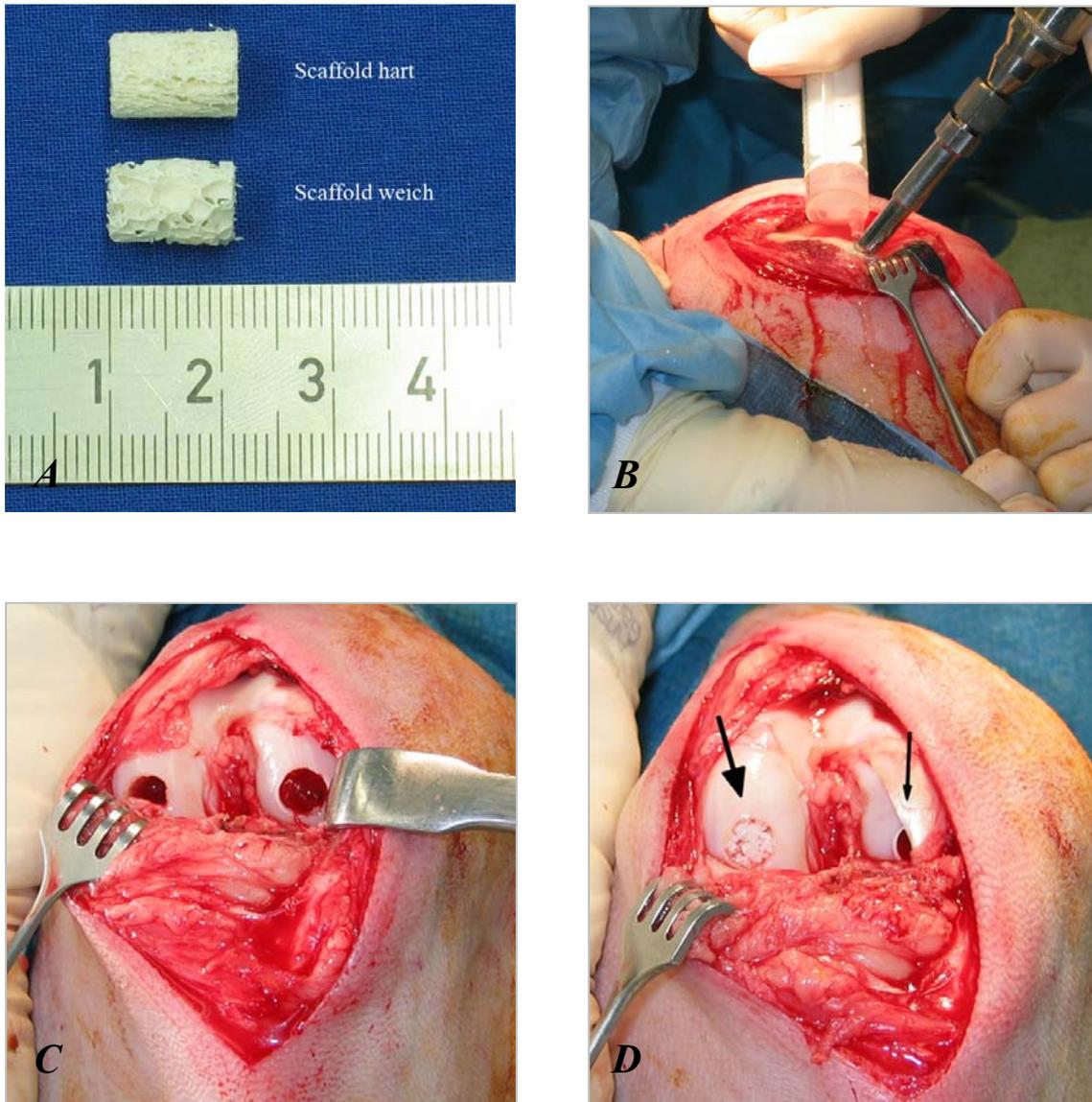


Abbildung 3-1: Scaffold-Zylinder weich und hart (A); Bohren des Defekts im lasttragenden Bereich der Femurkondyle mittels Hohlfräse unter kontinuierlicher Wasserkühlung (B); Gesetzte Defekte in beiden Kondylen (C); Gefüllter (dicker Pfeil) und ungefüllter (dünner Pfeil) Defekt (D)

Unter Steckung des Kniegelenkes erfolgte die Reposition der Patella. Es folgte schichtweise der Wundverschluss mittels resorbierbaren Nahtmaterials¹³ und abschließend die nichtresorbierbare Hautnaht¹⁴ mit Einzelheften. Die Wunde wurde mit einem selbstklebenden Verband Fixomulstretch¹⁵ abgedeckt und zur postoperativen Analgesie wurde ein Fentanylpflaster¹⁶ (transdermale Wirkstofffreisetzung von 75 µg pro Stunde) medial des Kniegelenkes platziert. Eine postoperative

¹³ Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁴ Prolene®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁵ Fixmull® stretch, BSN medical, Hamburg, Deutschland

¹⁶ Durogesic® SMAT 75µg/h, Jansen GmbH, Deutschland

röntgenologische Kontrolle¹⁷ erfolgte im lateromedialen und anteroposterioren Strahlengang. Diese Aufnahmen ermöglichten eine postoperative Kontrolle der Defekte und der Implantate.

Sobald die Tiere selbständig atmeten, wurden sie extubiert und in den Stall verbracht. Die Tiere wurden anschließend wieder in die gewohnte Gruppe integriert. Täglich erfolgte eine visuelle Kontrolle des Allgemeinbefindens und des Wundbereiches. Die Fäden wurden zehn Tage post operationem entfernt.

3.5 Indirekte MR-Arthrographie

Eine Woche vor Tötung der Tiere der Gruppen mit sechs Monaten Standzeit wurde zur morphologischen Darstellung des Heilungsfortschrittes MRT-Aufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen wurden am 1,5-Tesla Gerät¹⁸ in Brustbauchlage durchgeführt. Die Tiere wurden durch intravenöse Applikation von 0,5g/50 kg KM Thiopental-Natrium narkotisiert. Die Aufnahmezeiten von bis zu 1,5 Stunden erforderten intravenöse Nachdosierungen je nach Reflexstatus des jeweiligen Tieres. Zusätzlich wurden 60 min vor Aufnahmebeginn 0,2 mM/kg Körpermasse Gd-DTPA-Kontrastmittel¹⁹ intravenös infundiert. Die homogene Infiltration der Knorpelschicht wurde durch kontinuierliche passive Bewegung des Kniegelenkes gesichert. Zur Signaldetektion wurde eine Herzspule verwendet. Eine Kniespule konnte aufgrund der anatomischen Lage des Kniegelenkes beim Schaf nicht verwendet werden. Die verwendete Oberflächenspule erlaubt ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Um die Defektauffüllung und das Reparaturgewebe beurteilen zu können, wurden knorpelsensitive Sequenzen verwendet (Tab. 3-1).

<i>Sequenzen</i>	<i>Sagittal T1-2D-fs-GE</i>	<i>Sagittal T1-3D-fs-GE</i>	<i>Sagittal PD-fs-FSE</i>	<i>Coronal 3D-fs-GE</i>
<i>Repetitionzeit [ms], (TR)</i>	640	29,3	2460	27,19
<i>Schichtdicke [mm]</i>	3	2	3	2
<i>Echozeit [ms], (TE)</i>	5,1	16,1	16,1	6,66
<i>Flipwinkel (fa)</i>	70°	16°	90°	16°
<i>FOV [cm]</i>	14	14	14	14
<i>Matrix [Pixel]</i>	512 x 224	512 x 256	320 x 224	512 x 256
<i>Sliceap</i>	3	1	3	1

Tabelle 3-1: Sequenzprotokoll der knorpelsensitiven MRT-Aufnahmen

Neben einer sagittalen protonengewichteten (PD) fettsaturierten (fs) Fast-Spin-Echo (FSE) Sequenz und einer sagittalen T1-gewichteten zweidimensionale (2D) fs Gradientenecho (GE) Sequenz wurde in

¹⁷ Mobilett Plus, Siemens AG, München, Deutschland

¹⁸ 1,5 T Ecite® HD, General Electronics Company, Fairfield, USA

¹⁹ Magnevist®, Schering AG, Berlin, Deutschland

sagitaler und koronarer Schichtung orthogonal auf die Lokalisation des aufgefüllten Defektes und des Leerdefektes eine T1-gewichtete dreidimensionale (3D) fs GE Sequenz angefertigt.

Um den Heilungsverlauf anhand der gewonnenen Bildmaterialien zu beurteilen, erfolgte eine deskriptive Betrachtung der Bildmaterialien. Die Knorpeloberfläche der Defektzone sowie des übrigen Gelenkknorpels wurden in Hinblick auf ihre Kongruenz, ihre Dicke und ihr Signalverhalten bewertet. Die Signalintensitäten der gesamten Defektzone und des umliegenden Knorpel- und Knochengewebe wurden zusätzlich verglichen. Weitere Kriterien waren Größe der Defekte, Ödembildungen im subchondralen Knochengewebe, Zystenbildungen im Defektbereich, Gelenkeffusionen und Anzeichen einer Synovitis. Auch Veränderungen der ligamentären und meniskalen Strukturen wurden evaluiert. Die unterschiedlichen qualitativen Bewertungsmöglichkeiten der durchgeführten Sequenzen wurden dokumentiert. Anschließend wurden Korrelationen zu den makroskopischen und histologischen Beobachtungen gesucht.

Die weitere Auswertung der gewonnenen Bildmaterialien erfolgte qualitativ und semiquantitativ mittels eigens entwickeltem Score (Tab. 3-2).

Die quantitative Bildanalyse zur Messung der Signalintensität (SI) der Defektzone (Scorekategorie 7 und 8) erfolgte anhand einer auf die Defektzone platzierten radiären Region of Interest (ROI) mit einem Durchmesser von 7,4 mm. Gemessen wurden die mittlere Signalintensität und die Standardabweichung (SD) der Signalintensität. Zusätzlich wurde die Signalintensität und die Standardabweichung der Rauschsignale in einer ROI in Phasenkodierrichtung außerhalb des Kniegelenks bestimmt. Dies ermöglichte die Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (Signal-to-Noise-Ratio SNR) wie folgt:

$$SNR = \frac{SI_{Defekt}}{SI_{Rauschen}}$$

Den ermittelten SNR-Werten wurden Score-Punkte zugeteilt (Tab. 3-2).

Die Defekttiefe und die laterale Defektausbreitung (Scorekriterien 11-14) wurden ebenfalls computergestützt ermittelt und in mm angegeben. Dazu war eine manuelle Markierung der Anfangs- und Endmesspunkte mittels Cursor nötig.

Kategorie	Kriterium	Punkte
1. Defektauffüllung	Vollständig	3
	Hypertrophie oder unkomplett >50%	2
	Unkomplett <50%	1
	Keine Auffüllung	0
2. Signalintensität des Knorpels der Defektzone	Isointens	3
	Geringgradig hypointens	2
	Deutlich hypointens	1
	Kein Signal	0
3. Integration des Defektknorpels zum angrenzenden Knorpelgewebe	Komplett	3
	Einseitig integriert	2
	Beidseitig nicht integriert	1
	Kein Knorpelgewebe über dem Defekt	0
4. Knorpelstruktur	Homogen	2
	Inhomogen	1
	Kein Knorpelgewebe	0
5. Knorpeloberfläche	Intakt	2
	Unregelmäßig	1
	Kein Knorpelgewebe	0
6. Kongruenz des Knorpels	Kongruent	2
	Inkongruent	1
7. Signalintensität der Defektzone	2-4 SNR	4
	5-7 SNR	3
	8-10 SNR	3
	11-15 SNR	1
	>16 SNR	0
8. Signalintensität der Leerdefektzone	2-4 SNR	4
	5-7 SNR	3
	8-10 SNR	2
	11-15 SNR	1
	>16 SNR	0
9. Integrität des Zylindermaterials	Komplett	3
	Eine Seite nicht integriert	2
	Beide Seiten nicht integriert	1
	Implantat nicht integriert	0
10. Struktur des Defektgewebes	Homogen	3
	Geringgradig inhomogen	2
	Deutlich inhomogen	1
11. Defekttiefe	6-7 mm	3
	8-9 mm	2
	10-12 mm	1

12. Laterale Defektausbreitung	4-5 mm	3
	7-6 mm	2
	8-10 mm	1
13. Leerdefekttiefe	6-7 mm	3
	8-9 mm	2
	10-12 mm	1
14. Laterale Leerdefektausbreitung	4-5 mm	3
	6-7 mm	2
	8-10 mm	1
15. Subchondrales Knochenmarködem, Defektseite	Kein Ödem	3
	<50%	2
	>50%	1
16. Subchondrales Knochenmarködem, Leerdefektseite	Kein Ödem	3
	<50%	2
	>50%	1
17. Subchondrale Zystenbildungen, Defektseite	Keine Zyste	3
	<3mm	2
	>3mm	1
18. Subchondrale Zystenbildungen, Leerdefektseite	Keine Zyste	3
	<3mm	2
	>3mm	1
19. Gelenkerguß	Kein Erguss	3
	Geringgradiger Erguss	2
	Hochgradiger Erguss	1
20. Synovitis	Keine Synovitis	2
	Synovitis	1

Tabelle 3-2: Beurteilungskriterien und Punktzuordnung des eigens entwickelten MRT-Scores

3.6 Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate

3.6.1 Tötung und Sektion der Tiere

Die schmerzfreie Euthanasie der Tiere erfolgte je nach Standzeit der Gruppe nach 3 oder 6 Monaten post op. Das fixierte Tier wurde mit 2,5g Thiopental-Natium²⁰ intravenös narkotisiert und anschließend in tiefer Narkose mit 100 ml 14,9%iger Kalium-Chlorid-Lösung²¹ getötet. Der ausgelöste Herzstillstand wurde mittels Auskultation kontrolliert.

Die hinteren Gliedmaßen wurden vom Tierkörper abgesetzt, enthäutet und präpariert. Nachdem das Kniegelenk eröffnet wurde, konnte der distale Gliedmaßenanteil abgetrennt werden und es folgte die Entfernung der Muskel- und Sehnenbestandteile vom Oberschenkelknochen. Unter Schonung der

²⁰ Atlanta Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland

²¹ Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Gelenkflächen wurden die Femurkondylen von Band-, Kapsel- und Meniskusstrukturen freipräpariert. Während der Präparation wurden makroskopische Veränderungen, wie z.B. Verwachsungen, Gewebeveränderungen, Füllungszustand des Gelenkes und Beschaffenheit der Gelenkflüssigkeit protokolliert. Die Gelenkflächen wurden gleichfalls makroskopisch begutachtet und für die späteren Auswertungen photographisch dokumentiert.

3.6.2 Sägen der Präparate

Unter Verwendung eines wassergekühlten Makro-Trennschleifsystems²² wurden in ventrodorsaler Schnittführung die Knorpel-Knochen-Präparate gesägt. Nach der Befestigung des Oberschenkelknochens wurden die Schnittebenen in paralleler Ausrichtung zum äußeren Rollkamm gewählt. Beidseits der Defekte wurden bei der Schnittführung 5 mm Abstand gehalten und anschließend die Defekte in der Medianen durchgesägt (Abb. 3-2). Die Schnittführung wurde parallel zur Bohrrichtung der Defekte ausgerichtet. Die Kondyle des rechten Kniegelenks wurde in gleicher Weise gesägt. Die entstandenen Knorpel-Knochen-Scheiben wurden durch einen Sägevorgang im 90°-Winkel zu den vorherigen Schnitten von der Basis der Femurkondyle gelöst. Um eine thermische Schädigung an den Schnittträgern zu verhindern, erfolgte während des Sägens eine kontinuierliche Wasserkühlung. Die Schnittflächen der gewonnenen Präparate wurden photographisch dokumentiert.

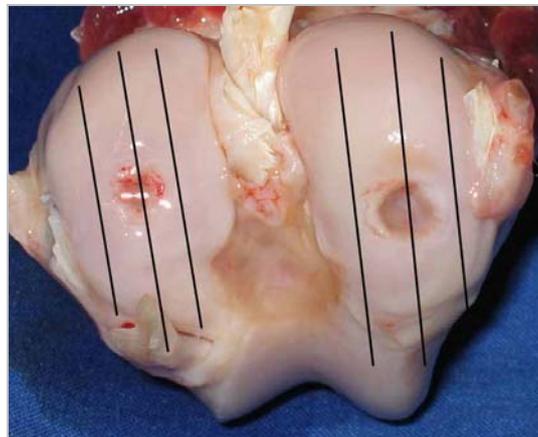


Abbildung 3-2: Schnittführungen an den Femurkondylen

Anschließend wurden die Scheiben in entsprechend beschriftete Uni-Kassetten²³ gelegt und für fünf Tage in einer Fixierlösung fixiert. Die Fixierlösung setzte sich aus 36%igem Formaldehyd, 100%igem Äthylalkohol, Barbitol-Natrium-Puffer (pH 7,4/ 0,1 molar) und einem Glukosezusatz zusammen und dient der Vorbeugung autolytischer Prozesse und von Befall mit Fäulnisbakterien. Um eine

²² Makro-Trennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland

²³ Tissue IITec®, Sacura Finetek BV, Niederlande

gleichmäßige und vollständige Infiltration des Fixatives in das Präparatgewebe zu erreichen, erfolgte die Lagerung auf einer Schüttelvorrichtung²⁴.

3.6.3 Entkalken mit EDTA-Lösung und Dehydrierung

Durch gründliches Spülen der Präparate unter Leitungswasser über 30 Minuten erfolgte die Entfernung des Fixiermediums. Anschließend wurde die Entkalkung in 0,36 molarer Etylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung)²⁵ eingeleitet und im Brutschrank bei 37°C für zwei Monate fortgeführt. Es erfolgte wöchentlich die Erneuerung der EDTA-Lösung.

Nach diesem Entkalkungsprozess wurde durch erneutes Spülen mit Leitungswasser die EDTA-Lösung aus dem Präparatgewebe entfernt. Daraufhin erfolgte die dreitägige Entwässerung und Entfettung des Gewebes in einem Entwässerungsautomaten²⁶ mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 96%-, 100%ige Alkohollösung und Xylollösung).

3.6.4 Einbetten in Paraffin und Anfertigen der Schnitte

Die Einbettung der Präparate erfolgte in Uni-Kassetten in flüssigem auf 60°C erhitztem Paraffin²⁷. Das Paraffinmedium ist eine Verbindung aus gereinigtem Paraffin und einem Zusatz von Plastikpolymeren mit definiertem Molekulargewicht. Die Seite des Defektes wurde nach unten platziert und der Block auf der Kälteplatte²⁸ bei -7°C ausgehärtet.

Unter Verwendung eines Rotations-Mikrotoms²⁹ erfolgte die Herstellung von 4 µm dünnen Schnitten. Diese Gewebeschnitte wurden in einem warmen Wasserbad geglättet und auf einem Objektträger³⁰ platziert. Zur Austrocknung der gewonnenen Gewebeschnitte wurden die Objektträger im Wärmeschrank bei 37°C für drei Tage gelagert.

²⁴ Horizontalschüttler HS501 digital, IKALabortechnik GmbH, Staufen, Deutschland

²⁵ EDTA-Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

²⁶ Hi-Tec®, Gewebeautomat 1500 Typ DDmP800, Busek

²⁷ Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical Co., USA

²⁸ Leica EG1130, Leica Instruments GmbH, Bensheim, Deutschland

²⁹ Leica RM2035, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland

³⁰ SupeRior, Marienfeld, Deutschland

3.7 Immunhistologisches Färben der Schnitte

Immunhistologische Färbeverfahren erlauben die hochspezifische farbliche Darstellung von definierten Antigenen in Gewebeschnitten mittels Antigen-Antikörper-Komplexbildung. In dieser Arbeit wurden mittels immunhistologischer Färbungen Kollagen-I, Kollagen-II und Gefäßanschnitte in den Gewebepräparaten dargestellt.

Kollagen-I-Färbung: Färbereihe Anti-Kollagen Typ I s. Anhang I

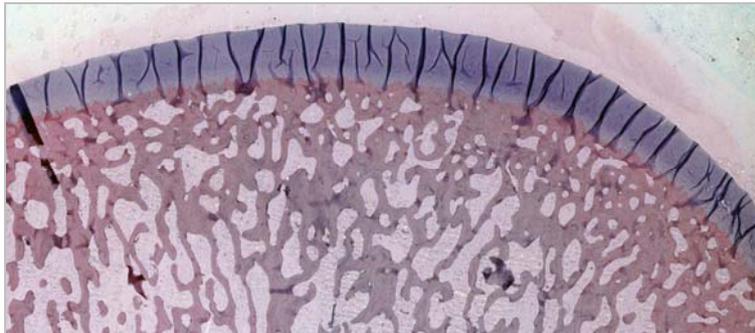


Abbildung 3-3: Rötlich dargestellt ist das Kollagen-I-positive Knochengewebe, durch Gegenfärbung mit Hämatoxin nach Mayer setzt sich das Knorpelgewebe bläulich ab

Kollagen-II-Färbung: Färbereihe Anti-Kollagen II s. Anhang I

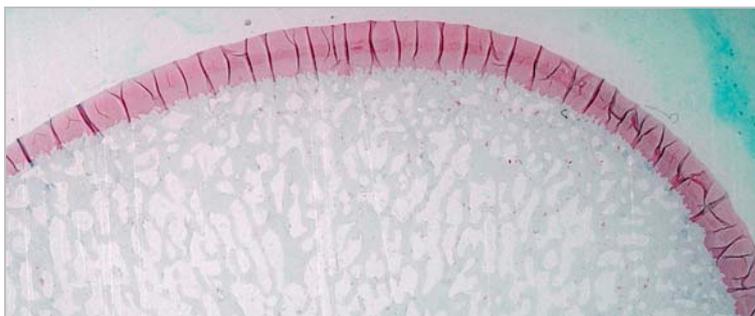


Abbildung 3-4: Rot dargestelltes Kollagen-II-positives Knorpelgewebe, durch Gegenfärbung mit Hämatoxin nach Mayer stellt sich das spongiöse Knochengewebe blau dar

Gefäßdarstellung: Färbereihe Anti- α -smooth-muscle-actin s. Anhang I



Abbildung 3-5: Gefäßanschnitte mit der rot angefärbten, radiär angeordneten Schicht glatter Muskelzellen in der Tunica media. Kleinere Gefäße, deren Auskleidung nur aus Endothelzellen besteht, wurden nicht erfasst.

3.8 Safranin Orange-Färbung

Die Safranin Orange-Färbung stellt die unterschiedlichen Gewebe kontrastreich in Rottönen verschiedener Intensität dar. Diese Färbung färbt Knorpelgewebe intensiv rot und mineralisiertes Knochengewebe blass rot. Die Infiltration des Farbstoffes in die Knorpelgrundsubstanz und die Bindung an saure Gruppen lässt auf den quantitativen Proteoglykangehalt im Knorpelgewebe schließen. Somit zeigt diese Färbung der Qualität des Knorpelgewebes und dient der Unterscheidung vom Knochengewebe.

Safranin Orange-Färbung: Färbereihe S O-Färbung (s. Anhang II)



Abbildung 3-6: Kontrastreiche Darstellung des Knorpel- und Knochengewebes in der Safranin Orange-Färbung

Abschließend wurden alle gefärbten Präparate auf einem Leuchttisch³¹ photographisch dokumentiert³². Um eine spätere Skalierung des digitalisierten Bildmaterials zu ermöglichen, wurde neben dem Präparat eine Millimeterskalierung platziert.

³¹ Leica MZ6, Nussloch, Deutschland

³² Nikon D70, Tokyo, Japan

3.9 Auswertungen

3.9.1 Mikroskopische Auswertung

Die histologischen Präparate der Safranin Orange-Färbung und der Kollagen-II-Färbung wurden lichtmikroskopisch bei aufsteigender Vergrößerung durchgemustert und qualitativ sowie semiquantitativ beurteilt. Die Kriterien umfassten die Defektauffüllung, die Qualität des Reparationsgewebes, Restbestandteile des Implantatmaterials, die Integration zum umliegenden Knorpelgewebe und die Struktur des subchondralen Knochens unterhalb des Defektes. Diese und ergänzende Kriterien wurden in einem Score nach O'Driscoll modifiziert von Frenkel et al. (Frenkel, Bradica et al. 2005) zusammengefasst (Tabelle 3-3). Die Punktgesamtzahl ergibt sich aus der Addition der Punkte der einzelnen Kriterien. Der Maximalwert beträgt 27 Punkte und entspricht der Qualität des nativen, physiologischen Knorpel-Knochengewebes im lasttragenden Bereich des Kniegelenkes.

Um die semiquantitative Auswertung zu vervollständigen und weitere Kriterien zu beurteilen, wurde ein ergänzender Fünf-Punkte-Score im Rahmen dieser Arbeit entwickelt (Tabelle 3-4). Die zusätzlichen Kriterien umfassen die Gewebeauffüllung und die Gewebeintegration im Defektbereich. Weitere hinzugefügte Beurteilungskriterien sind zelluläre Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen im Knorpel- und Knochengewebe. Die maximale Punktzahl beträgt 12 Punkte und beinhaltet eine vollständige Defektauffüllung, die Wiederherstellung der physiologischen knöchernen Strukturen im Defektbereich und keine Anzeichen zellulärer Reaktionen in diesen Geweben.

Kategorie	Kriterien	Punkte
1. Prozentualer Anteil hyalinen Knorpels	80-100%	8
	60-80%	6
	40-60%	4
	20-40%	2
	0-20%	0
2. Struktur des Knorpelgewebes		
a) Oberflächenbeschaffenheit	glatt und intakt	2
	Fissuren	1
	Risse und Fibrillationen	0
b) Strukturelle Integrität	Normal	2
	leichte Risse	1
	kaum integriert	0
c) Knorpeldicke	100% des umliegenden Knorpels	2
	50-100% oder hypertroph	1
	0-50%	0
d) Verbindung zum umliegenden Knorpel	verbunden auf beiden Seiten	2
	verbunden auf einer Seite	1
	Unverbunden	0
3. Degenerative zelluläre Veränderungen	normale Zellularität, keine Cluster	2
	leichte Hypozellularität, <25% Cluster	1
	moderate Hypo- oder Hyperzellularität, >25% Chondrozytencluster	0
4. Degenerative Veränderungen im umliegenden Knorpelgewebe	normale Zellularität, keine Cluster, normale Anfärbung	3
	normale Zellularität, wenig Cluster, moderate Anfärbung	2
	milde oder moderate Hypozellularität, leichte Anfärbung	1
	schwere Hypozellularität, viele Cluster, kaum Anfärbung	0
5. Rekonstruktion des subchondralen Knochens	Vollständig	2
	über 50% rekonstruiert	1
	50% oder weniger	0
6. Verbindung zwischen regeneriertem Knorpel und neuem subchondralen Knochen	vollständig und ununterbrochen	2
	<100%, aber mehr als 50%	1
	>50%	0
	mehr als 80% homogene Färbung	2
	40-80% homogene positive Färbung	1
	weniger als 40% homogen Färbung	0
Summe		27

Tabelle 3-3: Histologie-Score nach Frenkel et al. zur Beurteilung der Heilungsergebnisse

<i>Kategorie</i>	<i>Kriterien</i>	<i>Punkte</i>
<i>1. Auffüllung im Defektbereich</i>	<i>91-100%</i>	<i>4</i>
	<i>76-90%</i>	<i>3</i>
	<i>51-75%</i>	<i>2</i>
	<i>26-50%</i>	<i>1</i>
	<i><25%</i>	<i>0</i>
<i>2. Laterale knöcherne Integration</i>	<i>verbunden auf beiden Seiten</i>	<i>2</i>
	<i>verbunden auf einer Seite, teilweise verbunden</i>	<i>1</i>
	<i>unverbunden</i>	<i>0</i>
<i>3. Basale Integration</i>	<i>91-100%</i>	<i>3</i>
	<i>70-90%</i>	<i>2</i>
	<i>50-70%</i>	<i>1</i>
	<i><50%</i>	<i>0</i>
<i>4. Entzündungsreaktionen</i>	<i>keine</i>	<i>2</i>
	<i>gering</i>	<i>1</i>
	<i>stark</i>	<i>0</i>
<i>5. Fremdkörperreaktionen</i>	<i>nein</i>	<i>1</i>
	<i>ja</i>	<i>0</i>

Tabelle 3-4: Ergänzender Histologie-Score zur Beurteilung der Defektauffüllung, der Gewebeintegration und der zellulären Reaktionen im Defektbereich

3.9.2 Quantitative Gewebeauswertung

Die computergestützte Bildanalyse erlaubt die Quantifizierung der spezifisch angefärbten Gewebeanteile der immunhistologischen Präparate. Es erfolgte die quantitative Auswertung des Anteils von Kollagen-II-positivem Knorpelgewebe, Kollagen-I-positivem Knochengewebe und von Scaffoldresten im Defektbereich. Weiterhin wurde die Auffüllung des Defektes quantitativ erfasst. Die semiautomatische morphometrische Auswertung wurde durch Verwendung einer Morphometrie-Software³³ mit einem speziell entwickelten Makroprogramm³⁴ ausgeführt. Die Flächenberechnung der spezifisch angefärbten Gewebe wurde anhand des digitalisierten Bildmaterials durchgeführt. Vor der Messung wurden die Bildkontraste verstärkt, um eine Optimierung der Farbkontraste zu erreichen. Eine manuelle Distanzeingabe an der Skalierung der digitalisierten Bilder ermöglichte die Kalibrierung der Maßeinheiten. Die Flächenberechnung in mm² erfolgte in fünf definierten Regions of Interest (ROI). Die Defektregion wurde in zwei Regionen aufgeteilt und angrenzend an den Defekt wurden zwei laterale und eine basale Regionen bestimmt (Abb. 3-7). Die obere Kante der Defektregion wurde bis an die Gelenkknorpeloberfläche auf das Bildmaterial aufgezogen.

Die Flächenmessungen wurden wie folgt durchgeführt:

³³ KS 400, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland

³⁴ D. Epari, CMSC, Charite, Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland

- Bestimmung der Gesamtfläche der einzelnen ROI [mm²]
- Leerfläche des Defektes [mm²], der nichtaufgefüllte Bereich in der Defektregion wurde mit dem Cursor manuell umfahren, markiert und ausgemessen
- Fläche des Kollagen-I-positiven Gewebes der jeweiligen ROI [mm²]
- Fläche des Kollagen-II-positiven Gewebes der jeweiligen ROI [mm²]
- Fläche der Scaffoldreste der jeweiligen ROI [mm²]

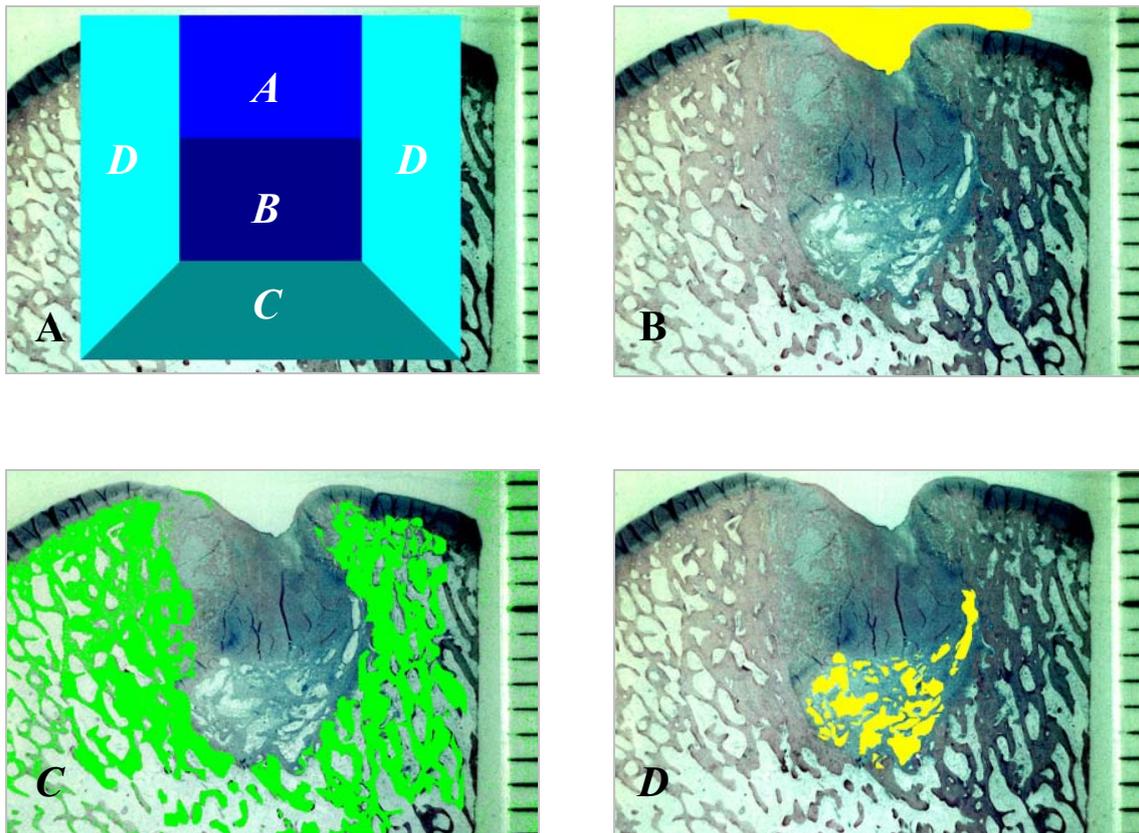


Abbildung 3-7: Darstellung der ROI in der computergestützten Bildanalyse: ROI A befindet sich über dem oberen Defektbereich, ROI B über dem basalen Defektbereich, ROI D je lateral neben dem Defekt und unter dem Defekt ROI C (A); gelb markierte Leerfläche über der Defektregion (B); Kollagen-I-positive Gewebefläche in grün dargestellt(C); gelb markierte Scaffoldreste im Defektgrund (D)

Alle Parameter wurden für den gefüllten Defekt, den Leerdefekt und für die native Kondyle ermittelt. Anschließend wurden die gemessenen Flächenangaben auf die initial gemessenen Gesamtflächen der einzelnen ROI bezogen. Die Angaben der Gewebeanteile in Prozent ermöglichten den Vergleich der erhaltenen Werte.

3.9.3 Mikroskopische Auswertung der Gefäßdarstellung

Die immunhistologische Darstellung der Gefäße wurde zuerst in der Übersicht mikroskopisch durchgemustert³⁵. Daraufhin folgte die Auszählung der Gefäße in der definierten ROI. Der Auszählungsbereich wurde mittels einer gefertigten Schablone festgelegt. Der Defektbereich (ROI) wurde mit einer Kantenlänge von 7,3 mm x 10 mm bis an das Niveau der Knorpeloberfläche aufgezogen. Bei der Auszählung der Gefäße wurden diese anhand ihres Durchmessers als kleine (<100 µm) und große (>100 µm) Gefäße erfasst. Die Schnitte wurden zweimal vom gleichen Untersucher ausgezählt und aus den erhaltenen Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet.

Um die Defektauffüllung im Auszählungsbereich in Relation zur Gefäßanzahl zu stellen, wurde die Anzahl der Gefäße in dem jeweiligen Defektbereich auf die vorhandene Bindegewebsfläche bezogen. Die Gefäßdichte ergab sich aus Gefäßanzahl pro 10 mm² Bindegewebsfläche. Die Bindegewebsfläche des Defektareals wurde den histomorphometrischen Daten entnommen und ergab sich aus der Differenz der Gesamtfläche der Defekt-ROI und der gemessenen Leerfläche im Defektareal.

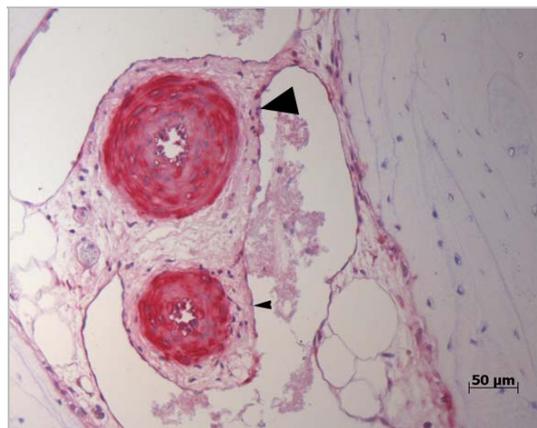


Abbildung 3-8: Gefäßdarstellung: Anschnitt eines großen (große Pfeilspitze) und kleinen (kleine Pfeilspitze) Gefäßes, bindegewebig integriert in einer Knochenlakune

3.9.4 Statistische Auswertungen

Die erhobenen Daten wurden statistisch mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms SPSS V 14.0³⁶ für Windows ausgewertet. Die kleine Stichprobenanzahl der betrachteten Gruppen dieser Studie (n=6) bedingt, dass keine Gaußsche Normalverteilung der Werte zu erwarten war. Somit wurde für die Auswertung der gesammelten Daten eine deskriptive Form der statistischen Analysen mit Berechnung der Minimum-, Maximum und Medianwerte gewählt.

³⁵ Zeiss, Eiching, Deutschland

³⁶ SPSS Inc., Chicago, USA

Die Auswertung aller nichtparametrischen Daten der unabhängigen Stichproben (zwischen Gruppen unterschiedlicher Standzeiten und zwischen den Gruppen unterschiedlicher Scaffoldmaterialien) erfolgte anhand des Mann Whitney U-Tests. Es wurde getestet, ob zwei unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Dieser Test ist aussagekräftiger als der Mediantest, da die Fallränge zugrunde gelegt werden. Die angegebenen p-Werte dieser Varianzanalyse zeigen die signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Bei der Auswertung nichtparametrischer Daten abhängiger Stichproben (zwischen gefülltem Defekt, Leerdefekt und nativer Kondyle) innerhalb der einzelnen Gruppen wurden die exakten Signifikanzen anhand des Wilcoxon-Tests ermittelt. Dieser Test dient zur Überprüfung der Hypothese, dass beide Variablen dieselbe Verteilung haben. Es werden Informationen über die Größe der Differenzen innerhalb von Paaren berücksichtigt und Paaren mit größeren Differenzen wird größeres Gewicht zugeteilt. Die Statistik beruht auf der Rangordnung der Absolutwerte der Differenzen zwischen den beiden Variablen. Die angegebenen p-Werte dieser Varianzanalyse geben Signifikanzen zwischen den gefüllten und ungefüllten Defekten und der nativen Kondyle an. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt und, falls nötig, nach Bonferroni Holm korrigiert.

Um Korrelationen zwischen unterschiedlichen Messwerten zu suchen, wurden Korrelationskoeffizienten nach dem Kendall-Tau-b-Verfahren bestimmt. Dieser Koeffizient gilt als ein nichtparametrisches Zusammenhangsmaß für Variablen und Ränge. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt die Richtung des Zusammenhangs und sein Betrag die Stärke an. Es wurde eine zweiseitige Signifikanz bestimmt und das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Alle Schafe zeigten nach dem operativen Eingriff ein ungestörtes Allgemeinbefinden und konnten unmittelbar in die Herde zurückgeführt werden. Während des gesamten Studienzeitraums waren die Futter- und Wasseraufnahme unbeeinträchtigt. Bei den Versuchstieren wurden weder Wundheilungsstörungen der Operationswunde noch klinische Anzeichen postoperativer Gelenkinfektionen beobachtet. Die linken Hintergliedmaßen wurden bereits am Tag nach dem Eingriff belastet. Operationsbedingte Komplikationen waren bei keinem der 24 Tiere zu verzeichnen.

4.2 Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung nach Explantation

Die makroskopische Beurteilung der Femurkondylen und der gesägten Knorpel-Knochen-Präparate wurde an der operierten linken Gliedmaße und der rechten nativen Gliedmaße durchgeführt. Alle sechs Tiere der entsprechenden Gruppen gingen in diese Auswertung mit ein. Nach Tötung und Explantation wurden keine klinischen Anzeichen einer Gelenkinfektion beobachtet. Die Synovia zeigte die physiologische Transparenz und die charakteristische fadenziehende Konsistenz. Bei Betrachtung der Gelenkfüllung wurde in Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) eine klinisch erfassbare Gelenkeffusion verzeichnet. Makroskopisch erfassbare Veränderungen der tibialen Gelenkfläche waren nicht vorzufinden, die Menisken und ligamentären Strukturen waren ohne pathologischen Befund. Die Gelenkflächen und ligamentären Strukturen des rechten Knies zeigten keine Veränderungen.

Defekte nach 3 Monaten Standzeit:

Die Defektbereiche der Gruppen 1 und 2 (Scaffold weich und hart, 3 Monate Standzeit) waren im Randbereich bis auf das angrenzende Gelenkknorpelniveau aufgefüllt. Das Gewebe stellte sich milchig dar, wobei die Oberflächenbeschaffenheit gegenüber dem nativen Knorpelgewebe unregelmäßiger und stellenweise aufgetrieben war. Im Defektzentrum erreichte die Gewebeaufüllung bei keinem dieser Tiere das Gelenkknorpelniveau und zeigte eine rot-bräunliche Verfärbung bei je drei Tieren pro Gruppe. Die Leerdefekte zeigten im Vergleich zu den aufgefüllten Defekten beider Gruppen eine deutlich geringere Defektauffüllung.

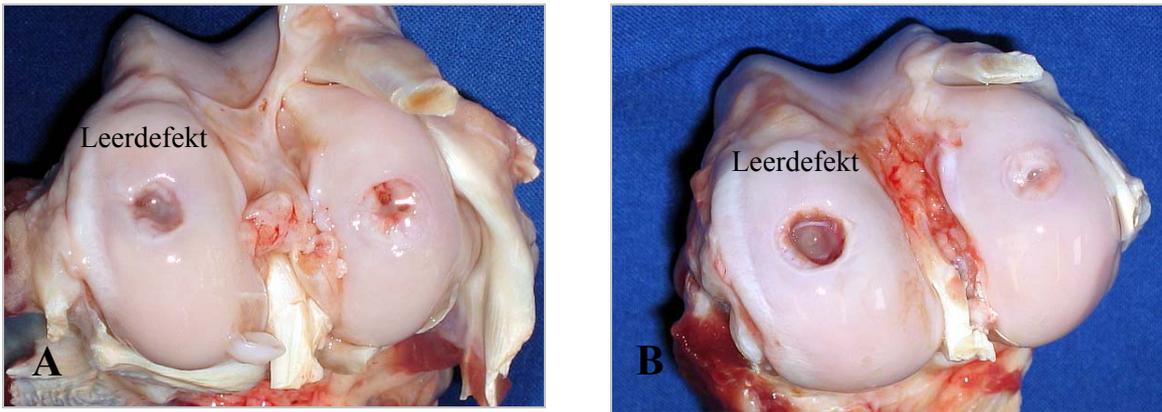


Abbildung 4-1: Das Defektgewebe des gefüllten Defekts nach drei Monaten Standzeit ist uneben und zeigt in der Defektmitte eine rötliche Verfärbung (A); wie in Abb. A ist eine geringere Defektauffüllung des ungefüllten Defekts im Vergleich zu den gefüllten Defekten zu beobachten (B)

Die Schnittflächen der gesägten Knorpelknochenpräparate erlaubten die makroskopische Betrachtung der Defektareale im Querschnitt. Diese Ansicht bestätigte die verminderte Defektauffüllung im Zentrum der gefüllten Defekte und die geringere Auffüllung der Leerdefekte im Vergleich. In der Defekttiefe ließ sich bei beiden Gruppen Scaffoldmaterial feststellen. Das Knochengewebe im Defektbereich und -umgebung zeigte rötlich verfärbte hyperämische Areale.

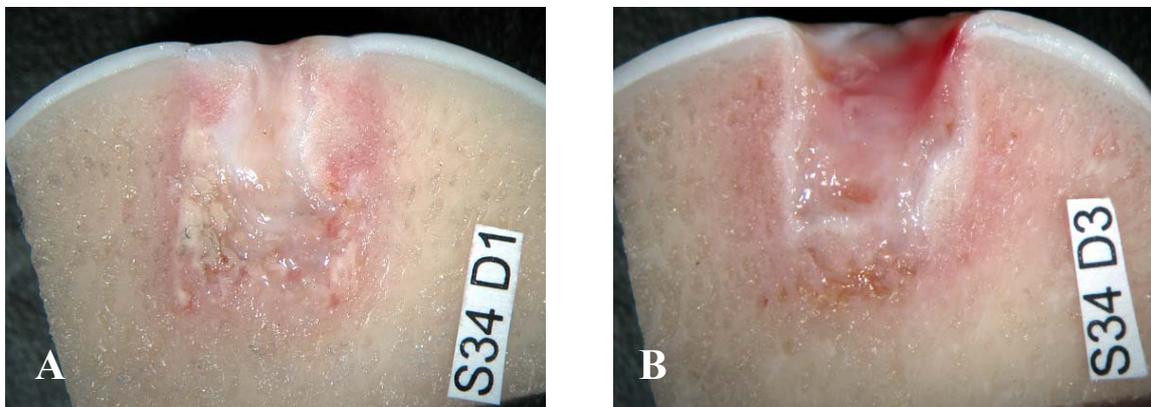


Abbildung 4-2: Defektauffüllung des gefüllten Defekts nur in den Randbereichen bis zum Gelenkniveau und hyperämische Verfärbung des Knochengewebes (A); geringfügige basale Defektauffüllung und Hyperämie des ungefüllten Defekts (B)

Defekte nach 6 Monaten Standzeit:

Die Defekte der Gruppen 3 und 4 (Scaffold weich und hart, 6 Monate Standzeit) waren bis auf das Gelenkniveau aufgefüllt. Das entstandene Regeneratgewebe erschien milchig-trüb und die Oberflächenstruktur war inhomogen im Vergleich zur nativen Gelenkfläche. Zwischen den gefüllten

und nichtgefüllten Defektbereichen waren makroskopisch keine Unterschiede festzustellen. Die Betrachtung der Schnittflächen der Kondylen ergab nichtresorbierte Scaffoldreste im Defektgrund und hyperämische Bereiche im Knochengewebe der gefüllten und nichtgefüllten Defekte.

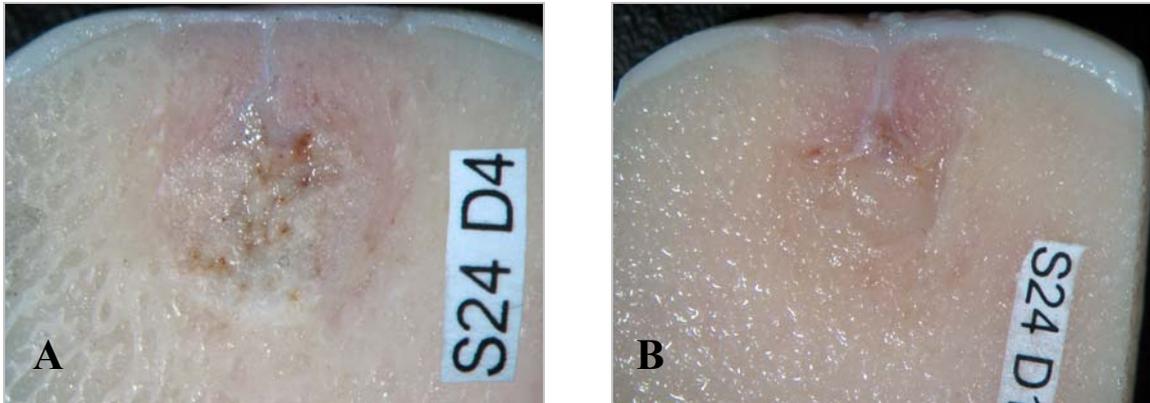


Abbildung 4-3: Defektauffüllung bis zum Gelenkniveau und Scaffoldreste im Defektgrund des gefüllten Defekts (A); ähnliche Auffüllung des ungefüllten Defekts mit inhomogener Knorpelschicht an der Gelenkoberfläche (B)

4.3 Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung

4.3.1 Deskriptive Histologie

Gefüllte Defekte nach 3 Monaten Standzeit:

Die Knorpeloberfläche der Defektregion der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate) war bei keinem der sechs Tiere durchgehend wiederhergestellt. Die Defektauffüllung erfolgte annähernd bis auf das Niveau der subchondralen Knochenlamelle bei fünf Präparaten. Eines der Präparate zeigte eine Hypertrophie des Knorpel- und Knochengewebes, welches eine inkongruente Gelenkkontur bildete (Abb. 4-4). Das Knorpelgewebe im Defektbereich zeigte ein Wachstum von den Defekträndern aus und zog unterschiedlich weit in die Defekttiefe, eine durchgehende Knorpelschicht in der Defektmitte auf Höhe des Gelenkflächenniveaus kam nicht zustande. Am Übergang der Knorpelschicht zum umliegenden nativen Knorpelgewebe war die Knorpelschichtdicke bis zu 50% dünner (Abb. 4-4). Besonders in dieser Knorpelregion waren Degenerationserscheinungen wie Chondrozytencluster, Fibrillationen und azelluläre Knorpelareale zu beobachten. Die Farbintensität des gebildeten Knorpelgewebes stellte sich inhomogen in der Safranin Orange-Färbung dar. Die EZM des Defektgewebes zeigte einen ungerichteten Faserverlauf und die Faserstruktur stellte sich im histologischen Präparat inhomogen dar. Die Zellform wies eine große Variation auf, diese runden bis spindelförmigen Zellen ließen die spezifische Integration in der EZM in Form von Chondronen vermissen.

Das Knochenwachstum erfolgte ebenfalls von den Defekträndern aus und die subchondrale Knochenlamelle war in diesen Bereichen deutlich verdickt (Abb. 4-4). An den Defekträndern konnten

enchondrale Ossifikationsvorgänge beobachtet werden. Der gebildete spongiöse Knochen zeigte verdickte Trabekel, englumige Knochenlakunen und eine ungeordnete Trabekelausrichtung. Im Bereich des subchondralen Knochens und auch im tieferen Defektbereich waren Prozesse der Knochensklerose zu beobachten. Die Defektauffüllung im Knochenbereich variierte zwischen 30 und 50% durch trabekuläres Kochengewebe und wurde bei fehlendem Knochengewebe durch hypervaskuläres, hyperzelluläres Bindegewebe aufgefüllt.

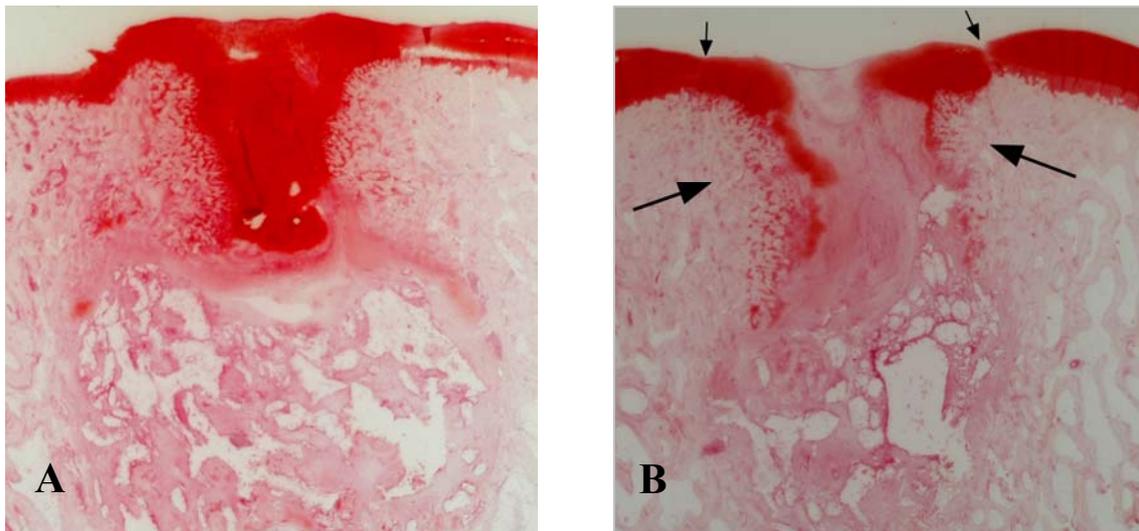


Abbildung 4-4: Hypertrophie des Knorpelgewebes im Defektbereich über das Gelenkknorpelniveau hinaus (A); Wachstumsrichtung (große Pfeile) des Knorpel- und Knochengewebe und dünne Knorpelschicht (kleine Pfeile) im Bereich der Defektränder mit inhomogener Anfärbung, in der Defektmittle hyperzelluläres Bindegewebe (B)

Im Defektgrund war nach 3 Monaten ca. die Hälfte des Scaffoldmaterials nicht resorbiert und von Knochengewebe, hypervaskulärem Bindegewebe und zu einem geringen Anteil von Fettgewebe umgeben. Eine Vielzahl polynukleärer Fremdkörperriesenzellen befand sich, aktiv Phagozytose betreibend, in dieser Defektregion (Abb. 4-5).

Die Defektauffüllung und Knorpelbildung der Gruppe 2 (Scaffold hart, 3 Monate Standzeit) zeigten eine große Variationsbreite. Drei der Präparate verfügten über eine vollständige Defektauffüllung bis auf Gelenkniveau, wobei zwei dieser Regenerate eine geschlossene Knorpelschicht aufwiesen (Abb. 4-6). In Analogie zu den Präparaten der Gruppe 1 waren eine geringere Knorpelschichtdicke im Bereich des Defektrandes und Degenerationserscheinungen im Knorpelgewebe zu beobachten. Das Defektknorpelgewebe beinhaltete im Randbereich die Formierung von Chondrozytenclustern und einzelnen hypertrophen Zellen. Die Mitoseaktivität dieser Zellen war durch die lockere Chromatinstruktur mikroskopisch sichtbar. Das gebildete Knorpelgewebe beinhaltete eine diffuse Zell- und Faseranordnung.

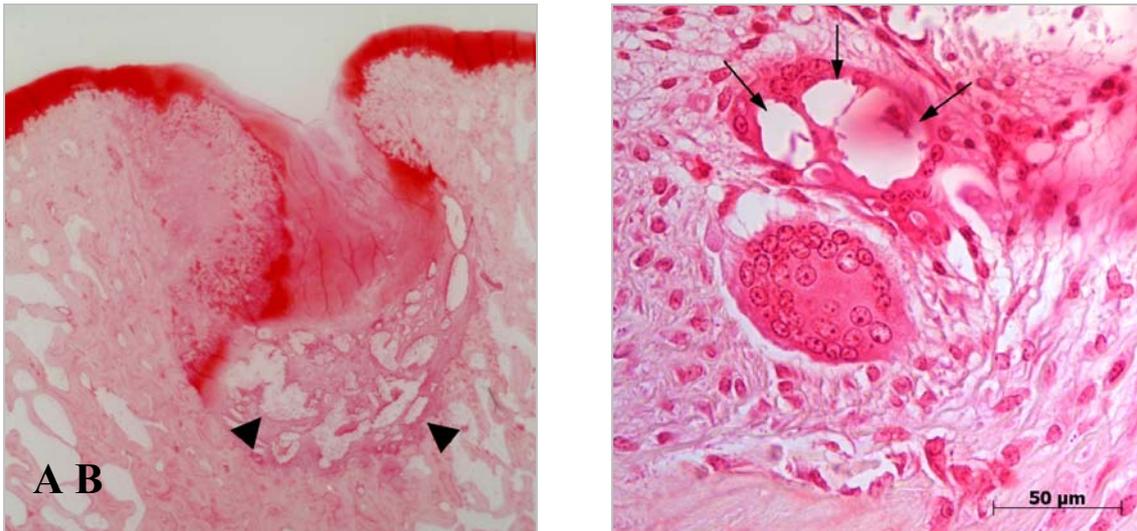


Abbildung 4-5: Verdichtetes Knochengewebe im Bereich der subchondralen Knochenlamelle und um den Defektbereich als Merkmale der Knochensklerose, Scaffoldreste (Pfeile) im Defektgrund (A); zwei polynukleäre Fremdkörperriesenzellen in Phagozytoseaktivität, wobei die obere Zelle große Zelleinschlüsse mit inkorporiertem Material (Pfeile) aufweist, aufgenommen im Defektgrund (B)

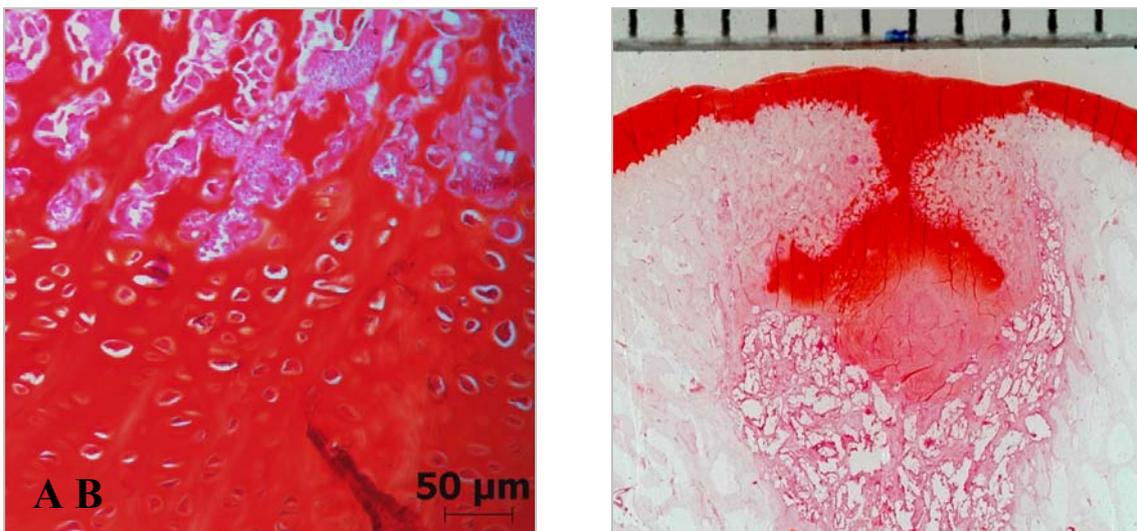


Abbildung 4-6: Zone der enchondralen Ossifikation (A); Geschlossene Knorpelschicht über dem Defekt, diese ist in den Randbereichen verjüngt und in der Defektmittle reicht das hypertrophe Knorpelgewebe in die Defekttiefe; die subchondrale Knochenlamelle ist verdickt und nähert sich in der Defektmittle durch enchondrale Ossifikationsprozesse einem Zusammenschluss an; die Scaffoldreste überwiegen in den unteren zwei Dritteln des Defektbereichs (B)

Die subchondrale Knochenlamelle zeigte hingegen in der Gruppe 2 nur eine moderate Zunahme der Schichtdicke im Defektareal. Das von den Randgebieten einwachsende spongiöse Knochengewebe wies Trabekelstrukturen auf, welche ebenfalls ein englumiges und verdicktes Netzwerk zeigten. In diesen Regionen waren aktive Vorgänge der enchondralen Ossifikation zu beobachten (Abb. 4-6). Die Skleroseprozesse im Knochengewebe waren in der Gruppe 2 im geringeren Ausmaß zu beobachten und stellten sich nur in den oberen Randbereichen durch verdichtetes Knochengewebe dar. Das Scaffoldmaterial blieb zum überwiegenden Teil als Leitgerüst, besonders in den unteren zwei Dritteln erhalten. Die bestehenden Implantatporen wurden vom Defektrand ausgehend von Knochengewebe durchwachsen. Der Anteil an hyperzellulärem Bindegewebe und Fettgewebe war deutlich niedriger als in der Gruppe 1.

Ungefüllte Defekte nach 3 Monaten Standzeit:

Die Präparate der ungefüllten Defekte zeigten eine breite Variation des Auffüllungsniveaus, wobei keine evaluierbaren Unterschiede im Heilungsstatus der zwei betrachteten Gruppen zu finden waren. Das Gelenkknorpelniveau wurde in jeweils einem Präparat der Gruppe 1 und 2 erreicht und von einer inhomogenen Knorpelschicht bedeckt (Abb. 4-7). Die Mehrzahl der Regenerate hingegen zeigte eine geringere Defektauffüllung als die der aufgefüllten Defekte und entsprach bei drei Präparaten annähernd der Ursprungsgröße des gebohrten Defektes (Abb. 4-7).

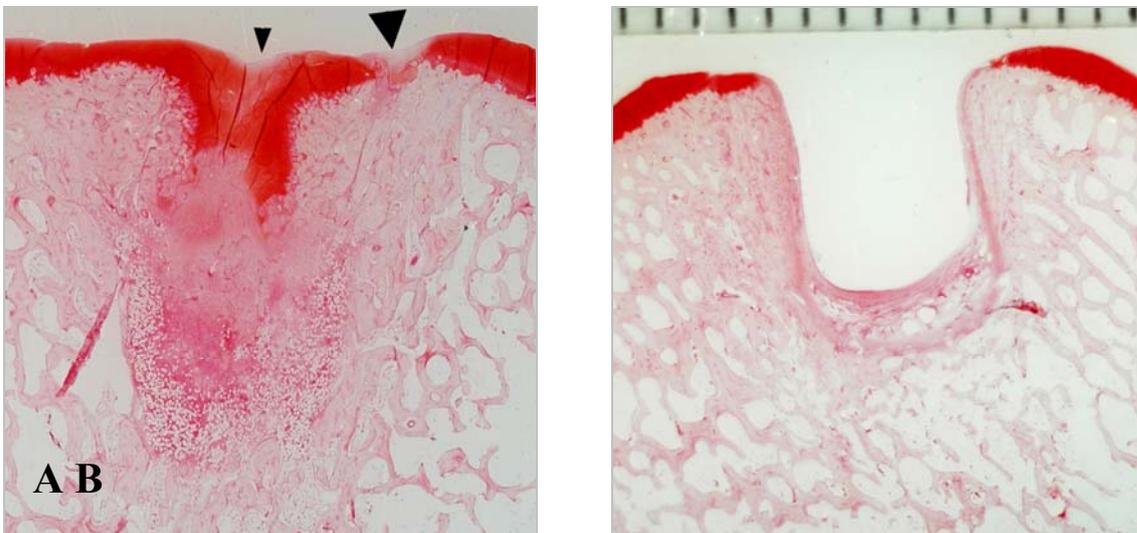


Abbildung 4-7: Inhomogen angefärbte Knorpelschicht (Pfeile) im Defektbereich und hoher Bindegewebsanteil im Defektgrund (A); ungefüllter Defekt in annähernder Ursprungsgröße, das Knorpelgewebe in den Randbereichen ist degeneriert, im Defektgrund ist eine dünne bindegewebige Auskleidung zu erkennen, und das Knochengewebe ist um den Defektbereich sklerotisch verändert (B)

Das vorherrschende Regeneratgewebe war hyperzelluläres Bindegewebe. Das Knorpelgewebe beinhaltete spindelförmige Zellmorphologien mit ungeordneter Gewebeverteilung. Zum fibrösen Bindegewebe war ein fließender Übergang zu verzeichnen. An den Defekträndern waren gleichfalls

enchondrale Ossifikationsvorgänge und sklerotische Prozesse im gebildeten Knochengewebe zu beobachten.

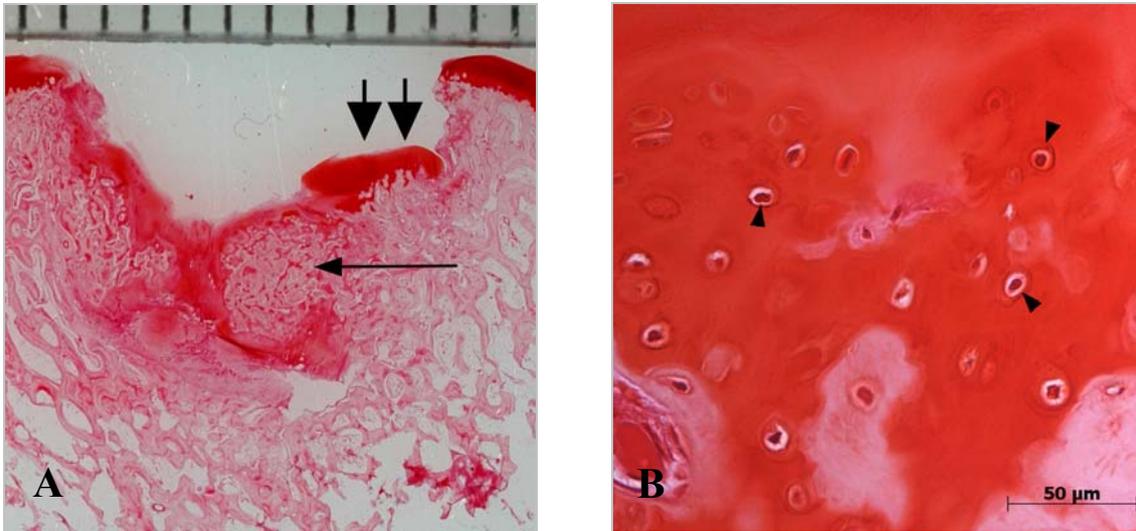


Abbildung 4-8: Der eingebrochene Randbereich (große Pfeile) verursacht einen vergrößerten Defektdurchmesser von neun Millimetern, enchondrale Ossifikationsprozesse (kleiner Pfeil) schließen den Defektgrund (A); so genannte Geisterhöfe (Pfeile) im basalen Defektknorpelbereich sind Anzeichen degenerativer Prozesse (B)

Gefüllte Defekte nach 6 Monaten Standzeit:

Die Knorpelschicht aller Präparate der Gruppe 3 (Scaffold weich, 6 Monate Standzeit) war durchgehend vorhanden. Ein Präparat zeigte eine fehlende Vereinigung dieser Knorpelschicht im Defektzentrum, welche spaltförmig drei Millimeter in die Defekttiefe reichte (Abb. 4-9). Die Knorpelschichtdicke war im Vergleich zum originären Gelenkknorpel häufig geringer. Besonders in den Defektrandgebieten wurden eine Abnahme der Schichtdicke, Degenerationserscheinungen und bei drei Regeneraten Fibrillationen im basalen Knorpelbereich am Übergang zur subchondralen Knochenlamelle beobachtet (Abb. 4-9). Insbesondere in diesen Regionen stellte sich die Farbintensität des Knorpelgewebes in der Safranin Orange-Färbung inhomogen dar. Das Knorpelgewebe in der Defektmitte wies diffuse Chondrozytenanordnungen und Farbinhomogenitäten in oberen Gewebebereich auf. Im basalen Bereich über der gebildeten subchondralen Lamelle waren abschnittsweise für diese Knorpelschicht charakteristische säulenförmige Anordnungen der Knorpelzellen zu erkennen. Der Übergangsbereich zwischen Knorpelgewebe und subchondraler Knochenlamelle wies ein unregelmäßiges Bild der Verzahnung auf.

Die Defektauffüllung erreichte bei fünf Präparaten das Gelenkniveau. Die subchondrale Knochenlamelle vereinigte sich nur bei einem der Regenerate in der Defektmitte, während diese bei den verbleibenden fünf Regeneraten 2-3 mm durch in die Tiefe reichendes Knorpelgewebe getrennt war. In diesen Bereichen waren Prozesse der enchondralen Ossifikation sichtbar.

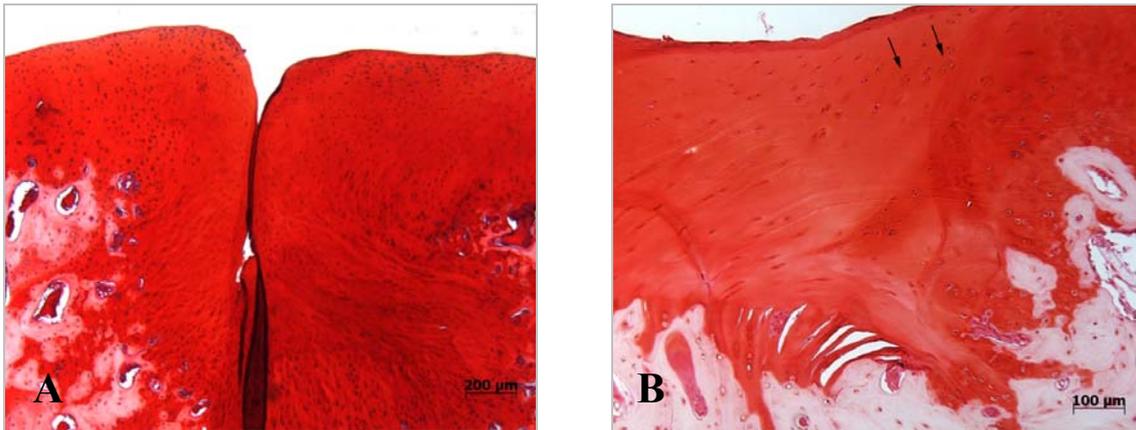


Abbildung 4-9: Fehlende Vereinigung der Knorpelschicht in der Defektmittle und hyperzelluläres Knorpelgewebe, welches in die Defekttiefe zieht (A); Aufnahme des Knorpelgewebes im Defektrandbereich mit Degenerationserscheinungen: Chondrozytencluster (Pfeile), azelluläre Bereiche in der Bildmitte und Fibrillationen im basalen Knorpelbereich am Übergang zur subchondralen Knochenlamelle (B)

Das gebildete Trabekelnetzwerk des spongiösen Knochens war verdickt, verdichtet und zeigte eine ungeordnete Ausrichtung. Vornehmlich in den Randgebieten waren sklerotische Vorgänge zu beobachten. Die oberen zwei Drittel des Scaffoldmaterials waren degradiert, während im Defektgrund hydrolysierte Implantatbestandteile von Binde- und Fettgewebe umgeben waren. Bei mikroskopischer Betrachtung konnten eine Vielzahl an polynukleären Fremdkörperriesenzellen in aktiver Phagozytose visualisiert werden. Ein Präparat wies kaum noch Scaffoldreste auf, zeigte jedoch im Defektbereich eine subchondrale Knochenzyste von 4-5 mm Durchmesser.

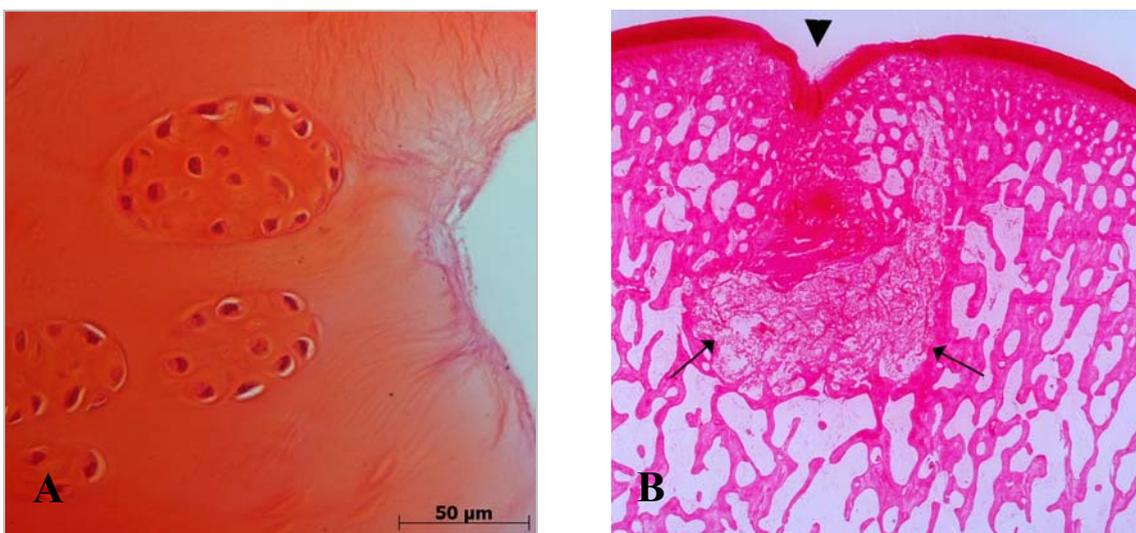


Abbildung 4-10: Chondrozytencluster im Defektrandbereich als Anzeichen degenerativer Prozesse (A); unvollständige Defektauffüllung (Pfeilspitze), verdichtetes Trabekelnetzwerk des spongiösen Knochengewebes und Scaffoldreste (Pfeile) im Defektgrund (B)

Die gefüllten Defekte der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit) wurden alle von einer Knorpelschicht bedeckt. Ein Präparat zeigte Fibrillationen in der Knorpelschicht am Übergang zum nativen Knorpelgewebe. Besonders diese Bereiche zeigten in allen Regeneraten moderate degenerative Erscheinungen und inhomogene Farbintensitäten im Knorpelgewebe. Das Vorkommen von Chondrozytenclustern in diesen Bereichen war deutlich geringer als zur Vergleichsgruppe 3. Die Schichtdicke des Defektknorpels war geringer als die des umliegenden Gelenkknorpels. Die Anzahl der Zellen war im oberen Knorpelbereich höher und die säulenförmige Anordnung der Zellen und Matrixbestandteile im basalen Bereich zeigte eine verstärkte Homogenität. Die Farbintensität zeigte an der Gelenkoberfläche Aufhellungen und Inhomogenitäten (Abb. 4-11)

Die verdickte subchondrale Knochenlamelle hatte sich bei fünf der betrachteten Präparate unter dem Defektknorpel geschlossen. Die ossären Ausläufer reichten unterschiedlich weit in die darüber liegende Knorpelschicht. In diesem Übergangsbereich zum Knorpelgewebe war das Knochengewebe von fibrösem Gewebe inselförmig durchsetzt. Die Trabekelstrukturen des gebildeten Knochengewebes zeigten bei drei der Präparate eine perpendikuläre Ausrichtung zur Gelenkoberfläche (Abb. 4-11).

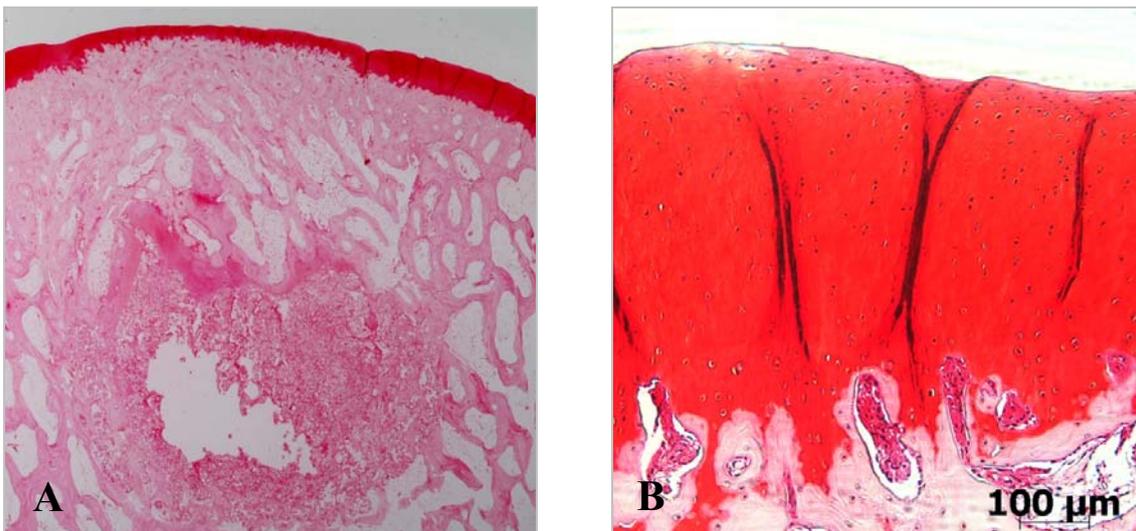


Abbildung 4-11: Geschlossene Knorpelschicht über dem Defekt, die Trabekelstrukturen des oberen Defektbereichs nähern sich in Form und Ausrichtung dem organären Knochengewebe an und im Defektgrund sind Scaffoldreste von unterschiedlicher knöcherner Durchbauung zu beobachten (A) Knorpelgewebe im Bereich der Defektmittle mit den morphologischen Merkmalen des Gelenkknorpels (B)

Über die Hälfte des Scaffoldmaterials war degradiert. Bei zwei der untersuchten Regenerate hatte sich eine subchondrale Knochenzyste mit einem Durchmesser von fünf Millimetern gebildet (Abb. 4-13). Die Auskleidung der Zystenwand bestand aus zellarmem Bindegewebe, welches in lockerer Verbindung zum angrenzenden sklerotisch veränderten Knochengewebe stand (Abb. 4-12).

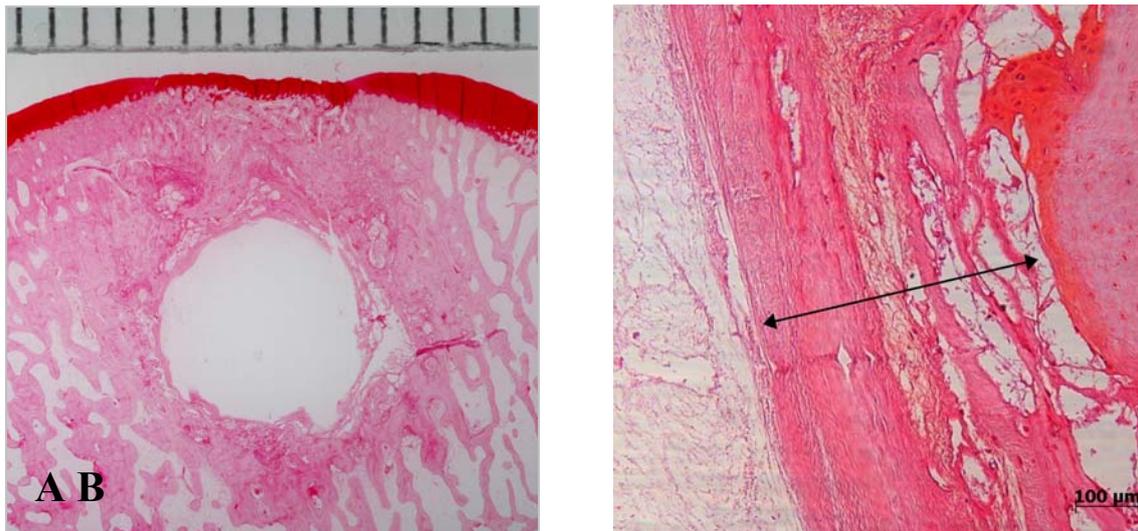


Abbildung 4-12: Subchondrale Knochenzyste im Defektgrund, umgeben von verdichtetem Knochengewebe und ohne Verbindung zur Gelenkoberfläche (A); zellarme Bindegewebsschichten (Pfeil) der Zystenwand (Zystenlumen am linken Bildrand) mit lockerer Verbindung zum umliegenden Knochengewebe (am rechten Bildrand) (B)

Leerdefekte nach 6 Monaten Standzeit:

Die Defektauffüllung der Leerdefekte der Gruppe 3 erreichte in vier Fällen das Gelenkniveau. Die Knorpelschicht war in allen Präparaten durchgehend und variierte in der Schichtdicken besonders an den Defektrandbereichen am Übergang zum umliegenden Gelenkknorpel. Degenerationserscheinungen im Knorpelgewebe traten auch hier deutlich hervor. Die Färbintensität des Knorpelgewebes stellte sich anhand der SO-Färbung inhomogen dar und wies besonders in diesen Regionen zellarme grobstrukturierte Fasermerkmale auf. Die Kongruenz der Gelenkoberfläche wurde bei keinem der Präparate durchgehend wiederhergestellt. Die Oberflächenmorphologie des Knorpelgewebes beinhaltete insbesondere in der Defektmitte spaltförmige in die Tiefe reichende Einkerbungen.

Der Zusammenschluss der subchondralen Knochenlamelle konnte nur in einem Fall beobachtet werden. Die Trabekelstrukturen des spongiösen Knochengewebes waren verdickt und verdichtet. Die Leerdefekte der Gruppe 4 stellten sich ähnlich dar, wobei zwei Präparate keine durchgehende Knorpelschicht im mittleren Defektbereich aufwiesen (Abb. 4-14). Die Gelenkkongruenz wurde bei keinem der Präparate vollständig wiederhergestellt. Ein Präparat je Gruppe zeigte eine subchondrale Knochenzyste im Defektgrund (Abb. 4-13).

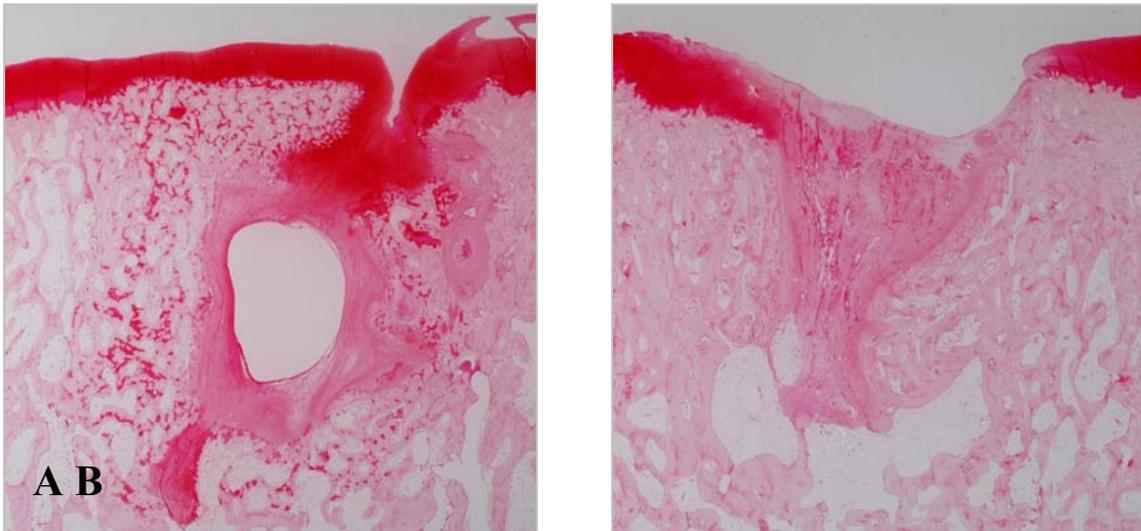


Abbildung 4-13: Subchondrale Knochenzyste und inkongruenter Gelenkknorpel (A); fehlende Knorpelschicht über dem Defektgrund und bindegewebige Defektauffüllung (B)

Zusammenfassend ließ sich anhand der histologischen Beobachtungen folgendes feststellen:

- Der Defektknorpel zeigte immer Degenerationserscheinungen im Randgebiet zum angrenzenden organischen Knorpel
- Die Knorpelschicht über der Defektregion war in keinem der Präparate der Gruppe 1 geschlossen, während die Gruppe 2 zwei Präparate mit durchgehender Knorpelschicht aufwies
- Die Knorpelschicht im Defektbereich war nach sechs Monaten Standzeit (Gruppe 3 und 4) durchgehend geschlossen, zeigte aber eine geringere Schichtdicke im Vergleich zum umliegenden Gelenkknorpel
- Das Gewebewachstum des Knorpelgewebes und der subchondralen Knochenlamelle verläuft parallel von den Defekträndern aus, die Defektauffüllung in der Defekttiefe erfolgte zeitlich versetzt im späteren Heilungsverlauf
- Während in der Gruppe 3 nur eine subchondrale Knochenlamelle im Defektzentrum verbunden war, war der Schluss der Lamelle in Gruppe 4 bei fünf Präparaten gegeben
- Die Scaffoldbestandteile des Implantats geringerer Steifigkeit wurden schneller degradiert
- Die Defektauffüllung der Gruppen der weichen Scaffoldimplantate hatte einen höheren Anteil an hypervaskulärem Bindegewebe
- Die Trabekelstrukturen des spongiösen Knochengewebes im Defektbereich in Gruppe 4 wies eine höhere Ordnung auf als in Gruppe 3
- Die Bildung von subchondralen Zysten war in den ungefüllten Defekten und in beiden Gruppen der gefüllten Defekte mit der Standzeit von sechs Monaten zu beobachten
- Die ungefüllten Defekte zeigten eine geringere Defektauffüllung und Geweberegeneration als die gefüllten Defekte äquivalenter Standzeit

Die histologischen Bildmaterialien der Gruppen 1-4 sind zur vergleichenden Ansicht in Anhang III in einer Übersicht dargestellt.

4.3.2 Histologie-Score

Die semiquantitative Auswertung der histologischen Präparate erfolgte anhand eines Scores, entwickelt von O'Driscoll modifiziert nach Frenkel et al. und bewertet die Knorpelschicht im Defektbereich. Die Kriterien beinhalten die Quantität, Qualität und Integrität des regenerierten Knorpelgewebes. Die Ergebnisse werden als Median dargestellt, in den Tabellen sind ergänzend die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte aufgeführt.

Gefüllte und ungefüllte Defekte: Knorpelgewebe

Der prozentuale Anteil hyalinen Knorpelgewebes erreichte in der Gruppe 2 im Median 8 Punkte. Die Oberflächenbeschaffenheit des Defektknorpels zeigte in allen Gruppen strukturelle Abweichung vom nativen Knorpelgewebe, wie Fissuren, Risse und Fibrillationen. Die strukturelle Integrität des Defektknorpelgewebes am Übergangsbereich zum originären nativen Knorpelgewebe wurde in den Gruppen 2 und 4 erreicht.

Gruppe		%-Anteil hyaliner Knorpel DE	Oberflächenbeschaffenheit DE	Strukturelle Integrität DE	Knorpeldicke DE	Verbindung zum angrenzenden Knorpel DE	Deg. zelluläre Veränderungen DE	Deg. Veränderungen im angr. Knorpel DE	Rekonstruktion der subch. Lamelle DE	Verbindung zw. Knorpel und subch. Lamelle DE	SO-Färbung DE
Scaffold weich, 3 Monate Gruppe 1	Median	4,00	1,00	1,00	1,00	1,50	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	Minimum	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Maximum	8	2	2	1	2	1	2	1	2	1
Scaffold hart, 3 Monate Gruppe 2	Median	8,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	2,00	2,00
	Minimum	6	1	1	0	2	0	1	1	2	1
	Maximum	8	2	2	2	2	1	2	2	2	2
Scaffold weich, 6 Monate Gruppe 3	Median	5,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50
	Minimum	2	1	1	0	1	0	1	0	2	0
	Maximum	8	2	2	2	2	1	2	1	2	2
Scaffold hart, 6 Monate Gruppe 4	Median	6,00	1,50	2,00	0,50	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00
	Minimum	4	1	1	0	2	0	1	1	2	1
	Maximum	6	2	2	1	2	1	2	2	2	2

Tabelle 4-1: Histologie-Score nach Frenkel et al., Übersicht der gefüllten Defekte der Gruppen 1-4

Die Knorpeldicke der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit) lag in Teilbereichen unter 50% des nativen Knorpelgewebes. Die Verbindungen zum angrenzenden Knorpelgewebe waren nur in der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) nicht vollständig gegeben. Degenerative Veränderungen im Defektknorpelgewebe und im angrenzenden Knorpelgewebe waren in allen Gruppen präsent und zeigten sich am deutlichsten in Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit). Diese Gruppe zeigte bei der Beurteilung der Rekonstruktion der subchondralen Lamelle und deren Verbindung zum Knorpelgewebe ebenfalls die geringste Punktzahl. Eine vollständige Rekonstruktion der subchondralen Lamelle war in der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit) mit einer maximalen Punktzahl von 2 zu verzeichnen. In der Safranin Orange-Färbung wurden die Farbintensität und die Homogenität des Knorpelgewebes beurteilt, welche einen Rückschluss auf den Proteoglykangehalt ermöglichen. Nur die Gruppe 2 (Scaffold hart, 3 Monate Standzeit) zeigte mehr als 80% homogen positive Färbung.

Die Ergebnisse der ungefüllten Defekte lagen bei allen Kriterien unter den Punktzahlen der gefüllten Defekte. Insbesondere die Knorpeldicke, die degenerativen Veränderungen des Knorpelgewebes und die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle zeigten defizitäre Heilungsergebnisse.

Gruppe		% Anteil hyaliner Knorpel LE	Oberflächenbeschaffenheit LE	Strukturelle Integrität LE	Knorpeldicke LE	Verbindung zum angrenzenden Knorpel LE	Deg. zelluläre Veränderungen LE	Deg. Veränderungen im angr. Knorpel LE	Rekonstruktion der subch. Lamelle LE	Verbindung zw. Knorpel und subch. Lamelle LE	SO-Färbung LE
Scaffold weich, 3 Monate Gruppe 1	Median	2,00	1,00	0,50	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00
	Minimum	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Maximum	6	1	1	1	2	0	1	1	2	1
Scaffold hart, 3 Monate Gruppe 2	Median	5,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,50	1,00	1,50	0,00
	Minimum	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maximum	8	1	2	1	2	1	2	2	2	1
Scaffold weich, 6 Monate Gruppe 3	Median	3,00	0,50	0,50	0,50	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	Minimum	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maximum	8	1	2	1	1	0	2	1	2	1
Scaffold hart, 6 Monate Gruppe 4	Median	5,00	0,50	1,00	0,50	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	Minimum	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	Maximum	6	1	2	1	2	1	1	1	2	1

Tabelle 4-2: Histologie-Score nach Frenkel et al., Übersicht der ungefüllten Defekte der Gruppen 1-4

Gefüllte und ungefüllte Defekte: knöcherne Defektauffüllung

Der eigens entwickelte Score bezieht sich ergänzend auf die knöcherne Defektauffüllung, deren Gewebeintegration und die zellulären Reaktionen im Defektbereich.

Die Defektauffüllung der gefüllten Defekte war höher als die der ungefüllten Defekte. Die Gruppen 2 und 4 (Scaffold hart, 3 und 6 Monate Standzeit) erreichten nach drei und sechs Monaten Standzeit die maximale Punktzahl von 4. Die laterale knöcherne Integration des neu gebildeten Knochengewebes im Defektbereich, beurteilt nach der Trabekelausrichtung und dem Übergang zum organären Knochengewebe, der gefüllten Defekte zeigte gute Heilungsergebnisse in allen Gruppen, außer der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) mit einer geringeren Punktzahl von 1. Die vollständige basale Integration wurde nur in der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit) nach sechs Monaten Standzeit erreicht. Die laterale und basale Integration des Knochengewebes der ungefüllten Defekte hingegen zeigte größere Defizite. Das Knochengewebe im Defektrandgebiet war durch sklerotische Veränderungen oder durch ungeordnete und aufgelockerte Trabekelstrukturen gekennzeichnet. Entzündungsreaktionen im Defektgewebe waren in der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) zu verzeichnen. In allen gefüllten Defekten wurden aktive Fremdkörperriesenzellen beobachtet, diese zellulären Reaktionen konnten in den ungefüllten Defekten nicht beobachtet werden.

Gruppe		Auffüllung im Defektbereich DE	Lat. knöcherne Integration DE	Bas. knöcherne Integration DE	Entzündungsreaktion DE	Fremdkörperreaktion DE	Auffüllung im Defektbereich LE	Lat. knöcherne Integration LE	Bas. knöcherne Integration LE	Entzündungsreaktion LE	Fremdkörperreaktion LE
Scaffold weich 3 Monate Gruppe 1	Median	2,50	1,00	1,00	2,00	0,00	2,00	1,00	0,50	1,50	1,00
	Minimum	2	1	0	1	0	0	0	0	1	1
	Maximum	4	2	2	2	0	3	2	2	2	1
Scaffold hart 3 Monate Gruppe 2	Median	4,00	2,00	2,00	2,00	0,00	4,00	2,00	1,50	2,00	1,00
	Minimum	3	2	2	1	0	2	1	0	2	0
	Maximum	4	2	3	2	1	4	2	3	2	1
Scaffold weich 6 Monate Gruppe 3	Median	3,50	2,00	2,00	2,00	0,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Minimum	2	2	1	1	0	0	1	0	1	1
	Maximum	4	2	3	2	0	4	1	1	2	1
Scaffold hart 6 Monate Gruppe 4	Median	4,00	2,00	3,00	2,00	0,00	3,00	1,00	0,50	2,00	1,00
	Minimum	2	2	0	1	0	2	1	0	1	1
	Maximum	4	2	3	2	1	3	1	1	2	1

Tabelle 4-3: Eigens entwickelter Score, Übersicht der gefüllten und ungefüllten Defekte der einzelnen Gruppen

Die erlangten Gesamtpunktzahlen der gefüllten und ungefüllten Defekte der einzelnen Gruppen sind in Abb. 4-14 grafisch dargestellt. Diese Gesamtpunktzahlen ergeben sich aus der Addition der Ergebnisse des Scores nach Frenkel et al. und dem eigens entwickelten Score. Diese Darstellung verdeutlicht eine geringere Punktzahl der ungefüllten Defekte aller Gruppen im Vergleich zu den gefüllten Defekten. Die Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) zeigte größere Defizite im Heilungsergebnis gegenüber den übrigen Gruppen. Die Medianwerte der Ergebnisse der Gruppen mit sechs Monaten Standzeit zeigen keine Unterschiede, jedoch lässt sich in der Gruppe 3 (Scaffold weich) eine größere Streuung der Gesamtpunktzahlen beobachten.

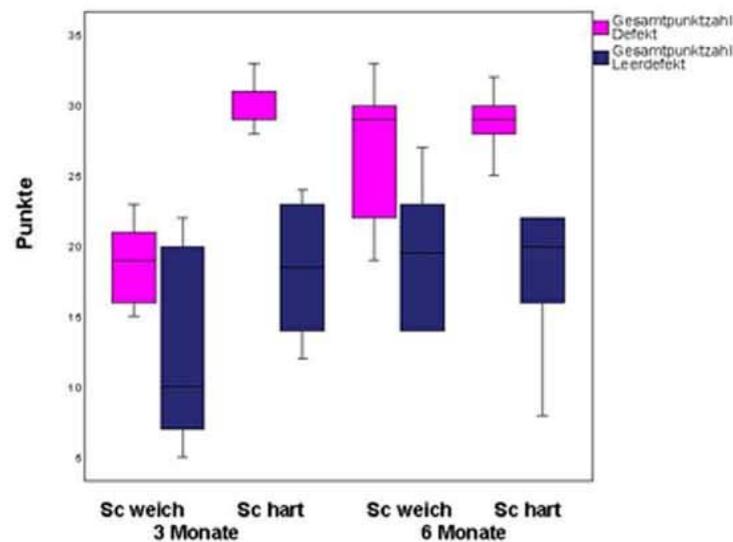


Abbildung 4-14: Grafische Darstellung der Gesamtpunktzahlen der gefüllten und ungefüllten Defekte der jeweiligen Gruppen

4.4 Ergebnisse der Auswertung der Gefäßdarstellung

Die Gefäßdarstellung wurde durch die immunhistologische Färbung unter Verwendung eines Antikörpers gegen α smooth muscle actin durchgeführt (Abb. 4-15). Dargestellt wurden größere Gefäße mit der positiv angefärbten radiär angeordneten Schicht glatter Muskelzellen (sog. Tunica media). Kleinere Gefäße deren Auskleidung nur aus Endothelzellen besteht wurden in dieser Färbung nicht erfasst. Die Gefäßdichte ist der Quotient aus der Gefäßanzahl geteilt durch die Bindegewebsfläche und wird in Gefäßanzahl pro 10 mm² angegeben.

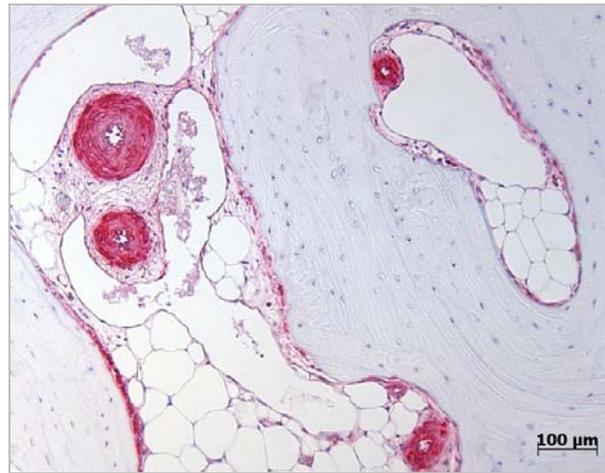


Abbildung 4-15: Positiv angefärbte Anschnitte großer und kleiner Gefäße (rot) in den Knochenlakunen bindegewebig integriert

In Tabelle 4-1 sind die Median-, Minimum- und Maximumwerte der einzelnen Gruppen dargestellt. Den Werten ist zu entnehmen, dass in der betrachteten Defektregion aller Gruppen die Anzahl der kleinen Gefäße der großen Gefäßanzahl weit überlegen war. Dieses Verhältnis zeigte sich in den Leerdefekten und gefüllten Defekten.

Scaffold	Zeit		kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.
			Gefäße/cm ² Leerdefekt	Gefäße/cm ² Leerdefekt	Gefäße/cm ² Defekt	Gefäße/cm ² Defekt	Gefäße/cm ² Nativ	Gefäße/cm ² Nativ
Weich	3Mo	Median	7	2*°	13°	2°	2	0
		Minimum	1	1	5	1	1	0
		Maximum	21	5	28	5	4	1
	6Mo	Median	3	1*°	8°	1°	1	0
		Minimum	1	0	4	1	0	0
		Maximum	4	1	10	2	2	1
Hart	3Mo	Median	7°	2°*	12°	2°	1	1
		Minimum	1	1	3	1	1	0
		Maximum	11	2	20	4	2	2
	6Mo	Median	2	1*	7**	1**	1	1
		Minimum	1	0	2	0	1	0
		Maximum	5	1	14	9	3	1

Tabelle 4-4: Übersicht der Gefäßdichte der Defekte der Gruppen 1-4; *Signifikanz zwischen der Standzeit, °Signifikanz zum nativen Gewebe, **Signifikanz zum Leerdefekt

Der Vergleich der Gefäßdichte zwischen den Gruppen Scaffold weich und Scaffold hart ergab keinen signifikanten Unterschied. Die in der Übersicht wiedergegebenen Werte der Leerdefekte und der gefüllten Defekte bestätigten die annähernd gleichen Dichteverhältnisse dieser Gruppen (Tab. 4-1).

Die Standzeit hatte einen Einfluss auf die Gefäßanzahl im Leerdefekt beider Gruppen. Die Anzahl großer Gefäße war drei Monate post op signifikant höher als nach sechs Monaten in beiden Scaffoldgruppen (Scaffold weich, Gruppe 1 und 3 $p=0,026$; Scaffold hart, Gruppe 2 und 4 $p=0,004$). Die Anzahl der kleinen Gefäße in der Gruppe 4 (Scaffold hart) war nach sechs Monaten mit $p=0,065$ geringer, im Vergleich zur Gruppe 2 (Scaffold hart) nach drei Monaten Standzeit. Diese Verhältnisse der Vaskularisation zeigten sich ebenfalls bei dem Vergleich der Standzeiten innerhalb der gefüllten Defekte. Ein annähernder Unterschied wurde in den gefüllten Defekten der Gruppen 1 und 3 (Scaffold weich) mit $p=0,065$ evaluiert.

Die Vaskularisation der gefüllten und der ungefüllten Defekte war in allen vier Gruppen stärker ausgeprägt als im nativen Knorpelknorpelgewebe. In den Diagrammen (Abb. 4-16) ist dieses Verhältnis grafisch dargestellt. Der Vergleich der Gefäßdichte zwischen dem nativen Gewebe und dem Leerdefekt ergab eine signifikant höhere Gefäßdichte der Leerdefekte in den Gruppen 1-3 (Gruppe 1 gr. Gefäße $p=0,026$; Gruppe 2 gr. Gefäße $p=0,016$; Gruppe 3 kl. Gefäße $p=0,016$). Analog dazu erreichte in diesen Gruppen der gefüllte Defekt ebenfalls eine signifikant höhere Gefäßdichte gegenüber dem nativen Gewebe (Gruppe 1 und 2 gr. Gefäße $p=0,016$ und kl. Gefäße $p=0,016$; Gruppe 3 $p=0,016$ kl. Gefäße).

Insbesondere war eine erhöhte Dichte großer Gefäße im Leerdefekt und im aufgefüllten Defekt zu erkennen, während die Dichte der kleinen Gefäße in diesen Geweben zwischen den einzelnen Tieren eine hohe Streuung aufwies.

Die Medianwerte der Gefäßdichte der gefüllten Defekte lagen in allen Gruppen höher als in den Leerdefekten. Eine signifikante Erhöhung im gefüllten Defekt ließ sich in der Gruppe 4 mit $p=0,016$ der kleinen und großen Gefäße nachweisen.

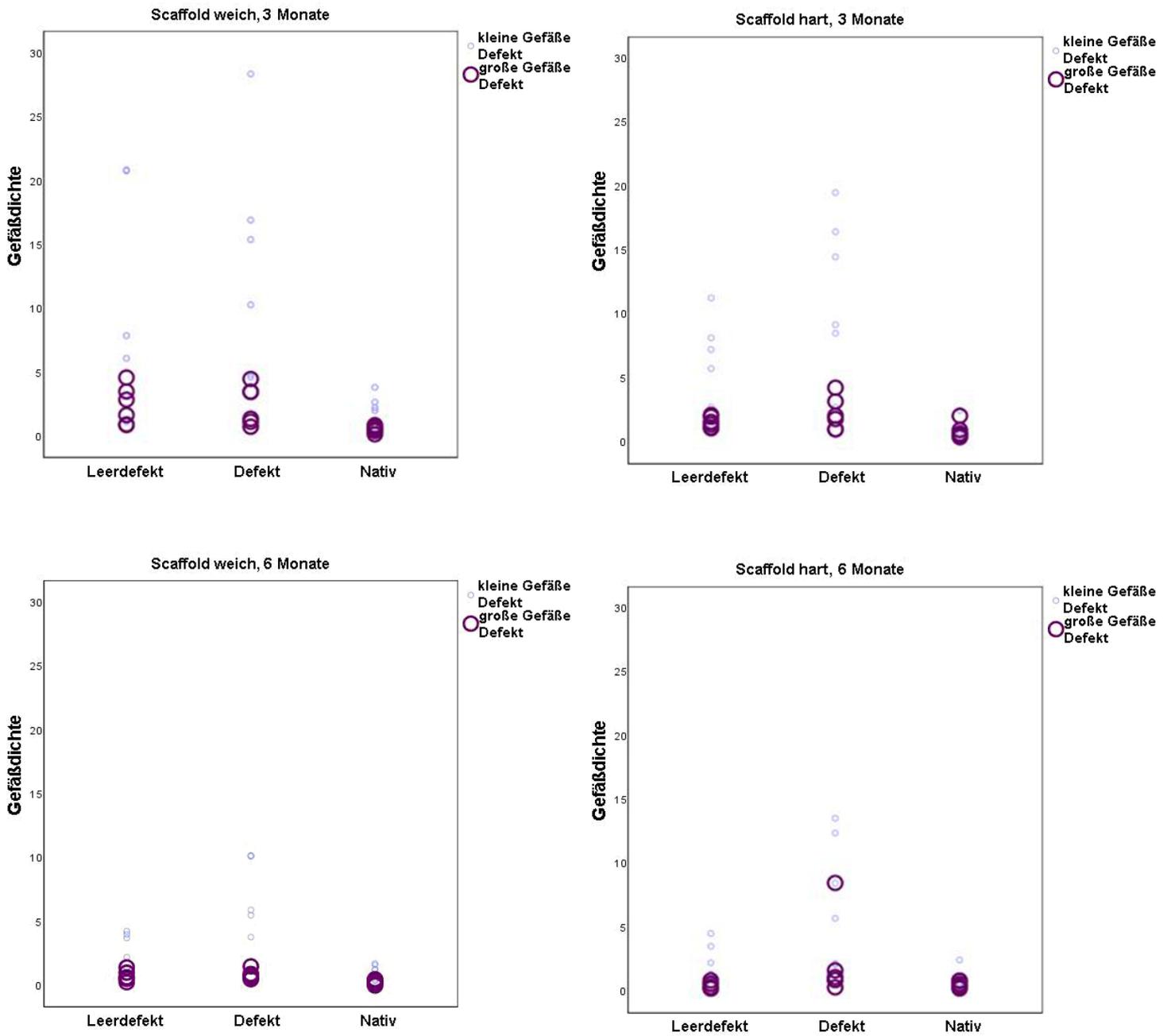


Abbildung 4-16: Stuediagramme der Gefäßdichte der Versuchsgruppen und der entsprechenden Präparate

4.5 Ergebnisse der quantitativen Gewebeauswertung

Die histomorphometrische Auswertung liefert eine quantitative Aussage der Kollagen-I-positiven und Kollagen-II-positiven Gewebeanteile, der Leerfläche über dem Defekt und den verbliebenen Scaffoldreste im Defektgewebe.

Leerfläche:

Die Leerfläche über dem Defektareal lässt Rückschlüsse auf den quantitativen Auffüllungsgrad zu. In Abb. 4-17 sind die Leerflächen der gefüllten (DE) und ungefüllten (LE) Defekte bezogen auf die Gesamtfläche der ROI in Prozent grafisch dargestellt. Die gefüllten Defekte zeigten einen höheren Auffüllungsgrad als die ungefüllten Defekte. Die Defektauffüllung zeigte im Heilungsverlauf nach sechs Monaten Standzeit ein höheres Niveau im Vergleich zu drei Monaten Standzeit. In Gruppe 3 (Scaffold weich, 6 Monate) war der Leerflächenanteil gegenüber der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate) signifikant geringer ($p=0,016$). Zwischen den Gruppen unterschiedlicher Scaffoldmaterialien waren keine signifikanten Unterschiede der Defektauffüllung zu ermitteln.

Kollagen I:

Die Kollagen-I-positiven Gewebeanteile sind bezogen auf die Gesamtfläche prozentual dargestellt (Abb. 4-17). Der erfasste Kollagen-I-positive Gewebeanteil gibt den Anteil an Knochengewebe im Defektareal wieder. Der Knochengewebeanteil war in den ungefüllten Defekten aller Gruppen im Vergleich zu den gefüllten Defekten höher. Nach sechs Monaten Standzeit war die Bildung von kollagen-I-positivem Gewebe vorangeschritten und hatte sich beispielsweise in den Gruppen 2 und 4 (Scaffold hart, 3 und 6 Monate Standzeit) von 37% auf 68% annähernd verdoppelt. In den übrigen Gruppen waren ähnliche Verhältnisse zu beobachten. Der ossäre Auffüllungsgrad war in den Gruppen 1 und 3 (Scaffold weich, 3 und 6 Monate Standzeit) einen signifikant höher als in den zeitgleichen Gruppen Scaffold hart auf ($p=0,01$).

Kollagen II:

Der Anteil an Kollagen-II-positivem Gewebe im Bezug auf die Gesamtfläche ist in Abb. 4-17 grafisch dargestellt und erlaubt eine Aussage über die prozentuale Deckung des Defektes mit Knorpelgewebe. Der Kollagen-II-Anteil zeigte sich in den ungefüllten Defekten mit 19-22% höher als in den gefüllten Defekten mit 15-18%. Die Abnahme des Kollagen-II-positiven Gewebeanteils nach 6 Monaten Standzeit wurde in den gefüllten Defekten beobachtet. Am deutlichsten war die Abnahme des Knorpelgewebes in den Gruppen Scaffold hart von 18 auf 14% zu erkennen. Die Prozentwerte der Gruppen Scaffold weich lagen um 2-3% unter den Werten der zeitgleichen Gruppen Scaffold hart.

Scaffoldreste:

Die Anteile der Scaffoldreste wurden in vier unterschiedlichen ROI erfasst und sind in Abb. 4-21 grafisch in Medianwerten dargestellt. Im basalen Defektbereich (ROI B) sind die Scaffoldanteile mit bis zu 26% am höchsten, während im oberen Defektbereich (ROI A) nur ein geringer Anteil an Scaffoldmaterial erfasst wurde. Um den Defektbereich (ROI C und D) wurden in allen Gruppen nur geringe Mengen Scaffoldreste ermittelt. In den Gruppen mit drei Monaten Standzeit waren die Scaffoldreste mit 26% in der Gruppe Scaffold hart deutlich mehr vertreten, als in der Gruppe Scaffold weich mit nur 8%. Nach sechs Monaten Standzeit lagen die Scaffoldanteile der Gruppe Scaffold hart mit 24% unter den Werten der Gruppe Scaffold weich mit 27%.

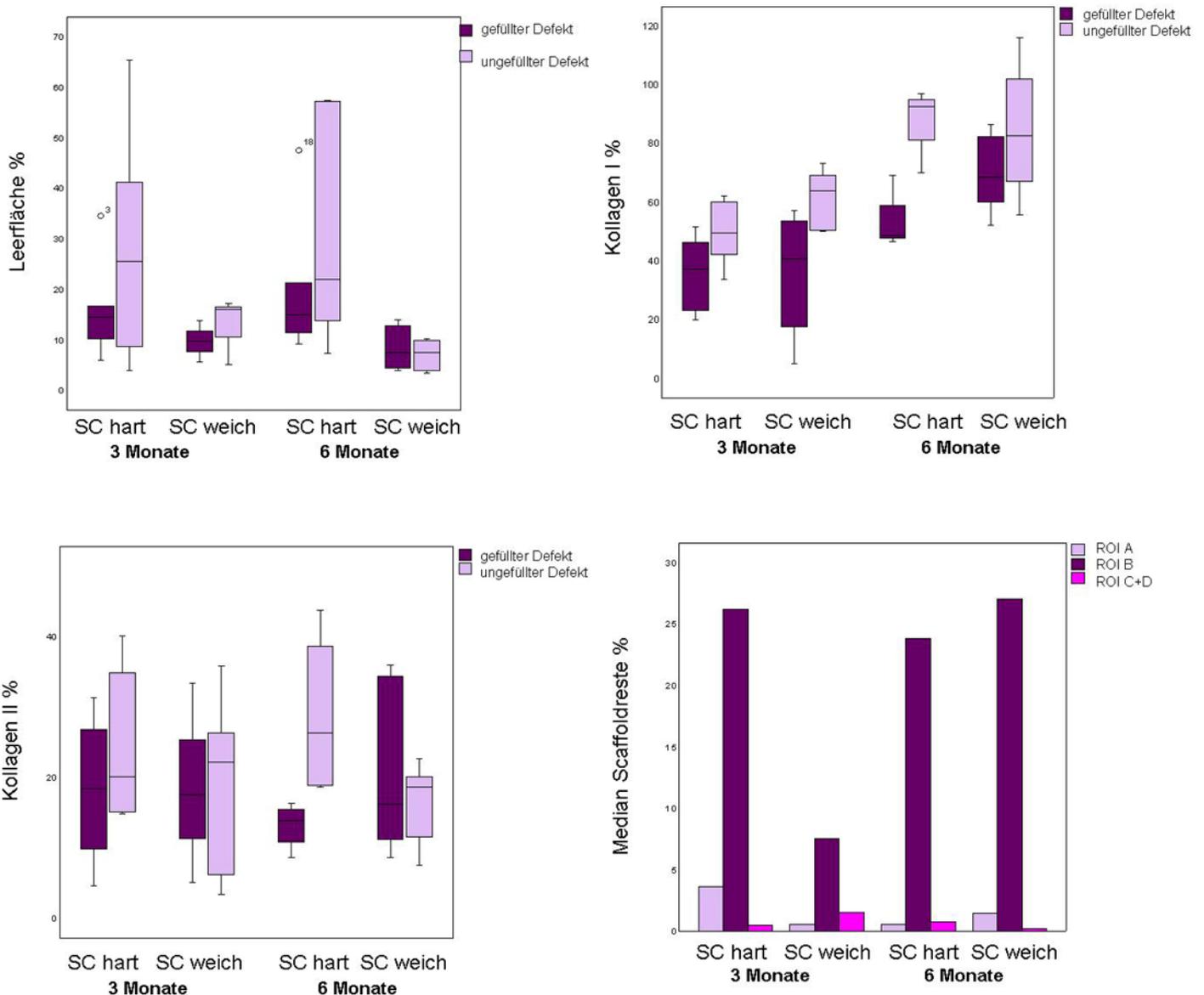


Abbildung 4-17: Grafische Darstellung der Leerfläche, des Kollagen I Anteils, Kollagen II Anteils und der Scaffoldreste in Prozent

4.6 Ergebnisse der indirekten MR-Arthrographie

4.6.1 Deskriptive Beurteilung

Die MRT-Untersuchungen wurden nur an Gruppe 3 und 4 nach sechs Monaten Standzeit durchgeführt. Die gewonnenen MRT-Bilddaten erlaubten eine Beurteilung des Heilungsverlaufs, der Morphologie der osteochondralen Defekte und der Veränderungen der umliegenden Gelenkstrukturen. Die sagittalen Sequenzen T1-2D-fs-GE und T1-3D-fs-GE fanden Verwendung für die Beurteilung der Knorpelstruktur und des Defektgewebes. Die PD-fs-FSE-Sequenz wurde für die Untersuchung weiterer Gelenkstrukturen und des Gelenkkavums hinzugezogen, während die sagittalen und coronalen Aufnahmen einen Aufschluss über die Defektlage und die Bohrrichtung der Defekte gaben.

Gefüllte Defekte der Gruppe Scaffold weich:

Die Bilddaten der Gruppe 3 (Scaffold weich, 6 Monate Standzeit) zeigten bei allen sechs Tieren eine Knorpelschicht über dem Defekt. Die Kongruenz der Knorpeloberfläche passte sich bei fünf Tieren der umliegenden Gelenkfläche an. Keine der Knorpeloberflächen zeigte eine glatte Beschaffenheit dem originären Gelenkknorpel entsprechend. So zeigten sich oberflächliche Unebenheiten und Unterbrechungen am Übergang zum nativen Knorpel. Ein Defekt zeigte in der Mitte der Defektfläche einen v-förmigen 3 mm tiefen Spalt (Abb. 4-18).

Die Knorpeldicke zeigte sich dünner als der umgebende Gelenkknorpel. Hypertrophien wurden bei keinem Tier beobachtet. Die Signalintensität des Defektknorpels stellte sich besonders in der Defektmitte inhomogen und an den Defekträndern hyperintens dar.

Bei allen untersuchten Schafen war anhand der MRT-Bildmaterialien eine vermehrte Füllung des Gelenkes festzustellen. Diese stellte sich bei allen Tieren durch eine Vergrößerung und einen Signalanstieg der kaudalen dorsalen Kniegelenkscapsel dar. Diese Ausbuchtung befindet sich ventral des Ansatzes des Muskulus gastrocnemius. Des Weiteren findet sich je eine Ausbuchtung medial und lateral der zwei Muskelbäuche des M. semimembranosus. Je ausgeprägter die Gelenkeffusion, desto mehr Gelenkausbuchtungen zeigten eine Vergrößerung und einen Anstieg der Signalintensität. Bei zwei Tieren war die Gelenkfüllung sehr stark ausgeprägt. Bei diesen Tieren zeigten, zusätzlich zur kaudalen Gelenkausbuchtung, die Ausbuchtung um den M. extensor digitalis pedis im Sulcus extensorius der Tibia und die suprapatellare Ausbuchtung des Kniescheibengelenkes einen Signalanstieg. Ebenfalls stellten sich die Bursa infrapatellaris distalis und die Ausbuchtung der lateralen Gelenkscapsel, welche den M. popliteus umhüllt, hyperintens dar (Abb. 4-19). Diese Veränderungen der Signalintensität der Synovialflüssigkeit bei diesen zwei Tieren im gesamten Gelenkbereich ließen auf eine Synovitis schließen.

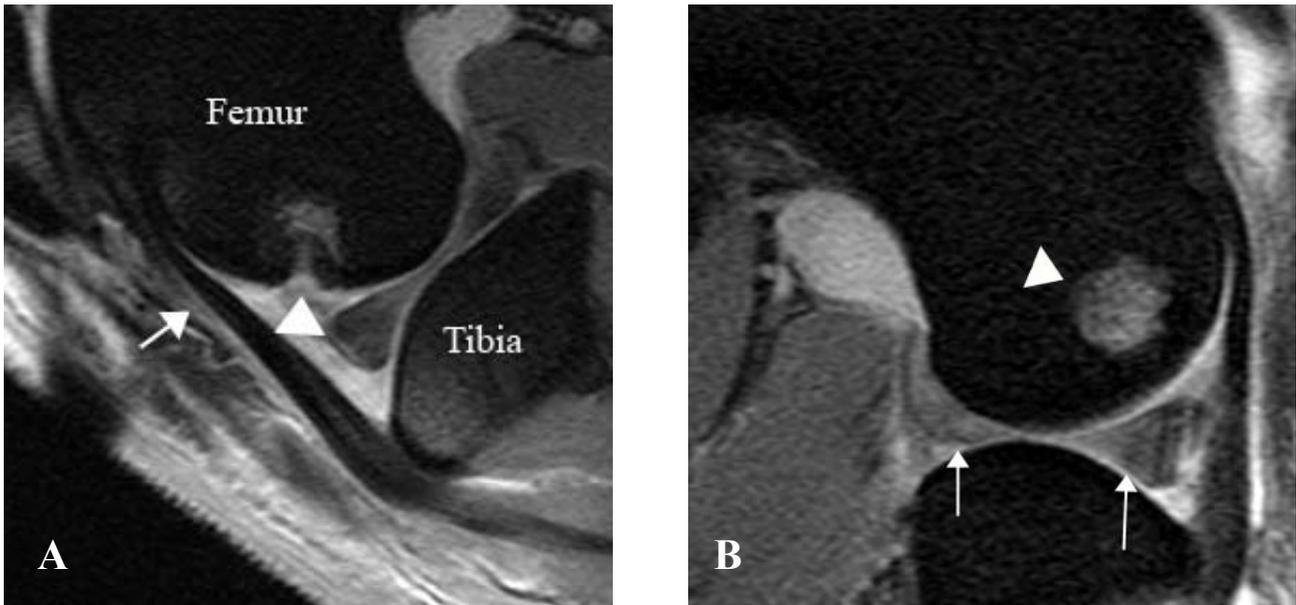


Abbildung 4-18: Inkongruente Gelenkoberfläche durch unvollständige Defektauffüllung (Pfeilspitze), gemeinsame Ansatzsehne des *M. extensor digitalis longus* und *M. fibularis tertius* (Pfeil), T1-2D-fs-GE Sequenz (A); vollständige Wiederherstellung der Gelenkkongruenz und hyperintens dargestelltes subchondrales Knochenmarködem in der Defekttiefe (Pfeilspitze), caudaler und cranialer Anteil des lateralen Meniskus (Pfeile), T1-2D-fs-GE Sequenz (B)

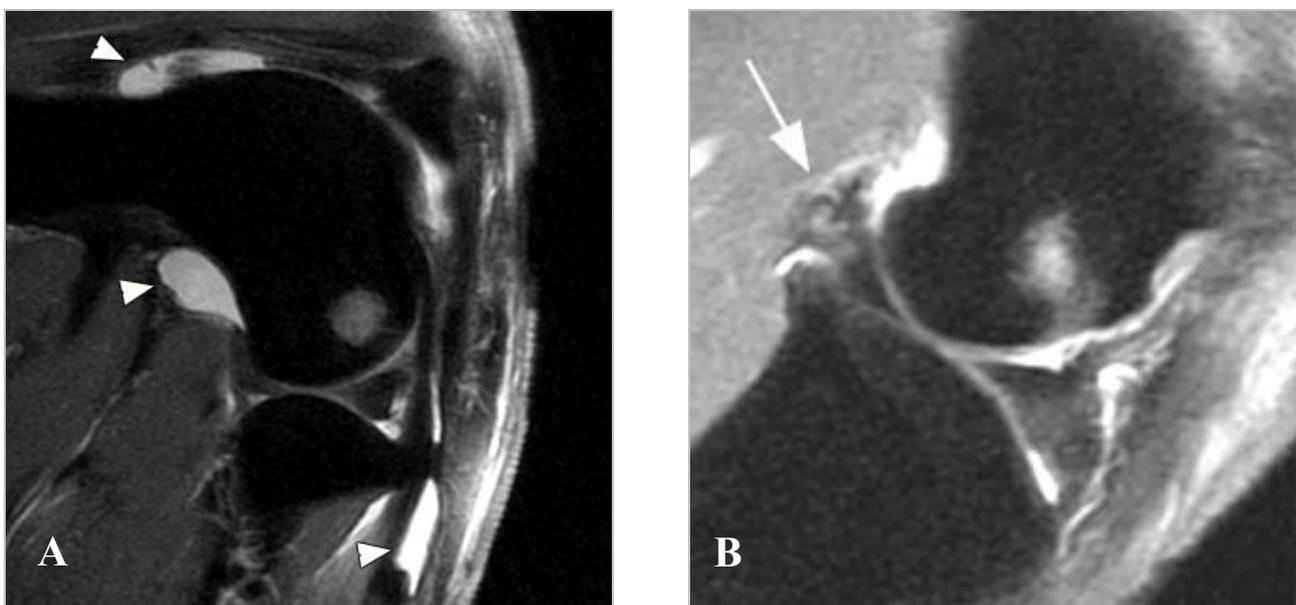


Abbildung 4-19: Hochgradige Gelenkeffusion mit hyperintenser Darstellung der Gelenkausbuchtungen (Pfeilspitzen), PD-fs-FSE Sequenz (A), Protrusion des kaudalen Meniskuswinkels (Pfeil) über den kaudalen Rand des Tibiaplateaus hinaus, PD-fs-FSE Sequenz (B)

Alle sechs Tiere zeigten ein subchondrales Knochenödem im Defektbereich. Die Knochenmarködeme kennzeichnen sich durch einen leichten Signalanstieg im Knochengewebe mit diffuser Ausbreitung in das umliegende Knochengewebe. Die Größe variierte im Durchmesser zwischen 7-10 mm. Die ödematösen Veränderungen waren bevorzugt im Defektgrund zu finden und zeigten eine halbmondförmige bis runde Struktur. Eines der Schafe zeigte in der Tiefe des Femurschaftes ein Knochenmarködem. Im Defektgrund lies sich bei einem der Tiere eine klar begrenzte subchondrale Knochenzyste erkennen. Bei einem Tier wurde die Subluxation des medialen Meniskus beobachtet. Diese Subluxation stellte sich durch eine Protrusion des caudalen Meniskuswinkels über den kaudalen Rand des Tibeaplateaus hinaus dar (Abb. 4-19).

Gefüllte Defekte der Gruppe Scaffold hart:

Die Beurteilung der Bilddaten der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit) ergaben ebenfalls bei allen Tieren eine Knorpelschicht über dem Defekt. Jedoch waren auch bei fünf der untersuchten Tiere Inhomogenitäten in den Knorpelregeneraten zu erkennen (Abb. 4-20). Zu den Signalveränderungen zählten Einschnitte am Übergang zum umliegenden Knorpel, Signalinhomogenitäten und bei einem Tier Hypertrophien in der Defektknorpelschicht. Ein Tier zeigte eine glatte, homogene Knorpelschicht. Die Gelenkkongruenz war bei einem Schaf durch eine verminderte Auffüllung im Defektzentrum deutlich gestört.

Die Ausbildung von subchondralen Knochenmarksödemen zeigte bei dieser Gruppe ebenfalls ein einheitliches Bild bevorzugt in der Defekttiefe (Abb. 4-21). Die hyperintense Darstellung einer subchondralen Zyste war bei einem Tier zu erkennen und bei zwei weiteren Tieren nicht eindeutig zu diagnostizieren. Die Zyste stellt sich hyperintens mit deutlicher Abgrenzung zum umliegenden Knochengewebe dar und ist von ödematösen Verschattungen umgeben (Abb. 4-21). Eine Verbindung des Zystenlumens mit dem Gelenkkavum konnte im Defektzentrum beobachtet werden. Der Durchmesser der subchondralen Zyste betrug 7 mm. Eine vermehrte Gelenkfüllung zeigte sich bei fünf Tieren, wobei bei einem Gelenk eine hochgradige Effusion, wie bereits beschrieben, auftrat. Das Gelenkkavum eines Tieres stellte sich physiologisch dar.

Leerdefekte beider Gruppen:

Der Gelenkknorpel im Defektbereich der ungefüllten Defekte der zwei Gruppen zeigte im Vergleich zu den gefüllten Defekten eine inhomogenere Struktur. Das hyperintens dargestellte Knorpelgewebe war von unterschiedlicher Schichtdicke und passte sich in nur zwei Fällen der Gelenkkontur an (Abb. 4-22). Im Defektgrund stellten sich Knochenmarködeme unterschiedlichen Ausmaßes dar. Im Vergleich zu den gefüllten Defekten war die Signalintensität dieser Veränderungen bei acht Tieren moderater und bei vier Tieren von ähnlicher Intensität. Je ein Tier pro Gruppe wies eine subchondrale Knochenzyste im Defektbereich auf. Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht evaluierbar.

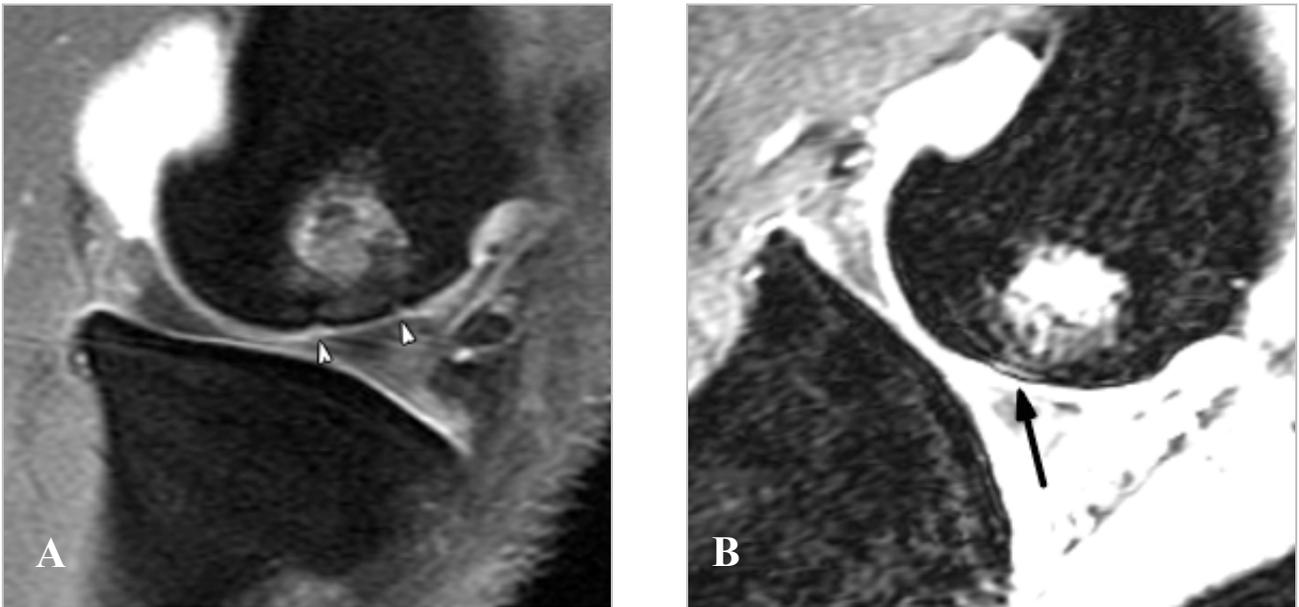


Abbildung 4-20: Defektknorpel besonders an den Defekträndern hyperintens dargestellt, T1-2D-fs-GE Sequenz (A); hyperintenses Knorpelgewebe (Pfeil) und Verjüngung im Randbereich und nicht eindeutig als Zyste diagnostizierbare hyperintense Struktur im Defektgrund, T1-3D-fs-GE Sequenz (B)

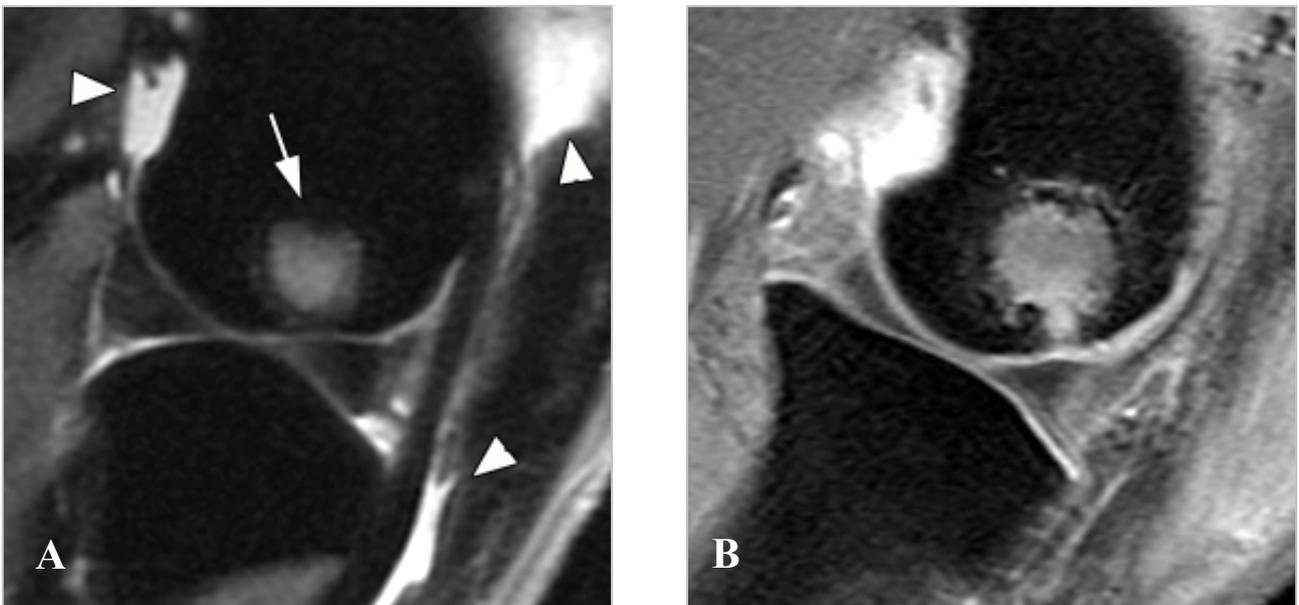


Abbildung 4-21: Subchondrales Knochenmarködem (Pfeil) und Anzeichen einer Gelenkeffusion (Pfeilspitzen) hyperintens dargestellt, PD-fs-FSE Sequenz (A); subchondrale Knochenzyste mit Verbindung zum Gelenkkavum, T1-2D-fs-GE Sequenz (B)

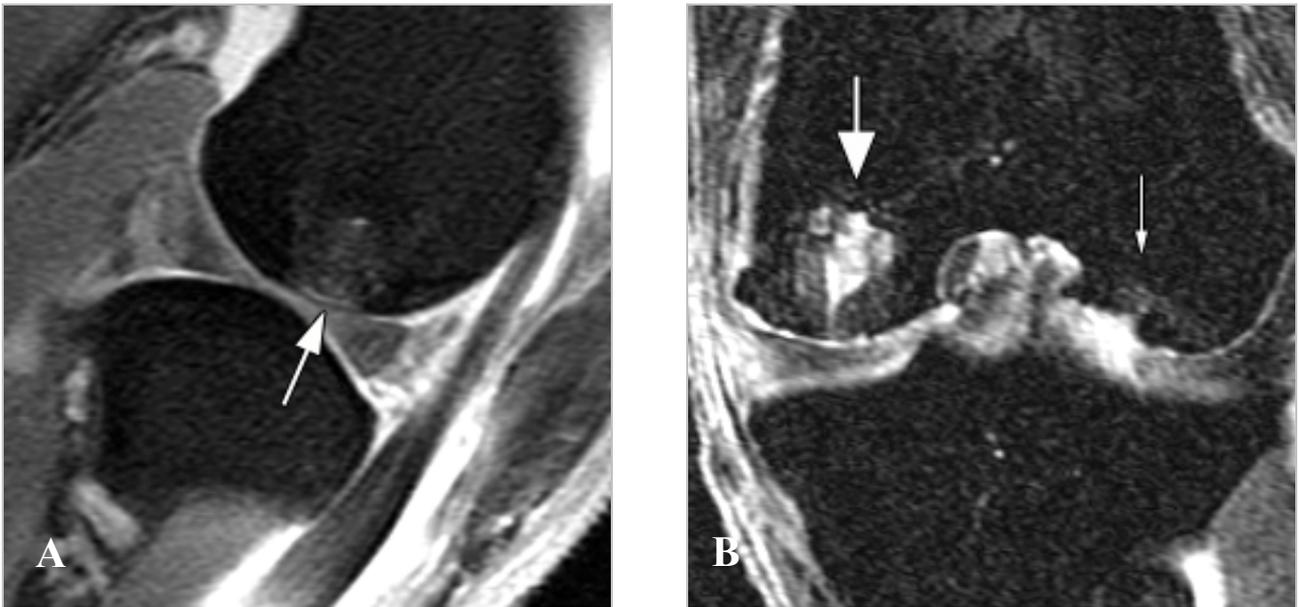


Abbildung 4-22: Hyperintens dargestelltes Defektknorpelgewebe, T1-2D-fs-GE Sequenz (A); gefüllter (großer Pfeil) und ungefüllter (kleiner Pfeil) Defekt in coronaler Aufnahme im Vergleich, der basale Defektbereich des gefüllten Defekts stellt sich hyperintenser dar, 3D-fs-GE Sequenz (B)

Zusammenfassend ließ sich anhand der MRT-Bildmaterialien folgendes feststellen:

- Beide Gruppen zeigten eine Knorpelschicht über dem gefüllten Defekt, welche Signalinhomogenitäten bei allen Tieren aufwies
- In Gruppe 3 (Scaffold weich) zeigten alle Tiere und in Gruppe 4 (Scaffold hart) fünf Tiere Gelenkeffusionen
- In der Gruppe 3 waren zwei Tiere und in der Gruppe 4 ein Tier welche pathologische Merkmale einer Synovitis aufwiesen
- Alle gefüllten Defekte beinhalteten im basalen Bereich ein hyperintenses subchondrales Knochenmarködem, die ödematösen Befunde der Leerdefekte stellten sich mit geringerer Signalintensität dar
- In beiden Gruppen lies sich bei je einem Tier eine Zyste im Defektgrund diagnostizieren, wobei in der Gruppe 4 zwei weitere Defekte ähnliche Strukturen aufwiesen
- Die Knorpelstruktur und die Wiederherstellung der Gelenkkongruenz der Leerdefekte beider Gruppen zeigten Heilungsergebnisse geringerer Qualität als die der gefüllten Defekte

4.6.2 MRT-Score

Die nach sechs Monaten gewonnenen Bildmaterialien wurden anhand des entwickelten Scores ausgewertet. Dabei wurden je nach Interessenschwerpunkt die Kriterien gruppiert und gegenübergestellt.

Vergleich der Scaffoldgruppen:

Die Auswertung der MRT-Bildmaterialien anhand des entwickelten Scores ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 3 und 4. In Tab. 4-1 sind die Ergebnisse der einzelnen Kriterien in Median-, Minimum- und Maximumwerten wiedergegeben. Daraus wird ersichtlich, dass die Knorpelstruktur, die Defektauffüllung und die Knorpeloberfläche in Gruppe 3 (Scaffold weich) eine geringere Punktzahl erhielten als die Vergleichsgruppe 4 (Scaffold hart). Die Gruppe 4 zeigte eine größere Defektausbreitung in die Tiefe, einen signalstärkeren Defektbereich und gehäuft pathologische Anzeichen einer Synovitis. Die Gruppe 3 erreichte eine Gesamtpunktzahl von 28 Punkten, während bei Gruppe 4 im Median 27,5 Punkte ermittelt wurde.

Scaffold		Defektauffüllung	SI Knorpelgewebe	Knorpelintegration	Knorpelstruktur	Knorpeloberfläche	Gelenkkongruenz	Gewebestruktur	SI Defekt	Defekttiefe	Defektbreite	subch. Ödem	Zyste	Gelenkeffusion	Synovitis
weich	Median	2,0	2,0	2,0	1,5	1,0	2,0	2,0	3,0	2,0	2,5	1,0	3,0	2,0	2,0
	Minimum	0	0	0	0	0	1	1	2	1	2	1	3	1	1
	Maximum	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2
hart	Median	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	2,0	1,0	3,0	2,0	1,5
	Minimum	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	Maximum	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	2

Tabelle 4-5: Übersicht der Ergebnisse des MRT-Scores bezogen auf die gefüllten Defekte der zwei Versuchsgruppen

Vergleich ungefüllter und gefüllter Defekt:

Die in der deskriptiven Auswertung der MRT-Bilder beschriebenen Unterschiede zwischen gefülltem Defekt und Leerdefekt werden in der Scoreauswertung bestätigt. So erscheint die Defektausbreitung der gefüllten Defekte von größerem Ausmaß als die der Leerdefekte. Das subchondrale Knochenmarködem ist unter dem gefüllten Defekt in beiden Gruppen stärker ausgeprägt. Die Bildung subchondraler Zysten zeigt sich von der Defektfüllung unbeeinflusst.

Vergleich Defektgröße und Signalintensität:

Die Größe der Defekte wurde in der basalen und lateralen Ausbreitung quantitativ erfasst. Die Signalintensität der Defektareale wurde in einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermittelt. In Abb. 4-25

wird ersichtlich, dass die Defektbreite und die Defekttiefe in der Ausbreitung korrelieren (Leerdefekte: Korrelationskoeffizient 0,504 mit $p=0,023$; gefüllte Defekte: Korrelationskoeffizient 0,400 mit $p=0,073$). Weiterhin steht die Signalintensität in einem signifikanten Zusammenhang mit der Defektgröße (Korrelationskoeffizient 0,727 mit $p=0,001$).

Scaffold		SI Defekt	SI Leerdefekt	Defekttiefe	Leerdefttiefe	Defektbreite	Leerdeftbreite	subch. Ödem Defekt	subch. Ödem Leerdefekt	Zyste Defekt	Zyste Leerdefekt
weich	Median	3,00	3,00	2,00	2,00	2,50	2,00	1,00	2,00	3,00	3,00
	Minimum	2	1	1	1	2	2	1	1	3	1
	Maximum	3	4	3	3	3	3	2	3	3	3
hart	Median	2,00	2,00	1,50	3,00	2,00	3,00	1,00	2,00	3,00	3,00
	Minimum	0	0	1	2	1	2	1	1	1	3
	Maximum	3	3	2	3	2	3	2	3	3	3

Tabelle 4-6: Übersicht der Ergebnisse des MRT-Scores bezogen auf die gefüllten und ungefüllten Defekte der zwei Versuchsgruppen

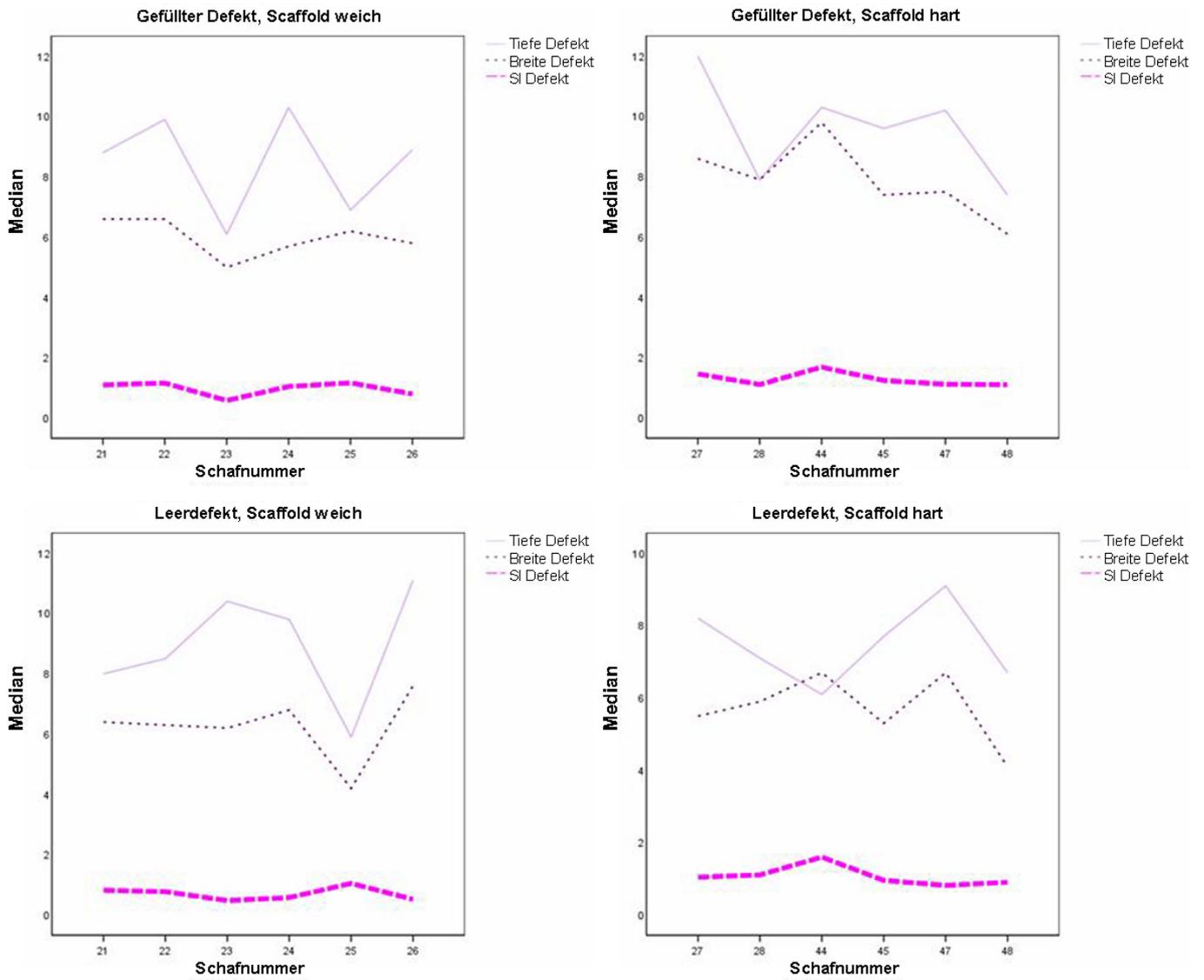


Abbildung 4-23: Grafische Darstellung der Defektgröße, Defekttiefe und der Signalintensität des Defektareals

5 *Diskussion*

5.1 **Diskussion der Methoden**

In dieser Studie wurden iatrogen gesetzte osteochondrale Defekte mittels synthetisch hergestellten Scaffolds in Zylinderform aus Poly(D,L)Laktid-co-Glykolid (85:15 PLG) als Basismaterial versorgt. Die Evaluation des Heilungsverlaufs nach Implantation von PLGA-Scaffolds und die Analyse des Einflusses der unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften der verwendeten Scaffolds war das Ziel dieser Studie. Die kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus und der angewandten Methoden zur Auswertung der Ergebnisse dieser Studie stellt die Grundlage für die folgende Diskussion der Ergebnisse dar. Die Eruierung möglicher Fehlerquellen und der qualitative Vergleich der Auswertungsmethoden im Vorfeld ermöglichen eine anschließende fundierte Interpretation der Ergebnisse.

5.1.1 Tiermodell

Die Entwicklung von chirurgischen Therapiemethoden zur Behandlung chondraler und osteochondraler Defekte setzt deren Etablierung im angemessenen Tiermodell voraus. Die tierexperimentellen Modellversuche müssen eine möglichst kliniknahe Reproduzierbarkeit und spezifische Aspekte der klinischen Situation erfüllen. Zu den wichtigsten Kritikpunkten zählen die Defektlokalisation und die Defektgröße, die biologischen und mechanischen Gewebeeigenschaften, die anatomischen Strukturen, das Tieralter und die Tierspezies.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Tierspezies wurde in tierexperimentellen Versuchsreihen für die Untersuchung osteochondraler Defektheilung gewählt. In der Literatur werden unter anderem experimentelle Studien zur Knorpelheilung am Kaninchen (Mommsen, Meenen et al. 1984; Hunziker und Rosenberg 1996; Frenkel, Toolan et al. 1997; Jansson, Muller et al. 2000) sowie am Hund (Frankenburg, Goldstein et al. 1998), Schwein (Jiang, Chiang et al. 2007), Ziege (Niederauer, Slivka et al. 2000) und Schaf (Bruns, Kersten et al. 1992; Burger, Kabir et al. 2006; Jones, Willers et al. 2007) beschrieben. Im Gegensatz zur extremen Extensionshaltung des Kniegelenkes des Kaninchens zeigt das Schaf eine dem humanen Kniegelenk ähnliche Belastungssituation (Bruns, Kersten et al. 1992).

Das Tieralter ist in experimentellen Studien zur Knorpelheilung von besonderer Bedeutung, da, in Analogie zur humanen Situation, nachgewiesen wurde, dass ausgewachsene Tiere eine insuffiziente Kapazität der Geweberegeneration aufweisen (Wei, Gao et al. 1997). In dieser Studie zeigten die spontan regenerierten osteochondralen Defekte jüngerer Tiere einen qualitativ höheren Anteil an hyalin-ähnlichem Knorpelgewebe im Defektbereich, während bei ausgewachsenen Tieren der Faserknorpel geringerer biomechanischer Qualität dominierte. Diese verminderte metabolische

Kapazität ist in der Abnahme an proliferativen Zellen, der Matrixsynthese des Knorpelgewebes, den mesenchymalen Stammzellen und den einwirkenden Wachstumshormonen begründet. In Anlehnung an die vorherrschende klinische Problemsituation (siehe Einleitung) wurden in dieser Studie Tiere im Alter von drei Jahren gewählt, deren skeletalen Strukturen des Bewegungsapparats als ausdifferenziert gelten.

Das ovine Kniegelenk bietet einen optimalen chirurgischen anteromedialen Zugang zu den Gelenkstrukturen und stellt somit ein ideales Modell für orthopädische Behandlungsoptionen des Gelenkknorpels aus anatomischer Sicht dar (Allen, Houlton et al. 1998; von Rechenberg, Akens et al. 2003). Die größte Limitation der experimentellen Studien zur Gelenkknorpelheilung stellt das Knorpelgewebe der unterschiedlichen Tierspezies dar. Während der Gewebeaufbau dem humanen Knorpel gleicht, zeigen die Gewebedimensionen eine große Variabilität (Hunziker 1999). Die Knorpeldicke im humanen Kniegelenk beträgt im Bereich der medialen Femorkondyle 2 bis 3 mm. Im vergleichbaren Bereich beträgt die Knorpeldicke beim Kaninchen nur 400 µm. Diese dünne Knorpelschicht führt zu einer Einschränkung der technischen Durchführung chirurgischer Eingriffe und der Auswertungsmethoden. Größere Tiere wie das Schaf und die Ziege zeigen im Verhältnis zum Menschen eine geringere Knorpeldicke von 0,8 bis 1,2 mm. Die Zunahme der Schichtdicke der subchondralen Knochenlamelle bei größeren Tieren führt ebenfalls zu unterschiedlichen Gewebedimensionen und differenten mechanischen Eigenschaften (Hunziker 2002). Die Chondrozytengröße der Kaninchen zeigt keine signifikanten Größenunterschiede zum humanen Knorpelgewebe. Allerdings ist die Zelldichte im humanen hyalinen Knorpel um 10% geringer, jedoch zeigen diese Chondrozyten eine deutlich höhere metabolische Aktivität. Diese Daten verdeutlichen, dass die quantitative strukturelle Gewebezusammensetzung, der Gewebemetabolismus und die nutritiven Modalitäten fundamentale Unterschiede aufweisen (Hunziker 1999). Daraus folgt, dass quantitative Analysen nicht in Beziehung zum humanen Knorpelgewebe gesetzt werden können. Somit beschränken sich die Ergebnisse im Kaninchenmodell nur auf den Nachweis eines grundsätzlichen Funktionsprinzips (Jansson, Muller et al. 2000). Die bereits erwähnten unterschiedlich vorherrschenden Gewebedimensionen des Gelenkknorpels und der sich anschließenden subchondralen Knochenlamelle im ovinen und humanen Kniegelenk beinhalten differente Rahmenbedingungen für die Heilung osteochondraler Defekte äquivalenter Tiefe. Durch die geringere Knorpeldicke und die stärkere Ausbildung der subchondralen Knochenlamelle im Kniegelenk des Schafes ist von einer höheren mechanischen Stabilität im Defektbereich als in vergleichbaren Situationen im humanen Kniegelenk auszugehen (Hunziker 1999) (siehe Abb. 5-1).

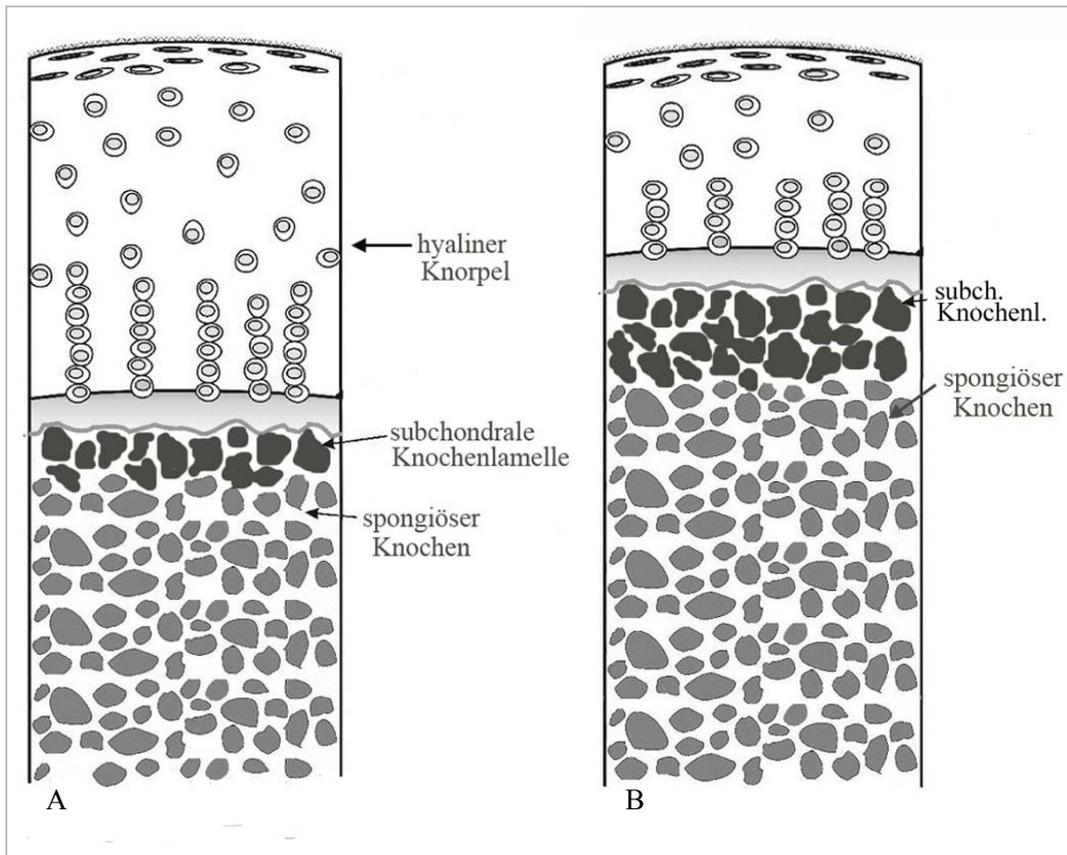


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der quantitativen Gewebedimensionen der humanen (A) und ovinen (B) osteochondralen Region. Die geringere Knorpeldicke und die stärker ausgeprägte subchondrale Knochenlamelle beim Schaf verursachen eine höhere Defektstabilität; modifiziert und übernommen aus Thimoty M et al (2006)

Ein weiterer limitierender Faktor ist die Größe des gesetzten osteochondralen Defekts. Bei Überschreitung der kritischen Defektgröße ist keine spontane Reparatur möglich. In einer Studie zu spontanen Knorpelheilung an Ziegen wurde bei einem Defektdurchmesser von 6 mm und einer äquivalenten Defekttiefe keine komplette Spontanheilung beobachtet (Jackson, Lalor et al. 2001). Bei Überschreitung der kritischen Defektgröße ist die Defektfüllung mit Reparaturgewebe insuffizient. Weiterhin ist eine Progression zur Defektausbreitung durch degenerativen Gewebeverlust des Knorpels und des subchondralen Knochens im Defektrandbereich zu beobachten. In Anlehnung an die klinische Situation wurde in dieser Studie ein Defekt über die kritische Größe hinaus im lasttragenden Bereich der Femurkondyle gesetzt.

Zusammenfassend stellt das Schaf für tierexperimentelle Studien im Bereich der chirurgischen Versorgung von chondralen Defekten ein akzeptables Modell dar. Die skeletalen Größenverhältnisse ermöglichen im Gegensatz zum Kaninchenmodell den Einsatz von in der Humanmedizin gebräuchlichen Instrumentarien und die Verwendung handelsüblicher synthetischer Implantate. Dennoch werden zwischen den experimentellen Versuchen im Tiermodell und der klinischen Anwendung weiterhin Differenzen bestehen bleiben. Diese sind nach Etablierung im Tiermodell bei der Übertragung der Methoden auf die humane Kliniksituation kritisch mit einzubeziehen.

Bei einer Gruppengröße von sechs Tieren konnte nicht von einer Gaußsche Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden, somit beschränkte sich die statistische Auswertung der erhaltenen Daten auf nichtparametrische Tests. Der Hauptanteil der Auswertungen war aufgrund der geringen Fallzahl von deskriptivem Charakter.

5.1.2 Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum

Der anteromediale parapatellare Zugang ließ eine optimale Darstellung der Gelenkstrukturen des Kniegelenkes zu. Die partielle Längsdurchtrennung der Ansatzsehne des M. quadriceps femoris, welche beim Wiederkäuer das laterale gerade Kniescheibenband darstellt, machte die anschließende Adaption mittels Einzelheften nötig. Eine weitere anatomische Besonderheit des ovinen Kniegelenkes ist die intraartikulär verlaufende gemeinsame Ursprungssehne des M. extensor digitalis longus und des M. fibularis tertius, welche in der Fossa extensoria des Os femoris ihren Ursprung nimmt (Allen, Houlton et al. 1998). Diese Gelenkstruktur erschwerte z. T. die optimale Darstellung der lateralen Femorkondyle.

Die Verwendung einer Hohlfräse mit Millimeterskalierung gewährleistete eine genaue Einstellung der Defekttiefe auf 10 mm. Die kontinuierliche Wasserkühlung während des Bohrvorgangs diente der Prävention von thermischen Gewebeerstörungen im angrenzenden Knorpel- und Knochengewebe. Die dennoch bestehende Invasivität des Bohrvorgangs lässt anschließende Gewebereaktionen und Degenerationsvorgänge im umliegenden Knorpelgewebe nicht vollständig ausschließen (Goldberg und Caplan 1999; D'Lima, Hashimoto et al. 2001; Redman, Dowthwaite et al. 2004), während die Einblutung aus dem Markraum des Knochengewebes als eine gewünschte Reaktion und Grundvoraussetzung dieser Therapiemethode anzusehen ist (Furukawa, Eyre et al. 1980; Goldberg und Caplan 1999).

Die verwendeten PGLA-Scaffolds hatten einen größeren Durchmesser als der zu füllende Defekt. Dies ermöglichte die feste Impaktierung der Scaffolds anhand der press-fit-Methode im osteochondralen Bohrkanal und verhinderte Implantatsablösungen während des Heilungsverlaufs (Duchow, Hess et al. 2000). Den einwirkenden mechanischen Kräften beim Einbringen der Implantate in den Bohrkanal hielten die Scaffold-Zylinder stand.

Mit der unterschiedlichen Steifigkeit der PLGA-Scaffolds war eine differente Porengröße verbunden. Die Scaffolds geringerer Steifigkeit zeigten bereits bei makroskopischer Betrachtung einen größeren Porendurchmesser als die Scaffolds höherer Steifigkeit.

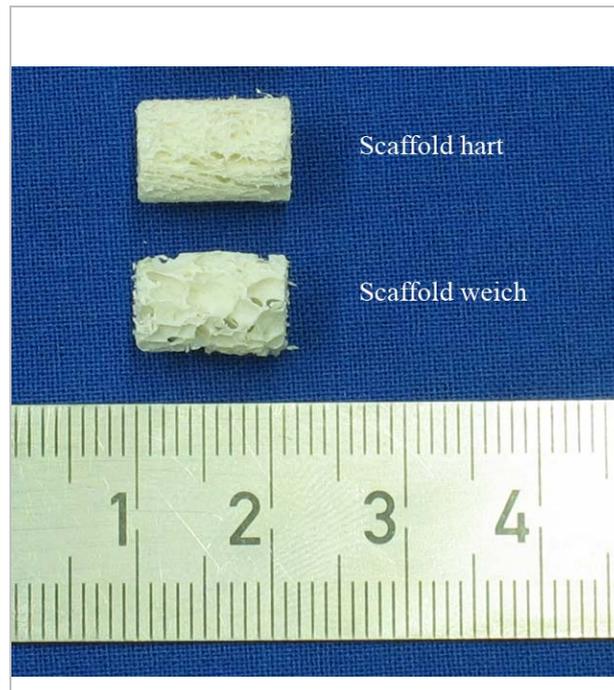


Abbildung 5-2: Makroskopisch erkennbare differente Porengröße der Scaffolds unterschiedlicher Steifigkeit

Wie bereits in Abschnitt 2.3.4 erwähnt, stellt die Porengröße der Scaffolds ein Designkriterium dar und nimmt Einfluss auf die Infiltration des Implantats, den dreidimensionalen Matrixaufbau und die Osteogenese im Defektareal (Karageorgiou und Kaplan 2005). Der Einfluss der biomechanischen Eigenschaften des Implantatmaterials stand in dieser Studie im Vordergrund, jedoch ist die differente Porengröße in die Diskussion der Ergebnisse mit einzubeziehen.

In den linken Kniegelenken wurden je zwei Defekte gesetzt, ein mit PGLA-Scaffold versorgter Defekt und ein ungefüllter Defekt. Da es sich um zwei Eingriffe in einem Kniegelenk handelt, kann eine wechselseitige Beeinflussung der Defekte nicht ausgeschlossen werden. Um eine eventuelle differente Belastungs- und Heilungssituation zwischen den Femurkondylen vorzubeugen, wurden die jeweiligen Defekte randomisiert abwechselnd in der lateralen, bzw. medialen Kondyle gesetzt.

Die gewählten Standzeiten von drei und sechs Monaten post op gewährleisteten die Beurteilung im frühen und späten Stadium der osteochondralen Defektheilung. Spezifische Aussagen über die Knorpelqualität des Regeneratgewebes (hyalines, hyalinartiges oder fibröses Knorpelgewebe) ließen sich erst zum späteren Zeitpunkt eruieren, da die Defektauffüllung nach drei Monaten Standzeit nicht vollständig abgeschlossen war. Endgültige Aussagen zur Knorpelqualität bleiben Langzeitstudien mit Standzeiten von einem Jahr und länger vorbehalten. Die Überprüfung von degenerativen Prozessen und Versagensmustern des neu gebildeten Knorpelgewebes in Langzeitstudien sind als Ergänzung zu dieser Studie anzustreben. In dieser Studie wurde beobachtet, dass die Biodegradation der Scaffoldmaterialien nach sechs Monaten nicht vollständig abgeschlossen war. Auch dieses Kriterium spricht für Studien mit längeren postoperativen Standzeiten, da erst nach vollständiger Biodegradation der synthetischen Bestandteile die spongiösen Knochenstrukturen und eventuelle Zystenbildungen in vollem Maße beurteilt werden können (siehe 5.2 Diskussion der Ergebnisse).

5.1.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Die Gewinnung der Knorpelknochenpräparate begann mit dem Sägen der Kondylen und verlangte die sagittale Schnittführung zum Bohrkanal in der Defektmittelpunkt. Zur Beurteilung kamen somit das Defektareal, das jeweils lateral angrenzende Knorpelknorpelgewebe und das basal des Defekts befindliche Knochengewebe im Anschnitt. Die unmittelbar postoperativ gefertigten Röntgenaufnahmen leisteten Hilfestellung bei der Orientierung der von außen nicht ersichtlichen Bohrausrichtung. Durch die manuelle Einstellung der Sägerichtung und die im Röntgenbild nicht eindeutig bestimmbare dreidimensionale Defektausrichtung war nicht in jedem Fall die exakte sagittale Schnittführung in der Mitte der Defektareale gegeben.

Die Fixation- und Entkalkungsprozesse führten zum partiellen Herauslösen der Scaffoldreste aus dem Knochengewebe, dies erklärt den quantitativ höheren Anteil der Scaffoldreste bei der makroskopischen Beurteilung nach Explantation im Vergleich zu den histomorphometrisch gewonnenen Daten. Der hohe Knochenanteil der Präparate verursachte eine gewisse Gewebeporosität, die das Schneiden der Paraplastblöcke am Rotations-Mikrotom erschwerte. Teilweise mussten Entwässerungs- und Entkalkungsprozesse der Präparate wiederholt werden. Da diese Prozesse physikochemischer Natur sind, die auf die Zell- und Gewebestruktur einwirken, können zusätzliche strukturelle Veränderungen dieser Präparate nicht ausgeschlossen werden.

5.1.4 Histologie

Die Safranin Orange-Färbung stellt Knochen und Knorpelgewebe kontrastreich in Rottönen dar. Diese histologische Färbung wird standardmäßig in der Knorpelhistologie für quantitative Aussagen über den Proteoglykangehalt eingesetzt (Niederauer, Slivka et al. 2000; Jiang, Chiang et al. 2007; Moriya, Wada et al. 2007). Die Färbelösung dringt gut in das Gewebe ein und bindet stöchiometrisch an die sauren Gruppen, so dass eine quantitative Abschätzung des Proteoglykangehalts möglich wird (Rosenberg 1971; Frenkel, Kubiak et al. 2006). Der Proteoglykangehalt dient als Hinweis auf die qualitativen Eigenschaften des gebildeten Knorpelgewebes. Diese wesentlichen Bestandteile der EZM des hyalinen Knorpelgewebes werden von den Chondrozyten sezerniert und geben somit verlässlichen Aufschluss über die Vitalität dieser Zellen (Buckwalter und Mankin 1998), (Buckwalter, Ehrlich et al. 1987). Die Beurteilung der Farbtintensität erfolgte durch subjektive Betrachtung der histologischen Präparate und stellte somit eine deskriptive Form der Auswertung dar.

Als nachteilig erwies sich diese Färbung zur Beurteilung spezifischer Merkmale des hyalinen Knorpelgewebes. Die Darstellung des Faserverlaufs der EZM, der Tidemark und der Zellmorphologie war durch die kontrastarme Rotfärbung dieser Strukturen nur eingeschränkt möglich.

5.1.5 Immunhistologie

In dieser Studie wurden etablierte immunhistochemischen Färbeverfahren anhand des ABC-Systems durchgeführt. Der spezifische Nachweis von Kollagen-I diente der Darstellung von Knochengewebe und ermöglichte Aussagen über die qualitative und quantitative Gewebeauffüllung im Defektareal. Weiterhin wurde Kollagen-II mittels Antigen-Antikörper-Reaktion dargestellt. Die Kollagen-II-Fasern stellen einen wesentlichen Anteil der EZM des hyalinen Gelenkknorpels dar und werden von den Chondrozyten synthetisiert, somit erlaubt der Nachweis eine qualitative und quantitative Beurteilung des gebildeten Knorpelgewebes (Jansson, Muller et al. 2000; Jiang, Chiang et al. 2007; Nagura, Fujioka et al. 2007).

Das verwendete ABC-System stellte die Antikörper in den Knorpelknochenpräparaten hochspezifisch farblich dar. Die bovinen Antikörper zeigten eine optimale Kreuzreaktivität zu den Antigenen der ovinen Präparate. Die Spezifität dieser Färbungen wurde durch mitgeführte Negativkontrollen bewiesen.

Die immunhistochemische Gefäßdarstellung wurde unter Verwendung von monoklonalem Anti α smooth muscle actin durchgeführt. In dieser Färbung wird die Tunica media der Gefäße, bestehend aus radiär angeordneter glatter Muskulatur, farblich dargestellt. Kapilläre Gefäße, deren luminale Auskleidungen nur aus Endothelzellen bestehen und in der frühen Phase der Angiogenese entstehen, wurden nicht erfasst. Daher blieben diese kleinen Gefäße in der Auszählung unbeachtet und wurden nicht erfasst. Die Gefäßanzahl ist aus diesem Grunde geringer als die tatsächlich vorhandene. Dies beeinflusst jedoch nicht die Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse, da die Auszählung aller Präparate identisch war und somit keine Fehlerquelle darstellte. Um einen Vergleich der ermittelten Gefäßanzahl der einzelnen Präparate zu ermöglichen, wurde die Gefäßanzahl in Relation zum Bindegewebsanteil gesetzt. Da in dieser Studie keine selektiven histologischen Färbungen des Bindegewebes durchgeführt wurden, konnte der Bindegewebeanteil nicht direkt bestimmt werden. Der Bindegewebsanteil im Defektareal wurde anhand der histomorphometrischen Daten ermittelt und ergab sich aus der Defektgesamtfläche abzüglich der Leerfläche und den Scaffoldresten. Dieser ermittelte Bindegewebsanteil umfasste unspezifisch alle Gewebearten und zuzüglich die Leerflächen der Knochenlakunen im Defektareal. Der Quotient aus der berechneten Bindegewebsfläche und der Gefäßanzahl ergab die Gefäßdichte. Dieses Vorgehen sicherte den Bezug auf die unterschiedliche quantitative Defektauffüllung der einzelnen Präparate.

5.1.6 Histomorphometrie

Die quantitative Auswertung der immunhistochemisch dargestellten Gewebeanteile erfolgte semiautomatisch anhand einer computergestützten Bildanalyse. Ein Vorteil dieser Auswertung ist die einfache Bedienung und die vergleichbare Auswertung der erhaltenen quantitativen Daten. Fehlerquellen stellen jegliche subjektive Entscheidungspunkte dar. Zu diesen Punkten zählten das

Platzieren der ROI und die manuelle Korrektur nicht erfasster Flächenanteile. Die manuelle Platzierung der ROI war nicht in jedem Fall genau auf dem Defektareal gegeben, da die exakten Defektgrenzen insbesondere nach sechs Monaten Standzeit nicht mehr eindeutig erkennbar waren. Diese Fehlerquelle ist jedoch zu vernachlässigen, da die Abweichungen nur gering sind. Die Fläche der ROI war rechteckig im Gegensatz zu der konvexen Oberflächenkontur des Gelenkknorpels. Somit wurde ein höherer Leerflächenanteil über dem Defektareal gemessen, der jedoch bei allen Präparaten einen annähernd gleichen quantitativen Anteil betrug. Dies sicherte die Vergleichbarkeit der erhaltenden Daten und ermöglichte eine gute Beurteilung der unspezifischen Defektauffüllung. Die Kollagenmasken der Kollagen-I- und der Kollagen-II-Gewebe wurden automatisch anhand des spezifischen Farbtönen und der Farbintensität erstellt. Geringfügige inhomogene Farbintensitäten führten zu einer fehlerhaften Erfassung der Gewebeanteile und mussten durch eine manuelle Markierung der nicht erfassten Gewebeanteile korrigiert werden. In Analogie zur Auswertung der Gefäßdichte wurden die Gewebeanteile und die Leerfläche auf die Gesamtfläche der ROI bezogen, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen.

Die verbliebenen Scaffoldbestandteile der gefüllten Defekte wurden in Analogie zu den Gewebeanteilen automatisch erfasst. Die unspezifische Anfärbung dieser Bestandteile machte eine manuelle Korrektur nötig. Die Unterscheidung von Scaffoldresten und Fettgewebe war in der histomorphometrischen Auswertung nicht möglich. Bei mikroskopischer Kontrolle dieser Gegebenheiten wurde deutlich, dass insbesondere in den Gruppen der weichen Scaffolds im Defektgrund ein erhöhter Anteil an Fettgewebe zu beobachten war. Die hydrolytische und enzymatische Biodegradation ist von der Materialzusammensetzung und den damit verbundenen biomechanischen Eigenschaften abhängig (Moran, Pazzano et al. 2003; Larsen, Pietrzak et al. 2005). Diese Hydrolyse der Materialien führte zum Aufquellen der Restbestandteile und beinhaltete eine weitere Fehlerquelle der gemessenen Flächenanteile. Histomorphometrisch war das Bindegewebe und das Fettgewebe durch die unspezifische Anfärbung nicht von den Scaffoldresten zu unterscheiden, dies erklärt die widersprüchlich erhaltenen Daten. Der geringere Anteil an Scaffoldresten der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit) im Vergleich zu Gruppe 3 (Scaffold weich, 6 Monate Standzeit) ließ sich nach mikroskopischer Betrachtung nicht bestätigen. Zudem war eine unterschiedlich hohe Herauslösung der Scaffoldreste aus den Präparaten durch die Probenaufarbeitung zu vermuten. Die makroskopisch und mikroskopisch beobachteten Verhältnisse der Restbestandteile ließen sich nicht mit den Daten der Histomorphometrie vereinen (Abb. 5-2).

Diese Kritikpunkte bedeuten dass die histomorphometrischen Ergebnisse der verbliebenen Scaffoldreste vorsichtig interpretiert werden müssen. Daher ist die deskriptive Form der Auswertung anhand der makroskopischen und der histologischen Präparate vorzuziehen.

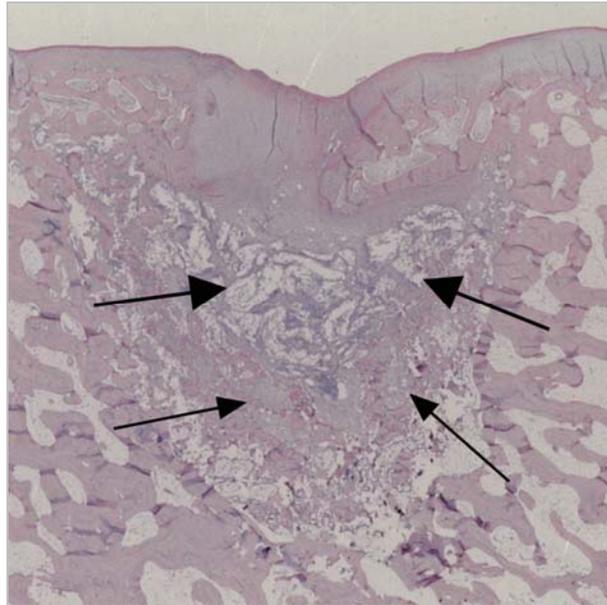


Abbildung 5-3: Immunhistologisches Präparat (Kollagen-I-Färbung) mit Leerflächen durch heraus gelöste Scaffoldreste (große Pfeile) und verbliebene unspezifisch angefärbte Restbestandteile (kleine Pfeile) im Defektgrund

5.1.7 Indirekte MR-Arthrographie

Zur Beurteilung des Heilungsverlaufs osteochondraler Defekte ist die indirekte MR-Arthrographie ein bereits etabliertes nichtinvasives Verfahren (Trattnig, Plank et al. 2004; Muller, Schrimpf et al. 2006). Die in dieser Studie verwendeten Sequenzen gelten als knorpelsensitiv und ermöglichten die Beurteilung des Knorpelgewebes und des darunter liegenden Defektbereichs.

Die sagittalen Sequenzen T1-2D-fs-GE und T1-3D.fs-GE ermöglichten eine detaillierte Beurteilung des Knorpelgewebes. Signalinhomogenitäten und strukturelle Befunde des Knorpelgewebes konnten detektiert werden. Die hyperintense Darstellung des subchondralen Defektbereichs erschwerte die Beurteilung der Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle. Die Signalintensität der gefüllten Defekte lag über der gemessenen Intensität der ungefüllten Defekte. Die erhaltenen Messdaten signalisierten eine verstärkte Ödembildung und hatten eine erhöhte Defektausbreitung der gefüllten Defekte in diesem Bereich zur Folge. Diese Beobachtungen korrelierten nicht mit den histologischen Ergebnissen. Daher stellte die erhöhte Signalintensität der gefüllten Defekte eine Fehlerquelle durch falschnegative Ergebnisse dar und ist in die Diskussion der Ergebnisse mit einzubeziehen.

Für die Beurteilung weiterer Gelenkstrukturen und des Gelenkkavums eignete sich die PD-fs-FSE-Sequenz. Trotz vorangegangener chirurgischer Interventionen wurden keine magnetischen Suszeptibilitätsartefakte, welche durch Metallrückstände der chirurgischen Instrumentarien

hervorgerufen werden können, beobachtet. Die Kontrastmittelgabe beinhaltete die gewünschte hyperintense Signalintensität des Knorpelgewebes und der reaktiven Veränderungen im darunter liegenden Knochengewebe.

5.1.8 Scoring der Defekte

Die Aussagekraft der histologischen Präparate und der MRT-Untersuchungsergebnisse ist durch die Verwendung von semiquantitativen Scores eindeutiger zu beurteilen. Die definierte Punktvergabe für entsprechende Kriterien des Regenerationsstatus und Gewebequalität sichert eine Auswertung der Bildmaterialien mit objektivem Charakter. Durch Verwendung dieser Beurteilungssysteme sind die Reproduzierbarkeit und der Vergleich von experimentellen und klinischen Studien erst möglich.

Histologie-Score

Der in dieser Studie angewandte Histologie-Score von Frenkel et al. wurde für die semiquantitative Beurteilung der Heilung versorgter osteochondraler Defekte entwickelt (Frenkel, Bradica et al. 2005). Der Heilungsstatus lässt sich durch die gewählten Kriterien im Detail darstellen. Die maximale Punktzahl beträgt 27 und ist der morphologischen Gewebequalität des physiologischen Knorpelknochengewebes gleichzusetzen. Zusätzlich zu der Struktur des gebildeten Knorpelgewebes werden degenerative Erscheinungen im angrenzenden Knorpelgewebe und die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle miteinbezogen. Die Safranin Orange-Färbung erlaubt, wie bereits beschrieben, eine Aussage über den Proteoglykangehalt des Knorpelgewebes. Die prozentuale Angabe der Farbintensität und der Farbhomogenität des Knorpelgewebes ermöglicht einen Rückschluss auf die Zusammensetzung der EZM und die Vitalität der Chondrozyten im gebildeten Knorpelgewebe. Die prozentuale Angabe von gebildetem Knorpelgewebe lässt die weitere qualitative Differenzierung in hyalines, hyalinartiges Knorpelgewebe und Faserknorpelgewebe vermissen.

Die Untersuchung im frühen Heilungsstadium nach drei Monaten Standzeit ergab eine ungenügende Defektauffüllung und Geweberegeneration. Diese Kriterien wurden durch den Score nach Frenkel et al. nicht abgedeckt und daher im eigens entwickelten Score berücksichtigt. Die allgemeine Beurteilung der Defektauffüllung berücksichtigte jedoch nicht die Qualität des Regeneratgewebes. Zusätzlich wurden Kriterien der basalen und lateralen knöchernen Integration des gebildeten Knochengewebes im Defektgrund als Grundvoraussetzung der Defektstabilität mit einbezogen. Die in dieser Studie verwendeten körperfremden synthetischen Implantatmaterialien können im Heilungsverlauf zu Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen führen und stellen unerwünschte reaktive Gewebeveränderungen dar (Hoffmann, Weller et al. 1997; Woodfield, Bezemer et al. 2002). Aus diesem Grund wurden Entzündungsmerkmale und Fremdkörperreaktionen in diesem Score ergänzt.

MRT-Score

Im Rahmen der Auswertung der gewonnenen MRT-Bildmaterialien wurde ein MRT-Score auf der Grundlage bereits bestehender Beurteilungssysteme entwickelt, der die Beurteilungskriterien osteochondraler Defektheilung beinhaltet (Peterfy, Guermazi et al. 2004; Kornaat, Ceulemans et al. 2005; Marlovits, Singer et al. 2006). Die geringe Knorpelschichtdicke erschwerte die detaillierte Evaluation von Strukturinhomogenitäten. Auf die erhöhte Signalintensität im basalen Defektbereich der gefüllten Defekte wurde bereits eingegangen. In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Defektgröße und der gemessenen Signalintensität bewiesen werden. Somit erscheint die Defektausbreitung durch die erhöhte Signalintensität der gefüllten Defekte von größerem Ausmaß als die der ungefüllten Defekte. Dies ist als Fehlerquelle zu deuten und muss in die Diskussion der Ergebnisse mit einbezogen werden. Weiterhin ließen sich durch die erhöhte Signalintensität nicht in jedem histologisch belegtem Fall die vorhandenen subchondralen Knochenzysten eindeutig diagnostizieren.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Evaluation des Heilungsverlaufs osteochondraler Defekte im ovinen Tiermodell nach Versorgung mit PGLA-Scaffolds. Durch Verwendung von Scaffolds unterschiedlicher Steifigkeit stand der Einfluss der biomechanischen Eigenschaften der verwendeten Implantate auf die Geweberegeneration im Vordergrund. Damit vergesellschaftet war die Beurteilung der Osteoinduktivität der verwendeten Scaffolds und somit der Beitrag zur ossären Geweberegeneration, sowie die Beurteilung der Wiederherstellung der chondralen Gelenkoberfläche in qualitativer und quantitativer Hinsicht. Weitere Kriterien stellten die Biokompatibilität und die Biodegradation der implantierten PGLA-Scaffolds dar. Die zusätzliche Darstellung des Heilungsverlaufs anhand der indirekten MR-Arthrographie nach sechs Monaten Standzeit diente der Überprüfung der Sensitivität dieses Verfahrens. Durch den Vergleich mit den histologischen Ergebnissen sollte die klinische Aussagekraft dieses nichtinvasiven Diagnostikums zur Beurteilung chirurgisch versorgter osteochondraler Defekte dargestellt werden. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung dieser Schwerpunkte diskutiert.

5.2.1 Defektversorgung: Scaffold weich versus Scaffold hart nach 3 Monaten Standzeit

Einfluss der Biomechanik

Der von Pauwels 1960 postulierte Grundgedanke der „kausalen Histogenese“ wurde von Carter et al. weiterverfolgt (Pauwels 1960). Diese Hypothese besagt, dass die auf die undifferenzierten Zellen einwirkenden mechanischen Stimuli die Gewebedifferenzierung beeinflussen. Die physikalischen Faktoren, wie Druck, Scherkräfte und andere Krafteinwirkungen, bewirkten die gerichtete Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Carter, Blenman et al. 1988). Die definierten

mechanischen Grundvoraussetzungen der Gewebedifferenzierung wurden in neueren tierexperimentellen Studien von Aspenberg und Tagli bestätigt (Aspenberg, Tagli et al. 1996). Diese Beobachtungen beinhalten, dass die mechanischen Eigenschaften der implantierten Scaffolds eine Schlüsselrolle für den Heilungserfolg osteochondraler Defekte darstellen (Kelly und Prendergast 2006).

Die Verwendung von Scaffolds unterschiedlicher Steifigkeit von 55% und 87% zum originären Knochengewebe in der vorliegenden Studie führte bereits nach drei Monaten Standzeit zu unterschiedlichen Heilungsergebnissen der osteochondralen Defektauffüllung. Der Auffüllungsgrad der Gruppe 1 (Scaffold weich) erreichte in keinem Fall das Gelenkflächenniveau, während drei Defekte der Gruppe 2 (Scaffold hart) bis zum Gelenkflächenniveau eine Gewebeauffüllung zeigten. Diese Präparate wiesen zusätzlich eine geschlossene Knorpelschicht über dem Defektareal vor. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass die höhere mechanische Stabilität der Geweberegeneration im Defektareal im frühen Heilungsstadium förderlich ist. In der Literatur wird bereits bestätigt, dass die Steifigkeit der implantierten Scaffolds zur Versorgung osteochondraler Defekte die Regenerationsfähigkeit des Knochen- und Knorpelgewebes beeinflusst. Der Einfluss der Defektstabilität wurde von Niederauer et al. untersucht (Niederauer, Slivka et al. 2000). In dieser Studie zeigten die Heilungsergebnisse osteochondraler Defekte, dass die Versorgung mit Scaffolds höherer Steifigkeit eine qualitativ und quantitativ hochwertigere Geweberegeneration induziert. Die quantitative und qualitative Geweberegeneration dieser Studie wird im Weiteren näher dargestellt und diskutiert.

Quantität und Qualität der ossären Geweberegeneration

In der vorliegenden Studie wurde ein höherer Anteil an hypervaskulärem fibrösem Bindegewebe im Defektzentrum der Gruppe 1 (Scaffold weich) detektiert. Nur in den Defektrandgebieten zeigte sich die Bildung von Knorpel- und Knochengewebe. Im Unterschied dazu war eine fortgeschrittene Formierung von subchondralen Knochengewebe und darüber liegendem Knorpelgewebe in der Gruppe 2 (Scaffold hart) zu beobachten. Die Scaffoldmaterialien beider Gruppen waren in diesem oberen Drittel des Defektbereichs bereits degradiert. In früheren Arbeiten wurde in Analogie zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie beobachtet, dass die frühzeitige Formierung der subchondralen Knochenlamelle für die Regeneration von Knorpelgewebe essentiell ist (Shapiro, Koide et al. 1993; Hutmacher 2001; Frenkel, Bradica et al. 2005). Der hyaline Gelenkknorpel und die subchondrale Knochenlamelle bilden in der Gelenkanatomie eine funktionelle Einheit. Bei mechanischer Gelenkbelastung ist die Stabilität der subchondralen Lamelle von großer Bedeutung. Sie schützt den hyalinen Knorpel besonders bei exzessiven Kraftereinwirkungen, aufgrund des zapfenförmigen Übergangs werden die einwirkenden Scherkräfte als Kompressions- und Druckbelastungen auf die subchondrale Knochenlamelle übertragen (Ding, Dalstra et al. 1998; Imhof, Breitenseher et al. 1999). Die hohe Vaskularisation in der subchondralen Region (arterieller und venöser Plexus) verdeutlicht

den Anteil an der nutritiven Versorgung der basalen Knorpelschicht, diese Blutgefäße reichen bis in die kalzifizierte Knorpelschicht (Lyons, McClure et al. 2006).

Nach der bereits dargestellten Hypothese der kausalen Histogenese sind die mechanischen Rahmenbedingungen Grundvoraussetzung für die Differenzierung der Gewebe im Defektareal (Carter, Blenman et al. 1988). Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, dass die höhere Stabilität im knöchernen Bereich osteochondraler Defekte ein förderlicher Aspekt für die frühzeitige Bildung der subchondralen Knochenlamelle ist. Diese wiederum bildet die mechanischen und nutritiven Rahmenbedingungen für eine Chondrogenese an der Gelenkoberfläche im Defektareal. In der vorliegenden Arbeit wurden degradierbare Implantate mit unterschiedlicher Steifigkeit zum organären Knochengewebe verwendet. Die Scaffolds stellen eine temporäre „Knochenersatzschicht“ dar und werden zeitnah von einwachsendem Knochengewebe ersetzt. Wie in der vorliegenden Studie bestätigt, sollte der Elastizitätsmodul der verwendeten Implantate unter dem des spongiösen Knochens liegen, damit das Einwachsen von Knochengewebe induziert wird und dieses die mechanische Stabilität aufgrund seiner höheren Steifigkeit übernimmt (Jansson, Muller et al. 2000).

Die Instabilität der Scaffolds geringerer Steifigkeit verursacht sklerotische Umbauprozesse des Knochengewebes in der Defektperipherie und einen höheren Anteil an fibrösem Bindegewebe im Defektzentrum (von Rechenberg, Akens et al. 2003). Die histologischen Ergebnisse der Gruppe 1 (Scaffold weich) stehen in Analogie zu diesen wissenschaftlichen Erkenntnissen. Das an den Randgebieten einwachsende Knochengewebe war durch verdickte Trabekel mit ungeordneter Ausrichtung gekennzeichnet. Das sklerotisch veränderte Knochengewebe war von fibrösem Gewebe durchsetzt und zeigte Bereiche der enchondralen Ossifikation als Zeichen der bestehenden Remodierungsprozesse. Die verdickten Trabekelstrukturen des sklerotisch veränderten Knochengewebes spiegelten sich im höheren prozentualen Kollagen-I-Anteil der Gruppe 1 in der histomorphometrischen Auswertung der Präparate wider. Zugleich stellte sich diese defizitäre ossäre Regeneration in den Ergebnissen der histologischen semiquantitativen Auswertung mittels des eigens entwickelten Scores dar.

Quantität und Qualität der chondralen Geweberegeneration

Der hyaline Gelenkknorpel zeigt bei Verletzungen und degenerativen Erscheinungen keine Spontanheilung. Begründet ist dieses Reparatursdefizit in der Avaskularität des Gewebes, der Immobilität der Chondrozyten und deren verminderten Proliferationsmöglichkeiten (Meachim und Roberts 1971; Hunter 1995; Simon und Jackson 2006). Durch chirurgische Eröffnung des Knochenmarkraumes und der Schaffung osteochondraler Defekte kommt es zum Einbluten in das Defektareal und zur Rekrutierung mesenchymaler Stammzellpopulationen. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit über Chondroblastenstadien zu Chondrozyten zu differenzieren und durch anschließende Synthese der Matrixbestandteile hyalines Knorpelgewebe zu regenerieren. Die kapilläre Proliferation

in osteochondralen Defekten beginnt bereits nach zwei Tagen vom benachbarten Knochengewebe ausgehend.

Die Gefäßdichte der vorliegenden Studie nach drei Monaten Standzeit post op ergab in beiden Gruppen äquivalente Verhältnisse, jedoch zeigten die mit den Scaffold versorgten Defekte eine höhere Gefäßdichte als die unversorgten Leerdefekte. Dieser positive Effekt auf die Angiogenese im Defektareal durch die Versorgung osteochondraler Defekte mit Scaffoldimplantaten wurde bereits in der Literatur beschrieben. Die frühzeitige Angiogenese ist eine Grundvoraussetzung für die Osteogenese und die für die Chondrogenese essentielle Stammzellrekrutierung (Karageorgiou und Kaplan 2005).

Anschließend an die kapilläre Proliferation ist die Infiltration spindelförmiger mesenchymaler Stammzellen im fibrösen Defektgewebe vom basalen Defektzentrum aus in die Peripherie zu beobachten. Nach zwei Wochen lassen sich erste chondrogene Differenzierungsformen der Zellen evaluieren. Die Verwendung poröser Scaffoldimplantate dient in der ersten Heilungsphase der Stabilisierung des Fibringerinnsels und anschließend als Leitgerüst für den Aufbau von Knochengewebe und vaskulärer Strukturen (Hunziker und Rosenberg 1996; Lubiatuski, Kruczynski et al. 2006). Weiterhin wird die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und essentieller Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmarkslager durch die offenporige Struktur gesichert und somit die intrinsische Regenerationskapazität unterstützt (Woodfield, Bezemer et al. 2002; Frenkel und Di Cesare 2004). Hunziker und Rosenberg zeigten, dass zusätzlich zur Infiltration der Stammzellen aus dem Knochenmarkraum, potente mesenchymale Stammzellen aus der synovialen Membran rekrutiert werden (Hunziker und Rosenberg 1996). Die vorliegenden histologischen Ergebnisse zeigten Knorpelgewebe im oberen Defektzentrum, welches in die Defekttiefe reichte. Der hohe Anteil an Knorpelgewebe im oberen Defektbereich und die Proliferation dieses Gewebes von den Defektrandgebieten ausgehend lassen eine starke Rekrutierung chondrogen potenter Stammzellen aus dem synovialen Kompartiment vermuten. Die Lokalisation dieser chondralen Gewebeproliferation im oberen Defektzentrum beweist die Invasion chondrogen potenter Zellen aus dem synovialen Kompartiment in die Scaffoldimplantate im frühen Heilungsverlauf. Die Gruppe 1 (Scaffold weich) wies einen höheren Anteil fibrösen Bindegewebes im oberen Defektzentrum im Vergleich zur Gruppe 2 (Scaffold hart) auf. In welchem Maße die erhöhte Degradationskinetik (siehe Biodegradation) oder die geringere mechanische Stabilität dieser Implantate Einfluss auf die qualitative Gewebeproliferation in diesem Defektareal hatte, ist zu diesem Untersuchungszeitpunkt nicht evaluierbar. Zum einen verhindert eine frühzeitige Biodegradation des Implantatmaterials die Invasion chondrogen potenter Zellen in das Implantatkonstrukt, zum anderen ist eine insuffiziente mechanische Stabilität der adäquaten Gewebedifferenzierung hinderlich. Der höhere Anteil an Knorpelgewebe im Defektzentrum der Gruppe 2 hatte zusätzlich, zu der bereits diskutierten höheren mechanischen Stabilität, die Regeneration der subchondralen Knochenlamelle positiv beeinflusst. Das chondrale Gewebe im

Defektzentrum stellte die Grundlage der enchondralen Ossifikation dar und war somit ein förderlicher Aspekt der ossären Gewebeproliferation im oberen Defektareal.

Bei Betrachtung der histologischen Präparate waren in beiden Gruppen ausdifferenzierte Chondrozyten im Defektknorpelgewebe evaluierbar. Die Hyperzellularität und die diffuse Anordnung dieser Zellen ließen jedoch die morphologisch charakteristischen Merkmale des hyalinen Gelenknorpels vermissen. Vielmehr ist durch die Zellmorphologie und die Faseranordnung zu diesem Untersuchungszeitpunkt von einer Faserknorpelbildung auszugehen.

Die Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix durch diese Zellen wurde anhand der Safranin Orange-Färbung und der spezifischen Darstellung von Kollagen-II-Gewebe bestätigt. Die durchschnittlich höhere Defektdeckung mit Knorpelgewebe in der Gruppe 2 (Scaffold hart) erlaubt die Vermutung zweier unterschiedlicher Einflussfaktoren. Zum einen bietet das Implantat durch die höhere Steifigkeit positive mechanische Rahmenbedingungen für die Formierung der subchondralen Knochenlamelle. Diese frühzeitige Regeneration der subchondralen Knochenlamelle ist die bereits dargestellt Grundvoraussetzung für die chondrale Geweberegeneration an der Gelenkoberfläche. Die direkte knöcherne Durchbauung bewirkt weiterhin eine zeitige Infiltration mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmarkraum und der Rekrutierung aus dem synovialen Kompartiment. Zum anderen ist im Defektzentrum eine höhere Stabilität gegeben, welche die Differenzierung der Zellen nach der bereits dargestellten kausalen Histogenese positiv beeinflusst.

Die degenerativen Veränderungen in der Übergangsregion des Defektknorpelgewebes zum angrenzenden Knorpelgewebe beinhalteten verminderten Proteoglykangehalt, Fibrillationen und Clusterbildungen der Zellen. Zwischen den Vergleichsgruppen 1 (Scaffold weich) und 2 (Scaffold hart) ließen sich keine Unterschiede in der Intensität dieser degenerativen Gewebeveränderungen evaluieren. Daraus lässt sich schließen, dass die unterschiedliche mechanische Stabilität der Implantate keinen Einfluss auf die degenerativen Prozesse zu diesem Heilungszeitpunkt hatte. Die Integration des Defektgewebes zum nativen angrenzenden Knorpelgewebe ist als ein wesentlicher Schwachpunkt im osteochondralen Heilungsverlauf chirurgisch versorgter Defekte anzusehen. In experimentellen Studien wurde in den Randgebieten der osteochondralen Defekte ein vermehrter Zelltod festgestellt und als ein potentieller Hinweis der unzureichenden Gewebeintegration gedeutet. Die zellulären Reaktionen beinhalteten Zellnekrose im angrenzenden originären Knorpelgewebe und Zellapoptose vom Übergangsbereich aus, welches unterschiedlich weit in das Defektknorpelgewebe reicht (Tew, Kwan et al. 2000). Angrenzend zu dieser Zone mit vermehrtem Zelltod wird eine Zone mit zellulärer Proliferation und verändertem Matrixmetabolismus beschrieben (Mankin, Dorfman et al. 1971; Mankin 1982; Redman, Dowthwaite et al. 2004). Im weiteren zeitlichen Verlauf sind Fibrillationen im Übergangsbereich als Zeichen der insuffizienten internen Gewebestabilität und Vorreiter einer progressiven Degeneration des Ersatzgewebes vom Randbereich aus zu deuten (Wakitani, Goto et al. 1994). Die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten neben den vertikal verlaufenden Fissuren, azelluläre Bereiche, Zelluntergang in Form von so genannten

Geisterhöfen und proliferative Clusterformierungen. In unmittelbarer Umgebung der Fibrillationen dominierten die azellulären Gewebereiche kombiniert mit einem geringen Proteoglykangehalt der EZM. Der geringe Proteoglykangehalt in den Defektrandgebieten ist Folge der insuffizienten Matrixsynthese der Zellen. Die daraus resultierende geringere mechanische Stabilität führt zu den beobachteten Zusammenhangstrennungen der EZM. Angrenzend an diese zellarmen Bereiche wurden Chondrozytencluster mit hoher proliferativer Aktivität detektiert.

Die Ätiologie dieser degenerativen Gewebeveränderungen im Randbereich ist zusätzlich zu der insuffizienten Stabilität in der Invasivität des chirurgischen Eingriffs begründet (Tew, Kwan et al. 2000; Redman, Dowthwaite et al. 2004). Die Zellnekrose wird initial infolge der chirurgisch bedingten Gewebeverletzung ausgelöst, während die Apoptose durch die mechanisch gestörte Chondrozyten-Matrix-Interaktion initiiert wird (Frisch und Francis 1994). Diese mechanischen Defizite regen die Chondrozytenproliferation in benachbarten Geweberegionen an. Die verschiedenen Degenerationserscheinungen in den Präparaten der vorliegenden Studie lassen aufgrund dieser wissenschaftlichen Erkenntnisse auf Reaktionsmuster traumatischer Genese spekulieren.

Der Vergleich der histologischen Safranin Orange-Färbungen mit den immunhistologischen Darstellungen des Kollagen-II-Gewebes zeigte die geringe Aussagekraft der immunhistologischen Darstellung über die qualitative Zusammensetzung des gebildeten Knorpelgewebes. Die immunhistologische Darstellung des Kollagen-II-Gewebes diente nur zur allgemeinen unspezifischen Aussage über die Quantität des regenerierten Gewebes.

Biokompatibilität und Biodegradation

Die unterschiedliche Materialzusammensetzung der verwendeten Scaffolds verursacht nicht nur differente mechanische Eigenschaften, sondern beeinflusst zusätzlich die Degradationskinetik der Implantatbestandteile. Die schnellere Degradation der Scaffolds geringerer Steifigkeit ist auf den niedrigeren Gehalt an Polylaktiden zurückzuführen (Weiler, Hoffmann et al. 2000; Moran, Pazzano et al. 2003). Die optimale Degradationskinetik bewirkt ein Gleichgewicht zwischen dem Implantatabbau und dem Einwachsen von Knochengewebe. Eine schnelle Degradation führt zur Kumulation von toxischen Abbauprodukten und damit verbundenen zellulären Degenerationserscheinungen im Implantatslager (Hoffmann, Weller et al. 1997). Die Degradation der Scaffoldmaterialien der Gruppe 1 (Scaffold weich) verlief schneller als in der Vergleichsgruppe. Diese erhöhte Degradationskinetik führte nicht zu erkennbaren zytotoxischen Reaktionen, aber liefert eine weitere Erklärung für die minderwertige Defektauffüllung mit fibrösem Bindegewebe im oberen Defektbereich und mit Fettgewebe im basalen Implantationslager. Die frühzeitige Degradation der Implantate gefährdet die Osteoinduktion, bei der der Scaffold als Leitgerüst für das einwachsende Knochengewebe dienen sollte.

Das unterschiedliche Scaffolddesign sollte an dieser Stelle ebenfalls diskutiert werden. Bereits bei makroskopischer Betrachtung lässt sich feststellen, dass die Scaffolds geringerer Steifigkeit eine

größere Porengröße und ein geringeren Materialanteil aufweisen (siehe Abb. 5-2). Dies ist als ein zusätzliches Kriterium der schnelleren Degradationkinetik zu erwähnen.

Die Degradation der synthetischen Bestandteile erfolgt durch passive Hydrolyse und endogen enzymatischen Abbau (Athanasίου, Niederauer et al. 1996). Die schnellere Degradation der Scaffoldbestandteile im oberen Defektbereich beider Gruppen ist durch den offenen Kontakt zum synovialen Gelenkraum und der dadurch vermehrten passiven Hydrolyse und dem schnelleren Abtransport der Spaltprodukte gegeben. Im Defektgrund war eine moderate zelluläre Reaktivität und die Phagozytoseaktivität von Fremdkörperriesenzellen ein Indiz für den langsam verlaufenden enzymatischen Abbau. Nach der Einteilung nach Pistner et al. ließen sich in den Defekten zeitgleich zwei Degradationsphasen beobachten (Pistner, Gutwald et al. 1993). Insbesondere im oberen Defektbereich der Gruppe 2 (Scaffold hart) dominierte die progressive Resorptionsphase, charakterisiert durch die fortgeschrittene Gewebeformierung, während im basalen Defektbereich die moderate zelluläre Reaktivität und das Einwandern von Makrophagen und polynukleären Fremdkörperriesenzellen auf die protrahierte Resorptionsphase hinwiesen.

5.2.2 Defektversorgung: Scaffold weich versus Scaffold hart nach 6 Monaten Standzeit

Einfluss der Biomechanik

Die Heilungsergebnisse nach sechs Monaten Standzeit wiesen einen qualitativen Unterschied der Defektauffüllung auf. Die unspezifische Gewebeauffüllung erreichte in beiden Gruppen das Gelenkniveau. In der Gruppe 3 (Scaffold weich) war kein vollständiger Zusammenschluss der subchondralen Knochenlamelle im Defektzentrum zu beobachten. In der Gruppe 4 (Scaffold hart) hingegen war die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle in fünf Fällen vollständig gegeben. Im Defektzentrum der Gruppe 3 stellte sich hypertrophes Knorpelgewebe dar, welches bis in die Defekttiefe reichte. Dies wurde in der histomorphometrische Gewebeauswertung anhand eines höheren Kollagen-II-Anteils bestätigt. Der Kollagen-I-Anteil hingegen war im Vergleich zu Gruppe 4 geringer und verdeutlichte das Defizit der knöchernen Defektauffüllung. Von den Defekträndern aus näherten sich die Fronten der enchondralen Ossifikation aufeinander zu. Der bereits nach drei Monaten beobachtete Einfluss der mechanischen Eigenschaften der Scaffolds wurde hier weiterhin bestätigt. Das anfangs gebildete fibröse Bindegewebe wurde durch Knorpelgewebe ersetzt und es folgte die sekundäre enchondrale Ossifikation.

Quantität und Qualität der ossären Geweberegeneration

Die sklerotischen Reaktionsmuster des bereits gebildeten Knochengewebes der Gruppe 3 ließen mechanische Instabilitäten im Defektbereich vermuten. Der knöchernen Gewebeaufbau der Gruppe 4 war im oberen Defektbereich bereits beendet. Es folgt in dieser Heilungsphase der strukturelle Umbau des trabekulären Knochengewebes. Vier der Präparate zeigten eine dem organischen Knochengewebe

ähnliche Trabekelstruktur im Defektbereich, sodass die Defektgrenzen im oberen knöchernen Defektbereich nicht mehr evaluierbar waren (Abb. 4-11 A). In dieser Wiederherstellungsphase findet nach Pistner et al. der integrative Aufbau von Knochengewebe statt (Pistner, Gutwald et al. 1993).

Wie bereits erläutert, beeinflusst zusätzlich die Degradationskinetik und die Architektur der implantierten Scaffolds die Osteogenese (Boyan, Lohmann et al. 1999; Woodfield, Bezemer et al. 2002; Moran, Pazzano et al. 2003; Karageorgiou und Kaplan 2005). Eine schnellere Degradation der Implantate birgt die Gefahr, dass durch den Abbau des als Leitgerüst fungierenden Scaffolds die adäquate Osteoinduktion verhindert wird. Wie in der Gruppe 3 findet daraufhin eine minderwertige Gewebeauffüllung statt und der Heilungsverlauf wird durch die sekundäre Osteogenese verzögert. Die unterschiedliche Architektur in Form einer differentiellen Porengröße der Scaffolds war in der vorliegenden Arbeit ein weiterer möglicher Einflussfaktor der unterschiedlichen Geweberegeneration (Hunziker 1999; Karageorgiou und Kaplan 2005; Jones, Arns et al. 2007; Jones, Willers et al. 2007; Nagura, Fujioka et al. 2007). In der Studie von Karageorgiou et al. ist eine insuffiziente Porengröße von $<100\ \mu\text{m}$ für die Bildung von unmineralisiertem fibrösem Gewebe verantwortlich. Eine geringere Porengröße verursacht durch die vorherrschenden hypoxischen Konditionen eine der Osteogenese vorausgehenden chondralen Gewebeformation. Nach dieser Studie wird eine Porengröße von $>300\ \mu\text{m}$ für eine optimale direkte ossäre Geweberegeneration empfohlen. Eine adäquate Porengröße ermöglicht die verstärkte Angiogenese und das diskontinuierliche Einwachsen des Knochengewebes in das Defektareal. Dies sind essentielle Kriterien für die direkte Osteogenese und sichern damit den zeitgerechten Heilungsverlauf (Karageorgiou und Kaplan 2005). Die Porengröße der Scaffolds höherer Steifigkeit betrug 300 bis $500\ \mu\text{m}$ und erfüllte somit die Designkriterien für eine adäquate Osteoinduktion. Ein signifikanter Unterschied der Gefäßdichte der Vergleichsgruppen dieser Studie war nicht zu verzeichnen, jedoch zeigte die Gruppe 4 eine direkte knöcherne Durchbauung der Scaffolds in der frühen Heilungsphase im histologischen Bild. Dies führte zu einer vollständigen Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle und dem spongiösen Knochengewebe im Defektbereich zum fortgeschrittenen Zeitpunkt nach sechs Monaten Standzeit. Die Porengröße der Scaffolds geringerer Steifigkeit variierte zwischen 1 Millimeter bis zu 2 Millimetern und mehr im Durchmesser. Demnach ist anzunehmen, dass die ossäre Geweberegeneration zusätzlich zu der Steifigkeit der verwendeten Scaffolds von der differentiellen Porengröße beeinflusst wurde. Der größere Porendurchmesser der Gruppen Scaffold weich lässt zusätzlich zur mechanischen Instabilität eine insuffiziente Osteoinduktion vermuten, da der Scaffold als Leitgerüst der Gewebeproliferation dienen sollte.

Quantität und Qualität der chondralen Geweberegeneration

Die vollständige Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle verursachte zusätzlich die verbesserte chondrale Geweberegeneration an den Gelenkflächen der Gruppe 4 (Scaffold hart) im Vergleich zu Gruppe 3 (Scaffold weich). Die Morphologie des regenerierten Knorpelgewebes in

Gruppe 3 wies qualitative und quantitative Defizite vor. Keines der sechs Tiere zeigte eine Wiederherstellung der kongruenten Gelenkfläche. Während in drei Fällen die Defektauffüllung nicht bis zum Gelenkflächenniveau reichte, waren bei den drei verbleibenden Tieren chondrale Hypertrophien im Defektbereich zu beobachten. Die inhomogene Matrixanfärbung verdeutlichte die minderwertige Gewebequalität des Regeneratgewebes in dieser Gruppe. Die Gruppe 4 verzeichnete bei vier Tieren eine vollständige Wiederherstellung der kongruenten Gelenkfläche.

In der histologischen Untersuchung konnten noch weitere morphologische Veränderungen des Defektknorpelgewebes evaluiert werden. Die zelluläre Anordnung, die Zellform der Chondrozyten und der Faserverlauf der EZM beinhalteten verstärkt in der Gruppe 4 Charakteristika des hyalinen Gelenknorpels. In der oberen Gewebeschicht waren einzelne abgeflachte Chondrozyten in der tangential verlaufenden Matrix eingebettet. Dieser Verlauf und die Zellanordnung änderten sich in der tieferen Region zur perpendikularen Ausrichtung. In diesem Bereich waren die Chondrozyten abgerundet und in Chondronen in die Matrix integriert. Histologisch konnte beobachtet werden, dass die gleichmäßige spezifische Anfärbung der Proteoglykane mit einer organisierten Kollagenarchitektur korrespondiert. Diese Gewebeorganisation war nicht in gesamten Defektknorpel durchgehend vorhanden, sondern wurde von Abschnitten höherer Unordnung durchsetzt. Der Faserverlauf war dort ungerichtet und die Faserstruktur der EZM beinhaltete grobe Strukturmerkmale und war mit unorganisiertem Kollagenfaserverlauf assoziiert. Der gebildete Knorpel der Gruppe 4 wies Merkmale des hyalinartigen Knorpelgewebes und Anteile von Faserknorpelgewebe auf. Im Vergleich dazu wies das zelluläre Bild der Gruppe 3 geringere Ordnung auf. Weiterhin zeigten der ungerichtete Faserverlauf und die groben Strukturmerkmale der EZM, dass es sich in dieser Gruppe vornehmlich um die Bildung von fibrösem Knorpelgewebe handelte. Das geringere Vorkommen degenerativer Erscheinungen des Defektknorpelgewebes zum angrenzenden gesunden Knorpelgewebe bewies in der Gruppe 4 eine hochwertigere Integration. In dieser Region zeigte die Gruppe 3 eine Hyperzellularität mit Chondrozytenclustern und Anzeichen von Zelldegeneration. Das Vorkommen von Chondrozytenclustern wird in der Studie von Wei et al. als ein Zeichen der Regeneration gedeutet (Wei, Gao et al. 1997). In anderen Studien hingegen werden Clusterformierungen als degenerative Erscheinungen und als morphologischer Vorreiter zellulären Untergangs gewertet (O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Mainil-Varlet, Aigner et al. 2003; Frenkel, Bradica et al. 2005). In dieser Studie wurden mikroskopisch vermehrte Anzeichen der mitotischen Aktivität und somit der Proliferation dieser Zellen beobachtet. Ob die Clusterbildung eine Reaktion auf degenerative Gewebeprozesse war oder durch den verzögerten Heilungsverlauf der Gruppe 3 „noch“ proliferativer Gewebeum- und aufbau stattfand ließ sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig feststellen. Ein Zeichen für die minderwertige Gewebestabilität im Übergangsbereich war das vermehrte Vorkommen von Fibrillationen in dieser Gruppe. Zudem war die verminderte Anfärbung der EZM durch die SO-Färbung in den Defektrandgebieten und im Defektzentrum ein weiterer Hinweis für die insuffiziente Matrixsynthese und lässt auf degenerative Zellreaktionen schließen.

Die höhere Ordnung des Defektknorpels und die positiven Merkmale der Integration der Gruppe 4 waren vermutlich aufgrund der frühzeitigen Bildung der subchondralen Knochenlamelle und der damit verbundenen mechanischen und physiologischen Grundvoraussetzungen gegeben. Der bereits nach drei Monaten verzeichnete verzögerte Heilungsverlauf der Gruppe 1 wurde durch eine geringere Gewebedifferenzierung der Gruppe 3 nach 6 Monaten Standzeit bestätigt.

Biokompatibilität und Biodegradation

Das Fortschreiten der Biodegradation der Scaffoldmaterialien im basalen Defektbereich war im Hinblick auf die längere Standzeit der Tiere verhalten. Durch die weiterhin bestehende Aktivität der Fremdkörperriesenzellen war im diesem Defektbereich die protrahierte Resorptionsphase vorherrschend. Während die Scaffoldreste der Gruppe 4 (Scaffold hart) eine hohe knöcherne Durchbauung aufwiesen, wurde in der Gruppe 3 (Scaffold weich) in diesem Bereich vermehrt Fett- und Bindegewebe histologisch detektiert. Das verdichtete Knochengewebe um diese Restbestandteile in dieser Gruppe bestätigte die bereits erwähnten negativen Materialeigenschaften für eine direkte Osteogenese und die insuffiziente Implantatintegration. Hutmacher et al. beschrieben bereits, dass die Degradationskinetik einen signifikanten Effekt auf die mechanische Stabilität im Defektareal ausübt und somit die zeitlichen Reparationsprozess beeinflusst (Hutmacher 2001). In der Gruppe 3 (Scaffold weich) war die Regeneration des ossären und chondralen Gewebes in der vorliegenden Studie zeitlich verzögert und zeigte histologisch eine geringere Gewebequalität.

Die verzögerte Degradation der Scaffoldbestandteile im basalen Defektbereich ist mit der Gefahr der Bildung subchondraler Knochenzysten verbunden (von Rechenberg, Akens et al. 2003). In beiden Gruppen war das Vorkommen von je einer vollständig bindegewebig ausgekleideten subchondralen Knochenzyste zu beobachten. Die Bildung von subchondralen Knochenzysten im Heilungsverlauf ist als ein bedeutender Schwachpunkt dieser Art der Defektversorgung anzusehen. In der Studie von Rechenberg konnte nachgewiesen werden, dass das fibröse Bindegewebe innerhalb der Knochenzysten selbst aktiv an der Synthese von Zytokinen, Mediatoren und Matrix degradierenden Enzymen teilnimmt und hauptverantwortlich für die schlechte Heilung ist. Die zusätzlich beobachtete Expansion der Knochenzysten im weiteren Verlauf lässt sich anhand dieser Beobachtungen erklären. Die Ätiologie subchondraler Knochenzysten ist in der Literatur vielfältig diskutiert (Carrino, Blum et al. 2006). Es werden primäre osteochondrale Läsionen, entzündliche Vorgänge infektiöser oder steriler Genese und eine durch vaskuläre Störungen im Knochengewebe bedingte Ischämie als Ursache genannt (von Rechenberg, Akens et al. 2003). In der vorliegenden Studie ist anzunehmen, dass die schnellere Bildung des Knochengewebes im oberen Defektbereich zu einer Isolierung der Scaffoldbestandteile vom synovialen Kompartiment führte. Die verzögerte enzymatische Biodegradation der Scaffoldbestandteile in der Defekttiefe ist einer sterilen Entzündungsreaktion gleichzusetzen und beinhaltet die Gefahr der Ausbildung subchondraler Zysten. Da die Degradation der Scaffoldbestandteile im Untersuchungszeitraum nicht abgeschlossen war, ist die Entstehung von

subchondralen Knochenzysten im weiteren Heilungsverlauf nicht auszuschließen. Die insuffiziente knöcherne Durchbauung und das verdickte umgebende Knochengewebe der Gruppe 3 lässt eine Prävalenz von zystoiden Veränderungen vermuten. Die Eruierung dieser Gegebenheiten ist jedoch Langzeitstudien vorbehalten.

Indirekte MR-Arthrographie

Der ossäre und chondrale Defektbereich wurde anhand der sagittalen Sequenzen T1-2D-fs-GE und T1-3D-fs-GE beurteilt. Diese werden in der Literatur als knorpelsensitive Sequenzen beschrieben (Peterfy, Majumdar et al. 1994). Zudem erlaubt die T1-3D-fs-GE Sequenz die Beurteilung der subchondralen Region durch die niedrige Signalintensität des fettunterdrückten Gewebes wie Hoffa-Fettkörper, subkutanen Fettgewebe und Fettmark (Peterfy, Majumdar et al. 1994).

Die beobachtete höhere Signalintensität der basalen Defektbereiche der gefüllten Defekte im Vergleich zu den ungefüllten Defekten lässt eine stärkere Vaskularisation und Knochenmarködembildung vermuten. Diese Bedingungen hätten eine höhere Kontrastmittelkonzentration in diesen Bereichen zur Folge. Die Ergebnisse der Gefäßauszählung wiesen jedoch keine signifikant erhöhte Gefäßdichte im Defektbereich der gefüllten Defekte auf. Dies lässt vermuten, dass die implantierten Scaffoldmaterialien oder deren Degradationsprozesse einen Einfluss auf die Signalintensität bei MRT-Auswertungen unter Kontrastmittelgabe ausüben. In einer Studie zur postoperativen radiologischen Kontrolle des Heilungsverlaufs nach Frakturversorgung mit Polylactid-Pins wurden Artefaktvorkommen in der MRT-Kontrolle beobachtet. Diese Artefakte erschwerten die Beurteilung der Implantatrestbestandteile und des Regenerationsgewebes anhand der MRT-Bildmaterialien (Prokop, Jubel et al. 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen dieses Artefaktvorkommen. Daher stellte die erhöhte Signalintensität der gefüllten Defekte eine Fehlerquelle durch falschnegative Ergebnisse dar. Die höhere Signalintensität suggeriert eine stärkere Ödembildung im Knochengewebe und eine Vergrößerung der Defektausbreitung, welche bei Betrachtung der histologischen Präparate nicht bestätigt wurden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte die Korrelation zwischen der Signalintensität und der Defektausbreitung nachgewiesen werden. Die hyperintense Darstellung des basalen Defektareals der gefüllten Defekte führte zu einer geringeren Punktzahl in der Scoreauswertung in den Scorekategorien Signalintensität der Defektregion, Defektbreite und Defekttiefe gegenüber den ungefüllten Defekten. Weiterhin ließ sich die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle durch die hyperintensiven Artefakte nicht eindeutig beurteilen. Die Beurteilung weiterer Veränderungen der subchondralen Region anhand der MRT-Bildmaterialien insbesondere in der Gruppe 4 (Scaffold hart) war durch die Artefaktbildung durch die verbliebenen Scaffoldreste erschwert. Eine hohe Signalintensität in diesem Bereich ließ die Unterscheidung zwischen subchondralem Knochenmarködem und subchondraler Knochenzyste bei vier Tieren nicht zu. Die Evaluation der Ausbildung subchondraler Knochenzysten war den histologischen Ergebnissen vorbehalten.

Die Beurteilung der Regeneration des Knorpelgewebes der gefüllten Defekte anhand der indirekten MR-Arthrographie hingegen erwies sich als sensitives diagnostisches Verfahren. Die inhomogene Gewebestruktur, die inkongruente Oberflächenstruktur des Knorpelgewebes und die defizitäre Defektauffüllung der Gruppe 3 (Scaffold weich) wurden in Analogie zu den histologischen Beobachtungen diagnostiziert. In der Gruppe 4 (Scaffold hart) wurden ebenfalls Strukturinhomogenitäten diagnostiziert, jedoch war die Wiederherstellung der Gelenkfläche bei 5 Tieren gegeben. Diese qualitativ hochwertigere Regeneration des Knorpelgewebes der Gruppe 4 spiegelte sich in der Scoreauswertung wider.

Die indirekte MR-Arthrographie nach Gd-DTPA-Kontrastmittelgabe vermittelt Informationen über die biochemische Zusammensetzung des regenerierten chondralen Gewebes. Diese Technik basiert auf der Kontrastmittelverteilung im Knorpelgewebe in umgekehrter Relation zur Glykosaminoglykanverteilung in diesem Gewebe und lässt somit Rückschlüsse auf die Qualität der EZM zu. Diese Methode wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Proteoglykankonzentration im Knorpel validiert (Bashir, Gray et al. 1999; Burstein, Bashir et al. 2000; Gillis, Gray et al. 2002). In der vorliegenden Studie stimmte die hyperintense Darstellung des Knorpelgewebes insbesondere in den Defektrandgebieten der Gruppe 3 mit der histologisch evaluierten verminderten Proteoglykankonzentration in diesen Bereichen überein.

Bei makroskopischer Betrachtung der synovialen Gelenkflüssigkeit nach Explantation wurden keine pathologischen Veränderungen eruiert. Die Auswertung der MRT-Bildmaterialien anhand der PD-fs-FSE-Sequenz hingegen ergab erhöhte Signalintensitäten der Gelenkflüssigkeit bei 11 Tieren. Die hyperintense Darstellung des synovialen Gelenkkavums ließ auf Gelenkeffusionen schließen. Derartige Gelenkeffusionen und moderate Knochenmarködem im Defektbereich sind physiologisch reaktive Prozesse nach osteochondralen chirurgischen Interventionen und während des Heilungsprozesses (Verstraete, Almqvist et al. 2004). Die Gelenkeffusionen zeichnen sich durch die hyperintense Darstellung der Gelenksrezessus aus. Eine Synovitis beinhaltet die massive Effusion des Gelenkes und eine hyperintens dargestellte verdickte Synovialmembran (Kornaat, Ceulemans et al. 2005). Die Magnetresonanztomographie stellt ein sensibles diagnostisches Verfahren für die Beurteilung des synovialen Kompartiments dar, während die makroskopische Untersuchung der Gelenkflüssigkeit keinen zuverlässigen Rückschluss auf die Qualität und Quantität erlaubt. Die Diagnostik der synovialen Veränderungen in den Ergebnissen dieser Arbeit ist unter Berücksichtigung der Kontrastmittelgabe verhalten zu beurteilen. Der arthrografische Effekt nach Applikation von Gd-DTPA-Kontrastmittel führt zur verstärkten hyperintens Darstellung der synovialen Strukturen (Vahlensieck, Sommer et al. 1998). Die Beurteilung der ligamentären Strukturen und der Menisken anhand der gewonnen Bildmaterialien war mittels der PD-fs-FSE-Sequenz möglich und zeigte nur bei einem Tier pathologische Merkmale in Form von einer Protrusion des medialen Meniskus.

5.2.3 Spontanheilung osteochondraler Defekte nach 3 Monaten Standzeit

Die Ergebnisse nach drei Monaten Standzeit der ungefüllten Defekte zeigten eine geringere Defektauffüllung als die der gefüllten Defekte beider Vergleichsgruppen. Die Gewebebildung im Defektareal wies fibrösen unspezifischen Bindegewebscharakter auf und beinhaltete im Defektzentrum einen unterschiedlich hohen Anteil an Knorpelgewebe. Die Variationsbreite der Defektauffüllung reichte von bindegewebig ausgekleideter ursprünglicher Defektgröße bei vier Tieren bis zur Auffüllung mit fibrösem Gewebe und unterschiedlichen Anteilen hypertrophen Knorpelgewebes bis auf das Niveau der subchondralen Region der verbleibenden acht Tiere.

In der tierexperimentellen Studie von Shapiro et al. wurde die Selbstheilungstendenz von osteochondral gesetzten Defekten untersucht (Shapiro, Koide et al. 1993). Nachdem die subchondrale Knochenlamelle chirurgisch eröffnet wurde, kam es zum Einbluten in das Defektareal und zur Formierung eines Fibringerinnsels. Dieses Netzwerk diente bereits nach drei Tagen als Leitgerüst für kapilläre Proliferation und der Invasion mesenchymaler Stammzellen. Fibröses Knorpelgewebe an der Defektoberfläche konnte nach 12 Tagen detektiert werden. Die Langzeitergebnisse diverser Studien zeigten die Bildung von Faserknorpelgewebe an der Gelenkoberfläche (Furukawa, Eyre et al. 1980; Mankin 1982; Nehler, Spector et al. 1999). Dieses minderwertige Ersatzgewebe unterscheidet sich in seiner mechanischen Belastbarkeit vom hyalinen Knorpelgewebe. Erste Fibrillationen und Zellnekrosen sind bereits nach sechs Monaten zu erkennen und werden von einer progressiv verlaufenden Degeneration gefolgt.

Weiterhin ergab die Untersuchung des Einflusses der Defektgröße auf den Heilungsverlauf osteochondraler Defekte, dass das Knorpel- und Knochengewebe unterschiedlich auf diese Einflussgröße reagiert. Überschreitet die Größe osteochondraler Defekte ein kritisches Maß, ist die Spontanheilung dieser Defekte insbesondere der Gelenkknorpelschicht nicht möglich. Das vorerst gebildete fibröse und ossäre Gewebe im Defektareal zeigt progressiven Untergang in Form von resorptiven und degenerativen Abbauvorgängen. Die verminderte Stabilität führt zum Kollaps von angrenzendem Knorpelgewebe und der subchondralen Knochenlamelle, woraus eine Vergrößerung des Defektdurchmessers resultiert. Die Überschreitung der kritischen Defektgröße wurde im Ziegenmodell bereits mit einem Defektdurchmesser von 6 mm dokumentiert (Jackson, Lalor et al. 2001). Die Versagemuster der vorliegenden Studie zeigten Analogien zu den beschriebenen Ergebnissen. So zeigten die histologischen Ergebnisse bei vier Defekten eine Defekttiefe, die dem gesetzten Defekt äquivalent war. Das Defektkavum war von einer dünnen bindegewebigen Schicht ausgekleidet und ließ keine proliferativen Gewebevorgänge erkennen. Die Vergrößerung des Defektdurchmessers durch Abbauprozesse, Degenerationen und Kollaps der angrenzenden Gelenkfläche wurde bei sechs Tieren beobachtet. Der verminderte Auffüllungsgrad und die geringe mechanische Stabilität des Ersatzgewebes führten zu sklerotischen Reaktionsmustern im umliegenden Knochengewebe. Diese Reaktionsmuster beinhalteten verdickte Trabekelstrukturen und ungeordnete

Ausrichtungen insbesondere in der oberen Hälfte des Defektrandgebietes und spiegelten sich im histomorphometrisch ermittelten erhöhten Kollagen-I-Anteil wider.

Die Differenzierung von Knorpelgewebe an der Gelenkoberfläche und Knochengewebe in der Defekttiefe verlangt eine vorige unspezifische Gewebeauffüllung im Defektareal (Hunziker und Rosenberg 1996). Die undifferenzierten Stammzellen werden aus dem Knochenmark, dem angrenzenden Knorpelgewebe und aus dem synovialen Kompartiment rekrutiert (Buckwalter 1998), (Hunziker 2002). Unter der Einwirkung von Wachstumsfaktoren und mechanischen Stimuli differenzieren sich diese Zellen über Chondroblastenstadien zu gewebespezifischen Chondrozyten (Messner 1999). Die Osteogenese setzt die unspezifische Auffüllung des Defektareals voraus um den osteokonduktiven Effekt eines Leitgerüsts und die essentielle Angiogenese zu ermöglichen (Weiland, Moore et al. 1983). In der vorliegenden Studie lag die Gefäßdichte der ungefüllten Defekte unter den ermittelten Werten der gefüllten Defekte. Die Auffüllung der Defekte mit degradierbaren Implantaten unterstützt somit die Angiogenese und die Gewebeauffüllung des Defektbereichs.

5.2.4 Spontanheilung osteochondraler Defekte nach 6 Monaten Standzeit

Der Auffüllungsgrad der ungefüllten Defekte nach sechs Monaten Standzeit erreichte annähernd das Gelenkniveau. Jedoch war keine kongruente Wiederherstellung der Gelenkfläche anhand der histologischen Präparate und der MRT-Bildmaterialien zu verzeichnen. Dieses Bild der eingeschränkten Selbstheilungstendenz osteochondraler Defekte wurde bereits in einer Vielzahl von Studien dargestellt (Wakitani, Imoto et al. 1997; van Dyk, DeJardin et al. 1998; Jackson, Lalor et al. 2001). Im Verlauf der Regeneration nimmt der fibröse Bindegewebsanteil ab und es kommt zur vermehrten Differenzierung von Knochen- und Knorpelgewebe. Der ossäre Gewebeaufbau findet von den Defektseiten aus statt und zieht in das Defektzentrum, während die ossäre Regeneration in der Defektbasis zeitlich verzögert ist (Hunziker und Rosenberg 1996; Hunziker 1999). Die Bildung des Knorpelgewebes orientiert sich an der rekonstruierten subchondralen Knochenlamelle und zeigte ebenfalls eine gerichtete Bildung von den Defekträndern aus in die Defektmitte (Bruns, Kersten et al. 1992). In Analogie zu den Studien von Shapiro et al. und Wei et al. war die Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle unvollständig (Shapiro, Koide et al. 1993; Wei und Messner 1999). Diese unzureichende Regeneration der subchondralen Knochenlamelle und die damit verbundenen Strukturinhomogenitäten des gebildeten Knorpelgewebes bewiesen einen defizitären Heilungsverlauf im Vergleich zu den gefüllten Defekten. Die verdichtete Trabekelstruktur des angrenzenden subchondralen Knochengewebes ist als ein Hinweis auf die verstärkte mechanische Belastung dieser Region zu deuten. Diese sklerotischen Veränderungen entwickeln sich infolge der insuffizienten mechanischen Stabilität im Defektareal.

Das gebildete Knorpelgewebe an der Gelenkoberfläche zeigte zu den Strukturinhomogenitäten im Defektrandgebiet strukturelle Defizite in der Defektmitte. Die inkongruente Gelenkfläche ergab sich

aus der unzureichenden Geweberegeneration in diesem Bereich. Daraus resultierten in die Tiefe reichende Einkerbungen, während es bei zwei Präparaten zu keinem Zusammenschluss der Knorpelschicht in der Defektmittle kam. In der tierexperimentellen Studie an Ziegen von Jackson et al. wurden diese Merkmale der defizitären chondralen Geweberegeneration ebenfalls beobachtet (Jackson, Lalor et al. 2001). Nach 26 Wochen zeigten die unversorgten osteochondralen Defekte Fibrillationen und Degenerationen im Defektrandgebiet und konkave Einkerbungen in der Defektmittle. In Analogie zu der vorliegenden Studie zog fibröses Knorpelgewebe in die Defekttiefe und zeigte somit den fehlenden Zusammenschluss der subchondralen Knochenlamelle. In der Defektmittle dominierte fibrocartilaginäres Gewebe, welches unterschiedlich weit in die Defekttiefe reichte. Die Hypertrophie dieses fibrocartilaginären Gewebes spiegelte sich im histomorphometrisch ermittelten hohen Anteil an Kollagen-II-Gewebe wider. Dieses hypertrophe Gewebe diente der Grundlage für den ossären Gewebeumbau in Form von der indirekten enchondralen Ossifikation. Das Knorpelgewebe wies einen geringen Proteoglykangehalt und ungeordnete Matrixstruktur auf. Das Zellbild beinhaltete spindelförmige Zellen unterschiedlicher Dichte und ließ die Morphologien der gewebespezifischen Chondrozyten vermissen. Anhand der morphologischen Merkmale ist das Knorpelgewebe im Defektbereich dem minderwertigen Faserknorpelgewebe zuzuordnen. Insbesondere im Defektrandbereich waren Degenerationserscheinungen wie Fibrillationen, Hypozellularität und ein geringer Proteoglykangehalt vorherrschend und reichten darüber hinaus in das angrenzende originäre Knorpelgewebe. Dies sind Merkmale einer unzureichenden Gewebestabilität, welche sich aus der unzureichenden Qualität des Knorpelgewebes und der insuffizienten biomechanischen Defektstabilität ergeben. Die mechanischen Stressoren wirken sich negativ auf den Metabolismus der Chondrozyten aus und als Folge dessen werden unzureichend Matrixbestandteile der EZM produziert (Rogers, Murphy et al. 2006). Diese Proteoglykandefizite und strukturellen Inhomogenitäten ließen sich anhand der MRT-Bildmaterialien durch hyperintense Darstellung des Defektknorpelgewebes ebenfalls darstellen. Die histologisch und radiologisch evaluierten degenerativen Veränderungen im angrenzenden Knorpelgewebe verdeutlichen die progressive Defektausbreitung und bestätigen, dass Defekte dieser Größe keine spontane Heilungskapazität aufweisen.

Die verzögerte Geweberegeneration im basalen Defektbereich lässt die Vermutung zu, dass dies zur Bildung subchondraler Knochenzysten im späteren Heilungsverlauf führen kann. Aufgrund der Abwesenheit von Scaffoldrestbestandteilen und der damit verbundenen Artefaktfreiheit konnten subchondrale Knochenzysten bei zwei Tieren bereits anhand des MRT-Bildmaterials zuverlässig diagnostiziert werden.

5.3 Schlussfolgerung

Die qualitativen und quantitativen Untersuchungen der Heilungsergebnisse osteochondraler Defekte nach Implantation von PLGA-Scaffolds mittels der histologischen und histomorphometrischen Auswertungen ergaben bereits nach drei Monaten Standzeit eine hochwertigere Defektauffüllung der Gruppe 2 (Scaffold hart) im Vergleich zur Gruppe 1 (Scaffold weich). Diese Beobachtungen ließen sich nach sechs Monaten Standzeit der Gruppen 3 (Scaffold weich) und 4 (Scaffold hart) weiterhin bestätigen. Die auf die Geweberegeneration einwirkenden Einflussgrößen in dieser Studie sind die unterschiedliche Biomechanik, Biodegradation und Porengröße der verwendeten Scaffolds. Im Folgenden werden die genannten Variablen und deren Gewichtung dargestellt.

Die differente Biomechanik der verwendeten Scaffolds führte zu einer unterschiedlichen biomechanischen Stabilität im Defektareal. Diese Einflussgröße wirkt sich auf Osteogenese und Chondrogenese im Heilungsverlauf osteochondraler Defekte aus (Athanasidou, Niederauer et al. 1996; Niederauer, Slivka et al. 2000). Bereits im frühen Heilungsstatus nach drei Monaten Standzeit war die Bildung der subchondralen Knochenlamelle in der Gruppe 2 (Scaffold hart) weiter fortgeschritten, während die Defektauffüllung der Gruppe 1 (Scaffold weich) mit einem hohen Anteil fibrösen Bindegewebes eine minderwertige Gewebeauffüllung vorwies. Die Formierung der subchondralen Knochenlamelle ist für die Chondrogenese an der Gelenkoberfläche essentiell (Shapiro, Koide et al. 1993; Hutmacher 2001; Frenkel, Bradica et al. 2005). Dieser wissenschaftliche Zusammenhang konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse besonders zum fortgeschrittenen Heilungsstatus nach sechs Monaten Standzeit bestätigt werden. Die unspezifische Defektauffüllung der Gruppe 1 (Scaffold weich) führte zu einer späteren indirekte Ossifikation, daraus resultierte nach sechs Monaten Standzeit eine Verzögerung und defizitäre Defektauffüllung der Gruppe 3 (Scaffold weich). Die direkte Osteogenese der Gruppen 2 und 4 (Scaffold hart) beinhaltete die vollständige Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle und der Wiederherstellung einer chondralen kongruenten Gelenkfläche bei fünf Tieren zum fortgeschrittenen Heilungsstatus.

Zusätzlich ist die insuffiziente Defektstabilität der Gruppe 3 (Scaffold weich) als Ätiologie für die vermehrten Degenerationserscheinungen des regenerierten Knorpelgewebes im Defektrandgebiet zu beachten. Zum frühen Heilungsstatus waren die Degenerationserscheinungen im Knorpelgewebe beider Gruppen von ähnlichem Ausmaß, jedoch sind diese zellulären Reaktionsmuster zusätzlich in der Invasivität des chirurgischen Eingriffs begründet. Die degenerativen Gewebeveränderungen zum fortgeschrittenen Heilungsstatus waren in der Gruppe 3 (Scaffold weich) stärker ausgeprägt. Die beobachteten Fibrillationen im Knorpelgewebe sind Anzeichen einer minderen Qualität der extrazellulären Matrix des gebildeten Knorpelgewebes und einer biomechanischen Instabilität. Ein weiteres Merkmal der unzureichenden Defektstabilität waren die sklerotischen Veränderungen des

umliegenden Knochengewebes der Gruppe 3 (Scaffold weich), während die Morphologie des spongiösen Knochens der Vergleichsgruppe 4 (Scaffold hart) den nativen Trabekelausrichtungen ähnlich waren.

Die Degradationskinetik der Scaffoldmaterialien zeigte Unterschiede zwischen den Gruppen Scaffold weich und hart. Die Biodegradation der Scaffolds geringerer Steifigkeit verlief schneller, als bei den mit Scaffolds höherer Steifigkeit versorgten Defekten. Dies ist auf den höheren Gehalt von schneller resorbierbaren Polyglykoliden und den niedrigeren Gehalt an Polylaktiden der Scaffolds geringerer Steifigkeit zurückzuführen (Weiler, Hoffmann et al. 2000; Moran, Pazzano et al. 2003). Die frühzeitige Degradation der Implantate der Gruppen 1 und 3 (Scaffold weich) liefert eine weitere Erklärung für die minderwertige Defektauffüllung und die geringere Defektstabilität. Die frühzeitige Degradation der Implantate gefährdet den Effekt der Osteoinduktion, wobei der Scaffold als Leitgerüst für das einwachsende Knochengewebe dienen sollte (Schenk R 1991). Die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass in den Gruppen 2 und 4 (Scaffold hart) die direkte Osteogenese dominierte, während in den Gruppen 1 und 3 (Scaffold weich) der minderwertigen unspezifischen Gewebeauffüllung eine sekundäre enchondrale Ossifikation folgte. Dies beinhaltete eine verzögerte Regeneration des ossären Gewebes und führte zu Instabilitäten im Defektbereich während des Heilungsverlaufs. Zudem war durch die frühzeitige Biodegradation im oberen Defektbereich die Zellinfiltration aus dem synovialen Kompartiment in der initialen Heilungsphase nur bedingt möglich. Der strategische Grundgedanke der angewandten Technik ist es jedoch, eine temporäre Stabilität im Defektareal zu schaffen und die Zellinfiltration und Zellproliferation zu fördern, um eine neue Gewebekonstruktion in der initialen Heilungsphase zu unterstützen (Niederauer, Slivka et al. 2000; von Rechenberg, Akens et al. 2003). Daher war die erhöhte Degradationskinetik der Gruppen Scaffold weich der ossären und chondralen Geweberegeneration hinderlich.

Die differente Porengröße der verwendeten Scaffolds stellte einen weiteren möglichen Einflussfaktor der unterschiedlichen Geweberegeneration dar. Laut der Studie von Karageorgiou et al. ist eine insuffiziente Porengröße für die Bildung von unmineralisiertem fibrösem Gewebe verantwortlich (Karageorgiou und Kaplan 2005). Danach ermöglicht eine adäquate Porengröße die verstärkte Angiogenese und das diskontinuierliche Einwachsen des Knochengewebes in das Defektareal. Dies sind essentielle Kriterien für die direkte Osteogenese und sichern damit den zeitgerechten Heilungsverlauf. Unterschiede der Gefäßdichte der gefüllten Defekte konnten nicht detektiert werden, jedoch zeigte die Regeneration des Knochengewebes der Gruppen 2 und 4 (Scaffold hart) eine direkte Osteogenese im basalen Defektbereich. Der hohe Anteil von fibrösem Gewebe der Gruppe 1 (Scaffold weich) hingegen lässt einen Einfluss der Porengröße auf die Geweberegeneration dieser Studie vermuten.

Die Defektstabilität osteochondraler Defekte ist abhängig von den biomechanischen Eigenschaften der verwendeten Implantate. Somit ist eine ausreichende Steifigkeit der Scaffoldimplantate für die adäquate Regeneration des Knochen- und Knorpelgewebes Grundvoraussetzung. Die Degradationskinetik und die Porengröße der Scaffolds sind als zusätzliche Faktoren anzusehen, die die Defektstabilität im Heilungsverlauf gefährden und negativ beeinflussen können.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass die initialen mechanischen Rahmenbedingungen in der osteochondralen Defektheilung von der Steifigkeit der verwendeten Scaffolds beeinflusst werden. Die Verwendung von Scaffolds höherer mechanischer Stabilität wirken sich positiv auf den Heilungsverlauf und das Heilungsergebnis aus. Die Heilungsergebnisse der Gruppen 2 und insbesondere der Gruppe 4 (Scaffold hart) wiesen eine gute Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle und der spongiösen Knochenstrukturen im basalen Defektbereich vor. Die Wiederherstellung einer kongruenten Gelenkfläche ist als Resultat der guten knöchernen Rekonstruktion anzusehen. Das gebildete hyalin-ähnliche Knorpelgewebe wies strukturelle Morphologien des hyalinen Gelenkknorpels auf. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich erkennen, dass eine ausreichende strukturelle und mechanische Stabilität im knöchernen Defektareal während der initialen Heilungsphase der Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle förderlich ist. Diese frühzeitige Rekonstruktion der subchondralen Knochenlamelle stellt die Voraussetzung für die schnelle und komplikationsarme Wiederherstellung der chondralen Gelenkfläche dar.

Die Knorpeldicke der versorgten Defekte war jedoch geringer als die Gewebedimensionen im angrenzenden Knorpelgewebe und in den Defektrandgebieten am Übergang zum zu originären Knorpelgewebe waren zelluläre Degenerationserscheinungen im histologischen Bild evaluierbar. Diese Beobachtungen implizieren eine geringere biomechanische Gewebestabilität und können im weiteren Heilungsverlauf zu progressiven Degenerationserscheinungen führen. Daher wären ergänzende Studien zur Untersuchung des weiteren Heilungsverlauf nach einem Jahr und länger wünschenswert.

Die Untersuchung des Heilungsverlaufs ergab eine gute Biokompatibilität der verwendeten Materialien. Es wurden keine Entzündungsreaktionen detektiert, die auf eine Unverträglichkeit der biodegradierbaren Scaffoldbestandteile zurückzuführen waren. Die moderate Phagozytoseaktivität der polynukleären Fremdkörperriesenzellen wies auf die in der Literatur beschriebene protrahierte Resorptionsphase hin und ist als Zeichen der physiologischen enzymatischen Biodegradation der Scaffoldbestandteile anzusehen (Stahelin, Weiler et al. 1997). Zudem konnten keine zytotoxischen Reaktionsmuster in Form von Zelluntergang und Zellnekrose in der Defektregion im histologischen Bild beobachtet werden.

Die erhöhte Signalintensität in der subchondralen Region der gefüllten Defekte als Ergebnisse der MRT-Untersuchungen ist auf die verbliebenen Scaffoldbestandteile und die damit assoziierten Artefakte zurückzuführen. Dies sollte bei der Beurteilung des Heilungsverlaufs nach Implantation von PLGA-Scaffolds anhand von MRT-Untersuchung beachtet werden. Die hyperintense Darstellung der

subchondralen Region im Defektbereich kann zu falsch-negativen Diagnosen, wie z.B. subchondralem Knochenmarködem oder subchondraler Zysten führen. Die Darstellung des Knorpelgewebes anhand der indirekten MR-Arthrographie hingegen erwies sich als zuverlässiges Diagnostikum. Die strukturellen Inhomogenitäten an der Gelenkoberfläche und auch defizitärer Proteoglykangehalt der extrazellulären Matrix ließen sich anhand des MRT-Bildmaterials in Korrelation zu den histologischen Beobachtungen evaluieren.

Abschießend ist festzustellen, dass die indirekte MR-Arthrographie ein sensibles Verfahren zur Beurteilung des Heilungsverlaufs osteochondraler Defekte darstellt. In dieser Studie wurde jedoch anhand des Vergleichs der gewonnenen Aussagen der MR-Arthrographie und der histologischen Präparate die überlegene Sensitivität der histologischen Untersuchungen bestätigt. Der histologischen Gewebeuntersuchung sind spezifische Aussagen über die strukturelle Qualität des Knorpelgewebes und des subchondralen Defektareals weiterhin vorbehalten.

Die Ergebnisse der ungefüllten osteochondralen Defekte zeigten eine große Variation der Quantität der Gewebearauffüllung. Die vollständigen Versagensmuster und die minderwertige Geweberegeneration der verbliebenen Defekte sind Merkmale der insuffizienten Heilungskapazität spontan regenerierender osteochondraler Defekte dieser Größe. In der Literatur ist die Größe osteochondraler Defekte als ein kritisches Maß beschrieben. Wird die kritische Defektgröße überschritten, ist die Spontanheilung dieser Defekte insbesondere der Gelenkknorpelschicht nicht möglich. Das vorerst gebildete fibröse und ossäre Gewebe im Defektareal zeigt progressiven Untergang in Form von resorptiven und degenerativen Abbauvorgängen. Die verminderte Stabilität führt zum Kollaps von angrenzendem Knorpelgewebe und der subchondralen Knochenlamelle, woraus eine Vergrößerung des Defektdurchmessers resultiert. Die Überschreitung der kritischen Defektgröße wurde im Ziegenmodell bereits mit einem Defektdurchmesser von 6 mm dokumentiert (Jackson, Lalor et al. 2001). Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse erklären die insuffizienten Heilungsergebnisse der ungefüllten Defekte der vorliegenden Studie. Die ungefüllten Defekte ließen ein Fundament für die Geweberegeneration vermissen und zeigten eine mangelhafte Defektstabilität. Das Auftreten von subchondralen Knochenzysten in den Kontrollgruppen (ungefüllte Defekte) nach sechs Monaten Standzeit lässt die Vermutung offen, dass die Bildung dieser zystoiden Defekte zusätzlich durch die gewählte Defektgröße und die speziesspezifischen anatomischen Gewebedimensionen (siehe 5.1.1) beeinflusst werden.

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die chirurgische Versorgung kritischer osteochondraler Defekte mittels biodegradierbarer synthetischer Implantate der ossären und chondralen Geweberegeneration förderlich ist. Zusätzlich konnte die anfangs aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass die initialen mechanischen Rahmenbedingungen in der osteochondralen Defektheilung von der Steifigkeit der verwendeten Scaffolds beeinflusst werden. Die Verwendung von

Scaffolds höherer mechanischer Stabilität wirkte sich positiv auf den Heilungsverlauf und das Heilungsergebnis aus. Die Quantität und Qualität der ossären und chondralen Geweberegeneration der mit Scaffolds höherer Steifigkeit versorgten Defekte war den Heilungsergebnissen der Scaffolds geringerer Steifigkeit überlegen.

6 Zusammenfassung

Das intrinsische Heilungspotential des hyalinen Knorpelgewebes ist stark limitiert. Der natürliche Regenerationsprozess osteochondraler Defekte basiert auf der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmarkraum und deren folgenden Differenzierung zu chondrogenen Vorläuferzellen. Die begrenzte Selbstheilungskapazität beinhaltet die Bildung von biomechanisch inadäquatem fibrösem Gewebe und Faserknorpelgewebe. Die klinisch angewendeten Therapieoptionen von Gelenkknorpeldefekten traumatischer und degenerativer Genese sind derzeit restorative Verfahren zur mesenchymalen Stammzellrekrutierung, wie die osteochondrale autologe Transplantation (OAT) und die autologe Chondrozytentransplantation (ACT). Diese chirurgischen Behandlungsoptionen führen jedoch nur zeitlich begrenzt zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik. Längerfristig hält das faserknorpelige Regeneratgewebe den natürlichen Belastungseinwirkungen nicht stand und entwickelt progressive Degenerationserscheinungen im späteren Heilungsverlauf.

In der Literatur wird eine Vielzahl über die Ergebnisse experimenteller Studien zur Versorgung osteochondraler Defekte mit synthetischen resorbierbaren Implantaten berichtet. Diese restaurativen Therapieansätze, auch unter dem Begriff „Tissue-Engineering“ zusammengefasst, beinhalten die Regeneration zwei verschiedener Gewebespezies, dem hyalinen Knorpelgewebe und dem subchondralen Knochengewebe. Die limitierte Heilungstendenz des hyalinen Knorpelgewebes erfordert eine Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle, um eine Einwanderung biologisch potenten Stammzellen und die anschließende Bildung von hyalin-ähnlichem oder hyalinem Knorpelgewebe zu ermöglichen. Um eine temporäre Stabilität im Defektareal zu schaffen und eine Geweberegeneration nach der Zellinfiltration in der initialen Heilungsphase zu unterstützen wird der Defekt mit biodegradierbaren Scaffolds aufgefüllt.

In der vorliegenden Studie wurden osteochondrale Defekte im Kniegelenk von Schafen geschaffen und mit biodegradierbaren Scaffolds aus Poly(D,L)Laktid-co-Glykolid (85:15 PLG) als Basismaterial versorgt. Die Heilungsergebnisse wurden nach drei und sechs Monaten Standzeit immunhistologisch, histologisch und histomorphometrisch untersucht. Durch die Verwendung von Scaffolds unterschiedlicher Steifigkeit (87% und 55% zum subchondralen Knochengewebe) stand diese biomechanische Einflussgröße im Vordergrund der Auswertung. Des Weiteren wurden die Biodegradation und das Implantatdesign als weitere Kriterien im Heilungsverlauf miteinbezogen. Die zusätzliche Darstellung des Heilungsverlaufs anhand der indirekten MR-Arthrographie nach sechs Monaten Standzeit diente der Überprüfung der Sensitivität dieses Verfahrens. Durch den Vergleich mit den histologischen Ergebnissen sollte die klinische Aussagekraft dieses nichtinvasiven Diagnostikums zur Beurteilung chirurgisch versorgter osteochondraler Defekte dargestellt werden. Die spontane Regeneration ungefüllter Defekte äquivalenter Größe wurde als Kontrolle angesehen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass die initialen mechanischen Rahmenbedingungen in der osteochondralen Defektheilung von der Steifigkeit der verwendeten Scaffolds beeinflusst werden. Die Verwendung von Scaffolds höherer mechanischer Stabilität wirkte sich positiv auf den Heilungsverlauf und das Heilungsergebnis aus. Die Quantität und Qualität der ossären und chondralen Geweberegeneration der mit Scaffolds höherer Steifigkeit versorgten Defekte war den Heilungsergebnissen der Scaffolds geringerer Steifigkeit überlegen. Die erhöhte mechanische Stabilität im Defektareal führte zu einer direkten Osteogenese und somit zur Wiederherstellung der subchondralen Knochenlamelle. Diese direkte Regeneration der subchondralen Knochenlamelle stellte die Grundvoraussetzung für die chondrale Gewebeproliferation an der Gelenkoberfläche dar. Die verminderte mechanische Stabilität der Scaffolds geringerer Steifigkeit führte vorerst zu einer fibrösen unspezifischen Gewebeauffüllung und wurde von einer indirekten enchondralen Ossifikation gefolgt. Dies verzögerte den Heilungsverlauf und hatte sklerotische ossäre Gewebemerkmale im Heilungsergebnis nach sechs Monaten zur Folge. Die unzureichende Defektstabilität spiegelte sich ebenfalls in der Quantität und Qualität der chondralen Geweberegeneration an der Gelenkoberfläche wider. Es wurden vermehrt Anzeichen der Gewebedegeneration, wie Fibrillationen und Zelluntergang detektiert.

Die indirekte MR-Arthrographie bewies sich als ein sensibles Verfahren zur Beurteilung des Heilungsverlaufs osteochondraler Defekte. Als kritischer Aspekt ist die erhöhte Signalintensität in der subchondralen Region der gefüllten Defekte zu erwähnen. Diese hyperintensiven Darstellungen sind auf die verbliebenen Scaffoldbestandteile und die damit assoziierten Artefakte zurückzuführen. Dies sollte bei der Beurteilung des Heilungsverlaufs nach Implantation von PLGA-Scaffolds anhand von MRT-Untersuchung beachtet werden. Die hyperintense Darstellung der subchondralen Region im Defektbereich kann zu falsch-negativen Diagnosen, wie beispielsweise subchondrales Knochenmarksödem, führen. Die Darstellung des Knorpelgewebes anhand der indirekten MR-Arthrographie hingegen erwies sich als zuverlässiges Diagnostikum. Die strukturellen Inhomogenitäten an der Gelenkoberfläche und auch defizitärer Proteoglykangehalt der extrazellulären Matrix ließen sich anhand des MRT-Bildmaterials in Korrelation zu den histologischen Beobachtungen evaluieren.

7 *Summary*

Repair and regeneration of focal osteochondral defects using biodegradable synthetic implants in ovine knee lesions

–

Prospective MRI evaluation and histological assessment of cartilage and subchondral bone repair

Articular cartilage lesions generally do not heal, or heal only partially under certain biological conditions. They are frequently associated with disability and with symptoms such as joint pain, locking phenomena and reduced or disturbed function. Moreover, such lesions are generally believed to progress to severe forms of osteoarthritis. This limited ability for self-repair of hyaline cartilage is caused by specific tissue properties, partly because of its low cellularity and partly because of its lack of vascular supply. In the case that the defect is larger than a certain critical size, spontaneous subchondral bone healing even fails. In these critical defects, bone resorption at the base of the defect is observed. Biomechanical analysis suggests that bone resorption is related to inappropriate mechanical conditions at the base of the defect. Therefore, early reconstruction of the subchondral structure to permit load transfer appears to be essential not only for the regeneration of the subchondral bone but also the overlying cartilage. Numerous methods have been devised to augment its natural healing response, but these methods generally lead to filling of the defects with fibrous tissue or fibrocartilage, which lacks the mechanical characteristics of articular cartilage and fails with time. Two of the more common cartilage repair procedures are autologous chondrocyte implantation (ACI) and autologous osteochondral transplantation (AOT).

Recently, tissue engineering has emerged as a new discipline that amalgamates aspects from biology, engineering, material science and surgery. Tissue engineering has as a goal the fabrication of functional new tissue to replace damaged tissue. Biodegradable scaffolds offer a new treatment alternative for full-thickness osteochondral defects of critical size that fail to heal spontaneously by providing a supportive matrix that also encourages the in-growth of cell and tissues. These scaffold materials must fulfil specific requirements with respect to the demands for mechanical stability and biocompatibility. The goal is still to promote repair of subchondral bone with restoration of the cortical plate and an overlay of normal hyaline articular cartilage.

In twenty four adult merino ewes osteochondral defects in the femoral condyle were created and the subchondral bone was reconstructed with either a stiff or a soft scaffold. In order to analyze the influence of scaffold stiffness, a commercial scaffold was used to reconstruct the subchondral bone of a critical osteochondral defect. The scaffold was composed of poly(lactide-co-glycolide) (PLG) copolymer for providing structure and calcium sulfate for enhancing bone growth. An untreated defect was created in other condyle of the same knee which served as an untreated control. After three and

six months the osteochondral repair has been evaluated by immunohistological, histological and histomorphometric assessments. MRI studies were performed six months postoperatively.

The histological and MRI findings show that the mechanical scaffold properties have a profound effect on the healing response of the subchondral bone and cartilage. The stiff scaffold was found to improve the regeneration of subchondral bone. Osteochondral defects treated with stiff scaffolds were characterised by trabecular bone formation with continuous osseous replacement of the scaffold. In contrast, soft scaffolds provided less support and as a consequence the surrounding subchondral bone became more sclerotic. This direct regeneration of the subchondral bone was the basic requirement for the chondral regeneration at the joint surface. These results of the present study showed that the stiff osteochondral scaffolds are safe and easy to use, and may represent a suitable matrix to direct and coordinate the process of bone and hyaline-like cartilage regeneration.

MRI has been shown to be accurate in the evaluation of the repair tissue, the subchondral bone and the interface between the repair tissue and the neighbouring native cartilage. One critical aspect is the enhanced signal intensity in the subchondral bone of the filled defects. These hyper intensive displays go back to the remaining scaffolds and the associated artefacts. This should be kept in mind when assessing the healing process after implementing PLGA-scaffolds by MRI. The hyper intensive findings in distal defect area could lead to wrong diagnosis.

8 Anhang

8.1 Anhang I: Immunhistologische Färbungen

Für die Darstellung der Gefäße, der Kollagen-I- und der Kollagen-II-Fasern erfolgte die Färbung nach modifizierter ABC-Methode, wobei die Alkalische Phosphatase als gekoppeltes Enzym verwendet wurde. Für alle drei Färbungen wurden ABC-Elite-Kits³⁷ zur Herstellung der Gebrauchslösung verwendet. Diese setzte sich aus equinem Normalserum, biotinyliertem Sekundäntikörper und den AB-Komplexlösungen zusammen.

Färbeprotokoll

- Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte
2 x Xylol je 10 min
2 x 100% Alkohol je 2 min
1 x 96% Alkohol je 2 min
1 x 80% Alkohol je 2 min
1 x 70% Alkohol je 2 min
2 x Aqua dest. je 5 min
- Spülen in Phosphatpuffer (PBS-Puffer), angesetzt aus Phosphatpufferkonzentrat³⁸ und sterilem Aqua dest.³⁹ 2 x je 5 min
- Vorbehandlung zu Demaskierung der Gewebsantigene in der feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank
Kollagen II: Hyaluronidase (8 mg Hyaluronidase in 50 ml PBS-Puffer gelöst) 4 Stunden, 0,1% Pepsin (3ml 1 M HCL, 297 ml Aqua dest und 300 mg Pepsin gelöst) für 30 min
Kollagen I: Hyaluronidase für 4 Stunden
 α -SMA: keine enzymatische Vorbehandlung
- Spülen in PBS-Puffer 2 x je 5 min
- Inkubation mit Normalserum (5 ml PBS-Puffer und 100 μ l Normalserum) 20 min bei Raumtemperatur

³⁷ Vectastain Elite ABC Kit PK-6200, alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vektor Laboratories Inc., CA, USA

³⁸ 3L 175 Phosphatpufferkonzentrat, Chroma-Gesellschaft, Köngen, Niederlande

³⁹ Aqua B. Braun, Melsungen, Deutschland

- Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4°C:
Kollagen II: polyklonales Anti-Collagen Typ II bovin⁴⁰, Herkunft Kaninchen, Verdünnung 1:100
Kollagen I: polyklonales Anti-Collagen Typ I bovin⁴¹, Herkunft Kaninchen, Verdünnung 1:400
Gefäße: monoklonales Anti- α -smooth-muscle-actin⁴², Herkunft Maus, Verdünnung 1:100
Spülen in PBS-Puffer 2 x 5 min
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (100 μ l verdünnter Sekundärantikörper) 30 min bei Raumtemperatur
- Spülen in PBS-Puffer 2 x 5 min
- Inkubation mit ABC-AB-Komplex (5ml Puffer, 50 μ l Reagenz A und 50 μ l Reagenz B) 50 min bei Raumtemperatur
- Spülen in PBS-Puffer und anschließend Inkubation mit Chromogenpuffer 2x je 2 min
- Inkubation mit Alkalische-Phosphatase-Komplex unter visueller Kontrolle
Kollagen II: ca. 6,5 min
Kollagen I: ca. 4 min
 α -SMA: ca. 5 min
- Spülen in Aqua dest.
- Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer
- Spülen unter Leitungswasser
- Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine⁴³

Zur Bestimmung einer unspezifischen Hintergrundfärbung nichtselektiver Bindungsstellen wurden in jeder Färbereihe Negativkontrollen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper mitgeführt.

⁴⁰ Anti-Collagen Typ II, Biologo, Kronshagen, Deutschland

⁴¹ Anti-Kollagen Typ I, Biologo, Kronshagen, Deutschland

⁴² Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

⁴³ Kaisers Glycerin-Gelantine, MERCK GmbH, Darmstadt, Deutschland

8.2 Anhang II: Safranin Orange-Färbung

Färbeprotokoll

- Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe
2 x Xylol je 10 min
2 x 100% Alkohol je 2 min
1 x 96% Alkohol je 2 min
1 x 80% Alkohol je 2 min
1 x 70% Alkohol je 2 min
2 x Aqua destje 5 min
- Färben in 1%iger Safranin-Orange-Färbelösung 8 min
- Spülen in Aqua dest.
- Dehydrieren mittels aufsteigender Alkoholreihe
96%iger Alkohol 3 min
96%iger Alkohol 3 min
100%iger Alkohol 5 min
100%iger Alkohol 5 min
2x Xylol, je 5 min
- Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine

8.3 Anhang III: Übersicht der histologische Bildmaterialien

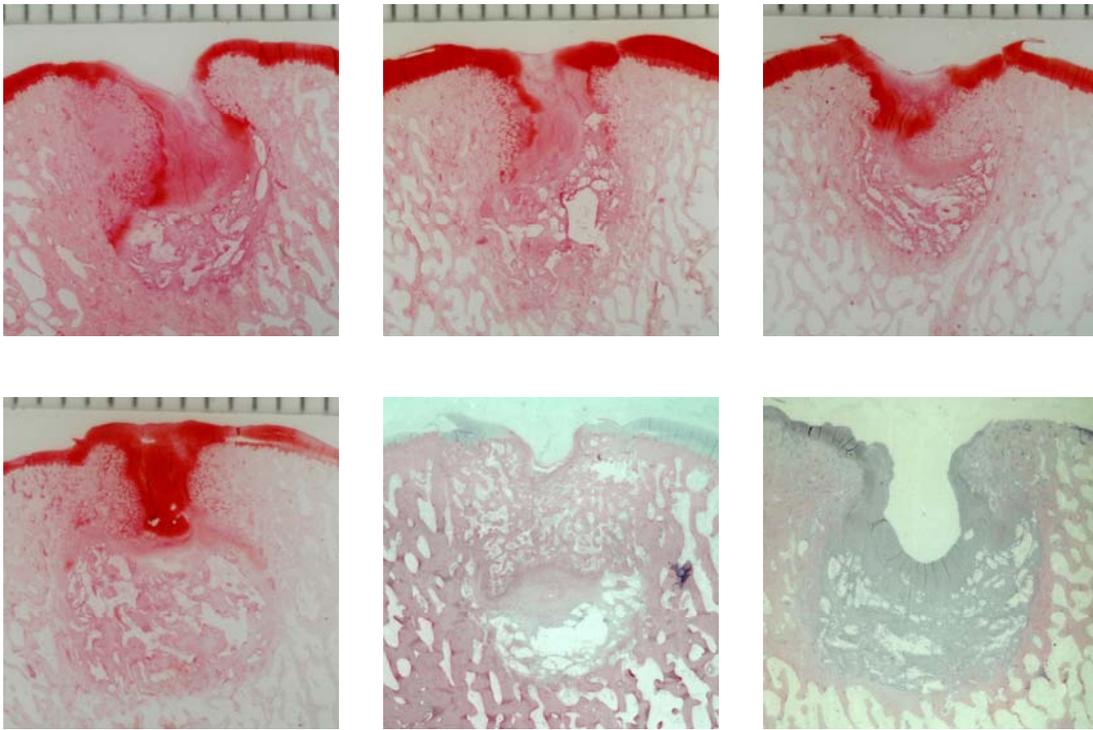


Abbildung 8-1: Übersicht der gefüllten Defekte der Gruppe 1 (Scaffold weich, 3 Monate Standzeit)

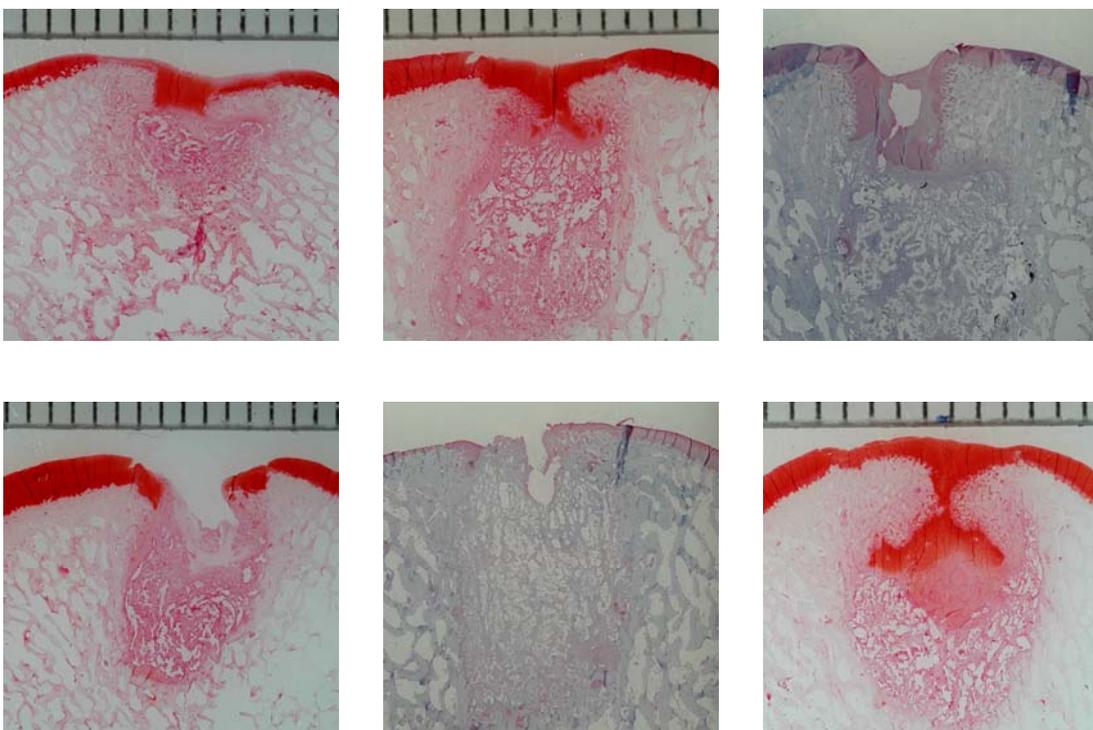


Abbildung 8-2: Übersicht der gefüllten Defekte der Gruppe 2 (Scaffold hart, 3 Monate Standzeit)

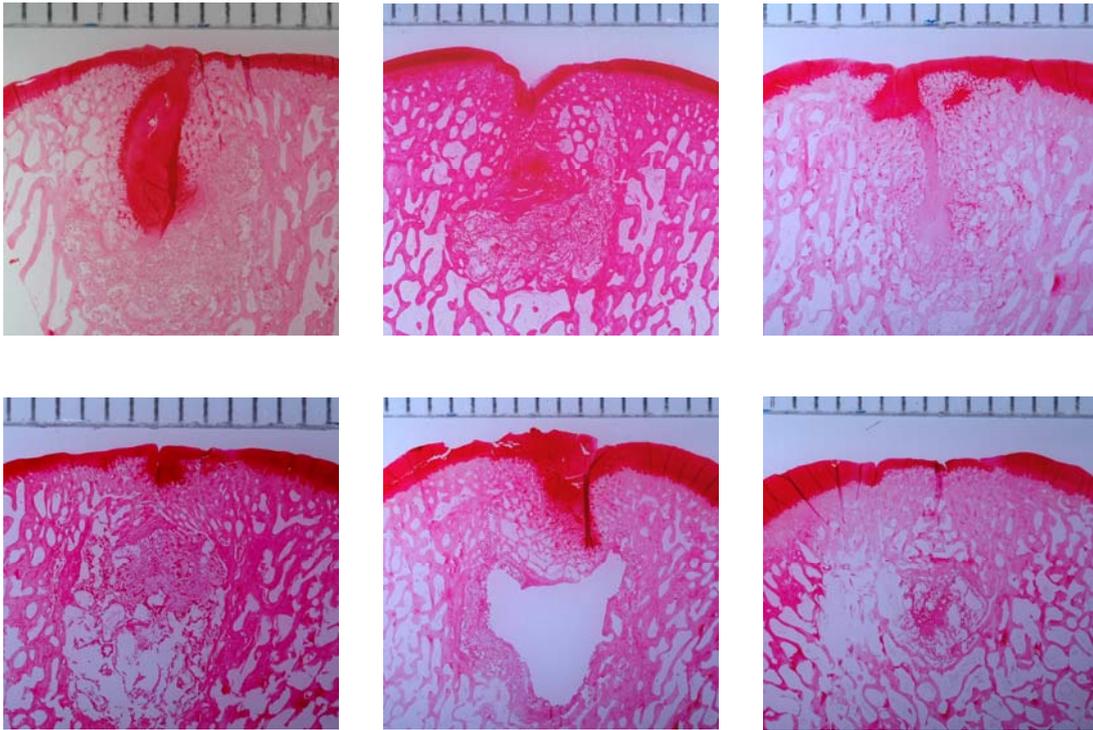


Abbildung 8-3: Übersicht der gefüllten Defekte der Gruppe 3 (Scaffold weich, 6 Monate Standzeit)

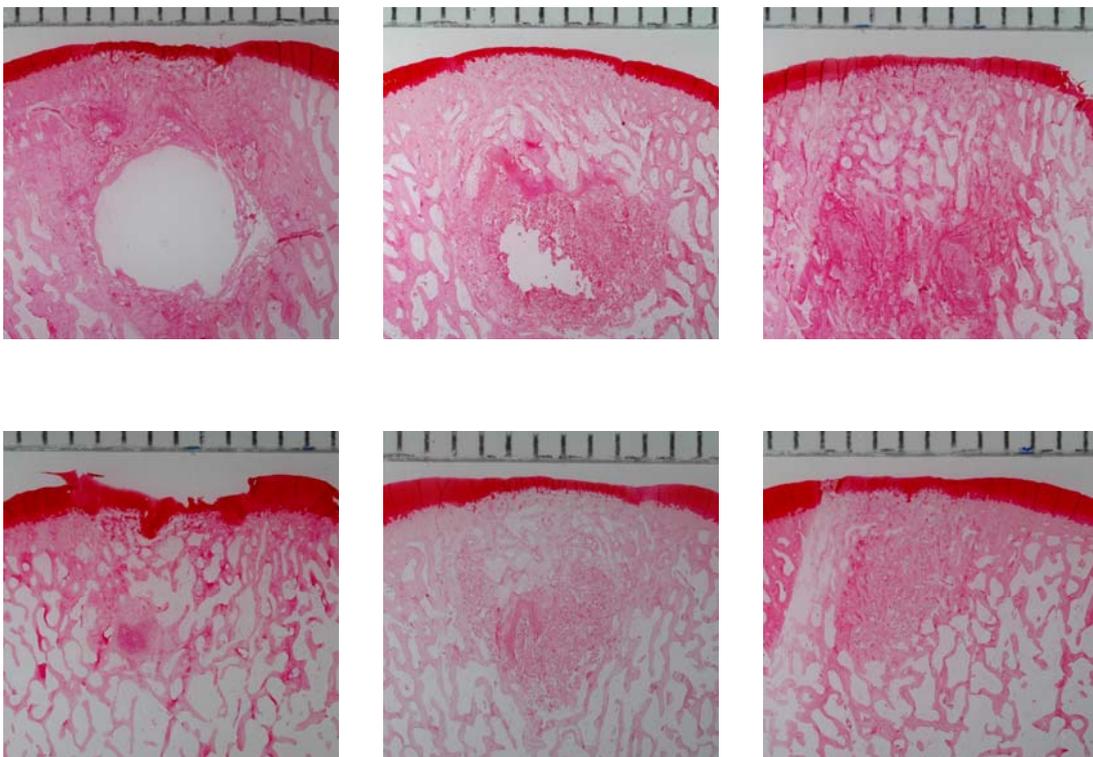


Abbildung 8-4: Übersicht der gefüllten Defekte der Gruppe 4 (Scaffold hart, 6 Monate Standzeit)

9 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
AK	Antikörper
α -SMA	Alpha-Smooth Muscle Aktin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
DE	gefüllter Defekt
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetraacetic-Acid
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	extrazelluläre Matrix
g	Gramm
μ g	Mikrogramm
GAG	Glykosaminoglykane
Gd-DTPA	Gadoliniumkomplex der Diäthylentriaminpentaessigsäure
ICRS	International Cartilage Research Society
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LE	Leerdefekt
MACT	matrixassoziierte Chondrozytentransplantation
min	Minuten
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
OAT	osteocondrale autologe Transplantation
OCT	osteocondraler Transfer
PBS	Phosphatpuffer-Lösung pH 7,2
PGA	Polyglykolid
PGLA-Scaffold	Polylaktidglykolid-Scaffold
PLA	Polylaktid
post op	post operationem
ROI	Region of interest
SI	Signalintensität
SNR	Signal-to-Noise-Ratio
SO-Färbung	Safranin-Orange-Färbung
Tab.	Tabelle

Vol.%

Volumenprozent

10 Literatur

- Alford, J. W. and B. J. Cole (2005). "Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options." Am J Sports Med **33**(2): 295-306.
- Allen, M. J., J. E. Houlton, et al. (1998). "The surgical anatomy of the stifle joint in sheep." Vet Surg **27**(6): 596-605.
- Aspenberg, P., M. Tagil, et al. (1996). "Bone graft proteins influence osteoconduction. A titanium chamber study in rats." Acta Orthop Scand **67**(4): 377-82.
- Athanasίου, K. A., G. G. Niederauer, et al. (1996). "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers." Biomaterials **17**(2): 93-102.
- Bartlett, W., J. A. Skinner, et al. (2005). "Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study." J Bone Joint Surg Br **87**(5): 640-5.
- Bashir, A., M. L. Gray, et al. (1999). "Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI." Magn Reson Med **41**(5): 857-65.
- Bert, J. M. and K. Maschka (1989). "The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone." Arthroscopy **5**(1): 25-32.
- Boyan, B. D., C. H. Lohmann, et al. (1999). "Bone and cartilage tissue engineering." Clin Plast Surg **26**(4): 629-45, ix.
- Braun, S., S. Vogt, et al. (2007). "[Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation]." Orthopäde **36**(6): 589-99; quiz 600.
- Bredella, M. A., P. F. Tirman, et al. (1999). "Accuracy of T2-weighted fast spin-echo MR imaging with fat saturation in detecting cartilage defects in the knee: comparison with arthroscopy in 130 patients." AJR Am J Roentgenol **172**(4): 1073-80.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-95.
- Brittberg, M. and C. S. Winalski (2003). "Evaluation of cartilage injuries and repair." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 58-69.
- Broom, N. D. and C. A. Poole (1982). "A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition." J Anat **135**(Pt 1): 65-82.

- Bruns, J., P. Kersten, et al. (1992). "Autologous rib perichondrial grafts in experimentally induced osteochondral lesions in the sheep-knee joint: morphological results." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **421**(1): 1-8.
- Buckwalter, J. A. (1998). "Articular cartilage: injuries and potential for healing." J Orthop Sports Phys Ther **28**(4): 192-202.
- Buckwalter, J. A., M. G. Ehrlich, et al. (1987). "Electron microscopic analysis of articular cartilage proteoglycan degradation by growth plate enzymes." J Orthop Res **5**(1): 128-32.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation." Instr Course Lect **47**: 487-504.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions." Instr Course Lect **47**: 477-86.
- Buckwalter, J. A. and L. C. Rosenberg (1988). "Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans." Electron Microsc Rev **1**(1): 87-112.
- Burger, C., K. Kabir, et al. (2006). "Polylactide (LTS) causes less inflammation response than polydioxanone (PDS): a meniscus repair model in sheep." Arch Orthop Trauma Surg **126**(10): 695-705.
- Burstein, D., A. Bashir, et al. (2000). "MRI techniques in early stages of cartilage disease." Invest Radiol **35**(10): 622-38.
- Caplan, A. I., M. Elyaderani, et al. (1997). "Principles of cartilage repair and regeneration." Clin Orthop Relat Res(342): 254-69.
- Carrino, J. A., J. Blum, et al. (2006). "MRI of bone marrow edema-like signal in the pathogenesis of subchondral cysts." Osteoarthritis Cartilage **14**(10): 1081-5.
- Carter, D. R., P. R. Blenman, et al. (1988). "Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing." J Orthop Res **6**(5): 736-48.
- Chen, A. C., J. P. Nagrampa, et al. (1997). "Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro." J Orthop Res **15**(6): 791-802.
- Curl, W. W., J. Krome, et al. (1997). "Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies." Arthroscopy **13**(4): 456-60.
- D'Lima, D. D., S. Hashimoto, et al. (2001). "Impact of mechanical trauma on matrix and cells." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S90-9.
- Ding, M., M. Dalstra, et al. (1998). "Mechanical properties of the normal human tibial cartilage-bone complex in relation to age." Clin Biomech (Bristol, Avon) **13**(4-5): 351-358.
- Duchow, J., T. Hess, et al. (2000). "Primary stability of press-fit-implanted osteochondral grafts. Influence of graft size, repeated insertion, and harvesting technique." Am J Sports Med **28**(1): 24-7.

- Eyre, D. (2002). "Collagen of articular cartilage." Arthritis Res **4**(1): 30-5.
- Frankenburg, E. P., S. A. Goldstein, et al. (1998). "Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement." J Bone Joint Surg Am **80**(8): 1112-24.
- Frenkel, S. R., G. Bradica, et al. (2005). "Regeneration of articular cartilage--evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants." Osteoarthritis Cartilage **13**(9): 798-807.
- Frenkel, S. R. and P. E. Di Cesare (2004). "Scaffolds for articular cartilage repair." Ann Biomed Eng **32**(1): 26-34.
- Frenkel, S. R., E. N. Kubiak, et al. (2006). "The repair response to osteochondral implant types in a rabbit model." Cell Tissue Bank **7**(1): 29-37.
- Frenkel, S. R., B. Toolan, et al. (1997). "Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair." J Bone Joint Surg Br **79**(5): 831-6.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-26.
- Furukawa, T., D. R. Eyre, et al. (1980). "Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee." J Bone Joint Surg Am **62**(1): 79-89.
- Gillis, A., M. Gray, et al. (2002). "Relaxivity and diffusion of gadolinium agents in cartilage." Magn Reson Med **48**(6): 1068-71.
- Goldberg, V. M. and A. I. Caplan (1999). "Biologic restoration of articular surfaces." Instr Course Lect **48**: 623-7.
- Gortz, S. and W. D. Bugbee (2006). "Allografts in articular cartilage repair." J Bone Joint Surg Am **88**(6): 1374-84.
- Grande, D. A., C. Halberstadt, et al. (1997). "Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts." J Biomed Mater Res **34**(2): 211-20.
- Gravius, S., U. Schneider, et al. (2007). "[Osteochondral marker proteins in the quantitative evaluation of matrix-based autologous chondrocyte transplantation CaRes]." Z Orthop Unfall **145**(5): 625-32.
- Guldborg, R., D. L. Butler, et al. (2009). "The Impact of Biomechanics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine." Tissue Eng Part B Rev.
- Ho, Y. Y., A. J. Stanley, et al. (2007). "Postoperative evaluation of the knee after autologous chondrocyte implantation: what radiologists need to know." Radiographics **27**(1): 207-20; discussion 221-2.
- Hoffmann, R., A. Weller, et al. (1997). "[Local foreign body reactions to biodegradable implants. A classification]." Unfallchirurg **100**(8): 658-66.

- Horas, U., D. Pelinkovic, et al. (2003). "Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial." J Bone Joint Surg Am **85-A**(2): 185-92.
- Huber, M. M., S. M. Trattnig, et al. (2000). "Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage." Investigative Radiology October **35**(10): 573-580.
- Hulbert, S. F., F. A. Young, et al. (1970). "Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses." J Biomed Mater Res **4**(3): 433-56.
- Hunter, W. (1995). "Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743." Clin Orthop Relat Res(317): 3-6.
- Hunziker, E. B. (1999). "Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?" Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 15-28.
- Hunziker, E. B. (1999). "Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements." Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S135-46.
- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 432-63.
- Hunziker, E. B., T. M. Quinn, et al. (2002). "Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **10**(7): 564-72.
- Hunziker, E. B. and L. C. Rosenberg (1996). "Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane." J Bone Joint Surg Am **78**(5): 721-33.
- Hutmacher, D. W. (2001). "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives." J Biomater Sci Polym Ed **12**(1): 107-24.
- Imhof, H., M. Breitenseher, et al. (1999). "Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease." Top Magn Reson Imaging **10**(3): 180-92.
- Jackson, D. W., P. A. Lalor, et al. (2001). "Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study." J Bone Joint Surg Am **83-A**(1): 53-64.
- Jansson, V., P. E. Muller, et al. (2000). "[A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study]." Orthopade **29**(2): 151-7.
- Jiang, C. C., H. Chiang, et al. (2007). "Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite." J Orthop Res **25**(10): 1277-90.
- Jin, Q. M., H. Takita, et al. (2000). "Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation." J Biomed Mater Res **52**(4): 491-9.
- Johnson, L. L. (1986). "Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status." Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery **2**(1): 54.

- Jones, A. C., C. H. Arns, et al. (2007). "Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT." Biomaterials **28**(15): 2491-504.
- Jones, C. W., C. Willers, et al. (2007). "Matrix-induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy." J Orthop Res.
- Karageorgiou, V. and D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." Biomaterials **26**(27): 5474-91.
- Kaul, G., M. Cucchiari, et al. (2006). "Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo." J Gene Med **8**(1): 100-11.
- Kellgren, J. H. and J. S. Lawrence (1957). "Radiological assessment of osteo-arthritis." Ann Rheum Dis **16**(4): 494-502.
- Kelly, D. J. and P. J. Prendergast (2006). "Prediction of the optimal mechanical properties for a scaffold used in osteochondral defect repair." Tissue Eng **12**(9): 2509-19.
- Kornaat, P. R., R. Y. Ceulemans, et al. (2005). "MRI assessment of knee osteoarthritis: Knee Osteoarthritis Scoring System (KOSS)--inter-observer and intra-observer reproducibility of a compartment-based scoring system." Skeletal Radiol **34**(2): 95-102.
- Kuboki, Y., Q. Jin, et al. (2001). "Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis." J Bone Joint Surg Am **83-A Suppl 1**(Pt 2): S105-15.
- Kuo, C. K., W. J. Li, et al. (2006). "Cartilage tissue engineering: its potential and uses." Curr Opin Rheumatol **18**(1): 64-73.
- Kuroki, H., Y. Nakagawa, et al. (2007). "Sequential changes in implanted cartilage after autologous osteochondral transplantation: postoperative acoustic properties up to 1 year in an in vivo rabbit model." Arthroscopy **23**(6): 647-54.
- Larsen, M. W., W. S. Pietrzak, et al. (2005). "Fixation of osteochondritis dissecans lesions using poly(l-lactic acid)/ poly(glycolic acid) copolymer bioabsorbable screws." Am J Sports Med **33**(1): 68-76.
- Laurencin, C. T., A. M. Ambrosio, et al. (1999). "Tissue engineering: orthopedic applications." Annu Rev Biomed Eng **1**: 19-46.
- Locker, M., O. Kellermann, et al. (2004). "Paracrine and autocrine signals promoting full chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line." J Bone Miner Res **19**(1): 100-10.
- Lohmander, L. S., L. Dahlberg, et al. (1989). "Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury." Arthritis Rheum **32**(11): 1434-42.
- Lotz, M., S. Hashimoto, et al. (1999). "Mechanisms of chondrocyte apoptosis." Osteoarthritis Cartilage **7**(4): 389-91.

- Lubiatowski, P., J. Kruczynski, et al. (2006). "Articular Cartilage Repair by Means of Biodegradable Scaffolds." Transplantation Proceedings **38**(1): 320.
- Lyons, T. J., S. F. McClure, et al. (2006). "The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces." BMC Musculoskelet Disord **7**: 52.
- Mainil-Varlet, P., T. Aigner, et al. (2003). "Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 45-57.
- Mankin, H. J. (1982). "The response of articular cartilage to mechanical injury." J Bone Joint Surg Am **64**(3): 460-6.
- Mankin, H. J., H. Dorfman, et al. (1971). "Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data." J Bone Joint Surg Am **53**(3): 523-37.
- Marlovits, S., P. Singer, et al. (2006). "Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years." Eur J Radiol **57**(1): 16-23.
- Marlovits, S., G. Striessnig, et al. (2004). "Definition of pertinent parameters for the evaluation of articular cartilage repair tissue with high-resolution magnetic resonance imaging." Eur J Radiol **52**(3): 310-9.
- Martinek, V., F. H. Fu, et al. (2001). "Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering." Clin Sports Med **20**(2): 403-16, viii.
- Martinek, V., P. Ueblacker, et al. (2003). "CURRENT CONCEPTS OF GENE THERAPY AND CARTILAGE REPAIR." J Bone Joint Surg Br **85-B**(6): 782-788.
- McCauley, T. R. and D. G. Disler (2001). "Magnetic resonance imaging of articular cartilage of the knee." J Am Acad Orthop Surg **9**(1): 2-8.
- Meachim, G. and C. Roberts (1971). "Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee." J Anat **109**(Pt 2): 317-27.
- Messner, K. (1999). "[Cartilage replacement operation using pre-cultured cells]." Orthopade **28**(1): 61-7.
- Micheli, L. J., J. E. Browne, et al. (2001). "Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up." Clin J Sport Med **11**(4): 223-8.
- Minas, T. and L. Peterson (1999). "Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation." Clin Sports Med **18**(1): 13-44, v-vi.

- Mizuta, H., S. Kudo, et al. (2004). "Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **12**(7): 586-96.
- Mommsen, U., N. M. Meenen, et al. (1984). "[Value of homologous spongiosa in filling up subchondral bone defects]." Unfallchirurgie **10**(6): 273-7.
- Moran, J. M., D. Pazzano, et al. (2003). "Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering." Tissue Eng **9**(1): 63-70.
- Moriya, T., Y. Wada, et al. (2007). "Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: histology, biochemistry, and MR imaging." J Orthop Sci **12**(3): 265-73.
- Muller, B. and D. Kohn (1999). "[Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]." Orthopade **28**(1): 4-10.
- Muller, P. E., F. Schimpf, et al. (2006). "Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model." Acta Orthop **77**(6): 981-5.
- Nagura, I., H. Fujioka, et al. (2007). "Repair of osteochondral defects with a new porous synthetic polymer scaffold." J Bone Joint Surg Br **89**(2): 258-64.
- Nam, E. K., M. Makhsous, et al. (2004). "Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model." Am J Sports Med **32**(2): 308-16.
- Nehrer, S., M. Spector, et al. (1999). "Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures." Clin Orthop Relat Res(365): 149-62.
- Niederauer, G. G., M. A. Slivka, et al. (2000). "Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats." Biomaterials **21**(24): 2561-74.
- Noyes, F. R., R. W. Bassett, et al. (1980). "Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries." J Bone Joint Surg Am **62**(5): 687-95, 757.
- O'Driscoll, S. W. (1998). "The healing and regeneration of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **80**(12): 1795-812.
- O'Driscoll, S. W., F. W. Keeley, et al. (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." J Bone Joint Surg Am **70**(4): 595-606.
- Outerbridge, R. E. (1961). "The etiology of chondromalacia patellae." J Bone Joint Surg Br **43-B**: 752-7.
- Pauwels, F. (1960). "[A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure.]." Z Anat Entwicklungsgesch **121**: 478-515.

- Peterfy, C. G., A. Guermazi, et al. (2004). "Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **12**(3): 177-90.
- Peterfy, C. G., S. Majumdar, et al. (1994). "MR imaging of the arthritic knee: improved discrimination of cartilage, synovium, and effusion with pulsed saturation transfer and fat-suppressed T1-weighted sequences." Radiology **191**(2): 413-9.
- Peterson, L., M. Brittberg, et al. (2002). "Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability." Am J Sports Med **30**(1): 2-12.
- Pineda, S., A. Pollack, et al. (1992). "A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair." Acta Anat (Basel) **143**(4): 335-40.
- Pistner, H., D. R. Bendix, et al. (1993). "Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. Part III. Analytical characterization." Biomaterials **14**(4): 291-8.
- Pistner, H., R. Gutwald, et al. (1993). "Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. I. Biological results." Biomaterials **14**(9): 671-7.
- Pistner, H., H. Stallforth, et al. (1994). "Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. Part II: Physico-mechanical behaviour of implants." Biomaterials **15**(6): 439-50.
- Prokop, A., A. Jubel, et al. (2005). "A comparative radiological assessment of polylactide pins over 3 years in vivo." Biomaterials **26**(19): 4129-38.
- Radin, E. L. and R. M. Rose (1986). "Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage." Clin Orthop Relat Res(213): 34-40.
- Redman, S. N., G. P. Dowthwaite, et al. (2004). "The cellular responses of articular cartilage to sharp and blunt trauma." Osteoarthritis Cartilage **12**(2): 106-16.
- Redman, S. N., S. F. Oldfield, et al. (2005). "Current strategies for articular cartilage repair." Eur Cell Mater **9**: 23-32; discussion 23-32.
- Remes, A. and D. F. Williams (1992). "Immune response in biocompatibility." Biomaterials **13**(11): 731-43.
- Rogers, B. A., C. L. Murphy, et al. (2006). "Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage." J Bone Joint Surg Br **88**(12): 1670-4.
- Rosenberg, L. (1971). "Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **53**(1): 69-82.
- Shah, M. R., K. M. Kaplan, et al. (2007). "Articular cartilage restoration of the knee." Bull NYU Hosp Jt Dis **65**(1): 51-60.
- Shapiro, F., S. Koide, et al. (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **75**(4): 532-53.

- Simon, J. L., T. D. Roy, et al. (2003). "Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect." J Biomed Mater Res A **66**(2): 275-82.
- Simon, T. M. and D. W. Jackson (2006). "Articular cartilage: injury pathways and treatment options." Sports Med Arthrosc **14**(3): 146-54.
- Spindler, K. P., J. P. Schils, et al. (1993). "Prospective study of osseous, articular, and meniscal lesions in recent anterior cruciate ligament tears by magnetic resonance imaging and arthroscopy." Am J Sports Med **21**(4): 551-7.
- Stahelin, A. C., A. Weiler, et al. (1997). "Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases." Arthroscopy **13**(2): 238-44.
- Steadman, J. R., K. K. Briggs, et al. (2003). "Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up." Arthroscopy **19**(5): 477-84.
- Swieszkowski, W., B. H. Tuan, et al. (2007). "Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints." Biomol Eng **24**(5): 489-95.
- Tagil, M. and P. Aspenberg (1999). "Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo." J Orthop Res **17**(2): 200-4.
- Tew, S. R., A. P. Kwan, et al. (2000). "The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis." Arthritis Rheum **43**(1): 215-25.
- Trattinig, S., S. A. Millington, et al. (2007). "MR imaging of osteochondral grafts and autologous chondrocyte implantation." Eur Radiol **17**(1): 103-18.
- Trattinig, S., C. Plank, et al. (2004). "[Diagnostic imaging of cartilage replacement therapy]." Radiologe **44**(8): 748-55.
- Ulrich-Vinther, M., M. D. Maloney, et al. (2003). "Articular cartilage biology." J Am Acad Orthop Surg **11**(6): 421-30.
- Vahlensieck, M., T. Sommer, et al. (1998). "Indirect MR arthrography: techniques and applications." Eur Radiol **8**(2): 232-5.
- van Dyk, G. E., L. M. DeJardin, et al. (1998). "Cancellous bone grafting of large osteochondral defects: an experimental study in dogs." Arthroscopy **14**(3): 311-20.
- Verstraete, K. L., F. Almqvist, et al. (2004). "Magnetic resonance imaging of cartilage and cartilage repair." Clin Radiol **59**(8): 674-89.
- von Rechenberg, B., M. K. Akens, et al. (2003). "Changes in subchondral bone in cartilage resurfacing--an experimental study in sheep using different types of osteochondral grafts." Osteoarthritis Cartilage **11**(4): 265-77.
- Wagner, H. (1964). "[Surgical Treatment Of Osteochondritis Dissecans, A Cause Of Arthritis Deformans Of The Knee.]" Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **50**: 335-52.

- Wakitani, S. (2007). "[Present status and perspective of articular cartilage regeneration]." Yakugaku Zasshi **127**(5): 857-63.
- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1994). "Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **76**(4): 579-92.
- Wakitani, S., K. Imoto, et al. (1997). "Hepatocyte growth factor facilitates cartilage repair. Full thickness articular cartilage defect studied in rabbit knees." Acta Orthop Scand **68**(5): 474-80.
- Wei, X., J. Gao, et al. (1997). "Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint." J Biomed Mater Res **34**(1): 63-72.
- Wei, X. and K. Messner (1999). "Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint." J Biomed Mater Res **46**(4): 539-48.
- Weiland, A. J., J. R. Moore, et al. (1983). "Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases." Clin Orthop Relat Res(174): 87-95.
- Weiler, A., R. F. Hoffmann, et al. (2000). "Biodegradable implants in sports medicine: the biological base." Arthroscopy **16**(3): 305-21.
- Willers, C., T. Partsalis, et al. (2007). "Articular cartilage repair: procedures versus products." Expert Rev Med Devices **4**(3): 373-92.
- Williams, R. J., 3rd, J. C. Dreese, et al. (2004). "Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation." Am J Sports Med **32**(1): 132-9.
- Woodfield, T. B., J. M. Bezemer, et al. (2002). "Scaffolds for tissue engineering of cartilage." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **12**(3): 209-36.

11 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Georg N. Duda und Frau Professor A. Sterner-Kock für die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit, in diesem wissenschaftlichen Gebiet der medizinischen Forschung Erfahrungen zu sammeln.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Hanna Schell für die Durchführung der chirurgischen Eingriffe und der Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit. Des Weiteren möchte ich ihr für die konstruktive Kritik bei der wiederholten Durchsicht der Arbeit und der sich daraus ergebenden Diskussionen bei der Entstehung des Manuskriptes danken.

Ich danke den Tierärztinnen Dorothea Jansen, Julia Busse und Christiane Bose für die Unterstützung bei der Durchführung dieses tierexperimentellen Projektes. Bei dem „Schliff an der äußeren Form“ der Arbeit standen mir Steffen Wellensandt und Alexander Schill mit geduldigen und lehrreichen Hilfestellungen stets zur Seite. Weiterhin danke ich den histologischen Laboren des Julius Wolff Institutes für die Unterstützung bei der Herstellung der histologischen und immunhistologischen Präparate, sowie der histomorphometrischen Auswertung.

Nicht zuletzt möchte ich Swantje Ronge und Dr. Sven-Christian Steude danken, die unermüdlich jede Version des Manuskriptes aufs Neue gelesen haben und dabei immer offen und ehrlich Kritik übten. Abschließend möchte ich mich bei Dr. Ralf Kleemann, Florian Streitpart, Dr. Jasmin Lienau und Devakar Epari für die Unterstützung bedanken.

12 *Selbstständigkeitserklärung*

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Liv Matz

Berlin, den 28.04.2010