

Aus dem
CharitéCentrum für Laser- und Medizintechnologie
Klinik für Medizinische Physik und Lasermedizin

Direktor Uni. Prof. Dr. Ing. G. Müller Prof. h.c. Dr. h.c. mult.

Habilitationsschrift

„Neue Ansätze zur Knorpelgeweberestitution durch selektiven Wärmeeintrag mittels Laserstrahlung“

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Lasermedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Eike Eric Scheller
geboren am 25.01.1957 in Goslar/Harz

Eingereicht: April 2008

Dekanin: Fr. Prof. Dr. Anette Grüthers-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Weise

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Steiner

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	3
2	Physikalische und technische Grundlagen der Laser	5
2.1	Laserprinzip	5
2.2	Eigenschaften der Laserstrahlung	8
2.3	Aufbau der medizinischen Lasersysteme	10
2.4	Lichttransmissionssysteme	13
2.5	Anwendungsmethoden der Laserstrahlung	15
2.5.1	Der berührungslose Einsatz	15
2.5.2.	Die Kotaktmethode	15
3	Biophysikalische Wirkungen der Laserstrahlung am Gewebe	17
3.1	Wirkprinzipien	17
3.2	Laser-Gewebe-Effekte	20
3.2.1	Photochemische Effekte	20
3.2.2	Thermische Effekte	22
3.2.3	Photodekompositionseffekte	25
3.3	Ermittlung der optischen Eigenschaften von Rinder-Knorpelgewebe	27
3.3.1	Problemstellung und Aufgabe	27
3.3.2	Material und Methode	27
3.3.2.1	Absorption	28
3.3.2.2	Streuung	29
3.3.2.3	Streulichtmessung	30
3.3.2.4	Messablauf	33
3.3.3	Absorptions- und Streukoeffizienten	34
3.3.4	Laserchirurgie und -therapie	38
4	Medizinische Lasersysteme	39
5	Problemstellung	46
5.1	Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels	46
5.2	Pathologie des Gelenkknorpels	54
5.3	Behandlung des Knorpelschadens	59

6	Experimentelle Untersuchungen zum Einsatz der Laser am Knorpelgewebe	64
6.1	In-vitro-Untersuchungen der Lasersysteme am Knorpelgewebe	64
6.1.1	Einfluss der Wellenlänge, Leistungsdichte und Einwirkzeit der Laserstrahlung auf Chondrozytenkultur	64
6.1.2	Syntheseleistung und Signaltransduktionskaskade nach Einwirkung von niedrigerenergetischer Laserbestrahlung	78
6.1.3	Zusammenfassung und Diskussion	91
6.1.4	Schneideigenschaften medizinischer Lasersysteme am humanen Knorpel	100
6.1.5	Einsatz des Er:YAG-Lasers zur Bearbeitung von Knorpelgewebe	106
6.2	In-vivo-Untersuchungen der Lasersysteme am Knorpelgewebe	120
6.2.1	Synoviale Reaktionen nach konventioneller und laserchirurgischer Knorpeloperation an Schweinegelenken	120
6.2.2	Schneideigenschaften des Er:YAG-Lasers während der Operationen am Kaninchenknorpel	144
6.2.3	Einfluss der Bestrahlung mit niederenergetischem Laserlicht auf Proteoglykanabbau im arthrotischen Kaninchenknorpel	147
6.2.4	Ultrastrukturelle Veränderungen eines experimentellen Knorpelschadens unter dem Einfluss der Bestrahlung mit Laserlicht niedriger Leistungsdichte	159
6.2.5	Zusammenfassung und Diskussion Proteoglykanabbau und ultrastrukturelle Veränderungen bei Osteoarthrose nach Laserbestrahlung	173
7	Stand und Perspektiven des biologischen Resurfacing von Knorpel	178
7.1	Aktueller Stand der autologen Chondrozytentransplantation (ACT)	178
7.2	Möglichkeiten des Lasereinsatzes in der arthroskopischen Chirurgie	185
7.3	Einfluss der Laserbestrahlung auf den Zellstoffwechsel	192
7.4	Gewebefusion durch selektiven Wärmeeintrag und ihre Bedeutung für das biologische Resurfacing vom Knorpelgewebe	200
8	Zusammenfassung	204
9	Literaturverzeichnis	207
10	Danksagung	225
11	Eidesstattliche Versicherung	226

1. Einleitung

Die Entwicklung des Lasers und der ständige Fortschritt auf dem Gebiet der Lasertechnik in den letzten Dekaden beeinflussen die moderne Heilkunde. Laser erwiesen sich als gut steuerbare Energiequellen, die das diagnostische und therapeutische Potenzial in allen medizinischen Disziplinen wesentlich zu erweitern vermögen.

Blickt man auf die Geschichte des Lasers, so ist erstaunlich, wie schnell sich diese neue Technik in einer Vielfalt von Anwendungen verbreitet hat. Seit Maiman 1960 den ersten Laser konstruierte, wächst die Zahl der Anwendungsmöglichkeiten in rasantem Tempo. Dabei ist die Geschichte medizinischer Laseranwendungen eng mit der Geschichte des Lasers verknüpft.

Das Wort LASER ist ein Akronym aus **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation. Dies bedeutet eine Lichtverstärkung durch stimulierte Emission. Dieses Prinzip, bereits 1917 von Einstein postuliert, ist die Grundlage für die Erzeugung monochromatischen, kohärenten und kollimierten Lichts, womit höhere Leistungs- bzw. Energiedichten und höhere spektrale Reinheit erreichbar sind als mit jeder anderen Lichtquelle. Townes realisierte 1954 den ersten "MASER" (ein Lichtverstärker für Millimeterwellen); 1958 wurde das Laserprinzip erstmals durch Schawlow und Townes (USA) sowie durch Bassov und Prokhorov (UdSSR) dargestellt. Maiman baute 1960 den ersten Laser mit sichtbarem Licht (Rubinlaser), Javan folgte mit dem ersten infraroten Gaslaser (He-Ne) im gleichen Jahr. Der Bau des ersten Neodymlasers mit der Kopplung an eine optische Faser erfolgte 1961 durch Snitzer.

In der Medizin setzten 1961 Campbell in der Augenheilkunde und 1963 Goldman in der Dermatologie den Rubinlaser ein. Während in der Augenheilkunde der Laser, vor allem der Argonionenlaser, sich von da an einen festen, allgemein anerkannten Platz in der Therapie erobern konnte, fanden die Laser erst nach und nach Einzug auch in die anderen Bereiche der Medizin. Mester, ein Arzt aus Budapest, hat zuerst 1964 mit einem Rubinlaser, dann 1974 mit einem niederenergetischen Helium-Neon-Laser die Biostimulation versucht. Ein weiterer Laser, der in den übrigen Bereichen der Medizin Eingang gefunden hat, ist der Kohlendioxidlaser (CO₂-Laser), der als Lichtskalpell bezeichnet werden kann. Die ersten Anwendungen fanden zwischen 1965 und 1967 durch Polanyi und später durch Kaplan statt. Danach hat er seinen zwar langsamen, aber stetigen Weg in die verschiedenen medizinischen Disziplinen nehmen können. Der Argon- und vor allem der Nd:YAG-Laser wurden für die breitere medizinische Applikation erst interessant, als es gelang, sie in Fasern einzukoppeln. 1971 entwickelte Nath eine Faser, die er zusammen mit Kiefhaber 1973 erstmals im Tierversuch über Endoskope im Magen-Darm-Trakt anwandte. Die weitere Entwicklung ging dann sehr schnell voran. 1975 haben Dwyer in den USA und Frühmorgen in Erlangen einen Argonlaser zur Stillung von Magenblutungen an Patienten benutzt. Ende 1975 hat Kiefhaber dafür einen Nd:YAG-Laser eingesetzt. 1976 erfolgte durch Hofstetter der Einsatz in der Urologie, und 1979 meldete Choy ein Patent zur Eröffnung verkalkter Arterien mit dem Argonlaser an. Nachdem 1960 das Hämatoporphyrinderivat entdeckt worden war, fanden mit dieser Substanz 1972 erstmals durch Diamond Anwendungen in der photodynamischen Therapie statt, die dann 1975 von Dougherty recht weit standardisiert werden konnten.

Bei den gepulsten Systemen wurden 1977 erstmals Güteschaltung (Q-switching) und Phasenkopplung (Mode-locking) von Frankhauser und Aron-Rosa in der Ophthalmologie eingesetzt. 1983 fand in diesem Fachgebiet auch der erste Einsatz des Excimer-Lasers durch Trokel statt. In den folgenden Jahren hat der Laser nach und nach im medizinischem Bereich einen festen Platz erworben. Durch die Entwicklung der verschiedensten Applikationsformen

wurde es möglich, den Lasereinsatz auf immer neue Anwendungsgebiete zu erweitern. Seit ihren ersten Einsätzen im Jahre 1983 durch Bown zur Behandlung von Lebertumoren und 1984 durch Ascher zur Behandlung von Hirntumoren gewinnt die interstitielle Laser-induzierte Thermotheapie (LITT) zunehmend an Bedeutung. Seit 1984 wird von Berlien die Behandlung von vaskulären Malformationen und Hämangiomen mittels interstitieller LITT durchgeführt. Mit dieser lokoregionalen Therapie können die bisher für die Behandlung der benignen und malignen Organtumoren zur Verfügung stehenden Standardtherapien sinnvoll ergänzt werden. In den 90-er Jahren kam es zu einem Aufbruch im Bereich der interstitiellen Laserinduzierten Thermotheapie (LITT). Dank der Entwicklung von diffus streuenden Applikatoren durch die Arbeitsgruppe um Müller konnten die großen Weichteiltumoren nach Punktion des erkrankten Gewebes und lokaler Erwärmung in loco zerstört werden. Heute steht dem Arzt bereits eine Vielzahl von Lasern für die verschiedenen Indikationen zur Verfügung. In den letzten Jahren konnten zahlreiche neue Anwendungsfelder erschlossen werden. Diverse Lasertherapiemethoden konnten sich insbesondere bei der Behandlung von Weichgewebe in vielen medizinischen Bereichen als Standardverfahren etablieren. Im Vergleich dazu befindet sich der Einsatz der Lasertechnologie zur Behandlung von Hartgewebe in den medizinischen Fachgebieten Orthopädie und Unfallchirurgie erst auf dem Vormarsch. Die Ursachen dafür liegen nicht zuletzt darin, dass die für eine erfolgreiche Laserbehandlung notwendigen biomedizinischen und technisch-physikalischen Grundlagen bisher nur teilweise erforscht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Untersuchungen zu regenerativen Prozessen bei der Knorpelgeweberestitution unter Lasereinsatz evaluiert und neue Ansätze für die therapeutische Anwendung der Laserstrahlung im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie erforscht.

2 Physikalische und technische Grundlagen der Laser

2.1 Laserprinzip

Ein Laser ist ein Gerät zur Umwandlung von elektrischer Energie in "geordnete" Lichtenergie. Die von Einstein postulierte induzierte Emission ist zwar als Effekt in jeder Leuchterscheinung von Materie rudimentär vorhanden, kann aber nur in ausgewählten Medien wirklich zur Dominanz gebracht werden.

Spontane Emission von Licht bedeutet, dass einem Körper (Gas, Flüssigkeit oder Festkörper) Energie zugeführt wurde, so dass die "Leuchtelektronen" aus dem Grundzustand n_1 in einen angeregten Zustand (Niveau) n_2 gebracht wurden und das Elektron nach einer charakteristischen Zeit wieder spontan in den Grundzustand übergeht und ein Photon aussendet. Die Verteilung der Elektronen auf den Grundzustand und die angeregten Zustände (Besetzungszahl) hängen von der Temperatur ab (Abb. 1), je höher die Temperatur, desto mehr Elektronen befinden sich im Mittel in angeregten Zuständen. Bei einer thermischen Lichtquelle (Glühbirne) wird ständig Energie durch Erwärmen zugeführt, um Elektronen wieder in höhere Niveaus zu "pumpen". Die Verweildauer in den angeregten Niveaus ist kurz; damit das Elektron wieder in den Grundzustand übergehen kann, darf dieser nicht komplett gefüllt sein. Eine Anregung eines Elektrons kann auch durch Einstrahlung von Licht erfolgen, durch Absorption der entsprechenden Energiedifferenz E wird das höhere Niveau besiedelt. Neben einem direkten Übergang von einem höheren Niveau direkt zum Grundniveau kann dies auch in Stufen über andere Niveaus erfolgen. Da die Lebensdauer der Niveaus unterschiedlich ist, d. h. die Niveaus unterschiedlich schnell entleert werden, können sich Elektronen in höheren Niveaus "ansammeln". In diesem Fall spricht man von Besetzungsinversion.

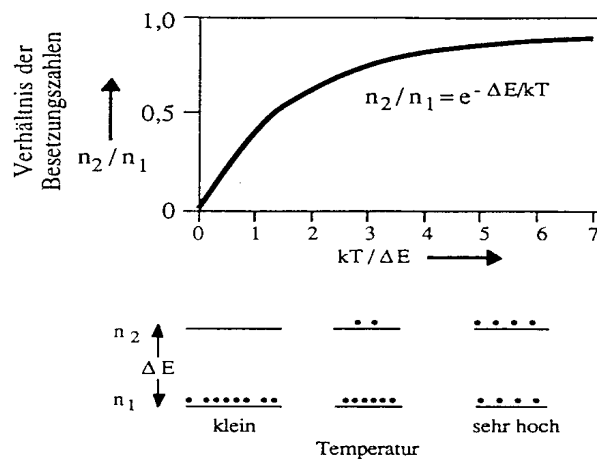


Abb. 1: Niveau-Schema für ein „Leuchtelektron“ und die Besetzungszahl für verschiedene Temperaturen [Dörschel 1989a].

Die induzierte Emission ist ein Prozess, bei dem durch Einstrahlung eines Photons passender Energie der vorzeitige Übergang des Elektrons aus dem besetzten höheren Niveau in das teilweise entleerte Grundniveau stimuliert wird. Die Besonderheit ist, dass das emittierte Photon die gleiche Wellenlänge, Richtung und Phase wie das einfallende Photon besitzt. Das Photon wurde also "verstärkt". Die meisten Laser nutzen mehrere Niveaus, die sich in der Lebensdauer und der Besetzungszahl unterscheiden, das Schema für einen 3- bzw. 4-Niveau-Laser zeigt Abb. 2.

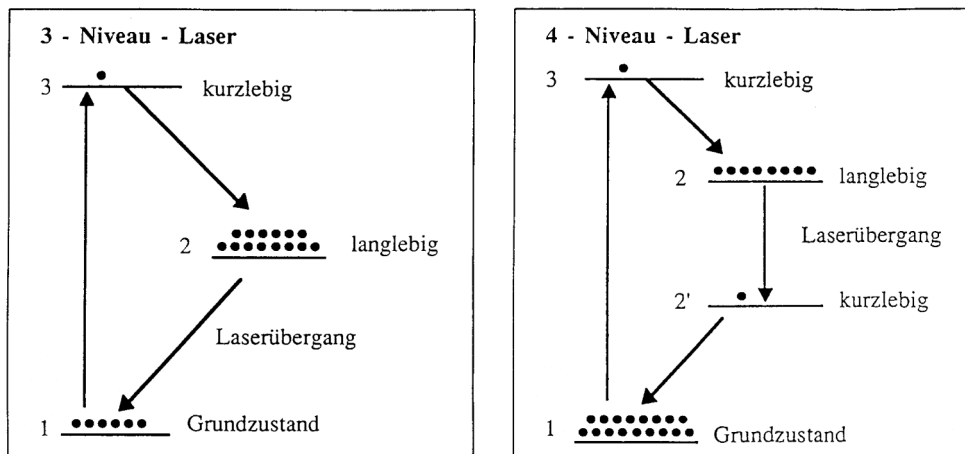


Abb. 2: Niveauschemata [Dörschel 1989a].

Für den Laserprozess muss die Zahl der Atome, bei denen das höhere, obere Laserniveau besetzt ist, immer größer gehalten werden als die Besetzungszahl des niedrigen, unteren Laserniveaus. Als Lasermedium können alle Stoffe verwendet werden, bei denen eine Besetzungsinversion erzeugt werden kann, z. B. freie Atome, Ionen, Moleküle, Molekülionen in Gasen oder Dämpfen, Farbstoffmoleküle in Flüssigkeiten gelöst, Atome und Ionen in Festkörpern eingebaut, dotierte Halbleiter und freie Elektronen. Der jeweilige Anregungsmechanismus für die Erzeugung einer Besetzungsinversion ist sehr speziell für den jeweiligen Lasertyp. Die wesentlichen Verfahren sind das optische Pumpen und die elektrische Gasentladung. Bei den Halbleiterlasern erfolgt die Anregung direkt durch elektrischen Strom. Auch chemische Reaktionen können zum Anregen genutzt werden. Bei kontinuierlich strahlenden Lasern muss die Besetzungsinversion ständig aufrechterhalten werden, d. h. es muss kontinuierlich "Pumpenergie" zugeführt werden.

Im Lasermedium emittieren angeregte Atome bereits spontan Photonen in alle Richtungen. Diese können nun im Lasermedium durch induzierte Emission weitere Photonen erzeugen, die dann ihrerseits wiederum induzierte Photonen freisetzen usw. Dieser Vorgang setzt sich lawinenartig fort, bis die Photonen das Lasermedium verlassen. Gibt man dem Lasermedium in einer Richtung eine große Ausdehnung, so werden sich Photonenlawinen, die zufällig in der Längsrichtung entstehen, bedeutend mehr verstärken als in anderer Richtung, weil sie länger im Lasermedium laufen.

Durch zwei Spiegel an beiden Enden kann man die Photonenlawine wieder in das Lasermedium reflektieren und so eine weitere Verstärkung erreichen. Bei optimaler Justierung der Spiegel kann die Photonenlawine bis zu einigen hundert Malen in der "Resonator" genannten Spiegelanordnung im Lasermedium hin und her laufen.

Damit ein Teil der Photonen den Resonator als nutzbarer Laser verlassen kann, wird einer der Resonatormirrors teildurchlässig ausgeführt.

Abb. 3 zeigt einen Vergleich zwischen einem Hochfrequenzsender mit den Komponenten Verstärker und Rückkopplung und einem Laser, bei dem Lasermedium und Resonator aus den beiden Spiegeln die entsprechenden Funktionen besitzen.

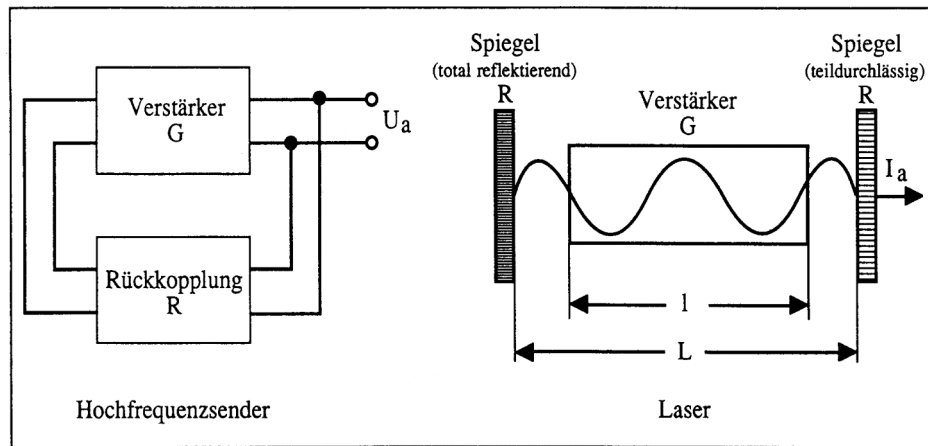


Abb. 3: Vergleich des Funktionsprinzips eines Hochfrequenzsenders und eines Lasers mit dem Lasermedium als Verstärker [Dörschel 1989b].

2.2 Eigenschaften der Laserstrahlung

Im Unterschied zur thermischen Lichtquelle sind es insbesondere drei Eigenschaften des Laserlichts (Abb. 4), die für die medizinische Anwendung von Bedeutung sind:

- **Kohärenz:** die Strahlung hat eine bestimmte räumliche und zeitliche Zuordnung (Phasenbeziehung),
- **Kollimation:** die Strahlung des Lasers ist gebündelt (geringe Divergenz),
- **Monochromasie:** alle Wellenzüge weisen die gleiche Wellenlänge bzw. Frequenz und somit die gleiche Energie auf.

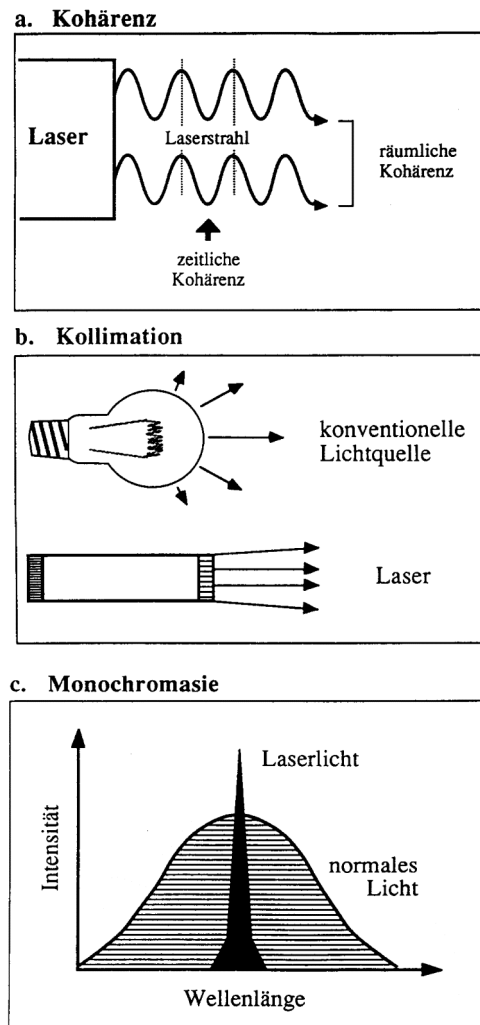


Abb. 4: Eigenschaften von Laserlicht [Müller 1989a].

Diese drei Eigenschaften machen die gute Fokussierbarkeit zur Erreichung hoher Energiedichten und damit auch das exakte Arbeiten mit einem Strahl kleinster Querschnittsfläche möglich.

Bei der Laseranwendung spielt die Qualität der Laserstrahlung eine wichtige Rolle. Die Strahlen eines Lasers sind zwar gebündelt, jedoch weisen sie keine scharfe Begrenzung auf, so dass mit Zunahme der Entfernung vom Zentrum des Strahlenbündels die Intensität des Lichtes abnimmt. Die Qualität des erzeugten Laserstrahls wird durch die Feldverteilung des Laserlichtes im Nah- und Fernfeld bestimmt. Die Intensitätsverteilung des Strahls hängt mit der Modenstruktur

zusammen. Die günstigste Intensitätsverteilung weist der Grundmode auf. Sein Intensitätsmaximum liegt in der Mitte des Strahls und nimmt zum Rand hin glockenförmig ab. Der Grundmode hat den kleinsten Strahlendurchmesser und ist damit der wichtigste Mode für die Mehrheit der Laseranwendungen. Durch die Konzentrierung bzw. Fokussierung des Laserstrahls kann die Leistungsdichte (Strahlleistung/Strahlquerschnitt) um ein Mehrfaches gesteigert werden.

In der Praxis werden die Wechselwirkungen der Strahlung mit den verschiedenen Gewebearten im wesentlichen durch zwei Parameter bestimmt. Diese sind zum einen die Einwirkzeit der Strahlen auf das Gewebe, zum anderen die effektiv zur Wirkung gelangende Leistungsdichte (Abb. 5). Durch entsprechende Wahl der Fokusgröße kann die Leistungsdichte breit variiert werden.

Für differenzierte Betrachtungen müssen eine Vielzahl von Parametern betrachtet werden. Die gewebespezifischen Materialkonstanten wie Absorptions- und Streuverhalten spielen für das Verteilungsvolumen der Energie ebenso eine Rolle wie Brechungsindex und Wärmeleitverhalten der beteiligten Gewebe [Müller 1986a,b, Roggan 1997].

In Abhängigkeit von der technischen Realisierung kann die Laserstrahlung kontinuierlich (cw = continuous wave) bzw. getaktet oder gepulst appliziert werden. Damit lassen sich die verschiedenen Gewebewirkungen im Verhältnis von therapeutischem Effekt zu den Nebenwirkungen kontrollieren.

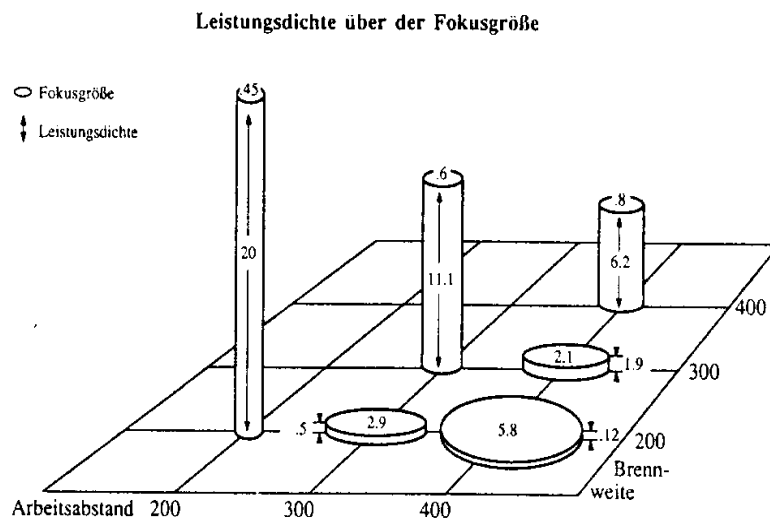


Abb. 5: Verhältnis von Fokusgröße und Leistungsdichte für verschiedene Brennweiten und Arbeitsabstände, Variation der Leistungsdichte und Fleckgröße beim Koagulieren und Schneiden [Müller 1986b].

2.3 Aufbau der medizinischen Lasersysteme

Lasengeräte bestehen nicht nur aus dem Lasermedium, dem Resonator und der Pumpquelle. Die wesentlichen Komponenten der medizinischen Laser sind in Abb. 6 dargestellt.

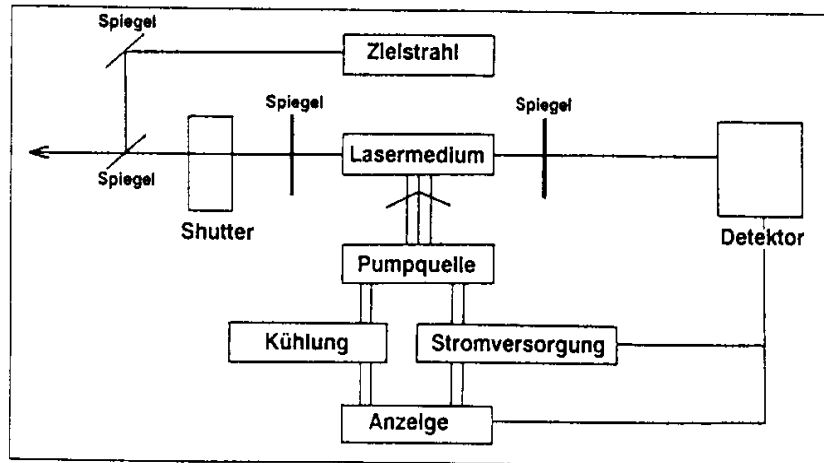


Abb. 6: Technische Komponenten eines Lasersystems, der Laserstrahl wird bei Wellenlängen außerhalb des sichtbaren Bereichs mit einem sichtbaren Zielstrahl markiert, der Detektor misst die Intensität oder Energie am Laserkopf, nicht dargestellt ist der Fußschalter zur Freigabe der Strahlung [Albrecht 2002].

Da nur ein kleiner Teil der aufgewendeten Energie in Laserlicht umgewandelt wird, muss ein erheblicher Teil als Wärme abgeführt werden. Abb. 7 gibt eine Zusammenstellung der Relation Pumpenergie zu Laserenergie für die gebräuchlichsten Lasertypen. Zum Vergleich beträgt die Lichtausbeute einer Halogenglühlampe ca. 3%. Der Wirkungsgrad eines Argonionenlasers beträgt $<0,1\%$, der eines Nd:YAG-Lasers ca. $1-3\%$ und der eines CO_2 -Lasers $5-20\%$.

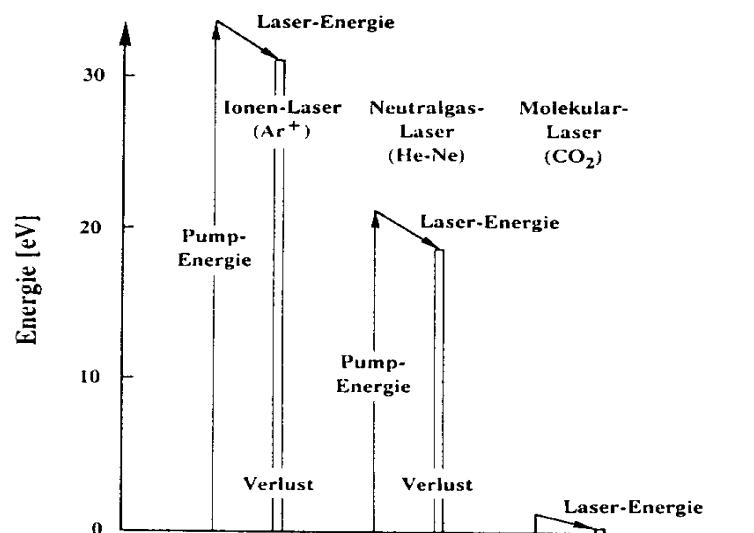


Abb. 7: Die Laserenergie in Relation zur Pumpenergie; die Verluste müssen durch Kühlung abtransportiert werden [Dörschel 1989a].

So wie in der Medizin bei verschiedenen Operationen spezielle Instrumente verwendet werden, gibt es auch zur Anpassung an das zu behandelnde Gewebe und die spezielle Therapie unterschiedliche medizinische Lasergeräte für verschiedene klinische Anwendungen (Abb. 8). Diese unterscheiden sich in ihrer Emissionswellenlänge, angegeben in Mikrometer (μm) oder Nanometer (nm), die im Bereich des Ultraviolett (UV) mit einer Wellenlänge von etwa $0,2 \mu\text{m}$ beginnt und bis ins Infrarote bis etwa $10 \mu\text{m}$ Wellenlänge reicht. Da die meisten Laser auf einem schmalen spektralen Übergang von Elektronen beruhen, kann man sie nicht einfach wie einen Radiosender durchstimmen; eine Ausnahme bilden Farbstofflaser, vibronische Festkörperlaser und der freie Elektronenlaser. Einige Gaslaser bieten zwar nach Art des gewählten Mediums mehrere Wellenlängen, aber auch diese sind nicht veränderbar. Ferner unterscheiden sich Lasersysteme in ihrer technisch-physikalischen Ausgestaltung, was die konstruktive Anordnung und das Zeitverhalten des Laserstrahles betrifft.

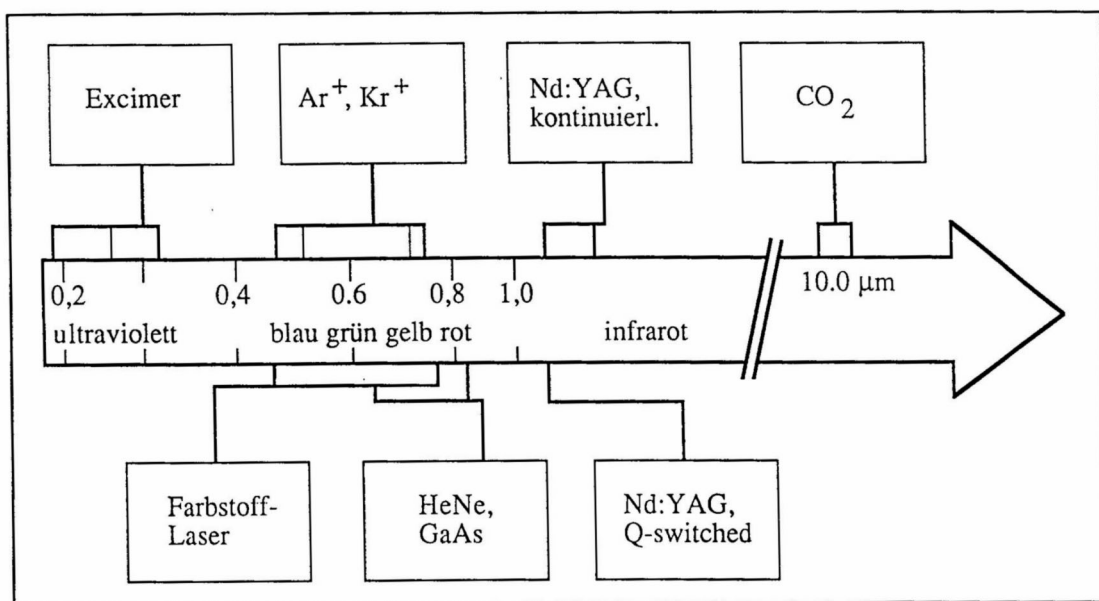


Abb. 8: Medizinische Lasersysteme mit ihren spezifischen Wellenlängen [Müller 1986b].

Der Laser allein stellt nur eine Lichtquelle dar, für die medizinische Anwendungen benötigt wird ein komplettes System, das mit einem Übertragungssystem und einem Endgerät die Strahlung dirigierbar an das zu therapierende Gewebe bringt und ein Verfahren zur Kontrolle der Wirkung. Je nach Wellenlänge im sichtbaren oder infraroten Spektralbereich wird zur Übertragung eine Glas- oder Quarzfaser, ein Faserbündel, ein Hohlleiter oder ein Spiegelgelenkarm verwendet. Endgeräte können ein Operationsmikroskop mit Mikromanipulator, ein Endoskop oder eine Spaltlampe sein (Abb. 9). Die Kontrolle der Wirkung hängt vom laserinduzierten Prozess ab und beruht in vielen Fällen auf der visuellen Beurteilung durch den erfahrenen Therapeuten. Bei sehr differenzierten Vorgehensweisen mit einer präzisen Dosissteuerung, wie bei der interstitiellen Thermotherapie von Tumoren oder Metastasen, können auch bildgebende Systeme, wie Ultraschall oder Magnetresonanztomografie zum Einsatz kommen.

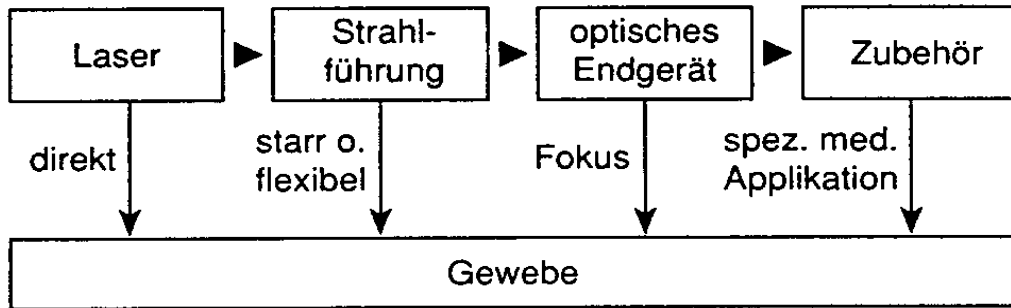


Abb. 9: Der laser als Systemkomponent für die medizinische Therapie [Müller 1988].

2.4 Lichttransmissionssysteme

Für die Applikation der Laserstrahlung auf das zu behandelnde Gewebe muss die Entfernung Lasergeräteausgang und Patient überbrückt werden.

Für die Übertragung von sichtbarem Laserlicht und den angrenzenden Spektralbereichen von ca. 0,3-2 μm lassen sich flexible Glas- bzw. Quarzfasern, ggf. mit spezieller Dotierung verwenden. Außerhalb dieses Bereiches werden Spiegelgelenkarme verwendet, um die Bereiche 0,19-0,3 μm (Excimer-Laser) oder 3-10 μm (Erbium- und CO_2 -Laser) abzudecken (Abb. 10). Spezielle Lichtleitfasern für den 3- μm - und den 10- μm -Bereich befinden sich in Erprobung, ebenso wird versucht, mit Hohlleitern CO_2 -Laserstrahlung über kurze Entfernung zu übertragen.

Besondere Anforderungen werden bei der Übertragung kurzgepulster, energiereicher Laserstrahlung zur Laserlithotripsie und Laserangioplastie an die Lichtleitfasern gestellt [Muschter 1990, Gross 1994, Albrecht 2002]. Durch intensive Forschungsarbeiten in den letzten Jahren konnten hier entscheidende Verbesserungen erreicht werden.

Laser		λ [μm]	Betriebsart	Faser
Excimer	ArF	0,193	gepulst	Quarz Glas
	KrF	0,248	gepulst	
	XeCl	0,308	gepulst	
	XeF	0,351	gepulst	
Dye	0,488 - 0,960	cw/gepulst		
Argon	0,488/0,514	cw		
Nd:YAG/SHG	0,532	cw/gepulst		
HeNe	0,543/0,593	cw		
	0,604/0,633	cw		
Krypton	0,647/0,676	cw		
Rubin	0,694	gepulst		
Alexandrit	0,710 - 0,820	gepulst		
Tl:Saphir	0,700 - 1,000	cw/gepulst		
Diode, Ga(Al)As	0,750 - 0,950	cw/gepulst		
Nd:YAG	1,064/1,319	cw/gepulst		
Nd:YLF	1,047/1,313	cw		
Ho:YSSG	2,088	gepulst		
Ho:YAG	2,0975	gepulst		
Er:YSSG	2,795	gepulst		
Er:YAG	2,94	gepulst		
CO	5,0 - 6,0	cw	polykristalline Silberhalogenide Hohlleiter	
CO ₂	9,6/10,6	cw/gepulst		

Abb. 10: Laserwellenlängen und spezifische Lichtwellenleiter für verschiedene Lasersysteme [Albrecht 2002].

Neben den bereits erwähnten Standardapplikatoren wurden für neue Anwendungen spezielle Ausführungen entwickelt. Für die interstitielle Erwärmung und Koagulation von Tumoren oder Metastasen wurden diffus abstrahlende Applikatoren entwickelt, die eine allseitige Abstrahlung und homogene Verteilung der Photonen im Gewebe ermöglichen. Für die Behandlung bestimmter Arrhythmieformen durch die EKG-kontrollierte Koagulation von Gewebe im Bereich des AV-Knotens wird durch einen kombinierten EKG-Laser-Katheter Laserlicht "um die Ecke geführt" und intrakardial appliziert.

Die Laserangioplastie nutzt für die Übertragung der Strahlung des Excimer-Lasers bei 308 nm einen Schlauch mit vielen dünnen Quarzfasern, um gleichzeitig einen großen Querschnitt für die Übertragung der Laserstrahlung, einen Spülkanal und eine hohe Flexibilität des gesamten Katheters zu erhalten.

2.5 Anwendungsmethoden der Laserstrahlung

2.5.1 Der berührungslose Einsatz

Beim berührungslosen Einsatz von medizinischen Lasern wird die Laserstrahlung über Strahlführungssysteme an das Gewebe gebracht, ohne dass dabei das Gewebe berührt wird. Strahlführungssysteme, die für den berührungslosen Einsatz in Frage kommen, sind Spiegelgelenkarm und Quarz- bzw. Glasfasern. Gegenüber Spiegelgelenkarmen sind Lichtleiter flexibler. Die Strahlführungssysteme können an optische Endgeräte wie Fokussierhandstücke, Mikromanipulatoren bei Verwendung von Operationsmikroskopen oder von Spaltlampen in der Ophthalmologie angeschlossen werden. Abb. 11 zeigt einen Vergleich der Anwendungsarten.

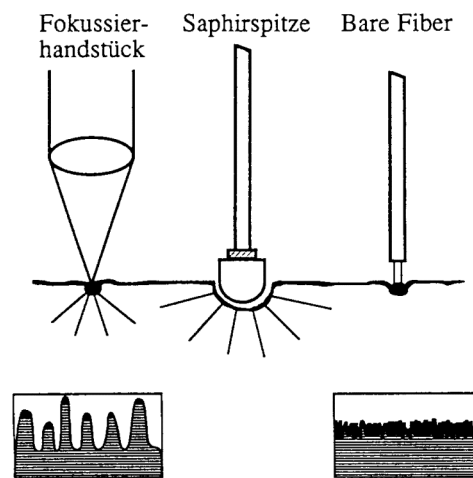


Abb. 11: Unterschiedliche Wirkung verschiedener Applikatoren [Müller-Stolzenburg 1989].

2.5.2 Die Kontaktmethode

Das zu behandelnde Gewebe wird im direkten Kontakt mit dem Faserende (Bare Fiber) bzw. auf das Faserende aufgesetzte Saphirspitzen (hot tips) gebracht. Der Durchmesser handelsüblicher Lichtleiter (0,05-1 mm) erlaubt den endoskopischen Einsatz. Durch die heiße Faserspitze vaporisiert das Gewebe, und eine scharf begrenzte homogene Karbonisationszone bleibt als Schnittkante. Für diese Anwendungen werden heute Fasern mit speziell präparierten Spitzen, sog. sculptured fibers mit fokussierenden Spitzen angeboten, um eine sichere Handhabung beim Laserschneiden zu ermöglichen. Entsprechendes kann auch mit einer geschwärzten Faserspitze, vom Anwender selbst präpariert, erreicht werden, wobei hier durch ein "Freibrennen" der Spitze ein Wechsel der Anwendung zum berührungslosen Einsatz, z. B. zur Koagulation, leicht möglich ist.

Zum Schutz der patientenseitigen Optiken der Endgeräte, der Stirnfläche des Applikators oder der Faserspitze können die Endflächen mit Schutzgas gespült werden. Mit dem Nd:YAG-Laser kann auch unter Flüssigkeitsspülung gearbeitet werden. Die Spülung vergrößert die Schnitttiefe in Weichgewebe, indem die entstehenden Verdampfungsprodukte oder Ablationsprodukte aus dem Schnittkanal gespült werden und die Laserstrahlung ungehindert eindringen lassen. Bei der

Photoablation im Kontakt kann der photohydraulische Effekt die Wirkung weiter verstärken, so dass Ablationskanäle entstehen, die die Faser ungehindert passieren lassen.

3 Biophysikalische Wirkungen der Laserstrahlung am Gewebe

3.1 Wirkprinzipien

Die Wirkung des Laserlichtes auf biologisches Gewebe beruht auf einer Interaktion der Photonen mit Molekülen des Gewebes und ist einerseits von der Eigenschaften der Laserstrahlung (Wellenlänge, Leistungsdichte, Expositionszeit), andererseits von den optischen und thermischen Eigenschaften des Gewebes abhängig.

Die optischen Gewebeeigenschaften (Absorptionskoeffizient (μ_a), Streukoeffizient (μ_s) und Anisotropiefaktor (g)) bestimmen die Verteilung des Laserlichtes im Bestrahlungsvolumen. Bei der Absorption wird Laserenergie auf das Zielgewebe übertragen, indem Lichtquanten Gewebemoleküle in einen angeregten Energiezustand überführen. Es kann daher nur der vom Gewebe absorbierte Anteil der Laserstrahlen Veränderungen hervorrufen.

Tritt Licht tief in das Gewebe ein und verteilt sich dort gleichmäßig, so spricht man von Streuung. Wird das Licht komplett vom Gewebe reflektiert oder tritt es vollständig durch dieses hindurch (Transmission), so findet keine Interaktion von Laserlicht und Gewebe statt [Helfmann 1989a,b, Müller 1989b, Roggan 1989].

Abb. 12 stellt die Absorptionskoeffizienten für die wichtigsten Bestandteilen des biologischen Gewebes dar. Im sichtbaren Spektrum bestehen zum Teil spezifische Absorptionen, zum Beispiel an Hämoglobin und Melanin, die die Eindringtiefe in das Gewebe begrenzen. Im nahen Infrarot verteilt sich die Strahlung recht homogen im biologischen Gewebe, deshalb kann die Eindringtiefe wellenlängenabhängig mehr als 5 mm betragen (Abb. 13).

Im mittleren und fernen Infrarot (3,0 bis 10,6 μm) wird die Lichtenergie im wesentlichen im Wasser absorbiert. Verglichen mit der Absorption der Laser im sichtbaren Bereich hat man es mit einer 10-100 fach effektiveren Ankopplung zu tun, so dass die Eindringtiefe und das Verteilungsvolumen sehr gering sind. Dabei kommt es bereits bei geringeren Leistungsdichten zu einer Verdampfung des biologischen Materials. So lässt sich Gewebe abtragen und schneiden, ohne dass eine wesentliche thermische Schädigung der Umgebung auftritt.

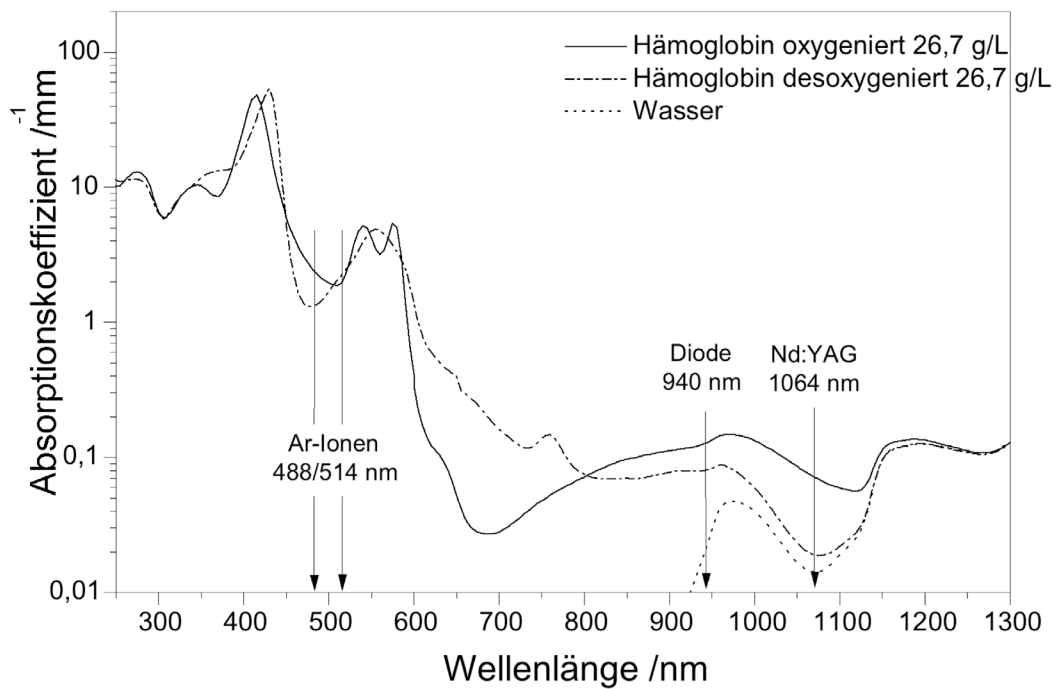


Abb. 12: Absorptionskoeffizient als Funktion der Wellenlänge für die wichtigsten Bestandteile des biologischen Gewebes [Rohde 2001].

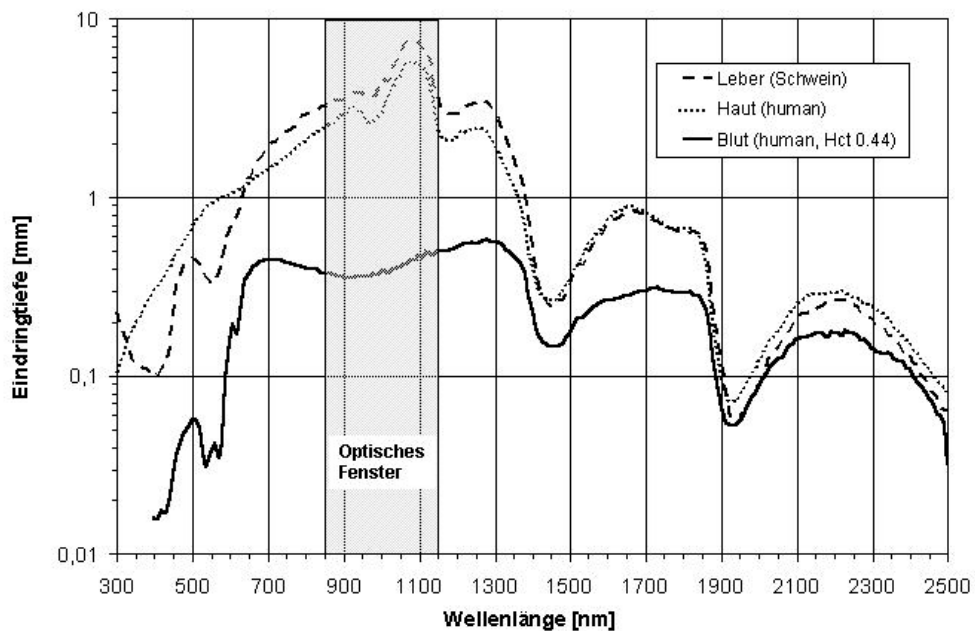


Abb. 13: Eindringtiefe des Lichtes als Funktion der Wellenlänge [Roggan 1999].

Neben der in starkem Maße von der Wellenlänge abhängigen Absorption und den unterschiedlichen Eindringtiefen bzw. dem stark unterschiedlichen Ausbreitungsverhalten, die eine ausgeprägte Gewebeselektivität bewirken, ist es vor allem die Möglichkeit der Applikation einer Strahlungsenergie in unterschiedlichen Zeitdauern, die völlig verschiedene Leistungsdichten mit stark unterschiedlichen Wirkungen hervorbringt. Dabei ist die unmittelbare physikalische Folge der Bestrahlung zu unterscheiden von der eigentlich beabsichtigten medizinisch-biologischen Wirkung, deren Eintreten oft erst lange nach Abschluss der Einwirkung der Laserstrahlung beurteilt werden kann. Je nach Art der Behandlung müssen dabei unterschiedliche Zeiten berücksichtigt werden (Abb. 14).

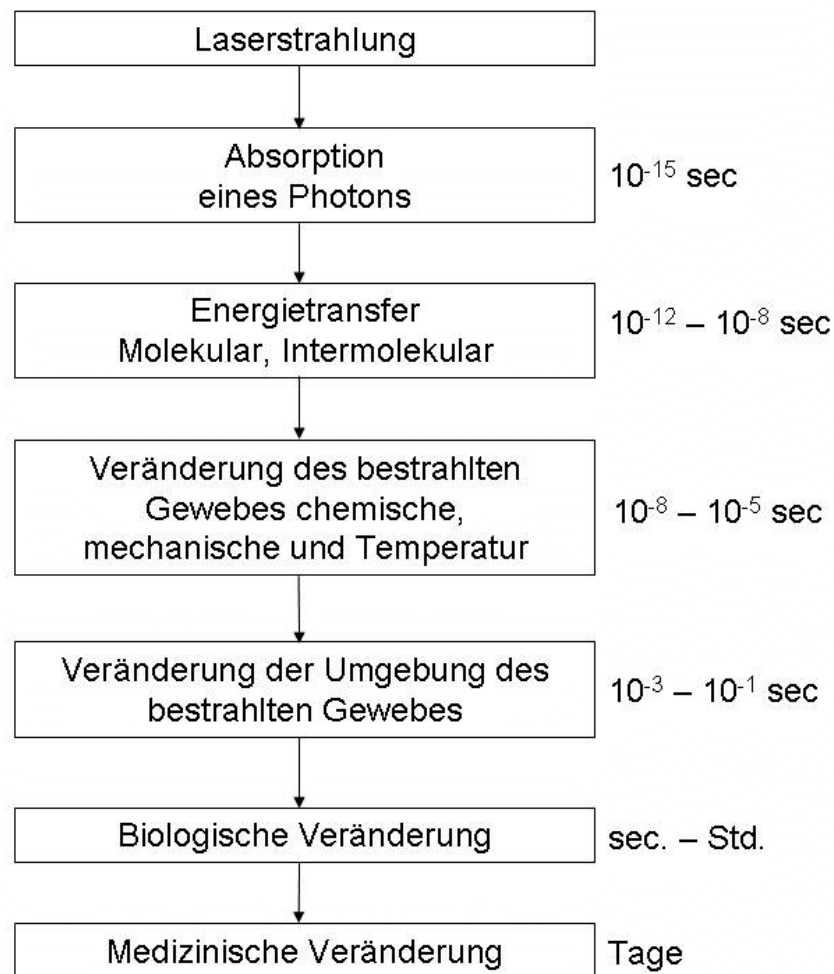


Abb. 14: Zeitachse für die medizinische Laseranwendung von der Laserbestrahlung bis zum endgültigen medizinischen Behandlungsergebnis.

dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Photosensibilisators entspricht, kommt es an dieser Stelle zu einer Absorption der Strahlung. Als lichtabsorbierende Reaktionsvermittler dienen vor allem Hämatoporphyrinderivate (HPD) und Phtalocyanine. Der phototoxische Effekt, der zur lokalen Tumorzerstörung führt, wird durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen hervorgerufen. Die niedrige Leistungsdichte der Laserstrahlen verhindert thermische Nebenwirkungen [Fuchs 1996, Bäumlner 2003, Plaetzer 2003].

Über die zunehmende therapeutische Bedeutung der Laserbiostimulation (Low-Level-Lasertherapie (LLLT)) wird neuerdings auch im angelsächsischen Raum berichtet. Bereits seit Jahren wird das niederenergetische Laserlicht (650-980 nm) u.a. zur Schmerztherapie, Wundbehandlung und Therapie von entzündlichen Prozessen in zahlreichen medizinischen Bereichen eingesetzt.

Von Kritikern wird die methodische Qualität vieler Studien zur Low-Level-Laser-Therapie bemängelt. Angaben zu Leistungs- und Energieparametern sowie zu den Bestrahlungsbedingungen sind häufig nicht ausreichend. Neben der berichteten therapeutischen Wirksamkeit liegt auch eine größere Anzahl von Veröffentlichungen vor, die diese Beobachtungen nicht bestätigen konnten. Inzwischen sind seriöse Anstrengungen unternommen worden, um genau hier Abhilfe zu leisten. Sowohl was die Theorie des Wirkungsmechanismus auf molekularer Ebene angeht, wie auch in der Beweisführung bezüglich des Nachweises der Effektivität dieser Behandlungsmethode können inzwischen einige Ergebnisse ins Feld geführt werden [Karu 2005].

Die postulierten Wirkmechanismen der LLLT sind Anregung des Stoffwechsels durch vermehrte ATP-Bildung und Steigerung der Durchblutung im bestrahlten Gewebe. Wahrscheinlich wird der molekulare Wirkmechanismus über eine Änderung des zellulären Membranpotentials vermittelt. Dies kann durch Aktivierung der membranständigen Atmungskette, deren Enzyme Chromophore sind, erreicht werden. Wird die membranständige Na/K-ATPase mittels Laserlicht aktiviert, so kann dies ebenfalls zu einer Änderung des Membranpotentials führen. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus ist die Aktivierung der Ca²⁺-ATPase mit konsekutiver Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Dies führt zu einer erhöhten Mitostrate und Zellproliferation [Friedmann 1991, Thawer 1999].

Neuste Untersuchungen weisen auf die potenzielle Bildung von freien Radikalen im Gewebe unter Bestrahlung mit niederenergetischen Licht. Dies könnte erklären, warum es bei einigen Bestrahlungsparametern auch zu Inhibitionsprozessen innerhalb des Gewebes kommt, und macht die weitere Untersuchungen zur Dosimetrie der Low-Level-Lasertherapie notwendig.

3.2.2 Thermische Effekte

Die thermische Wirkung des Lasers beruht auf der Umwandlung der gestreuten und anschließend im Gewebe absorbierten Laserenergie in Wärme. Dieser Prozess führt zu einer Temperaturerhöhung im bestrahlten Volumen und durch Wärmeleitung zu einer Temperaturerhöhung in dessen Umgebung. Das Ausmaß der jeweiligen thermischen Wirkung hängt einerseits von den Eigenschaften der Laserstrahlung (Wellenlänge, Energiedichte, Bestrahlungsdauer und Wiederholrate) ab, andererseits von den optischen (Absorption, Streuung, Dichte) und thermischen (Wärmeleitfähigkeit des Gewebes, Wärmespeicherung (Wärmekapazität) und Wärmeabfluss durch das vaskuläre System) Eigenschaften des Gewebes [Helfmann 1989a, Müller 1986a, Müller 1989a,b].

Der Wärmefluss im Gewebe folgt den Temperaturgradienten von Regionen mit höherer Temperatur zu Regionen mit niedrigerer Temperatur und ist direkt proportional der Temperaturzufuhr pro Längeneinheit. Bei einer Gewebsprobe mit der Länge l und Querschnittsfläche d fließt die Wärmeenergie Q innerhalb der Zeit t von der Region der höheren Temperatur T_1 in die Region der niedrigeren Temperatur T_2 . Aus der hier angegebenen Gleichung lässt sich die jeweilige Wärmeleitfähigkeit (λ) errechnen:

$$\frac{Q}{t} = \lambda * d * \frac{T_1 - T_2}{l}$$

$$\lambda = \frac{Q * l}{d * t * (T_1 - T_2)}$$

Die Wärmeleitfähigkeit wird in W/m K angegeben. Die Wärmeleitfähigkeit für Wasser beträgt 0,58 W/m K und für Blut 0,62W/m K.

Die spezifische Wärme c_p drückt die Fähigkeit des Gewebes aus, Wärme zu speichern. Die spezifische Wärme ist definiert als die Wärmemenge, die pro Grad Temperaturanstieg und pro Maßeinheit gespeichert wird. Die spezifische Wärme für Wasser beträgt 4,18 kJ/kg K und für Blut 3,22 kJ/kg K.

Bei Erwärmung des Gewebes unter Vernachlässigung der Wärmeleitung kann der Temperaturanstieg bezogen auf die zugeführte Energie wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{W}{\sigma * c_p}$$

T = Temperatur

W = absorbierte Leistung pro Volumeneinheit

σ = Dichte

c_p = spezifische Wärme bei konstantem Druck

Beim Erwärmen des Gewebes unter Einschluss der Wärmeleitung kann der Temperaturanstieg wie folgt berechnet werden:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{W}{\sigma * c_p} + \frac{\lambda}{c_p} * T$$

λ = Wärmeleitfähigkeit

Ein Teil der Wärmeenergie wird durch Blutfluss aus der bestrahlten Region abtransportiert. In der bestrahlten Region kommt es zu einem Anstieg der Bluttemperatur. Das venöse Blut speichert durch seine Wärmekapazität einen Teil der eingestrahnten Energie. Die Wärmemenge wird dann im Kapillargebiet an die Umgebung wieder abgegeben. Schlecht durchblutetes Gewebe mit geringer Wärmeabtransportmöglichkeit wird durch die Bestrahlung stärker thermisch geschädigt als gut durchblutetes Gewebe. Die Eindringtiefe der thermischen Veränderung wird durch die Durchblutungsrate beeinflusst. Allerdings nimmt bei längerer Expositionsdauer der Einfluss der Durchblutungsrate ab. Die Wärmeableitung kann aber auch durch metabolische Prozesse sowie durch Wasserverdampfung und Hitzekonvektion stattfinden.

Das Ausmaß der Zellschädigung hängt von der Temperatur ab. Bis ca. 40°C treten keine irreversiblen Schäden auf, durch Erwärmen des Gewebes auf Temperaturen zwischen 40 und 60°C kommt es zu einer Störung der Membranfunktionen, zu enzymatischen Veränderungen im Gewebe und nachfolgend zur Ödembildung, ab ca. 60°C kommt es zur Eiweißdenaturierung, d. h. zu einer Koagulation, bei 100°C tritt Wasserverdampfung ein, bei ca. 150°C beginnt die Karbonisation, und bei Temperaturen über 300°C verdampft das Gewebe [Müller 1986a, Helfmann 1989a].

Weiterhin hat die Zeit, während der das Gewebe der Temperatur ausgesetzt ist, einen Einfluss auf die Gewebewirkung. Die notwendige Bestrahlungszeit bis zum Eintreten des Zelltodes unterliegt einer exponentiellen Abhängigkeit. Eine vereinfachte Darstellung des Zusammenhanges zwischen Temperatur / Zeit und dem thermischen Effekt zeigt Abb. 16.

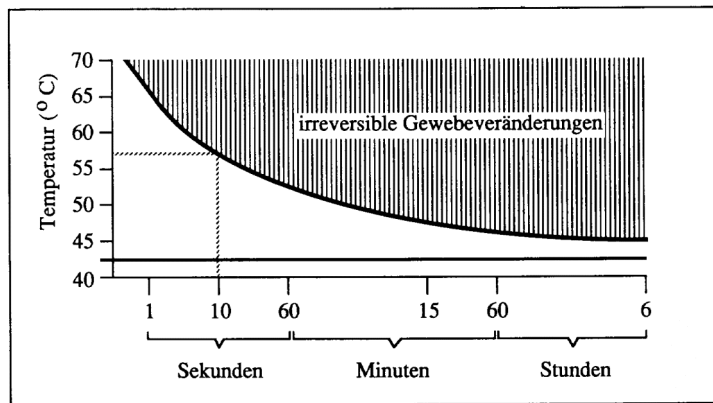


Abb. 16: Einfluss von Temperatur und Zeitdauer auf die irreversible Gewebeerstörung. [Helfmann 1989a].

Bei der Anwendung der thermischen Laser am lebenden Gewebe ist weiterhin zu berücksichtigen, dass sich die optischen, thermischen und mechanischen Gewebeeigenschaften während der Laserbestrahlung ändern und somit zur Veränderung der Gewebeeigenschaften führen [Müller 1986a]. Daraus resultieren Folgen für den Grad der thermischen Schädigung am Gewebe. So kann zum Beispiel die eingetretene Karbonisation eine Erhöhung der Absorption der Laserstrahlung bewirken, wodurch sehr schnell hohe Temperaturen erreicht werden. Eine Austrocknung des Gewebes schwächt die Wärmeleitung ab, was in der Ausbildung eines Wärmestaus resultiert (Abb. 17).

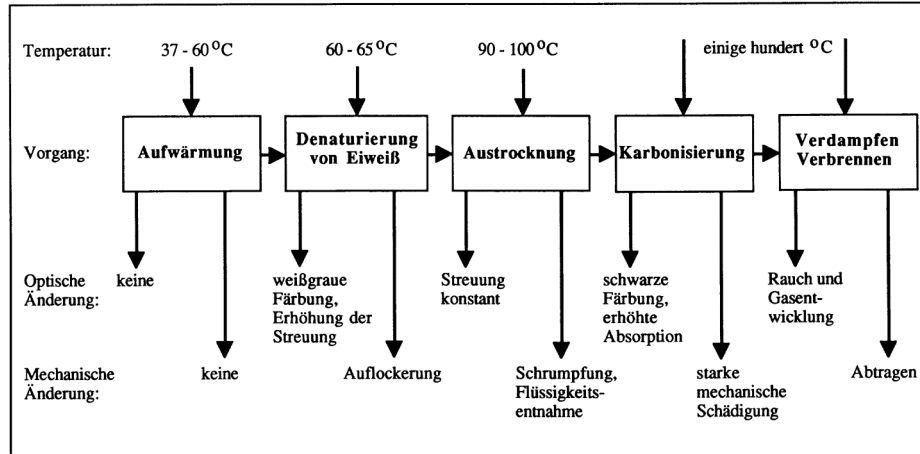


Abb. 17: Änderung der optischen, thermischen und mechanischen Eigenschaften von Gewebe während der Laserbestrahlung [Helfmann 1989a].

Im medizinischen Bereich finden derzeit die thermischen Lasereffekte den breitesten klinischen Einsatz.

3.2.3 Photodekompositionseffekte

Bei hohen Leistungsdichten (10^6 - 10^{12} W) und extrem kurzen Laserpulsen (im Nanosekundenbereich) beim Einsatz der gepulsten Lasersysteme entsteht eine so hohe Verdampfungsgeschwindigkeit, dass es zur Mikroexplosionen kommt. Werden die absorbierenden Eigenschaften der Geweboberfläche zur Auslösung dieses Prozesses genutzt, so bezeichnet man diesen Effekt als Photoablation. Dieser Effekt könnte aufgrund seines örtlich limitierten thermischen Charakters als Sonderfall des Photovaporisationseffektes mit geringer thermischer Beeinflussung der Umgebung angesehen werden.

Die Photoablation findet heutzutage ihre Anwendung in der refraktiven Kornealchirurgie. Auf diesem Prinzip basiert auch die Laserrekanalisation artherosklerotischer Gefäße.

Bei noch höheren Leistungsdichten im Fokus des Laserstrahls ist es möglich, durch die Erzeugung eines Plasmas eine solche Explosion auch im Inneren eines für die verwendete Laserstrahlung transparenten Mediums durch die Auslösung eines „optischen Durchbruches“ zu erhalten. Dieser Effekt wird als Photodisruption bezeichnet. Das Prinzip der Photodisruption wird z. B. in der Augenheilkunde bei der Laserbehandlung von Nachstarmembran benutzt und spielt bei der Steinertrümmerung im Bereich der Urologie eine zunehmend wichtige Rolle.

Diese Klasse von Photodekompositionseffekten lässt sich am ehesten unter dem Begriff nichtlineare Wirkungen zusammenfassen, da sich bei hohen Intensitäten die Effekte nicht mehr allein durch die lineare Absorption von Photonen beschreiben lassen.

Allerdings ist zu beachten, dass sich die optischen Eigenschaften des Gewebes wie Absorption und Streuung während der Bestrahlung von Körpergewebe bereits im Bereich photothermischer Effekte erheblich ändern [Helfmann 1989b, Roggan 1997]. Entsprechendes gilt für die Wirkung energiereicher Laserpulse, bei denen auch die nichtlinearen Anteile des Absorptionskoeffizienten wirksam werden. Die Absorption ist ebenfalls ein Maß für die optische Eindringtiefe, die zur Beurteilung der thermischen Schädigungszone bei der Photoablation mit gepulster Laserstrahlung herangezogen werden kann. Je nach optischer Eindringtiefe der Strahlung muss die Energie pro Laserpuls unterschiedlich groß sein, um die Schwelle für die Photoablation zu überschreiten und Gewebe abzutragen. Da in der Regel die Zerstörschwelle des Übertragungssystems die übertragbare Energiedichte begrenzt, kann durch die Vergrößerung der Pulslänge die Energie pro Puls entsprechend erhöht werden. Eine größere Pulslänge bedeutet eine längere Einwirkzeit der Strahlung, in der eine Wärmeleitung aus dem erhitzten Volumen in das benachbarte Gewebe stattfindet, die erst mit dem explosionsartigen Herausschleudern der Gewebereste beendet wird. Abb. 18 zeigt auf, bei welcher Wellenlänge und welcher Laserpulslänge die Schädigungszone überwiegend optisch durch die Eindringtiefe oder thermisch durch Wärmeleitung bestimmt wird. Damit können die Parameter eines Photoablationslasers in Hinblick auf geringe thermische Schädigungen optimiert werden.

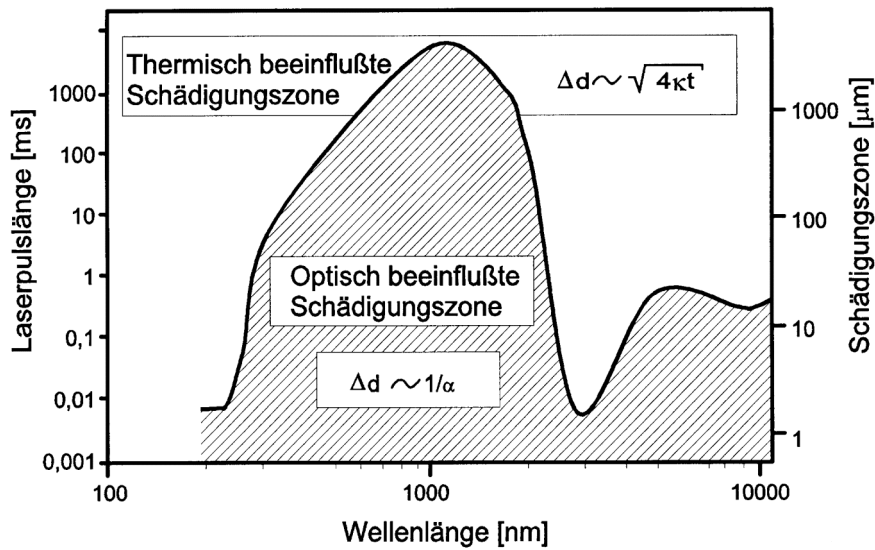


Abb. 18: Diagramm für die Schädigungszone in Abhängigkeit der Laserpulslänge und der Wellenlänge für die Photoablation mit Darstellung der Bereiche für die primär thermisch bzw. optisch beeinflusste Zone [Albrecht 2002].

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass mit zunehmender Frequenz der Laserpulse ein Teil der im Gewebe deponierten Energie in Wärme umgewandelt werden kann. Zur Vermeidung einer thermischen Schädigung angrenzender Gewebeschichten darf die Wiederholfrequenz der Laserpulse nicht zu hoch eingesetzt werden.

3.3 Ermittlung der optischen Eigenschaften von Rinderknorpelgewebe

3.3.1 Problem- und Aufgabenstellung

Für die praktische Anwendung lasertechnischer Verfahren am biologischen Gewebe ist die Kenntnis der Gewebeparameter von größter Wichtigkeit. Soll eine Abschätzung oder theoretische Berechnung der Strahlungsverteilung im Therapievolumen erfolgen, dann ist die Kenntnis von den mikroskopischen optischen Parametern unumgänglich.

Die Ermittlung von optischen Parametern diverser Gewebe kann mittels spektroskopischer Untersuchungen an Gewebematerial erfolgen. Um die optischen Parameter Absorptionskoeffizient (μ_a), Streukoeffizienz (μ_s) und Anisotropiefaktor (g) für Knorpelgewebe zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen am tierischen Knorpelgewebe durchgeführt.

3.3.2 Material und Methode

Die messbaren Größen Remission, Reflexion und Transmission werden häufig auch als makroskopische optische Eigenschaften bezeichnet, die wellenlängen-, gewebe- und schichtdickenabhängig sind. Für die Verteilung des Laserlichtes im Gewebe und die daraus resultierenden makroskopischen optischen Eigenschaften sind die Prozesse der Absorption, der Streuung und der Brechung verantwortlich. Um neue Anwendungen des Lasers zu erschließen, ist die möglichst umfassende Kenntnis der optischen Eigenschaften der verschiedenen Gewebe eine wichtige Voraussetzung. Auf dieser Grundlage können für einen bestimmten Gewebetyp Voraussagen über die Effizienz vorhandener Lasersysteme gemacht werden. Der interessierende Wellenlängenbereich, in dem medizinische Laser zur Verfügung stehen, kann in Ultraviolett (UV: $\lambda < 400$ nm), sichtbaren Bereich (VIS: $400 < \lambda \leq 780$ nm), nahes Infrarot (NIR: $780 \text{ nm} < \lambda \leq 2,5 \mu\text{m}$), mittleres Infrarot (MIR: $2,5 < \lambda \leq 25 \mu\text{m}$) und fernes Infrarot (IR: $\lambda > 25 \mu\text{m}$) unterteilt werden [Cheong 1990, Roggan 1997].

Neben der sehr aufwendigen Bestimmung der mikroskopischen optischen Parameter existieren unterschiedliche spektroskopische Verfahren, um die Transmission, in selteneren Fällen auch die Remission von biologischen Geweben in weiten Wellenlängenbereichen zu erfassen. Es ist jedoch darauf zu achten, dass die Ergebnisse von der Schichtdicke der Probe abhängen, wohingegen die mikroskopischen optischen Eigenschaften schichtdickenunabhängige Parameter sind. Die Messungen der Transmission im UV-, sichtbaren und nahen Infrarot-Bereich können z. B. mit einem Universal Mikroskop Spektrophotometer (UMSP 80, Zeiss Oberkochen) durchgeführt werden. Als Lichtquelle werden Quecksilber- oder Xenon-Kurzbogenlampen verwendet, die Wellenlängenselektion erfolgt mittels Monochromator. Ein typisches Spektrum für humanes Meniskusgewebe im Wellenlängenbereich von 250 bis 750 nm ist in Abb. 19 dargestellt.

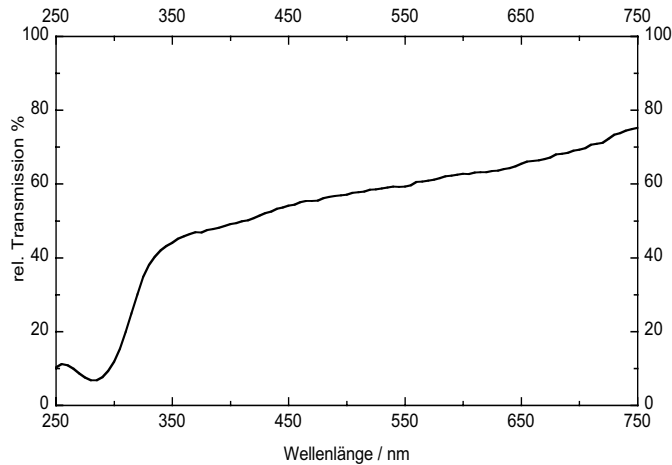


Abb. 19: UV/VIS-Spektrum, humaner Meniskus (post mortem, in vitro), UMSP 80, Gefrierschnitt, Schnittdicke 10 μm , Messspotdurchmesser 20 μm .

Die Schnittdicke des Präparates betrug 10 μm . Wie in Abb. 23 zu sehen nimmt die Transmission bei steigender Wellenlänge im Bereich 350-750 nm kontinuierlich zu. Lediglich bei ca. 280 nm ist eine deutliche Abnahme der Transmission zu verzeichnen. Grund dafür ist die Strahlungsabsorption in Proteinen u.a. mit Anteilen an aromatischen Aminosäuren.

3.3.2.1 Absorption

Die ins Gewebe eintretenden Photonen werden an allen molekularen Bestandteilen des Gewebes absorbiert. Im UV- und sichtbaren Spektralbereich ist dies zumeist an gewebespezifische Chromophore wie Porphyrine (Hämoglobin), Melanin, Flavin, Retinal, NADH (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid), Nucleobasen etc. gekoppelt. Es werden elektronische Übergänge angeregt, und diskrete, intensive Absorptionsbanden beobachtet. Für Proteine werden dagegen häufig nur wenig strukturierte, breite Absorptionsbanden nachgewiesen. Im biologischen Gewebe sind die Chromophore vorzugsweise an zellulären Komponenten wie z. B. Membranen gekoppelt oder liegen wie die Nucleobasen der DNA/RNA in Form einer zellulären Substruktur vor. Dagegen wird die Gewebeabsorption im nahen und mittleren Infrarotbereich wesentlich durch die Wasserabsorption dominiert. Es werden niederenergetische elektronische Übergänge hauptsächlich der Ober- und Kombinationsschwingungen angeregt.

Physikalisch wird die Absorption durch den Absorptionskoeffizienten μ_a charakterisiert, der das Produkt aus Absorberkonzentration c_a [cm^{-3}] und Absorptionswirkungsquerschnitt σ_a [cm^2] darstellt und die Einheit cm^{-1} besitzt. Da bei einer diskreten Wellenlänge in der Regel unterschiedliche Absorber beteiligt sind, muss μ_a als Summe über die Produkte aller beteiligten Stoffe betrachtet werden.

Abb. 20 zeigt den Absorptionskoeffizienten vom reinen Wasser, welches zu den wichtigsten Absorbern im biologischen Gewebe gehört.

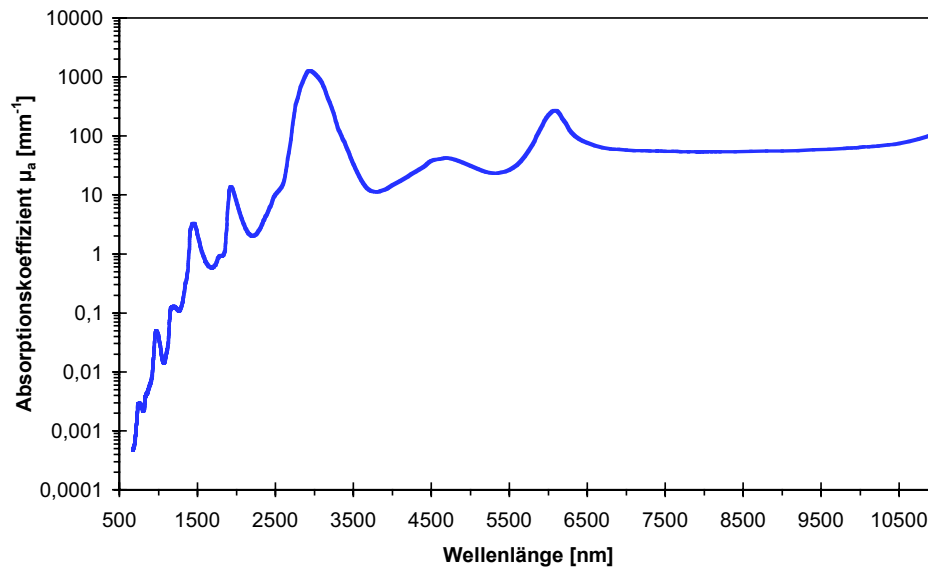


Abb. 20: Absorptionskoeffizient von reinem Wasser [Kou 1993].

3.3.2.2 Streuung

Membranen, Zellkerne, Mitochondrien, Lipide etc. sind als Inhomogenitäten im Sinne des Brechungsindex im Gewebe für die Streuung von Photonen ursächlich verantwortlich [Anderson 1981]. Die beschreibende physikalische Größe ist der Streukoeffizient μ_s , der analog zur Definition des Absorptionskoeffizienten das Produkt aus Streuzentrenkonzentration c_s [cm^{-3}] und Streuwirkungsquerschnitt σ_s [cm^2] darstellt, wobei über verschiedene Arten von Streuzentren summiert wird:

$$\mu_s = \sum c_s \sigma_s$$

μ_s ist ein direktes Maß für die Anzahl der Streuereignisse pro zurückgelegter Wegstrecke eines Photons. Der Streukoeffizient ist in weiten Wellenlängenbereichen deutlich größer als der Absorptionskoeffizient. Außerdem weist μ_s nur eine schwache Wellenlängenabhängigkeit auf. Bei vielen Geweben findet sich in erster Näherung eine $1/\lambda$ -Abhängigkeit, d. h. mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Streuung ab. Licht wird in Gewebe nicht gleichmäßig gestreut. Der Streukoeffizient alleine reicht somit nicht aus, um die Streueigenschaften von biologischem Gewebe vollständig zu beschreiben. Zusätzlich muss die Winkelverteilung bekannt sein, welche die Richtungsänderung des gestreuten Photons charakterisiert. Diese wird als Streuphasenfunktion bezeichnet. Weil Streuphasenfunktionen nur schwer zu bestimmen sind, wird häufig deren Informationsgehalt über die Winkelverteilung einzelner Streuereignisse auf die Angabe des Anisotropiefaktors g reduziert. Dieser gibt den über viele Streuereignisse gemittelten Kosinus des Streuwinkels Θ an. Der Wertebereich von g reicht von -1 (Rückwärts-Streuung) über 0 (isotrope Streuung) bis +1 (Vorwärts-Streuung). Biologische Gewebe weisen in der Regel eine starke Vorwärtsstreuung auf. Im Bereich des sichtbaren Lichtes und im nahen Infrarotbereich liegt der Wert zwischen 0,8 und 0,99 [Cheong 1990, Roggan 1997].

3.3.2.3 Streulichtmessung

Die mikroskopischen optischen Eigenschaften Absorption, Streuung und Anisotropiefaktor von biologischen Geweben sind einer direkten Messung in der Regel nicht zugänglich. Vielmehr können lediglich makroskopische Eigenschaften wie die Rückstreuung bzw. die Transmission einer Gewebeprobe gemessen werden.

Um μ_a , μ_s und g zu bestimmen, sind aufwendige Mess- und Auswerteverfahren erforderlich. Als Standardmethode wird die Streulichtmessung genutzt, bei der die zu vermessende Gewebeprobe zwischen zwei Ulbrichtkugeln positioniert wird (Abb. 21). Gleichzeitig erfolgt die Beleuchtung der Probe mit einem kollimierten Lichtbündel der interessierenden Wellenlänge. Die Ulbrichtkugeln sind auf ihrer Innenseite hochreflektierend beschichtet (z. B. PTFE oder BaSO_4), so dass die gesamte von der Probe diffus remittierte und total transmittierte Strahlung erfasst werden kann (R_d und T_t). An jeder Ulbrichtkugel ist ein Photodetektor befestigt, der ein zur Intensität des jeweiligen Strahlungsfeldes proportionales elektrisches Signal liefert, welches elektronisch weiterverarbeitet werden kann. Um die drei unabhängigen Parameter μ_a , μ_s und g zu bestimmen, sind drei unabhängige Messungen erforderlich. Daher wird als dritter Messwert die kollimierte, d. h. ungestreute Transmission T_c der Gewebeschicht bestimmt. Die Kalibrierung des Messsystems erfolgt mit geeichten Reflexions- bzw. Transmissionsstandards (Fa. Labsphere). Abb. 22 zeigt die technische Realisierung eines Doppel-Ulbrichtkugelsystems (Lichtquelle Hg- bzw. Xe-Hochdrucklampe mit nachgeschaltetem Monochromator / LMTB, Berlin). Der Messbereich umfasst 300-2500 nm bei einer Wellenlängenauflösung von 8-16 nm (FWHM). Als Detektoren werden Silizium-Photodioden (300-1100 nm) bzw. Bleisulfid-Photodioden (1100-2500 nm) verwendet.

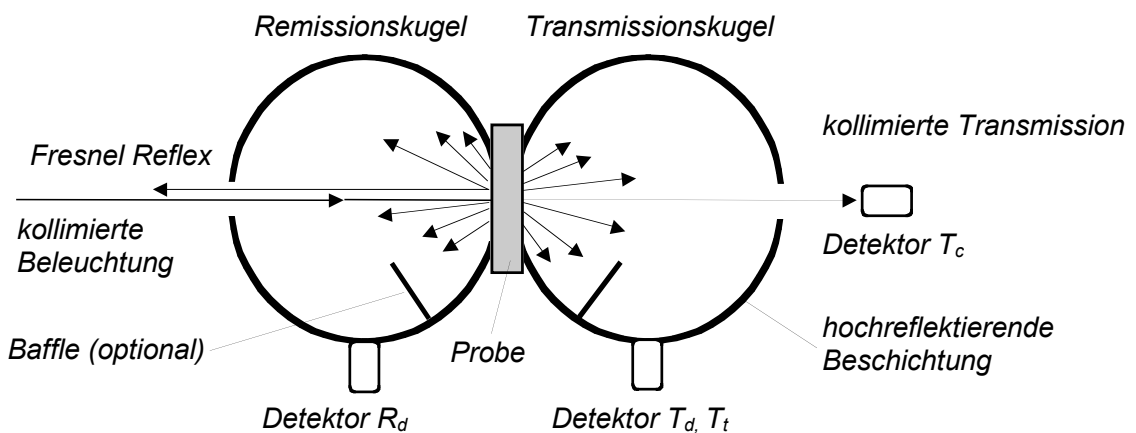


Abb. 21: Prinzip der Streulichtmessung zur Bestimmung optischer Gewebeeigenschaften [Roggan 1997].

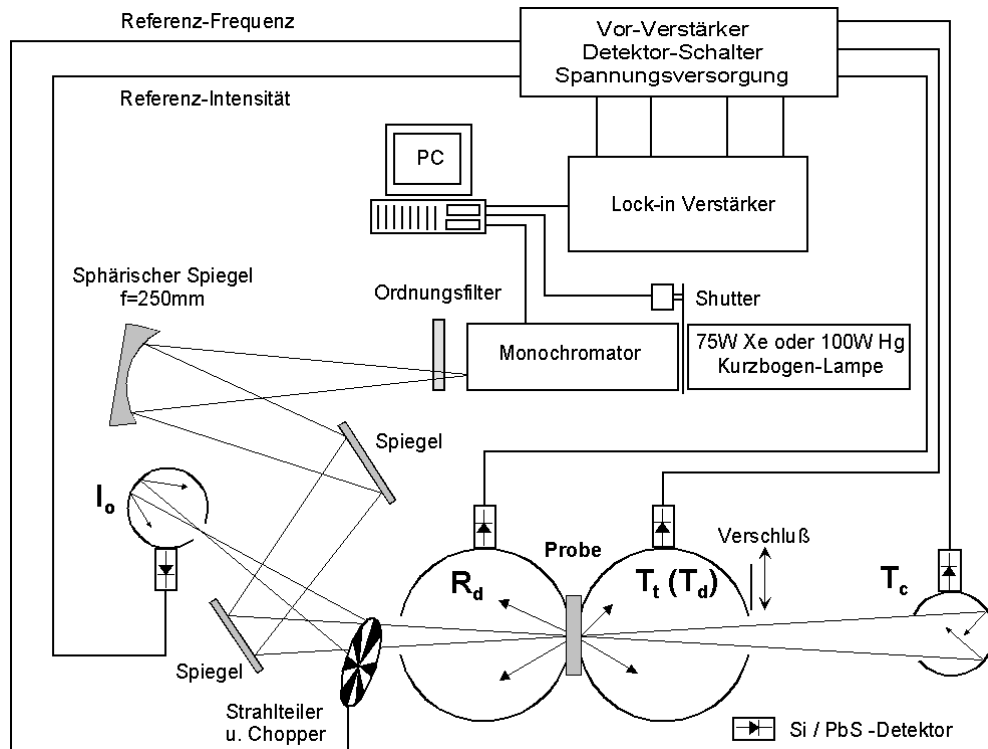


Abb. 22: Doppel-Ulbrichtkugel-System zur Messung optischer Parameter (LMTB, Berlin).

Durch die Probenpräparation darf es zu keiner Veränderung der optischen Parameter kommen. Um das Austrocknen der biologischen Präparate während der Messung zu verhindern, werden die Gewebeproben in zylindrischen Quarzküvetten mit definierter Schichtdicke fixiert. Typische Probendicken liegen zwischen $100\ \mu\text{m}$ und $1\ \text{mm}$. Die Proben selbst können dabei aus nativen Strukturen, Gefrier- bzw. Nativschnitten oder über eine Homogenisierung gewonnen werden. Für die Extraktion der optischen Parameter μ_a , μ_s , g aus den gewonnenen Messwerten wird die Methode der Monte-Carlo-Simulation angewendet, die als statistisches Verfahren die Trajektorien einer Vielzahl von Photonen berechnet und als Ergebnis die Remissions- und Transmissionseigenschaften einer Probe mit vorgegebenen optischen Parametern ausgibt. Um beim gegebenen Problem gerade umgekehrt die unbekannt optischen Parameter aus den gemessenen makroskopischen Eigenschaften zu bestimmen, wird die inverse Monte-Carlo-Simulation verwendet.

Ein analoger Aufbau ist in dem für die Zwecke dieser Untersuchungen eingesetzten UV/VIS/NIR-Spektrometer Lambda 900 (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk USA) realisiert worden. Das kommerzielle Zweistrahl-Spektrometer verfügt über ein Doppelmonochromatorsystem, das unter Verwendung einer Ulbrichtkugel Messungen im Wellenlängenbereich von $200\ \text{nm}$ bis $2500\ \text{nm}$ erlaubt. Als Lichtquelle für den UV-Bereich dient eine Deuteriumlampe, für den VIS/NIR-Bereich wird eine Wolfram-Halogenlampe eingesetzt. Abb. 23 zeigt das optische System des Spektrometers.

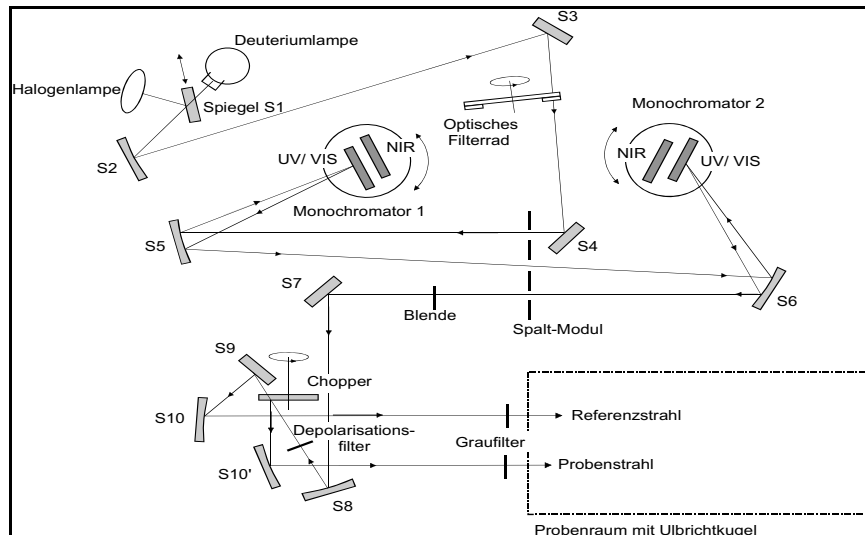


Abb. 23: Schema zum optischen Aufbau des UV/VIS/NIR-Spektrometers Lambda 900.

Die Strahlung der Beleuchtungsquelle wird je nach Wellenlängenbereich von Spiegel S1 auf den Spiegel S2 reflektiert, wobei gleichzeitig der Strahl der jeweils inaktiven Lampe blockiert ist. Über Spiegel S3 wird der Lichtstrahl durch ein optisches Filterrad in den ersten Monochromator geführt. Das optische Filterrad läuft durch einen Schrittmachermotorbetrieb synchron mit den Monochromatoren. Es nimmt verschiedene wellenlängenspezifische Filter auf, die jeweils automatisch ausgewählt und gewechselt werden. Diese dienen der Vorfiltrierung des Lichts. In den beiden Monochromatoren erfolgt die eigentliche Wellenlängenselektion, indem der Lichtstrahl entweder auf das UV/VIS- oder auf das NIR-Gitter der Monochromatoren trifft und dadurch in ein Lichtspektrum zerlegt wird. Der Lichtstrahl der so selektierten Wellenlänge wird über Spiegel durch das Spalt-Modul geleitet. Aufgrund des Doppelmonochromatorsystems wird eine hohe spektrale Reinheit mit niedrigem Anteil von Störstrahlung erreicht.

Das Spalt-Modul stellt jeweils den Eintritts- oder Austrittsspalt der beiden Monochromatoren dar. Für die Spaltgröße kann ein fester Wert gewählt oder – abgestimmt auf die Lichtintensität – im Servomodus automatisch variiert werden. Mittels einer Blende ist zusätzlich die Verkleinerung des Strahls im Falle kleiner Probendurchmesser möglich. Ein Chopperrad dient zur Aufteilung des Strahls in einen Probenstrahl und einen Referenzstrahl. So werden automatisch bei jedem Messwert nacheinander Probenstrahl und Referenzstrahl abgegeben, wodurch beim Zweistrahl-Spektrometer eine Normierung der Messwerte parallel zur Messung ermöglicht wird. Beide Strahlen werden über Spiegel in den Probenraum mit der Ulbrichtkugel geleitet. Wahlweise können Depolarisationsfilter oder Graufilter vorgeschaltet werden. Zur Kalibrierung wird der Referenzstrahl in die Ulbrichtkugel auf den Referenzstandard geführt. Ulbrichtkugel und Referenzstandard bestehen aus Spektralon. Das Spektralon absorbiert minimal und ermöglicht eine 99,8 %-ige Reflexion der Strahlung. Der Probenstrahl gelangt nach dem Durchgang durch eine frei wählbare strahlfokussierende optische Linse auf die Probe und somit in die Ulbrichtkugel. Die Probe kann im Probenhalter entweder am Transmissions- oder Remissionsport der Kugel befestigt werden, je nachdem, ob die Vorwärts- oder Rückwärtsstreuung gemessen werden soll. Die jeweils gewählte optische Linse regelt die Fokussierung des Lichtspots auf Transmissions- und Remissionsport. Die aus der Probe austretenden Photonen werden von den am Boden der Ulbrichtkugel befindlichen Photodetektoren erfasst. Im UV/VIS-Bereich steht als Detektor ein Photomultiplier(PMT)Detektor zur Verfügung, im NIR-Bereich ein Bleisulfid(PbS)-Detektor.

Der Detektorwechsel kann im Bereich von 700 bis 900 nm erfolgen. Der Wert von 0,8 Sekunden hat sich für das Impulsintervall in den meisten Messungen bewährt. Der Remissionsport weist mit seiner Anordnung von 8 grd eine 8/d-Messgeometrie auf, so dass die Fresnel-Reflexion bei offenem Fresnel-Port die Kugel verlässt und nicht detektiert wird.

3.3.2.4 Messablauf

Messwerte sind die diffuse Rückstreuung R_d , die totale Transmission T_t und die diffuse Transmission T_d (Abb. 24). Für die Messung der totalen Transmission T_t wird der Probenhalter mit der Probe am Transmissionsport der Kugel positioniert. Der Remissionsport der Kugel wird mit einem Spektralstandard verschlossen. Wird der Standard entfernt, verlassen die Photonen der ungestreuten, kollimierten Transmission T_c durch den offenen Remissionsport die Ulbrichtkugel. Es wird nun die diffuse Transmission T_d detektiert. Für die Messung der diffusen Remission R_d wird der Probenhalter am Remissionsport der Ulbrichtkugel positioniert.

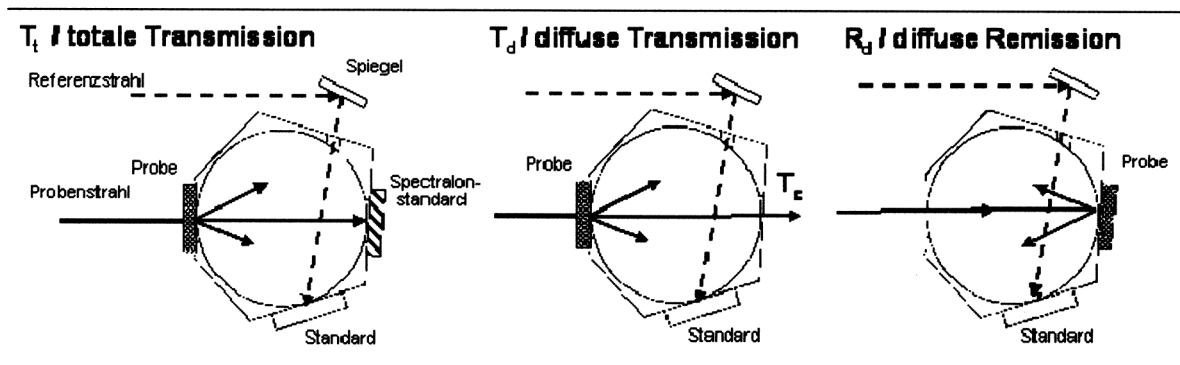


Abb. 24: Schematische Darstellung für die Detektion von R_d , T_d und T_t mit jeweiliger Positionierung der Probe an der Ulbrichtkugel.

Für die spektroskopischen Messungen wurden Rundküvetten aus Quarzglas (Hellma) verwendet (Abb. 25).

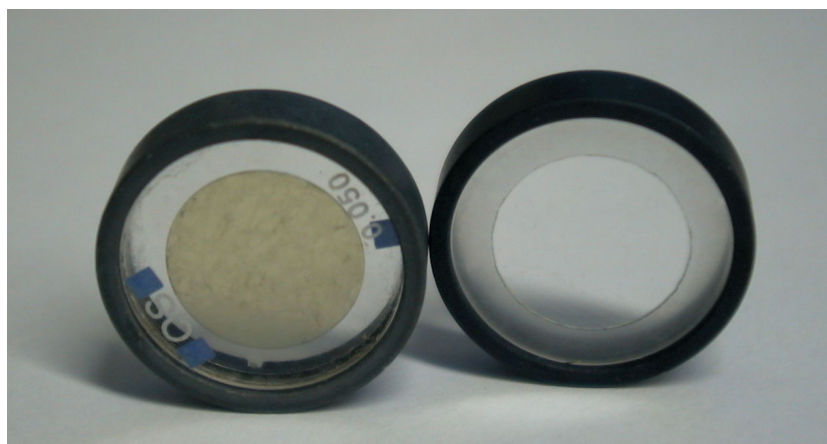


Abb. 25: Mit homogenisiertem Gewebe gefüllte Quarzküvette im Küvettenhalter (links), leere Quarzküvette im Halter (rechts).

Die Küvetten bestehen aus einem Probenglas und einem Deckglas. Das Deckglas verhindert die Austrocknung der Probe. Durch die kalibrierten Stärken des Probenraumes werden Messfehler bei entsprechender Präparation und vollständiger Ausfüllung des Probenraumes ohne Lufteinschlüsse minimiert. Für Messungen mit nativem Rinderknorpelgewebe wurde eine Probenraumdicke von 500 μm ausgewählt. Zur Probenaufbereitung wurde das Gewebematerial in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Um Gewebecluster zu erhalten, in denen die Zellstruktur der einzelnen Zellen erhalten bleibt, sollte das Gewebe dabei nur zerstoßen und nicht zermahlen werden. Nach dem Auftauen wurde der Gewebebrei in den vorbereiteten Probenraum der Quarzglas-Küvette transferiert. Beim Verschließen der Küvette ist darauf zu achten, dass möglichst keine Luftblase, die das Ergebnis verfälschen könnte, im Probenraum mit eingeschlossen wird. Die gefüllte Küvette wird in einem Küvettenhalter fixiert und die jeweilige Gewebeschichtdicke ermittelt. Dazu wird die leere Küvette sowie die mit Gewebe befüllte Küvette an 5 beliebigen Punkten mit einer Mikroschraube vermessen. Die Differenz der arithmetisch gemittelten Messwerte ergibt die tatsächliche Schichtdicke der Probe.

3.3.3 Absorptions- und Streukoeffizienten

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt mit dem Simulationsprogramm WinFit 32, Version 5.2 (LMTB, Berlin). Es wird eine inverse Monte-Carlo-Simulation durchgeführt, in der die geometrischen und optischen Verhältnisse bei der Messung im Ulbrichtkugel-Spektrometer wie Probengeometrie, Blendendurchmesser, Kugelparameter, Strahldivergenz, Durchmesser des Lichtspots auf der Probe, Brechungsindexsprünge und seitliche Verluste von Photonen an Probengrenzflächen berücksichtigt werden, so dass systematische Fehler weitgehend vermieden werden [ROGGAN/97A]. Aus den vorher ermittelten optischen Größen T_v , T_d und R_d , werden die Parameter μ_a , μ_s und g berechnet.

Photonen werden dabei durch einen Zufallsgenerator numerisch erzeugt, um eine Lichtquelle zu repräsentieren. Das Photon bewegt sich durch das Medium und kann gestreut werden, bis es absorbiert wird oder aus dem betrachteten Volumen entkommt. Der Weg, den es zurücklegt, wird anhand der bekannten Streu- und Absorptionseigenschaften des Mediums und einer zufälligen Verteilung der Streueignisse gemäß der verwendeten Phasenfunktion berechnet. Um gerade umgekehrt die unbekannt mikroskopischen optischen Parameter aus den gemessenen makroskopischen Parametern zu bestimmen, wird das Modell der Monte-Carlo-Methode invertiert. Dazu werden, wie in Abb. 26 dargestellt, von einem Startparametersatz für μ_a , μ_s und g ausgehend, die Messwerte simuliert und mit den wahren, gemessenen Werten verglichen.

Sind die Differenzen größer als eine vorgeschriebene Abweichung, wird eine Gradientenmatrix berechnet, aus der sich neue Werte für einen Parametersatz von μ_a , μ_s und g ableiten lassen. Dieses Vorgehen wird solange wiederholt, bis die gemessenen Werte innerhalb der vorgeschriebenen Abweichung wiedergegeben werden. Es sollte mit mindestens einer Million Photonen gerechnet und eine Abweichung von 0,15% als Fehlergrenze erlaubt werden.

In der Anwenderoberfläche der Simulationssoftware WinFit 32 können die jeweiligen Spektrometerparameter und Geometriedaten der Ulbrichtkugel, die zu verwendende Phasenfunktion sowie die Probanden im Menü eingegeben werden. Zu den Probanden zählen beispielsweise der Brechungsindex und die ermittelte Probendicke. In

Voruntersuchungen wurde die optimale Phasenfunktion bestimmt. Ziel ist es, bei jeder Phasenfunktion gleiche Ergebnisse für die von der Schichtdicke unabhängigen Parameter μ_a , μ_s und g zu erhalten. Resultat der Simulationsrechnungen sind die wellenlängenspezifischen Werte für μ_a , μ_s , g und μ_s' , die in Form einer MS Excel-Datei zur Verfügung stehen.

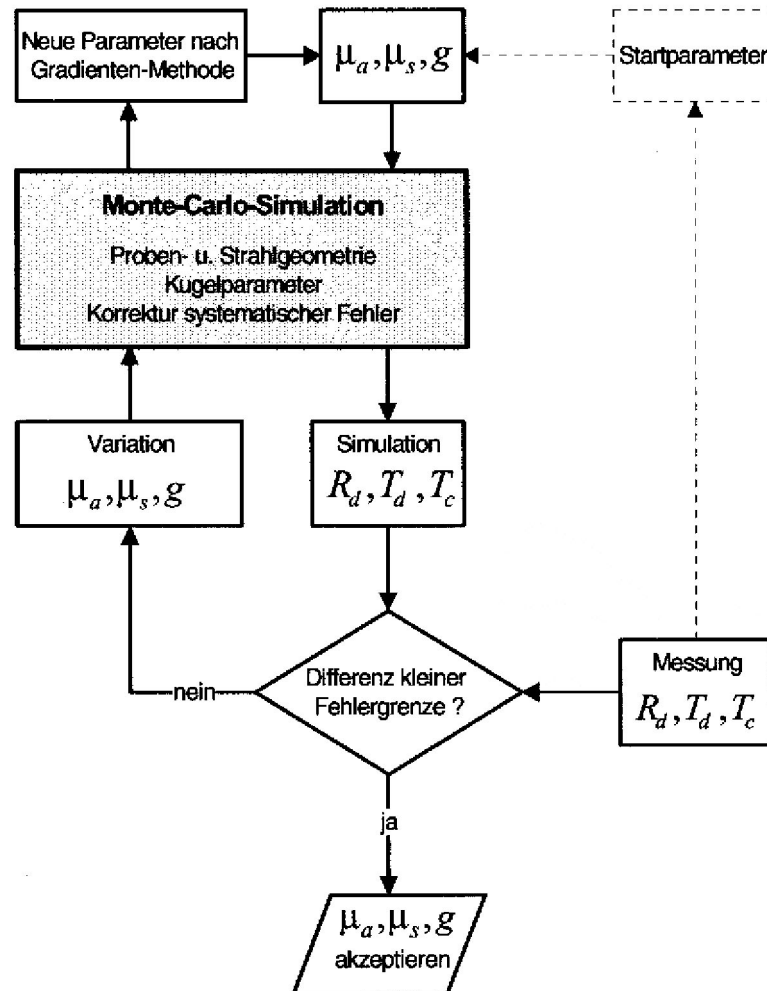


Abb. 26: Ablaufdiagramm zur inversen Monte-Carlo-Simulation mit WinFit 32.

In Abb. 27 sind die UV/VIS-Spektren für R_d , T_t und T_d im Wellenlängenbereich von 250 bis 850 nm für nativen Rinderknorpel dargestellt. Für T_t und T_d ist über dem gesamten Wellenlängenbereich eine stete Intensitätszunahme zu beobachten. Für die diffuse Rückstreuung kann zunächst ein Anstieg bis ca. 375 nm verzeichnet werden, danach weist der spektrale Verlauf eine abnehmende Intensität auf.

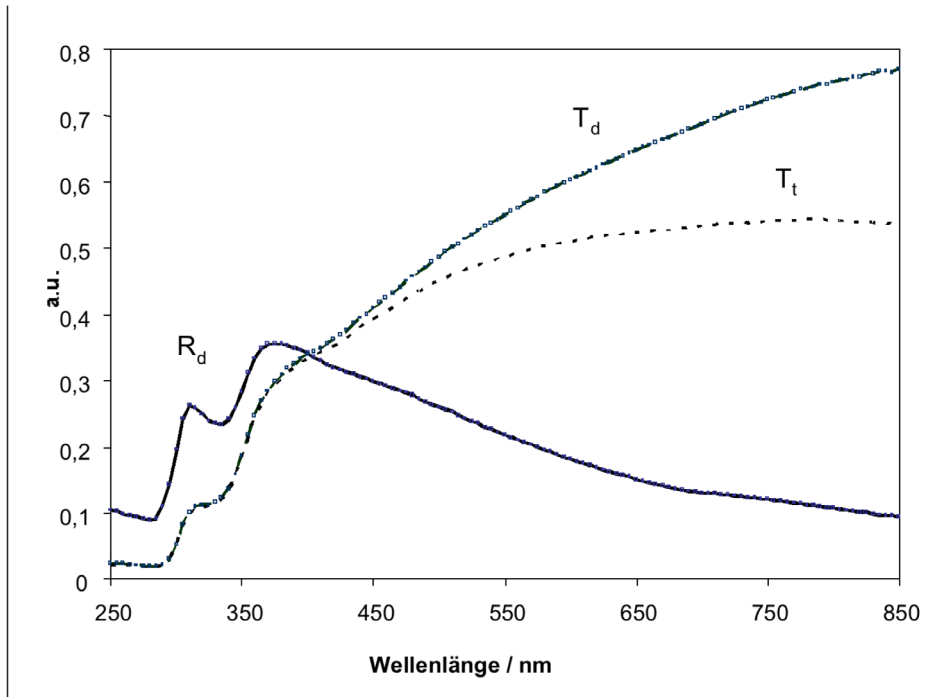


Abb. 27: UV/VIS-Spektren der diffusen Rückstreuung R_d , totalen Transmission T_t und diffusen Transmission T_d an Rinderknorpelgewebe.

Die spektrale Auftragung für die aus den Messdaten erzielten optischen, wellenlängenspezifischen Parameter als Funktion der Wellenlänge sind in den Abb. 28-30 dargestellt.

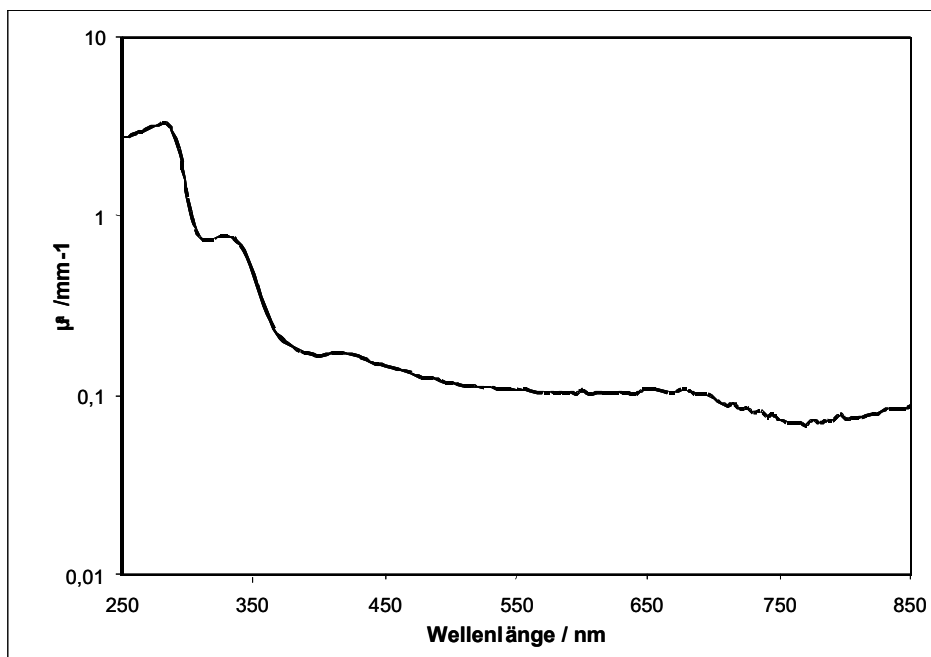


Abb. 28: Verlauf des Absorptionskoeffizienten von Rinderknorpelgewebe als Funktion der Wellenlänge.

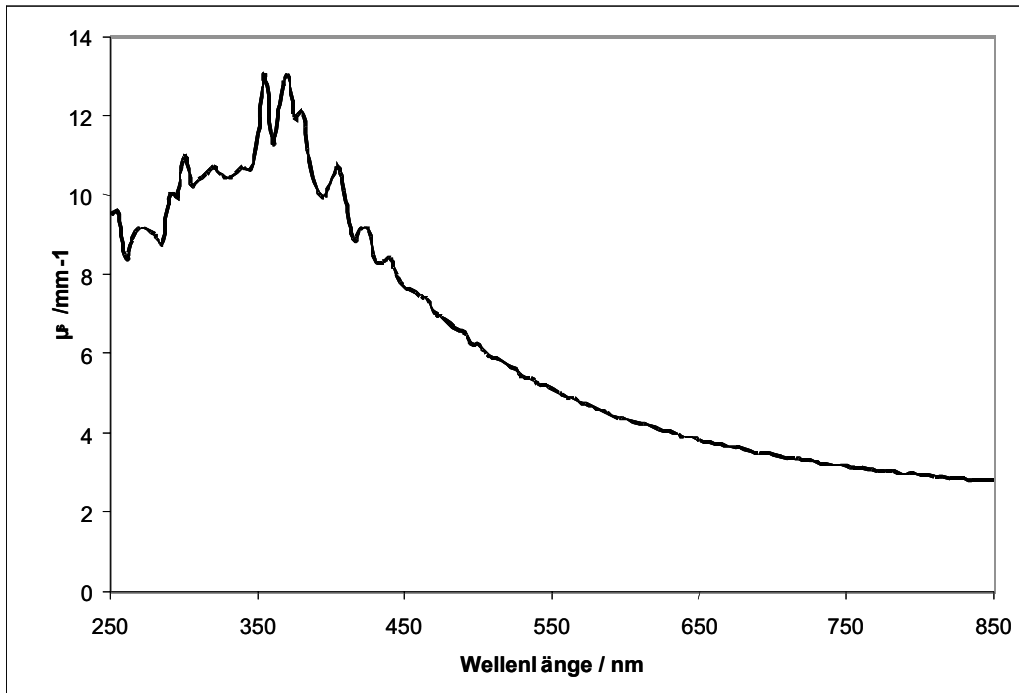


Abb. 29: Verlauf des Streukoeffizienten von Rinderknorpelgewebe als Funktion der Wellenlänge.

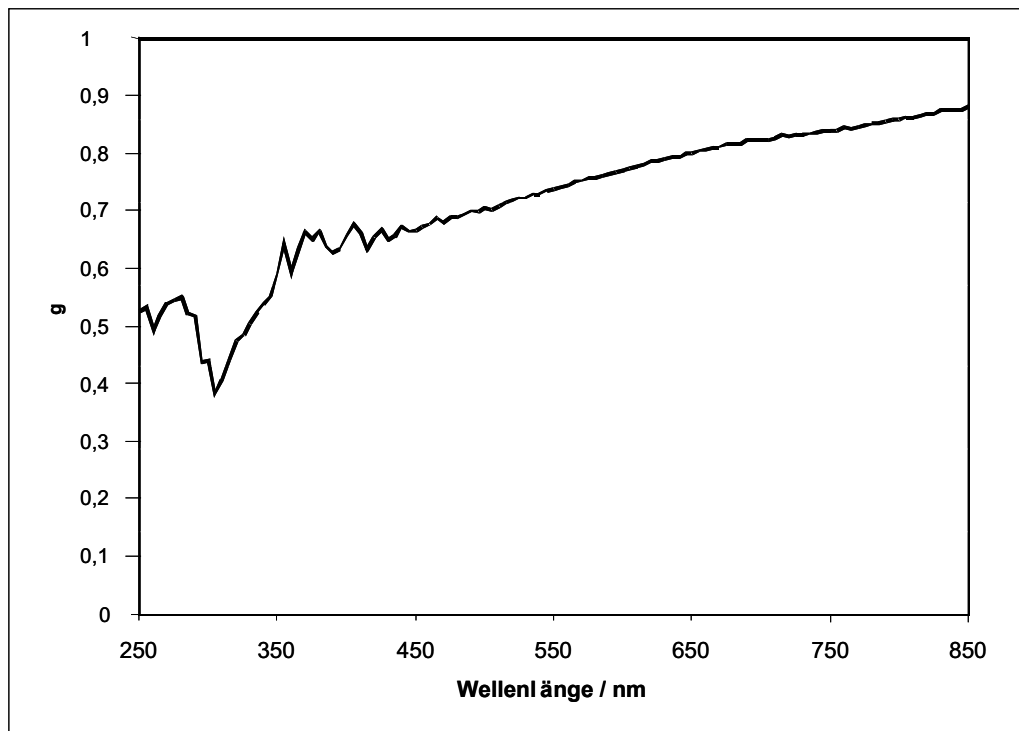


Abb. 30: Verlauf des Anisotropiefaktors g von Rinderknorpelgewebe als Funktion der Wellenlänge.

Der spezifische Absorptionskoeffizient μ_a für Knorpelgewebe zeigt einen strukturierten Verlauf. Insbesondere im Bereich der UV-Absorption ist in der logarithmischen Darstellung ein hoher Absorptionskoeffizient bei 275 und 335 nm festzustellen. Demgegenüber weisen die Werte für den Streukoeffizienten μ_s bis ca. 400 nm eine Zunahme auf, zu höheren Wellenlängen ist ein monoton abnehmender Verlauf für μ_s festzustellen. Für den Anisotropiefaktor g ist eine steigende Zunahme im Wert für die Vorwärtsstreuung zu höheren Wellenlängen hin zu verzeichnen.

3.3.4 Laserchirurgie und -therapie

Die Ermittlung von optischen Gewebeparametern erfolgte exemplarisch für das tierische Knorpelgewebe am Rinderknorpel.

In dem untersuchten Wellenlängenbereich 250-750 nm ist der Absorptionskoeffizient für das Knorpelgewebe um ein Vielfaches höher als der Streukoeffizient. Das bedeutet, dass die Eindringtiefe des Lichtes aus diesem Wellenlängenbereich in Knorpelgewebe wesentlich von der Absorption bestimmt wird. Streuphänomene spielen eine untergeordnete Rolle.

Es muss berücksichtigt werden, dass das Knorpelgewebe neben Proteinstrukturen einen hohen Anteil an gebundenem Wasser enthält, das den Hauptabsorber in diesem Gewebe ausmacht. Dies kommt insbesondere im Wellenbereich >1300 nm zum Tragen. Hier dominieren die Wasserabsorptionsbanden.

Das heißt, dass eine laserchirurgische Anwendung bei einer Wellenlänge von größer als 750 nm optimal, bei 2940 nm sinnvoll ist und eine Lasertherapie bei einer Wellenlänge von 500-900 nm sinnvoll erscheint.

4 Medizinische Lasersysteme

In den letzten Jahren hat der Laser in fast allen medizinischen Fachgebieten seinen festen Platz erworben. Durch die Entwicklung der verschiedensten Applikationsformen wurde es möglich, den Lasereinsatz auf immer neue Anwendungsgebiete zu erweitern [Hopf 2002, Müller 2003, Muschter 1997, Phillip 1995a,b, Rolle 2003, Vogl 1997, 2000 und 2001, Waldschmidt 1996, 1997 und 2004, Weidelich 2003]. Dabei ist zu unterscheiden zwischen dem Einsatz des Lasers als einem Hilfsinstrument im Rahmen einer größeren Operation oder als eigentliches Therapieverfahren bei endoskopischen Eingriffen, Kathetereingriffen oder sonstigen Laserbestrahlungen. Ein anderes Einteilungsprinzip ist die Körperregion. So finden sich Eingriffe an der Körperoberfläche, endoskopische Eingriffe oder der Lasereinsatz im Rahmen der offenen Chirurgie in vielen Fachgebieten. Bei einigen Indikationen wie z. B. Hämangiome wurde die Laserbehandlung zur Therapie der Wahl [Poetke 2004].

Die Vorteile des Lasers in den chirurgischen Disziplinen lassen sich unter folgenden Gesichtspunkten zusammenfassen :

- präzises Arbeiten, definierte Schnitttiefe, kleine fokale Nekrose
- homogene, gut steuerbare Koagulation
- Hämostase / Minimierung des Blutverlustes
- berührungsfreie Gewebeabtragung / Minimierung des Infektionsrisikos,
- minimale Traumatisierung des umliegenden Gewebes durch kräftefreies Arbeiten
- Möglichkeit des endoskopischen Einsatzes
- Verringerung der Instrumentenzahl im Operationsfeld,
- unproblematische Wiederholbarkeit der Operationen ohne Patientenbelastung

Dem Anwender steht heutzutage eine Reihe von medizinischen Lasern zur Verfügung. Entsprechend den gewünschten Problemlösungen muss die Qualität der unterschiedlichen Lasersysteme herangezogen werden. Im folgenden werden die am häufigsten im medizinischen Bereich eingesetzten Lasersysteme vorgestellt.

Argonlaser

Argonionenlaser sind Dauerstrich(cw)-Laser, die blaugrünes Mischlicht (488 und 514 nm) oder grünes Licht (514 nm) emittieren. Der Argonionenlaser wird wegen seiner hohen Selektivität für körpereigene Chromophore (Hämoglobin, Melanin) zur Koagulation von oberflächlichen Gefäßen in der Ophthalmologie und Dermatologie benutzt. Das Licht wird über einen Lichtleiter, an dessen Ende sich ein Fokussierhandstück befindet, geführt. Es stehen auch spezielle Scanner zur Verfügung, die eine automatisierte und gleichmäßige Behandlung von größeren Arealen ermöglichen.

Frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (sog. KTP-Laser)

Die Frequenzverdoppelung der Nd:YAG-Laserstrahlung erfolgt mit Hilfe eines Kalium-Titanyl-Phosphat(KTP)-Kristalls. Die Wellenlänge 532 nm wird in Hämoglobin gut absorbiert. Die klinische Anwendung entspricht weitgehend dem Argonionenlaser. Geräte mit hohen Ausgangsleistungen (bis 15 W) ermöglichen die Anwendung kurzer Impulszeiten, so dass die Behandlung weniger schmerzhaft für den Patienten ist.

Farbstofflaser

Das Funktionsprinzip des Farbstofflasers (FPDL = flashlamp pumped dye laser) basiert auf der Anregung einer organischen Farbstofflösung zur Fluoreszenz durch energiereiche Lichtblitze einer Blitzlampe. Dabei wird ein relativ breites Lichtspektrum emittiert. Mittels wellenlängenselektiver Filter wird allerdings nur eine bestimmte – je nach Lasergerät festgelegte oder wählbare – Wellenlänge verstärkt und über das Fasersystem ausgesendet. Zu den typischen verwendeten Farbstoffen zählt Rhodamin 6G, welches durch entsprechende Abstimmung Wellenlängen im Bereich des sichtbaren Lichtes zwischen etwa 570 bis 630 nm zu erzeugen vermag. Energiedichte, Impulszeit, Intervall und Wellenlänge werden dabei für die jeweilige Indikation so aufeinander abgestimmt, dass das bestmögliche Ergebnis erzielt werden kann. Klinische Anwendung finden diese spezialisierten Laser in der Dermatologie [Goldman 1999, Landthaler 1999].

Nd:YAG-Laser

Der Dauerstrich-Nd:YAG-Laser (1064 und 1320 nm) ist ein typischer Volumenkoagulator. Je nach verwendeter Leistungsdichte ist mit diesem Gerät eine tiefe, unspezifische Koagulation, eine Vaporisation bzw. das Schneiden von Gewebe möglich. Die Übertragbarkeit des Nd:YAG-Laserlichtes durch Glasfasern gestattet eine universelle Anwendung. Über flexible oder starre Endoskope kann es zur Koagulation von Blutungen, Fehlbildungen oder Tumoren benutzt werden; bei höherer Leistung auch zur Rekanalisation von Tumorstenosen [Philipp 1995b, Cholewa 1998, Waldschmidt 2004]. Mit einem Fokussierhandstück und entsprechend hoher Leistungsdichte sind Resektionen an parenchymatösen Organen, wie Leber, Milz, Pankreas und Niere, bei gleichzeitig guter Hämostase möglich. In den letzten Jahren wird der Nd:YAG-Laser auch zunehmend im Kontaktverfahren benutzt, d. h. eine spezielle Kontaktspitze aus synthetischem Saphir (Sapphire Probe) oder aber auch die nackte Quarzglasfaser (Bare Fiber) wird direkt auf das Gewebe aufgesetzt. Durch die hohe Leistungsdichte an der Kontaktstelle kommt es dort sehr schnell zur Karbonisation und Vaporisation. Dies bedeutet aber auch, dass schon in einigen Millimetern Entfernung, insbesondere bei kurzer Expositionszeit, keine thermisch wirksame Leistungsdichte erreicht wird, da die Energie bereits absorbiert oder sehr stark gestreut wurde. Der Koagulationssaum kann so begrenzt werden.

Im Nano- und Picosekundenbereich gepulste Nd:YAG-Lasersysteme (Q-switched Nd:YAG), mit denen eine Photodisruption des Gewebes erfolgen kann, haben sich in der Ophthalmologie zur Behandlung von Nachstarmembranen, aber auch für die periphere Iridotomie zur Therapie des akuten Glaukomanfalls etablieren können. Über optomechanische Koppler werden sie auch zur Lithotripsie eingesetzt.

Diodenlaser

Diodenlaser, die das Licht im nahen Infrarotbereich emittieren, werden seit Ende der 80-er Jahre in der Ophthalmologie eingesetzt. Aufgrund der Weiterentwicklung sowohl des spektralen Emissionsbereichs als auch der Ausgangsleistung erwirbt sich der Diodenlaser ein zunehmend breites Anwendungsfeld in der Medizin. Die Vorteile des Diodenlasers gegenüber den anderen Lasersystemen sind seine kompakte Bauweise, Tragbarkeit, wasserfreie Kühlung, leichte Installation und geringer Wartungsaufwand. Diodenlaser mit einer Emissionswellenlänge von 980 nm bzw. 940 nm können weitgehend das bisherige Indikationsspektrum eines cw-Nd:YAG-Lasers abdecken. Die geringere Eindringtiefe bei 980 nm kann bei den meisten Geweben durch entsprechende Veränderungen der Applikationsparameter wie z. B. höhere Leistung und/oder längere Bestrahlungszeit ausgeglichen werden. Die Tiefenwirkung der Koagulation ist für 1064 nm und 980 nm identisch, weil die Bereiche jenseits der optischen Eindringtiefe ausschließlich durch wellenlängenunabhängige Wärmeleitung beeinflusst werden. Das Hauptindikationsfeld der neuen Hochleistungsdiodenlaser ist zurzeit die Urologie [Muschter 1997]. Die Diodenlaser finden aber bereits Einzug auch in die anderen Disziplinen, z. B. HNO-Bereich [Hopf 2002].

Diodenlaser mit der Emissionswellenlänge von 630 nm bzw. 670 nm werden als Lichtquelle für die photodynamische Therapie eingesetzt [van den Bergh 2003].

CO₂-Laser

Der Dauerstrich-CO₂-Laser (10600 nm) ist wegen seiner hohen Wasserabsorption und damit geringen Eindringtiefe in das Gewebe ein sehr exaktes Schneidinstrument. Der Laser findet überall dort seine Verwendung, wo präzise Gewebeschnitte gefordert werden, ohne dass es zu einer wesentlichen thermischen Schädigung der Umgebung kommt. Seine blutstillende Wirkung ist gering, es lassen sich lediglich kapilläre Blutungen verhindern. Aufgrund ihrer starken Absorption im Wasser kann die Strahlung nicht mittels flexiblen Quarzfasern transmittiert werden. In zunehmendem Maße werden deshalb neben dem starren Spiegelgelenkarm Hohlleiter eingesetzt, die eine relativ flexible Strahlführung ermöglichen, bisher aber noch eine Reihe von Nachteilen aufweisen.

Im Fall des gepulsten CO₂-Lasers wird anstatt eines kontinuierlichen Strahls eine sehr schnelle Folge kurzer Impulse mit hoher Energiedichte emittiert, was aufgrund der reduzierten Wärmeabgabe an das umliegende Gewebe einen Schneide- bzw. Vaporisationseffekt mit noch geringerer thermischer Beeinflussung der Umgebung ermöglicht. Gepulste bzw. Dauerstrich-CO₂-Laser mit speziellen Scannersystemen, die das oberflächliche Abtragen von dünnen Hautschichten ermöglichen, werden vor allem im Bereich der Dermatologie und plastischen Chirurgie verwendet [Fuchs 1996, Goldman 1999, Landthaler 1999].

Erbium:YAG-Laser

Bei den Er:YAG-Lasern handelt es sich um blitzlampengepumpte Festkörperlaser, die das Infrarotlicht der Wellenlänge 2940 nm emittieren. Dies entspricht einem Absorptionsmaximum von Wasser. Bei der Verwendung von kurzen Pulslängen (ca. 1 ms) ist ein nahezu athermisches Abtragen von extrem feinen Hautschichten (je nach verwendeter Energiedichte bis zu 10 µm) möglich. Anwendung finden die Er:YAG-Laser vor allem im Bereich der Dermatologie,

plastischen Chirurgie und Zahnmedizin [Goldman 1999, Landthaler 1999]. Die Anwendung zur Bearbeitung von Hartgeweben wird zurzeit durch den Lichtübertragungsmodus (Spiegelgelenkarm) stark limitiert. Die Entwicklung einer Faser für den Er:YAG-Laser ist Gegenstand der Forschung.

Rubinlaser

Die Wellenlänge des Rubinlasers liegt bei 694 nm. In ihrer Auslegung als gütegeschaltete Lasergeräte (Q-switch-Rubinlaser, QSRL) liefern diese Laser hochenergetisches Licht mit einer Pulslänge von 20-40 ns. Der QSRL wird derzeit für die Behandlung von oberflächlichen pigmentierten Hautveränderungen sowie für die Entfernung von Tätowierungen angewendet. Neuerdings stehen Rubinlasergeräte zur Verfügung, die längere Pulszeiten (0,3-5 ms) ermöglichen. Diese Geräte werden in erster Linie zur Epilation eingesetzt.

Alexandritlaser

Der Alexandritlaser emittiert Licht mit der Wellenlänge von 755 nm. Als Q-switch-Laser verfügt dieses Gerät über Pulslängen im Nanosekundenbereich. Die klinische Anwendung und Applikationstechniken entsprechen weitgehend dem QSRL. Die Langpulsalexandritlaser mit Pulslängen im ms-Bereich werden für die Laserepilation verwendet.

Excimer-Laser

Excimer-Laser sind Gaslaser, deren ebenfalls gepulste Lichtemission im ultravioletten Bereich liegt. Bei kurzen Pulszeiten und sehr hohen Spitzenenergien kommt es zum Prozess der Photoablation. Neben der Anwendung zur operativen Behandlung der Myopie in der Hornhautchirurgie wird der Excimer-Laser auch in der Laserangioplastie eingesetzt [Gross 1994].

Holmium:YAG-Laser

Holmium:YAG-Laser emittiert das Licht mit der Wellenlänge von 2100 nm. Anwendung findet der Laser zur Bearbeitung von Hartsubstanzen wie Knorpel und Knochen. Dank der Möglichkeit der Faserübertragung kann der Laser endoskopisch eingesetzt werden (Arthroskopie, Lithotripsie).

HeNe-Laser

Der Helium-Neon Laser (632 nm) findet vor allem im Bereich der Low-Level-Lasertherapie (LLLT, Softlaser, Biostimulation) seinen Einsatz. Daneben werden diese Laser als Pilotlaser für die Laser, die das unsichtbare Licht aus dem UV bzw. IR-Bereich emittieren, verwendet.

Tabelle 1 stellt eine Zusammenfassung der medizinischen Anwendungsfelder für die wichtigsten medizinischen Laser dar.

Tabelle 1: Medizinische Anwendungsfelder der wichtigsten Lasersysteme

Lasertyp	Modus	Medizinisches Anwendungsfeld
Ar ⁺ , (Kr ⁺)	cw	Dermatologie, Ophthalmologie, HNO
KTP	gepulst	Plastische Chirurgie, Dermatologie
FDL	gepulst	Dermatologie (585 nm), Urologie (504 nm)
Nd:YAG	cw	Chirurgie, Urologie, Gynäkologie, Neurochirurgie, Gastroenterologie, Pulmologie
Nd:YAG	gepulst	Ophthalmologie, Lithotripsie
CO ₂	cw	Chirurgie, Dermatologie, HNO, Gynäkologie, Neurochirurgie, plastische Chirurgie
Er:YAG	gepulst	Dermatologie, plastische Chirurgie, Zahnmedizin
Diodenlaser	cw	Chirurgie, Dermatologie (810/940/980 nm), PDT (630 nm)
Excimer	gepulst	Angiologie, Ophthalmologie
Rubin	gepulst	Dermatologie
Alexandrit	gepulst	Dermatologie
Ho:YAG	gepulst	Urologie, Orthopädie

Perspektiven

Vor dem Hintergrund der hier angesprochenen Anwendungen des Lasers in der Medizin wird sich auch die künftige Entwicklung abspielen. Dabei werden folgende Faktoren maßgeblich sein:

- das noch bessere Verständnis der Wirkmechanismen,
- die Verfügbarkeit technisch ausgereifter Laserkonstruktionen und entsprechender Systemkonzepte, die dann auch zu einer Kostensenkung und damit breiteren Akzeptanz des Lasers führen,
- die Verfügbarkeit flexibler, optischer Transmissionssysteme für die entsprechende Strahlung, insbesondere von geeigneten optischen Fasern sowohl für den UV- als auch für den Infrarotbereich,
- das geeignete Zubehör,
- Kombinationstherapien, bei denen der Laser nur einen Teil des Therapiekonzepts darstellt
 - palliative Tumorbehandlung mittels Afterloading-Verfahren, Anwendung von Photosensibilatoren zur lokalen Veränderung des Absorptionsverhaltens im biologischen Gewebe,
- dosimetrische Verfahren und smart systems sowohl zur Wirkungskontrolle als auch zur Diagnostik.

Aus technischer Sicht geht der Trend in immer stärkerem Maße zur Nutzung von Festkörperlaser und Halbleiterlasern (Diodenlasern), die zu technisch einfacheren Systemen führen. Die Entwicklung entsprechenden Zubehörs wird im Bereich der endoskopischen Laserchirurgie immer neue und erweiterte Anwendungen ermöglichen.

In jedem Fall muss sich aber die Lasermedizin mit ihren Möglichkeiten am Stand etablierter oder alternativer technischer Verfahren messen, um so auch gezielt zu einer Verbesserung des Kosten-Nutzenverhältnisses in der Medizin beizutragen.

5 Problemstellung

Über das Knorpelgewebe und dessen Entwicklung, Aufbau, die intra- und interzelluläre Signalvermittlung besteht nach wie vor nur ein lückenhaftes Wissen. Ohne das grundlegende Verständnis der biochemischen Funktionsweise des Knorpelgewebes ist eine sinnvolle Behandlung nur bedingt möglich.

5.1 Aufbau und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels

Gemeinsame Strukturmerkmale synovialer Gelenke sind mit hyalinem Knorpel überzogene kongruente Gelenkflächen, Gelenkbänder und eine mit synovialer Schleimhaut ausgekleidete Gelenkkapsel (Abb 31).

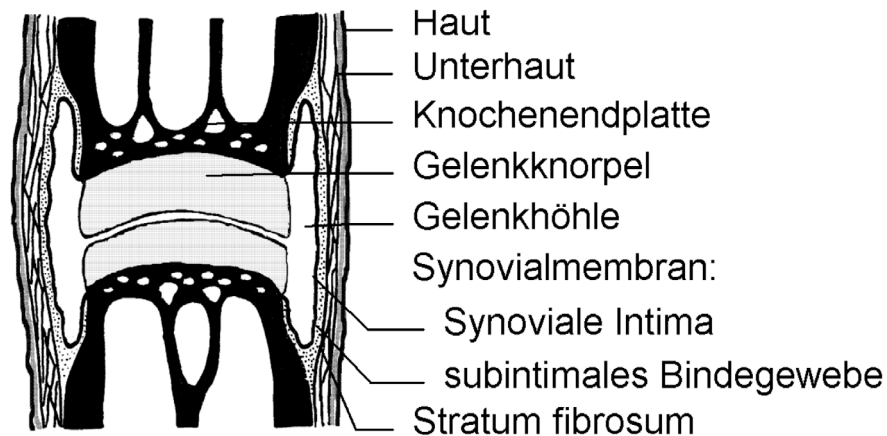


Abb. 31: Schematische Darstellung der Gelenkstrukturen.

Hyaliner Knorpel kann als speziell differenziertes Bindegewebe betrachtet werden, das aneural, alymphatisch und avaskulär ist. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit, und die Homöostase wird sowohl mediatorvermittelt als auch durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion reguliert.

Der hyaline Knorpel ist in seiner Konsistenz prall elastisch und erscheint makroskopisch mit glatt glänzender Oberfläche. Der hyaline Knorpel erhielt seinen Namen aufgrund seines bläulichen, gläsernen und durchscheinenden Aussehens (□□□□□ (hyalos)=glasartig, durchsichtiger Stein).

Lichtmikroskopisch wird er von apikal nach basal in sechs Zonen unterteilt:

1. Lamina splendens
2. Superfizialzone
3. Übergangszone
4. Radiärzone
5. Tidemark
6. Zone des verkalkten Knorpels.

Der hyaline Gelenkknorpel (Abb. 32) besteht aus Chondrozyten und der extrazellulären sowie perizellulären Matrix. Chondrozyten sind in Gruppen von Zellen, sogenannten Territorien, angeordnet. Zellen und Matrix innerhalb dieser Territorien werden als Chondrone zusammengefasst [Putz 1994]. Unterhalb der Lamina splendens, in der Superficialzone, liegen die Chondrozyten parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Die extrazelluläre Matrix hat in dieser Schicht einen von apikal nach basal abnehmenden Gehalt an Glycosaminoglykanen (GaG). Die Übergangszone ist durch runde Chondrozyten und einen hohen Gehalt an GaG gekennzeichnet. Die Radiärzone ist durch säulenartig angeordnete Chondrozyten und durch eine milde Abnahme der GaG nach basal charakterisiert. Die Tidemark erscheint als schmale basophile Linie, an die sich die Zone des verkalkten Knorpels anschließt. Unterhalb des verkalkten Gelenkknorpels liegt der subchondrale Knochenpunkt.



Abb. 32: Histologisches Bild des hyalinen Knorpels (Toluidinblau-Färbung): 1) isogene Zellgruppe, 2) Interterritorium, 3) Chondrozyt, 4) stark basophiles Territorium, 5) Chondron.

Hyaliner Knorpel kann aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften statische und dynamische Druckkräfte auffangen und auf das subchondrale Knochengewebe übertragen. Bei schnell einwirkenden Kräften mit hoher Verformungsgeschwindigkeit des Knorpels steigt die Knorpelhärte und damit der intraartikuläre Druck schnell an. Lang andauernde, statisch einwirkende Kräfte, wie z. B. beim Stehen, führen nach initialem Druckanstieg über einen langsamen Flüssigkeitsaustritt aus dem Knorpel zu intracartilaginärem Druckabfall. Dieses Verhalten, vergleichbar mit einem pneumatischen Stoßdämpfer, wird als viskoelastisches Verhalten des Gelenkknorpels bezeichnet [Putz 1994, Ding 1998, Egan 2000].

Bemessen auf das Trockengewicht des hyalinen Gelenkknorpels gliedern sich die prozentualen Anteile folgendermaßen: ca. 50% kollagene Fasern und ca. 10% Proteoglykane und Hyaluronsäurekomplexe [Cremer 1998, Newman 1998, Evans 1999]. Chondrozyten stellen nur ca. 0,1-1% des Trockengewichts dar, der Rest wird im nativen Zustand von Wasser und Elektrolyten gebildet [Treppo 2000, Poole 2001].

Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) sind Kollagen Typ II, knorpelspezifische Proteoglykane, Fibronectin, Kationen und andere kleinere Kollagene vom Typ IX und XII [Wu 1991, Cremer 1998]. Die Matrixbestandteile werden in den Chondrozyten selbst synthetisiert. Im gesunden Knorpel herrscht ein ständiges Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Matrixkomponenten. Die extrazelluläre Matrix ist im Gegensatz zu früheren Meinungen nicht nur als mechanisches Gerüst und Stabilisierungsbestandteil im Gewebe vorhanden, sondern entscheidend für Zellwachstum und Zelldifferenzierung verantwortlich. Die Matrixproteine spielen in der intrazellulären Kommunikation der Chondrozyten durch die

Interaktion mit den transmembranösen Rezeptoren, den Integrinen, eine entscheidende Rolle. Eine Aktivierung der Integrin-Rezeptoren hat die Stimulation der intrazellulären Signaltransduktion über das Zytoskelett und die Signalproteine in den Chondrozyten zur Folge, an der Proteine wie, z. B. Vinculin, Paxillin, Src-homology-protein (Shc), extracellular signal-regulated kinase p44 (Erk1) und p42 (Erk2) entscheidend beteiligt sind [Shakibaei 1999a,b und 2001].

Kollagene

Insgesamt sind in Wirbeltieren 18 verschiedene Kollagene beschrieben [Mayne 1993, Reed 1994]. Am weitesten verbreitet sind die „fibrillenformenden Klasse 1-Kollagene“ der Typen I, II, III, V und XI. Im humanen, hyalinen Gelenkknorpel dominieren die Kollagen Typen II, V und XI der Klasse 1-Kollagene. Diese Kollagene werden zu den Skleroproteinen gezählt, deren Makromoleküle aus drei Untereinheiten (α -Ketten) bestehen, die eine Tripelhelixform und die gleiche Größendimension besitzen. Daneben kommen im hyalinen Gelenkknorpel noch Klasse 3-Kollagene der Typen VI, IX und X vor. Die kollagene Matrix im hyalinen Gelenkknorpel besteht hauptsächlich aus Kollagenen der Typen II, IX und XI und kleineren Konzentrationen der Kollagentypen V, VI und X. Auf Kollagen Typ II entfällt ca. 80-95% des absoluten Kollagengehaltes der Matrix des Gelenkknorpels. Kollagen Typ II bildet ein Netzwerk aus Fibrillen, in dem die Proteoglykane des hyalinen Gelenkknorpels eingelagert werden. Die Fibrillen der interzellulären Knorpelmatrix sind dicker als die perizellulär liegenden Typ II Fibrillen [Poole 2001]. Es wurde diskutiert, dass dieser Größenunterschied charakteristisch für die perizelluläre Matrix und die Funktion der Chondrozyten ist. Kollagen Typ II scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Erhaltung des Phänotyps und die Vitalität von kultivierten Chondrozyten zu haben [Takagi 1992, Shakibaei 1997]. Der Kontakt von Chondrozyten zu Kollagen Typ II bewirkt eine Steigerung der Synthese von anabolen Signalproteinen in Chondrozyten. Daher scheint Kollagen Typ II an der Differenzierung von Chondrozyten beteiligt zu sein. Ein Verlust oder eine Veränderung dieses Kollagens könnte u.a. ein Grund für den Verlust des chondrogenen Potentials sein [Shakibaei 1997, 1999a,b].

Die Funktion des Kollagen Typs V ist zur Zeit nicht geklärt. Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung wie die des Kollagen Typ XI. Kollagen Typ VI, seine Funktion ist bisher unklar, hat Arginin-Glyzin-Aspartat-Sequenzen, die ihm durch Integrine, die Zell-Matrix-Interaktion erlauben. Normalerweise ist Kollagen Typ VI in tieferen Knorpelschichten lokalisiert, zeigt sich aber auch im osteoarthrotisch veränderten Gelenkknorpel in den apikalen Knorpelschichten [Brierley 1991]. Kollagen Typ IX soll die Funktion haben, die Kollagen Typ II-Moleküle kovalent zu vernetzen. Dieses Kollagen ist wichtig für die Quervernetzung der Kollagen Typ II-Fibrillen [van der Rest 1988]. Das Kollagen Typ X kommt in der Zone des verkalkten Knorpels und in den Wachstumszonen der langen Röhrenknochen vor. Kollagen Typ XI wurde in den gleichen Fibrillen wie Typ II gefunden. Eine Funktion wird ihm in der Kontrolle des Fibrillendurchmessers zugeschrieben. Möglicherweise besteht aufgrund der $\alpha 1$ (II)-Kette des Kollagen Typ XI eine spezielle Interaktion mit der Matrix. Durch die Osteoarthrose verändert sich die Balance zwischen Kollagenabbau und -neusynthese. Initial zeigt sich eine Steigerung der Kollagen Typ II-Synthese und nachfolgend ein erhöhter Abbau, so dass der Kollagen Typ II-Gehalt des osteoarthrotischen Knorpels sinkt [Ishiguro 2001]. Im Rahmen von Reparaturmechanismen kann der Gehalt an Kollagen-C-II-Propeptid wieder steigen [Salminen 2001]. Ein weiteres Phänomen ist der Nachweis von Gelenkknorpel unspezifischen Kollagenen

wie Typ I und Typ III. Das Auftreten von Kollagen Typ I und III konnte in den apikalen Schichten von geschädigtem Knorpel beobachtet werden [Aigner 1993, Nerlich 1993]. Durch das veränderte Synthesemuster der Chondrozyten ändern sich gleichzeitig die physikalischen und chemischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels und beeinflussen zusätzlich ungünstig den Erkrankungsgrad.

Proteoglykane und Glykoproteine

In das Netzwerk der Kollagene sind neben den polyanionischen Proteoglykanen, Hyaluronsäure und verschiedene Glykoproteine eingelagert, die auch als Nicht-Kollagenmoleküle bezeichnet werden. Hauptbestandteil des hyalinen Gelenkknorpels ist neben dem Kollagen Typ II das sogenannte Aggrecan-Proteoglykan [Heinegard 1989]. Es hat ein Molekulargewicht von 210 Kilodalton und Seitenketten, die kovalent an den Proteinkern binden. Das Gesamtmolekül hat an seinem aminoterminalen Ende verschiedene globuläre Domänen, wodurch die Interaktion mit Hyaluronsäure gegeben ist. Die Bindung an Hyaluronsäure wird durch ein sogenanntes Linkprotein stabilisiert [Neame 1999]. Das Aggrecan-Molekül macht ca. 5-10% des Knorpelfeuchtgewichtes aus. Durch die Sulfat- und Carboxylreste der Seitenketten ist das Molekül stark negativ geladen und bindet viele Kationen, wodurch ein hyperosmolares Milieu entsteht. Aufgrund des Donnan-Gleichgewichtes tritt Wasser in den Knorpel ein und der Druck im Gewebe steigt. Daher sind die Aggrecan-Proteoglykane indirekt verantwortlich für die prall-elastischen Eigenschaften des Knorpels. Es existieren zwei weitere Proteoglykane mit niedrigem Molekulargewicht, die ein bzw. zwei Seitenketten tragen, und Chondroitinsulfat bzw. Dermatan-sulfat enthalten. Proteoglykan-small 2 (PG-S2) bzw. Decorin soll an Kollagenfibrillen binden und an der Regulation der Fibrillogenese beteiligt sein [Wiberg 2001]. Dieses Proteoglykan macht ca. 1-2% der Totalmasse der Proteoglykane aus, stellt aber insgesamt den gleichen Molekulargewichtsanteil im Knorpel wie die großen Aggrecan-Proteoglykane dar. Hyaluronsäure, die die Bindung zwischen Proteoglykanen und Kollagenen stabilisieren soll, hat die höchste Konzentration in der Lamina splendens und den mittleren Knorpelschichten. Hyaluronsäure soll in intrazellulären Vakuolen gespeichert und anschließend ausgeschleust werden [Asari 1994].

Weitere wichtige Makromoleküle im hyalinen Gelenkknorpel sind die Nicht-Kollagenmoleküle. Hier sind Fibronectin, Fibromodulin, Tenascin, 58 Kilodalton-Protein, 148 Kilodalton-Protein, Anchorin, Cartilage oligomeric high-Mr Matrixprotein (COMP) und Chondrocalzin beschrieben. Fibronectin, Tenascin und Undulin bilden aufgrund ihrer Sequenzhomologie eine eigene Familie der extrazellulären Matrixproteine [Schuppan 1990]. Fibronectin, ein im Körper ubiquitär vorkommendes polymorphes Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht, gibt es in unlöslicher Form in der extrazellulären Matrix. Es werden drei Fibronectin-Typen sowie zwanzig Fibronectin-Isoformen unterschieden. Fibronectin hat seine Funktionen in der Beeinflussung der Zelladhäsion, Differenzierung, Migration und des Zellmetabolismus. Im humanen Gelenkknorpel wird das Fibronectin über $\alpha 5$ Ketten der very late activation antigens 5 (VLA 5) Integrine an die Chondrozyten gebunden. In Chondrozytenkulturen konnte gezeigt werden, dass Fibronectin wesentlich in der Signalvermittlung zwischen Matrix und Proliferation der Chondrozyten beteiligt ist [Enomoto-Iwamoto 1997]. Fibronectin scheint eine wichtige Rolle für das Überleben der Chondrozyten zu spielen. Die alleinige Präsenz von Fibronectin stimuliert das Wachstum von kultivierten Chondrozyten in vitro [Martin 2000]. Eine Hemmung des Fibronectin-Rezeptors kann den Zelltod des Chondrozyten zur Folge haben

[Pulai 2002]. Interessanterweise sind größere Mengen an Fibronectin in den oberflächlichen Schichten von osteoarthritischem Knorpelgewebe als mögliches Anzeichen von laufenden Reparaturmechanismen zu verzeichnen. Fibronectin fand sich im osteoarthrotischen Knorpel gegenüber gesundem Knorpel in 5-10fach erhöhter Konzentration [Brown 1990].

Die Synthese der Proteoglykane und Glykoproteine zeigt in den frühen Stadien der Osteoarthrose eine Synthesesteigerung der großen Aggrecan-Proteoglykane [Carney 1992]. Im weiteren Verlauf der Osteoarthrose sinkt der Proteoglykangehalt. Die neu synthetisierten Aggrecan-Moleküle unterscheiden sich in ihrer Größe und den Seitenketten. Sie sind signifikant größer, jedoch ist ihr Hyaluronsäuregehalt verringert [Rizkalla 1992].

Signaltransduktion in Chondrozyten

Die wesentliche funktionelle Aufgabe der Chondrozyten ist es, entsprechend ihrer gewichttragenden Funktion, Matrixbestandteile zu synthetisieren. Somit erklärt sich, warum in den Hauptbelastungszonen von gewichttragenden Gelenken eine stärkere Knorpelschicht mit höherem Proteoglykangehalt als in den weniger belasteten Zonen zu messen ist. Da Chondrozyten ihre Energie ausschließlich über anaerobe Glykolyse gewinnen und der Metabolit Laktat ausgeschieden wird, liegt der pH-Wert im Gelenkknorpel zwischen 6,8 und 7,1. Dynamische Be- und Entlastung des Gelenkknorpels führt zu einem erhöhten Durchstrom von Synovialflüssigkeit durch den Knorpel. Dies führt zu einer besseren Ernährung, gesteigertem Abtransport von Metaboliten und einer Konzentrationserhöhung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an den Chondrozyten [Kovach 1996]. In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Chondrozyten die Fähigkeit haben, Wachstumsfaktoren und Zytokine selbst zu synthetisieren. Die Wachstumsfaktoren und Zytokine führen in vitro zu verschiedenen Antworten der Chondrozyten. Auf die Matrixsyntheseraten von Chondrozyten in der Zellkultur stimulierend wirkende Faktoren sind Insulin-like-Growth-Faktor-1 (IGF-1), Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β), Platelet-Derived-Growth-Faktor-AA (PDGF-AA), Parathormon (PTH) und β -Fibroblast-Growth-Faktor (β -FGF) [Shakibaei 1999a,b, Rozenblatt-Rosen 2002]. Im humanen Gelenkknorpel konnte eine deutliche Korrelation zwischen IGF-1 Rezeptor Expression und der Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen Typ II und Proteoglykanen aufgezeigt werden [Shakibaei 1999a,b]. In wachsendem bzw. reifendem Knorpel wurde eine Expression von TGF- β nachgewiesen, die mit zunehmender Kalzifizierung des Knorpels langsam abnahm [Dodds 1994]. Matrixsynthese hemmende Zytokine an Chondrozyten sind Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) [Dingle 1990, Guerne 1990].

Der Gelenkknorpel muss in der Lage sein, Spitzenbelastungen in der Größenordnung 100-200 Atmosphären, die in Millisekunden auftreten, abzupuffern. Die Belastungen werden über die extrazelluläre Matrix auf die Chondrozyten übertragen und geben das Signal, den Knorpel entsprechend den Anforderungen zu stärken. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass eine dynamische Be- und Entlastung einer Chondrozytenkultur mit einer Frequenz von 1 Hertz zu einer gesteigerten Synthese von Matrixbestandteilen führt [Korver 1992]. Gleichzeitig konnte der Beweis erbracht werden, dass eine statische Belastung von Chondrozyten zur Reduktion der Matrixsynthese führt. Aufgrund der isolierten Lage von Chondrozyten im Gelenkknorpel ist die Zellmatrix-Interaktion entscheidend für die Regulierung der Syntheseleistung. Zellmatrix-Interaktionen werden u.a. durch spezialisierte Transmembranrezeptoren, die Integrine, vermittelt [Enomoto-Iwamoto 1997, Shakibaei 1995a,b, 1997 und 1999a,b, Pulai 2002]. Die Fähigkeit der Wahrnehmung mechanischer Signale und das Umwandeln dieser in eine biologische Antwort durch entsprechende Genexpression, Synthese von Proteinen und extrazellulärer Matrix (EZM) ist eine fundamentale Voraussetzung zum Überleben vom lasttragenden Gelenkknorpel. Hier spielen die transmembranären Integrinrezeptoren neben traditionellen Botenstoffen wie Ca^{2+} und cAMP eine entscheidene Rolle [Mobasheri 2002].

Die Tatsache, dass diese Moleküle die Zellmembran durchspannen und die Signale aus der EZM in den intrazellulären Raum übertragen, gibt ihnen eine große Bedeutung in der Signalübertragung von Chondrozyten. Es gibt zwei prinzipielle Typen von Zell-Adhäsion: Zell-Zell-Adhäsion und Zell-EZM-Adhäsion. Die Adhäsion hat eine fundamentale Bedeutung für

eine Zelle in der Verankerung, der Migration, der Signalübermittlung, dem Wachstum und für die Differenzierung.

Integrine sind heterodimere Moleküle, d. h. sie bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen Polypeptidketten, die als α und β Untereinheiten bezeichnet werden. Beide Untereinheiten haben große extrazelluläre Domänen, eine transmembranäre und eine relativ kleine intrazelluläre Domäne [Shakibaei 1995a,b und 1998].

Die α -Untereinheit ist mit 120-180 Kilodalton die größere Kette, die durch eine extrazelluläre Domäne mit mehreren divalenten kationischen Bindungsstellen charakterisiert ist. Die kationische Bindungsdomäne ist entscheidend für die Ligandenbindung [Hynes 1992].

Die β -Kette hat eine Größe von 90-110 Kilodalton und besitzt ebenfalls drei Domänen (extrazelluläre, transmembranäre und zytoplasmatische). Die zytoplasmatische Domäne enthält eine kurze Aminosäure-Sequenz (65 Aminosäuren), die homolog zu der Tyrosin-Phosphorylierungsstelle des Epidermal Growth Factor (EGF) Rezeptors und des Insulin-Rezeptors ist.

Abhängig von der Kombination der α - und β -Untereinheiten ist der Rezeptor in der Lage, verschiedene Matrixkomponenten zu erkennen und zu binden. Es gibt unterschiedliche β -Untereinheiten (mindestens 8) und 14 α -Untereinheiten. Die Integrinfamilie wird in mindestens 3 Hauptklassen, basierend auf der β -Untereinheit unterteilt ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$). Die $\beta 1$ -Integrine (Klasse 1) oder auch CD29 und VLA sind die vorherrschenden Integrine in der Kommunikation des Chondrozyten mit der extrazellulären Matrix [Hynes 1992, Shakibaei 1995a,b, Loeser 2000].

Die Klasse 2 ($\beta 2$ -Integrine) sind Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Leukozyten vorkommen und Klasse 3 ($\beta 3$ -Integrine) sind auf Thrombozyten nachgewiesen worden. Integrine mit $\beta 1$ - und verschiedenen α -Untereinheiten sind die wesentlichen Bindungsrezeptoren zu den Liganden der extrazellulären Matrix. Die Kombination von $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1) and $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) bindet an Kollagen und Laminin [Albelda 1993]. Die $\alpha 3\beta 1$ Kombination kann sowohl an den Liganden Fibronectin als auch an Kollagen Typ II binden. [Enomoto 1993, Shakibaei 1995a,b]. $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) bindet an Fibronectin und an zelluläre Liganden. $\alpha 5\beta 1$ ist ein bekannter Rezeptor in der extrazellulären Matrix, der für die Bindung des Fibronectin von besonderer Bedeutung ist. Die Blockierung des $\alpha 5\beta 1$ Rezeptors kann in Chondrozyten Apoptose induzieren und macht folglich die Rolle dieses Rezeptors in der Übermittlung von lebenswichtigen Signalen deutlich [Loeser 2000, Pulai 2002].

Die Bindung verschiedener extrazellulärer Proteine, wie Kollagen oder Fibronectin, an die Integrinrezeptoren aktiviert zytoskeletale Proteine, hierzu zählen Vinculin und Paxillin. Gleichzeitig kommt es auch zur Aktivierung von intrazellulären Signalproteinen wie der fokale Adhäsionskinase (FAK) [Shakibaei 1999a,b und 2001, Rozenblatt-Rosen 2002]. Es ist bekannt, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von FAK durch die Interaktion des Chondrozyten mit der extrazellulären Matrix durch die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne der β -Integrin-Untereinheit bedingt ist [Tahiliani 1997]. Ein weiteres elementares „downstream“ Signalprotein in der Integrin-vermittelten Signalkaskade ist das Adaptorprotein Shc (Src homology collagen), welches wesentlich an der Signaltransduktion zwischen der Tyrosinkinase und den Ras-Proteinen beteiligt ist. Es stellt ein bedeutendes Bindeglied, in der für Chondrozyten überlebenswichtigen Signalvermittlung zwischen der extrazellulären Matrix, den

β -Integrinen und dem Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase-Signalweg, dar [Wary 1996]. Phosphoryliertes Adapter-Protein Shc bildet einen Komplex mit einem weiteren Adapter-Protein dem Growth Factor Receptor Protein 2 (Grb2). Interessant ist, dass der $\alpha 5\beta 1$ Rezeptor am Signalweg des intrazellulären Shc-Grb2 Komplexes in Chondrozyten beteiligt zu sein scheint. Dieser gemeinsame Komplex aktiviert Ras [Harmer 1997]. Anschließend kommt es zu einer Stimulation von extracellular signal-regulated kinase 1 und 2 (Erk1/Erk2) und der MAP-Kinase Kaskade.

Dieser oben genannte Signalweg konnte an humanen Chondrozyten mehrfach nachgewiesen werden. Hierbei wurde deutlich aufgezeigt, dass der Komplex Shc-Grb2/Ras-MAP-Kinase durch IGF-1 induziert und diese Signalkaskade über Kollagen Typ II und $\beta 1$ -Integrin vermittelt wird (Abb. 33) [Shakibaei 1999a,b]. Daher sind diese Faktoren entscheidend für den Erhalt des differenzierten Chondrozyten. Eindrucksvoll konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung des Ras-MAP-Kinase Signalweges durch die Hemmung von Erk1 und Erk2 einen apoptotischen Zelltod zur Folge hat [Shakibaei 2001].

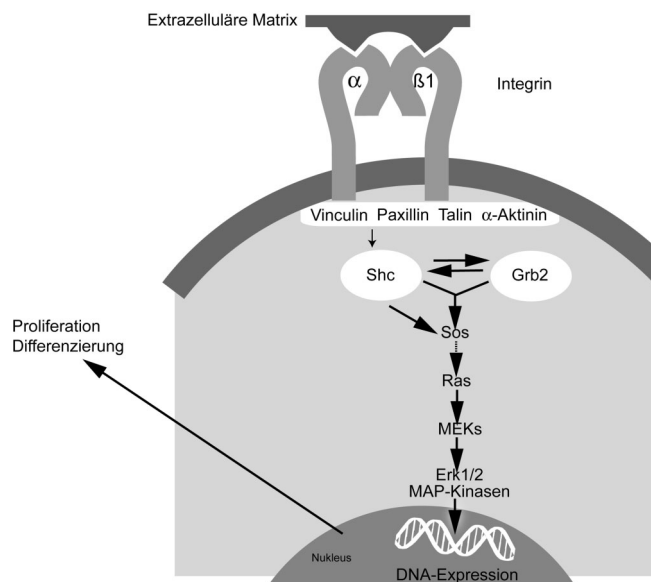


Abb. 33: Signaltransduktion in Chondrozyten.

5.2 Pathologie des Gelenkknorpels

Die Osteoarthritis (OA) ist ein pathologischer Zustand synovialer Gelenke, der mit Strukturveränderungen des Knorpels und anderer Gelenkanteile einhergeht [Alexander 1990, Jones 1992, Bellany 1997, Gardner 1994].

Weltweit leiden 85% der älteren Bevölkerung an einer Osteoarthritis [Senior 2000]. Die Prävalenz steigt mit dem Alter und es sind alle ethnischen Bevölkerungsgruppen betroffen [Sun 1997]. Röntgenologisch werden Gelenkdestruktionen bei 50% der Erwachsenen nachgewiesen [Kriegel 1995]. Die gewichttragenden Gelenke der unteren Extremität sind am häufigsten beteiligt. Es besteht keine Geschlechterdisposition zur Entwicklung einer Osteoarthritis, allerdings bestehen bezüglich der einzelnen beteiligten Gelenke geschlechtsspezifische Unterschiede. Männern erkranken häufiger als Frauen an einer Coxarthritis, während Frauen häufiger an einer Gonarthrose erkranken [Puett 1994].

Ätiologie

Der auslösende Faktor einer Osteoarthritis ist die relative Überlastung des Gelenkknorpels. Es besteht ein Missverhältnis von stattfindender Belastung und tatsächlicher Belastbarkeit [Gardner 1994, Moore 1994].

Ein hohes Patientenalter, abgelaufene Entzündungen und Stoffwechselerkrankungen sind neben anlagebedingten Faktoren Ursachen für eine verminderte mechanische Belastbarkeit des Knorpelgewebes. Die starke Bedeutung des genetischen Einflusses wird durch Familienstudien gestützt. Das COL2A1 Gen war das erste Gen, bei dem ein Kausalzusammenhang zur Osteoarthritis nachgewiesen wurde. Es kodiert für das Kollagen Typ II und befindet sich auf dem langen Arm vom Chromosom 12. Im Exon 31 ist Arginin durch Zystein an Position 519 ausgetauscht [Holderbaum 1999]. Dadurch ist das synthetisierte Kollagen einer Proteolyse leichter zugänglich. Obwohl eine Vielzahl weiterer Gendefekte beschrieben und Stämme transgener Mäuse gezüchtet wurden, die spontan eine Osteoarthritis entwickeln, ist die Osteoarthritis in der Mehrzahl der Fälle wahrscheinlich polygen bedingt.

Unphysiologisch hohe Belastungen des Knorpelgewebes entstehen bei Gelenkdysplasien und anderen Gelenkabnormalitäten wie Achsenfehlstellungen und Bandinstabilitäten sowie posttraumatischer Gelenkinkongruenz. Ein erhöhtes Körpergewicht sowie alle beruflichen und sportlichen Varianten einer unphysiologisch hoher Gelenkbelastung sind weitere Risikofaktoren bei der Entwicklung einer Osteoarthritis (Abb. 34).

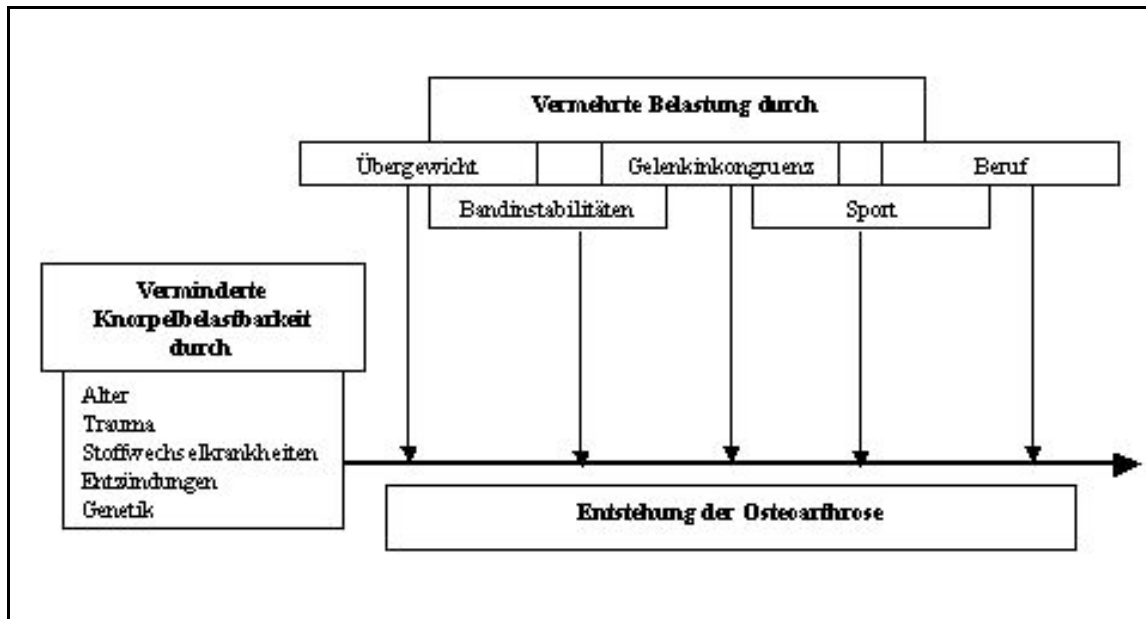


Abb. 34: Schematische Darstellung der Risikofaktoren bei der Entwicklung einer Osteoarthritis.

Pathogenese

Bei erhaltenem physiologischen und metabolischen Gleichgewicht des Knorpelgewebes halten sich durch Proteinase bedingter Matrixabbau und Neusynthese die Waage. Ein schädigendes Ereignis, das zu einem gesteigerten Matrixabbau durch von Chondrozyten freigesetzte Proteinase führt, ist der erste Schritt bei der Entstehung einer Osteoarthritis.

Schäden am fibrillären Maschenwerk des Knorpels haben angesichts des langsamen Umsatzes eine zentrale Bedeutung. Der Abbau erfolgt durch MMPs. Dies sind zinkabhängige Endopeptidasen, die als Zymogene sezerniert werden. Nach intrahelikaler Spaltung der Fibrillen durch MMP-1 (Kollagenase I), MMP-8 (Kollagenase II) und MMP-13 (Kollagenase III) denaturiert das Kollagen zu Gelatinderivaten und wird durch Proteinase wie MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) weiter abgebaut [Billinghurst 1997, Mercuri 1999]. Die Aggrecanase, MMP-7 (Matrilysin), MMP-10 (Stromelysin-2), Plasmin, Cathepsin B, Cathepsin L und Cathepsin D sind weitere Enzyme, denen eine zentrale Rolle beim Abbau der Kollagene und Proteoglykane zukommt [Mercuri 1999]. IL- α , IL- β und TNF- α sind die stärksten Stimulatoren der Freisetzung matrixdegradierender Enzyme [Nemoto 1996].

Die Aktivität der MMPs wird durch Proteaseinhibitoren, wie α_2 -Makroglobulin oder den ebenfalls von Chondrozyten synthetisierten Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) gehemmt. TIMP-1 bildet dabei einen hochaffinen Komplex mit den MMPs und hemmt diese. Die TIMP-2 ist der TIMP-1 zu 42% homolog und besitzt des Weiteren die Eigenschaft, mit den Proenzymen der MMPs Komplexe zu bilden. Mediatoren, wie IL-6, IL-11, TGF- β und LIF (leukemia inhibiting factor), führen zur verstärkten Freisetzung der TIMPs, weswegen sie auch als Chondroprotektoren bezeichnet werden [Mercuri 1999].

Kompensatorisch findet im Anfangsstadium der Osteoarthritis eine gesteigerte Synthese von ECM und chondrozytärer DNA statt [Sandy 1984]. Dies wird durch Produkte der Matrixdegeneration (Aggrecan- und LP-Fragmente) und durch Wachstumshormone, wie IGF,

TGF- β , BMP-2 und OP-1, vermittelt [Tesch 1992].

Es besteht ein erhöhter Matrixumsatz, ohne dass es zu einem Nettoverlust der ECM kommt. Die erhöhte Syntheserate der ECM-Proteine und chondrozytärer DNS repräsentiert das Ausmaß des osteoarthrotischen Prozesses. Neusynthetisierte Kollagene und Proteoglykane weisen jedoch Strukturanomalien gegenüber gesundem Knorpelgewebe auf [Gulisano 1993]. Histologisch ist das frühe Stadium der OA durch eine Proliferation der Chondrozyten gekennzeichnet, die im weiteren Verlauf als Clusterformation, proliferierende Zellnester oder als Brutnester imponieren [Matsui 1997].

Im Verlauf der OA kommt es zur metabolischen Dekompensation. Der proteolytische Abbau kann nicht mehr durch eine erhöhte Synthese kompensiert werden. Dadurch entsteht ein Nettoverlust der Grundsubstanz. Der Abbau des Kollagenetzwerkes führt primär zu einer erhöhten Wasserbindungskapazität der darin eingeschlossenen Proteoglykane [Dean 1991], so dass der Knorpel makroskopisch geschwollen erscheint. Histologisch imponiert der Verlust der Proteoglykane als Demaskierung der Kollagenfasern [Gulisano 1993]. Ein Hauptcharakteristikum der Osteoarthrose ist dabei der Aggrecanverlust. Nach Spaltung des bei Säugetieren hochkonservativen Proteinkerns kommt es zur Diffusion des Glykosaminoglykan tragenden Anteils aus dem Gewebe. Mit der Wasserbindungskapazität der Chondroitin- und Sulfatseitenketten gehen auch die funktionellen Eigenschaften des Knorpelgewebes verloren [Häuselmann 1997].

Die Synthesekapazität der Chondrozyten vermindert sich kontinuierlich und die proteolytischen Prozesse schreiten mit unverminderter Intensität voran. Das Endstadium der Osteoarthrose ist durch teilweise totalen Knorpelsubstanzverlust charakterisiert. Makroskopisch liegt jetzt der ehemals subchondrale Gelenkknochen frei [Morini 1996].

Im Verlauf der Osteoarthrose wird die Synovia im Rahmen einer sekundären Synovitis in den pathologischen Prozess miteinbezogen. Freigesetztes NO führt zur Expression der Cyclooxygenase 2 (COX 2) und vermehrten Bildung von Prostaglandin H₂ (PGH₂). Neben Prostaglandinen und weiteren Entzündungsmediatoren werden von den endothelialen Zellen des Synoviums auch Proteasen und reaktive Sauerstoffverbindungen synthetisiert. Diese beschleunigen die Knorpeldestruktion und sind für einen Großteil der Klinik einer symptomatischen Osteoarthrose verantwortlich [Manicourt 2000].

Arthrosestadien

Der Verlauf der Arthrose lässt sich in 4 Stadien unterteilen:

Stadium I

Der Verlust des Glanzes der Knorpeloberfläche ist eine der frühesten strukturellen Veränderungen. Der Knorpel erscheint matt-grau-gelb und weist eine weichere Konsistenz als ein normaler Knorpel auf.

Histologisch erkennt man die beginnende oberflächliche Auffaserung (Fibrillation). Es zeigen sich Chondrozytennekrosen in einer bandförmigen Zone der Gelenkoberfläche. Oberflächliche Knorpelfissuren sind oft parallel zur Oberfläche und ragen mit zunehmender Knorpelzerstörung in die Matrix hinein.

Stadium II

Nachfolgend treten in den belasteten Zonen umschriebene oberflächliche Defekte auf, die als Rauigkeiten oder stärkere Unebenheiten auffallen. Tiefere Läsionen können als unregelmäßig gestaltete, umschriebene Defekte der Knorpelsubstanz (Ulzerationen) vorliegen.

Histologisch zeigen sich Fibrillationen, die die gesamte Knorpelschicht durchziehen, so dass oberflächliches Knorpelgewebe mechanisch abgerieben wird. Seitlich davon proliferieren die restlichen Chondrozyten zu kleinen Zellhaufen. Im Laufe der Arthrose verbreitet sich die Zone des verkalkten Knorpels. Die Tidemark, die meist als schmale basophile Linie vorkommt, kann sich verdoppeln oder vermehrfachen.

Stadium III

Fortgeschrittene Fälle zeigen einen ausgedehnten herdförmigen oder kompletten Schwund des Knorpels. Wenn die freigelegte knöchernen Deckplatte Defekte aufweist (Knochenglatze), ist sie mit Granulationsgewebe bzw. Narbengewebe überzogen, das sich wärzchenförmig auf die Oberfläche erstreckt. Randwärts liegt noch Knorpelgewebe vor, das arthrotisch entsprechend dem Stadium II verändert ist. In diesem Bereich finden sich regelmäßig kleinere Nekrosen. Diese werden entweder abgestoßen, womit der spongiöse Markraum freigelegt wird, oder in die Spongiosa eingepresst und von Resorptionsriesenzellen abgebaut, oder sie bleiben als Geröllzysten aus Blut- und Nekroseresten übrig. Die knöchernen Deckplatte ist hyperostotisch verdickt. Das Hervortreten der fibrillären Grundstruktur (Demaskierung der Fasern) tritt erst später im Verlauf der Arthrose auf.

Der arthrotische Knorpelzerstörungsprozess kann mit der Entwicklung eines Pannusgewebes einhergehen, das von dem Gelenkkapselersatz auf den Knorpel übergreift und in die oberflächliche Chondrozytenlakunen eintritt, sie vergrößert, und somit das Fortschreiten des Abbaus der Knorpelsubstanz unterstützt.

Stadium IV

In diesem Stadium liegt ein Ulkus im Bereich der subchondralen Knochenplatte mit direkter Eröffnung des spongiösen Markraumes vor. Es bilden sich in den Hauptbelastungszonen

größere Pseudozysten und als Zeichen der Umbauprozesse in den Entlastungszonen „Randexostosen“. Pseudozysten stellen ein- bis mehrkammerige Hohlräume dar, die teilweise mit Flüssigkeit gefüllt sein können. Sie kommen durch Knochennekrosen und damit verbundenen Deckplatteneinbrüchen zustande. Exostosen erscheinen als Knochenauflagerungen über der alten subchondralen Knochenzone oder als ossäre Auswüchse im Gelenkbereich. Vom subchondralen Markraum greift ein Granulationsgewebe auf Knochen und Knorpel über. Mononukleäre Rundzellen grenzen an den nicht verkalkten Knorpel, verkalkter Knorpel und Knochen werden häufig von mehrkernigen Riesenzellen resorbiert.

Klinische Symptome

Für die Patienten ist der Gelenkschmerz in der Regel die im Vordergrund stehende Beschwerdesymptomatik. Weitere klinische Befunde sind eine schmerzhaft eingeschränkte Gelenkbeweglichkeit, Anlaufschmerzen, Krepitationen und veränderte Gelenkkonturen. Nach längerem Verlauf finden sich Sehnenkontrakturen und Muskelatrophien [Bellamy 1997, Muehleemann 1995].

Die Diagnose einer Osteoarthrose beruht hauptsächlich auf radiologischen Befunden. Eine Verschmälerung des Gelenkspaltes ist durch den Verlust des Knorpels bedingt. Weitere radiologische Kriterien der Osteoarthrose sind Osteophyten, eine subchondrale Sklerosierung und subchondrale Zysten. Als Zeichen einer Beteiligung des subchondralen Knochens stellen sich Gelenkdeformitäten radiologisch dar [Gross 1997, Hammerschmidt 1997].

5.3 Behandlung des Knorpelschadens

Die primäre Behandlung der Osteoarthrose erfolgt konservativ und wenn möglich nicht medikamentös. Ziel ist es, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Ein weiterer Therapieschwerpunkt ist die Behandlung der Schmerzsymptomatik.

Krankengymnastische Übungen erhalten oder verbessern die Gelenkbeweglichkeit. Damit wird eine Immobilisation des Patienten sowie eine Atrophie von Muskeln und Knochen der betroffenen Extremität verhindert bzw. vermindert. Durch Gelenkschienen und Gehhilfen ist es möglich, die auf den Knorpel einwirkenden Druckkräfte zu vermindern und dadurch das weitere Fortschreiten der Osteoarthrose zu verhindern [Dieppe 1990].

Die durch Erwärmung des Gewebes bedingte reaktive Hyperämie führt zu einer Minderung der Schmerzen und Lockerung bestehender Muskelverkrampfungen. Zur oberflächlichen Erwärmung werden neben warmen Bädern und Packungen auch infrarotes Licht, Ultraschall, Mikro- und Kurzwellen angewendet [Puett 1994].

Der Schmerz kann durch transkutane Nervenstimulation oder Akupunktur als klassische Verfahren der Schmerztherapie gemindert werden. Die Anwendung topischer, lokal irritierender Substanzen, gepulster elektromagnetischer Felder, Laserlicht niedriger Leistung sowie der Vibrationstherapie stellen experimentelle Ansätze der Schmerztherapie dar.

Medikamentös wird die Schmerzsymptomatik mit nichtsteriodalen Antiphlogistika, Opiaten und Antidepressiva therapiert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der pharmakologischen oder chirurgischen Nervenblockade.

Die entzündliche Symptomatik einzudämmen, um dadurch das weitere Fortschreiten der Knorpeldestruktion zu verhindern und die Schmerzen zu minimieren, ist ein weiterer Therapieansatz. Dies erfolgt durch nichtsteriodale Antiphlogistika, intra- und periartikuläre Steroidinjektionen sowie Punktion eines entzündlichen Gelenkergusses [Fassbender 1995]. Das gleiche Ziel verfolgt die Synovektomie der entzündeten Synovia, die chirurgisch oder radioaktiv erfolgen kann [Cruz-Esteban 1995]. Bei Versagen der konservativen Behandlungsmethoden steht die Korrekturostetomie als chirurgisches Verfahren zur Verfügung. Diese Behandlung, die eine unphysiologisch hohe Gelenkbelastung korrigiert, kommt nur bei durch Gelenkfehlstellungen verursachter Osteoarthrose in Frage.

Ausgefranst und aufgerauter Knorpel kann arthroskopisch mit motorisierten Saug-Schneide-Instrumenten geglättet werden. Alle losen Teile werden aus dem Gelenk herausgesaugt. Ist der Gelenkknorpel bereits auf dem Knochen abgerieben, besteht die Behandlung darin, diesen Knochen von seiner oberflächlich abgestorbenen Schicht zu befreien, damit dort ein sogenannter Ersatzknorpel nachwachsen kann. Mit einem motorisierten Fräsinstrument wird nun der Knochen soweit oberflächlich angefranst, bis der subchondrale Knochen eröffnet und die Blutversorgung des Knochens freigelegt wird. Nur so ist es möglich, dass innerhalb von etwa 3-6 Monaten die aus dem Markraum einsprossenden mesenchymalen Zellen ein faserhaltiges Ersatzknorpelgewebe bilden können, das die Funktion des verlorengegangenen Gelenkknorpels zum großen Teil übernimmt.

Etablierte Standardverfahren, die die Verletzung des subchondralen Knochens mit Eröffnung des Markraumes und Einsprossung pluripotenter Zellen beinhalten, sind seit Jahren bekannt. Die Methoden nach Pridie, Magnuson, Ficat, die Mikrofragmentierung nach Rodrigo oder die subchondrale Abrasion mit kontinuierlicher passiver Bewegung nach Salter sind vielfach

beschrieben worden [Priedie 1959, Ficat 1979, Friedmann 1984, Salter 1984, Mitchell 1987, Kim 1991, Frisbie 1999, Muller 1999].

Seit Anfang der achtziger Jahre werden experimentelle Untersuchungen zum Einsatz von Lasern in der Orthopädie durchgeführt. Aufbauend auf diesen Daten wird die Lasertechnik seit einigen Jahren in der operativen Orthopädie eingesetzt. Zur Resektion von Weichteilstrukturen im Kniegelenk, wie z. B. Knorpel und Meniskus wird insbesondere der Einsatz von Ho:YAG-Lasern propagiert. Das Licht des Ho:YAG-Lasers mit der Wellenlänge von 2100 nm kann durch dünne Fasern transmittiert werden, womit auch der arthroskopische Einsatz des Lasers erfolgen kann. Während bei instrumentellen Eingriffen in herkömmlicher Technik mit Saug-Schneide-Instrumentarium und modernisierten Shaver-Systemen lediglich ein Knorpeldebridement, d. h. Entfernung aller lockeren Teile möglich ist, soll durch gezielte Laserablation eine wesentlich glattere Oberflächensituation gelingen. Ferner ist durch die Anwendung des Lasers eine suffiziente Blutstillung bei der arthroskopischen Operationen möglich, so dass postoperativ nur minimale Schwellungen und Nachblutungen zu erwarten sind. Allerdings weisen einige klinische Erfahrungen darauf hin, dass bei unsachgemäßer Laseranwendung des Ho:YAG-Lasers thermische Neben- und Spätwirkungen auftreten können, so dass arthroskopische Laser-Orthopädie nur erfahrenen Operateuren vorbehalten sein sollte [Schmolke 1997].

Beim Vorliegen ausgeprägter Osteoarthrosen besteht schließlich die Möglichkeit, die abgeriebenen Oberflächen durch künstliche Teile aus Metall bzw. Polyäthylen (sog. Endoprothesen) zu ersetzen. Diese Art von Operation stellt einen großen Eingriff mit insbesondere für ältere Patienten hohem Risiko und hoher Komplikationsrate dar. Das Ergebnis einer solchen Gelenkersatzoperation ist häufig für den Patienten und Operateur nicht sicher kalkulierbar und unbefriedigend. In der Behandlung der Gonarthrose sollte deswegen die endoprothetische Versorgung eines Patienten an letzter Stelle des Spektrums der operativen Möglichkeiten stehen [Häuselmann 1997].

Stimulation der Knorpelneubildung

Im Gegensatz zu früheren Ansichten stellt der adulte Gelenkknorpel durchaus ein lebendiges und regenerationsfähiges Gewebe dar. Allerdings hat der geschädigte Gelenkknorpel eine sehr limitierte Potenz zur Heilung größerer Defekte, die ein Ausmaß von mehr als zwei bis vier Millimetern im Durchmesser zeigen [O'Driscoll 1998].

In zahlreichen Zell- und Organkulturen konnte gezeigt werden, dass Gelenkchondrozyten als Antwort auf inflammatorische Reize oder degenerative Prozesse vermehrt proliferieren und eine inkomplette Knorpelmatrix synthetisieren [Salter 1993, von der Mark 1998, Ghivizzani 2000]. Die klassische, chirurgische Behandlung des chronischen, symptomatischen Knorpeldefektes umfasst Methoden, die durch Induktion einer Blutung aus dem subchondralem Knochen einen Heilungsprozeß im Defekt induzieren [Johnson 1991]. Die meisten Methoden führen zu einer fibrocartilaginären Narbenbildung im Defektbereich; es wird also keine Restitutio ad integrum erreicht.

Die große Anzahl an therapeutischen Methoden zur Deckung von Knorpeldefekten unterscheidet sich im Wesentlichen in ihrem therapeutischen Ansatz. Eine Therapieform stellt die Induktion der Regenerationsfähigkeit der Chondrozyten durch mechanische Reize, z. T. in Kombination mit Transplantation von chondrogenen Materialien, dar. Außerdem gibt es Verfahren, bei denen Chondrozyten direkt in den Defekt als natives Gewebe oder neuerdings als Zellsuspension transplantiert werden. Etablierte Standardverfahren beinhalten die Verletzung des subchondralen Knochens mit Eröffnung des Markraumes und Einsprossung pluripotenter Zellen, die zu einer Anregung der Knorpelregeneration führen sollen.

Durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren TGF- β , FGF, IGF und EGF ist es möglich die Chondrozyten zur Matrixsynthese zu stimulieren [Dore 1994, Günther 1994]. Chondroprotektive Substanzen, wie IL-6, IL-11, TGF- β und LIF, hemmen durch verstärkten Freisetzung der TIMPs die Knorpeldegeneration. Klinische Bedeutung für die Synthesestimulation haben Glykosaminyk-Polysulfat, Glykosaminyk-Peptidkomplex, Pentosan-Polysulfat und Hyaluronan als Derivate der physiologischen Glykosaminoglykane erlangt [Jones 1992, Puttick 1995].

Durch Stimulation mit elektromagnetischen Feldern und Anlegen eines gepulsten Stromflusses wurde der Nachweis erbracht, dass das Knorpelgewebe auch durch physikalische Reize zu einer vermehrten Matrixsynthese angeregt werden kann [Norton 1981].

Ähnliches wird über die Anwendung der Low-Level-Lasertherapie (LLLT) berichtet [Spivak 1992]. Zum Beispiel zeigen Knorpelzellkulturen von Mäuseembryonen nach Bestrahlung mit dem CO₂-Laser bei einer Leistungsdichte von 25 mW/mm² histologisch eine deutlich gesteigerte Chondrogenese [Ahmadi 1992]. Weitere Hinweise einer möglichen Stimulation mittels Laserlicht liefert die von Herman¹ durchgeführte Untersuchung, in der Explantatkulturen von Rinderknorpel mit einem cw-Nd:YAG-Laser mit 11,5 W/cm² über Zeiträume bis zu 133 Sekunden bestrahlt wurden. Nach Bestrahlung mit dem Laser sich eine Steigerung der Kollagen-, Proteoglykan- und DNS-Synthese durch Radioisotopenmarkierung nachweisen, die bis zu 3 Tage nach der Bestrahlung andauerte. Wurde ein gepulster Nd:YAG-Laser verwendet, so kam es zu einer Minderung der Matrixsynthese [Herman 1988]. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Spivak beschrieben [Spivak 1992]. Explantatkulturen von Rinder- und Hundeknorpel wurden mit dem cw-Nd:YAG-Laser bestrahlt. Bei verwendeten Leistungsdichten

von 10-79 W/cm² wurde mittels Radioisotopenmarkierung eine bis zu 100%ige Steigerung der Matrixsynthese nachgewiesen.

Durch eine Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser mit 53 W/cm² und 30 J ließ sich der Heilungsprozess traumatisch bedingter Knorpelläsionen bei Beaglehunden nicht beschleunigen [Hardie 1989]. Der bestrahlte Knorpel zeigte gegenüber der Kontrolle keine makroskopischen und histologischen Veränderungen. In einer weiteren in-vivo Studie wurde von einer beschleunigten Knorpelregeneration nach Nd:YAG-Laserbestrahlung berichtet. Eine Bestrahlung der Gelenkknorpelläsionen von Meerschweinchen mit 70 W/cm² und 25 J führte zu einer beschleunigten Defektheilung [Schultz 1985]. Ebenfalls wurde in einer weiteren Arbeit nach der Bestrahlung von Hundeknorpel mit dem Nd:YAG-Laser mit niedriger Energie eine beschleunigte Regeneration von Knorpeldefekten beobachtet [Kollmer 1990].

Knorpeltransplantation

Allogene Knorpeltransplantation

Die Knorpeltransplantation zur Behandlung von Defekten in der Gelenkknorpeloberfläche wurde erstmalig von Wagner als orthotope Knorpel-Knochen-Transplantation vorgenommen [Wagner 1972]. Hierbei wurde das Transplantat aus dem hinteren Bereich des Femurkondylus entnommen und in den ventral gelegenen Defekt transplantiert. Da in vielen Fällen kein ausreichender Erfolg erzielt wurde, entwickelte sich die Methode der Mosaiktechnik. Bei dieser Technik werden osteochondrale Zylinder mit einem kleinen Durchmesser mosaikförmig in einen osteochondralen Defekt eingesetzt [Hangody 1997a,b]. Für eine abschließende Beurteilung gibt es noch keine Langzeit-Studien, die eine hinreichende Nachbeobachtungszeit mit einbeziehen.

Allogene, frische bzw. kryokonservierte Knorpel-Knochen-Transplantate haben den Nachteil einer unterschiedlichen Knorpeldicke zwischen der Spender- und Empfängerseite. Weitere Schwierigkeiten bereiten immunologische Reaktionen, die Erhaltung der Vitalität und Nutrition der Chondrozyten, Konservierungsart und limitierte Verfügbarkeit der Zellen. Zudem stellt die allogene Transplantation ein Risiko für die Übertragung von viralen Infektionen dar [Minas 1997]. Verschiedene Untersuchungen zeigen unterschiedliche Überlebensraten der Chondrozyten, die bis zu 78% nach 24 Monaten bei allogenen Ersatz des medialen Femurkondylus reichen. Entscheidend für die Überlebenszeit der Chondrozyten ist die Konservierungsart. Dieses Verfahren eignet sich ausschließlich für den traumatischen Knorpeldefekt und nicht für die Behandlung einer primären Arthrose [Saleh 2000].

Chondrogene Materialien

Vorteile gegenüber der allogenen Knorpeltransplantation zeigen proliferationsfähige Spendermaterialien, welche die Fähigkeit haben, eine knorpelähnliche Substanz zu bilden. Zu diesen autologen Materialien gehören das Perichondrium und das Periost. Nach dem heutigen Kenntnisstand soll die Deckung mit Periost die Differenzierung der in den Knorpeldefekt einwandernden Zellen zu hyalinem Knorpelgewebe induzieren. Tierexperimentelle Untersuchungen mit Perichondrium zeigten, dass das Perichondrium als Transplantat in der Lage ist, das für den Gelenkknorpel typische Kollagen Typ II zu synthetisieren. Periost wird als Füllmaterial hauptsächlich in Verbindung mit passiver kontinuierlicher Bewegung (CPM -

continuous passive motion nach Salter) verwandt. Jedoch kommt es bei beiden Verfahren zur Ausbildung von minderwertigem Knorpelgewebe, das längerfristigen Belastungen nicht gerecht werden kann. Nachbeobachtungszeiten, die über fünf Jahre hinausgehen, relativieren die zunächst guten Erfolge, da es über längere Zeit häufig zur Ausbildung von schmerzhaften, enchondralen Ossifikationen kommt [Mandelbaum 1998].

Autologe Chondrozytentransplantation

Brittberg berichtete erstmalig über eine erfolgreiche Knorpelheilung bei Patienten mit traumatischen, lokalisierten Knorpelschäden durch die Implantation autologer Chondrozyten und eine Periostabdeckung, die neue Hoffnung in der Behandlung von ausgedehnten Knorpeldefekten weckte [Brittberg 1994].

Nach Entnahme von Knorpelgewebe aus der unbelasteten Zone der femoralen Condyle erfolgt im Anschluss an die enzymatische Isolierung der Chondrozyten die Kultivierung der Zellen in einer Monolayerkultur. In dieser Kulturfom dedifferenzieren die Chondrozyten in einen fibroblastenartigen Zelltyp, der eine Vermehrung der Chondrozyten begünstigt.

In der klassischen ACT Methodik werden die Zellen nach ca. 14-21 Tagen in eine Suspensionkultur überführt, reimplantiert, und der Defekt wird mit einem Periostlappen abgedeckt. Anschließend erfolgt eine frühfunktionelle Nachbehandlung [Brittberg 2001, Minas 1997].

Ziel der Untersuchungen

Grundlage der hier vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen, die zeigten, dass Laserlicht ebenfalls in der Lage ist, die Knorpelregeneration herbeizuführen. Zu diesem Zwecke wurden zahlreiche Untersuchungen am Knorpelgewebe in vitro und in vivo sowohl mit chirurgischen Lasersystemen als auch mit den niederenergetischen Laser durchgeführt.

6 Experimentelle Untersuchungen zum Einsatz der Laser am Knorpelgewebe

6.1 In-vitro-Untersuchungen der Lasersysteme am Knorpelgewebe

6.1.1 Einfluss der Wellenlänge, Leistungsdichte und Einwirkzeit der Laserstrahlung auf Chondrozytenkulturen

Die Chondrozyten spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau des verlorengegangenen Gewebes im osteoarthrotischen Knorpel. Im Rahmen einer In-vitro-Untersuchung soll deshalb evaluiert werden, ob durch die Laserbestrahlung die Chondrozyten des osteoarthrotischen Knorpels zu einer gesteigerten Synthese der Matrix angeregt werden können. Weiterhin soll untersucht werden, welchen Einfluss Laserparameter wie Wellenlänge, Leistungsdichte und Bestrahlungszeit auf das Verhalten der Chondrozyten in Chondrozytenkulturen nach deren Bestrahlung mit Laserlicht haben.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollen Voraussetzungen für eine potenzielle Anwendung der Lasertherapie im Rahmen der Osteoarthrosebehandlung evaluiert werden. Zu diesem Zwecke wurden die dem humanen osteoarthrotischen Knorpel entnommenen Chondrozyten kultiviert und mittels verschiedener Lasersysteme bei Verwendung unterschiedlicher Laserparameter (Leistungsdichte und Expositionszeit) bestrahlt. Die dabei zu erwartenden Veränderungen der Matrixsynthese sollen durch Messungen der Radioaktivität vom ^3H -Prolin quantifiziert werden.

Der humane osteoarthrotische Gelenkknorpel wurde im Rahmen der Gelenkendothrosenoperationen bei Cox- und Gonarthrose entnommen. Nach der Entnahme wurde der Gelenkknorpel sofort steril vom knöchernen Gelenkteil abgetrennt und in 4°C kaltes Kulturmedium transportiert. Vor ihrer Anwendung im Rahmen der geplanten Versuche wurden die Proben dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und danach 24 Stunden zur Erholung im Nährmedium inkubiert. Als Kulturmedium wurde Opti-MEM® mit 15% FKS; 100 IE Penicillin, 100 µg Streptomycin und 2,5 µg Amphotericin B pro Milliliter verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%.

24 Stunden nach der Entnahme wurden aus den Knorpelproben Zylinder mit einem Durchmesser von 4 mm gestanzt und in die Schalen einer 96er Lochplatte gegeben. Nach Zugabe von jeweils 250 µl frischem Kulturmedium wurden diese zur Erholung für weitere 24 Stunden inkubiert.

Jeweils eine Hälfte der Zylinder der entnommenen Knorpelproben wurde der Versuchsgruppe bzw. der Kontrollgruppe zugeordnet. Die Zylinder der Versuchsgruppe wurden bestrahlt mit Laserlicht. Vor der eigentlichen Laserbehandlung wurde das Nährmedium aus den Schalen entfernt und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit dem Diodenlaser DL-12 (Toshiba) mit der Emissionswellenlänge von 690 nm sowie mit dem Nd:YAG-Laser Medilas 4060 (Dornier) mit der Emissionswellenlänge von 1064 nm. Die Bestrahlungsparameter beider Laser, die in den Versuchen eingesetzt wurden, sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Der Austrittsstrahl des Diodenlaser war oval geformt und hatte eine Fläche von 0,1 cm². Beim Nd:YAG-Laser erfolgte die Laserbestrahlung über eine flexible Faser mit einem Kerndurchmesser von 400 µm. Während des Laservorganges waren die Knorpelzylinder 5 cm von der Austrittsfläche des Laserstrahls entfernt.

Nach der Laserbestrahlung wurde die physiologische Kochsalzlösung aus Versuchs- und Kontrollgruppe entfernt und durch radioaktiv angereichertes Kulturmedium ersetzt. Es wurden zu jedem Stanzzyylinder 250 μ l Kulturmedium zugegeben. Dieses enthielt ^3H -Prolin (Proline, L-[2,3- ^3H]/Du Pont) mit einer Radioaktivität von jeweils 2 μCi . Während der folgenden 24-stündigen Inkubationszeit waren die Knorpelkulturen in der Lage, Radioaktivität zu inkorporieren.

Tabelle 2: Laserparameter für die Bestrahlungsversuche an Chondrozytenkulturen

Versuchsgruppe	Lasertyp	Leistung	Spotfläche	Leistungsdichte	Expositionszeit	Energiedichte
I	Diodenlaser	20 mW	0,18 cm ²	0,1 W/cm ²	60 s	1,2 J
II	Diodenlaser	20 mW	0,18 cm ²	0,1 W/cm ²	90 s	1,8 J
III	Diodenlaser	20 mW	0,18 cm ²	0,1 W/cm ²	120 s	2,4 J
IV	Nd:YAG-Laser	2 W	0,13 cm ²	16 W/cm ²	0,5 s	1 J
V	Nd:YAG-Laser	2 W	0,13 cm ²	16 W/cm ²	60 s	120 J
VI	Nd:YAG-Laser	40 W	0,13 cm ²	318 W/cm ²	3 s	120 J

Zur Beendigung der radioaktiven Markierung wurde nach 24 Stunden das radioaktiv angereicherte Kulturmedium abgesaugt. Um unspezifisch gebundene Aktivität zu entfernen, wurden die Knorpelstanzzyylinder anschließend dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung und einmal mit 100% Alkohol gewaschen. Danach wurden die Stanzzyylinder für 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Es wurden jeweils vier Stanzzyylinder zu einer Gruppe zusammengefasst. Diese wurden gemeinsam gewogen und dann in ein Scintillationsvial für die Bestimmung des radioaktiven Uptakes gegeben.

Zu jeweils vier Knorpelzylindern pro Scintillationsvial (Super Poly Vial[®], 20 ml, Packard Instrument BV, Chemical Operations) wurden 250 μ l physiologische Kochsalzlösung und 1 ml einer starken organischen Base, Soluene-350[®] (Packard Instrument BV, Chemical Operations), zugeben. Die Hydrolyse erfolgte über 24 Stunden im Wasserbad bei 50°C. Nachdem das Gewebe vollständig aufgelöst war, wurden den Scintillationsvials 10 ml Hionic-Fluor[®] (Packard Instrument BV, Chemical Operations) als Scintillationscocktail zugegeben. Scintillationscocktails wandeln die beim radioaktiven Zerfall von β -Strahlern entstehende Energie in Lichtblitze um. Diese Lichtblitze werden mit einem Liquid Scintillation Counter (LSC) registriert und als Maß für den radioaktiven Zerfall genommen. Die Radioaktivität der vier Knorpelzylinder pro Scintillationsvial wurden in einem LSC (1219 Rackbeta/Wallac) als relative Counts pro Minute (CPM) bestimmt.

In den Vorversuchen wurden folgende Bedingungen festgestellt:

1. Nach dem vierten Waschvorgang ließ sich kaum noch Aktivität in der Waschlösung

nachweisen. Somit stammt die nach Hydrolyse gemessene Radioaktivität ausschließlich aus dem Knorpelgewebe.

2. Durch Messungen der Radioaktivität der Knorpelproben, die unter unterschiedlichen Kulturbedingungen inkubiert wurden (Standardbedingungen, Antibiotikallösung und Alkohol) konnte festgestellt werden, dass die Abnahme der Radioaktivität als Zeichen einer Knorpelschädigung angesehen werden kann.

Nach Wägung von jeweils vier Knorpelstanzzylindern und Bestimmung der Radioaktivität wurden die CPM auf das Trockengewicht bezogen. Es ergaben sich somit 5 Messwerte in der Versuchsgruppe und 5 Messwerte in der Kontrollgruppe. Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte von Versuchs- und Kontrollgruppe wurden bestimmt. Weiterhin wurde die Summe der Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollgruppe berechnet.

Gruppe I

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 60 s, Energie 1,2 J) ist in der Abb. 35 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu keiner Veränderung der Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthrose.

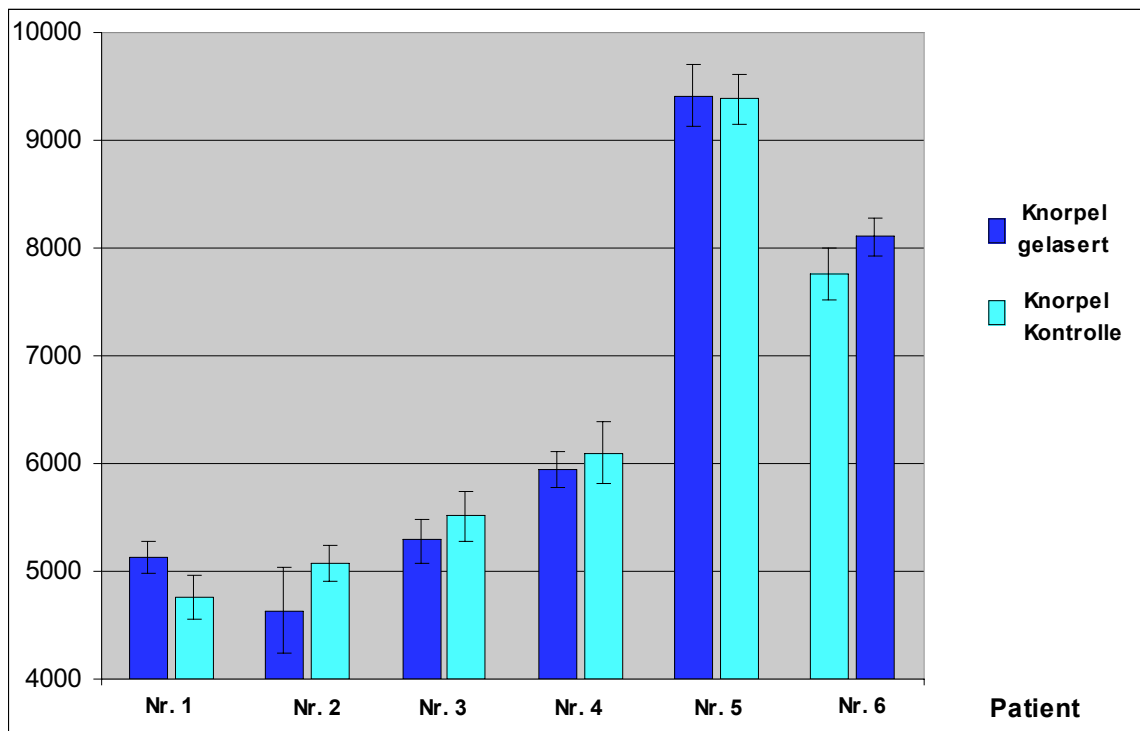


Abb. 35: Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 60 s, Energie 1,2 J). Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockensubstanz angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe I zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser eine um 104 CPM/mg Trockengewicht verminderte Einlagerung an Radioaktivität. Dies entspricht einer um 2,6% verminderten Aufnahme von ³H-Prolin gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 36).

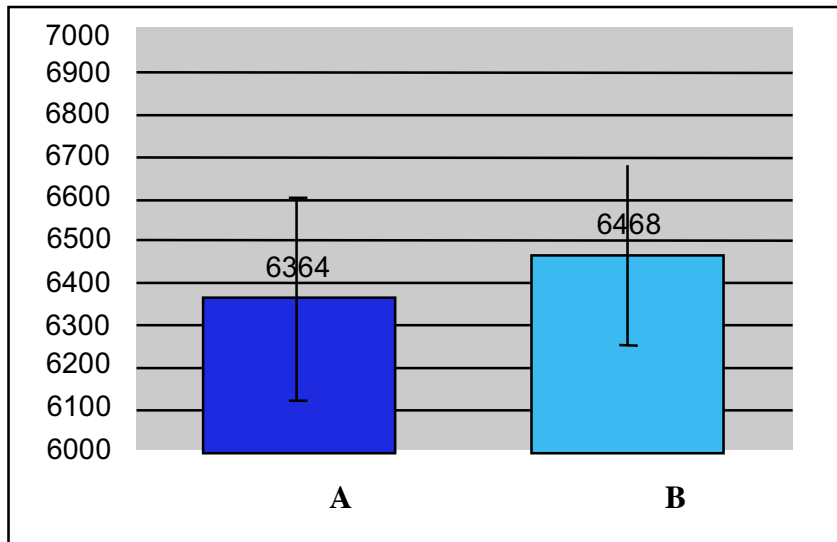


Abb. 36: Lasergruppe I. Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM/mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 60 s, Energie 1,2 J) bestrahlten Knorpel (A) und der Kontrollgruppe (B).

Gruppe II

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 90 s, Energie 1,8 J) ist in der Abb. 37 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu keiner Veränderung der Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthrose.

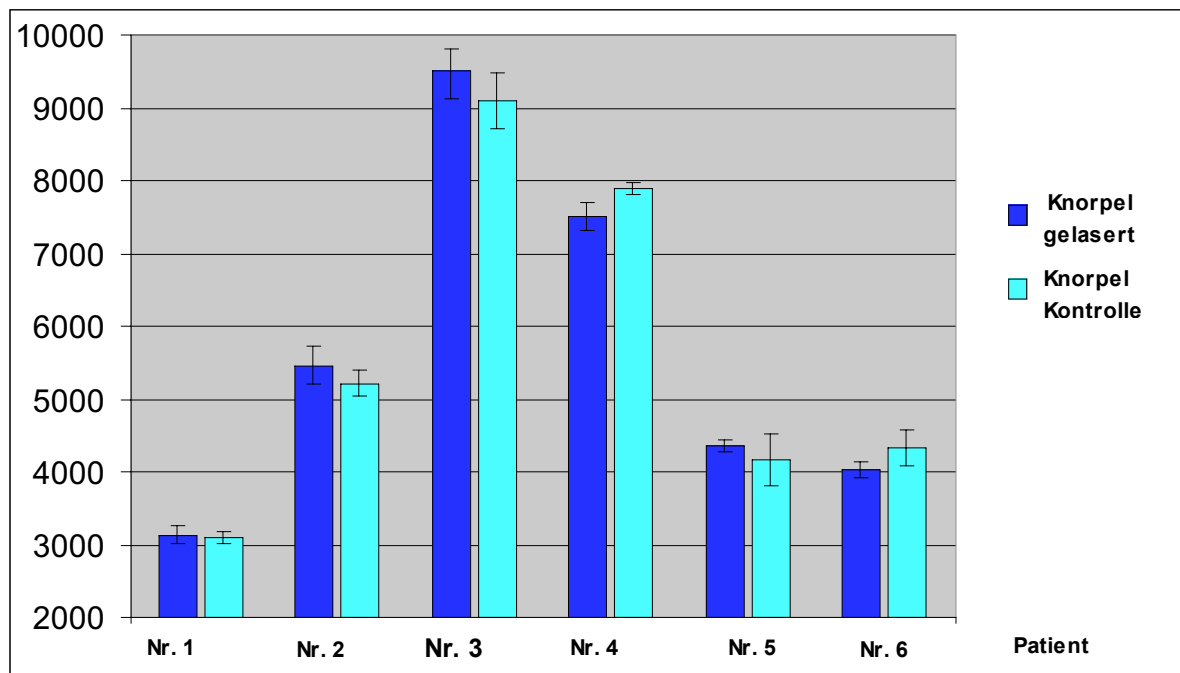


Abb. 37: Lasergruppe II. Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 90 s und Energie 1,8 J. Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockengewicht angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe II zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser eine um 43 CPM/mg Trockengewicht erhöhte Einlagerung an Radioaktivität. Dies entspricht einer um 0,7% erhöhten Aufnahme von ³H-Prolin gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 38).

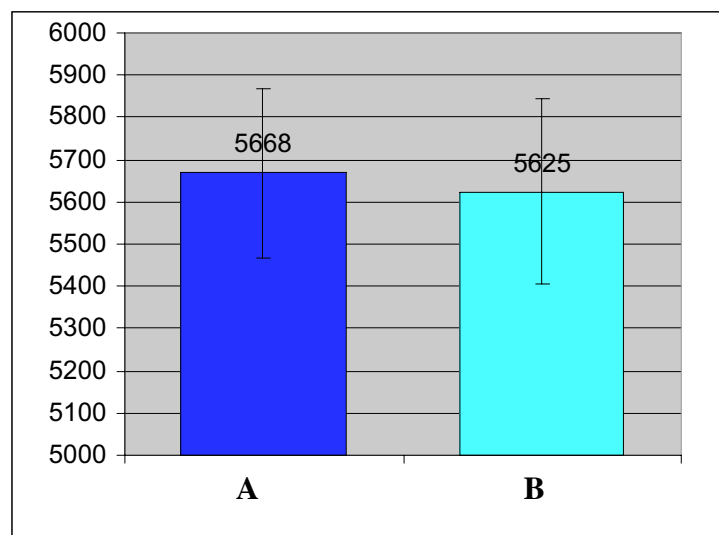


Abb. 38: Lasergruppe II. Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM/pro mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte 0,1 W/cm², Expositionszeit 90 s, Energie 1,8 J) bestrahlten Knorpel (A) und Kontrollgruppe (B).

Gruppe III

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte $0,1 \text{ W/cm}^2$, Expositionszeit 120 s, Energie 2,4 J) ist in der Abb. 39 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu keiner Veränderung der Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthritis.

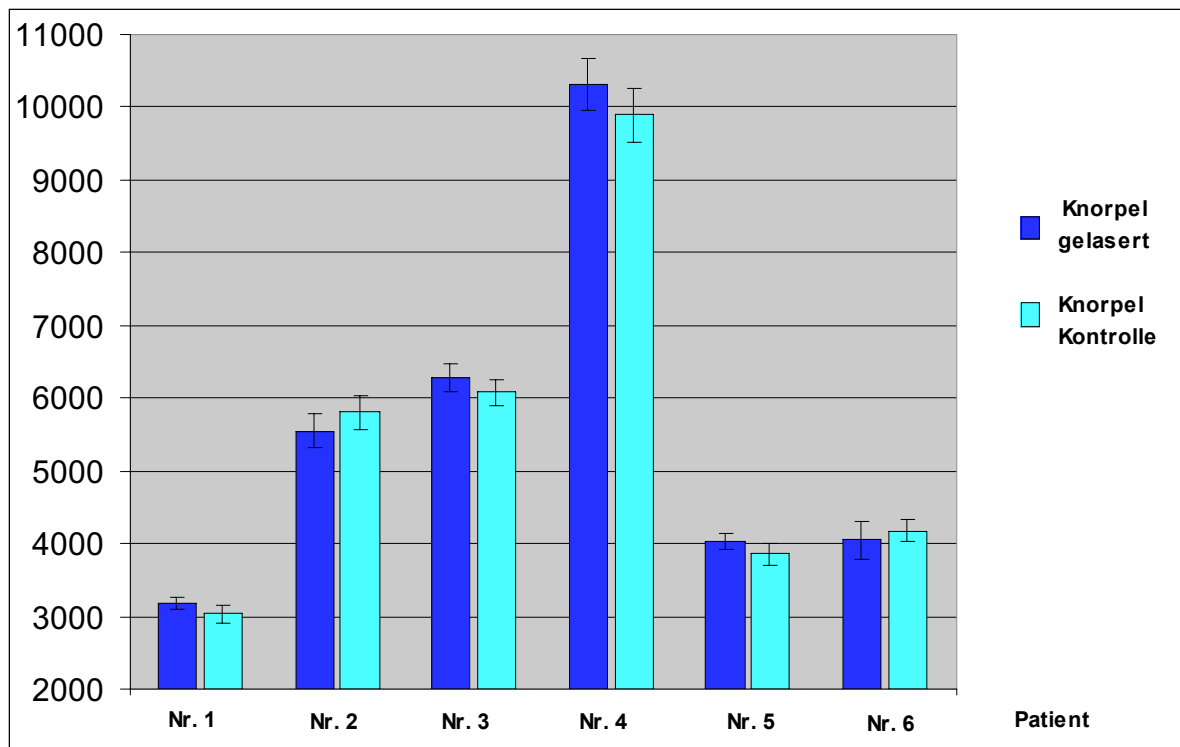


Abb. 39: Lasergruppe III. Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte $0,1 \text{ W/cm}^2$, Expositionszeit 120 s und Energie 2,4 J). Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockengewicht angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe III zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser eine um 89 CPM/mg Trockengewicht erhöhte Einlagerung an Radioaktivität. Dies entspricht einer um 1,5% erhöhten Aufnahme von ^3H -Prolin gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 40).

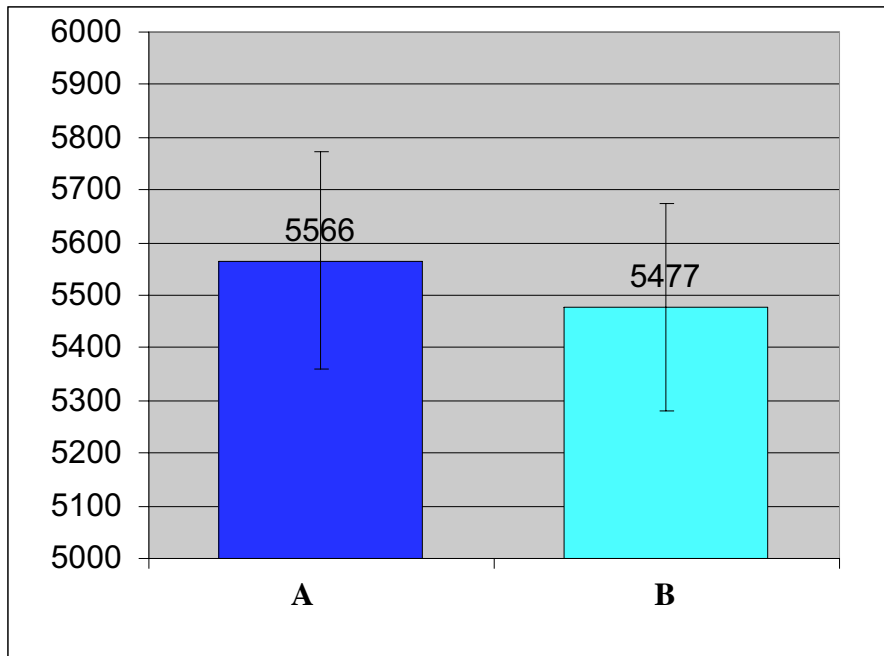


Abb. 40: Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM/mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Diodenlaser (Leistungsdichte $0,1 \text{ W/cm}^2$, Expositionszeit 120 s und Energie 2,4 J) bestrahlten Knorpel und Kontrollgruppe.

Gruppe IV

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 16 W/cm², Expositionszeit 0,5 s, Gesamtenergie 1 J) ist in der Abb. 41 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu keiner Veränderung der Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthrose.

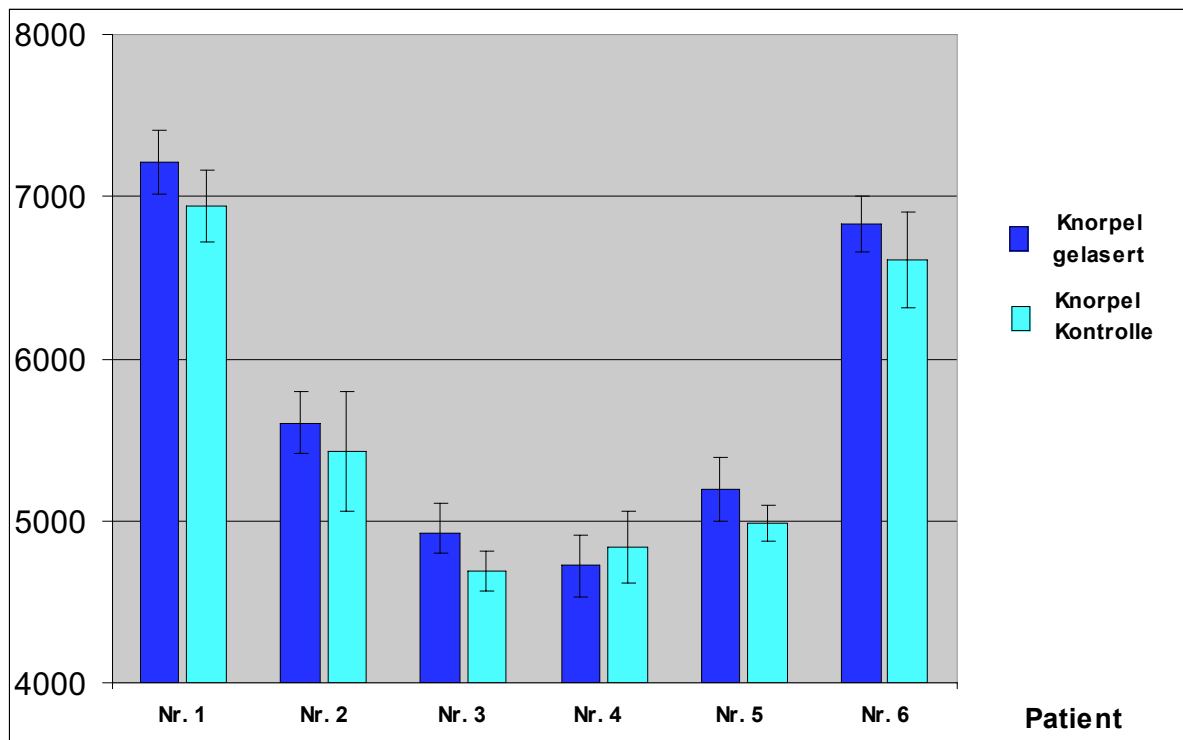


Abb. 41: Lasergruppe IV. Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungs-dichte 16 W/cm², Expositionszeit 0,5 Sekunden, Energie 1 J). Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockengewicht angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe IV zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser eine um 168 CPM/mg Trockengewicht erhöhte Einlagerung von Radioaktivität. Dies entspricht einer vermehrten Aufnahme von ³H-Prolin um 3% gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 42).

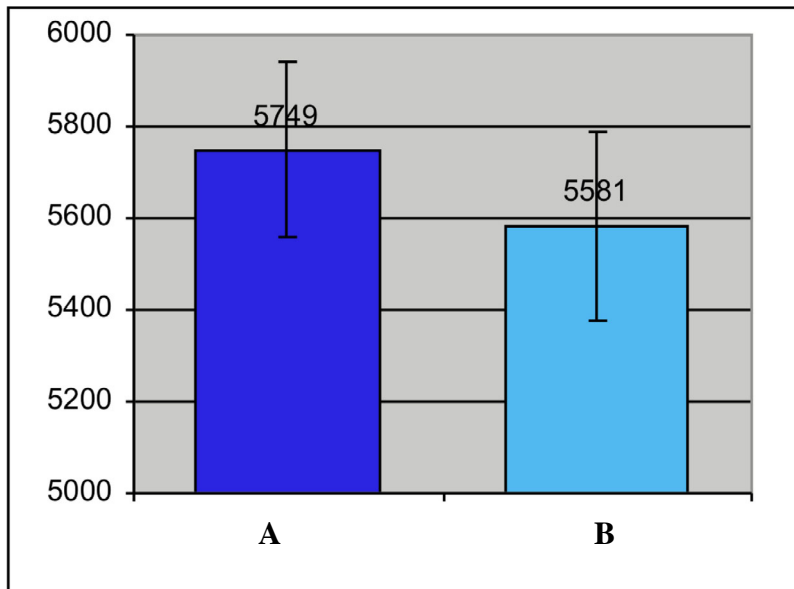


Abb. 42: Lasergruppe IV. Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM/mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 16 W/cm^2 , Expositionszeit $0,5 \text{ s}$, Energie 1 J) bestrahlten Knorpel (A) und Kontrollgruppe (B).

Gruppe V

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 16 W/cm^2 , Expositionszeit 60 s , Gesamtenergie 120 J) ist in der Abb. 43 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zur gesteigerten Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthrose.

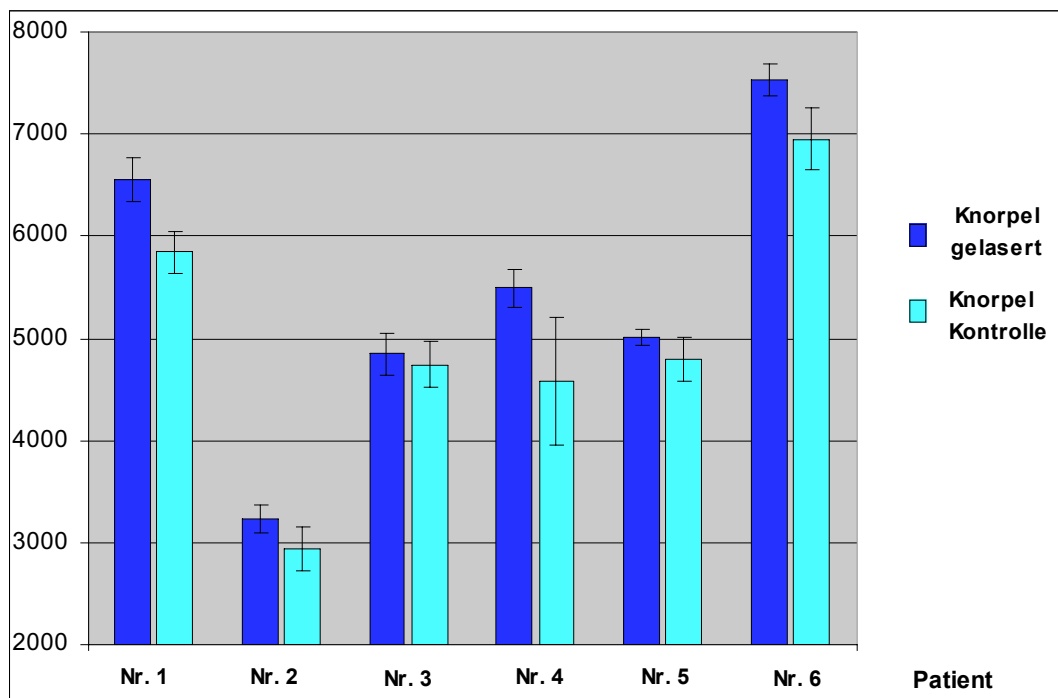


Abb. 43: Lasergruppe V. Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 16 W/cm^2 , Expositionszeit 60 s, Energie 120 J). Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockengewicht angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe V zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser eine um 471 CPM/mg Trockengewicht erhöhte Einlagerung an Radioaktivität. Dies entspricht einer um 9,5% erhöhten Aufnahme von ^3H -Prolin gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 44).

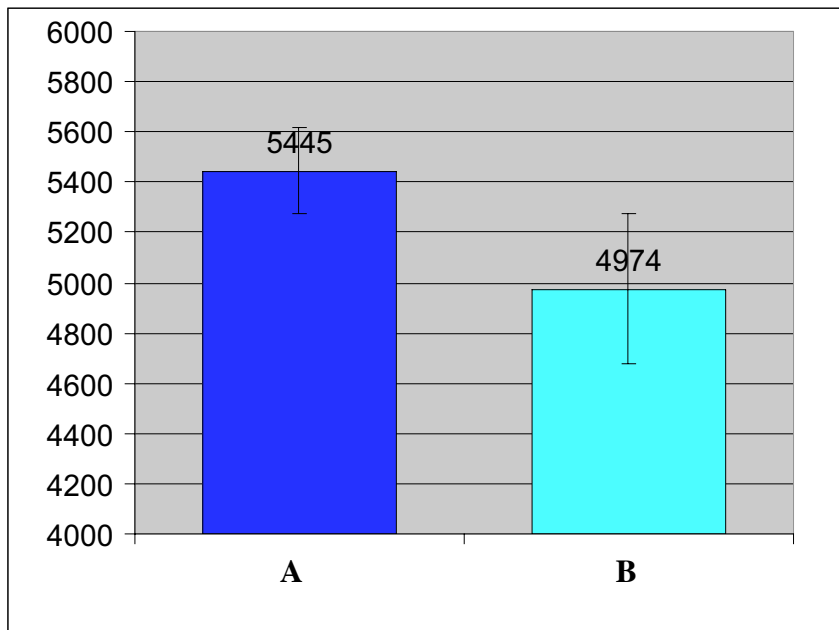


Abb. 44: Lasergruppe V. Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM pro mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 16 W/cm^2 , Expositionszeit 60 s, Energie 120 J) bestrahlten Knorpel (A) und Kontrollgruppe (B).

Gruppe VI

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 318 W/cm^2 , Expositionszeit 3 s, Gesamtenergie 120 J) ist in der Abb. 45 dargestellt.

Statistisch führte die Diodenlaserbestrahlung mit diesen Parametern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% zu einer verkleinerten Matrixsynthese beim Gesamtkollektiv der Patienten mit Osteoarthrose.

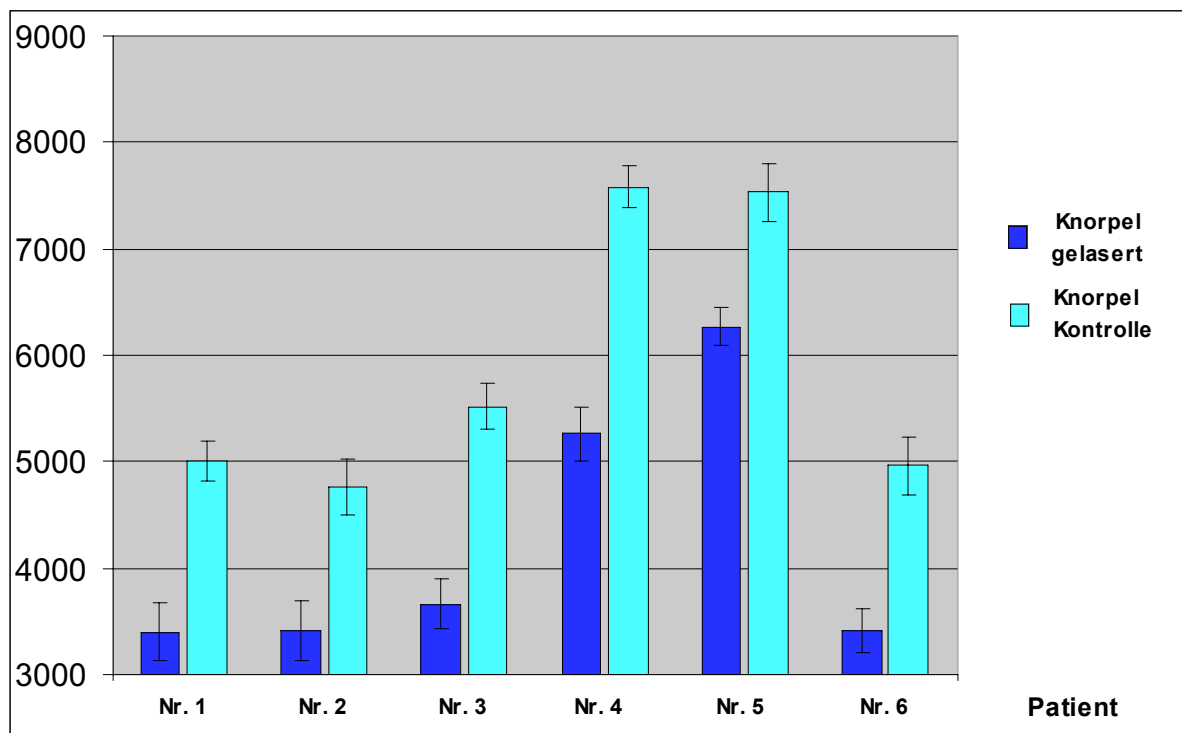


Abb 45: Lasergruppe VI. Darstellung der Menge aufgenommener Radioaktivität in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 6 verschiedenen Patienten nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 318 W/cm^2 , Expositionszeit 3 s, Energie 120 J). Der radioaktive Uptake ist in CPM/mg Trockengewicht angegeben.

Der Knorpel von sechs Patienten aus der Gruppe VI zeigte im Mittelwert nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser eine um 1659 CPM/mg Trockengewicht verminderte Einlagerung an Radioaktivität. Dies entspricht einer um 28% reduzierten Aufnahme von ^3H -Prolin gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 46).

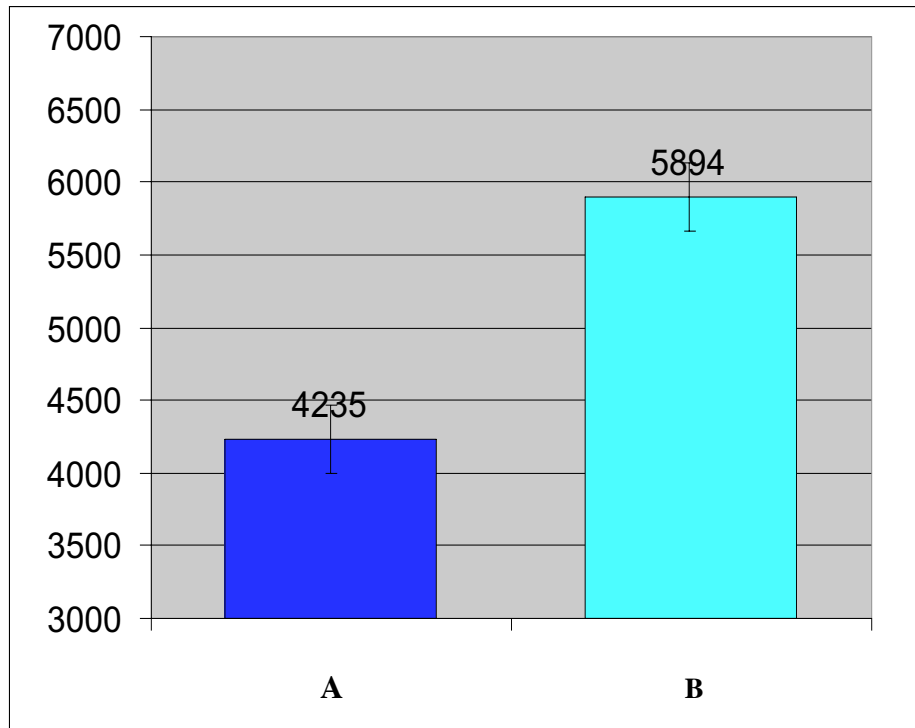


Abb. 46: Lasergruppe VI. Durchschnittlich aufgenommene Radioaktivität in CPM pro mg Trockengewicht der Knorpel aller 6 Patienten. Darstellung von mit dem Nd:YAG-Laser (Leistungsdichte 318 W/cm^2 , Expositionszeit 3 s, Energie 120 J) bestrahlten Knorpel (A) und Kontrollgruppe (B).

6.1.2 Syntheseleistung und Signaltransduktionskaskade nach Einwirkung von niedrigenergetischer Laserbestrahlung

Eine deutliche Knorpeldestruktion entsteht bei ausgedehnter Verletzung des hyalinen Gelenkknorpels durch die eingeschränkte Reparaturfähigkeit. Um die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels zu verbessern, kommen neue Methoden wie z. B. die ACT (autologe Chondrozytentransplantation) zum Einsatz. Durch eine rasche Dedifferenzierung der Zellkulturen ist jedoch die Bioverfügbarkeit autologer Chondrozyten problematisch. Die bisherigen Aussagen zur Laseranwendung auf Knorpelgewebe beschränken sich auf morphologische und metabolische Phänomene. Wesentlich aussagekräftiger und hilfreicher für die praktische Anwendung sind Aussagen bezüglich ultrastruktureller und molekularbiologischer Veränderungen. Elektronenmikroskopische, immunhistologische und molekularbiologische Veränderungen im Sinne der Synthesesteigerung extra- und intrazellulärer Matrixstrukturen sind hierbei von entscheidender Bedeutung.

Ziel der In-vitro-Untersuchungen war deshalb die Evaluierung der stimulierenden bzw. schädigenden Wirkungen der Laserbestrahlung auf Rezeptoren und Signalproteine der Chondrozyten in Monolayerkulturen unter Berücksichtigung der geeigneten Parameter der Laserbestrahlung und optimalen Anzahl von Bestrahlungen. Dabei sollte ermittelt werden, inwieweit dieses Verfahren zu verbesserten kulturellen Bedingungen für die autologe Chondrozytentransplantation angewendet werden kann.

Der humane Gelenkknorpel wurde bei Schenkelhalsfrakturen oder bei Multiorganspendern für die Knochenbank gewonnen, steril entnommen, in Transportmedium (Ham's F-12/DMEM) und auf Eis gekühlt transportiert. Nach Spülung, Inkubation in 0,2%-iger Kollagenase und nach Zugabe von Medium erfolgte die Homogenisierung der Suspension. Durch Filtration und Sedimentierung wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in ihrer Anzahl auf $1,5 \times 10^6$ /ml Medium in der Neubauer-zählkammer eingestellt. In Alginat erfolgte die Kultivierung der Chondrozyten (Wachstumsmedium in 24-Multiwell-Schalen). Unter Standardbedingungen in einem Brutschrank bei 37°C und 5%-iger CO₂-Begasung wurden die Alginatkulturen kultiviert, wobei der Mediumwechsel alle 3 Tage erfolgte.

Die Bestrahlung erfolgte mit dem GaAlAs-Diodenlaser (Toshiba) mit der Emissionswellenlänge von 780 nm. Die Bestrahlungsparameter des Lasers, der in den Versuchen eingesetzt wurde, sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Darstellung der Laserparameter, die in den Experimenten zur Anwendung kamen

Leistung (mW)	Bestrahlte Fläche (cm ²)	Leistungsdichte (mW/cm ²)	Expositionszeit (s)	Energiedichte (J/cm ²)	Energie (J)
20	1	20	50	1	1
20	1	20	200	4	4
20	1	20	300	6	6

Tabelle 4: Bestrahlungsalgorithmus der verwendeten Energie, Häufigkeit der Bestrahlung und der Kultivierungsdauer

Energiedichte (J/cm ²)	Tag 1	Tag 5	Tag 7	Tag 10
1	Bestrahlung			Entnahme
1	Bestrahlung	Bestrahlung		Entnahme
1	Bestrahlung	Bestrahlung	Bestrahlung	Entnahme
4	Bestrahlung			Entnahme
4	Bestrahlung	Bestrahlung		Entnahme
4	Bestrahlung	Bestrahlung	Bestrahlung	Entnahme
6	Bestrahlung			Entnahme
6	Bestrahlung	Bestrahlung		Entnahme
6	Bestrahlung	Bestrahlung	Bestrahlung	Entnahme

Der Austrittsstrahl des Diodenlasers war oval geformt und wurde durch eine Lochblende auf eine Fläche von 1 cm² fokussiert. Die Alginatkulturen wurden in den 24-Multiwell-Schalen bestrahlt. Zur Laserbehandlung wurde das Wachstumsmedium gegen PBS getauscht, auf ein Minimum reduziert, auch in den jeweiligen Kontrollgruppen. Nach dem Laservorgang wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Deckplatten wurden während des Laservorganges abgenommen.

Nach der Laserbestrahlung wurden alle Kulturen bis zum 10. Tag kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen morphologisch mittels Licht-, Elektronen- bzw. Immunelektronenmikroskopie sowie molekularbiologisch in der Western-Blot-Analyse untersucht. Bei der APAAP(Alkaline-Phosphatase/Anti-Alkaline-Phosphatase)-Technik wurden die Alginatkulturen in ein Einbettungsmittel (Tissue-Tek) eingetaucht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C aufbewahrt. Nach Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte die Fixation in Aceton und zweimalige Spülung mit TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl / pH 7,6). Über mehrere Stufen der Inkubation mit Tris-Puffer, primären Antikörpern, Maus-anti- Kaninchen-IgG-Antikörpern, Dualsystem-Brücken-Antikörpern und Dualsystem-APAAP-Komplex erfolgte zwischendurch jeweils ein dreimaliges Auswaschen in

TBS. Für die Farbentwicklung wurden die Präparate mit der Neufuchsin-Färbemethode für 10 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Präparate gewaschen und getrocknet, mit Kaisers-Glyceringelatine eingedeckt und mit einem Lichtmikroskop Axiophot 100 (Zeiss/Oberkochen) untersucht.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Kulturen in gepuffertem Glutaraldehyd 2,5% fixiert und mit 1%-igem Osmiumoxid in Phosphatpuffer nachfixiert. Mit aufsteigender Alkoholreihe folgte die Entwässerung und anschließend die Einbettung in Epon. Nach Herstellung von Ultradünnschnitten mit dem Ultramikrotom Ultracut E (Reichert/Heidelberg) erfolgte die Nachkontrastierung der Schnitte mit 2% Uranaylacetat mit Bleizitrat. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem EM 10-Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss/Oberkochen).

Bei der Immunelektronenmikroskopie wurde die Immunmarkierung der LR-White-Präparate gegen Kollagen und knorpelspezifische Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane (CSPG) in Alginatkultur mit der Postembedding-Technik durchgeführt. Nach Fixierung der Alginatkulturen mit 3%-Paraformaldehyd und 0,25%-Glutaraldehyd in PBS für 1 Stunde, stufenweiser Entwässerung mit aufsteigender Ethanolreihe sowie Inkubation der Alginatkügelchen für 12 Stunden in einem 1:1 Gemisch LR-White/100%-Ethanol erfolgte die Infiltration mit 100%-igem LR-White für 2 Tage. Nach der Polymerisation auf Eis wurden die Kunststoffkapseln nach vorheriger Einlage der Alginatkügelchen entfernt und in Blöcke geschnitten. Die LR-White-Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-befilmte Grids übertragen und anschließend immunmarkiert.

Zur Western-Blot-Analyse mussten die Chondrozyten aus dem Alginat herausgelöst, mit Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert und 1/2 Stunde bei 4°C zentrifugiert werden. So wurden die Zelltrümmer von der Proteinfraction getrennt und die lösliche Phase weiterverarbeitet. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben erfolgte mit der BCA-Methode (Bicinchoninic acid system / Pierce, USA). Die über den Western-Blot dargestellten Proteinbanden sind somit quantitativ für die densitometrischen Untersuchungen vergleichbar. Nach gründlicher Durchmischung mit 250 µl Probenpuffer (35% Glycerol, 10% SDS, 25% Ethanol, 0,025% Bromphenolblau, Tris-HCL/pH 6,8; 1,5 M) zu je 1 ml Lysat wurden die Proben anschließend 10 min aufgekocht. Die Proteinproben wurden auf 5%-igen oder 7,5%-igen SDS-Polyacrylamidgelen unter Verwendung eines 4%-igen Sammelgels 1 Stunde bei 120 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Transblot-Elektrophorese-Apparatur (Mini Trans Blot/Bio-Rad Laboratories, USA) für 1 Stunde mit 120 Volt auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) transferiert. Die Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungspuffer (5% w/v Magermilchpulver in PBS / 0,1% Twen 20) über Nacht bei 4°C blockiert und dann mit dem Primär-Antikörper (verdünnt 1:1000 in 5% w/v Magermilchpulver in PBS / 1% Twen 20) 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Spülen im gleichen Puffer wurden die Membranen mit sekundären Antikörpern (Anti-Maus-Ig-AP-Fab fragments oder anti-Kaninchen-IgG-AP), die mit alkalischer Phosphatase verdünnt 1: 5000 in Blockierungspuffer konjugiert waren, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal 15 min im Blockierungspuffer und danach dreimal 10 min in 0,1 M Trispuffer (pH 9,5) mit 0,05 M MgCl₂ und 0,1 M NaCl gespült. Die spezifischen Bindungen wurden mit Nitroblautetrazolium und 5-bromo-4-chloro-3-Indoylphosphat als Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wurde dann mit Aqua bidest. gestoppt.

Mit Hilfe eines Image Analysis Systems (Ultraspec III/ Pharmacia) wurde die optische Dichte gemessen, um somit eine quantitative Aussage über die Intensität der Proteinbanden des Western-Blots zu ermöglichen. Die Ergebnisse der drei untersuchten Alginatkulturen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung errechnet und in einem Spaltdiagramm dargestellt. Zum Vergleich von Mittelwerten zweier Messreihen auf signifikante Unterschiede wurde der Student's t-Test angewendet.

Lichtmikroskopische Immunmorphologie der Chondrozyten in der Alginatkultur der Kontrollgruppe

In den isolierten humanen Chondrozyten ließ sich schon nach wenigen Tagen ($n=3$) eine Synthese knorpelspezifischer Matrix erkennen. Auch noch am 7. Tag der Kultivierung konnten in der APAAP-Methode mit Antikörpern gegen Kollagen Typ II und gegen knorpelspezifische Proteoglykane Nachweise erbracht werden, dass die Zellen auch weiterhin in der Kultivierung knorpelspezifische Matrix synthetisieren. Diesem Nachweis zufolge handelt es sich weiterhin um gelenkknorpelspezifische Chondrozyten in der Alginatkultur. Die Chondrozyten setzten ihre Tendenz zur Bildung von Aggregaten von zwei und mehr Zellen ebenso fort wie der weiterhin bestehende Nachweis von Antikörpern gegen knorpelspezifische Proteoglykane (Abb. 47).

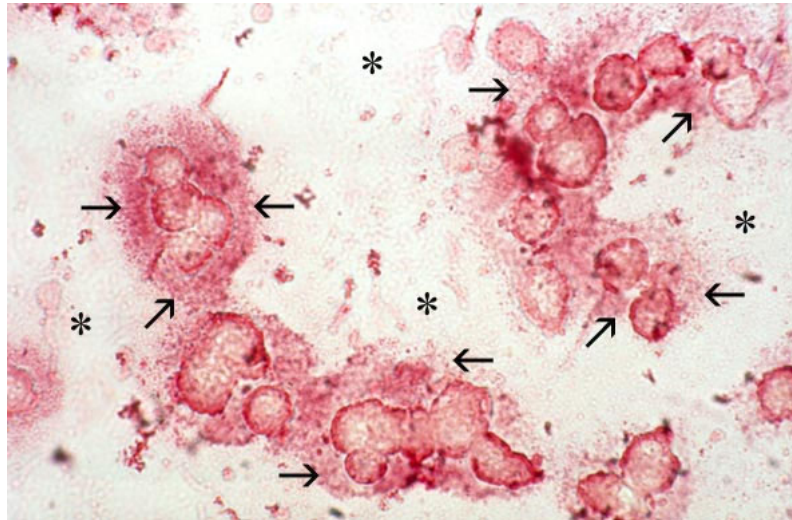


Abb. 47: APAAP-Methode (lichtmikroskopische immunmorphologische Darstellung) von Chondrozyten am 7. Tag in der Alginatkultur, Markierung der Zellen mit Antikörper gegen knorpelspezifische Proteoglykane. Die Chondrozyten liegen in Gruppen vor und sind von einem breiten Saum extrazellulärer Proteoglykane umgeben (Pfeile); 60fache Vergrößerung.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Chondrozyten in der Alginatkultur der Kontrollgruppe

Am ersten Tag der Alginatkultur deutet die Struktur der Zelle auf eine syntheseaktivierte Zelle hin. Die Form der Zelle ist rundlich bis oval, es zeigt sich ein gut entwickeltes, raues endoplasmatisches Reticulum, große Golgi-Apparate und gut differenzierte, intrazytoplasmatische Organellen (Mitochondrien, Vakuolen, Granula, Komponenten des Zytoskelettes). Abb. 48 verdeutlicht die normale Struktur eines zellaktiven Chondrozyten.

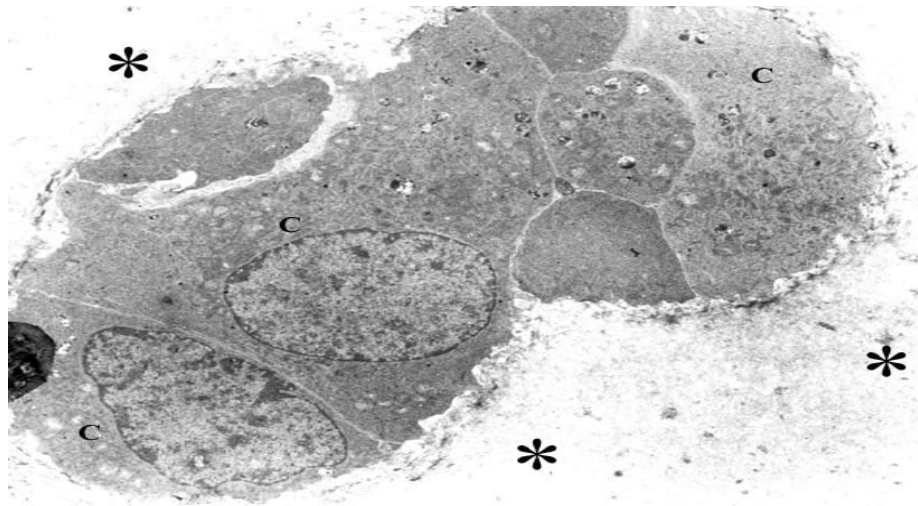


Abb. 48: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Chondrozyten (C) in Alginat am 1. Tag der Kultivierung. In der Umgebung findet sich eine zarte Alginatkapsel (*); 5000fache Vergrößerung.

Die Chondrozyten begannen bereits am 3. Tag extrazelluläre Matrix zu synthetisieren und zu sezernieren. Durch die neugebildete extrazelluläre Matrix erweiterte sich der Abstand zwischen den Chondrozyten nach 3-5 Tagen (Abb. 49). Im perizellulären Raum abgelagerte extrazelluläre Matrix bewegt die Zellen auseinander. Die neu synthetisierte Matrix lag zunächst dicht an der Zellmembran und breitete sich dann ungerichtet aus. In der Matrix waren deutlich kollagene Fibrillen erkennbar (Abb. 50).

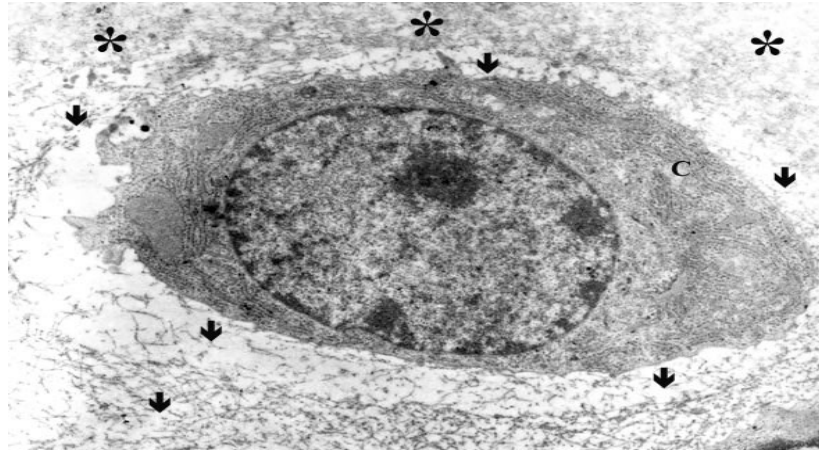


Abb. 49: Chondrozyt (C) am 5. Tag in Alginate (transmissionselektronenmikroskopisches Bild). Filamentäre Strukturen der neu synthetisierten Matrix sind perizellulär angeordnet (Pfeil). Alginate (*) ist in der Umgebung der Chondrozyten erkennbar. Die neugebildete Matrix verdrängt das Alginate. Der Chondrozyt zeigt strukturiertes Zytoplasma mit rauem endoplasmatischem Reticulum und Golgi-Apparat; 7000fache Vergrößerung.

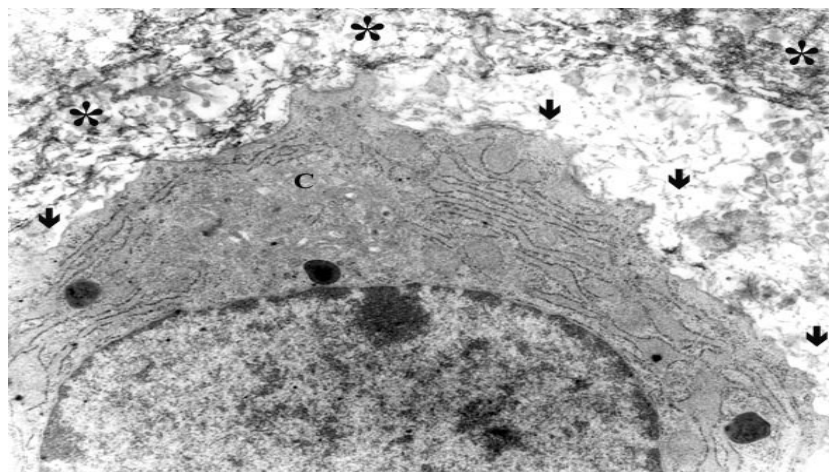


Abb. 50: Chondrozyt (C) am 10. Tag in Alginate mit gut ausgebildetem rauem endoplasmatischem Reticulum und elektronendichten Granula. Deutlich perizellulär zeigen sich filamentäre Strukturen der Matrix (Pfeil) und Kollagenfasern. Verdichtetes und verdrängtes Alginate lagert sich um die Zelle herum (*). Der Zellkern des Chondrozyten ist groß, rund und euchromatinreich mit strukturiertem Zytoplasma und Zellorganellen (raues endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat); 10000fache Vergrößerung.

Immunelektronenmikroskopie der Chondrozyten in der Alginatkultur der Kontrollgruppe

In der Immunelektronenmikroskopie sind mittels Goldmarkierung die knorpelspezifischen Matrixbestandteile nachgewiesen und zwar goldmarkierte Antikörper gegen Kollagen Typ II und gegen knorpelspezifische Proteoglykane. Im extrazellulären Raum befanden sich die mit anti-Kollagen-Typ II-Antikörpern gekoppelten Goldpartikel. Diese sind assoziiert mit extrazellulären Fibrillen. Die Goldpartikel, die mit anti-Proteoglykan-Antikörper gekoppelt waren, sind in der extrazellulären Matrix der Chondrozyten auf extrazellulären filamentären Strukturen nachweisbar (Abb. 51). In den dargestellten immunmorphologischen Untersuchungen konnten Kollagen Typ II und Proteoglykane nach 7 Tagen in der Alginatkultur gesehen werden. Dies bedeutet, dass die Chondrozyten über eine längere Kultivierungszeit knorpelspezifische Matrixbestandteile bilden. Ihre chondrozytäre Eigenschaft wurde in der Kultur erhalten.

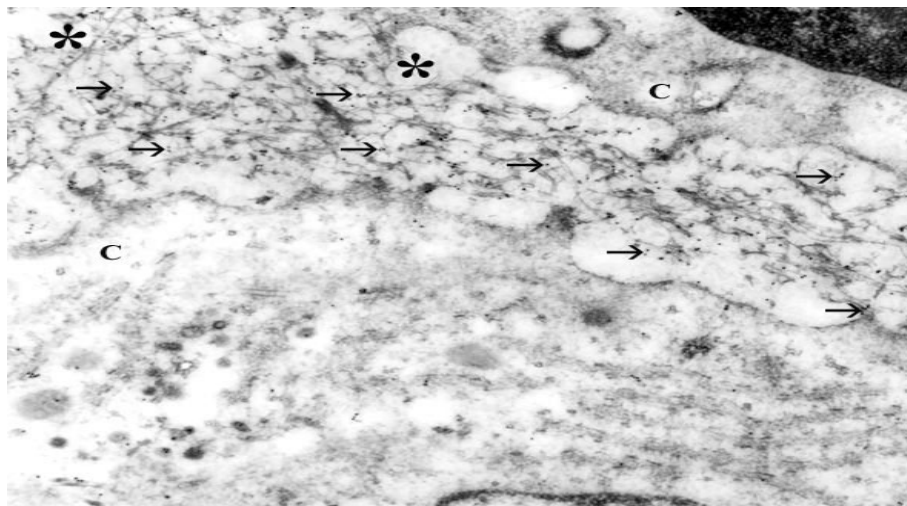


Abb. 51: Immunelektronenmikroskopisches Bild eines Chondrozyten (C) am 7. Tag in Alginat (*) mit goldgekoppelten Antikörpern gegen knorpelspezifische Proteoglykane (Pfeil). Die Markierung ist assoziiert mit extrazellulären fibrillären Strukturen; 15000fache Vergrößerung.

Chondrozyten in der bestrahlten Alginatkultur

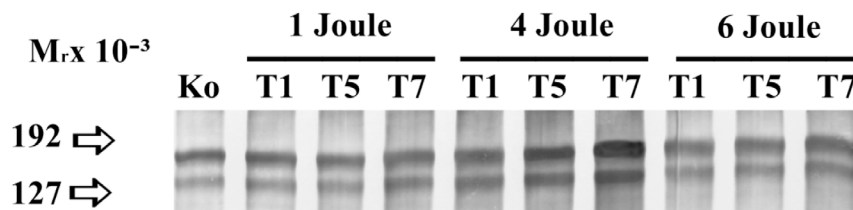
In den durchgeführten lichtmikroskopischen Immunmorphologien, in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und in der Immunelektronenmikroskopie sind keine morphologischen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den bestrahlten Kulturen erkennbar. Eine Synthese von Kollagen Typ II war in gleicher Weise sichtbar, die intrazytoplasmatischen Zellorganellen waren qualitativ, ebenso wie die knorpelspezifischen Proteoglykane, ohne Unterschiede erkennbar.

Molekularbiologie

Die Bestrahlung der Chondrozyten in der Alginatkultur erfolgte mit unterschiedlichen Energiedichten und zu verschiedenen Zeitpunkten. Anhand der Western-Blots sind die extrazellulären Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, Fibronectin und Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan), transmembranöse Rezeptoren (Integrine: Beta 1, Alpha 5) und intrazelluläre Proteine der anabolen Signalkaskade (Vinculin, Paxilin, Shc, Erk1/Erk2) in Chondrozyten nachgewiesen. Die Auswertung der Proteinsynthese wurde in Abhängigkeit von den zugeführten Energiedichten (1 J/cm², 4 J/cm² und 6 J/cm²) und in Bezug auf die Anzahl der durchgeführten Bestrahlungen (Tag 1, Tag 5 und Tag 7) aufgezeigt. Die Expression der Proteine ist als Western-Blot und densitometrisch in Grafiken dargestellt. Die Proteinmenge wurde in Bezug auf die Kontrolle in Prozent berechnet.

Molekularbiologie Kollagen Typ II

Eine vermehrte Expression von Kollagen Typ II konnte nach der Laserbestrahlung von Chondrozytenkulturen nachgewiesen werden. Diese Expression war zeit- und energieabhängig. Die stärkste Expression von Kollagen Typ II wurde bei 4 J/cm² festgestellt und mit geringerer Bandenausprägung bei 1 J/cm² und 6 J/cm² beobachtet (Abb. 52). Im Vergleich zur einmaligen und zweimaligen Bestrahlung stellte sich nach dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm² die höchste Synthese von Kollagen Typ II dar.



Blot: Anti-Kollagen Typ II

Abb. 52: Western-Blot-Analyse. Kollagen Typ II-Banden von Chondrozyten in Alginatkultur nach ein-, zwei- bzw. dreimaliger Laserbestrahlung (Tag 1, 5 und 7) bei Energiedichten von 1, 4 und 6 J/cm². Bei 4 J/cm² und nach der dritten Bestrahlung ist die Kollagen Typ II-Synthese am stärksten. (Molekulargewicht linke Seite).

Grundsätzlich fand sich bei der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse der bestrahlten Kulturen eine unterschiedlich starke Expression des extrazellulären Matrixproteins Kollagen Typ II. Die Bestrahlung mit einer Energiedichte von 4 J/cm² führte jeweils an allen drei Bestrahlungstagen zur höchsten Kollagensynthese. Eine signifikante und zeitabhängige Steigerung der Kollagen Typ II-Synthese ist vom Tag 1 bis zum Tag 7 zu verzeichnen. Zusammenfassend zeigte sich nach drei Bestrahlungen mit 4 J/cm² die signifikant höchste prozentuale Steigerung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte der dritte Bestrahlungszyklus zu einer Verdopplung der Kollagenexpression. Die höchste Synthese von Kollagen Typ II war bei jeder Energiedichte am dritten Bestrahlungstag erkennbar bei signifikant höherer Expression nach Bestrahlung mit 4 J/cm² (Abb. 53).

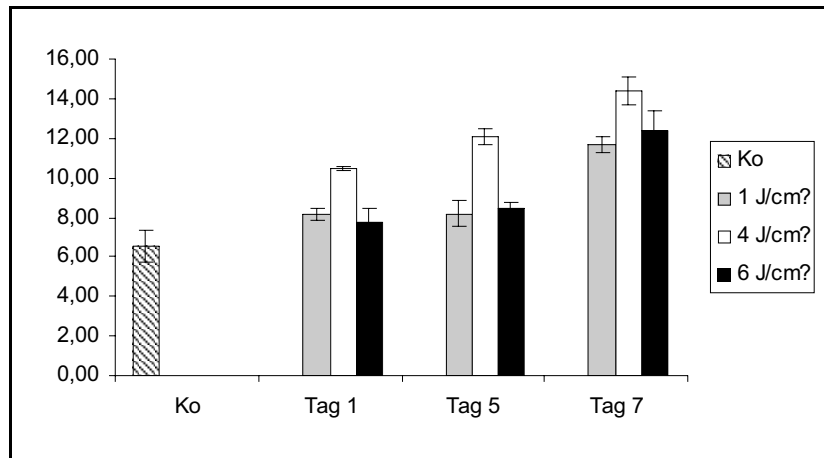


Abb. 53: Bei den verwendeten Energiedichten von 1, 4 und 6 J/cm² zeigten am Tag 7 alle Bestrahlten Chondrozyten die höchste Synthese von Kollagen Typ II. In der absteigenden Reihenfolge 4, 6 und 1 J/cm² wurden die höchsten Synthesen erzielt. Im Vergleich zur Kontrolle (Ko) sind die densitometrischen Einheiten aufgezeigt.

Molekularbiologie Chondroitinsulfat-Proteoglykan

In der Western-Blot-Analyse konnte eine energieabhängige Synthesesteigerung von Chondroitinsulfat-Proteoglykan nach der Laserbestrahlung gesehen werden. Nach insgesamt dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm² zeigte sich eine deutlich vermehrte Synthese von Fibronectin im Vergleich zu 1 und 6 J/cm². In der densitometrischen Auswertung bestätigte sich, dass es nur nach drei Bestrahlungen mit 4 J/cm² zu einem signifikanten Anstieg der Synthese von Fibronectin kam. Die optimale Energiedichte und Bestrahlungsanzahl für eine Fibronectinsynthesesteigerung liegen bei 4 J/cm² und drei Bestrahlungen (7. Tag). Energiedichten von 1 und 6 J/cm² zeigen unabhängig von der Bestrahlungsanzahl keine Signifikanz zu einem Anstieg der Fibronectinsynthese (Abb. 54).

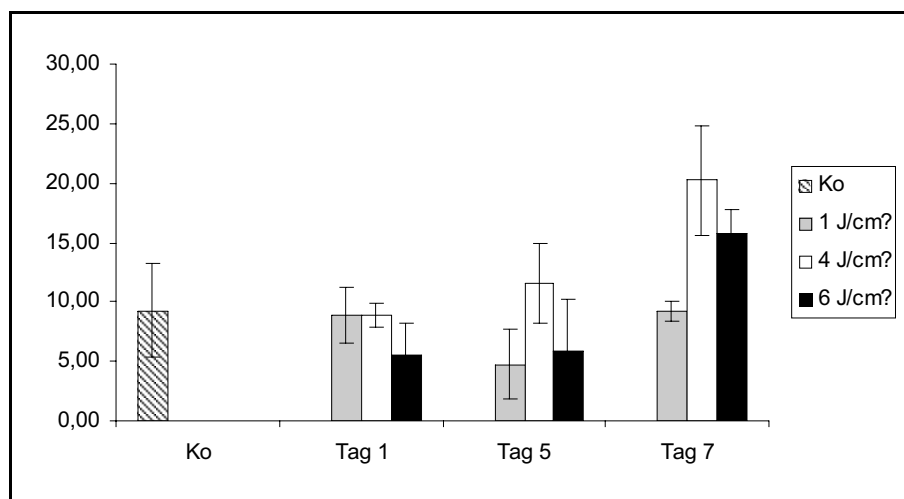
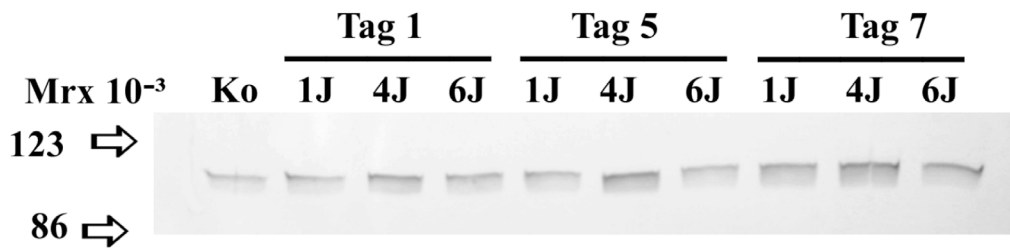


Abb. 54: Densitometrische Einheiten in der Auswertung der Fibronectin-Synthese mit deutlicher Signifikanz bei 4 J/cm² nach 3 Bestrahlungen (Tag 7). Alle anderen Energiedichten und Bestrahlungszyklen ergaben keine signifikante Veränderung der Fibronectinsynthese.

Molekularbiologie Beta 1-Integrin und Alpha 5-Integrin

An allen Bestrahlungstagen zeigte sich eine erhöhte Synthese des Beta 1-Integrinrezeptors. Für die verwendeten Energiedichten zeigten sich unterschiedliche Banden mit intensiverer Bande bei 4 J/cm² (Abb. 55). In der Densitometrie ist die höchste Synthesesteigerung von Beta 1-Integrin nach zwei- und dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm². An den Tagen 5 und 7 konnte die höchste Synthese von Beta 1-Integrin unter der Behandlung mit 4 J/cm² (eine signifikante Synthesesteigerung um 272,95% nach zweimaliger und um 286,24% nach dreimaliger Bestrahlung) beobachtet werden. Dagegen erbrachte die einmalige Bestrahlung mit 4 J/cm² keine signifikante Erhöhung der Proteinsynthese.

Bei der Untersuchung von Alpha 5-Integrin zeigte sich nach der Bestrahlung mit 4 J/cm² eine deutlich intensivere Bande in der Western-Blot-Analyse nach ein-, zwei- und dreimaliger Bestrahlung. Nach der Laserbestrahlung mit 1 und 6 J/cm² waren an allen drei Behandlungstagen keine signifikanten sichtbaren Erhöhungen der Synthese in Form von intensiveren Banden der Western-Blot-Darstellung zu erkennen. In der Analyse der Densitometrie bestätigte sich auch hier eine deutlich vermehrte Synthese durch eine zweifache Bestrahlung (Abb. 56).



Blot: Anti-β1 Integrin

Abb. 55: Western-Blot-Analyse. An den Tagen 1, 5 und 7 wurde nach Bestrahlung der Chondrozyten mit den Energiedichten von 1, 4 und 6 J/cm² eine stärkere Synthese des Beta 1-Integrinrezeptors deutlich. Am stärksten erschien die Synthese nach dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm².

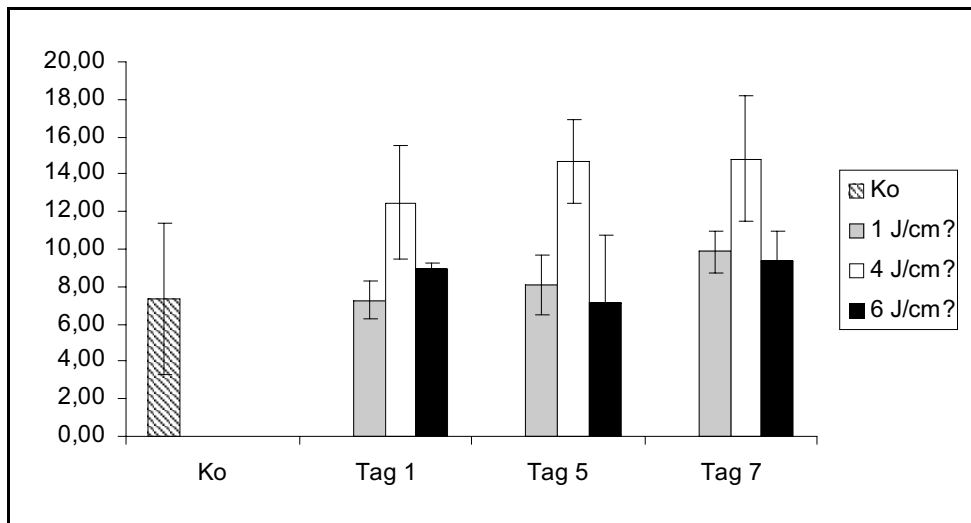
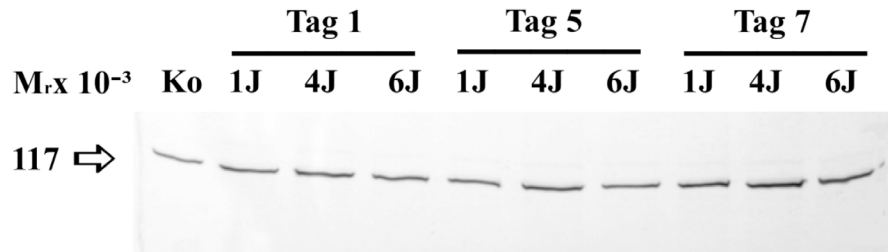


Abb. 56: Alpha 5-Integrinexpression in der Densitometrie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe Bewirkt die zweimalige Bestrahlung von Chondrozyten mit 4 J/cm² eine signifikante Erhöhung der Synthese (200,82%; p=0.05).

Molekularbiologie Vinculin und Paxillin

Beide Proteine ließen sich in den Chondrozyten an allen Bestrahlungstagen und bei jeder zugeführten Energiedichte nachweisen. Am stärksten ausgeprägt war die Expression für Vinculin nach Laserbestrahlung mit 4 J/cm² am 7. Tag (Abb. 57). Dies gilt auch für Paxillin.



Blot: Anti-Vinculin

Abb. 57: Western-Blot-Analyse von Vinculin nach Laserbestrahlung mit den Energiedichten von 1, 4 und 6 J/cm². Bei allen Energiedichten tritt eine deutliche Synthesesteigerung am Tag 7, d. h. nach dreifacher Bestrahlung.

Auch bei Vinculin war zu verzeichnen, dass die Energiedichte von 4 J/cm² nach dreifacher Bestrahlung die höchste Synthesesteigerung (densitometrische Analyse) ergab. Paxillin als intrazelluläres Signalprotein erbrachte in der densitometrischen Analyse die absolut höchste Synthesesteigerung nach dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm² mit 393% (p=0.0016) im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Proteinergebnissen (Abb. 58).

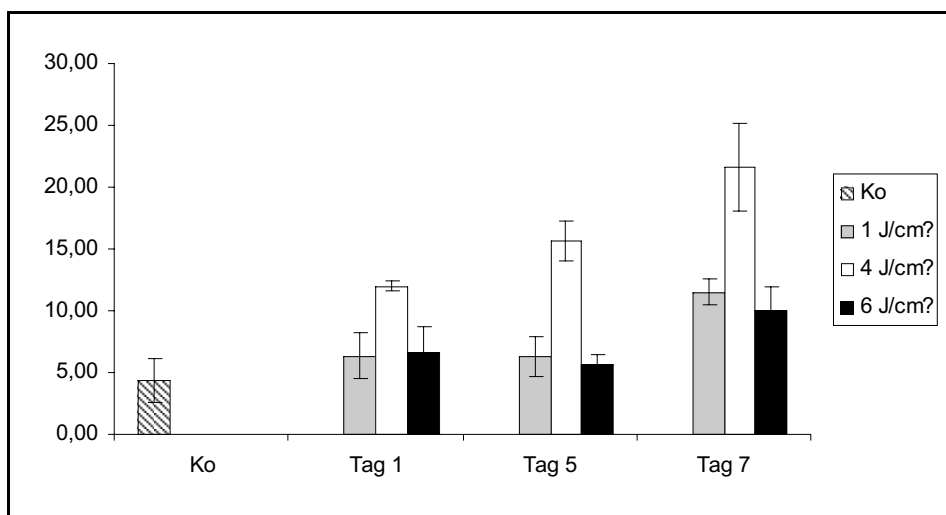
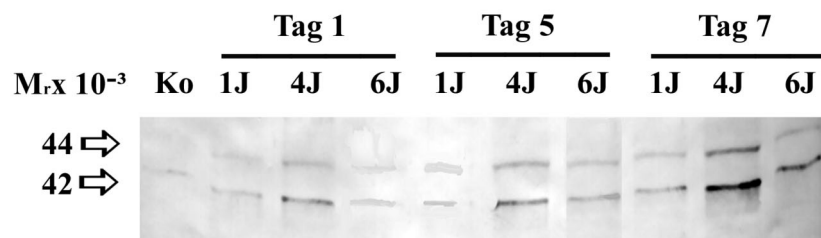


Abb. 58: Deutlichste signifikante Synthesesteigerung durch 4 J/cm² mit dem Höhepunkt am 3. Bestrahlungstag für das intrazelluläre Signalprotein Paxillin.

Molekularbiologie Shc (Src-homology collagen) und Erk1/Erk2

Wie auch bei den bisher genannten Proteinen zeigt sich für Shc und Erk1/Erk2 eine deutlich vermehrte Synthese nach der Anwendung von Laserenergie auf die in Alginatkultur befindlichen Chondrozyten. Bezogen auf die Energiedichte war die stärkste Synthese von Shc und Erk1/Erk2 nach Bestrahlung mit Energiedichte von 4 J/cm^2 zu verzeichnen. In beiden Fällen war die Proteinsynthese zeit- und energieabhängig. Im Western-Blot-Modus ist sowohl für Shc als auch für Erk1/Erk2 das Maximum nach 3 Bestrahlungen mit 4 J/cm^2 zu erkennen, wobei Erk2 eine stärkere Bandenausprägung und im Vergleich zu Erk1 auch eine stärkere Syntheseleistung in der Densitometrie aufzeigt (Abb. 59 und Abb. 60).



Blot: Anti-Erk1/2

Abb. 59: Western-Blot-Analyse der Signalproteine von Erk1/Erk2 mit deutlicherer Bandenschwächung bei Erk1. Bei 4 J/cm^2 ist die Synthese stärker als bei 1 und 6 J/cm^2 .

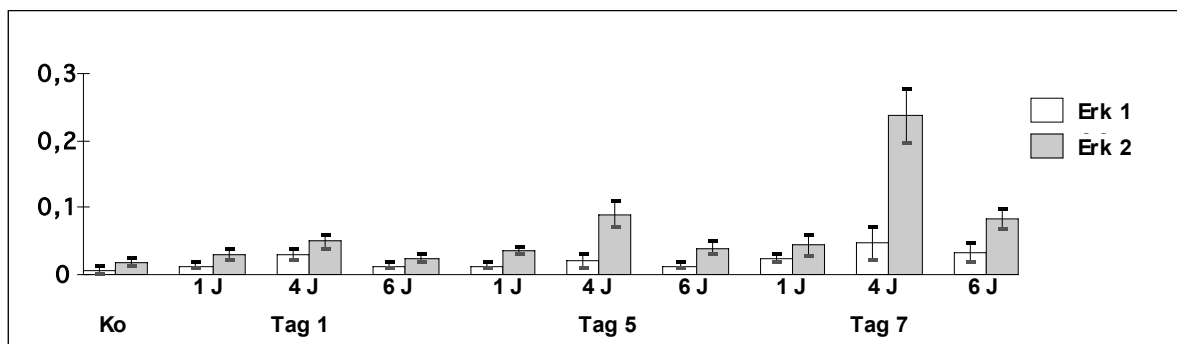


Abb. 60: Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Steigerung der Synthese von Erk1/Erk2 bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 in der densitometrischen Darstellung gut erkennbar. Das Maximum wird nach einer dreimaligen Bestrahlung mit einer Energiedichte von 4 J/cm^2 am Tag 7 erreicht. Am Tag 5 und Tag 7 Synthesesteigerung von Erk2 bei Energiedichten von 1 und 6 J/cm^2 .

6.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Kollagen und Fibronectin als extrazelluläre Matrixproteine beeinflussen die Morphologie, die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten [Enomoto-Iwamoto 1997]. Die Beta 1-Subfamilie der Integrine vermitteln die Signalübertragung zwischen Chondrozyten und den Matrixproteinen. Die Interaktion zwischen Integrinen und Matrixproteinen führt zu spezifischen Antworten der anabolen intrazellulären Signalkaskade in den Chondrozyten [Shakibaei 1999a,b]. Die Untersuchungen zur Anwendung der niedrigenergetischen Bestrahlung mit Laser sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Stimulation dieser intra- und extrazellulären Vorgänge in den Chondrozyten möglich ist.

In Abhängigkeit von der Laserart, der einwirkenden Energiedichte und der Bestrahlungszeit sind unterschiedliche Effekte beschrieben worden [Spivak 1992, Dortbudak 2000]. Bei der Implantation von in vitro kultivierten Chondrozyten existieren bereits neue Ansätze zur Stimulation von Knorpelgewebe bei lokalen Defekten [Torricelli 2001]. Bisher ist kein niedrigenergetischer Laser bekannt, der in die Aktivierung von intrazellulären Abläufen von Chondrozyten auf wissenschaftlich nachgewiesener molekularbiologischer Ebene positiv eingreift. Bei der Kultivierung der Chondrozyten zur Vorbereitung einer autologen Chondrozytentransplantation besteht das Problem einer raschen Dedifferenzierung der Zellen und somit einer Inaktivierung der Knorpelzellfunktion. Sowohl die Morphologie als auch die metabolische Situation und die Syntheseleistung der Matrixprodukte beziehen sich auf die Veränderungen. Nach längerer Verweilzeit in Monolayerkultur verlieren die Chondrozyten ihr chondrogenes Potenzial. Die knorpelspezifische Syntheseleistung von Kollagen Typ II und anderer Proteoglykane sind reduziert oder stoppen ganz [Kuettner 1982, Shakibaei 1997, Schulze-Tanzil 2002].

Bei den bisherigen experimentellen Einsätzen einer klassischen Low-Level-Lasertherapie an Knorpelgewebe wurden unterschiedliche Wellenlängen eingesetzt, so dass nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit besteht. Thawer und Houghten beschreiben eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit als proliferativen Effekt beim Einsatz eines Gallium-Aluminium-Arsenid(GaAlAs)-Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 904 nm [Thawer 1999]. Eine Proliferation von Fibroblastenzellkulturen und eine Zunahme der Syntheseleistung wurden bei Bestrahlung mit einem Diodenlaser beobachtet [Bosatra 1984, Labbe 1990, Kreisler 2002]. Ebert beschreibt bei der Behandlung von Chondrozyten in Monolayerkulturen mit einem GaAlAs-Diodenlaser (810 nm) eine Steigerung der Glykosaminsynthese durch Bestrahlung mit 51 J/cm² [Ebert 1998]. Bei 780 nm kam es zur Steigerung der Proliferationsrate von Chondrozyten um das Doppelte, bei Änderung der applizierten Laserfrequenz zeigt sich eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate. Alle bisherigen Autoren sind von unterschiedlichen Grundvoraussetzungen wie humane oder bovine Chondrozyten, unterschiedliche Kulturbedingungen, unterschiedliche Laserwellenlängen, unterschiedliche Energiedichten und Bestrahlungsintervalle [Labbe 1990, Guzzardella 2000] ausgegangen. Garino [1995] beschreibt bei der Versiegelung von Knorpeloberfläche durch einen Laser sogar Chondrolysen und Osteonekrosen.

Durch Optimierung der Kulturform von humanen Chondrozyten in Alginate verfolgten die Untersuchungen dieser Arbeit das Ziel, die Wirkung eines 780 nm-Diodenlasers auf extra- und intrazellulärer Ebene zu untersuchen. Es galt die Parameter der Leistungs- und Energiedichten zu definieren und optimal aufeinander abzustimmen. Es kam der GaAlAs-Diodenlaser mit einer

Wellenlänge von 780 nm mit verschiedenen Energiedichten und unterschiedlicher Anzahl an Bestrahlungen an bestimmten Tagen zum Einsatz. Die morphologischen Veränderungen auf extrazellulärer Ebene und der Synthese der extrazellulären Matrixbestandteile, der Integrinrezeptoren und auf der Ebene der intrazellulären Signalproteinkaskade wurden an humanen Chondrozyten in Alginatkultur untersucht. Die grundsätzliche Voraussetzung aussagefähiger In-vitro-Untersuchungen muss eine stabile Zellkulturform sein. Die Alginatkultur erfüllt diese Voraussetzungen [Häuselmann 1994, Schulze 2001]. Die Alginatkulturform der Chondrozyten ist besonders gut geeignet, um Veränderungen im Differenzierungsgrad oder die Synthesefähigkeit zu untersuchen. Durch die Kultivierung der Chondrozyten in Alginat sind ihr Differenzierungsgrad und ihre Synthesefähigkeit optimal [Aydelotte 1991, Gagne 2000]. Arbeiten von Shakibaei zeigen deutlich, welche Faktoren in der Signalkaskade für die Stabilisierung des Phänotypes und des Differenzierungsgrades der Chondrozyten lebensnotwendig sind [Shakibaei 1997, 1999 und 2001]. Eine Wirkung von Laserlicht auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene mit Nachweis der unterschiedlichen Expression beteiligter Signalproteine wurde bisher nicht untersucht.

Der Nachweis von potenziell stimulierender Wirkung der Laserbestrahlung auf Chondrozytenkultur hätte eine große Bedeutung im Hinblick auf die Produktion von stabilen, differenzierten Chondrozyten für eine Chondrozytentransplantation gehabt. Zu diesem Zwecke wurden entsprechende Untersuchungen an humanen Chondrozyten, die nach enzymatischer Isolierung in einer Alginatkultur kultiviert wurden, durchgeführt. Nach ein-, zwei- und dreimaliger Bestrahlung mit einem niedrigenergetischen Diodenlaser (780 nm) mit drei unterschiedlichen Energiedichten (1 J/cm², 4 J/cm² und 6 J/cm²) sollte die Wirkung der Laserbestrahlung auf die Zelle untersucht werden. Die extrazelluläre Matrixkomponente Kollagen Typ II zeigte nach dreimaliger Bestrahlung mit der Energiedichte von 4 J/cm² die höchste Synthesesteigerung. Mit 1 und 6 J/cm² war keine Synthesesteigerung zu erzielen. Die Energiedichte 4 J/cm² stellt sich nach dreimaliger Bestrahlung für Kollagen Typ II als optimal heraus. Auch die Expression von Chondroitinsulfatproteoglykan ist am stärksten ausgeprägt nach zweimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm² am 5. Tag. Die vermehrte Produktion vom Aggrecan Chondroitinsulfatproteoglykan kann zur Verbesserung der extrazellulären Matrix führen, die die Chondrozyten umgibt.

Durch die speziellen Oberflächenrezeptoren und Integrine, hier das Beta 1-Integrin, wird die Interaktion zwischen Chondrozyten und extrazellulärer Matrix gewährleistet [Enomoto-Iwamoto 1997, Cao 1999]. Die Beta 1-Integrinrezeptorgruppe ist von entscheidender Bedeutung für die Signalübertragung in Chondrozyten [Shakibaei 1995a,b]. Die vermehrte Expression dieses Rezeptors spricht nach aktuellem Kenntnisstand für eine angeregte Signalkaskade in Richtung des Zellkerns [Shakibaei 1999a,b]. Nach dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm^2 wurde eine signifikante Erhöhung der Synthese erreicht. Dies scheinen die optimalen Bestrahlungsintervalle und Energiedichte für eine Aktivierung der Beta 1-Integrinsynthese durch den GaAlAs-Diodenlaser zu sein.

Es wird vermutet, dass der Alpha 5 Beta 1-Rezeptor den intrazellulären Shc-Grb2-Komplex in Chondrozyten aktiviert [Wary 1996]. Bei den Untersuchungen der Alpha 5-Integrinexpression erzielte eine Bestrahlung mit 4 J/cm^2 nach zweimaliger Behandlung eine eindeutige Synthesesteigerung des Integrins. Unter dem optimalen Zeitfenster und der geeigneten Energiedichte führt die Bestrahlung mittels GaAlAs-Diodenlaser zu einer Aktivierung der Chondrozytendifferenzierung.

Fibronektin als weitere wichtige extrazelluläre Matrixkomponente hat eine bedeutende Funktion für das Überleben der Chondrozyten, da es das Wachstum von kultivierten Chondrozyten in vitro stimuliert [Martin 2000]. In oberflächlichen Schichten von osteoarthrotischem Knorpelgewebe wurden größere Mengen Fibronektin als Anzeichen für laufende Reparaturmechanismen gefunden [Jones 1987]. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen konnte eine signifikante Steigerung der Synthese von Fibronektin bei einer Energiedichte von 4 J/cm^2 und nach dreifacher Bestrahlung als Optimum gesehen werden.

Die intrazelluläre Signalkaskade wird durch die Adhäsion von Chondrozyten an Kollagen Typ II über die Beta 1-Integrin-Rezeptoren aktiviert [Shakibaei 1999a,b]. Die zytoskeletalen Signalproteine Vinculin und Paxillin werden nach Phosphorylierung aktiviert. Die Laserbehandlung mit dem GaAlAs-Diodenlaser mit der Energiedichte von 4 J/cm^2 nach zwei- und dreimaliger Behandlung bewirkt eine deutliche Synthesesteigerung von Vinculin und Paxillin. Die Aktivierung dieser intrazellulären Signalkaskade durch die Laserbehandlung scheint ein Integrin-vermittelter Effekt zu sein. Durch die Bindung von Kollagen Typ II an Beta 1-Integrin in humanen Chondrozyten kann über die Vermittlung der zytoskeletalen Proteine eine Aktivierung von Shc entstehen. Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Kaskade wird durch den Signalweg der Komplexbildung des Shc mit Grb2 aktiviert [Shakibaei 1999a,b].

Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs scheint für die Regulierung der Genexpression durch Integrin-vermittelte Signale bedeutsam zu sein. Dieser Aktivierungsprozess ist besonders wichtig für das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation der Chondrozyten. Bei Hemmung der Aktivierung von Erk1/Erk2 kommt es zum Zelltod oder zur Lyse der Zellen [Shakibaei 2001]. Auch bei diesem Aktivierungsprozess zeigt die Laserbestrahlung einen positiven Effekt im Sinne einer Synthesesteigerung von Erk1/Erk2 nach dreimaliger Bestrahlung mit 4 J/cm^2 .

Insgesamt weisen die Untersuchungen auf eine stimulierende Wirkung der Laserbehandlung bei einer einheitlichen Energiedichte von 4 J/cm^2 mit zwei- bzw. dreimaliger Bestrahlung auf die extrazellulären Matrixkomponenten, auf die Rezeptoren und auf die intrazellulären Signalproteine hin. Bei allen Proteinen kommt es zu einer deutlichen Synthesesteigerung. Da Fibronektin als Bestandteil der extrazellulären Matrix einen entscheidenden Beitrag zur Vitalität

der Chondrozyten leistet, kann anhand der nachgewiesenen Synthesesteigerungen die optimale Behandlung der Chondrozyten in Alginatkultur mit dem GaAlAs-Diodenlaser mit einer Energiedichte von 4 J/cm² und dreimaliger Behandlung definiert werden.

Der in Untersuchungen verwendete Laser mit einer Wellenlänge von 780 nm zeichnet sich durch eine hohe Gewebeabsorption und niedrige Wasserabsorption im biologischen Gewebe. Die geringe Ausgangsleistung und Energiedichte sollten zum erhöhten Metabolismus der Zellkultur führen. Eine längere Rekultivierung passagierter Chondrozyten in der Monolayerkultur durch stabilisierende Effekte kann durch die anabolen Effekte der Laserbehandlung an isolierten Chondrozyten ermöglicht werden. Dies könnte eine bedeutende Weiterentwicklung im Bereich der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) darstellen. Durch die Verbesserung der chondrogenen Eigenschaften autologer Zellen könnte das Reimplantationsergebnis optimiert werden.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass durch einen geeigneten Stimulus die Chondrozyten zu einer gesteigerten Matrixsynthese angeregt werden können. Dies geschieht z. B. durch Zugabe von Wachstumsfaktoren (FGF, TGF- β und IGF-1/2). In der Monolayerkultur humaner Chondrozyten wurde eine 2,5fach erhöhte Prolinaufnahme nach Zugabe von IGF-1 beschrieben [Dore 1994]. Bei einer Kultivierungszeit von 21 Tagen fand sich in Knorpelimplantatkulturen von Rindern eine bis zum 8fachen erhöhte Aufnahme von ³⁵SO₄ [Tesch 1992]. Wurde IGF oder FGF-Monolayerkulturen von Ratten- oder Rinderknorpel zugegeben, so kam es zu einem vergleichbaren Anstieg der Matrixsynthese [Trippel 1993]. Auch durch Bestandteile der ECM, wie FN- oder Aggrecanfragmente, sind Chondrozyten durch Aktivierung ihrer Integrinrezeptoren stimulierbar [Tesch 1992]. Ferner ist es möglich, durch elektromagnetische Felder oder gepulsten Strom einen Synthesereiz zu erzeugen [Norton 1981, Lipiello 1990].

Untersuchungen an gesundem Rinder- und Hundeknorpel, bei denen eine erhöhte Matrixsynthese nach Laserbestrahlung nachgewiesen wurde [Spivak 1992], warfen die Frage auf, ob diese Methode eine mögliche Therapieform der Osteoarthrose beim Menschen darstellt.

Der Verlauf einer Osteoarthrose beim Tier unterscheidet sich von der beim Menschen. Bei tierischem Knorpel hat der Krankheitsverlauf abhängig von der Spezies seine eigenen zeitlichen, morphologischen und biochemischen Charakteristika.

Die Osteoarthrose beim Menschen wird im Gegensatz zu den Ratten durch ischämische Knochennekrosen und eine Debrissynovitis kompliziert [Mohr 1993]. Eine im Tierversuch induzierte Osteoarthrose ist in der Regel traumatisch bedingt. Sie wird mittels Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes und weiterer Haltestrukturen, wie der Meniski, des mediales Kollateralbandes oder sogar beider Kreuzbänder¹, und durch Valgusumstellungsosteotomien herbeigeführt [Yoshimi 1994, Neidel 1998, Wei 1998a]. Diese rein mechanisch bedingten Osteoarthrosen zeigen einen kürzeren Verlauf als die chronisch degenerative Osteoarthrose des Menschen [Altman 1990, Wei 1998b]. Strukturelle und biochemische Eigenheiten des Knorpels verschiedener Spezies sind eine weitere Ursache für den unterschiedlichen Verlauf. Osteoarthrotischer Knorpel des Temporomandibulargelenks beim Kaninchen hat im Gegensatz zum Menschen einen höheren Anteil an Glykosaminoglykanen [Axelssons 1993]. Kaninchenknorpel weist zudem eine 10-fach höhere Chondrozytendichte und eine gegenüber dem menschlichen Gelenkknorpel fünffach verringerte Halbwertszeit der Proteoglykane auf [Mohr 1985]. Während im menschlichen hyalinen Knorpel kein Kollagen Typ I vorkommt, wurde es im Schweineknorpel bis zu einem Anteil von 10% nachgewiesen [Wardale 1993]. Im

Zellkulturmodell zeigen Rinderchondrozyten nach Wachstumsstimulierung mit IGF eine 7fach erhöhte Aufnahme von $^{35}\text{SO}_4$, während sich im gleichen Versuchsaufbau Rattenchondrozyten resistent gegenüber dieser Stimulierung zeigten. Umgekehrt verhält es sich nach Zugabe von FGF. Auf diesen Wachstumsreiz reagierten Rinderchondrozyten nicht, wohingegen es bei den Rattenchondrozyten zu einer Zunahme der Thymidin- und Sulfataufnahme um das Zweifache kam [Trippel 1993]. Kaninchenchondrozyten synthetisieren in der Monolayerkultur einen wesentlich höheren Anteil an Hyaluronsäure und Dermatansulfat als humane. Die Zeitdauer bis zum konfluenten Wachstum betrug 1 Woche, wohingegen humane Chondrozyten 5 Wochen benötigten [Srivastava 1974]. Eine speziesspezifische Beteiligung matrixdegradierender Enzyme im Verlauf einer Osteoarthrose wurde für MMP-1 (Kollagenase 1), MMP-3 (Stromelysin-1), MMP-7 (Matrilysin), MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-10 (Stromelysin-2) nachgewiesen [Mercuri]. Um die schwierige Übertragbarkeit an tierischem Knorpel gewonnenen Untersuchungsergebnisse auf den menschlichen Knorpel zu umgehen wurde in dieser Arbeit die Laserbestrahlung direkt an humanen Knorpel durchgeführt.

Die Reaktion des osteoarthrotisch geschädigten Knorpels auf äußere Einflüsse unterscheidet sich von der des gesunden. Humaner osteoarthrotischer Knorpel, der im Rahmen von Gelenkersatzoperationen erhalten wurde, weist eine bis zum sechsfachen gesteigerte Syntheserate sämtlicher Matrixbestandteile auf [Jacoby 1973, Mankin 1970, 1971]. Die Bestandteile der synthetisierten Matrix weisen ein anderes Verhältnis zueinander auf und haben einen atypischen molekularen Aufbau. Der Glukosamingehalt sowie die Keratan- und Chondroitinmenge sind vermindert [Byers 1977, Mankin 1981]. Wurden osteoarthrotische humane Chondrozyten in der Monolayerkultur mit IGF-1 stimuliert, so zeigten sie im Gegensatz zu gesunden Zellen erst nach der Zugabe von 10% FKS eine Steigerung der Matrixproteinsynthese um 220% [Calderhead 1988]. Der Unterschied zum gesundem Knorpel ist durch ein verschobenes Gleichgewicht der Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Matrixkomponenten bedingt. Um den therapeutische Einfluss der Laserstrahlung zu untersuchen, wurden die Experimente dieser Arbeit an osteoarthrotisch geschädigtem Knorpelgewebe durchgeführt.

Die Bedingungen der Explantatkultur kommen den Verhältnissen in vivo am nächsten. Werden die Chondrozyten als Monolayer kultiviert, so zeigen sie nach kurzer Zeit Dedifferenzierungserscheinungen [Grundmann 1980]. Es findet eine Umwandlung zu länglichen fibroblastenartigen Zellen statt, die einen vermehrten Anteil an Hyaluronsäure und einen verminderten an Chondroitinsulfat synthetisieren [Kimura 1984]. Die Genexpression von Differenzierungsmarkern wie Aggrecan und Kollagen Typ II, wird supprimiert, untypische Gene wie für Kollagen Typ I und II werden exprimiert [Brittberg 1994]. Die Fähigkeit, bei einer Stimulation durch IL-1- β mit einer Synthese von Nitridoxid, einer spezifischen 92kD-Gelatinase, von Kollagen Typ I und III sowie verminderter Synthese der knorpelspezifischen Kollagene II, IX und XI zu antworten, geht verloren [Lemare 1998]. Nach Zugabe von OSM ließ sich in der Monolayerkultur ein Anstieg der MMP-1 und MMP-3 Synthese um das 3,5fache beobachten, während sich in der Explantatkultur die Synthese lediglich um das 2,5fache steigern ließ. Möglichkeiten, der Dedifferenzierung entgegenzuwirken, sind die Kultivierung auf verschiedenen Kollagenen und Alginat [Goldring 1999]. Eine weitere Möglichkeit ist die Kultivierung als Pelletkultur in der die Chondrozyten nach Zentrifugation ihre intrazellulären Kontakte beibehalten [Grundmann 1980]. Die einfachste Möglichkeit eine Dedifferenzierung zu

verhindern und unter Bedingungen zu arbeiten, die denen in vivo sehr nahe kommen, ist die Kultivierung als Explantatkultur. Unter diesen Verhältnissen kommt die MMP Expression der in vivo am nächsten und die phänotypische Stabilität ist über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen gegeben [Flannery 1999]. Wurde osteoarthrotischer Knorpel von Beagle-Hunden in vivo durch eine $^{35}\text{SO}_4$ -Injektion in die Jugularisvene oder nach Explantation in der Gewebekultur markiert, so fand sich die gleiche Syntheserate an Glykosaminoglykanen [Sandy 1984]. Um den Bedingungen eines klinischen Einsatzes möglichst nahe zu kommen, wurden die Versuche der hier vorliegenden Arbeit an Explantatkulturen durchgeführt.

Eine Messung der Gesamtmenge im Knorpel befindlicher Proteine und Glykosaminoglykane ist mit geringem Aufwand möglich. Durch Bestimmung der Hydroxyprolinmenge kann das Gesamtkollagen und mittels Dimethylenblaufärbung die Menge der Glykosaminoglykane bestimmt werden [Peterkofsky 1971, Simha 1971]. Die Radioisotopenmarkierung ist jedoch die einzige Methode, die es gestattet, den Anteil neu synthetisierter Bestandteile der extrazellulären Matrix in der Explantatkulturen nachzuweisen [Brighton 1984, Neidel 1998]. Sie ist einfach durchzuführen und erlaubt eine quantitative Aussage. Der Nachweis einer Proteinsynthese im Northern-Blot ist semiquantitativ und wird häufig ebenfalls mittels radioaktiver Markierung durchgeführt.

Da in der hier vorliegenden Arbeit die markierten Syntheseprodukte nicht mit SDS-PAGE oder Säulenchromatographie weiter aufgetrennt wurden, kann lediglich eine Änderung der Gesamtsynthese beschrieben werden. Dieses Vorgehen ist etabliert, um den Einfluss bisher nicht untersuchter Größen, z. B. Druck oder Zugbelastung, auf den Metabolismus zu beschreiben. Erste Untersuchungen zum metabolischen Zustand des osteoarthrotischen Knorpels sowie zu dessen Stimulierbarkeit durch Wachstumsfaktoren wurden mittels einfacher Markierung ohne Auftrennung der Syntheseprodukte durchgeführt [Mankin 1971, Jacoby 1976, Srivastava 1974, Osborn 1989]. Auch der Nachweis der Synthesesteigerung an gesundem tierischen Knorpel nach Nd:YAG-Laserbestrahlung wurde mit der Radioisotopenmarkierung erbracht [Herman 1988].

In den Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Menge der aufgenommenen Radioaktivität über 24 Stunden ansteigt (Abb. 19; Seite 49). 75% der von vitalem Knorpelgewebe aufgenommenen Radioaktivität werden auch durch avitales Knorpelgewebe aufgenommen. Daraus folgt, dass lediglich 25% der aufgenommenen Radioisotopen aktiv metabolisiert werden. Ein 10%iger Anstieg der aufgenommenen Radioaktivität entspricht damit einer vierfach gesteigerten Syntheserate. Durch die aufgenommene Menge an ^3H -Prolin ließ sich in dieser Arbeit eine geänderte Syntheserate der ECM nach Laserbestrahlung nachweisen.

Eine vom Alter der Versuchstiere abhängige Proteoglykansynthese nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurde zuerst beim Kaninchenknorpel beschrieben [Weber 1981, Makower 1988]. Auch humaner Knorpel weist in Abhängigkeit vom Patientenalter und Ausmaß der Osteoarthrose Unterschiede auf [Lui 1999]. Die in der Literatur beschriebenen Matrixsyntheseraten des osteoarthrotischen Knorpels verschiedener Patienten haben eine Standardabweichung von bis zu 50% [Byers 1977, Mankin 1981]. In der hier vorliegenden Arbeit weisen der Knorpel von Patient 5 in Lasergruppe I mit 9400 CPM/mg Trockengewicht und der Knorpel von Patient 1 aus der Lasergruppe III mit 3050 CPM/mg Trockengewicht einen maximalen Unterschied der Syntheseleistung von 300% auf. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, stammte der Knorpel von Versuchs- und Kontrollgruppe aus dem gleichen

Gelenk. Um eine patientenspezifische Reaktion auf die Laserbestrahlung zu berücksichtigen, wurde pro Lasergruppe der Knorpel von sechs verschiedenen Patienten bestrahlt.

Der Knorpel eines Gelenks ist in einem unterschiedlichen Ausmaß von den osteoarthrotischen Veränderungen betroffen. Das Spektrum reicht makroskopisch von nahezu unauffällig bis zur kompletten Eburnisierung und faserknorpeligen Umwandlung. Der metabolische Status der entnommenen Knorpelstücke ist deshalb abhängig von der Lage im Gelenk [Lui 1999]. In dieser Arbeit erfolgte aus diesem Grund die zufällige Zuordnung von jeweils 4 Stanzzyklindern aus der Entnahmecharge zu einer Messeinheit. Die Standardabweichung der Knorpelzyklinder aus dem gleichen Gelenk ist mit durchschnittlich 10% relativ gering. Dennoch erschwert sie die statistische Erfassung geringer Änderungen in der Syntheseleistung.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Diodenlaser mit einer Ausgangsleistung von wenigen Milliwatt erfüllt die klassischen Kriterien des Low-Level-Lasers. Aufgrund seiner geringen Leistung können auftretende Veränderungen lediglich photochemischer Natur sein. Kürzlich wurde eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit fetaler Mäuseextremitäten nach Bestrahlung mit dem GaAs-Laser nachgewiesen [Friedmann 1991]. Die proliferationsstimulierende Wirkung könnte durch Chromophore der Atmungskette oder durch eine Aktivierung der Ca^{++} -ATPase vermittelt werden [Tiphlova 1989].

Nach Bestrahlung einer Fibroblastenmonolayerkultur mit dem HeNe-Laser mit 25 mW und 2 J/cm^2 fand sich elektronenmikroskopisch eine Hypertrophie des rauhen endoplasmatischen Retikulums, Zeichen mitochondraler Hypertrophie und vermehrt zytoplasmatische Mikrofibrillen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ^[20]. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete von einer signifikanten Zellzahlzunahme nach Bestrahlung mit dem HeNe-Laser ($0,1 \text{ mW/cm}^2$; $0,9 \text{ J}$) [Boulton]. In einer weiteren Untersuchung wurde die Anzahl der Fibroblasten im Coulter Counter und die Menge neu synthetisierten Kollagens Typ I mittels ELISA bestimmt. Abhängig von der Leistungsdichte mit der die Gesamtenergie von 180 mJ über drei Tage durch den HeNe-Laser zugeführt wurde, fand sich eine erhöhte Zellproliferation und Kollagensynthese [Breugel 1992]. Eine fünffach erhöhte intrazelluläre Hydroxyprolinmenge als indirektes Zeichen einer gesteigerten Kollagensynthese wurde nach Fibroblastenbestrahlung mit dem GaAs-Laser mit $0,1 \text{ J}$ festgestellt [Labbe 1990]. Nach Bestrahlung mit dem HeNe-Laser mit $0,8 \text{ mW/cm}^2$ und $0,0053$ bis $1,589 \text{ J/cm}^2$ sowie nach Bestrahlung mit dem GaAs-Laser mit $0,2 \text{ mW/cm}^2$ und $1,94 \times 10^{-7}$ bis $5,84 \times 10^{-6} \text{ J/cm}^2$ über vier Tage ließ sich eine Steigerung des inkorporierten ^3H -Prolin und ^3H -Leucin bis zum sechsfachen nachweisen [Lam 1986].

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Explantatkulturen mit 100 mW/cm^2 und $1,2 \text{ J}$, $1,8 \text{ J}$ sowie $2,4 \text{ J}$ bestrahlt. Es konnte bei keiner der drei Lasergruppen eine Änderung der Syntheseleistung beobachtet werden. Die an Fibroblasten beobachteten Ergebnisse sind nicht auf Chondrozyten übertragbar. Eine Möglichkeit ist, dass nicht die optimalen Bestrahlungsparameter verwendet wurden. Die verwendete Leistungsdichte und Gesamtenergie war wesentlich geringer als bei den Arbeiten an Fibroblasten. An Fibroblasten beschriebene Veränderungen waren abhängig von den Bestrahlungszyklen und der Kultivationszeit, die der Laserbestrahlung folgte. Es könnte sein, dass eine gesteigerte Syntheserate der Chondrozyten ähnlich wie bei Fibroblasten erst nach 3 bis 4 Tagen nachweisbar ist ^[22, 94]. Ein weiterer Grund für die fehlende Reaktion mag in der verglichen mit den Fibroblasten verminderten metabolischen Aktivität der Chondrozyten liegen. Ferner könnten eventuell aufgetretene

Veränderungen zu diskret gewesen sein, um mit der angewendeten Methode statistisch erfasst zu werden.

Der stimulierende Einfluss einer Nd:YAG-Laserbestrahlung auf Knorpelgewebe wurde in zwei Arbeiten nachgewiesen [Herman 1988, Spivak 1992]. Die Arbeitsgruppe von Herman bestrahlte mit einem cw-Nd:YAG-Laser Stanzzylinder gesunden bovinen Knorpels. Die Leistungsdichte war mit $11,5 \text{ W/cm}^2$ konstant, und die Energie von 1 bis 200 J wurde durch Variation der Bestrahlungszeit zugeführt. Eine Energie von 1 J hatte keinen Einfluss auf die Proteinsyntheserate. Wurde die Energie erhöht, so fand sich im Bereich von 30 bis 100 J eine gesteigerte Kollagen-, Glykosaminoglykan- und DNS-Synthese über einen Zeitraum von 3 Tagen. Die Prolinaufnahme war am Tag nach der Laserbestrahlung mit 100 J um 40% erhöht. Eine weitere Energieerhöhung auf 200 J führte dagegen zu einer um 30% verringerten Prolinaufnahme.

In der hier vorliegenden Arbeit war die Leistungsdichte mit 16 W/cm^2 in Lasergruppe IV und V nahezu identisch mit der von Herman verwendeten. Eine Energie von 1 J (Lasergruppe IV) hatte keine Auswirkung. Wurden 120 J appliziert, so fand sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Prolinaufnahme um 9,5%. Dieser Anstieg war geringer als in der Arbeit von Herman. Dies mag darin liegen, dass in der vorliegenden Arbeit vorgeschädigter Knorpel untersucht wurde. Bei Herman wurde das Kollagen nach Verdauung des Knorpelgewebes mit Trichloressigsäure ausgefällt und damit nur die Aktivität des in Kollagen eingebauten Prolins bestimmt. Dieser Schritt wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Sämtliche im Gewebe vorliegende Aktivität ging in die Messung mit ein.

Die Gruppe von Spivak bestrahlte gesunden explantierten Rinder- und Hundeknorpel mit einem Nd:YAG-Laser. Die Laserdauer war mit 5 s konstant und die Leistungsdichte bewegte sich im Bereich von 10 bis 203 W/cm^2 . Bei Leistungsdichten zwischen 10 W/cm^2 und 25 W/cm^2 war die Synthese sämtlicher Matrixbestandteile um bis zu 100% gesteigert. Die Prolinaufnahme war bei 25 W/cm^2 um 65% erhöht. Eine Bestrahlung mit 203 W/cm^2 führte zu einer um 36% verminderten Prolinaufnahme. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen diesen Veröffentlichungen. Bei einer Bestrahlung von 16 W/cm^2 war der Prolineinbau um 9,5% erhöht. Wurde die Leistungsdichte jedoch auf 318 W/cm^2 erhöht, so lagerte der Knorpel 28% weniger Aktivität ein.

Findet die Bestrahlung vom explantierten Knorpelgewebe mit einer Gesamtenergie im Bereich von 30 bis 100 Joule und einer Leistungsdichte im Bereich von 10 bis 30 Watt/cm^2 statt, so lassen sich sowohl bei gesundem tierischen als auch bei osteoarthrotisch geschädigtem menschlichen Knorpel Zeichen einer gesteigerten Matrixsynthese nachweisen. Wird die gleiche Energie mit einer Leistungsdichte von $200\text{-}300 \text{ Watt/cm}^2$ zugeführt, so ist die Syntheserate vermindert. Histologien, die von Spivak gefertigt wurden, zeigen keine Änderung der Zell- und Gewebemorphologie bei den Bestrahlungsparametern, die zu einer Mehrsynthese führten. Kam es durch Laserstrahlung hoher Leistungsdichte zur Suppression der Synthese, so wurde histologisch lediglich eine verminderte Safranin-O-Anfärbbarkeit beschrieben [Spivak 1992]. Leistungsdichten von $200\text{-}300 \text{ Watt/cm}^2$ werden klinisch zum Koagulieren von Blutungen verwendet und führen in vivo zur Koagulationsnekrose der Haut [Müller 1989b, Castro 1983]. Das Licht des Nd:YAG-Lasers dringt in die Tiefe des Gewebes ein, wird gleichmäßig gestreut und absorbiert. Leistungsdichten von $10\text{-}30 \text{ W/cm}^2$ und Energien von 100 J, die zu gesteigerten

Matrixsynthese führen, erfüllen nicht mehr die formalen Kriterien der Low-Level-Lasertherapie, da es zu Gewebserwärmung kommt. Hermann maß Temperaturerhöhungen des Nährmediums um ca. 10°C während des Laservorgangs [Herman 1988]. Da das Nährmedium selbst nicht das Nd:YAG-Laserlicht absorbiert, kann die beobachtete Temperaturerhöhung lediglich durch das erwärmte Knorpelgewebe bedingt sein. In einem an Fibroblastenkulturen durchgeführten Versuch traten nach Nd:YAG-Laserbestrahlung mit 531 W/cm² und 40000 J/cm² Temperaturerhöhungen bis zu 50°C auf. Unter diesen Bedingungen war die Prolinaufnahme vermindert. Erfolgte die Erwärmung mit einer Halogenlampe gleicher Energie und Leistungsdichte, so kam es zu keiner Änderung der Prolinaufnahme [Abergel 1984]. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass laserspezifische Eigenschaften für die Änderung im Zellmetabolismus verantwortlich sind. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an Chondrozyten gewonnen wurden und mit anderen Laserparametern als im Fibroblastenversuch gearbeitet wurde, ist es möglich, dass thermische Effekte für die Synthesesteigerung am Knorpelgewebe mitverantwortlich sind.

Bisher konnte die chondrozytäre Matrixsynthese durch Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser in Versuchen am gesunden tierischen Knorpel bewiesen werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals nachgewiesen, dass dieser Effekt auch beim geschädigten menschlichen Knorpel erzielbar ist. Damit ist die Voraussetzung für eine mögliche klinische Anwendung des Lasers gegeben.

6.1.4 Schneideigenschaften medizinischer Lasersysteme am humanen Knorpel

Im Rahmen einer in-vitro Studie sollten die Kriterien herausgearbeitet werden, die für ein effizientes Schneiden von Gelenkknorpel mit verschiedenen gängigen Lasersystemen von Bedeutung sind. Dabei wurden neben einem potentiellen Einsatz der Laser zur Knorpel-Knochen-Transplantation auch andere Indikationen aus dem klinisch-orthopädischen Bereich berücksichtigt.

Folgende Kriterien wurden für die Beurteilung der mit Laser durchgeführten Schnitte am Knorpelgewebe herangezogen:

- klinische Einsetzbarkeit des Lasersystems
- Qualität des Schnittes
- Größe der thermischen Schädigungszone
- Vorhandensein von Karbonisation

Die In-vitro-Untersuchungen wurden an frisch entnommenem humanem Knorpelgewebe aus den gewichtstragenden Anteilen des medialen und lateralen Femurkondylus durchgeführt. Der Gelenkknorpel zeigte makroskopisch keine Anzeichen pathologischer Veränderungen. Vor den Messungen wurde die Knorpelschicht mit einer frischen Skalpellklinge vorsichtig in gleichmäßiger Schichtdicke vom subchondralen Knochen gelöst und in Tyrodelösung aufbewahrt.

Zum Einsatz kamen sowohl Dauerstrich- (continuous wave (cw)) als auch kurzgepulste Lasersysteme. Das Ende des Lichttransmissionssystems (Faserspitze bzw. Fokussierhandstück) befand sich im Abstand von ca. 0,5 mm zum Gewebe. In Abhängigkeit vom verwendeten Lasersystem wurden die Pulsenergie sowie die Pulswiederholrate variiert. Die Anzahl der Pulse bis zur Penetration der Knorpelprobe wurde ermittelt. Während der Versuche wurden die Knorpelproben ständig mit Tyrodelösung feucht gehalten. Die Querschnitte der entstandenen Ablationskrater wurden stereomikroskopisch vermessen und auf ihre Form untersucht. Bis auf den Excimer-Laser wurden die Versuche in Raumluft durchgeführt. Zur Ermittlung des Einflusses des umgebenden Mediums auf die Schneidergebnisse wurden für den Excimer-Laser zusätzlich vergleichende Untersuchungen in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt.

Unmittelbar nach Versuche wurden Proben für die Histologie und Rasterelektronenmikroskopie entnommen.

Tabelle 5 zeigt die bei den Untersuchungen eingesetzten Laserparameter.

Für die Histologie wurden die Präparate nach dem ersten Zuschnitt in einer 4%-igen Formalinlösung fixiert. Nach Entkalkung mittels einer speziellen Lösung aus Aluminiumchlorid, Salzsäure und Ameisensäure erfolgte die übliche Routinebearbeitung mit Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe und Einbettung in Paraffinblöcke. Die Untersuchung der histologischen Präparate wurde am Mikroskop (Zeiss AxioPhot) durchgeführt.

Tabelle 5: Laserparameter für die Bestrahlungsversuche am humanen Knorpel in vitro

Pos.	Laser	Wellenlänge	Betriebsart	Leistung bzw. Pulsenergie	Schnittgeschwindigkeit	Lichttransmissionssystem
1.	Nd:YAG-Laser (Axyon GL001/ Aesculap)	1064 nm	cw	10-40 W	0,5-1 mm/s	600 μ m-Faser, Fokussierhandstück (Strahldurchmesser 700 μ m)
2.	CO ₂ -Laser (LS500 / Heraeus)	10600 nm	quasi-cw, 62,5 bzw. 4400 Hz / Tastverhältnis 0,4	5-13 W	2,5 mm/s	Fokussierhandstück (Strahldurchmesser 500 μ m)
3.	CO-Laser (Laborlaser)	5300- 5700 nm	cw	6-20 W	1 mm/s	Freistrahler
4.	Ho:YSGG-Laser (Laborlaser)	2100 nm	kurzgepulst. Pulslänge 250 μ s	5,7 J pro Millimeter Schnittlänge	0,5-1 mm/s	600 μ m-Faser
5.	Er:YAG-Laser (MBB)	2940 nm	kurzgepulst, Pulslänge 180 μ s	400-800 mJ	0,5-1 mm/s	Fokussierhandstück, (Strahldurchmesser 0,4 mm)
6.	Excimer-Laser (MAX 10 / Technolas)	308 nm	kurzgepulst, Pulslänge 60 ns	20 mJ	0,1-0,2 mm/s	600 μ m-Faser

Für die Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop wurden die Präparate auf eine Kantenlänge von etwa 5 mm zugeschnitten und für 24-48 Stunden in einer Glutaraldehydlösung fixiert. Danach erfolgte für 2-3 Stunden eine Nachfixierung mit einer 1%-igen Osmiumtetroxidlösung. Anschließend wurden die Präparate in aufsteigendem Aceton entwässert, für 2 x 30 Minuten in Hexamethyldilazan gespült und an der Luft getrocknet. Sie wurden dann auf Aluminiumträgern montiert, in der Balzers Sputteranlage mit Gold besputtert (Goldschichtdicke etwa 20 nm) und im Zeiss DSM 950 Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Nd:YAG-Laser

Bei geringer Leistung zeigte der Nd:YAG-Laser zunächst keine Schneidwirkung, sondern führte zu einer muldenförmigen Einsenkung des Präparates aufgrund der Wasserverdampfung aus dem Gewebe. Erst höhere Leistungen von 30 W und darüber führten zu Schneideffekten am Knorpel, wobei jedoch die stark variierende Schnitttiefe und die unregelmäßigen Schnittländer charakteristisch waren. Bei diesen Leistungen kam es teilweise zu einer starken Rauchentwicklung während des Schneidvorganges.

Histologisch zeigten sich regelmäßig thermische Schädigungszonen von 1-1,3 mm im angrenzenden Gewebe.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben eine stark veränderte Schnittoberfläche mit deutlichen Koagulationsartefakten und Rissbildungen in der Oberflächenschicht. Die Netzstruktur der Kollagenfasern war aufgehoben. Dies war in allen Präparaten im Unterschied zu unbehandelten Knorpelproben deutlich zu erkennen. Ferner zeichneten sich sämtliche Schnitte durch eine starke Karbonisation an den Schnittländern aus, die auch makroskopisch sichtbar war.

Die Schnitttiefe beim Einsatz des Nd:YAG-Lasers hängt wesentlich von den lokalen Oberflächeneigenschaften des Gewebes ab. Kleine Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit des Gelenkknorpels (etwa durch Blutauflagerungen, degenerative Veränderungen wie Chondromalazie etc.) verändern das Schneidverhalten des Lasers beträchtlich. Bei gleicher Verfahrensgeschwindigkeit und gleicher Leistung traten mancherorts nur Gewebeeinsenkungen durch Wasserverdampfung auf, während es in anderen Knorpelarealen zu starken Einbrandphänomenen mit Verkohlung des Gewebes gekommen ist.

CO₂-Laser

Bei Leistungen zwischen 5-13 W konnte in allen Schnitten die gesamte Knorpelhöhe von ca. 2 mm durchtrennt werden, dabei entstanden V-förmige Schnittkanäle mit glatten Schnittländern.

Histologische Untersuchungen zeigten eine geringe Schädigungszone von ca. 5 μm . Makroskopisch fielen relativ starke Karbonisationsphänomene auf, in den histologischen Präparaten war jedoch das Karbonisat entfernt.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die glatten Schnittländer. An der Schnittoberfläche fand sich eine etwa 5 μm dicke, nahezu homogene Schicht aus koaguliertem Gewebe. Außerhalb dieser Zone ließen sich keinerlei Veränderungen an Kollagenfasern und Chondrozyten nachweisen.

Beim Wechsel der Hochfrequenzanregung von 62,5 Hz auf 4400 Hz war sowohl makroskopisch als auch histologisch eine verstärkte Karbonisation nachweisbar. Die Breite der Schädigungszone im angrenzenden Gewebe betrug jedoch auch in diesem Fall nur ca. 6 μm .

CO-Laser

Während des Laservorganges kam es regelmäßig zu einer starken Rauchentwicklung.

Die Knorpeloberfläche wies makroskopisch deutliche Karbonisationsartefakte auf, die sich histologisch bestätigen ließen. Histologisch wie auch rasterelektronenmikroskopisch zeigten sich große Ähnlichkeiten zwischen den CO- und CO₂-Laserschnitten hinsichtlich Schnittform, Schädigungszonen und -charakteristik. So lässt sich bei den Schnitten eine Schädigungszone von etwa 40 µm erkennen, die aus karbonisierten und kristallinierten Gewebeschichten besteht. Bei den verwendeten Leistungen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Breite der Schädigungszonen erkennen.

Ho:YAG-Laser

Charakteristisch für den hier verwendeten Ho:YSGG-Laser waren die regelmäßig auftretenden starken Einrisse des Gewebes rings um den Schnittspalt.

Die maximal erreichbare Schnitttiefe betrug in den Versuchen mit Energien von 5,7 J pro Millimeter Schnittlänge 1 mm. Die Schädigungszone in angrenzendem Gewebe betrug 300 bis 400 µm und war teilweise durch vakuoläre Strukturen sowie deutliche Karbonisationsphänomene gekennzeichnet.

Rasterelektronenmikroskopisch zeigte sich an der Schnittoberfläche eine unregelmäßig strukturierte, kompakte Schicht vom koagulierten Gewebe, die den mit dem Nd:YAG-Laser bearbeiteten Oberflächen ähnelte. Einzelne Kollagenfasern waren an der gelaserten Oberfläche nicht nachweisbar.

Für die vom Holmium-Laser emittierte Strahlung mit einer Wellenlänge von 2100 nm beträgt die mittlere Eindringtiefe ins Knorpelgewebe etwa 300 bis 400 µm, was mit der Breite der Schädigungszone gut korreliert.

Er:YAG-Laser

Die mit dem Er:YAG-Laser erzeugten Gewebeschnitte zeigten einen geraden Verlauf der Schnittländer ohne Rissbildung an der Oberfläche. Die Schnittländer waren glatt und wirkten wie ausgestanzt. Bei den Schnittgeschwindigkeiten von 0,5 bis 1 mm pro Sekunde ließ sich eine Schnittspalttiefe von ca. 2 mm erzielen.

Die Schädigungsbreite längs der Schnittländer betrug bei Frequenzen von max. 10 Hz nur 5 bis 10 µm und stieg bei Frequenzen ab 10 Hz auf etwa 15 µm an.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine nur geringe Schädigung der Schnittoberfläche. Die Schnittoberfläche erschien samtartig, die Faserstruktur der Kollagenfasern sowie Chondrozyten waren deutlich zu erkennen. Bei Frequenzen von max. 10 Hz konnten keine Karbonisationseffekte nachgewiesen werden.

Excimer-Laser

Durch Variation der Prozessparameter wurde eine Pulswiederholrate von 10 Hz und darunter als die günstigste für die Erzielung möglichst geringer thermischer Schädigungszonen ermittelt. Bei der Frequenz von 10 Hz konnten jedoch in keinem der Versuche ausreichende Schnitttiefen erreicht werden, d. h. der Knorpel konnte nicht in seiner gesamten Dicke durchtrennt werden.

Die histologische Auswertung zeigte eine Schädigungszone von ca. 50 μm um den Schnittspalt. Rasterelektronisch konnte die Breite der Schädigungszone bestätigt werden. Höhere Frequenzen gingen stets mit einer signifikanten Steigerung der Breite der thermischen Schädigungszone einher (100 μm bei 20 Hz bzw. 150 μm bei 40 Hz). Bei Anwendung des Excimer-Lasers in physiologischer Kochsalzlösung nahm die Ablationsrate gegenüber der an der Luft gemessenen um den Faktor 6 ab, gleichzeitig kam es aber zur Abnahme der Breite der thermischen Schädigungszone. Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass bei den an Luft durchgeführten Schneidversuchen die höhere Abtragrate durch eine Verstärkung der thermischen Wirkung und der damit verbundenen Verdampfung von Gewebswasser zustande kommt. Bei Laseranwendung in physiologischer Kochsalzlösung wirkt das umgebende Wasser durch den Abtransport von Wärme der thermischen Schädigung der Schnittspaltränder entgegen.

Im Rahmen der In-vitro-Untersuchungen wurden die gängigen Lasersysteme im Hinblick auf ihre Schneideigenschaften beim Einsatz am Knorpelgewebe untersucht.

Bei den Schnittversuchen wurden vergleichend mehrere Schnitte mit unterschiedlichen Energien bzw. Leistungen durchgeführt. Dadurch ließ sich eine Optimierung der Schnittbedingungen hinsichtlich der einzubringenden Energie und der Verfahrensgeschwindigkeit erzielen.

Die histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass ein optimales System, das alle erforderlichen Eigenschaften zum Schneiden von Gelenkknorpel in sich vereinigt, derzeit nicht verfügbar ist.

Den im Dauerstrich arbeitenden Lasern (Nd:YAG, CO₂- und CO-Laser) ist eine relativ starke Oberflächenschädigung mit Karbonisation und Kristallisation von Gewebe gemeinsam. Die Breite dieser Schädigungszone variiert mit der Wellenlänge und der Eindringtiefe der Laserstrahlung ins Gewebe. Über diese Eigenschaften der Dauerstrich-Laser auch bei der Bearbeitung von anderen Geweben wurde bereits vielfach berichtet. Auch erscheinen diese Laser für einen potenziellen Einsatz zur Gelenkknorpeltransplantation eher ungeeignet.

Demgegenüber bieten gepulste Laser, hier insbesondere die kurzgepulsten Systeme, den zumindest theoretischen Vorteil eines nahezu athermischen Abtrags von Gewebe. In den Intervallen zwischen den Laserpulsen kann die eventuell entstandene Wärme abtransportiert, und somit ein Aufheizen des Gewebes verhindert werden. Andererseits treten bei sehr kurzen energiereichen Laserimpulsen so hohe Energiedichten auf, dass sämtliches von der Strahlung getroffene Gewebe explosionsartig herausgesprengt wird. Hierbei treten aufgrund der Schnelligkeit des Abtragsvorgangs sehr wenig thermische Veränderungen auf.

Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Minimierung der thermischen Effekte liefern die Einsätze des Erbium:YAG-Lasers sowie des Excimer-Lasers. Jedoch ist die Schneideffizienz beim Einsatz des Excimer-Lasers aufgrund der relativ geringen Pulsenergien eher gering. Mit der Entwicklung von Excimer-Lasern mit höheren Pulsenergien und Fasern, die für die Übertragung von hohen Energien geeignet wären, könnte die Stellung dieses Lasers im Bereich der Gelenkchirurgie eine neue Dimension erlangen.

Demgegenüber lassen sich gegenwärtig mit dem Er:YAG-Laser Einzelpulsenergien von bis zu 2 J erzielen. Dadurch sind wesentlich effektivere Schneidvorgänge möglich. Allerdings sind derzeit keine suffizienten Fasern, die für die Übertragung des hochenergetischen Lichtes mit der Wellenlänge von 2940 nm geeignet sind, kommerziell verfügbar. Die Arbeiten zur Entwicklung geeigneter Fasern sind jedoch Stand der Forschung.

Der Vorteil des Holmium-Lasers besteht in der Möglichkeit der Übertragung seiner Strahlung durch flexible Fasern, deswegen wird der Laser bereits klinisch im Bereich der Arthroskopie verwendet. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Schädigungszone im Vergleich zum Er:YAG viel größer ist. Außerdem ist die Qualität der Gewebearbeitung durch entstehende Oberflächeneinrisse nicht zufriedenstellend. Darüber hinaus kommt es während des Laservorganges zu starken Vibrationen des Gewebes. Es ist zu erwarten, dass im wässrigen Milieu dieser Effekt noch stärker auftritt, womit die Gefahr von unvorhersehbaren Umgebungsschädigungen verbunden wäre.

6.1.5 Einsatz des Er:YAG-Lasers zur Bearbeitung von Knorpelgewebe

In den bisherigen Untersuchungen zeigte der Er:YAG-Laser mit der Wellenlänge von 2940 nm gute Qualitäten bei der Bearbeitung von Knorpelgewebe. Vor allem wurden mit diesem Laser gute Ergebnisse in Hinblick auf die Minimierung der thermischen Effekte am umliegenden Gewebe erzielt. Aufgrund hoher Wasserabsorption des Lichtes mit der Wellenlänge von 2940 nm ist die Transmission der Er:YAG-Laserstrahlung durch kommerziell zur Verfügung stehende Quarzfasern nahezu ausgeschlossen. Dies limitiert erheblich die Möglichkeiten des arthroskopischen Einsatzes des Er:YAG-Lasers. Allerdings ist die Entwicklung geeigneter Fasern Stand der Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der potenzielle Einsatz eines modifizierten Er:YAG-Lasersystems mit einer experimentellen Faserübertragung der Strahlung zur Bearbeitung von Knorpelgewebe getestet werden.

In den Vorversuchen mit einem Er:YAG-Laser (2940 nm, Pulsdauer 200 μ s, Pulsenergie 5-50 mJ, Pulsfrequenz 10 bis 100 Hz/Asklepion) mit Strahlübertragung mittels 600 μ m-ZrF₄-Faser sollten die Parameter für die experimentellen Untersuchungen am Knorpelgewebe optimiert werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Abtragen von Knorpel mit diesem Lasersystem unter Wasser prinzipiell möglich ist. Mit der am Faserende verfügbaren max. Pulsenergie von ca. 20 mJ lassen sich jedoch nur geringe Abtragraten am Knorpelgewebe erzielen. Um das Potenzial des Abtragens von Knorpel unter Wasser genauer untersuchen zu können, wurde der zur Verfügung stehende medizinische Er:YAG-Laser MCL-29 Dermablate (Aesculap-Meditec), der für dermatologische und dentale Anwendungen ausgelegt ist, in den weiteren Versuchen verwendet. Dieser Laser liefert höhere Pulsenergien, ist jedoch mit einem Spiegelgelenkarm zur Strahlübertragung ausgestattet. Da es für das Abtragen von Knorpelgewebe unter Wasser notwendig ist, die Strahlung zumindest für die letzten Zentimeter mit einer flexiblen Faser zu übertragen, wurde für diesen Laser experimentell eine externe Faserkopplung aufgebaut. Parameter des Systems:

- Wellenlänge: 2940 nm
- Pulsdauer: 250 μ s
- Pulsenergie und -frequenz:

1 bis 8 Hz	100 bis 1200 mJ
10 Hz	100 bis 1000 mJ
15 Hz	100 bis 400 mJ
- Strahlführung: Spiegelgelenkarm

Der Laser weist ein Strahlprofil auf, das durch viele Moden eher kasten- als gaußförmig ist.

In den Versuchen wurde eine low OH⁻-Quarzglasfaser (HCL-MO550T-08 LOW-OH ALL / Laser Components) mit einem Kerndurchmesser von 550 μ m und einer numerischen Apertur (NA) von 0,22 verwendet. Für die Knorpelexperimente werden kurze Faserstücke von ca. 35 bis 50 mm benötigt. Dazu musste die Faser so präpariert werden, dass an beiden Enden eine glatte Oberfläche entsteht. Zu diesem Zwecke wurde das Brechen der Faser so lange wiederholt, bis Fasern mit einer Länge im spezifizierten Bereich und möglichst ebenen Faserendflächen erhalten wurden. Es musste daher in Kauf genommen werden, dass die Versuche nicht mit einer konstanten Faserlänge und damit konstanter Dämpfung durchgeführt werden konnten. Eine

eventuelle Krümmung der Endfläche war zumindest für die Einkopplung unproblematisch, da die NA der Faser deutlich größer als die des Laserstrahls war.

Aufbau und Test einer Fasereinkopplung

Mit Komponenten eines optischen Mikrobanksystems wurde eine Kopplung der Strahlung von einem Fokussierhandstück (Handstück 2045 / Aesculap-Meditec) in eine Faser aufgebaut (Abb. 61). Die Faser kann zur optimalen Einkopplung in xyz-Richtung justiert werden. In xy-Richtung ist eine Feinjustage möglich. Zwischen Gelenkarm und Handstück können Glasfilter zur Abschwächung der Laserstrahlung eingefügt werden. Ein Glasfilter OG 515, Dicke 3 mm, weist bei 2940 nm eine Transmission von 16 % auf. Alternativ kann ein einfaches Objektträgerglas aus der Mikroskopie verwendet werden, um die Strahlung auf ca. 63 % Transmission abzuschwächen. Der Fokus des Fokussierhandstücks liegt etwa 17 mm außerhalb des Handstückes mit einem Durchmesser von ca. $0,45 \pm 0,15$ mm. Es weist eine Strahldivergenz hinter dem Fokus von ca. 2° bzw. eine NA von 0,036 auf.

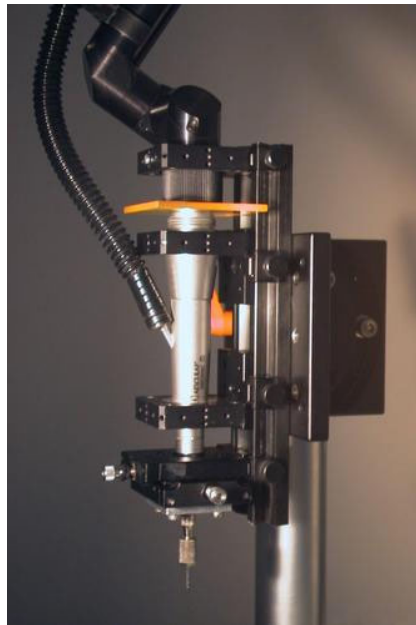


Abb. 61: Fasereinkopplung für das Fokussierhandstück 2045 (Er:YAG-Laser MCL29 Dermablade / Aesculap).

Das Bewegen des Spiegelgelenkarmes führt zum Wandern des Strahls in der Fokusebene. Um dies zu vermeiden, wird der Spiegelgelenkarm über ein Stativ fixiert und nur die Faser justiert. Die Lage von Pilotstrahl und Laserstrahl stimmen gut überein. Mit dem Pilotlaser kann so der Er-Laserstrahl justiert werden. Die Faser wird in z-Richtung wie üblich in den divergenten Bereich ein bis zwei Millimeter hinter den Fokus positioniert.

Die leichten Unebenheiten in der Faserendfläche führen zu leichten Störungen im Abstrahlprofil, die aber als akzeptabel für die Untersuchungen angesehen wurden. Ein als sehr gut angesehenes Strahlprofil des Pilotlasers einer Faser mit nahezu ebener Endfläche ist in Abb. 62 dargestellt.

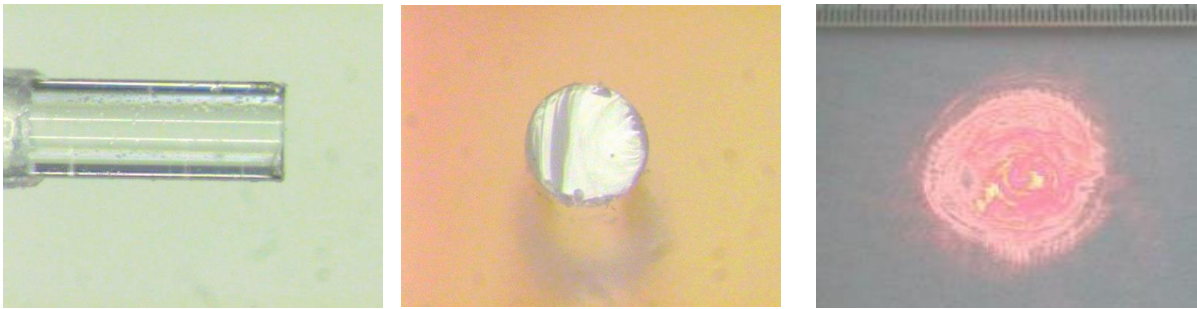


Abb. 62: Nahezu optimal gebrochenes Faserende, Strahlprofil des Pilotlasers 20 cm nach Faserende, Divergenz ca. 4° bzw. NA 0,07.

Die Einkopplung wird neben der visuellen Kontrolle des Pilotlasers durch Messen der Energie bei der Justage kontrolliert. Die Strahlung lässt sich nahezu vollständig in den Faserkern einkoppeln, erkennbar an konstant bleibender Energie bei geringer Dejustage.

Die in folgenden Versuchen verwendeten Pulsenergien am distalen Faserende wurden jeweils an der Luft gemessen. Der Reflexionsverlust an einer Grenzfläche zu Luft beträgt etwa 3 % und ist ca. 10fach höher als unter Wasser. Damit steht – unter Berücksichtigung der Reflexionsverluste an zwei Grenzflächen – unter Wasser etwa 3 % mehr Energie zur Verfügung als an der Luft. Da dies aber im Rahmen der Schwankungsbreite der Laserenergie bzw. der Energiemessung liegt, wurde hier keine Korrektur der Werte vorgenommen. Aus der Transmission lässt sich die Dämpfung des verwendeten Fasermaterials bestimmen. Bei einer 50 mm langen Faser beträgt, bei einer effektiven Pulsenergie von 85 mJ, die Transmission an der Luft etwa 49 ± 2 %. Bereinigt um die Reflexionsverluste an der Luft, ergibt dies eine Dämpfung der Faser von etwa 0,55 dB/cm.

Durch die Faser lässt sich dauerhaft Strahlung mit Pulsenergien von 1000 mJ übertragen, ohne dass es zu Schäden an den Endflächen oder im Faserkern kommt. Bei einer Frequenz von 15 Hz und Energien >200 mJ kam es zeitweilig durch einen Anteil am Rande des Strahlprofils, der den Faserkern überstrahlt, zu Schmelzen und Abtragen des Fasermantels. Bei geringeren Frequenzen bis 8 Hz tritt dies nicht auf. Das Abtragen des Fasermantels war an einem Plasmablitzen zu erkennen, das Schmelzen des Fasermantels war nachträglich an der Faser zu erkennen.

Aufbau eines Messplatzes für das definierte Knorpelabtragen

An einen Messplatz (Abb. 63) zur Durchführung von gezielten Abtragexperimenten am Knorpel unter Wasser werden besondere Bedingungen gestellt. Neben einer stabilen Fasereinkopplung und einer stabilen Probenhalterung ist es besonders wichtig, den Faserabstand zur Gewebeoberfläche genau einzustellen und bestimmen zu können, da das Abtragverhalten maßgeblich von diesem Abstand abhängig ist. Die genaue Positionierung der Probe in xyz-Richtung wurde durch einen Laborheber realisiert, der auf einem xy-Tisch montiert wurde.



Abb. 63: Messplatz für kontrollierte Abtragexperimente. Rechts der Er:YAG-Laser (Asklepion), oben ein Monitor, auf dem mittels einer Videokamera die Faseranordnung etwa zehnfach vergrößert dargestellt werden konnte.

Die Installation einer Videokamera seitlich zur Faserhalterung und die Darstellung der Faser und der Knorpeloberfläche auf einem Monitor ermöglichte eine etwa zehnfach vergrößerte Darstellung der Anordnung. Am Monitor wurde anhand einer auf die Mattscheibe aufgebrachten kalibrierten Skala der Abstand zwischen Faser und Oberfläche bestimmt. Damit war eine visuelle Abstandskontrolle in z-Richtung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,10$ mm möglich.

Präparation von Knorpelproben

Für die Untersuchungen wurde Kniegelenkknorpel von Schweineröhrenknochen (Oberschenkel) verwendet. Das Knochenende, an dem sich der Knorpel befindet, wurde in ca. 2 cm lange Stücke gesägt, bei denen die Krümmung möglichst gering war und die Knochenschicht unter dem Knorpel nicht zu dick ausfiel. Damit sollte das spätere präzise Zerschneiden der Probe erleichtert werden.

Die Untersuchungen zur Laserbearbeitung des Knorpels unter Wasser fanden in physiologischer Kochsalzlösung statt, um den arthroskopischen Bedingungen in vivo möglichst nah zu kommen.

Bestimmen des maximalen Faserabstandes zum Gewebe für unterschiedliche Energien

Die Grundvoraussetzung für die klinische Einsetzbarkeit der Er:YAG-Laserstrahlung im Gelenk ist der Transport der Laserstrahlung durch eine Wasserschicht zur Knorpeloberfläche. Es wurde im Rahmen der durchgeführten Versuche für vier unterschiedliche distale Energien evaluiert, bei welchem maximalen Faserabstand noch Gewebe abgetragen wird.

Die distale Energie wird durch Variieren der Energieeinstellung am Lasergerät sowie durch Einfügen geeigneter Glasfilter in den Strahlengang eingestellt. Für die distalen Energien von 16, 28, 47 und 110 mJ wurde an je einer Knorpelprobe der maximale Faserabstand bestimmt. Entlang einer Reihe wurden in unterschiedlichen Faserabständen je 50 Pulse mit 5 Hz abgegeben. Nach der ersten Reihe wurde makroskopisch beurteilt, bis zu welchem Abstand Gewebe abgetragen wird und in zwei weiteren Reihen um diese Grenze herum der Abstand variiert. Am Ende einer Reihe wurde jeweils der Zustand der Faser unter dem Stereo-Mikroskop begutachtet.

Evaluierung des Abtragverhaltens bei unterschiedlichen Energien

Um das Potenzial des Knorpelabtrags für den klinischen Einsatz richtig einzuschätzen, ist die Kenntnis des Abtragverhaltens notwendig.

Mit geeigneten Kombinationen von Faserlänge, Energieeinstellung am Laser und Verwendung von Glasfiltern wurden Energien von 16, 26, 43 und 100 mJ eingestellt. Für diese Energiewerte wurde für unterschiedliche Pulszahlen die Tiefe des Ablationskraters am Knorpel gemessen. Da ein recht großer Energiebereich gewählt wurde, wurde die Kratertiefe bei zwei unterschiedlichen Abständen bestimmt, damit die Spanne zwischen sehr ausgeprägtem und kaum messbarem Abtrag nicht zu groß wird: bei 1 mm Abstand für 100 mJ und bei 0,5 mm Abstand bei den anderen Energien. Es wurde jeweils mit 1, 5, 10 und 20 Pulsen mit 1 Hz in drei Versuchen Gewebe auf einer geraden Linie auf der Knorpeloberfläche abgetragen. Im Anschluss wurde mit einem Skalpell freihändig unter dem Mikroskop ein Schnitt entlang der Linie durch das Zentrum der Ablationskrater geführt und dann der Knorpel und Knochen in zwei Teile getrennt. Unter dem Stereo-Mikroskop wurden die Tiefe und Durchmesser der Krater vermessen. Als Durchmesser wurde dabei der maximale Durchmesser einer erkennbaren Gewebeeränderung an der Oberfläche gemessen, als Tiefe die maximal erkennbare oberflächliche Vertiefung im Schnitt. Nach Vorversuchen mit 103 mJ wurde deutlich, dass die Kratergrenzen im Schnitt

wegen sehr geringem Kontrast nur schwer zu erkennen sind. Um den Kontrast der Krater zu erhöhen, wurde die Knorpeloberfläche nach den Abtragexperimenten vor dem Schneiden mit leicht verdünnter blauer Tinte angefärbt.

Vergleichuntersuchungen zum Einsatz des Systems an der Luft

Zusätzlich zu den Untersuchungen unter Wasser wurden Vergleichuntersuchungen zum Einsatz des gleichen Lasersystems an der Luft durchgeführt.

Die Effektivität des Abtragverhaltens unter Wasser wurde mit dem Abtrag an der Luft bei einer Energie von 43 mJ exemplarisch verglichen. Mit einer Pulsanzahl von 5, 10 und 20 Pulsen wurden Löcher gebohrt sowie ihre Qualität und Tiefe unter dem Stereo-Mikroskop ausgewertet. Auf das Anfärben der Oberfläche wurde verzichtet, damit durch die Laserbehandlung eventuell entstandene Verfärbungen des Gewebes identifiziert werden konnten.

Bei der Applikation von Laserpulsen unter Wasser entsteht zu Beginn des Pulses eine Kavitationsblase, die während der Pulsdauer vor allem in Strahlrichtung anwächst. Die restliche Strahlung des Laserpulses kann dann mit geringer Schwächung durch den Wasserdampf hindurchtreten. Das Entstehen von Kavitationsblasen konnte makroskopisch in den mit dem Er:YAG-Laser durchgeführten Versuchen nicht direkt beobachtet werden. Lediglich konnte die Aufwirbelung kleiner Schwebeteilchen in der Umgebung festgestellt werden. Es wird offensichtlich beim Entstehen von Kavitationsblasen eine Strömung erzeugt, die seitlich und in Strahlausbreitungsrichtung einige Millimeter tief wirkt, mit zunehmender Tendenz bei Steigerung der Energie. Bei hohen Energien (>100 mJ am distalen Ende) war zu beobachten, dass entlang der Faser, die in das Wasser eintaucht, Wasser an der Faser entlang nach oben herausspritzt. Die Strömungs- oder Verdrängungseffekte scheinen sich also auch in rückwärtiger Richtung entlang der Faser auszubreiten. Bezüglich solcher Erscheinungen wäre zu untersuchen, wie diese von der Pulsenergie abhängen und ob ab einer gewissen Stärke möglicherweise eine Schädigung des umliegenden Gewebes bei klinischen Einsetzen eintritt.

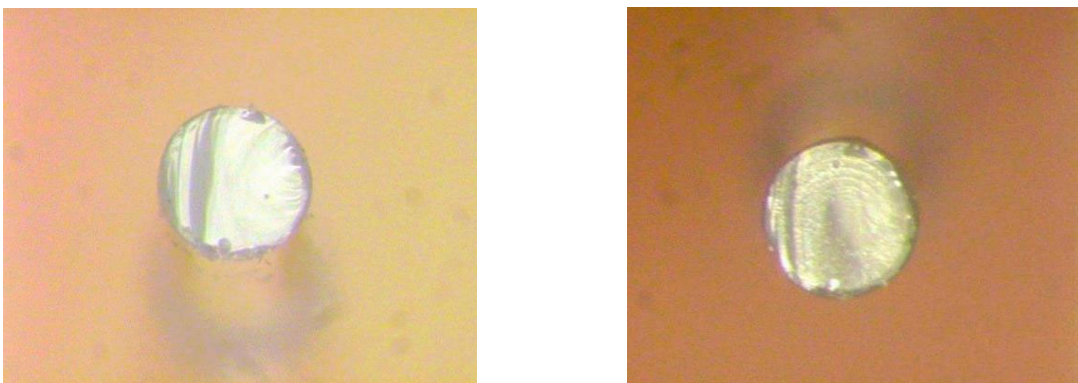


Abb. 64: Distales Faserende vor und nach dem Abtragen von Knorpel: 30 Abtragexperimente mit Pulsenergie 110 mJ, Frequenz 5 Hz, jeweils 50 Pulse, Abstand zur Gewebeoberfläche zwischen 3,5 und 8,5 mm. Links: frisch gebrochene Faser, rechts: Zeichen der Schädigung nach Durchführung der Versuche.

Die Fasern erwiesen sich als sehr stabil und wurden durch das Ausbilden von Kavitationsblasen

am Faserende nicht zerstört. Beim Abtragen von Gewebe werden die Abbrandprodukte teilweise von Flüssigkeit aufgenommen bzw. weggespült. Es kam aber auch zum Niederschlag von Abbrandpartikeln auf der Faserendfläche. Hierbei hängt es von der Menge der Abbrandprodukte ab, ob es zu einer Schädigung der Faserendfläche kommt. Die Menge der Abbrandprodukte nimmt mit steigender Pulsenergie, mit geringer werdendem Faserabstand und mit der Pulsanzahl bzw. –frequenz zu. Je mehr Abbrandprodukte entstehen, desto stärker wird der Niederschlag. Je größer der Niederschlag, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Faserendfläche durch Absorption der Strahlung in dem Niederschlag und dadurch auftretende Temperaturerhöhungen beschädigt wird. Dabei wird die Oberfläche uneben oder es brennen sich am Rand konzentrische Kreise ein (Abb. 64), was auf hohe Intensitäten im Strahlprofil zurückzuführen ist. Durch diese Veränderung kann es zur minimalen Vergrößerung des Spotdurchmessers sowie zum Entstehen von diffusen Strukturen im Strahlprofil kommen. Es konnte jedoch keine Verschlechterung des Abtragverhaltens festgestellt werden, wenn mit einer verschmutzten oder leicht beschädigten Faser gearbeitet wurde.

Die Untersuchung der Knorpeloberfläche auf Veränderungen durch Laser-Gewebe-Wechselwirkung wird dadurch erschwert, dass Knorpel strahlend weiß ist und die Knorpeloberfläche diffus reflektiert. Geringe Änderungen der Oberflächenstruktur sind mit bloßem Auge gar nicht und unter einem Mikroskop nur bei optimaler Beleuchtung mit streifendem Lichteinfall zu erkennen. Dabei zeichnet sich die Abtragstelle als Schatten ab. Die Tiefe des Abtrages lässt sich auf diese Weise nicht beurteilen.

Bestimmen des maximalen Faserabstandes zum Gewebe für unterschiedliche Energien

Bei allen Untersuchungen konnte makroskopisch sichtbarer Abtrag identifiziert werden. Unter einem Stereo-Mikroskop konnten zusätzlich Mikroveränderungen an der Oberfläche erkannt werden (Abb. 65).

Der maximale Faserabstand, bei dem eine sichtbare Veränderung auftritt, steigt mit der Pulsenergie an (Abb. 66). Dabei ist der Anstieg im Bereich von 16 mJ bis 47 mJ nicht linear sondern deutet ein Sättigungsverhalten an. Die Messung mit 110 mJ weicht aber deutlich nach oben von dieser gedachten Sättigungskurve ab. Die Messung wurde mit der als optimal bewerteten Faser durchgeführt. Die Experimente bei 47 mJ und 28 mJ wurden in dieser Reihenfolge mit einer neuen Faser und bei 16 mJ mit einer dritten Faser durchgeführt. Die Faser wurde jeweils wegen zunehmender Schädigung der Faserendfläche durch vorangegangene Experimente ausgewechselt. Möglicherweise hat bei 28 mJ und 47 mJ ein Strahlprofil mit ungleichmäßiger Intensitätsverteilung vorgelegen, welches das Ausbreiten einer Kavitationsblase oder die Intensität an der Gewebeoberfläche ungünstig beeinflusste und somit den Abstand verkürzt hat, bei dem der Abtrag einsetzte.

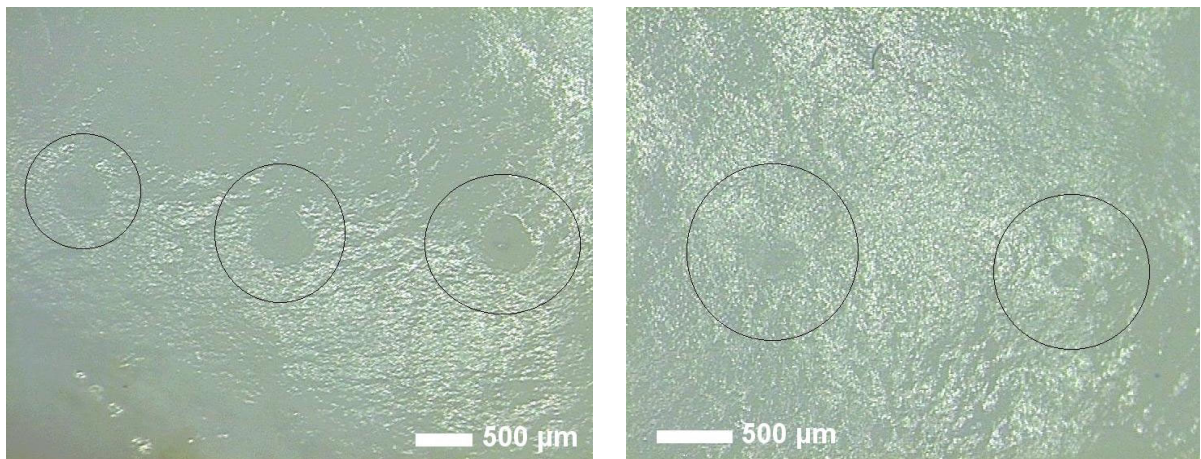


Abb. 65: Darstellung der Abtragergebnisse auf der Knorpeloberfläche mit dem Stereo-Mikroskop. Abtrag mit 16 mJ, 5 Hz, 50 Pulse, Faserabstand zur Oberfläche von links nach rechts: links: 1 mm, 0,75 mm, 0,5 mm, rechts: 1,3 mm und 1,5 mm.

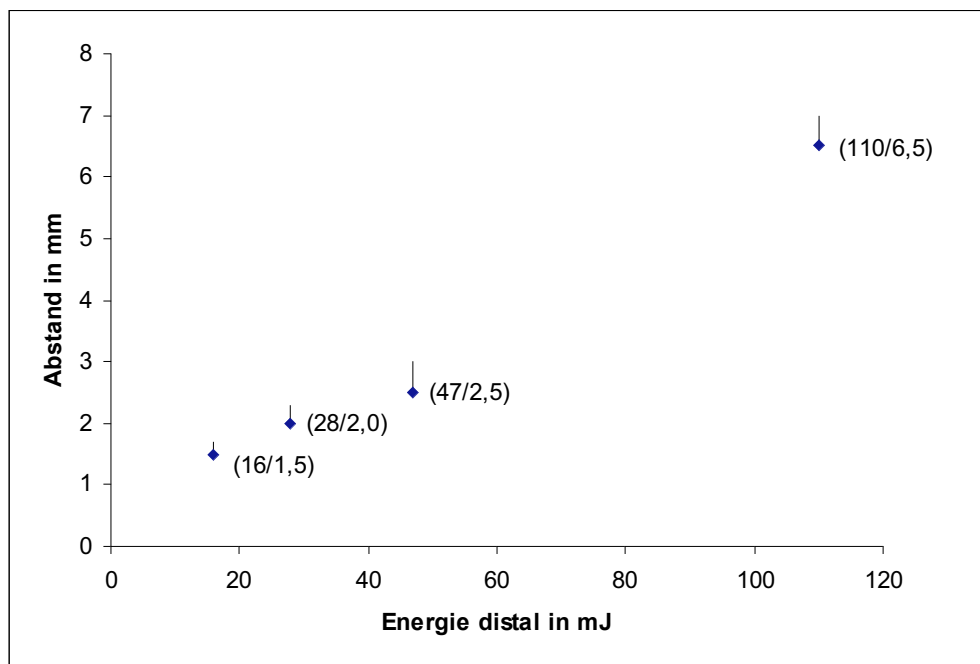


Abb. 66: Maximaler Faserabstand zur Gewebeoberfläche, bei dem noch Gewebe abgetragen wird.

Für die klinische Anwendung erscheint eine distale Energie von ca. 50 mJ ausreichend zu sein, um auch aus größerem Abstand das Knorpelgewebe abtragen zu können.

Evaluierung des Abtragverhaltens bei unterschiedlichen Energien

Bei der Bearbeitung von Gewebe mit dem Er:YAG-Laser ist zu berücksichtigen, dass die Abtrage rate nicht nur von der Energiedichte abhängig ist. Mit fortschreitendem Gewebeabtrag wächst der Faserabstand zur Gewebeoberfläche. Je größer der Faserabstand, desto mehr Energie wird zur Ausbildung einer Kavitationsblase benötigt und fehlt für das Abtragen von Gewebe. Deshalb kommt es mit zunehmender Tiefe zu einer Abnahme der Abtrage rate pro Puls.

Mit dem Skalpell ließ sich ein präziser Schnitt durch die erzeugten Löcher führen. Das weiche Knorpelgewebe ließ sich leicht trennen. Dagegen ließ sich das darunter liegende Knochengewebe, das deutlich härter war, nur mühsam trennen. Teilweise wurde ein Loch nicht genau in der Mitte sondern leicht versetzt getroffen (Abb. 67). Dadurch kam es zur Vergrößerung der statistischen Schwankungsbreite beim Bestimmen der Kratergeometrie. Durch Anfärben der Oberfläche und des Kraters mit Tinte vor dem Schneiden ließ sich die Erkennbarkeit der Kratergrenzen deutlich verbessern. Bei geringer Pulsenergie konnte der Abtrag bei einem einzelnen Puls zwar oberflächlich festgestellt werden, die Kratertiefe sowie der Durchmesser konnten im Schnitt jedoch nicht bestimmt werden. Es war deutlich zu erkennen, dass die Krater keine Röhre bilden, sondern leicht trichterförmig zulaufen.

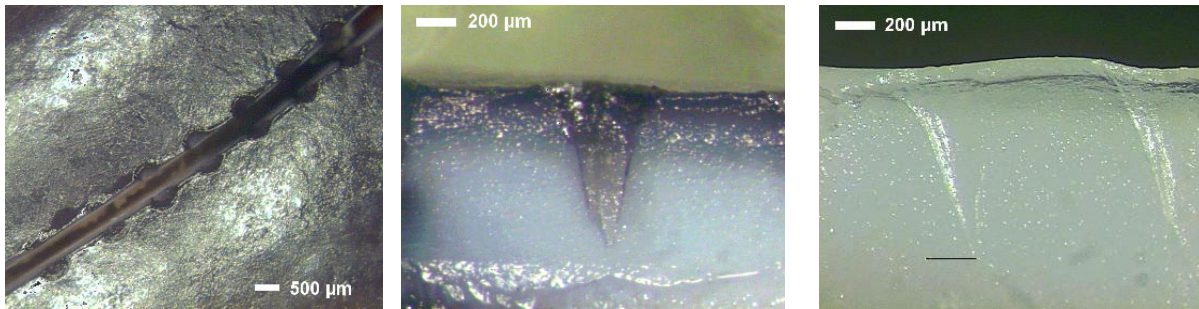


Abb. 67: Querschnitt durch einen Abtragkrater. Links: Schnitt durch die Abtragkrater bei gefärbter Oberfläche, Mitte: Schnitt bei 100 mJ (5 Pulse), Oberfläche gefärbt. Rechts: Schnitt bei 103 mJ, 10 Pulse, ohne Färbung, das Ende des Kraters ist mit schwarzem Strich markiert.

Die Auswertung der Kratertiefe zeigt, dass der Abtrag wie zu erwarten mit der Energie steigt (Abb. 68). Bei geringen Energien ist die Kratertiefe linear zur Pulsanzahl, die Abtragrate also konstant. Bei den beiden höheren Energien wird mit zunehmender Pulsanzahl und damit mit zunehmender Kratertiefe eine Sättigung erreicht. Die Sättigung tritt aber deutlich früher ein, als nach dem maximalen Faserabstand für Gewebeabtrag zu erwarten wäre. Dies ist damit zu erklären, dass die Ausbreitung der Kavitationsblase im Krater sich ab einer gewissen Tiefe anders als an der Oberfläche verhält, so dass der Abtrag schon in geringerer Tiefe endet.

Der erzielte Durchmesser des Kraters an der Oberfläche scheint im wesentlichen durch die Spotgröße bestimmt zu sein (Abb. 69). In Abb. 70 ist die Ablationsrate über der Energiedichte dargestellt, errechnet aus den Abtragergebnissen bei 5 Pulsen. Für die Berechnung der Energiedichte wurde wegen der geringen Strahldivergenz und des geringen Abstandes der Faserdurchmesser gleich dem Spotdurchmesser gesetzt.

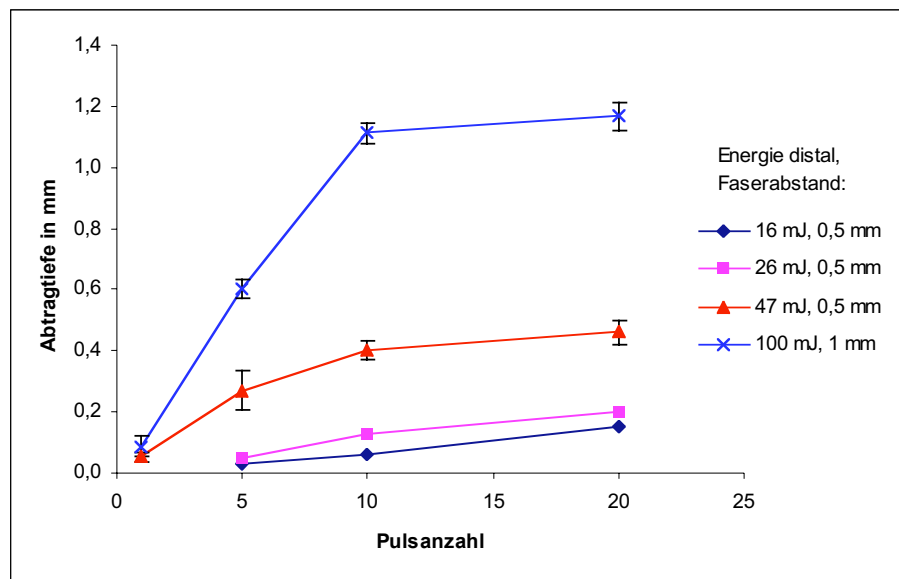


Abb. 68: Abtragtiefe für unterschiedliche Pulsenergien in Abhängigkeit von der Pulsanzahl. Die Fehlerbalken geben die max. Schwankung aus drei Versuchen und den Messfehler wieder.

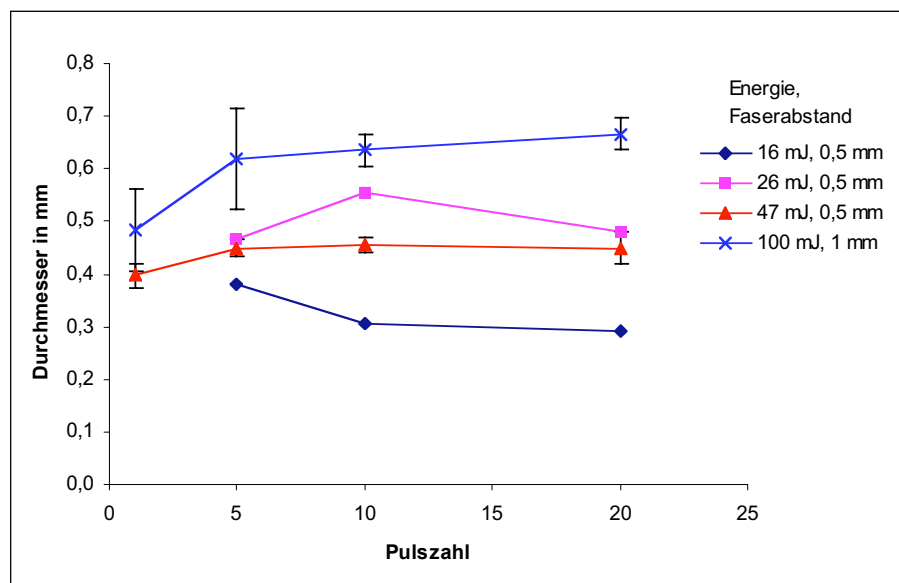


Abb. 69: Durchmesser der Ablationskrater bei unterschiedlichen Energien in Abhängigkeit von der Pulsanzahl. Die Fehlerbalken geben die maximale Schwankung aus drei Versuchen und den Messfehler wieder.

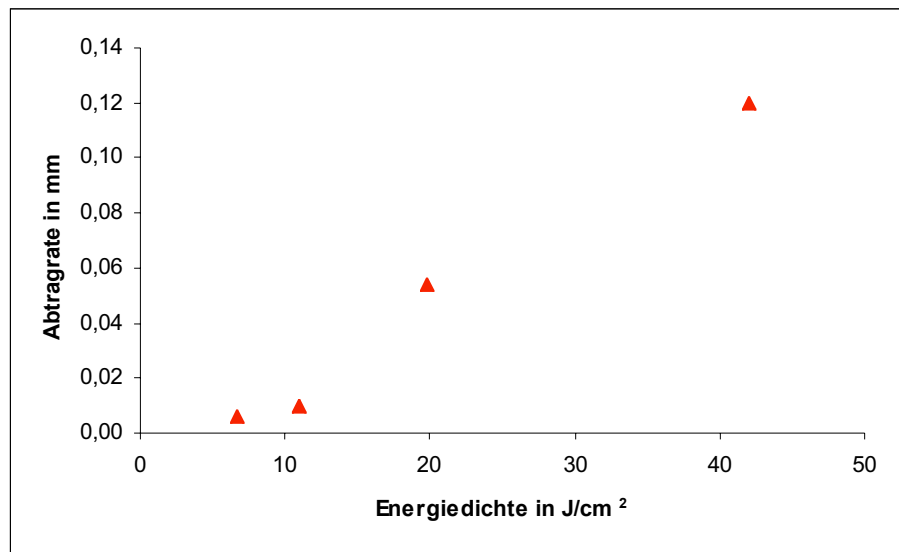


Abb. 70: Ablationsrate in Abhängigkeit von der Energiedichte.

Abtragverhalten an der Luft

Die Effektivität des Abtragverhaltens unter Wasser wurde mit dem Abtrag an der Luft bei einer Energie von 43 mJ exemplarisch verglichen. Die mit einer Pulsanzahl von 5, 10 und 20 Pulsen gebohrten Löcher wurden auf ihre Eigenschaften unter dem Stereo-Mikroskop untersucht.

Am Rand der Krater zeigt sich eine leichte bräunliche Verfärbung, die auf thermische Effekte zurückzuführen ist (Abb. 71). Die Form des Abtrages ist nicht kreisrund, vermutlich verursacht durch ein inhomogenes Abstrahlprofil der Faser. Die Krater sind in der Tiefe deutlich röhrenförmiger als beim Abtrag unter Wasser, jedoch in diesem Schnitt sehr schmal.

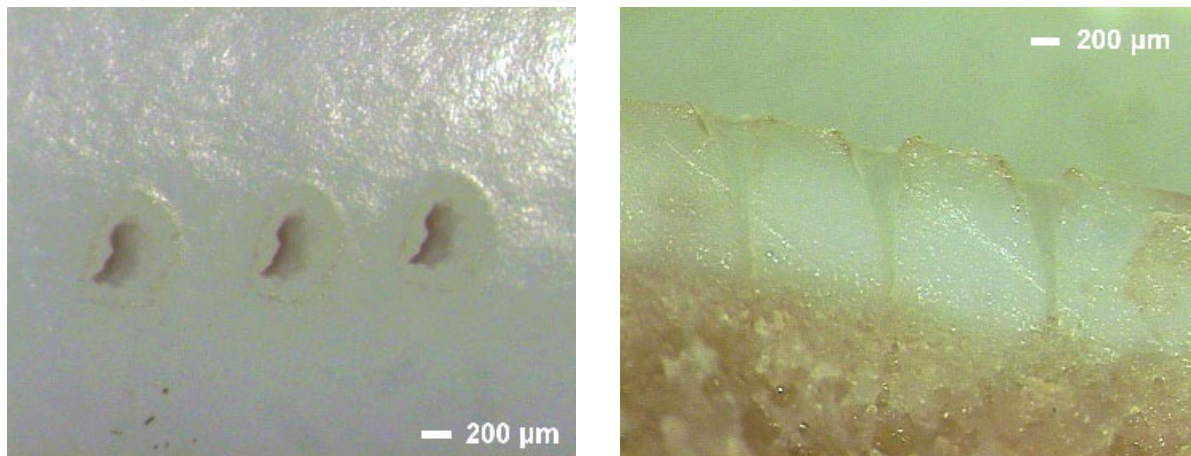


Abb. 71: Abtrag an der Luft bei Pulsenergie von 43 mJ, 3x20 Pulse, Abstand 2 mm.

Abb. 72 stellt den Vergleich zwischen Abtragtiefe an der Luft und unter Wasser in Abhängigkeit von der Pulszahl dar.

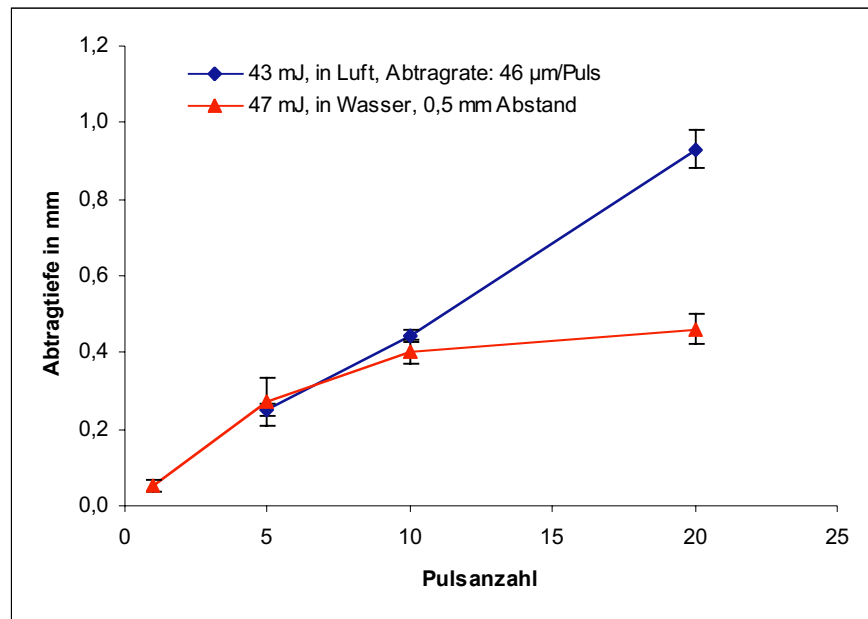


Abb. 72: Abtragtiefe an der Luft und unter Wasser bei gleicher Energie in Abhängigkeit von der Pulsanzahl. Die Fehlerbalken geben die maximale Schwankung aus drei Versuchen und den Messfehler wieder.

Die Vorgänge beim Abtragen von größerem Knorpelvolumen unter Wasser stellen sich als deutlich komplexer dar als bei den Abtragexperimenten an der Luft. Während des Abtragens unter Wasser ändern sich auf zweifache Weise die geometrischen Bedingungen, von denen das Abtragergebnis entscheidend abhängt:

1. Durch das Abtragen wird der Abstand von der Faser zur Gewebeoberfläche größer.
2. Die Kavitationsblase, die das Abtragen von Gewebe erst ermöglicht, kann sich in einem ein- oder zweidimensionalen Ablationskrater nicht mehr ungestört ausbreiten.

Beide Vorgänge führen dazu, dass der Abtrag mit zunehmender Tiefe abnimmt und von allein endet. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch die Ausbreitung der Kavitationsblase in den Krater Wasser nach oben aus dem Krater herausgedrückt wird. Dadurch kommt es zu einem zusätzlichen Kühleffekt, wodurch der Gewebeabtrag vor allem an den Seiten vermindert wird (Trichterform) und die Blase frühzeitig kollabiert.

Um in größerer Tiefe schneiden und damit das Knorpelgewebe durchtrennen zu können, sollte untersucht werden, ob in Kontakt und mittels Nachführen der Faser geschnitten werden kann, ohne die Faser zu zerstören. Das flächige Abtragen ließe sich möglicherweise durch Erhöhen des Divergenzwinkels der Abstrahlung erreichen. Es ist aber noch unbekannt, wie sich die Kavitationsblase bei divergenter Abstrahlung verhält. Für das Entfernen des „Knorpelrasens“ könnte die begrenzte Tiefenwirkung unter Wasser ausgenutzt und als ein seitliches „Abrasionen“ technisch realisiert werden.

Die Fasern verschmutzen zwar durch Niederschlag von Abbrandprodukten, das Abtragverhalten wird dadurch jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Es kommt auch bei Dauerbelastung am distalen Ende zu keiner mechanischen Zerstörung der Faser. Bei optimaler Faserpräparation und Einkopplung sollte es möglich sein, mit höheren Frequenzen zu arbeiten und so die

Abtraggeschwindigkeit zu erhöhen. Dank der geringen Dämpfung und der Belastbarkeit des verwendeten Fasermaterials bei hohen Pulsenergien wäre es vorstellbar, Fasern von 10 cm Länge mit einer Transmission von ca. 27 % zu verwenden. Damit könnte eine Kopplung von einer Übertragungsfaser in die Quarzfaser in ausreichendem Abstand zum distalen Ende erfolgen. Auf diese Weise ließe sich ein einfaches Austauschen und Verwenden verschiedener Applikatorspitzen während der Behandlung realisieren.

Bemerkenswert ist, dass mit dem verwendeten experimentellen Fasersystem unter Wasser vergleichbare Abtragraten erzielt werden konnten wie an der Luft. Bei Pulsfrequenzen um 10 Hz könnte bei optimalen Bedingungen bezüglich Faserpräparation und Abstrahlprofil in wenigen Sekunden ein sauberer Schnitt durch Knorpelgewebe durchgeführt werden. Damit würde das Laserschneiden konkurrenzfähig zur konventionellen Technik. Über den flächigen Abtrag kann noch keine Aussage getroffen werden, seitliches „Abrasierer“ von Knorpelrasen sollte aber durch eine entsprechende Applikatorlösung möglich sein.

Die Untersuchungen zur prinzipiellen Anwendbarkeit der Knorpelbearbeitung mittels fasertransmittierter Er:YAG-Laserstrahlung unter Wasser sind ermutigend. Es lässt sich Knorpelgewebe in vernünftigen Raten, die mit den Abtragraten mittels lasergestützter Knorpelbearbeitung an der Luft vergleichbar sind, abtragen. Die Bedingungen unter Wasser sind jedoch deutlich komplexer, da zuerst ein Kanal in Form einer Kavitationsblase geschaffen werden muss, bevor die Strahlung auf das Gewebe trifft. Das erfolgreiche Ausbilden einer solchen Kavitationsblase und damit das Abtragergebnis hängt von verschiedenen Bedingungen ab. Um optimale Applikatorlösungen für die klinische Einsätze zu entwickeln, wären weitere weitreichende Untersuchungen notwendig.

Die Präparation der Faserendflächen kurzer Glasfaserstücke stellte sich als schwierig heraus, die Qualität der Faserpräparation genügte jedoch den Anforderungen dieser grundlegenden Untersuchungen. Die Einkopplung der Strahlung von dem verwendeten Fokussierhandstück in die Glasfaser war unproblematisch, jedoch noch verbesserungsbedürftig, da die NA des Handstückes kleiner war als die der Faser und der Fokusedurchmesser etwa dem Faserdurchmesser entsprach. Es wurde offensichtlich nicht 100 % des Strahlprofils in die Faser eingekoppelt, da bei hohen Frequenzen in Zusammenhang mit hohen Energien der Fasermantel geschädigt wurde. Dies beeinflusste aber das Arbeiten mit der Faser nicht wesentlich. Auch bei hohen Energien (über 1000 mJ) konnte keine Schädigung des Faserkerns festgestellt werden.

Die Fasern zeigten eine sehr gute Haltbarkeit während der Abtragexperimente. Nach einigen abtragenden Pulsen war eine Verschmutzung der Faserendfläche durch Abbrandprodukte zu erkennen. Die Verschmutzung führte aber zu keiner wesentlichen Änderung des Abtragverhaltens und auch zu keiner Zerstörung an der Faser durch thermische Effekte. Hier scheint Wasser als Umgebungsmedium einen deutlichen Vorteil zu bringen.

Es konnte gezeigt werden, dass z. B. bei einer Energiedichte von ca. 20 J/cm² (Pulsenergie 50 mJ) unter Wasser bis zu einem Abstand von 3 mm Gewebe abgetragen und eine Abtragate von bis zu 50 µm pro Puls erzielt werden kann.

6.2 In-vivo-Untersuchungen der Lasersysteme am Knorpelgewebe

6.2.1 Synoviale Reaktionen nach konventioneller und laserchirurgischer Knorpeloperation an Schweinegelenken

Im Rahmen eines DFG-Projektes (Gr 991/1-1) ist eine umfangreiche in vitro und in vivo Studie zur arthroskopischen Anwendung von fünf verschiedenen Lasersystemen am Kniegelenk von Schweinen der Deutschen Landrasse durchgeführt worden. Während die pathologisch-anatomische und histopathologische Auswertung mit Schwerpunkt auf dem behandelten Gelenkknorpel von anderen Arbeitsgruppen erfolgte [Dorn 1994, Grothues-Spork 1994], konzentrierten sich die vorliegenden histopathologischen Untersuchungen auf die Synovialmembran der in den Versuch einbezogenen Schweinekniefelenke.

Untersuchungsgegenstand ist die Synovialmembran von Kniegelenken weiblicher Schweine der Deutschen Landrasse. Zur Verfügung standen von 36 im Rahmen des Forschungsprojektes arthroskopisch behandelten Schweinen je eine Gewebeprobe aus beiden Kniegelenken sowie von neun Schweinen mit unbehandelten Kniegelenken je eine Gewebeprobe, die als Kontrolle fungierten. Die neun Kontrollproben wurden im Zuge des Zerlegungsprozesses von neun Schlachtschweinen, der Rasse Deutsche Landschweine mit einem Lebendgewicht von ca. 100 bis 120 kg gewonnen. Die Kniegelenke dieser Tiere waren makroskopisch unauffällig und wiesen pathologisch-anatomisch unauffällige Gelenkflächen im Femorotibialgelenk und im Femoropatellargelenk sowie geringe Mengen klarer, leicht gelblicher Synovia auf. Insgesamt lagen 81 Gewebeproben vor. Alle Gewebeproben wurden in der Fossa intercondylaris cranial der Kreuzbänder entnommen. Dieser Abschnitt der Synovialmembran war geschützt vor der operationstechnisch bedingten Traumatisierung infolge des Einbringens der arthroskopischen Instrumente und eventuell technisch bedingter Teilsynovektomie der vorderen Gelenkanteile.

Während der arthroskopischen Knieoperationen an Deutschen Landschweinen kamen ein Excimer-Laser, ein Ho:YAG-Laser, zwei Nd:YAG-Laser (1064 nm und 1440 nm) sowie ein CO₂-Laser zum Einsatz. Als Vergleich dienten Operationen, die mit konventioneller Technik ausgeführt wurden.

In Vorversuchen an humanen Operationspräparaten wurde nachgewiesen, dass Knorpel und Gelenkschleimhaut vom Schwein identische Lichtabsorptionseigenschaften wie das humane Gewebe aufweisen.

Mit den verschiedenen Operationstechniken wurde versucht, immer das gleiche, folgendermaßen definierte Operationsergebnis zu erzielen:

1. Im Bereich des medialen Femurkondylus eine oberflächliche Knorpelabtragung: rund, im Durchmesser ca. 5 mm groß, deutlich unter dem Oberflächenniveau des unbehandelten Knorpels liegend, subchondraler Knochen nicht sichtbar.
2. Im Bereich des medialen Femurkondylus eine tiefe Knorpelabrasion: rund, im Durchmesser ca. 5 mm groß, subchondraler Knochen sichtbar.

Die Beurteilung des Operationsergebnisses erfolgte während des Eingriffes durch den Operateur.

Die arthroskopische Operation mit konventioneller Operationstechnik wurde nach Narkoseeinleitung, Rasieren, Desinfektion und sterilem Abdecken durchgeführt. Der Trokar mit Optik, Spülung und Absaugung wurde durch einen inferolateralen Zugang, nach Stichinzision

der Kutis und Subkutis, stumpf in das Gelenk eingeführt. Nach Insufflation des Gelenkes mit 0,9%iger NaCl-Lösung erfolgte die Darstellung der intraartikulären Strukturen. Anschließend wurde unter arthroskopischer Kontrolle nach Stichinzision der Arbeitszugang mit dem stumpfen Mandrin gebahnt.

In einigen Fällen wurde die Darstellung des Gelenkes durch synoviales Gewebe beeinträchtigt. In diesen Fällen wurde eine Teilsynovektomie der vorderen Gelenkanteile mit dem Incisor (Fa. Dyonics) durchgeführt. Dies ist beim Menschen ein übliches Verfahren zur Verbesserung der arthroskopischen Sicht, ohne nachweisbaren negativen Einfluss auf Operations- und Heilungsprozesse [Kelly 1990]. Nach der Operation wurde das Gelenk intensiv mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Die Arbeitszugänge wurden mit Einzelstichknopfnähten aus resorbierbarem Material verschlossen und die Hautwunden mit Pflastersprayverband abgedeckt. Als postoperative Versorgung wurde Benzylpenicillinbenzathin 10.000 I.E./kg KG, Benzylpenicillinprocain 2.500 I.E./kg KG, Dihydrostreptomycin 12,5 mg/kg KG (Tardomyocel[®]) und Metamizol 50 mg/kg KG (Novalgine[®]) verabreicht.

Die Operationen mittels Laser erfolgten bis auf die eigentliche Knorpelbearbeitung analog zur konventionellen Methode. Sie wurden mit Ausnahme des CO₂-Lasers in flüssigem Milieu durchgeführt. Zur oberflächlichen Knorpelbearbeitung wurden bei gepulsten Lasersystemen Einzelpulse nebeneinander gesetzt, während bei cw-Systemen getaktet gelasert wurde. Die Knorpelabrasion wurde in gleicher Weise durchgeführt, jedoch wurde auf einer Stelle solange gelasert, bis der subchondrale Knochen frei lag. Hierbei wurde die Laserenergie im Kontaktverfahren appliziert, d. h. die Lichtleiterspitze berührte das zu bestrahlende Gewebe. Zum Einsatz des CO₂-Lasers wurde das Kniegelenk vor dem Einbringen der Hohlleiter drainiert und mit CO₂-Gas insuffliert. Zum Abschluss der Operation wurde das Gelenk wieder mit Spülflüssigkeit (0,9%ige NaCl-Lösung) gefüllt und intensiv gespült.

Die im Rahmen der Versuche eingesetzten Lasersysteme und ihre Anwendungsparameter sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Laserparameter für die Bestrahlungsversuche am Schweineknorpel in vivo

Pos.	Laser	Wellenlänge	Betriebsart	Leistung bzw. Pulsenergie	Frequenz	Lichttransmissionssystem
1.	Excimer-Laser (MAX 10/ Technolas)	308 nm	gepulst, Pulslänge 60 ns	20-35 mJ	10 Hz	1. Bündelfaser 2. 1250 μm -Faser, gespült
2.	Ho:YAG-Laser (Laborlaser)	2100 nm	gepulst, Pulslänge 450 ns	850 mJ	4 Hz	1. Bündelfaser 2. 1250 μm -Faser, gespült
3.	Nd:YAG-Laser (Opmilas 144/ Carl Zeiss)	1440 nm	gepulst, Pulslänge 650 ns	1 J	5 HZ	600 μm -Faser
4.	CO ₂ -Laser (LS 500/ Heraeus)	10600 nm	getaktet	5 W	Taktlänge: 0,25 s	gasgespülte Arthroguide-Applikatoren
5.	Nd:YAG Laser (Medilas 4060/ MBB)	1064 nm	cw	20 W		600 μm -Faser

Die Operationen wurden in den zentralen Tierversuchslaboratorien der Freien Universität Berlin unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mit jeder der sechs untersuchten Operationstechniken (konventionell, Excimer-Laser, Ho:YAG-Laser, 1064 nm- und 1440 nm-Nd:YAG-Laser sowie CO₂-Laser) wurden 12 Kniegelenke operiert. Bei jeder Operationstechnik wurden je drei Kniegelenke direkt postoperativ, zwei Wochen postoperativ, sechs Wochen postoperativ und 12 Wochen postoperativ untersucht. Um die Anzahl der Versuchstiere zu senken, wurden die Schweine konsekutiv an beiden Hinterextremitäten operiert. Hierfür wurden die Tiere in zwei Gruppen geteilt. Die Tiere der ersten Gruppe wurden 14 Tage nach der ersten Operation an der Gegenseite operiert und direkt postoperativ getötet. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden 6 Wochen nach der ersten Operation an der Gegenseite operiert, aber erst nach weiteren 6 Wochen getötet. Insgesamt wurden 36 Tiere operiert. Nach Tötung der Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital (60 mg/kg KG) wurden die operierten Hinterläufe abgesetzt, sorgfältig sezziert und die Gelenke dargestellt.

Die entnommenen Gewebeproben wurden im neutral gepufferten 4%-igem Formol für ca. 24 Stunden fixiert und über Nacht in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%) bis zum Xylol entwässert. Bei der anschließenden Einbettung in Weichparaffin mit einem Schmelzpunkt bei 53°C wurde angestrebt, eine zur Oberfläche der Synovialmembran senkrecht verlaufende Schnittebene zu ermöglichen. Auf einem Tetrander der Firma Jung/Heidelberg, wurden Paraffinschnitte einer Dicke von 4-6 μm hergestellt. Diese wurden im Wasserbad gestreckt und nach dem Aufziehen auf Objektträger 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Von jeder Gewebeprobe wurden je zwei Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt sowie mit einer Kombination aus Silberimprägnierung von Retikulinfasern nach Gomorri und Kollagenfärbung nach van Gieson. Zur Differenzierung von Kollagen und Fibrin diente die van

Gieson-Färbung. Zum selektiven Nachweis von Mastzellen wurde die Unna-Färbung eingesetzt. Hämosiderin wurde mittels Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen. Alle Präparate wurden in drei Schritten ausgewertet. Histomorphologisch wurde jedes Präparat zum einen im Überblick ausgewertet, und zum anderen erfolgte eine gesonderte Befundung seiner synovialen Intima.

Jedes Präparat wurde an einem Durchlichtmikroskop (SM-Lux/ Leitz) bei Vergrößerungen 40-, 100- und 400fach untersucht.

Die in diesem Falle angewandte Untersuchungsmethodik sollte einen Vergleich der verschiedenen Präparate aus unterschiedlichen Blickwinkeln, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der eingesetzten Operationsmethode, ermöglichen. Das Prinzip der Untersuchung beruht deshalb auf der Beurteilung der verschiedenen Präparate nach einem einheitlichen Schema, das schwerpunktmäßig die synoviale Auskleidung der untersuchten Kniegelenke erfasst. Dies wiederum machte es erforderlich, dass diejenigen Präparate aufgeführt wurden, in denen sich trotz unterschiedlicher Schnittführung kein erkennbarer Abschluss gegen das Gelenklumen feststellen ließ. Ebenso wurden Präparate, die nur eine geringe Menge Synovialmembran enthielten, aufgeführt. Die Befundung einer stark veränderten synovialen Intima, wie sie bei fibrinöser Synovialitis in Verbindung mit Massennekrosen oder Granulationsgewebe gefunden wird, könnte zu einer Verzerrung der bezüglich der synovialen Intima und der Synovialozyten erhobenen Befunde führen. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden Präparate, die ausschließlich stark veränderte Synovialmembran aufwiesen, ebenfalls gesondert aufgeführt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich synoviale Intima auf adipösem und fibrösem subsynovialem Bindegewebe aufgrund des geringen Anteils an „entzündungsfähigem“ Bindegewebe auf Einflüsse jeglicher Art abweichend von der synovialen Intima auf areolärem subsynovialem Bindegewebe verhält, wurden erhebliche Anteile an synovialer Intima dieser Typen aufgeführt.

Makroskopische Auswertung

Die makroskopische Beurteilung der Gelenke erfolgte nach den Kriterien, die in Tabelle 7 dargestellt wurden. Die Ergebnisse der postoperativen Beurteilung stellt Tabelle 8 dar.

Tabelle 7: Beurteilungskriterien für die behandelten Kniegelenke

Parameter	Befund	§
Gelenkerguss	kein Gelenkerguss (geringe Menge Synovia)	0
	geringer Gelenkerguss (Synovia vermehrt)	1
	mäßiger Gelenkerguss (Synovia deutlich vermehrt)	2
Rotfärbung der Synovia	klare Synovia	0
	rötliche Synovia	1
Synovialmembran	unauffällig	0
	hypertroph	1
	leicht entzündet	2
	ausgeprägt entzündet	3
Karbonisate in der Synovialmembran	keine vorhanden	0
	vorhanden	1
Rand des Knorpeldefektes	glatt	0
	abgerundet	1
	Defekt nicht abgrenzbar	2
	nicht auszumachen, bei unauffälligem Operationsgebiet	3
Tiefe des Knorpeldefektes	kein Niveauunterschied	0
	kaum unter Oberflächenniveau	1
	deutlich unter Oberflächenniveau aber nicht bis in den subchondralen Knochen reichend	2
	bis in den subchondralen Knochen reichend	3
	tief in den subchondralen Knochen reichend	4
Vorkommen von Fibrin, Bindegewebe und Ersatzknorpel im Knorpeldefekt	kein Vorkommen	0
	nur in der Tiefe	1
	deutliche Auffüllung	2
Karbonisat am Knorpeldefekt	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
Beschaffenheit der umliegenden Knorpeloberfläche	unverändert	0
	leicht verändert	1
	deutlich verändert	2
	stark verändert	3
	Knorpelveränderungen weit von behandeltem Bereich entfernt	4

Tabelle 8: Makroskopische Beurteilung der postoperativen Präparate

Operationsmethode	Wochen post op.						Knorpelabrasion						Knorpelglättung						
		Gelenkerguß	Rötliche Synovia	Synovialmembran	Karbonisate in SM	Rand	Tiefe	Fibrin	Bindegewebe	Ersatzknorpel	Karbonisat	Umgebung	Rand	Tiefe	Fibrin	Bindegewebe	Ersatzknorpel	Karbonisat	Umgebung
Konventionell	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	2	0/1	0	1	0	1	3	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
	12	0	0	0	0	3	2	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	0	2
Excimer-Laser	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	2	0/2	0/1	0/2	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	6	0	0	3	0	2	2	0	0	1	0	3/4	3	3	0	0	1	0	3/4
	12	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	2/4	1	3	0	0	0	0	2/4
Ho:YAG-Laser	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	
	2	2	0	2	0	1	3	1	0	0	0	1	1	3	0	0	0	1	1
	6	1	0	0	0	1	3	0	2	1	0	1	1	3	0	0	0	0	1
	12	0	0	0/1	0	0	2	0	0	2	0	2	2	3	0	0	0	0	2
Nd:YAG-Laser 1440 nm	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	1
	2	2	0	2	0	1	3	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1
	6	0	0	0	0	1	3	0	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1
	12	0	0	0	0	1	3	0	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1
CO ₂ -Laser	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	1	0
	2	2	0	2	0/1	1	3	2	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	2
	6	1	0/1	3	0/1	1	2	0	2	0	1	1	1	2	0	2	0	1	1
	12	0	0	0	0/1	3	2	0	2	0	1	1	3	2	0	2	0	1	1
Nd:YAG-Laser 1064 nm	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1
	2	2	1	3	0	1	3	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	1	2
	6	2	1	3	0	1	3	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1
	12	2	1	2	0	1	3	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1

Histomorphologische Auswertung der synovialen Intima

Dicke der synovialen Intima

Die synoviale Intima der untersuchten Ausschnitte wies zumeist ein bis drei Lagen Synovialozyten auf. Mehr als drei Zellagen fanden sich bei einem Kontrolltier. Demgegenüber wurde bei 20 der arthroskopierten Tiere 2 und 6 Wochen postoperativ eine synoviale Intima mit mehr als drei Zellagen gefunden. Ausschließlich nach Laserbehandlung fanden sich Präparate, die eine synoviale Intima ohne intakte Synovialozyten aufwiesen. Diese Veränderungen, die überwiegend 2 Wochen postoperativ aufgetreten sind, konnten dem 1440 nm-Nd:YAG-, dem Ho:YAG- und dem CO₂-Laser zugeordnet werden.

Anordnung der Synovialozyten

Die Synovialozyten waren fast ausschließlich in Schichten angeordnet. Lediglich zwei Präparate ließen eine Anordnung in Reihen erkennen. Einzelne Ausschnitte mit fehlender Ordnung der Synovialozyten wurden bei einem Kontrolltier und bei neun behandelten Tieren beobachtet. Mehrere Abschnitte mit fehlender Ordnung der Synovialozyten fanden sich nach konventioneller Behandlung unmittelbar postoperativ, nach Behandlung mit dem Excimer-, dem 1064 nm-Nd:YAG- und dem CO₂-Laser 2 und 6 Wochen, nach Behandlung mit dem Ho:YAG-Laser unmittelbar und 2 Wochen postoperativ sowie nach Behandlung mit dem 1440 nm-Nd:YAG-Laser unmittelbar und 6 Wochen postoperativ. Nach Einsatz des CO₂-Lasers fanden sich die meisten Präparate, bei denen in mehreren Ausschnitten eine Ordnung der Synovialozyten fehlte.

Form der Synovialozyten

Bei den Kontrollen zeigte die überwiegende Zahl der untersuchten Ausschnitte Synovialozyten mit überwiegend kubischer Form. Es konnten jedoch auch alle anderen Formvarianten mit Ausnahme der hochzylindrischen beobachtet werden. Nach Behandlung mit dem 1064 nm-Nd:YAG-Laser waren die Synovialozyten fast ausschließlich kubisch. Deutlich vielfältiger geformt als in den Kontrollen waren die Synovialozyten in der 2. und 6. Woche nach konventioneller Behandlung und nach Behandlung mit dem CO₂-Laser. Ähnliche Veränderungen traten nach Einsatz des Excimer-Lasers unmittelbar und in der 6. postoperativen Woche, nach Behandlung mit dem Ho:YAG-Laser unmittelbar und nach Einsatz des 1440 nm-Nd:YAG-Lasers in der 2. postoperativen Woche auf.

Struktur der synovialen Intima

Bei den Kontrolltieren zeigte sich die synoviale Intima fast ausschließlich kontinuierlich mit zumeist locker gepackten Synovialozyten. Eine dichte Packung der Synovialozyten wurde in dieser Gruppe ebenso häufig gesehen wie eine synoviale Intima mit lückenhaftem Synovialozytenbesatz. Bei behandelten Tieren war der Synovialozytenbesatz der synovialen Intima häufig verringert. Bei arthroskopierten Gelenken wurde überwiegend ein lückenhafter bis sehr lückenhafter Synovialozytenbesatz gesehen. Nach konventioneller Behandlung und nach der Behandlung mit dem Excimer-Laser wurde nur selten eine stärkere Beeinträchtigung der synovialen Intima beobachtet. Ein völliger Verlust der synovialen Intima wurde nur bei laserbehandelten Tieren und fast ausschließlich 2 Wochen postoperativ befundet.

Bei den mit dem Ho:YAG-Laser, dem CO₂-Laser und dem 1064 nm-Nd:YAG-Laser behandelten Tieren waren die strukturellen Veränderungen der synovialen Intima 2 Wochen postoperativ am stärksten ausgeprägt. Diese Veränderungen nahmen 6 Wochen postoperativ ab, um sich nach 12 Wochen auf einen sehr lückenhaften Synovialozytenbesatz zu beschränken. Lediglich beim 1440 nm-Nd:YAG-Laser fanden sich 12 Wochen postoperativ immer noch über diesen Befund hinausreichende Veränderungen der synovialen Intima.

Grenze zum Gelenklumen

Die Grenze zum Gelenklumen war bei den Kontrolltieren und bei allen behandelten Tieren sehr unterschiedlich zu erkennen. Präparate von behandelten Tieren wiesen zumeist einen undeutlichen Abschluss der synovialen Intima gegen das Gelenklumen auf.

Fibrinöse Membran

Eine fibrinöse Membran wurde nur bei arthroskopierten Tieren gesehen. Nach konventioneller Behandlung trat dieser Befund nur bei zwei Präparaten auf. Nach Behandlung mit dem Excimer-Laser wurden einzelne Ausschnitte mit einer fibrinösen Membran unmittelbar postoperativ sowie nach 6 und 12 Wochen gesehen. Nach dem Einsatz des Ho:YAG-Lasers zeigte sich dieser Befund bis 6 Wochen postoperativ, während er nach Einsatz des 1440 nm-Nd:YAG-Lasers bis zur 12. Woche mit deutlichen Anteilen auftrat. Nach Behandlung mit dem CO₂-Laser fand sich 2 Wochen postoperativ ein erheblicher Anteil an synovialer Intima mit einer fibrinösen Membran. Nach Behandlung mit dem 1064 nm-Nd:YAG-Laser war dies bis 2 Wochen postoperativ feststellbar.

Phagozytoseerscheinungen

Phagozytoseerscheinungen wurden bei den Kontrollen und den Präparaten nur sporadisch beobachtet. Bei keinem der arthroskopierten Gelenke wurde die Phagozytose in der 2. postoperativen Woche festgestellt.

Chromatin der Synovialozytenkerne

Das Chromatin der Synovialozyten war bei den Kontrolltieren teils dicht, teils gelockert, wobei dichtes Chromatin vorherrschte. Nach konventioneller Behandlung erhöhte sich der Anteil von Synovialozyten mit aufgelockertem Chromatin deutlich ab der 2. postoperativen Woche. Die gleichen Befunde traten nach Behandlung mit dem Excimer-Laser und dem Ho:YAG-Laser auf. Nach Einsatz des 1440 nm-Nd:YAG-Lasers fand sich in allen Überlebenszeiten mit Ausnahme der 6. postoperativen Woche ein deutlich erhöhter Anteil an aufgelockertem Chromatin. Nach Behandlung mit dem CO₂-Laser fand sich erst ab der 6. postoperativen Woche ein nennenswerter Anteil an Synovialozyten mit aufgelockertem Chromatin, während nach Einsatz des 1064 nm-Nd:YAG-Lasers ein erhöhter Anteil an Synovialozyten mit aufgelockertem Chromatin in allen Überlebenszeiträumen festgestellt wurde.

Färbung des Zellplasmas der Synovialozyten

Das Zellplasma der Synovialozyten war bei den Kontrolltieren überwiegend gleichmäßig gefärbt. Bei konventionell behandelten Schweinen trat nur 2 Wochen postoperativ ein erwähnenswerter Anteil von Synovialozyten mit unregelmäßig gefärbtem Plasma auf. Nach Laserbehandlung zeigte sich in allen Überlebenszeiten ein erhöhter Anteil an Synovialozyten mit unregelmäßig gefärbtem Zytoplasma. Nach dem Einsatz von Excimer-Laser und Ho:YAG-Laser blieb deren Anteil bis 12 Wochen postoperativ nahezu unverändert erhöht. Im Anschluss an die Behandlung mit den beiden Nd:YAG-Lasern war 2 Wochen postoperativ der Anteil unregelmäßig gefärbter Synovialozyten am größten, verringerte sich bis 12 Wochen postoperativ deutlich, wobei er jedoch nicht auf die Werte der Kontrollgruppe zurückging. Nach der Behandlung mit dem CO₂-Laser zeigte sich in der 6. postoperativen Woche ein Maximum der unregelmäßig gefärbten Synovialozyten.

Lage der Synovialozytenkerne

Die Zellkerne lagen in den Synovialozyten der Kontrolltiere überwiegend zentral, gelegentlich basal und nur selten apikal. Nach arthroskopischen Eingriffen fanden sich die Zellkerne der Synovialozyten überwiegend basal. Eine apikale Lage wurde selten beobachtet. In der 12. postoperativen Woche war die basale Lage der Zellkerne sehr deutlich ausgeprägt. Lediglich die mit dem Excimer-Laser behandelten Tiere wiesen bereits 6 Wochen postoperativ eine ausgeprägte basale Anordnung der Zellkerne in den Synovialozyten auf. 12 Wochen postoperativ zeigten die Präparate Synovialozytenkerne in mehr zentraler Lage.

Die unbehandelte Synovialmembran beim Schwein

Uruchurtu und Barthel haben den gleichen Aufbau der Gelenkkapsel in allen untersuchten Schweinegelenken festgestellt [Uruchurtu 1971, Barthel 1972]. Vergleicht man die Beobachtungen dieser Autoren mit den Beschreibungen der Gelenkkapsel beim Menschen kann davon ausgegangen werden, dass die Synovialmembran bei Schwein und Mensch den gleichen histologischen Aufbau aufweist und aus den gleichen histologisch erfassbaren Gewebestrukturen gebildet wird [Ghadially 1983]. In der Synovialmembran des Untersuchungsgebietes finden sich neben vorherrschenden areolären auch adipöse oder fibröse Anteile in direkter Nachbarschaft. Die in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Dicke der synovialen Intima von ein bis drei Synovialozyten entspricht den Beobachtungen anderer Autoren [Horký 1991]. Eine Anordnung der Synovialozyten in Reihen oder Stufen wird nur vereinzelt gesehen. Die Synovialozyten sind fast ausschließlich in Schichten angeordnet und haben überwiegend kubische Form. In den meisten Berichten werden die Synovialozyten, im Gegensatz zu der vorliegenden Vielfalt, als relativ einheitlich in Form und Größe beschrieben. Der dichte bis lückenhafte Synovialozytenbesatz der synovialen Intima, bei dem selten Freiräume von mehr als einem Synovialozytendurchmesser gesehen werden, findet keine Erwähnung in der Literatur. Die Beobachtung, dass die Grenze zum Gelenklumen zumeist scharf ist, sich dabei oft ausgefranst oder aufgefasert zeigt, lässt sich aus dem besonderen Aufbau der synovialen Intima erklären, die als dünne Lage von Fasergewebe, in das Synovialozyten eingelagert sind, beschrieben wurde. Im Gegensatz zu Epithelien wird die Oberfläche nicht von scharf konturierten Zellen gebildet, sondern von Fasern, die im histologischen Schnitt als Fransen gesehen werden. Auf das gleichmäßig gefärbte Zytoplasma der Synovialozyten und deren überwiegend zentral und basal liegenden Kerne wird in der Literatur nicht eingegangen. Das Vorkommen von Mastzellen, das von Uruchurtu mit etwa drei bis vier je 12 mm^2 eines histologischen Schnittes angegeben wird [Uruchurtu 1971], kann im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Es finden sich je Präparat drei bis zehn Mastzellen, was daraus resultiert, dass die vorliegenden histologischen Präparate bis zum Dreifachen der Fläche aufweisen.

Ebenfalls bestätigt wird das Vorkommen von versilberbaren Fasern in der synovialen Intima. Diese Fasern treten lumennah auf, scheinen jedoch nicht die Grenze zum Gelenklumen zu bilden. Die Frage, inwieweit das Auftreten von Leukozyten in der Synovialmembran bei Schweinen dieses Alters als physiologisch oder als pathologisch beurteilt werden muss, bleibt weiterhin ungewiss. Kleine Gruppen von Lymphozyten in der Synovialmembran klinisch gesunder Schweine im Alter von 120 und 180 Tagen. Bei jüngeren Tieren wurden keine Lymphozyten gefunden [Uruchurtu 1971]. Bei diesen handelte es sich zum Teil um gnotobiotische und zum Teil um klinisch gesunde Schweine. Barthel beurteilt das Auftreten von Lymphozyten prinzipiell als pathologisch [Barthel 1972]. Nach anderen Autoren stellt die Synovialmembran aufgrund ihrer besonderen hämostatischen Bedingungen in den Schlingenkapillaren eine Prädilektionstelle zur mikrobiellen Metastase dar [Schulz 1991]. Durch Übertritt von Erregern in das avaskuläre Knorpelgewebe und infolge einer fehlenden Fähigkeit dieses Knorpelgewebes, die Erreger zu eliminieren, besteht eine erhöhte Neigung zur Persistenz der Erreger. Dieser Umstand kann zur Ausbildung und Unterhaltung einer Synovialitis führen. Die bei den meisten Kontrolltieren gesehene leichte Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen ist folglich bei Schweinen aus konventioneller Haltung und dem hierdurch bedingten unklaren Infektionsstatus mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein bakterielles

Infektionsgeschehen zurückzuführen. Ob dieser Befund für die Diagnose einer Arthritis resp. Synovialitis ausreichend ist, bleibt fraglich. Ebenso verhält es sich mit der bei den meisten Kontrollen gesehenen deutlichen bis überwiegenden Zotten- und Faltenbildung der Synovialmembran. Darüber hinaus erweist sich die Differenzierung von Zotten und Falten als unsicher. Ob Zotten- und Faltenbildung pathologische Geschehen darstellen, bleibt unklar. Für eine Beurteilung der Zotten- und Faltenbildung als physiologisch spricht die Tatsache, dass bei den 11 Kontrollen und 10 uneingeschränkt auswertbaren Präparaten unmittelbar postoperativ lediglich ein Präparat keine Zotten- und Faltenbildung aufweist. Die Form der Zotten und Falten wird für ein wichtiges Diagnostikum erachtet. Schlanke, dünne Zotten und Falten werden vorwiegend als physiologisch beschrieben. Diese Beschreibung entspricht der als feinvillös bezeichneten Zottenform, die die überwiegende Anzahl der Kontrollen aufweist. Das Auftreten von Gefäßkongestionen deutet auf eine akute Entzündung. Das Auftreten eosinophiler Schlieren im Gelenklumen stellt allein keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Veränderung des Gelenkes dar und wird als Artefakt gedeutet.

Die Synovialmembran nach konventioneller Knorpelchirurgie

Um der funktionellen Einheit der inneren Gelenkanteile Rechnung zu tragen, werden die Ergebnisse der Untersuchung der Synovialmembran im Zusammenhang mit den Befunden der Gelenksektion diskutiert.

Der im Zuge der Sektion unmittelbar postoperativ auftretende mäßige Gelenkerguss mit rötlich gefärbter Synovia ist direkt auf den arthroskopischen Eingriff zurückzuführen, denn im Rahmen der klinischen Untersuchungen und der Gelenkexploration wäre das Bestehen eines hämorrhagischen Gelenkergusses zum Zeitpunkt des Eingriffes festgestellt worden. Da die histologischen Befunde der Präparate unmittelbar postoperativ lediglich Zeichen eines leichten Ödems der Synovialmembran zeigen, erscheint es wahrscheinlich, dass die Blutanteile in der Synovia von der Zusammenhangstrennung der Gelenkkapsel beim Eröffnen des Gelenkes stammen und die vermehrte Füllung des Gelenkes auf einem Verbleib von Spülflüssigkeit im Gelenklumen beruht. Es finden sich keine Anzeichen für Diapedesisblutungen. Das Auftreten dieses Ödems in der Synovialmembran ist auf eine gesteigerte Permeabilität der Wand der lokalen Gefäße zurückzuführen. In Analogie zu den Beobachtungen beim Pferd kann dies unmittelbar und 2 Wochen postoperativ als eine reaktive entzündliche Veränderung infolge der Gelenkspülung gedeutet werden [Prades 1986]. Das in vorliegender Untersuchung beobachtete Auftreten von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten belegt den entzündlichen Charakter des Geschehens und spricht gegen ein reaktionsloses Eindringen von Spülflüssigkeit in die Synovialmembran. Wird ein physiologisches Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen in der Synovialmembran bei Schweinen diesen Alters postuliert, erscheint das Vorliegen einer infektiösen Arthritis in den vorliegenden Untersuchungen unwahrscheinlich, zumal Ansammlungen von Plasmazellen und Lymphozyten auch bei Kontrolltieren gesehen werden. Ebenso sprechen die überwiegend feinvillösen Zotten und Falten für ein vor dem Eingriff unauffälliges Gelenk. Die Zusammenhangstrennung der Synovialmembran beim Einbringen des arthroskopischen Instrumentariums könnte ebenfalls zur Ausbildung einer Entzündung führen, da die freigesetzten Entzündungsmediatoren über die Gelenkhöhle auf die gesamte synoviale Intima verteilt werden. Hierbei ist jedoch der durch die Gelenkspülung und das Volumen des verbleibenden Gemisches aus Synovia und Spülungsflüssigkeit bedingte Verdünnungseffekt zu

berücksichtigen. Das unmittelbar postoperativ erhöhte Kern-Plasma-Verhältnis bei unauffälligen Zell- und Kernflächen kann nur durch eine verringerte Zellfläche in Verbindung mit einer ebenfalls erhöhten Kernfläche erklärt werden. Dies kann als Zeichen von Änderungen im Wasserhaushalt der Zelle gedeutet werden, bei denen Wasser vom Zytoplasma in den Kern strömt bzw. die Zelle verlässt. Da zwischen der Arthroskopie und der Entnahme der Gewebeprobe die gleiche Zeit vergangen ist wie zwischen Schlachtung und Gewebeentnahme, müssen etwaige Änderungen im Wasserhaushalt der Synovialozyten auf den arthroskopischen Eingriff zurückgeführt werden.

Bis zur 2. postoperativen Woche bildet sich der makroskopisch erkennbare Gelenkerguss zurück, und es wird nur bei einem Kniegelenk ein nunmehr leichter Gelenkerguss beschrieben. Histologisch erscheint das Ödem der Synovialmembran unverändert ausgebildet, was mit den Beobachtungen von Prades übereinstimmt. Dagegen zeigt die Synovialmembran deutlich ausgeprägtere Veränderungen als unmittelbar postoperativ. So findet sich ein ausgeprägtes serofibrinöses Exsudat bei weiterhin leichter Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen sowie vereinzelt vorkommenden Ansammlungen dieser Zellen. Auch einzelne neutrophile Granulozyten werden weiterhin gesehen. In Verbindung mit Kongestion und weiten Lumina der Gefäße des subintimalen Bindegewebes sowie Thrombenbildung ist dies als akutes Entzündungsgeschehen zu deuten. Zugleich werden auch Anzeichen einer subakut bis chronischen Gelenkveränderung gesehen. So weisen Präparate zu diesem Zeitpunkt eosinophile Granulozyten auf, und die Zotten und Falten erscheinen überwiegend plumpvillös. Stellenweise ist eine fibrinöse Membran ausgebildet, was zu einer undeutlichen Grenze gegen das Gelenklumen führt. Der Zustand der Synovialmembran muss als über die Veränderungen nach einer Gelenkspülung hinausgehende, entzündliche Reaktion gedeutet werden, die sich nur durch das Vorliegen einer Noxe von Seiten des Gelenklumens erklären lässt. Das gleichzeitige Vorkommen von akuten und subakuten bis chronischen Entzündungszeichen weist darauf hin, dass diese Noxe in der 2. postoperativen Woche noch vorliegt. Als Noxe muss eine Zerstörung von Knorpelgewebe durch die gesetzte Knorpelläsion angesehen werden. Das Abrunden der Läsionsränder findet im Anschluss an die eigentliche Operation statt, da in der 2. postoperativen Woche die Defektränder als abgerundet beschrieben werden. Die Zerstörung von Knorpelsubstanz setzt Chondromucoproteine, Kollagen und Enzyme frei, die normalerweise nicht mit Geweben außerhalb des Knorpels in Kontakt treten [Johnston 1987]. Über die Synovia werden diese Substanzen zur Synovialmembran transportiert. Das antigene Potenzial der Chondrozyten ebenso wie Antikörper gegen Proteoglykane scheinen eine Rolle bei Arthritiden zu spielen [Malseed 1976, Rupp 1981]. Von Kollagen Typ II ist bekannt, dass es eine entzündliche Reaktion der synovialen Intima hervorruft [Lipowitz 1985]. Bei Ratten konnte durch Kollagen Typ II eine Arthritis eingeleitet werden [Trentham 1977, 1978, Morgan 1980]. Autoantikörper gegen Kollagen wurden beim Schwein nachgewiesen [Schulz 1991]. Auch die Fibrinauflagerungen in Verbindung mit einer leichten Infiltration mit Plasmazellen und Lymphozyten, wie sie in einem der vorliegenden Präparaten aus der 2. postoperativen Woche gesehen werden, können im Rahmen einer durch die Freisetzung von Knorpelbestandteilen ausgelösten und unterhaltenen Synovialitis erklärt werden. Gegen das Vorliegen eines infektiösen Geschehens sprechen die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren, die eine progressive, subakut bis chronische Arthritis von serofibrinöser bis fibrinopurulenter Qualität als ursächlich infektiös ansehen [Turner 1991].

Der sehr lückenhafte Synovialozytenbesatz der synovialen Intima bzw. deren Erosion wird als Anzeichen für eine Degeneration der Synovialmembran gedeutet, die sich im Fehlen von

histomorphometrisch erfassbaren Synovialozyten niederschlägt. Ein Austritt von Erythrozyten in das Gelenklumen erscheint in solchen Arealen der Synovialmembran wahrscheinlich, während das sporadische Auftreten dieses Befundes auch durch das Eindringen von Blut in das Gelenklumen im Zuge der Sektion erklärbar ist. Als Zeichen einer Regeneration wird das Auftreten von Granulationsgewebe, plumpvillösen Zotten und der gelegentlichen Verdickung der synovialen Intima auf über drei Zellagen angesehen. Die Hyperplasie der Synovialozyten wird von vielen Autoren im Rahmen von Synovialitiden beschrieben [Barthel 1972, Aaron 1987, Johnston 1987]. Die größere Formenvielfalt der Synovialozyten weist ebenso wie die unregelmäßige Färbung ihres Zytoplasmas und der erhöhte Anteil an Kernen mit aufgelockertem Chromatin auf eine erhöhte Aktivität der Synovialozyten hin. Das stellenweise Vorkommen von versilberbaren Fasern in tieferen Schichten der Synovialmembran kann als Zeichen erhöhter Bildung von Bindegewebe gedeutet werden. Elektronenmikroskopisch sind die argyrophilen Fasern aus gewöhnlichen Kollagenfibrillen (Typ III) aufgebaut. Der Durchmesser dieser Fasern ist gegenüber den derben Faserbündeln des Kollagens (Typ II) deutlich geringer. Damit ist bei den argyrophilen Fasern die Oberfläche relativ größer als bei einer nicht versilberbaren Faser. Die Oberflächen der Fasern tragen Glykoproteinauflagerungen, die folglich in versilberbaren Fasern konzentrierter als im gewöhnlichen Kollagen vorliegen. Diese Glykoproteinauflagerungen sind die Ursache für die Argyrophilie. Aus diesem Grunde sind auch feinste Verzweigungen und Ausläufer von Kollagen versilberbar [Romeis 1989]. Folglich kann geschlossen werden, dass sich regenerierendes Bindegewebe aufgrund seines Anteiles an präkollagenen Fasern ebenfalls versilberbar darstellt.

In der 6. bzw. 8. postoperativen Woche überwiegen reparative bzw. regenerative Prozesse, da makroskopisch Synovialmembran und Synovia zu diesem Zeitpunkt bereits völlig unauffällig erscheinen. Auch die histologischen Befunde weisen auf eine fortgeschrittene Regeneration des Gelenkes hin, da kein Exsudat gefunden wird und weder neutrophile noch eosinophile Granulozyten gesehen werden. Zwar findet sich noch Granulationsgewebe, doch die Schichtung der Synovialmembran scheint überwiegend ausgebildet zu sein. Plumpe Zotten und Falten beherrschen das Bild, während die Synovialozyten eine deutliche Tendenz zu längsovaler und hochzylindrischer Form zeigen, was sich in deutlich erhöhten Werten für die Zell- und Kernfläche sowie für den Zell- und Kerndurchmesser ausdrückt. Ihr Plasma ist dabei wieder unauffällig gefärbt, während ihre zentral bis basal liegenden Kerne vermehrt aufgelockertes Chromatin zeigen. Dies könnte als Zeichen für eine fortschreitende Normalisierung der Synovialmembran gedeutet werden. Somit deutet die Form der Synovialozyten in Verbindung mit der typischen Lage ihrer Kerne auf eine weitgehende Anpassung der Synovialmembran an eine Gelenkirritation, denn die Regeneration der Synovialmembran ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Während die Dicke der synovialen Intima unauffällig ist, finden sich weiterhin vereinzelt Erosionen. Stellenweise tritt weiterhin eine fibrinöse Membran auf. Auch ist die Zahl der Zelltrümmer auffallend groß, und die Grenze zum Gelenklumen bleibt überwiegend unscharf.

In der 12. Woche nach konventioneller Knorpelchirurgie zeigt die Synovialmembran histologisch annähernd das gleiche Bild wie unmittelbar postoperativ. Lediglich die Grenze zum Gelenklumen bleibt unscharf, die Synovialozytenkerne liegen fast ausschließlich basal, und ihr Chromatin bleibt aufgelockert. In Verbindung mit erhöhten Werten der Zell- und Kernfläche sowie der Zell- und Kerndurchmesser spricht dies für eine erhöhte Aktivität der Synovialozyten. Diese steht möglicherweise in Zusammenhang mit einer Veränderung der um die Defekte

gelegenen Knorpeloberfläche, die sich ab der 6. bis zur 12. postoperativen Woche mit zunehmender Intensität zeigt, während sich die Synovialmembran makroskopisch unauffällig darstellt.

Insgesamt sind nach einer arthroskopisch durchgeführten Knorpelchirurgie die Veränderungen an der Synovialmembran des behandelten Kniegelenkes in der 2. postoperativen Woche gravierender als unmittelbar postoperativ. In der 12. postoperativen Woche erscheint die Synovialmembran unverändert, lediglich die Synovialozyten zeigen Anzeichen einer gesteigerten Aktivität. Unmittelbar postoperativ kann die Initialphase einer Entzündung beobachtet werden. Diese besteht in der Veränderung der Permeabilität der Gefäßwände kleiner Gefäße, was zu einem Ödem der Synovialmembran führt und dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass geringe Mengen Spülflüssigkeit in die Interzellularsubstanz der Synovialmembran eindringen und möglicherweise eine Veränderung des Wasserhaushaltes der Synovialozyten bedingen, was zu einem erhöhten Kern-Plasma-Verhältnis führt. Als Auslöser dieser entzündlichen Reaktion wird die Gelenkspülung angesehen. Im Anschluss an diese Veränderungen nimmt die Entzündung einen exsudativen Charakter mit serofibrinöser Qualität an. Das Vorliegen entsprechender – wenn auch abgeschwächter – Symptome in der 6. Woche lässt das Auftreten eines weiteren Auslösers vermuten, der in den regressiven und reparativen Vorgängen am behandelten Knorpel gesehen wird. Nur hiermit kann eine über den Zeitraum von mehreren Wochen andauernde reaktive Synovialitis erklärt werden. Nach der 6. postoperativen Woche erlischt die Synovialitis. Die regenerativen Vorgänge dauern jedoch weiter an.

Die Synovialmembran nach Laseroperationen

Excimer-Laser

Unmittelbar nach dem Einsatz des Excimer-Lasers werden Veränderungen in der Synovialmembran gefunden, die über die genannten Befunde infolge einer Gelenkspülung (Auftreten eines Ödems und neutrophiler Granulozyten) hinausgehen. Während jedoch die Synovialmembran unmittelbar nach Einsatz des Excimer-Lasers makroskopisch als unauffällig beurteilt wird, zeigen histologische Untersuchungen erhebliche Gewebeveränderungen wie Hitzeokoagulation und hämorrhagisches Exsudat. Als Ursache für die histologisch erkennbaren Veränderungen, insbesondere die Hitzeokoagulation, kommt einzig die Anwendung von Laser in Betracht. Dafür spricht das Vorkommen plumpvillöser Zotten, einer fast immer undeutlichen Grenze zum Gelenklumen und einer fibrinösen Membran. Das gleiche gilt für die ausgeprägte Ordnung der Synovialozyten in Schichten und die basale bis zentrale Ausrichtung ihrer Zellkerne sowie deren vermehrt unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma, denn diese Befunde sind denen in der 12. Woche nach konventioneller Behandlung vergleichbar und sprechen für eine erhöhte Aktivität der Synovialozyten.

Die gefundenen Hitzeokoagulationen in der Synovialmembran mit den sie umgebenden zellkernfreien Arealen weisen keinen Kontakt zur synovialen Oberfläche auf. Um diese Koagulationen findet sich ausgedehntes überwiegend seröses Exsudat. Die zentrale Lage im Präparat und die Tatsache, dass zwei der drei Präparate den gleichen Befund aufweisen, schließt einen Artefakt aus. Das Vorkommen typischer Formen von Zellkernpyknosen kann nur durch Hitzeeinwirkung erklärt werden. Das erhöhte Kern-Plasma-Verhältnis der Synovialozyten in

Verbindung mit einem geringen Anteil aufgelockerten Synovialozytenchromatins entspricht der konventionellen Behandlung. Dagegen weisen das Auftreten einzelner Abschnitte der Synovialmembran mit Erosionen oder fehlenden Synovialozyten sowie die überwiegend undeutliche Grenze zum Gelenkklumen, die in Verbindung mit einer erhöhten Anzahl von Trümmern und vereinzelt mit einer fibrinösen Membran gesehen werden, auf eine Schädigung der synovialen Oberfläche hin. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Schädigungen um rein mechanische Defekte durch das in das Gelenk eingebrachte Instrumentarium handelt. So finden sich keine Anzeichen für eine Wärmeeinwirkung oder direkte Bestrahlung mit dem Laser, wie sie von Richter nach Synovialisabtragung mittels Argon-Laser am Kniegelenk des Kaninchens beschrieben werden [Richter 1991].

Aus dem Auftreten von Hitzenekrosen in der Synovialmembran in der 2. Woche kann gefolgert werden, dass die Behandlung mit dem Excimer-Laser in der Synovialmembran aller behandelten Kniegelenke Hitzenekrose verursacht. Darüber hinaus besteht eine rezidivierende Blutung in der Synovialmembran, denn die zusätzliche hämorrhagische Qualität des Exsudates spricht in Verbindung mit der makroskopisch beschriebenen blutig tingierten Synovia für das Bestehen einer Blutung. Die Hämosiderin speichernden Makrophagen weisen auf eine mindestens anderthalb Tage zurückliegende Blutung hin [Pohlenz 1990]. Diese Befunde belegen eine Schädigung der Synovialmembran nach dem Einsatz des Excimer-Lasers, da die Knorpelveränderungen, die im Sektionsbefund zwar ausgeprägter als nach konventioneller Behandlung sind, kaum als alleinige Ursache ausreichen. Es herrscht insgesamt, wie nach konventioneller Behandlung, eine exsudative Entzündung vor. Das im Gegensatz zur konventionellen Behandlung bei allen Präparaten gefundene Auftreten von Granulationsgewebe und neutrophilen Granulozyten unterstützt die makroskopische Beurteilung des Gelenkzustandes als Arthritis im Anschluss an einen arthroskopischen Eingriff, die deutlicher ausgeprägt ist als nach konventioneller Behandlung. Die unmittelbar postoperativ gesehenen histologischen Veränderungen der synovialen Intima sind ebenfalls deutlicher ausgeprägt und entsprechen nunmehr denen nach konventioneller Behandlung. Es handelt sich primär um die Verringerung der Synovialozytendichte in der synovialen Intima, denn die erhöhte Zahl von Zelltrümmern spricht für ein Zugrundegehen der Synovialozyten. Auch sind die Synovialozyten gegenüber der konventionellen Behandlung stärker beeinträchtigt, da aufgelockertes Chromatin und unregelmäßiges Zytoplasma häufiger gesehen werden, während das Kern-Plasma-Verhältnis jedoch unauffällig bleibt.

In der 6. postoperativen Woche spricht das Nebeneinander von einerseits offensichtlichen Heilungstendenzen wie eine unauffällige Gewebetextur, das Fehlen eines Exsudates und einer fibrinösen Membran sowie das Vorkommen von Granulationsgewebe bei allen Präparaten und andererseits Zeichen einer akuten Synovialitis mit weiterhin bestehenden hämorrhagischen Anteilen für das Vorliegen einer chronisch rezidivierenden Synovialitis. In Verbindung mit den extremen makroskopischen Veränderungen des Gelenkknorpels kann von einer chronisch destruierenden Arthritis gesprochen werden. Dabei befindet sich die funktionelle Einheit des Gelenkes an der Grenze ihrer Regenerationsfähigkeit, da eine ausgeprägte Synovialitis und umfangreiche Knorpeldefekte sich gegenseitig fördern. Die Beobachtung, dass sich alle Knorpeldefekte ausdehnen und sich zum Teil auch vertiefen, lässt eine Schädigung der Chondrozyten postulieren, die zu einer vermehrten Aktivität von degradativen Enzymen führt [Weiss 1979]. Der damit gesteigerte Abbau von Knorpelmatrix führt zur weiteren Zellschädigung und unterhält die Synovialitis, was zur Ausbildung eines Circulus vitiosus führt, wie ihn Mohr bei fortgeschrittenen Stadien der Arthropathia deformans des Menschen

beschreibt [Mohr 1984]. Histologisch ist die ausgeprägte Beeinträchtigung der Synovialmembran nachgewiesen, da gegenüber der konventionellen Behandlung vermehrt eosinophile Granulozyten und vereinzelte Erosionen der Synovialmembran auftreten. Auch das gänzliche Fehlen feinvillöser Zotten und Falten, das Vorkommen von Synovialmembranabschnitten mit fehlender Ordnung der Synovialozyten und von Synovialozyten mit unregelmäßigem Zytoplasma unterstreichen diesen Zustand.

In der 12. Woche nach Behandlung mit dem Excimer-Laser besteht weiterhin eine erhebliche Beeinträchtigung der Gelenke, die sich jedoch gegenüber der 6. Woche verringert hat. Das gegenüber der konventionellen Behandlung festgestellte Fehlen von feinvillösen Strukturen, das Auftreten von eosinophilen Granulozyten und einer fibrinösen Membran sprechen ebenso wie das überwiegend unregelmäßige Plasma der Synovialozyten, das gelegentliche Fehlen einer Ausrichtungstendenz ihrer Kerne und die erhöhte Zahl von Trümmern für eine anhaltende Gelenkiritation, die sich makroskopisch als leichte Synovialitis darstellt. In Verbindung mit den ebenfalls makroskopisch beschriebenen ausgedehnten Veränderungen am gesamten Knorpel des Gelenkes ergibt sich das Bild einer Arthropathia deformans. Dass diesem Zustand eine umfangreichere Schädigung des Gelenkes voranging, ist aus dem Auftreten von Fibrin im Gelenklumen und insbesondere von Makrophagen ersichtlich, die mit Hämosiderin beladen sind. Somit besteht kein Zweifel, dass dieser Zustand der Gelenke eine Folge der erheblichen Veränderung darstellt, die in den vorhergehenden Überlebenszeiträumen beschrieben wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Synovialmembran unmittelbar nach knorpelchirurgischen Eingriffen mit dem Excimer-Laser eine auffällige Schädigung zeigt, die auf thermische Einflüsse zurückzuführen ist. Diese Schädigung der Synovialmembran bedingt eine ausgeprägte serofibrinöse Entzündung, neben der ab der 2. postoperativen Woche eine umfangreiche Degeneration des gesamten Gelenkknorpels gesehen wird. In der 6. postoperativen Woche ergibt sich das Bild einer chronisch destruierenden Arthritis, die sich in der 12. Woche zu einer ausgeprägten Arthropathia deformans entwickelt hat.

Ho:YAG-Laser

Sowohl histologisch als auch makroskopisch entsprechen die Befunde unmittelbar nach der Knorpelchirurgie mit dem Ho:YAG-Laser denen nach Anwendung des Excimer-Lasers. Lediglich das Fehlen von Hitzenekrosen lässt die Schädigung der Synovialmembran als geringer erscheinen. Da dem Fehlen von Erosionen der synovialen Intima eine erhöhte Anzahl von Trümmern gegenübersteht, ist die Schädigung der synovialen Intima unmittelbar nach Einsatz beider Lasersysteme gleich ausgeprägt. Das Fehlen feinvillöser Strukturen und das zum Teil ausgeprägte Auftreten von eosinophilen Granulozyten lassen – wie bei den Präparaten unmittelbar nach Excimer-Laserbehandlung – eine Gelenkirritation zum Zeitpunkt der Operation vermuten. Im Gegensatz zum Einsatz des Excimer-Lasers kann das Vorkommen von Karbonisat beobachtet werden.

In der 2. postoperativen Woche entsprechen die histologischen Befunde an der Synovialmembran im wesentlichen denen nach Einsatz des Excimer-Lasers. Es fehlen jedoch Hinweise auf eine ausgeprägte Schädigung der Synovialmembran. Diesen Befunden stehen Gelenkergüsse ohne hämorrhagische Anteile gegenüber. Im Vergleich zu den Behandlungen mit dem Excimer-Laser können weniger ausgeprägte makroskopische Veränderungen des Knorpels in der Umgebung der Defekte beobachtet werden. Die als oberflächliche Knorpelglättung geplanten Knorpeldefekte reichen weiterhin bis auf den subchondralen Knochen.

In der 6. Woche nach dem knorpelchirurgischen Eingriff mittels Ho:YAG-Laser ist aus dem vereinzelt Auftreten von eosinophilen Granulozyten und mäßigen fibrinösen Exsudat an der Oberfläche der Synovialmembran auf ein Entzündungsgeschehen zu schließen. Histologisch bietet die Synovialmembran somit das Bild einer abklingenden Synovialitis mit deutlichen regenerativen bzw. reparativen Anteilen. In einem Präparat werden wie nach konventioneller Behandlung neben den regenerativen bzw. reparativen Anzeichen keine weiteren Entzündungszeichen gesehen. Die Entzündung ist wesentlich geringer ausgeprägt als nach Behandlung mit dem Excimer-Laser. Das Auftreten von feinvillösen Strukturen und die nahezu unauffälligen histomorphologischen Werte sprechen für eine gegenüber der konventionellen Behandlung weitergehende Annäherung an den bei den Kontrollen gesehenen Zustand der Synovialmembran. Hierfür spricht ebenfalls die Tendenz zu eher dichtem Chromatin der Synovialozytenkerne. Wie nach der Behandlung mit dem Excimer-Laser zeigt ein deutlicher Anteil von Synovialozyten ein unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma, was in Verbindung mit dem Fehlen von Trümmern als gesteigerte Stoffwechselaktivität der Synovialozyten gedeutet wird.

Die von der 2. bis auf die 6. Woche nach Einsatz des Ho:YAG-Lasers feststellbare Tendenz einer sich an den Zustand bei den Kontrolltieren annähernden Synovialmembran wird in der 12. postoperativen Woche unterbrochen. Das regelmäßige Auftreten von zum Teil auffallend vielen eosinophilen Granulozyten sowie vereinzelt im Gelenklumen gesehenes Fibrin ist in Verbindung mit den weiten Lumina der subintimalen Gefäße als Synovialitis zu deuten. Das erneute Ansteigen der Trümmerzahl, der gelegentliche Verlust der Ordnung in der synovialen Intima sowie das Fehlen feinvillöser Strukturen sprechen für eine fehlende Heilungstendenz. In Verbindung mit der nahezu unveränderten Tiefe der Knorpeldefekte und der sich gegenüber der 6. postoperativen Woche verstärkenden Knorpelveränderungen in deren Umgebung scheint, ähnlich wie nach Behandlung mit dem Excimer-Laser, ein Circulus vitiosus wie bei einer Arthropathia deformans vorzuliegen, der sich auf einem Niveau mit geringeren Schädigungen und entsprechend geringer ausgeprägter Synovialitis als nach dem Einsatz des Excimer-Lasers

eingependelt hat. Gegenüber der konventionellen Behandlung fällt eine anhaltende Tendenz der Synovialozyten zu dichtem Chromatin und unregelmäßig gefärbtem Plasma auf.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Synovialmembran unmittelbar nach knorpelchirurgischen Eingriffen mit dem Ho:YAG-Laser ebenfalls Schädigungen zeigt, die denen nach Einsatz des Excimer-Lasers ähneln, jedoch weniger deutlich ausgeprägt sind. Diese Schädigung der Synovialmembran zeigt sich in einem verringerten Synovialozytenbesatz der synovialen Intima und wird von einem zuerst im subintimalen Bindegewebe beobachteten, serösen bis hämorrhagischen Exsudat begleitet. Diese exsudative Entzündung klingt im Gegensatz zu mit dem Excimer-Laser behandelten Gelenken schneller ab. In der 12. Woche treten gegenüber der 6. Woche verstärkte entzündliche Komponenten auf. Auch nach dem Einsatz dieses Lasers findet sich eine bis in die 12. postoperative Woche andauernde Gelenkirritation, die mit einer ausgeprägten Veränderung des gesamten Knorpels einhergeht.

1440 nm-Nd:YAG-Laser

Unmittelbar nach dem Einsatz des Nd:YAG-Laser (1440 nm) weisen histologische Anzeichen eines Entzündungsgeschehens in der Anfangsphase und einer Schädigung der synovialen Intima auf eine gegenüber der konventionellen Behandlung stärker ausgeprägte Beeinträchtigung der Gelenke hin. Wie nach Behandlung mit dem Excimer- und dem Ho:YAG-Laser finden sich deutliche Anzeichen einer Schädigung der synovialen Intima in Form von verringerter Synovialozytendichte bis hin zum völligen Fehlen der Synovialozyten. Hieraus erklärt sich die erhöhte Zahl von Trümmern und die Erhöhung der Länge der erfassten synovialen Oberfläche. Zwar deuten die ausschließlich plumpe Zottenform und das regelmäßige Auftreten einer fibrinösen Membran auf eine zum Zeitpunkt der Operation bestehende Gelenkirritation hin, das Fehlen von lymphoplasmazellulären Infiltraten und Ansammlungen in zwei der drei Präparate schließt jedoch ein chronisch arthritisches Geschehen aus. Wie schon im Anschluss an die Behandlung mit dem Excimer- und dem Ho:YAG-Laser zeigen die Synovialozyten eine deutliche Tendenz zu aufgelockertem Chromatin und unregelmäßig gefärbtem Zytoplasma. Das Auftreten von zerstörten Gewebereichen am Rande aller drei Präparate bleibt als vermutlicher Artefakt unberücksichtigt, da als Ursache hierfür eine entnahmebedingte Schädigung des Gewebes wahrscheinlicher als eine operationsbedingte ist. Dagegen führt das Auftreten von gequollenen Kollagensträngen zu der Befundung eines ausgeprägten Ödems. Solche gequollenen Kollagenstränge werden auch in der Umgebung der nach Behandlung mit dem Excimer-Laser beschriebenen Hitzenekrosen gesehen. Das Fehlen jeglicher Nekrosezeichen verbietet jedoch die Befundung einer geänderten Gewebetextur.

Das Auftreten von Knorpeltrümmern und Karbonisat im Gelenklumen ist wahrscheinlich die Ursache der in der 2. Woche nach arthroskopischer Knorpelchirurgie mittels dieses Lasers gesehenen zelligen Infiltration, die stärker ausgeprägt ist als nach dem Einsatz des Excimer-Lasers. Die Präsenz insbesondere der neutrophilen Granulozyten wird in diesem Zusammenhang auch von Whipple beschrieben [Whipple 1984]. Sie ist jedoch nicht so stark, wie sie im Zusammenhang mit einer septischen Arthritis zu erwarten wäre, gegen die auch das makroskopische Erscheinungsbild des Gelenkes spricht. Andererseits ist bei den nach Behandlung mit dem Excimer-Laser beschriebenen erheblichen makroskopischen Knorpelveränderungen auch mit dem Auftreten von Knorpelfragmenten zu rechnen, was im

Rahmen der histologischen Auswertung jedoch nicht bestätigt wird. Die erheblichen entzündungsfördernden Eigenschaften des im Zuge der arthroskopischen Manipulationen entstehenden Detritus sind jedoch bekannt. Whipple beobachtet nach Menishektomie ohne Gelenkspülung beim Kaninchen Granulozyten, die in der Synovialmembran kleine Nester um größere Einschlüsse von Karbonat und Knorpelfragmenten bilden. Auch in der zweiten Woche wird dieses Bild, wenn auch wesentlich seltener, gesehen. Nach acht Wochen beschreiben diese Autoren die synoviale Intima und das subsynoviale Bindegewebe als völlig normal. In diesem Zusammenhang erscheint es wahrscheinlicher, dass das überwiegend aufgelockerte Chromatin der Synovialozyten in Verbindung mit erhöhten Werten für Zellfläche und -durchmesser sowie für Kernfläche und -durchmesser ein Anzeichen für eine hydropische Degenerationen der Synovialozyten darstellt, die sich in einer erhöhten Zahl von Trümmern niederschlägt, als dass es sich um besonders stoffwechselaktive Zellen handelt. Hierfür sprechen auch die uneinheitliche Ausrichtung der Zellkerne und die fehlende Ordnung in der Synovialmembran.

In der 6. Woche weicht die Synovialmembran nur noch geringfügig vom Zustand bei den Kontrolltieren ab. Das bei allen Präparaten gesehene Ödem der Synovialmembran weist auf eine bestehende Gelenkiritation hin, die ihre Ursache in der makroskopisch beschriebenen leichten Veränderung der Umgebung der Knorpeldefekte hat. Das Auftreten von Abschnitten der Synovialmembran, in denen in allen Schichten versilberbare Fasern gesehen werden, weist auf Granulationsgewebe hin. Der Synovialozytenbesatz der synovialen Intima ist gegenüber der 2. postoperativen dichter geworden, was für eine fortschreitende Regeneration der Synovialmembran spricht. Eine weiterhin erhöhte Stoffwechselaktivität bedingt ein gehäuftes Vorkommen von Synovialozyten mit unregelmäßig gefärbtem Zytoplasma. Die in der Synovialmembran eingeschlossenen Knorpeltrümmer haben keine erkennbare Auswirkung auf das Entzündungsgeschehen, was den Beobachtungen von Whipple entspricht. Es ist zu vermuten, dass der Einschluss von Knorpeltrümmern in die Synovialmembran die Unterhaltung eines entzündlichen Geschehens verhindert. In diesem Zusammenhang handelt es sich bei dem gefundenen intakten Knorpelfragment mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine sekundäre Inkorporation. Eine chondroide Metaplasie des Gelenkkapselgewebes, die beim Menschen seltene sogenannte synoviale Chondromatose, kann aufgrund der deutlichen Abgrenzung des Fragmentes ausgeschlossen werden.

Ähnlich wie nach Behandlung mit dem Ho:YAG-Laser wird die von der 2. bis zur 6. Woche gesehene Heilungstendenz nicht fortgesetzt. Das Auftreten von Erosionen der synovialen Intima und von Granulationsgewebe spricht dagegen für eine rezidivierende Schädigung der Synovialmembran. Da makroskopisch die gleichen Befunde wie in der 6. postoperativen Woche vermerkt werden, kann auf das Vorliegen eines Circulus vitiosus wie bei einer Arthropathia deformans geschlossen werden. Dabei kann aus den makroskopischen Sektionsbefunden eine stark verzögerte Heilungstendenz der im Vergleich zu den Befunden nach Einsatz des Excimer-Lasers relativ geringen Knorpeldefekte abgeleitet werden. Dagegen weisen die Synovialozyten weiterhin neben überwiegend lockerem Chromatin auch vermehrt unregelmäßiges Zytoplasma auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach einer arthroskopischen Knorpelchirurgie mittels Nd:YAG-Laser mit der Wellenlänge von 1440 nm eine Schädigung der Synovialozyten auftritt. Es besteht außerdem der Verdacht, dass Schäden der Synovialmembran ähnlich denen nach Einsatz des Excimer-Lasers auftreten. Bis zur 2. Woche sind die Veränderungen der

synovialen Intima besonders ausgeprägt, nehmen aber bis zur 6. Woche deutlich ab. Ab der 6. Woche ist die Heilungstendenz jedoch stark verzögert.

CO₂-Laser

Das regelmäßige und zum Teil auffallende Auftreten von eosinophilen Granulozyten sowie das Fehlen von feinvillösen Zotten und Falten sprechen eher für das Vorliegen eines zum Zeitpunkt des arthroskopischen Eingriffes bestehenden Entzündungsgeschehens in der Synovialmembran, als dass es auf das eingesetzte Lasersystem in Verbindung mit der technisch erforderlichen Befüllung des Gelenkes mit CO₂-Gas zurückgeführt werden könnte. Da bei nur einem Präparat dieser Gruppe die synoviale Intima ausgewertet werden kann, bleibt offen, ob sich nach der Behandlung mit dem CO₂-Laser das Plasma der Synovialozyten im Gegensatz zur Behandlung mit den anderen Lasersystemen geringer verändert oder ob es sich hierbei um einen Zufallsbefund handelt. Es ist jedoch aufgrund der Operationstechnik, die lediglich eine abschließende Gelenkspülung vorsieht, eine von allen anderen Operationstechniken mit permanenter Gelenkspülung abweichendes Erscheinungsbild der Synovialozyten zu erwarten. Die ausschließlich nach dem Einsatz des CO₂-Lasers auftretenden ausgeprägten interstitiellen Blutungen weisen auf eine über den Rahmen der anderen Operationstechniken hinausgehende Beeinträchtigung des subsynovialen Bindegewebes hin, bieten jedoch keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Gasemphysems, wie es unmittelbar postoperativ palpatorisch festgestellt wurde und bei Einsätzen des CO₂-Lasers beschrieben wird [Smith 1989]. Ungefärbte kreisrunde Strukturen im Blutungsgebiet stellen nicht die im Zusammenhang mit Gasbrand der Muskulatur beschriebenen Gasblässchen in blutgefüllten Gewebespalten dar [Joest 1969], sondern können fast immer als Fettvakuolen von Lipozyten identifiziert werden von.

Aus der Tatsache, dass im Gegensatz zu allen anderen Methoden der arthroskopischen Knorpelchirurgie in der 2. Woche nach Behandlung mit dem CO₂-Laser der überwiegende Teil der Synovialmembran durch das Auftreten einer ausgeprägten serofibrinösen Synovialitis und von Granulationsgewebe so stark verändert erscheint, dass bei über der Hälfte der untersuchten Ausschnitte keine synoviale Intima ausgemacht und keine ausreichende Anzahl von histomorphometrisch auswertbaren Synovialozyten gefunden werden kann, muss auf eine ausgedehnte Schädigung der Synovialmembran durch den Einsatz des CO₂-Lasers geschlossen werden. Es erscheint unwahrscheinlich, dass das Auftreten von Knorpeltrümmern und Karbonisat im Gelenklumen allein zur Ausbildung einer derart ausgeprägten serofibrinösen Synovialitis ausreicht, die in Verbindung mit einem mäßigen Gelenkerguss bei allen untersuchten Präparaten am stärksten auftritt.

Die in der 6. postoperativen Woche bei zwei Präparaten gesehene ausgeprägte serofibrinöse Synovialitis ist zu diesem Zeitpunkt als rezidivierend einzustufen. Ein Hinweis auf eine vorhandene Heilungstendenz wird aus dem Vorkommen von Granulationsgewebe und Synovialozyten abgeleitet, deren Form zumeist kubisch und deren Chromatin überwiegend dicht ist. Hierfür spricht auch, dass nur einzelne größere histomorphometrische Werte des Zell- und des Kerndurchmessers festgestellt werden. Das Fehlen von neutrophilen Granulozyten und das Auftreten feinvillöser Zotten und Falten und die überwiegend basale bis zentrale Lage ihrer Zellkerne sprechen ebenfalls für eine abklingende Irritation des Gelenkes. Abschnitte der Synovialmembran, die keine erkennbare Schichtung aufweisen und in denen auffällig viele versilberbare Fasern vorkommen, weisen auf stattgefundenen Veränderungen hin. Die

hämorrhagische Qualität des Exsudates sind eher auf eine Rhexisblutung in der Synovialmembran zurückzuführen als auf eine Diapedesisblutung im Rahmen eines über die Ausmaße der anfänglichen Synovialitis hinausgehenden Entzündungsrezidivs. Auch dieser Umstand spricht für eine ausgeprägte primäre Schädigung der Synovialmembran bei Einsatz des CO₂-Lasers, da eine in Regeneration befindliche synoviale Oberfläche vermutlich bereits bei physiologischer Belastung des behandelten Gelenkes traumatisiert werden kann. Schädigungen der synovialen Intima werden weiterhin gesehen, fallen aber gegenüber der 2. postoperativen Woche geringer aus.

In der 12. postoperativen Woche spricht das Auftreten von Granulationsgewebe und das Vorkommen von Abschnitten der Synovialmembran, die keine Schichtung erkennen lassen und in denen viele versilberbare Fasern vorkommen, für eine gegenüber der 6. Woche fortgeschrittene Regeneration der Synovialmembran. Dabei scheinen Zeichen einer Synovialitis in den Hintergrund zu treten, da Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen fehlt. Da die Schädigung des den Defekt umgebenden Knorpelgewebes über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant bleibt und sich im Gegensatz zur konventionellen Behandlung nicht ausdehnt, kann ein Abbau von Knorpelgewebe ausgeschlossen werden, was wiederum einen nahezu physiologischen Zustand der Synovialozyten erklärt, der sich anhand des zumeist regelmäßig gefärbten Zytoplasmas und des deutlichen Anteils an Kernen mit dichtem Chromatin erkennen lässt. Das Auftreten von Karbonisat im Gelenklumen und im subsynovialen Bindegewebe steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von anderen Autoren, die nach partieller Menishektomie mittels CO₂-Laser beim Kaninchen bereits nach der achten Woche weder im Gelenklumen noch in der Synovialmembran der behandelten Gelenke und auch nicht in den regionalen Lymphknoten Karbonisat nachweisen können [Whipple 1984]. Hinzu kommt, dass diese Autoren die behandelten Gelenke im Anschluss an den arthroskopischen Eingriff nicht gespült hatten, das Ausmaß der Verunreinigung der Gelenke mit Karbonisat und Knorpeltrümmern folglich ungleich größer gewesen sein muss. Da in den untersuchten Präparaten zu diesem Zeitpunkt noch Karbonisat an den Knorpeldefekten vermerkt wird, erscheint es wahrscheinlich, dass die histologisch gefundenen Karbonisatpartikel wesentlich langsamer von den Knorpeldefekten als von den Meniskusdefekten abgestoßen werden. Entscheidend hierfür mag die am Rand der Knorpeldefekte gegen mechanische Einflüsse im Zuge der Gelenkbewegung relativ geschützte Lage der Karbonisate sein. Der nur langsame Abbau der Karbonisate an den Knorpeldefekten ist kein für den CO₂-Laser spezifischer Befund, sondern wird auch bei den beiden Nd:YAG-Lasern gesehen. Zugleich spricht der Verlauf des Entzündungsgeschehens, der nach dem Einsatz dieser drei Lasersysteme nicht erheblich vom Verlauf nach dem Einsatz des Excimer- oder des Ho:YAG-Lasers abweicht, gegen eine maßgebende Rolle von Karbonisat als Entzündungsursache.

Zusammenfassend führt der CO₂-Laser in Verbindung mit der für seinen Einsatz erforderlichen Befüllung des Gelenkes unmittelbar postoperativ zu palpatorisch feststellbaren Beeinträchtigung des periartikulären Gewebes. Zwar treten bei diesen Präparaten interstitielle Blutungen auf, doch können ausgeprägte Schädigungen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. In der 2. postoperativen Woche weisen Präparate aus Gelenken die mit dem CO₂-Laser behandelt wurden, die gravierendsten Veränderungen der Synovialmembran auf, die zum Teil bis zur 6. Woche anhalten. Die Regeneration der Synovialmembran schreitet deutlich voran und ist in der 12. Woche fast abgeschlossen. Die Synovialozyten erscheinen dann nahezu unauffällig.

1064 nm-Nd:YAG-Laser

Das Auftreten einzelner eosinophiler Granulozyten ist nur ein schwacher Hinweis auf eine zum Zeitpunkt des Eingriffes bestehende Irritation des Gelenkes, da es, mit Ausnahme des Excimer-Lasers, unmittelbar nach der Behandlung mit Laserstrahlen und bei einer Kontrolle gesehen wird. Die überwiegend feinvillösen Zotten und Falten sprechen ebenso wie die Synovialozyten mit ihren zentral und basal liegenden Kernen und deren nahezu unauffälligen histomorphometrischen Werten für einen physiologischen Zustand der Gelenke vor dem Eingriff.

In der 2. postoperativen Woche entsprechen die histologischen Befunde weitgehend denen nach konventioneller Behandlung, während makroskopisch stärker ausgeprägte Veränderungen der Gelenke gesehen werden. Zu diesem Zeitpunkt steht eine serofibrinöse Synovialitis im Vordergrund. Makrophagen, die Hämosiderin gespeichert haben, weisen ebenso wie die Rotfärbung der Synovia auf eine zurückliegende Blutung hin. Die Ursache der Synovialitis liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem weiteren Abbau von Knorpelgewebe, der im Anschluss an den knorpelchirurgischen Eingriff stattfindet und zu den gegenüber unmittelbar postoperativ ausgedehnten Veränderungen in der Umgebung der Knorpeldefekte führt. Die Synovialozyten weisen gegenüber der konventionellen Methode deutlichere Zeichen eines gesteigerten Stoffwechsels auf, was sich aus dem erhöhten Anteil von Kernen mit aufgelockertem Chromatin und unregelmäßig gefärbtem Zytoplasma folgern lässt.

In der 6. Woche nach Einsatz des Nd:YAG-Lasers besteht weiterhin ein großer Unterschied zwischen den histologischen und den makroskopischen Befunden. Während die Gelenke makroskopisch nur gering von den Beschreibungen der 2. Woche abweichen, finden sich histologisch deutlich weniger Veränderungen der Synovialmembran. Das Fehlen von Granulationsgewebe und das Auftreten von nur einem Abschnitt der Synovialmembran, der keine Schichtung erkennen lässt und in dem viele versilberbare Fasern auftreten, lassen auf eine weitgehende Regeneration der Synovialmembran schließen. Obwohl kein Exsudat und nur einzelne neutrophile und eosinophile Granulozyten gefunden werden, kann aufgrund des Vorkommens von Fibrin im Gelenklumen und von hämosiderinspeichernden Makrophagen im subintimalen Bindegewebe auf zurückliegende Exsudation bzw. Blutungen geschlossen werden. Dass innerhalb eines Gelenkes eine ausgeprägte Synovialitis lokal begrenzt auftritt und es gleichzeitig Abschnitte der Synovialmembran gibt, die sich unverändert darstellen, ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten beim Schwein, bei dem die Gelenkhöhle des Kniegelenkes einen einzigen zusammenhängenden Hohlraum bildet, nicht erklärbar. Es erscheint vielmehr wahrscheinlicher, dass es sich bei der im Sektionsprotokoll aufgeführten ausgeprägten Synovialitis um eine Rhexisblutung im subintimalen Bindegewebe handelt. Somit ist eine rezidivierende Blutung ähnlich wie nach Behandlung mit dem CO₂-Laser zu vermuten, die eine Rotfärbung der Synovia verursacht. Als Anzeichen einer weiterhin bestehenden geringen Schädigung der Synovialozyten zu bewerten sind die erhöhte Anzahl von Trümmern, das Vorkommen von Abschnitten der synovialen Intima mit sehr lückenhaftem Synovialozytenbesatz und die bei allen Präparaten erhöhte Länge der synovialen Intima.

Auch in der 12. postoperativen Woche steht ein Sektionsbefund, der im wesentlichen dem der 2. Woche entspricht, einer histologisch nur unwesentlich veränderten Synovialmembran gegenüber. Eine weiterhin erhöhte Anzahl von Trümmern bei einem Präparat und ein Ausschnitt mit einer Erosion sind die einzigen Anzeichen einer weiterhin bestehenden Schädigung der synovialen Intima. Plumpe Zotten weisen auf eine Störung des Gelenkes hin, während die

Synovialozyten wie nach konventioneller Behandlung wahrscheinlich aufgrund gesteigerter Stoffwechselaktivität lockeres Chromatin und eine deutliche Tendenz zu erhöhten histomorphometrischen Werten aufweisen. Das Auftreten von vereinzelt neutrophilen Granulozyten und von Blut im Gelenklumen deuten auf ein akutes Geschehen hin. Im Zusammenhang mit der makroskopisch beschriebenen Rotfärbung der Synovia ist somit von einer rezidivierenden Blutung auszugehen.

Zusammenfassend ist nach Einsatz des Nd:YAG-Lasers 1064 nm nach Abklingen der serofibrinösen Synovialitis im Anschluss an die arthroskopische Knorpelchirurgie von der Ausbildung einer Arthrose auszugehen, bei der das Knorpelgewebe nur geringste Tendenzen zur Heilung zeigt, so dass in der 12. postoperativen Woche die Befunde an den Knorpeldefekten nahezu unverändert sind. Da andererseits auch kein Abbau von Knorpelgewebe erfolgt, bildet sich die Synovialitis ähnlich schnell wie nach konventioneller Behandlung zurück. Miller beschreibt in allen Fällen nach einer experimentellen Knorpelabrasion mit diesem Laser das Auftreten einer massiven Heilungsreaktion, charakterisiert durch verstärkte Vaskularisierung und Chondrozytenproliferation [Miller 1989].

Die In-vivo-Untersuchungen haben gezeigt, dass die arthroskopische Knorpelchirurgie am Kniegelenk von Schweinen Auswirkungen auf die gesamte funktionelle Einheit der inneren Gelenkanteile hat, die von den Gelenkenden zweier oder mehrerer Knochen, welche mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen sind, der Gelenkhöhle (cavum articulare), welche mit Gelenkschmiere (Synovia) angefüllt ist, sowie der umschließenden Gelenkkapsel (capsula articularis) gebildet wird. Jeder dieser drei inneren Gelenkanteile wird durch den Eingriff direkt verändert.

Neben dem vom Operateur erwünschten Effekt, Knorpel zu verändern, verursacht die Arthroskopie eine, wenn auch geringe Zusammenhangstrennung in der Gelenkkapsel, und durch die Spülung des Gelenkes oder dessen Befüllung mit CO₂-Gas ändert sich die in der Gelenkhöhle befindliche Flüssigkeit.

Während bei der Knorpelchirurgie mit konventioneller Methode eine über die erwähnten Beeinträchtigungen hinausgehende direkte Schädigung der Synovialmembran durch die vorliegende Untersuchung ausgeschlossen werden kann, finden sich nach Einsatz von im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten Laser Hinweise auf eine primäre Schädigung der Synovialmembran. Nach Einsatz des Excimer-Lasers werden eindeutige Belege für eine thermische Schädigung gefunden. Die Befunde nach Knorpelchirurgie mit anderen Lasersystemen sind vermutlich ebenfalls auf thermische Schädigung zurückzuführen. Die thermische Gewebewirkung von Lasern wird nicht ausschließlich von der Wellenlänge des eingesetzten Lasers bestimmt. So bedingt jeder durch Laser verursachte Gewebeabtrag eine thermisch veränderte Randzone. Diese Zone der Gewebekoagulation erreicht immer eine Dicke in der Größenordnung der optischen Eindringtiefe der Laserstrahlung. Entscheidend für das Ausmaß der thermischen Gewebeschädigungen, die nicht zum Abtrag des Gewebes führen, ist Energie, die dem Gewebe zugeführt wird. Dabei ist zu bedenken, dass bereits 10% der Verdampfungsenergie für eine Gewebekoagulation ausreicht. Es stellt sich folglich die Frage, wie Energie in Gewebe gelangt, welches nicht abgetragen werden soll. In Konsequenz könnten die operativen Eingriffe durch Minimierung dieser „Nebenwirkungsenergie“ optimiert werden. Energie kann zum einen optisch durch Strahlung und zum anderen thermisch durch Wärmeleitung in das Gewebe gelangen. Für den Einsatz von Laser in Gelenkspalten sind analoge Effekte wie beim Einsatz in geschlossenen Gefäßen zu erwarten. So hat insbesondere

der Kontakt von unbestrahltem Gewebe mit energiereicher, bestrahlter Materie einen nicht zu vernachlässigenden Effekt. Bei dieser energiereichen Materie kann es sich um Abbrandprodukte oder um Spülmedien handeln. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Zeitdauer, in der das Gewebe mit energiereicher Materie in Kontakt steht, die sogenannte Kontaktzeit. Diese kann in engen Kanälen, wie es Gelenkspalten darstellen, stark verlängert sein, da Gas, Gewebepartikel und Spülmedium nur durch enge Kanäle abströmen können. Einen Anhaltspunkt für die Kontaktzeit könnte die Zeitdauer bieten, die benötigt wird, um die in diesem Projekt geforderten Knorpeldefekte zu erzeugen. Dieser Parameter wurde jedoch nicht erfasst.

Im Anschluss an jeden knorpelchirurgischen Eingriff kommt es zu einer reaktiven Synovialitis, die, wie die Entzündung nach jedem Gewebetrauma, den Heilungsprozess einleitet. Die Ausprägung dieser Synovialitis wird vom Ausmaß der Knorpelläsion und der primären Schädigung der Synovialmembran bestimmt.

Die Dauer der Entzündung und der anschließenden Regenerationsphase wird von der Knorpelläsion und den Veränderungen an der Synovialmembran in gegenseitiger Abhängigkeit bestimmt.

Keines der eingesetzten Lasersysteme ließ einen gegenüber der konventionellen Methode günstigeren Verlauf der Heilung erkennen. Im Gegenteil erscheint der Heilungsprozess anhand der Untersuchungen der Synovialmembran nach Lasereinsatz durchweg verzögert. Inwieweit hierfür eine primäre Schädigung der Synovialmembran oder eine über das Ausmaß der konventionellen Methode hinausgehende Knorpelschädigung verantwortlich ist, kann mit den durchgeführten Untersuchungsmethoden nicht geklärt werden.

Es muss angemerkt werden, dass jeweils nur drei Tiere pro Verfahren und Überlebenszeit zur Verfügung standen, so dass die Unterschiede nicht als statistisch signifikant gewertet werden können. Ein weiterer methodischer Unsicherheitsfaktor stellt die konsekutive Operation der beiden Kniegelenke eines jeden Versuchstieres dar. So können eventuelle Auswirkungen der ersten Operation auf das noch unbehandelte Kniegelenk nicht ausgeschlossen werden. Da der Heilungsprozess im Gelenk selbst nach konventioneller Behandlung innerhalb des dreimonatigen Beobachtungszeitraumes nicht gänzlich abgeschlossen ist, müssten in Langzeitstudien mögliche Spätschäden nach Einsatz von Laser im Gelenk evaluiert werden.

In vorliegenden In-vivo-Untersuchungen wurde die synoviale Reaktion nach Laseroperationen mittels zwei Dauerstrich-Laser (1064 nm-Nd:YAG-Laser und CO₂-Laser) sowie drei gepulsten Lasersystemen (Excimer-Laser, Ho:YAG-Laser, 1440 nm-Nd:YAG-Laser) evaluiert. Da der Er:YAG-Laser für die Untersuchungen nicht zur Verfügung stand, liegen keine Erkenntnisse bezüglich der Reaktion der Synovia auf die Knorpelbearbeitung mit diesem Laser vor.

6.2.2 Schneideigenschaften des Er:YAG-Lasers während der Operationen am Kaninchenknorpel

Während der bereits im Pkt. 6.3 vorgestellten In-vitro-Untersuchungen zur Erprobung und Optimierung von Schneideigenschaften diverser Lasersysteme am humanen Knorpel wurden die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Schneideffektivität sowie die Minimierung der thermischen Effekte mit dem Er:YAG-Laser erzielt.

Im Rahmen folgender In-vivo-Untersuchungen soll der Einsatz des Er:YAG-Lasers unter praxisnahen Operationsbedingungen an Kaninchenknorpel erprobt werden.

Als eine Neuerung wurde während dieses Experimentes ein Robotergelenkarm zur exakten Steuerung des Laserstrahls eingesetzt. Mit dem Experiment wurde somit die potenzielle Möglichkeit der klinischen Anwendbarkeit eines solchen Systems erprobt.

Die besonderen Vorzüge der Kopplung aus Laser und prozessorgesteuerter Strahlführung liegen in einer präzisen Anpassungsmöglichkeit an die verschiedenen Transplantatformen und in einer exakten Wiederholgenauigkeit des Laserstrahles. Damit lässt sich eine im Voraus bestimmbare, präzise, dreidimensionale Schnittführung im Knorpel und im Knochen durchführen.

Die In-vivo-Untersuchungen zur Evaluierung der Schneideigenschaften des Er:YAG-Lasersystems erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathologie, Charité Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin, Berlin. Dabei sollte eine Versuchsreihe durchgeführt werden, bei der Kaninchen ein definierter Knorpel-Knochen-Zylinder mit einem Durchmesser von 0,4 cm aus dem Patellagleitlager des Femurs entnommen und durch ein Implantat (Ceravital) ersetzt werden sollte.

Die 12 Kaninchen wurden für die Vergleichsuntersuchungen in zwei Gruppen à 6 Tiere eingeteilt. Die Tiere aus der ersten Gruppe sollten mit der herkömmlichen Hohlfräse operiert werden und die Tiere aus der zweiten Gruppe mit dem robotergeführten Er:YAG-Laser.

Laserparameter:

Wellenlänge:	2940 nm
Pulsenergie	150 mJ und 200 mJ
Pulswiederholrate:	3,5 Hz
Verfahrensgeschwindigkeit	0,2 mm/s

Aufgrund der intraoperativ auftretenden Schwierigkeiten, die im Abschnitt Ergebnisse ausführlich beschrieben wurden, wurde die Anzahl der Versuchstiere auf drei Kaninchen reduziert.

Insgesamt wurden bei den drei Tieren fünf Kniegelenke operiert, davon vier mit dem Laser und eines vergleichsweise mit der Hohlfräse mit einem Radius von 2 mm. Mit Ausnahme von einem mit dem Laser operierten Knie wurden sämtliche gesetzten Defekte mit einem Ceravital-Implantat mit einem Außendurchmesser von 4 mm versorgt. Die Implantate wurden dabei im Press-fit-Verfahren unter Druck eingesetzt. Nach der Operation erfolgte keine Ruhigstellung der behandelten Kniegelenke der Kaninchen. Zur Anfärbung des neugebildeten Knochens wurden den Tieren in Abständen von jeweils einer Woche Intravitalfarbstoffe intramuskulär injiziert

(Xylenol-Orange, Calcein-Grün, Tetracyclin, Allizarin-Komplexon). Nach 2, 4 bzw. 12 Wochen erfolgte die schmerzlose Tötung der Versuchstiere.

Die entnommenen Knorpelproben wurden für die histologische Untersuchung in Form von Hartschnittpräparaten aufbereitet. Die Auswertung der Hartschnitthistologien wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit einem Morphometriesystem (Videoplan) anhand folgender Kriterien vorgenommen:

- Auftreten von Karbonisationsphänomenen
- Breite des Karbonisationssaumes
- Breite der Kristallisationsschicht
- Breite der von erhöhtem Knochenumbau gezeichneten Schicht
- Menge an Bindegewebsneubildung.

Die ersten Versuche mit dem Laser waren aufgrund des in das Operationsgebiet einfließenden Blutes entmutigend. Dieses Blut entstammte den Gefäßen der Knochenpongiosa, die während des Laservorganges eröffnet wurden. Durch das Blut wurde das emittierte Laserlicht so stark absorbiert, dass ein weiterer effizienter Abtrag von Knorpel-Knochen-Gewebe nicht mehr stattfand. Wurde lediglich die Knochenkortikalis durchtrennt, so kam es zwar auch zur Blutung, diese war jedoch im Verhältnis zu den Blutungen aus der Spongiosa so gering, dass der Laservorgang dadurch nicht wesentlich behindert wurde bzw. diese Blutmenge durch die vorgenommenen Spülmaßnahmen leicht entfernt werden konnte.

Im weiteren Verlauf der Versuche wurde deshalb eine Gasstrahlspülung zur Entfernung des Blutes aus dem Schnittspalt und zum Schutz der Frontlinse des Spiegelgelenkarmes verwendet. Als Spülgas wurde Stickstoff gewählt, welcher mit einem Druck von 2 bar durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm in den Schnittspalt gelenkt wurde. Diese Spülung reichte zur vollständigen Entfernung des Blutes aus dem Schnittspalt nicht aus, so dass es dennoch zu einer starken Absorption des Laserlichtes durch das Blut kam.

Eine für die optimale Wirkung der Laserstrahlung am Knorpelgewebe notwendige vollständige Entfernung des Blutes aus dem Schnittspalt war auch mit Gasspülung nicht zu erreichen. Dennoch ließ sich durch den Einsatz der Gasspülung im Vergleich zu ungespülten Einsätzen des Er:YAG-Lasers eine Steigerung der Schnitttiefe erreichen.

Aufgrund der Auswertung der histologischen Präparate konnte festgestellt werden, dass die entnommenen zylinderförmigen Knorpelpräparate an den Schnittstellen keinerlei Anzeichen von Karbonisation oder Kristallisation aufwiesen, wie sie für andere Lasersysteme wie z. B. der CO₂-Laser typisch sind. Die um den Schnitt auftretende Knochenvermehrung aufgrund von Umbauprozessen war im Fall der mit dem Er:YAG-Laser operierten Gelenke nicht größer als bei den mit der herkömmlichen Fräse operierten Tieren. Resorptionserscheinungen um die Knochen-Ceravitalimplantat-Verbindungsstellen waren nicht zu erkennen.

Im Rahmen von operativen Eingriffen am Kaninchenknorpel wurde ein prozessorgesteuerter Er:YAG-Laser zum Herausschneiden von Knorpel-Knochen-Zylinder eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass dieses Kopplungssystem zum operativen Schneiden von Knorpel-Knochen-Gewebe geeignet ist. Der besondere Vorteil einer solchen Kopplung liegt in der exakten Wahl der Transplantatgeometrie, die den Operateur von den vorgegebenen meist runden Formen bislang gebräuchlicher Transplantationsinstrumentarien unabhängig macht.

Hiermit ist eine gewebesparende Entnahme mit relativ geringer Traumatisierung von zur Transplantation benötigtem gesundem Knorpel möglich.

Ferner eröffnet der Einsatz des Er:YAG-Lasers zur Bearbeitung von Knorpelgewebe den derzeit noch theoretischen Vorteil einer zumindest teilweisen Versiegelung der Schnittoberfläche. Bei den in herkömmlicher Technik gewonnenen Knorpeltransplantaten findet zumeist im Bereich der Schnittflächen ein sekundärer Ersatz der originären Knorpelsubstanz durch minderwertiges Ersatzgewebe (Faserknorpel oder Bindegewebe) statt. Diese sekundäre Degeneration des Gewebes könnte sich durch eine Versiegelung der Schnittoberfläche, wie sie beim Lasereinsatz in vitro beobachtet wurde, minimieren lassen. Infolge dessen wäre eine Verbesserung der Transplantationsergebnisse im Hinblick auf die Überlebenszeit der Transplantate denkbar. Weitere klinische Absicherung dieser Hypothese steht noch aus.

Allerdings ergeben sich beim intraoperativen Einsatz des Er:YAG-Lasers einige Probleme, die bei der Operationsplanung berücksichtigt werden müssen. Da der Er:YAG-Laser weitgehend athermisch arbeitet, kann es durch auftretende Blutung zum einen zu einer eingeschränkten Sicht, zum anderen zur Absorption der Laserstrahlung im Blut kommen, wodurch die Schneideffizienz des Lasers abnimmt. Eine Gasspülung bringt zwar Vorteile, reicht aber meistens nicht aus, um diese Problematik gänzlich zu beseitigen. Folglich ist die Anwendung des Er:YAG-Lasers grundsätzlich in Fällen zu befürworten, in denen lediglich oberflächliche Abtragung des Knorpels stattfindet.

Ein anderes, bereits angesprochenes Problem ist das Fehlen von flexiblen Fasern, die das Licht des Er:YAG-Lasers suffizient transportieren können. Es ist jedoch zu erwarten, dass aktuelle Arbeiten zur Entwicklung entsprechender flexibler Lichttransmissionssysteme hier in naher Zukunft eine Lösung bieten können.

6.2.3 Einfluss der Bestrahlung mit niederenergetischem Laserlicht auf Proteoglykanabbau im arthrotischen Kaninchenknorpel

Über die Veränderungen des Proteoglykangehaltes und damit des Glykosaminoglykangehaltes des Knorpels im Verlauf der Arthrose wurde in der Literatur einstimmig berichtet. Mit dem Fortschreiten der Arthrose nimmt der Proteoglykangehalt ab, was zu einer zunehmenden Erweichung des Knorpels führt. Der Verlußt der Glykosaminoglykane, der im Bereich der fibrillierten Knorpelbereichen am stärksten auftritt, führt zu einem Verlust der Festigkeit des Knorpels. Für den biomechanischen Ablauf bedeutet dies, dass bei Stoßbelastung der Eindringkörper tiefer in die Matrix eindringen kann. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion der Elastizität des Knorpels, da der Knorpel nach der Entlastung nicht in seine Ausgangslage zurückfedert. Die gesteigerte Verformbarkeit, die insbesondere in arthrotischen Defekten am stärksten ist, kann unter der Belastung zu Scherkräften führen, die dann die Ursache für einen gesteigerten Abrieb der Knorpelsubstanz sind. Damit kommt die „abrasive“ Wirkung der Bewegung an einem Knorpel, dessen Proteoglykangehalt reduziert ist, stärker zur Ausprägung. Die Reduktion des Glykosaminoglykangehaltes erhöht aber auch die Permeabilität des Knorpels, womit die Elektrolytveränderungen zu weiteren Veränderungen der physikalischen Eigenschaften des Knorpels führen können. In zahlreichen Studien wurden die Veränderungen der molekularen Größe der Proteoglykane, deren Glykosaminoglykaneseitenketten, und der Aggregation der Proteoglykane mit Hyaluronsäure im Verlauf der Arthrose unterschiedlich bewertet. Insgesamt herrscht Einigkeit, dass das Verhältnis Glykosaminoglykane zu Proteinen im Verlauf der Arthrose stetig abnimmt und der zunehmende Mangel an Hyaluronsäure für die verminderte Aggregation der Proteoglykane verantwortlich ist. Die Ansicht, dass in früheren Stadien die Proteoglykansynthese erhöht ist und bei fortgeschrittener Arthrose die Synthese abnimmt musste revidiert werden. Es zeigte sich, dass die Degradierung der Proteine in der frühen Phase von einer starken Synthese unreifer Proteoglykane begleitet wird. In der späteren Phasen der Erkrankung nimmt die Synthese ab, aber die gebildeten Proteoglykane sind reifer. Neben den Störungen in der Proteoglykansynthese spielen Störungen im Abbau eine wichtige Rolle. Hierbei wird eine erhöhte Aktivität von degradierenden Proteasen für den Abbau des Kernproteins und deren chondroitinsulfatreicher Areale verantwortlich gemacht. Da Chondrozyten sämtliche Enzyme für den Abbau der Proteoglykane synthetisieren können, und da im arthrotischen Knorpel erhöhte Aktivitäten dieser Enzyme vorliegen, ist dieser pathogenetische Weg verständlich. Bei dieser enzymatischen Degradation soll zunächst eine Proteolyse des Proteinskeletts der Proteoglykane an oder nahe der Hyaluronsäure-Bindungsstelle erfolgen und dann die Depolymerisation der Glykosamine ablaufen. Der Verlust der Hyaluronsäurebindungsstelle führt zum verminderten Aggregationsvermögen der Proteoglykane.

Im Rahmen folgender Studie sollte anhand eines tierexperimentellen Arthrosemodells untersucht werden, ob Bestrahlung des arthrotischen Knorpels mit Laserlicht niedriger Leistungsdichte einen Einfluss auf die Veränderungen des Proteoglykangehalts hat. Die quantitative Evaluierung dieser Veränderungen erfolgte mittels photometrischer Absorptionsmessung in Anwesenheit von Dimethylmethylenblau.

Eine quantitative Bestimmung der Proteoglykane wurde vor der Einführung der Dimethylmethylenblau-Methode mit kolorimetrischen Verfahren vorgenommen, bei denen

Glykosaminoglykane in Uronsäure überführt wurden und anschließend das chromogenetische Produkt gemessen wurde. Dieses Verfahren war zuverlässig, jedoch sehr aufwendig. Vor der Quantifizierung mussten u.a. die zur Aufbereitung von Knorpelproben benutzten Reagenzien wie z. B. Guanidin-HCl entfernt werden.

Dimethylmethylenblau wurde durch Taylor und Jeffre als ein stark metachromatischer Farbstoff für den histochemischen Nachweis von sulfatierten Glykosaminoglykanen eingeführt [Taylor 1969]. Dimethylmethylenblau ist ein kationischer Farbstoff, der sich an polyionische Moleküle, wie sulfatierte Glykosaminoglykane bindet, und dabei einen Farbstoffwechsel von blau nach purpurrot erfährt. Nach Anfärbung einer glykosaminoglykanhaltigen Lösung mit Dimethylmethylenblau wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 525 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz gilt $E = \epsilon \times c \times d$; d. h. die Extinktion (E) einer Lösung ist proportional der Konzentration (c) der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanzen, deren molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) und der Schichtdicke der Lösung (d). Die Wellenlänge von 525 nm entspricht dem Absorptionsmaximum für das Produkt der Reaktion zwischen Dimethylmethylenblau und Chondroitinsulfat.

Für die Zwecke dieser Untersuchungen wurde ein experimentelles Arthrosemodell in vivo an 42 ausgewachsenen weiblichen Kaninchen erzeugt. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch die Senatsverwaltung für Gesundheit (Genehmigungsnummer G0023/92).

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen (A-D) aufgeteilt.

Die Gruppe A bestand aus 18 Kaninchen, die einer Gelenkinstabilitätsoperation unterzogen wurden. Nach 3, 7, 17, 20, 30, 40 und 60 Tagen wurde der arthrotische Knorpel pathomorphologisch aufgearbeitet und die Messung der Glykosaminoglykane vorgenommen.

Auf Knorpelveränderungen dieser Gruppe sollte die Veränderung des Glykosaminogehalts im Verlauf der Arthrose evaluiert werden. Die makroskopischen Veränderungen wurden gemäß den Kriterien zur Einteilung von Knorpelveränderungen am humanen Knorpel beurteilt.

Für die makroskopische Verlaufskontrolle jenseits von 60 Tagen wurden jeweils ein Tier 3, 4, 6 und 8 Monate post operationem untersucht. Diese Tiere wurden aus der Gruppe A zur photometrischen Messung herausgenommen, da ab dem 2. Monat die Veränderungen so ausgeprägt waren, dass eine standardisierte Knorpelentnahme aus der Hauptbelastungszone nicht mehr möglich war.

Die Gruppe B bestand aus 8 Kaninchen, die der initialen Gelenkinstabilitätsoperation unterzogen wurden. 30 Tage post operationem wurde eine Arthrotomie und Gelenkspülung durchgeführt. Nach weiteren 7 Tagen erfolgte die pathomorphologische Aufarbeitung der Knorpelpräparate und Glykosaminoglykanmessung mittels Dimethylenblau-Methode. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe gegenüber Gruppe C und D, da hier zur Laserbestrahlung ebenfalls eine Arthrotomie durchgeführt werden musste.

Die Gruppe C bestand aus 6 Kaninchen, bei den 30 Tage nach der initialen Gelenkinstabilitätsoperation eine Arthrotomie und Knorpelbestrahlung mit Diodenlaser mit Energiedichte von 1 J/cm^2 durchgeführt wurde. Die pathomorphologische Aufarbeitung der Knorpel und Messung der Glykosaminoglykane erfolgte 7 Tage nach der zweiten Operation.

Die 8 Kaninchen der Gruppe D wurden dem gleichen Prozedere wie die Kaninchen der Gruppe II unterzogen, wobei die Energiedichte der Laserstrahlung 4 J/cm^2 betrug.

Operationstechnik

Operiert wurde unter streng aseptischen Bedingungen am jeweils linken Bein des Kaninchens. Zur Operationsvorbereitung gehörte die Rasur des Beines, Lagerung in Rückenlage, Hautdesinfektion mit Polyvidon-Jodlösung und die Abdeckung des Operationsgebietes mit sterilen Tüchern. Zur Analgesie wurde den Tieren präoperativ 20-25 mg/kg Körpergewicht Ketamin-HCl intramuskulär injiziert. Anschließend wurde den Tieren über die V. auricularis 2,5-3 ml Nembutol verabreicht. Während der Narkose erfolgte eine Dauerinfusion mit Ringer-Lactatlösung. Blutspeeren oder Blutleeren wurden nicht angelegt. Intraoperative Blutstillung erfolgte mit einem monopolaren Elektrokoagulator. Wundspülungen wurden mit einer Ringer-Lactatlösung durchgeführt. Eine perioperative Antibiotikaphylaxe erfolgte bei jedem Eingriff mit Tardomycel in einer Dosierung von 0,1 ml/kg KG. Die Operationswunde wurde mit einer Rückstichnaht der Gelenkkapsel mittels Dexon 4/0, Einzelknopf-Subkutannaht mittels Dexon 4/0 sowie Einzelknopf-Kutannaht mittels Prolene 5/0 verschlossen. Am 14. postoperativen Tag wurde das Nahtmaterial entfernt.

Gelenkinstabilitätsoperation

Nach standardisierter Vorbereitung erfolgte eine ca. 4-5 cm lange Hautinzision anteromedial. Nach Durchtrennung der Subkutanfaszie und unterminieren derselben von der Kutis und des Perimysiums wurde die Faszie zur Darstellung der Gelenkkapsel angeklemt. Die Gelenkkapsel wurde medial der Patella eröffnet. Bei Extensionstellung des Kniegelenkes konnte die Patella unter Druck nach lateral luxiert werden. Durch anschließende Flexion des Gelenkes wurde die Kniescheibe in Luxationsstellung fixiert. Unter Schonung der Muskulatur erfolgte die Anklebung und Durchtrennung des medialen Kollateralbandes. Danach konnte der mediale Meniskus mit einer Klemme luxiert und im Bereich des Hinterhorns reseziert werden. Das vordere Kreuzband wurde anschließend unter maximaler Außenrotation des Unterschenkels abgesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der stark vaskularisierte Hoffersche-Fettkörper nicht verletzt wurde. Nach ausgiebiger Wundspülung erfolgte schichtweise der Wundverschluss.

Sekundäroperation – Arthrotomie und Gelenkspülung (Gruppe B)

Das Kniegelenk wurde nach standardisierter Vorbereitung eröffnet. Nach Eröffnung erfolgte eine ausgiebige Spülung mit einer Ringer-Lactatlösung und der Wundverschluss.

Sekundäroperation und Bestrahlung mit Laser (Gruppe C und D)

Nach standardisierter Operationsvorbereitung wurde das Kniegelenk von anteromedial in gleicher Weise wie bei der ersten Operation eröffnet. Das Gelenk wurde gespült und in 90°-Flexionsstellung mittels zweier Stative fixiert. Die Patella wurde vorher lateral des Gelenkes in

Luxationsstellung fixiert. Der Abstand vom Femurkondylus bis zur Lochblende des Lasers betrug 14 cm. Vor jeder Bestrahlung wurde mit einem Leistungsmessgerät (Modell 7101/Scitec Instruments) die Leistung gemessen. Der Laserstrahl traf senkrecht auf den medialen Femurkondylus. Nach der Bestrahlung erfolgte der Wundverschluss.

Laser

Die Bestrahlung erfolgte mit einem cw-Diodenlaser mit der Emissionswellenlänge von 692,6 nm (TOLD 9140/Toshiba). Die Ausgangsleistung betrug 20 mW.

Parameter für die Laserbestrahlung von Gruppe C und D sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Parameter der Laserbestrahlung (Gruppe C und D)

	Leistungsdichte	Bestrahlungszeit	Energiedichte
Gruppe C	4,5 mW/cm ²	222 s	1 J/cm ²
Gruppe D	4,5 mW/cm ²	900 s	4 J/cm ²

Nachuntersuchung

Die Versuchstiere, bei denen die Veränderungen im Verlauf der Arthrose evaluiert werden sollten, wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mit einer Überdosis von Pentobarbital eingeschläfert.

Die Einschläferung der Tiere zur Untersuchung des Einflusses von Laserbestrahlung erfolgte 7 Tage nach dem zweiten Eingriff, d. h. 37 Tage nach der initialen Gelenkinstabilitätsoperation.

Makroskopische Befunderhebung

Der makroskopische Sektionsbefund wurde mittels Operationsmikroskop (Opmi 65/Zeiss) erhoben. Die Bewertung der Schwere des Knorpelschadens erfolgte nach der Outerbridge-Klassifikation:

- Grad I: Verfärbung des Knorpels mit Erweichung, evtl. oberflächliche Auffaserung
- Grad II: Defektbildung mit Einrissen (Lefzen und Dellenbildung)
- Grad III: Tiefe Defekte mit Einrissen bis zu Knochen, Ulkusbildung, tiefere Flakes
- Grad IV: Freiliegender und sklerosierter subchondraler Knochen

Entnahme der Probeexzisionen

Nach der makroskopischen Befunderhebung wurden die Stanzbiopsien aus der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondylen beider Kniegelenke entnommen, im flüssigen Stickstoff fixiert und bei -80°C gelagert. Vor dem Proteoglykanbestimmungsverfahren erfolgte die Bestimmung des Nassgewichtes der gefrorenen Proben.

Extraktion der Proteoglykane mit Guanidin-Hydrochlorid

Zur Extraktion der Proteoglykane wurde ein Verfahren mit Guanidin-HCl und isopyknischen CsCl-Dichtegradienten nach Sajdera und Hascall angewendet [Sajdera 1969].

Die Extraktionslösung bestand aus 4 M Guanidin-HCl und aus einer Lösung A, die wie folgt zusammengesetzt war:

0,1 M 6-Aminohexanoicssäure (A6763/Sigma)

0,01 M Na_2EDTA (E1644/Sigma)

0,05 M Natriumacetat, pH 6,0 (S2889).

Kurz vor dem Gebrauch wurden hinzugefügt:

1 mM Benzanidine-HCl (B6506/Sigma)

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (P7626/Sigma)

10 mM N-ethylmaleinide (E3876/Sigma).

Die Knorpelproben wurden mit 15 vol. Extraktionslösung pro Gramm Feuchtgewicht versetzt und über 12 Stunden bei 4°C mit einem Magnetrührer (Modell 5436/Eppendorf) gerührt. Anschließend konnten unlösliche Reste mit einer Zentrifuge (Labofuge 400R/Heraeus) bei 45000 g für 20 min entfernt werden. Hierdurch erhält man eine Lösung, die 10-50% der Proteoglykane des Gewebes enthält. Zur weiteren Reinigung war eine Dialyse und Überführung der Lösung in assoziative Bedingungen notwendig. Hierfür wurde die Lösung mit der 7fachen Menge an Lösung A verdünnt und 20 Stunden bei 4°C gelagert. Nach der Dialyse betrug die Konzentration von Guanidin-HCl 0,5 M. Hierbei reagrieren 50-90% der Proteoglykane [Heinegard 1972]. Anschließend wurde CsCl dazugegeben, um eine initiale Dichte von 1,69 g/ml zu erreichen. Die Lösung wurde danach in einer Ultrazentrifuge (L2-65B/Beckmann) bei 40000 U/min (200000 g) bei 20°C für 44 Stunden zentrifugiert. Die Proteoglykanfraktion im unteren Fünftel der Proberöhrchen wurde abpunktiert.

Spektrophotometrische Messungen

Vor der Durchführung der spektrophotometrischen Messungen wurden die Proben bis jeweils 50 μ l mit 1%-igem BSA-PBS(bovine serum albumin in phosphate-buffered saline)-Medium aufgefüllt, um Farbkonstanz zu gewährleisten.

Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l Dimethylmethylenblau-Lösung. Die angefärbte Lösung wurde in eine Küvette platziert und bei der Wellenlänge von 530 nm im Spektrophotometer (UV1202/UV-VIS/Shimadzu) photometrisch gemessen. Jede Probe wurde drei Mal ausgewertet und der errechnete Mittelwert wurde für die statistische Ausarbeitung verwendet.

Darstellung der Arthrose im Zeitverlauf

Makroskopische Beobachtungen

Die ersten makroskopischen Veränderungen konnten 17 Tage nach der Gelenkinstabilitätsoperation beobachtet werden. Es fanden sich dezente Erweichungen und Verfärbungen der medialen Femurgelenkfläche entsprechend Outerbridge Grad I. Die Gelenke, die nach 20 Tagen untersucht wurden, zeigten Verfärbungen und Dellenbildung sowie Einrisse (Outerbridge I und II). Am 40. postoperativen Tag fand sich bei der Sektion eine Erweichung mit Verfärbung sowie eine Aufrauung in der Hauptbelastungszone mit angedeuteter Ulkusbildung, so dass dieser Situs dem Grad III zugeordnet wurde. Nach zwei Monaten fanden sich neben Erweichung und gelb-brauner Verfärbung Ulkusbildung und tiefgreifende Fissuren, die auf die Bereiche außerhalb der Hauptbelastungszone übergriffen (Grad III-IV).

Ab dem dritten Monat waren die vorgefundenen Veränderungen dem Grad IV zuzuordnen. Es zeigten sich osteophytäre Ausziehungen im Kondylenbereich nach drei Monaten und freiliegender sklerosierter Knochen in der Hauptbelastungszone nach vier Monaten. Nach sechs Monaten war der freiliegende Knochen auch außerhalb der Hauptbelastungszone sichtbar. Im achten Monat lagen schwerste arthrotische Veränderungen vor, die durch eine vollständige Eburnisierung der Gelenkfläche gekennzeichnet waren.

Spektrophotometrische Messungen

Die gemessenen Absorptionswerte der Knorpelproben der Gruppe A wurden in der Abb. 73 als Funktion der Zeit dargestellt.

Absorption

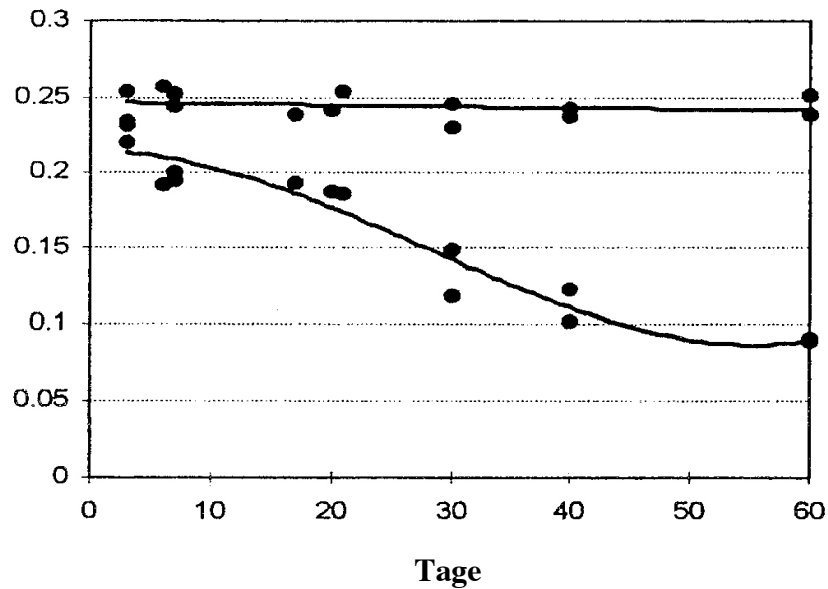


Abb. 73: Extinktionswerte für Knorpelproben (Gruppe A), gemessen 3 bis 60 Tage nach der Gelenkinstabilitätsoperation. Obere Reihe: gesundes Knie; Untere Reihe: arthrotisches Kniegelenk.

Ab dem 7. Tag sind deutlich geringere Absorptionswerte bei arthrotisch geschädigtem Knorpel über den gesamten Zeitverlauf zu erkennen. Kein gemessener Extinktionswert der Knorpelproben aus geschädigten Kniegelenken lag über den Werten, die für die gesunde Seite gemessen wurden. Die Abnahme der Absorptionswerte war nicht linear. Die größten Unterschiede traten in der Zeit zwischen dem 20. und dem 40. postoperativen Tag auf. In diesem Zeitraum kam es zu deutlichster Veränderung des Proteingehaltes. Dagegen stagniert die Abnahme der Absorption bzw. des Proteoglykangehaltes ab dem 40. postoperativen Tag. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Tiere in Gruppen 1 bis 3 30 Tage der Belastung ausgesetzt, da in dieser Zeit die Veränderungen am deutlichsten ausgeprägt und somit am einfachsten zu erkennen sind.

Einfluss der Laserbestrahlung auf arthrotischen Knorpelschaden

Makroskopische Veränderungen

Die Einteilung der Veränderungen nach Outerbridge in den Gruppen B (Kontrollgruppe), C (Laserbestrahlung mit 1 J/cm²) und D (Laserbestrahlung mit 4 J/cm²) sind in den Tabellen 10, 11 und 12 dargestellt.

Gruppe B

Bei 30 Tagen Belastung nach der Gelenkinstabilitätsoperation trat am häufigsten eine arthrotische Veränderung des Kniegelenks von Grad III, gefolgt von Grad II auf. Schädigung von Grad I bzw. IV konnte in keinem der untersuchten Fällen beobachtet werden.

Tabelle 10: Arthrose-Scores in Gruppe B (Kontrollgruppe)

Arthrose-Grad	Anzahl	Prozentanteil
I	0	0
II	2	25
III	6	75
IV	0	0
Total	8	100

Gruppe C

Der Skalenwert II ist mit einer Häufigkeit von 50% der am häufigsten vergebene Skalenwert. Es finden sich 25% mehr Befunde von Grad II gegenüber der Kontrollgruppe. In Gruppe C wurde der Schweregrad III mit einer Häufigkeit von 37,5% beobachtet, was im Vergleich zu Kontrollgruppe (75%) auf eine deutliche Abnahme der Schweregrades der Knorpelschädigung nach Laserbestrahlung mit der Energiedichte von 1 J/cm² hinweist.

Tabelle 11: Arthrose-Scores in Gruppe C

Arthrose-Grade	Anzahl	Prozentanteil
I	1	12,5
II	4	50
III	3	37,5
IV	0	0
Total	8	100

Gruppe D

Der Skalenwert II ist mit einer Häufigkeit von 50% der am häufigsten vergebene Skalenwert. Es finden sich 25% mehr Befunde von Grad II gegenüber der Kontrollgruppe. In Gruppe D wurde der Schweregrad III mit einer Häufigkeit von 25% festgestellt, was im Vergleich zu Kontrollgruppe (75%) und Gruppe C (37,5) auf eine deutliche Abnahme der Schweregrades der Knorpelschädigung nach Laserbestrahlung mit der Energiedichte von 4 J/cm² hinweist.

Somit hat die Laserbestrahlung einen deutlichen Einfluss auf den Schweregrad der Knorpelschädigung, wobei die Bestrahlung mit der Energiedichte von 4 J/cm² einen günstigeren Einfluss auf den Grad der Knorpelschädigung als die Bestrahlung mit der Energiedichte von 1 J/cm² hat.

Tabelle 12: Arthrose-Scores in Gruppe D

Arthrose-Grad	Anzahl	Prozentanteil
I	2	25
II	4	50
III	2	25
IV	0	0
Total	8	100

Spektrophotometrische Messungen

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messungen in den Gruppen B (Kontrollgruppe), C (Laserbestrahlung mit 1 J/cm²) und D (Laserbestrahlung mit 4 J/cm²) sind in den Tabellen 13, 14, und 15 dargestellt.

Gruppe B

Beim Betrachten der Minima und Maxima der Extinktionswerte der gesunden und arthrotischen Kniegelenke fällt auf, dass die Extinktionswerte und somit der Proteoglykangehalt der Proben aus arthrotisch veränderten Knorpeln deutlich unterhalb der Werte für den gesunden Knorpel liegen. Entsprechend den Unterschieden in Absorptionsmaximum, -minimum, und -mittelwert ist 30 Tage nach einer Kniegelenkinstabilitätsoperation mit einer Abnahme der gemessenen Absorptionswerte zwischen 34 und 39% zu rechnen.

Tabelle 13: Photometrische Messergebnisse in Gruppe B (Kontrollgruppe)

	Anzahl	Bereich	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
nicht operierte Kniegelenke (rechts)	8	0,035	0,223	0,258	0,243	0,012
operierte Kniegelenke (links)	8	0,03	0,14	0,17	0,157	0,011

Gruppe C

Die Minima und Maxima der Extinktionswerte der arthrotischen, mit dem Laser bei 1 J/cm² bestrahlten Kniegelenke liegen unterhalb der Extinktionswerte, die für den gesunden Knorpel gemessen wurden. Die Differenz der Absorptionsminima (32%) ist kleiner als die Differenz der Absorptionsmaxima der Kontrollgruppe (39%). Die Unterschiede der Absorptionsmaxima sind in Gruppe I und II gleich hoch (34%).

Der Mittelwert der Extinktionswerte in Gruppe C ist auf der arthrotischen Seite um 33% niedriger als auf der kontralateralen, ungeschädigten Seite. Diese Differenz ist um 2% niedriger als die entsprechende Differenz in der Kontrollgruppe.

Bei einer Laserbestrahlung mit einer Energiedichte von 1 J/cm² ist im Mittelwert eine um 0,007 höhere Absorption gegenüber den Messungen für die geschädigten Kniegelenke der Kontrollgruppe beobachtet worden. Dies entspricht einem 4,7% höheren durchschnittlichen Extinktionswert. Beim t-Test für ungepaarte Stichproben wurde festgestellt, dass sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 25,6% (p=0,256) der Einfluss von einer Laserbestrahlung mit der Energiedichte von 1 J/cm² in höheren Absorptionswerten widerspiegelt. Es konnte zwar ein positiver Einfluss der Laserbestrahlung auf arthrotische Gelenkschäden beobachtet werden, aber bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ist dies statistisch nicht signifikant.

Tabelle 14: Photometrische Messergebnisse in Gruppe C

	Anzahl	Bereich	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
nicht operierte Kniegelenke (rechts)	8	0,070	0,213	0,283	0,246	0,026
operierte Kniegelenke (links)	8	0,038	0,145	0,183	0,164	0,014

Gruppe D

Die gemessenen Extinktionswerte für den Knorpel der arthrotischen, mit dem Laserlicht bei 4 J/cm² bestrahlten Kniegelenke liegen auch in Gruppe D unterhalb des Wertebereiches für gesunden Knorpel der Gegenseite. Der Unterschied zwischen den Minima der beiden Kniegelenkseiten betrug nur 25% und zwischen den Maxima 25%.

Der Unterschied zwischen den Mittelwerten beider Seiten beträgt 0,06 auseinander. Dies sind 25% des Mittelwertes für Knorpel aus nicht operierten Kniegelenken in Gruppe D. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten für geschädigte Gelenke in den Gruppen B und D beträgt 0,024 zugunsten der Kniegelenke, die mit einer Energiedichte von 4 J/cm² behandelt wurden. Das entspricht 15,2% des Mittelwertes der Kontrollgruppe. Somit hat die Laserbestrahlung mit der Energiedichte von 4 J/cm² einen größeren Einfluss auf die Absorptionswerte bzw. den Proteoglykangehalt als die Bestrahlung mit der Energiedichte von 1 J/cm². Dieser hier beobachtete positive Lasereinfluss bei einer Energiedichte von 4 J/cm² auf die gemessenen Extinktionswerte zeigt sich, anders als bei der Bestrahlung mit der Energiedichte von 1 J/cm², als statistisch signifikant ($p > 0.001$) gegenüber der Kontrollgruppe.

Tabelle 15: Photometrische Messergebnisse in Gruppe D

	Anzahl	Bereich	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
nicht operierte Kniegelenke (rechts)	8	0,034	0,224	0,258	0,241	0,013
operierte Kniegelenke (links)	8	0,021	0,171	0,192	0,184	0,007

6.2.4 Ultrastrukturelle Veränderungen eines experimentellen Knorpelschadens unter dem Einfluss der Bestrahlung mit Laserlicht niedriger Leistungsdichte

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines tierexperimentellen Kaninchenmodells die Arthroseentstehung und den Arthroseverlauf in Abhängigkeit von der Zeit darzustellen. Dabei sollte die Zeit- und Arthrosegradabhängigkeit der makroskopischen sowie mikroskopischen und immunhistochemischen Veränderungen bei der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Bereich der Kollagene und der Glycoproteine evaluiert werden. Durch histochemische Verfahren sollten speziell die Expression der Kollagene I, II, IV und VI sowie die Glycoproteine Tenascin und Fibronectin nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Bestrahlung mit einem Laser niedriger Leistungsdichte und einer Wellenlänge von 692,6 nm auf den tierexperimentell entstandenen Knorpelschaden untersucht werden, wobei zwei Energiedichten-Laser-Gruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden sollten. Nach operativ erzeugter Gelenkinstabilität sollte ein progredienter Verlauf in der Schwere der arthrotischen Knorpelveränderungen aufgezeichnet werden. In einem Zeitraum von 10 Tagen bis 8 Monate postoperativ sollten die Veränderungen der Morphologie durch Laserbestrahlung mit Wellenlänge von 692,6 nm und einer Energiedichte von 1 J/cm² und 4 J/cm², sieben Tage nach Bestrahlung gegenüber einer nicht bestrahlten Kontrollgruppe evaluiert werden. Zum Nachweis der Kollagene I, II, IV und VI sowie der Glycoproteine Tenascin und Fibronectin sollten dabei an Paraffin- und Kryoschnitten des arthrotischen Gelenkknorpels immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

Nach Genehmigung der Tierversuche durch die Senatsverwaltung (Genehmigungsnummer GOO23/92) dienten 16 weibliche Kaninchen mit ausgewachsenem Skelettsystem als Modell zur Untersuchung einer experimentellen Osteoarthrose. Für die Untersuchungen zur Wirkung von Low-Level-Laser auf vorgeschädigtem Knorpel in vivo wurden 29 Kaninchen operiert. Bei allen Tieren wurde operativ das mediale Längsband durchtrennt, der mediale Meniscus entfernt und das vordere Kreuzband durchtrennt und entfernt. Die Tiere der Voruntersuchungen und der Kontrollgruppe wurden nach 10 Tagen, 20 Tagen, 37 Tagen, 2, 3, 4, 6 und 8 Monaten nachuntersucht und nekropsiert. Die Gruppe 0 bestand aus neun Tieren und wurde als Kontrollgruppe mit den Bestrahlungsgruppen verglichen. Es wurde 30 Tage nach der Instabilitätsoperation die Kaninchen ein zweites Mal operiert, indem unter Narkose das voroperierte Gelenk eröffnet und debridiert wurde. In der Gruppe 1, die aus zehn Tieren bestand, wurden die arthrotischen Gelenke, 30 Tage postoperativ, arthrotomisch durch Low-Level-Laser mit einer Energiedichte von 1 J/cm² bestrahlt. In der Gruppe 2 mit zehn Tieren wurden die arthrotischen Gelenke 30 Tage nach der ersten Operation arthrotomisch durch Low-Level-Laser mit einer Energiedichte von 4 J/cm² bestrahlt. Der verwendete Laser war ein Diodenlaser (TOLD 9140 / Toshiba) mit einer Wellenlänge von 692,6 nm, einem ovalen Strahlungsprofil und einer maximalen Ausgangsleistung von 20 mW. Der kollimierte Laserstrahl wurde über ein Mikroskopobjektiv (Modell 170/-10/025 / Leitz) mit zehnfacher Vergrößerung aufgeweitet. Danach wurde der aufgeweitete Laserstrahl durch eine geschwärzte Lochblende deren Durchmesser 0,3 cm betrug geschickt. Die Bestrahlungsebene befand sich in einer Entfernung von 14 cm von der Lochblende. In dieser Ebene wurde mittels eines Messgerätes (Modell 66 XLA / Photodyne) ein Strahlungsprofil des Lasers erstellt. Die Gesamtausgangsleistung wurde durch ein Leistungsmessgerät (Modell 7101 / Scitec Instruments) vor jeder Bestrahlung bestimmt. Die Leistungsdichte betrug 4,5 mW/cm². Die Bestrahlungszeit lag in der Gruppe, die

mit der Energiedichte von 1 J/cm² bestrahlt wurde, bei 222 s und in der Gruppe, die mit der Energiedichte von 4 J/cm² bestrahlt wurde, bei 900 s. Der Experimentaufbau wurde in der Abb. 74 dargestellt.

Der makroskopische Sektionsbefund wurde unter Sicht eines Operationsmikroskops (Modell Opmi 65 / Zeiss) erhoben. Die Schwere des Knorpelschadens wurde nach der Outerbridge-Klassifikation beurteilt.

Aus der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondylen sind kleine Stanzbiopsien entnommen worden. Diese wurden in flüssigem Stickstoff fixiert und bei -80°C gelagert. Nach Entfernung der Weichteile und Entnahme der Kniegelenke erfolgte die Fixierung der Präparate in 4%-igem Paraformaldehyd mit 0,1 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,2-7,4 über 24 Stunden bei Raumtemperatur und 4°C. Nach Entkalkung des Knochens und Einbettung in Paraffin wurden für die Lichtmikroskopie Saggitalschnitte durch den medialen Femurkondylus in der Dicke von 6 µm angefertigt. Nach Färbung mit Hämatoxylin-Erythrosin, Toluidinblau und Alcianblau 8 GX mit jeweils kritischer Elektrolytkonzentration erfolgte die Beurteilung des Knorpelschadens anhand des histomorphologischen Scoringsystems nach Mankin und Reimann. Der Antigennachweis für die immunhistochemische Auswertung am Paraffinpräparat erfolgte mit der APAAP(Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-Technik. Zum Antikörpernachweis wurden monoklonale Anti-Human-Kollagen Typ VI-Antikörper (Chemicon) in einer Verdünnung 1:50 mit 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 30-minütiger Entwicklerlösung verwendet. Ebenso wurden monoklonale Anti-Human-Tenascin-Antikörper (SIGMA) mit einer Verdünnung 1:100 bei 37°C und 30-minütiger Entwicklerlösung sowie monoklonale Anti-Human-Fibronectin-Antikörper (Chemicon) mit einer Verdünnung von 1:75 bei 37°C und 10-minütiger Entwicklerlösung verwendet.

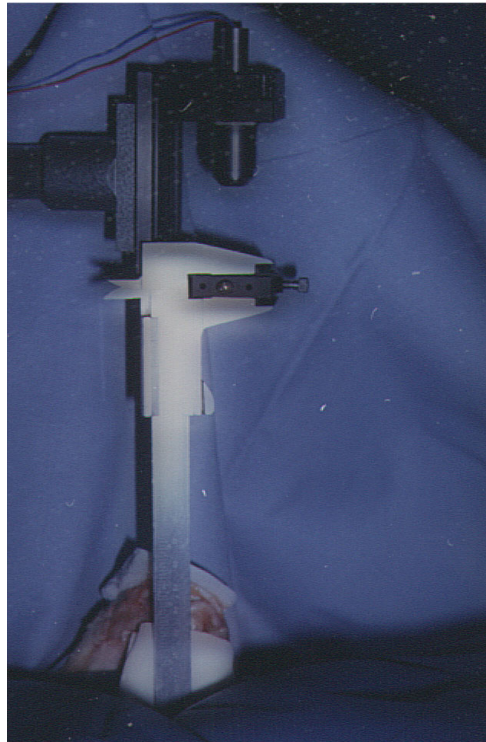


Abb. 74: Arthrotomische Laserapplikation: An einem Stativ der Laseraufbau mit von oben Toshiba-Laser, Leitz-Objektiv, Lochblende mit daran befestigter Schublehre und im Abstand von 14 cm Bestrahlungsebene mit medialem Femurkondylus.

Bei der statistischen Auswertung erfolgte zunächst die makroskopische Befunderhebung nach Outerbridge. Hierbei wurden jeweils drei histologische Schnitte der Hauptbelastungszone und der Nicht-Hauptbelastungszone in dem histomorphologischen Scoringssystem bewertet und die Daten mit dem Auswertungsprogramm SPSS 6.1 für APPLE-Macintosh bearbeitet. Der Pearson Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um den Zusammenhang zwischen Energiedichte der Laserbehandlung und deren Auswirkung auf die verschiedenen Parameter zu evaluieren. Unter Durchführung einer multivariaten Varianzanalyse (Manova) ist der Einfluss der Energiedichte der Laserbestrahlung auf die einzelnen Parameter erfasst worden.

Entstehung des Arthrosemodells

Bei den makroskopischen Knorpelveränderungen zeigten sich im 8. Monat postoperativ schwerste arthrotische Veränderungen, diese waren durch eine vollständige Eburnisierung der Gelenkfläche gekennzeichnet. Abb. 75 zeigt den Verlauf der Arthrose vom 10. Tag bis zum 8. Monat.

Makroskopische Befunde

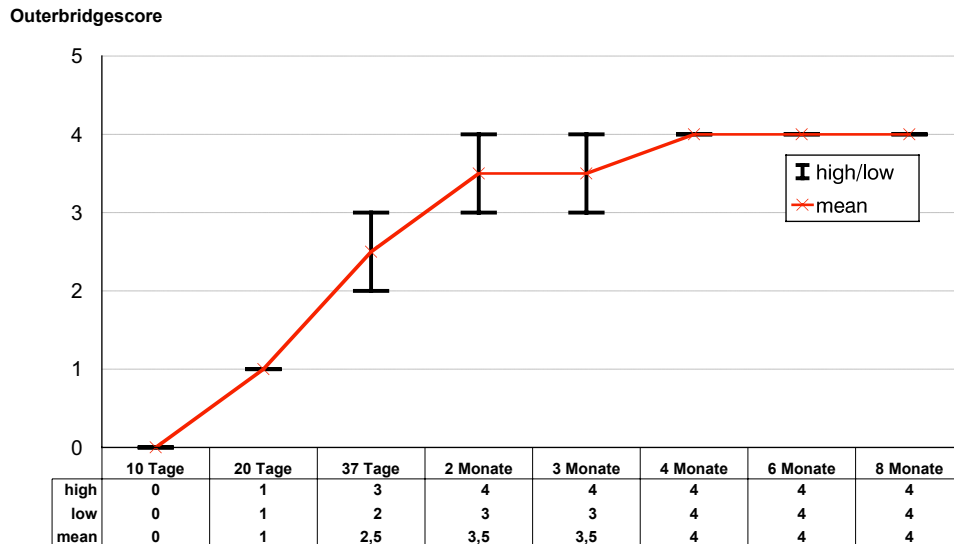


Abb. 75: Ergebnisse der makroskopischen Befunde der medialen Femurkondylen in Abhängigkeit von der postoperativen Belastungszeit der Kaninchen. Darstellung der erhobenen makroskopischen Befunde nach Outerbridge (Mittelwert) in Abhängigkeit von der postoperativen Überlebenszeit. Zu jedem postoperativen Zeitpunkt n=2.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung zeigten sich am 10. postoperativen Tag Fibrillationen und Fissuren in der Hauptbelastungszone. Einzelne Chondrozytennekrosen und leere Zelloberflächen konnten oberflächennah in der apikalen Superficialzone beobachtet werden. Ab dem 20. Tag post operationem zeigte der Gelenknorpel Nekrosen mit ausgedehntem Verlust der Superficialzone. Fissuren reichten bis zur Radiärzone, die Alcianophilie der Grundsubstanz war stark vermindert. Im Vergleich zum gesunden hyalinen Kaninchenknorpel (Abb. 76) war die Chondrozytendichte geringgradig verringert.

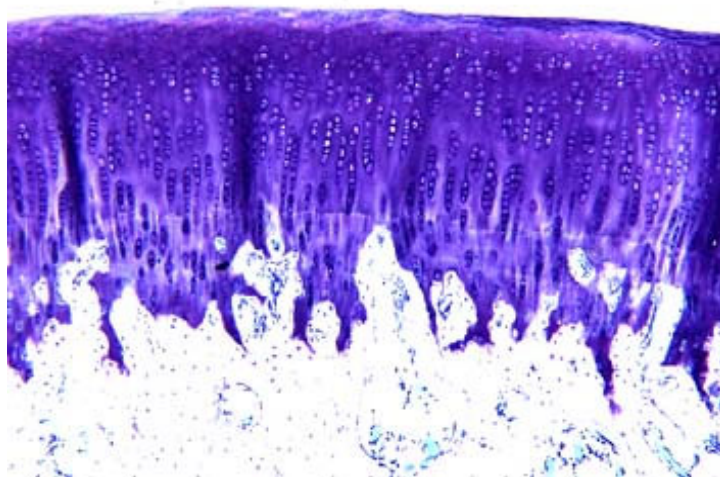


Abb. 76: Gesunder hyaliner Kaninchen gelenkknorpel, 35fache Vergrößerung, Färbung HE (Haematoxylin-Erythrosin).

Ab dem 2. Monat waren die Veränderungen in der Hauptbelastungszone sehr stark ausgeprägt, wobei Superficial- und Übergangszone verlorengegangen waren. Nur an der Basis waren noch vitale Chondrozyten, zum Gelenkraum ragten asbestierte Knorpelzotten, die überwiegend aus großen Clustern bestanden; der subchondrale Knochen zeigte eine ausgeprägte Verdickung und Verdichtung (Abb. 77).

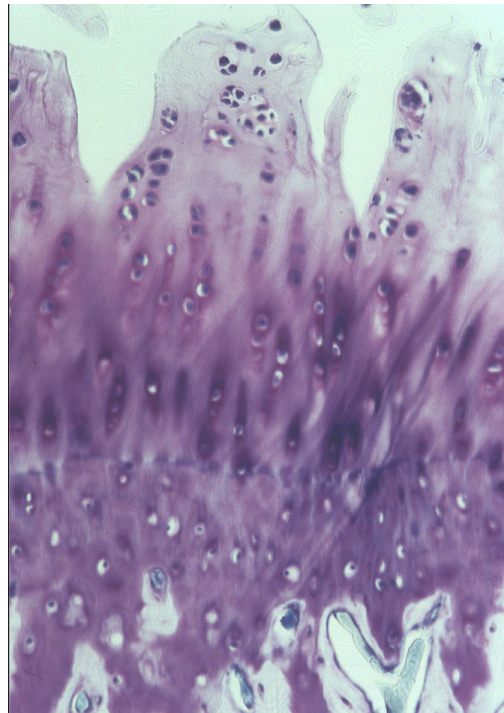


Abb. 77: Arthrotischer Gelenkknorpel der Hauptbelastungszone 2 Monate postoperativ. Es zeigt sich hypertrophierter verkalkter Knorpel mit großen Clustern und subchondraler Sklerose des Knochens, 35fache Vergrößerung, Toluidinblaufärbung.

In der Hauptbelastungszone war nach 6 Monaten postoperativ kein Knorpel mehr zu sehen, an der Oberfläche zeigte sich geringgradige Pannusbildung. Der subchondrale Knochen war angefüllt mit Granulationsgewebe, in der Nicht-Hauptbelastungszone zeigten sich hypertropher verkalkter Knorpel und asbestierte Knorpelzotten mit Chondrozytennekrosen, leeren Zellofen und Clusterbildungen.

Bei den histomorphologischen Scoreergebnissen zeigte sich im Vergleich der Mittelwerte von jeweils 2 Versuchstieren für jeden postoperativen Überlebenszeitraum, dass der arthrotische Prozess in den Hauptbelastungszonen wesentlich rasanter verläuft als in den Nicht-Hauptbelastungszonen. Die Knorpeldegeneration ist komplett, wenn die histomorphologischen Gesamtscores der zwei Belastungszonen ab dem 6. Monat den Wert 44 erreichen; dieses entspricht dem makroskopischen Korrelat der vollständigen Knochenglatze (Abb. 78).

Histomorphologische Scores Grad der Knorpelschädigung

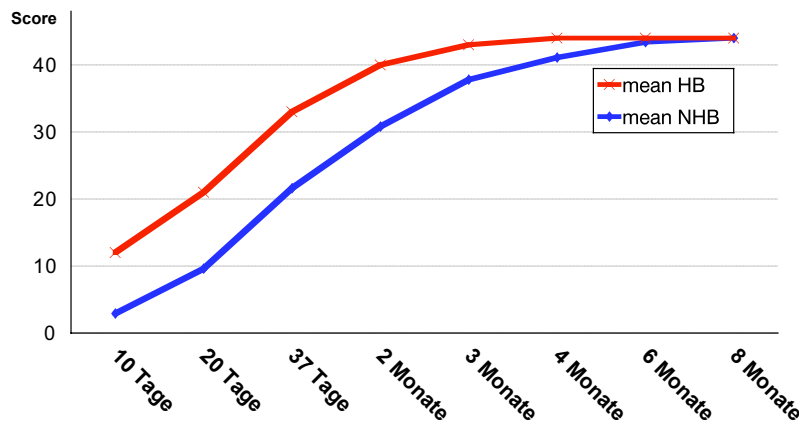


Abb. 78: Grad der Knorpelschädigung: Vergleich der Mittelwerte der histomorphologischen Gesamtscores HB und NHB in Abhängigkeit von der postoperativen Überlebenszeit.

Bei der immunhistochemischen Auswertung am Paraffinpräparat mittels APAAP-Technik wurden zunächst Kollagen Typ II und Typ VI untersucht. Mit hoher Spezifität konnte im gesunden Gelenkknorpel immunhistochemisch in allen Schichten Kollagen Typ VI nachgewiesen werden (Abb. 79).

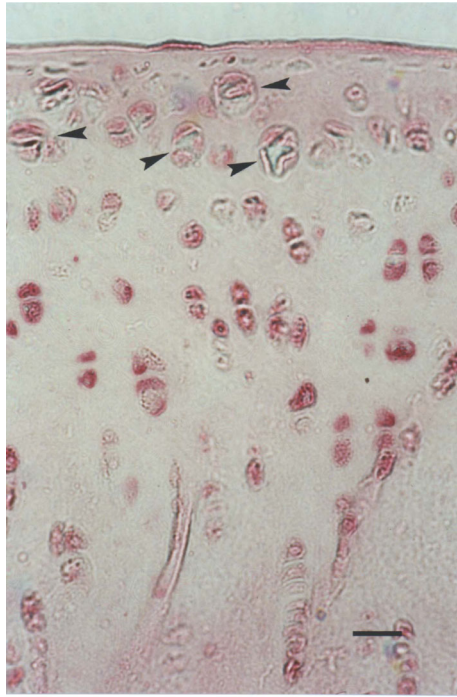


Abb. 79: Gelenknorpel mit perizellulärem Kollagen Typ VI (Pfeile). Kollagen VI-positive Zellen zeigen sich selten in der Superficialzone, aber vermehrt in der Übergangs- und Radiärzone; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:50 in APAAP-Technik.

Über die einzelnen Wochen und Monate der Arthroseentstehung zeigte sich zunehmend, dass sich im Bereich von Chondrozytennekrosen perizellulär kein Kollagen Typ VI mehr nachweisen ließ. Mit zunehmendem Arthrosestadium zeigt sich in der Hauptbelastungszone eine weitere Abnahme der Kollagen VI-positiven Zellen in den oberen Schichten, jedoch in den zunehmend desorganisierten Radiärzonen nahm die Intensität der APAAP-Färbung zu. Die nicht positiven Zellen der Übergangszone erschienen größer und ballonierter, um die Chondrozytencluster war weiterhin kein Kollagen VI nachweisbar. In der Nicht-Hauptbelastungszone dagegen zeigte sich eine relative Zunahme der Kollagen VI-positiven Zellen. Ab dem 2. postoperativen Monat waren die meisten Chondrozyten der Hauptbelastungszone abhängig von der Zellmorphologie negativ für Kollagen VI. Speziell die in den Knorpelzotten vorkommenden Chondrozytencluster und ballonierete atypische Chondrozyten exprimierten perizellulär kein Kollagen VI (Abb. 80).

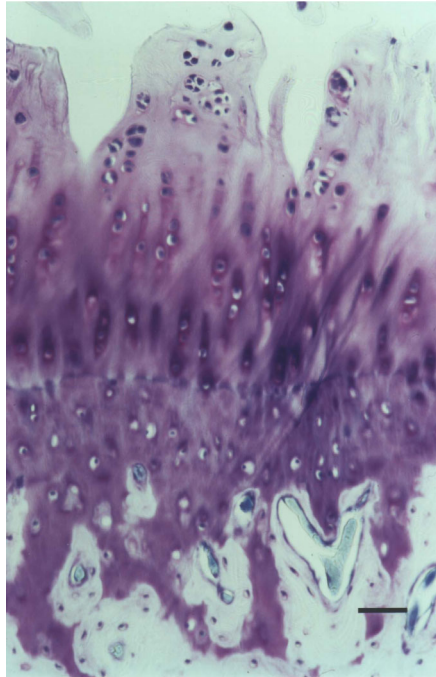


Abb. 80: Hier ist der Knorpel 2 Monate postoperativ in Knorpelzotten dargestellt, vereinzelt findet perizellulär die Expression von Kollagen-VI statt. 140fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:50 in APAAP-Technik.

Tenascin konnte im gesunden hyalinen Gelenkknorpel des Kaninchens am Paraffinschnitt als diskrete interterritoriale Färbung der Matrix mit Betonung der Radiär- und Übergangszone gezeigt werden. Mit zunehmender Dauer der Arthrose zeigten die Zellen und Cluster der Hauptbelastungszone perizellulär eine verminderte Tenascinanreicherung, demgegenüber in der Nicht-Hauptbelastungszone des arthrotischen Gelenkknorpels nahm die Tenascinexpression zu; so dass die Chondrozytencluster eine stark ausgeprägte perizelluläre Antigenhäufung von Tenascin (Abb. 81) und die wenig desorganisierten Knorpelareale arkadenförmig einen verstärkter Nachweis von Tenascin um die Zellen der Übergangs- und Radiärzone zeigten (Abb. 82). In der Hauptbelastungszone sah man nach 3 Monaten postoperativ keine tenascinpositiven Zell- oder Knorpelareale, in der Nicht-Hauptbelastungszone sah man im verdünnten Gelenkknorpel bis zur Zone des verkalkten Knorpels beim Großteil der Chondrozyten perizellulär eine Tenascinanreicherung.

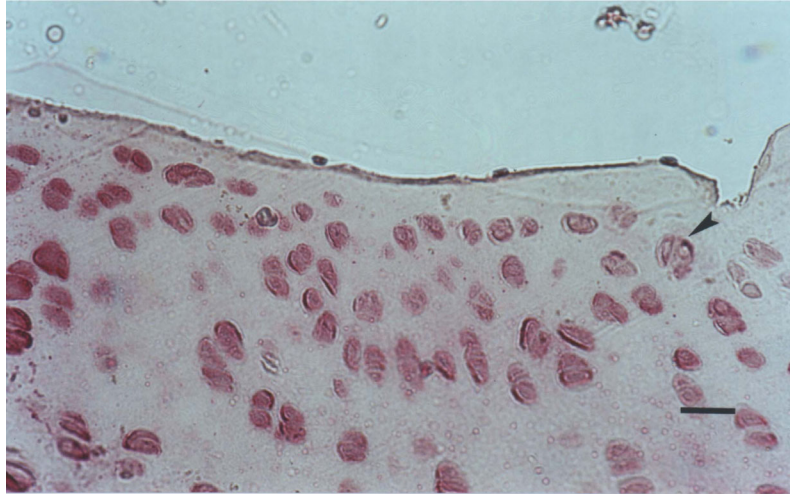


Abb. 81: Tenascin territorial und interterritorial um oberflächennahe Chondrozytennester exprimiert, 3 Monate postoperativ NHB; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:100 in APAAP-Technik.

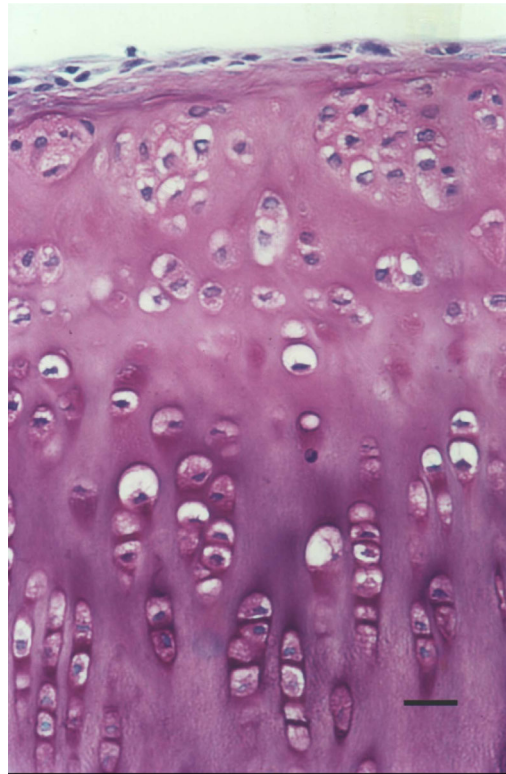


Abb. 82: Zwei Monate postoperativ entnommener Gelenkknorpel. In der Nicht-Hauptbelastungszone zeigen sich deutliche perizelluläre und interterritoriale arkadenförmige Tenascinanreicherungen in stark desorganisiertem Knorpel; 140fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:100 in APAAP-Technik.

Fibronectin zeigt sich sowohl im gesunden als auch arthrotischen Gelenkknorpel. Mit zunehmendem Arthrostadium steigt zunächst der Fibronectinanteil in HB und NHB an, bis schließlich ab dem 4. postoperativen Monat Fibronectin in der HB nur noch im Bereich des subchondralen Knochens zu finden ist. Auch in der NHB zeigte sich dann eine Abnahme des interterritorialen und zellulären Fibronectins (Abb. 83 und 84)

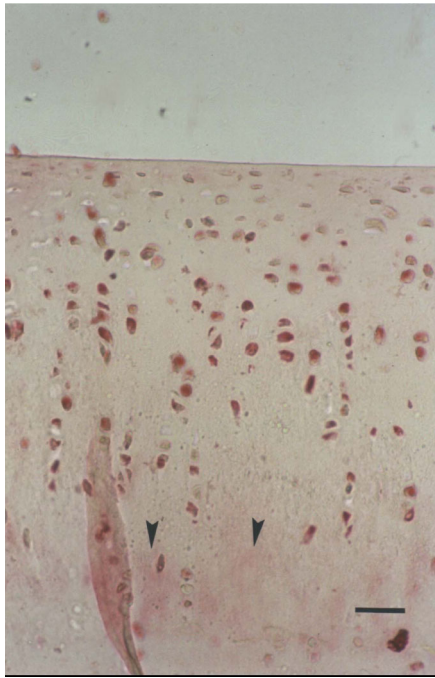


Abb. 83: Gesunder hyaliner Gelenkknorpel mit Darstellung von Fibronectin. Fibronectin-positive Zellen in allen Schichten, sowie interterritoriale Fibronectinanreicherung; 20fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:75 in APAAP-Technik.

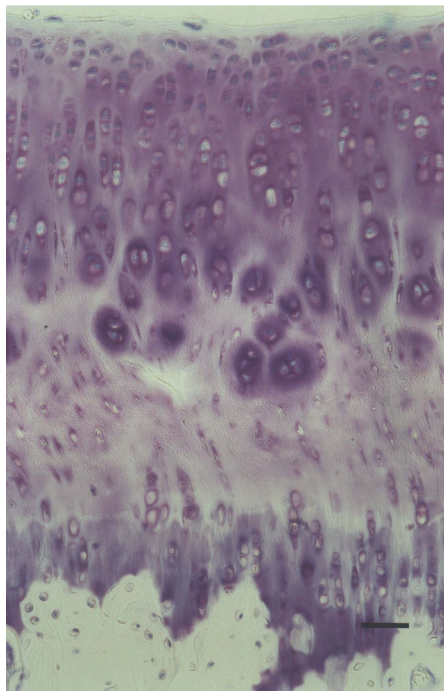


Abb. 84: Fibronectinnachweis nur in knorpelüberwachsendem Pannusgewebe mit chondroider Metaplasie, in den darunterliegenden Schichten keine Fibronectinanreicherung; 140fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:75 in APAAP-Technik, Gegenfärbung Alcianblau.

Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten der Nicht-Hauptbelastungszone

Kollagen Typ II als ubiquitäres Matrixprotein konnte im gesunden hyalinen Gelenkknorpel in homogener Strukturverteilung nachgewiesen werden. In der Superfizialschicht und in der territorialen Matrix ist die Struktur homogen nachweisbar (Abb. 85).

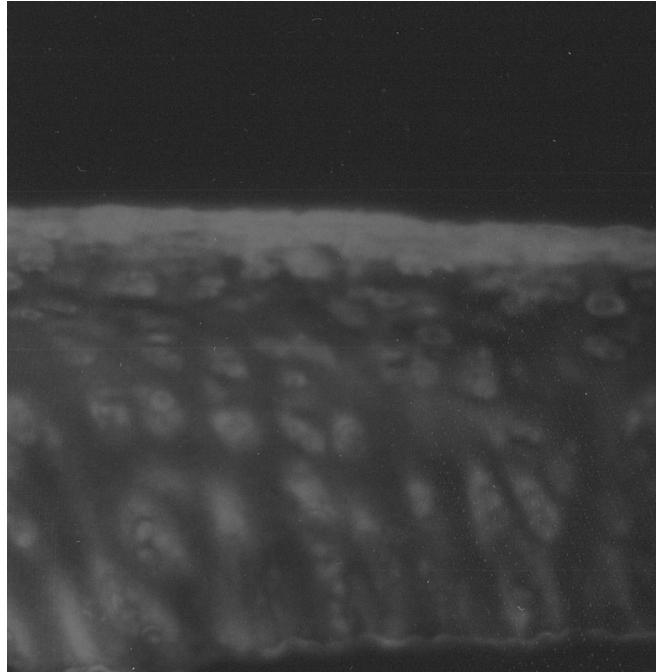


Abb. 85: Gesunder hyaliner Kaninchenknorpel mit Kollagen-II-Nachweis und typischem Aufbau, ohne verkalkten Knorpel und untere Radiärzone; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:20 mit Cy3-gekoppeltem Sekundär-AK.

Im Verlauf der sekundären Arthroseentstehung nahm die homogene Verteilung des Kollagens II deutlich ab. Es kam zum vollständigen Verlust der Superfizialschicht sowie zu einer ungeordneten Kollagen II-Faserausrichtung in den Chondrozytenresten und Clustern. Ab dem 6. postoperativen Monat waren nur noch lose Kollagen II Fibrillen über den Resten der Radiärzone zu sehen, perizellulär verblieben Reste des Kollagens (Abb. 86).

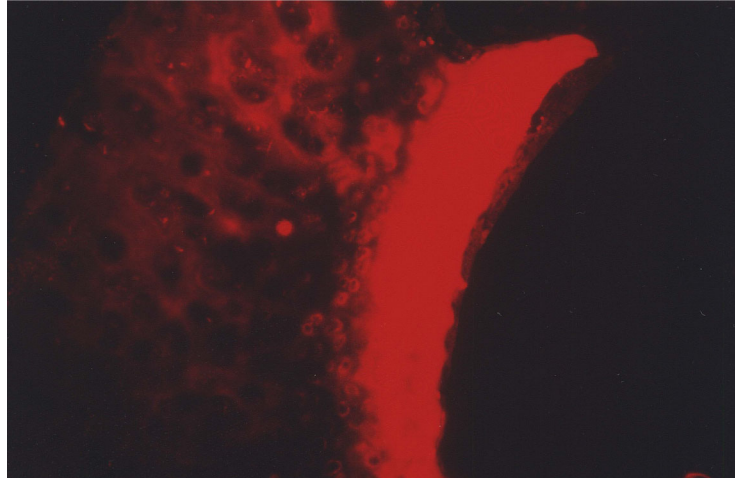


Abb. 86: 6 Monate postoperativ entnommener Knorpel. In den Knorpelzotten und flottierenden Fasern gute Darstellung des Kollagen-II durch die ausgeprägte Asbestierung; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:20 mit Cy3-gekoppeltem Sekundär-AK.

Fibronectin und Tenascin wurde sowohl im gesunden als auch im arthrotischen Gelenkknorpel immunhistochemisch nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Schwere der Arthrose zeigte sich eine Abnahme der interterritorialen und zellulären Anfärbbarkeit von Fibronectin und Tenascin (Abb. 87 und 88).

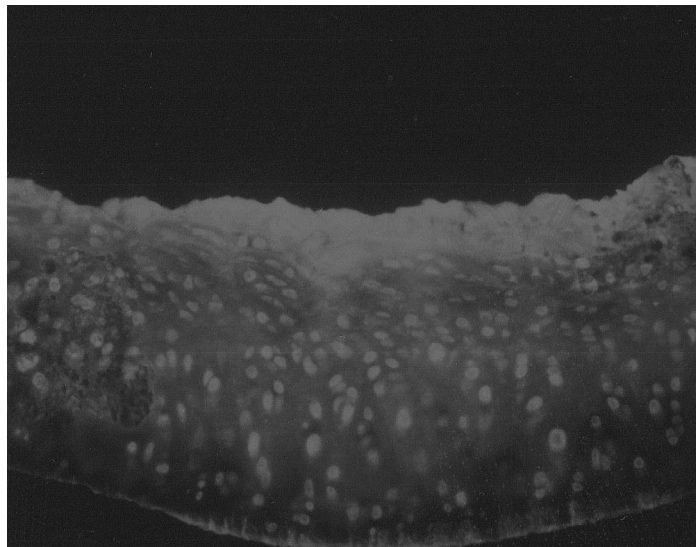


Abb. 87: Sechs Monate postoperativ entnommener Gelenkknorpel. Breite, kondensierte, oberflächliche Fibronectinbande; Abnahme des interterritorialen und zellulären Antigennachweises und Auftreten eines den Chondrozyten folgenden territorialen Verteilungsmusters; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:75 mit Cy3-gekoppeltem Sekundär-AK.

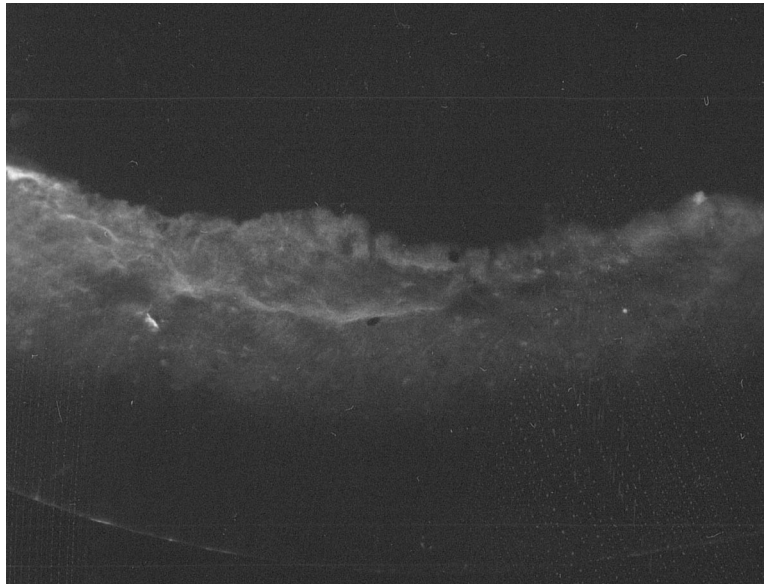


Abb. 88: Sechs Monate postoperativ entnommener Gelenknorpel. An der Oberfläche des fissurierten, fragmentierten Gelenknorpels zeigen sich Tenascinbande; vereinzelt positiver zellulärer Tenascinnachweis. Am Übergang zur Tidemark streifiges interzelluläres Antigenmuster; 70fache Vergrößerung, AK-Verdünnung 1:75 mit Cy3-gekoppeltem Sekundär-AK.

Einfluss der Low-Level-Laser-Bestrahlung auf vorgeschädigten Knorpel in vivo

Insgesamt und ohne Vorabdifferenzierung der Energiedichte der Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass der Laser einen Einfluss auf die Bewertung der Knorpelpräparate hat. Im Einzelnen zeigt sich, dass die Laserbestrahlung einen hohen Einfluss auf die histomorphologischen Gesamtscoreergebnisse hat. In der Hauptbelastungszone zeigen sich in Bezug auf das histomorphologische Gesamtscore bei den Tieren, die mit einer Energiedichte von 1 J/cm^2 bestrahlt wurden, bedeutend bessere Ergebnisse als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Die Laserbestrahlung mit 4 J/cm^2 zeigte keinen bedeutenden Einfluss auf die Bewertung der Präparate (Abb. 89). In der Nicht-Hauptbelastungszone zeigte sich, dass die Gruppe der Tiere, die mit einer Energiedichte von 1 J/cm^2 bestrahlt wurden, gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe in der Gesamtbewertung besser bewertet wurden. Bei der Bestrahlung mit einer Energiedichte von 4 J/cm^2 gab es keine Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 90).

Histomorphologische Gesamtscores der Teilstichproben Hauptbelastungszone

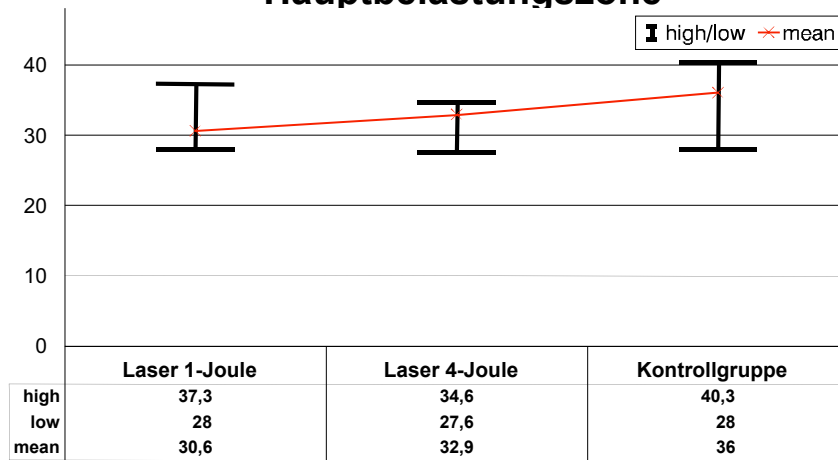


Abb. 89: Darstellung der histomorphologischen Gesamtscores (Mean der Lasergruppen versus Kontrollgruppe) in der Hauptbelastungszone.

Histomorphologische Gesamtscores der Teilstichproben Nicht-Hauptbelastungszone

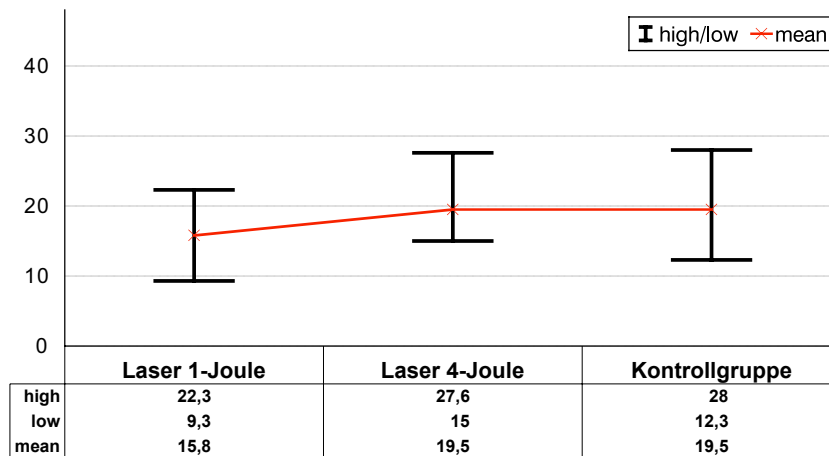


Abb. 90: Darstellung der histomorphologischen Gesamtscores (Mean der Lasergruppen versus Kontrollgruppe) in der Nicht-Hauptbelastungszone.

6.2.5 Zusammenfassung und Diskussion Proteoglykanabbau und ultrastrukturelle Veränderungen bei Osteoarthrose nach Laserbestrahlung

Die operativ erzeugten mechanischen Gelenkinstabilitäten haben die größte Ähnlichkeit zum menschlichen Krankheitsbild der Arthrose [Schwartz 1979]. Die chronischen Gelenkinstabilitäten des Menschen z. B. nach Sportverletzungen führen zu sekundären Arthrosen und nehmen heutzutage immer mehr an Bedeutung zu. Gegenüber dem humanen Gelenkknorpel ist die Chondrozytendichte im Kaninchenknorpel von 15 auf 180 Chondrozyten $\times 10^3/\text{mm}^3$ erhöht, die Proteoglykanhalbwertszeit von 780 auf 120 Tage verringert [Mohr 1984]. Diese anatomischen und biochemischen Unterschiede machen eine Übertragung der in dem experimentellen Arthrosemodell des Kaninchens gewonnenen Erkenntnisse auf die Verhältnisse in der humanen Arthrose nur mit Einschränkung möglich. Problematisch an dem gewählten experimentellen Arthrosemodell ist die operative Kapselöffnung. Der synoviale Reiz der Kapselöffnung führt zu Gelenksergüssen. Dies ist bei allen operativen Verfahren mit Schwierigkeiten verbunden [Butler 1983].

Trotz der Neigung zu Gelenkergüssen zeigten die Nekropsien keine klinisch relevanten Synovialreaktionen. Inzidenz, Progression und Schwere der beobachteten Knorpelläsionen im Kaninchenkniegelenk sind vergleichbar mit denen in anderen Tiermodellen [Butler 1983, Gardner 1994].

Makroskopische, lichtmikroskopische und immunhistochemische Veränderungen

In der Hauptbelastungszone wurde ein fulminanter Verlauf der arthrotischen Veränderungen gefunden, während in der Nicht-Hauptbelastungszone der arthrotische Prozess deutlich milder verlief. Aus diesem Grunde wurde die Hauptbelastungszone und die Nicht-Hauptbelastungszone des Kniegelenkes getrennt betrachtet. Frühzeitig kam es zu oberflächlichen Chondrozytennekrosen, die in der NHB sehr diskret auftraten und den Befunden beim Menschen entsprechen [Meachim 1965]. In der HB traten die Nekrosen der Chondrozyten sehr massiv auf und reichten bis in die Radiärzone. Im weiteren Verlauf zeigten sich in der NHB oberflächliche Fibrillationen, in der HB tiefe Fissuren als Ausdruck hoher Spitzenbelastungen und Auswirkung großer Scherkräfte. In Bezug auf Chondrozytencluster zeigte sich in der HB eine verminderte Chondrozytendichte, in der NHB lediglich eine zunehmende Desorganisation und Verschmälerung des Gelenkknorpels ohne Zellverminderung. Der frustrane Regenerationsversuch entwickelte in der HB nur mittlere Größen von Clustern, während in der NHB sehr große Cluster in enger Beziehung zum Pannusgewebe standen. Wie auch bei der humanen Osteoarthrose gesehenen und beschriebenen Veränderungen [Mohr 1981 und 1984] sind im weiteren Verlauf Abnahmen der perizellulären Alcianophilie, Pannusbildung, osteophytäre Ausziehungen, Knorpelsequester, Durchbruch von Gefäßen aus dem subchondralen Raum in den Gelenkknorpel und subchondrale Knorpelknötchen beobachtet worden. Als Maß für den abnehmenden Glucosaminoglykangehalt im arthrotischen Gelenkknorpel steht der Verlust der Alcianophilie der extrazellulären Matrix. In allen Schichten und Matrixlokalisationen wurde dieser Befund bewertet, so dass im histomorphologischen Gesamtscore die jeweilige Schwere und Graduierung des Knorpelschadens die Akzentuierung auf den Glucosaminoglykangehalt repräsentiert. Da es bisher keine qualitativen und quantitativen Marker für das jeweilige Schädigungsmuster gibt, sind verschiedene molekulare

Marker der Osteoarthritis herausfiltriert worden. Das Major-Kollagen Typ II als potenzieller molekularer Osteoarthritis-Marker zeigt eine erhebliche Synthesesteigerung im arthrotischen Knorpel mit überwiegend perizellulärer Lage [Poole 1991]. Im arthrotischen Knorpel unterliegt Kollagen II einem Zytokin-induzierten Abbau durch Metalloproteinasen, was insgesamt zur Abnahme des Kollagen II-Gehaltes führt [Wu 1991]. Kollagen VI erschien regelhaft im gesunden Knorpel [Poole 1988]. Das perizelluläre Vorkommen ist aber nur an normale Chondrozytenformen gebunden. In den Chondrozytenclustern und ballonierten Chondrozyten konnte kein Kollagen VI gefunden werden. Als wichtiger Bestandteil der perizellulären Matrix war es in der NHB stärker angereichert als in der HB während des arthrotischen Prozesses. Kollagen VI könnte ein wichtiger Marker für vitale funktionstüchtige Chondrozyten sein. Die kurze Gewebelbenszeit von 6 Stunden zeigt empfindlich einen Funktionsverlust von Chondrozyten an. Fibronectin ist im gesunden Kaninchen-Knorpel regelhaft zellulär und interterritorial als Glycoprotein erschienen [Burton-Wurster 1986]. In Abhängigkeit von der Schwere der arthrotischen Veränderungen nimmt der Anteil fibronectinpositiver Zellen in der NHB deutlich zu, in der HB deutlich ab. In degenerativ verändertem Kaninchenknorpel und humanem Osteoarthritis-Knorpel findet sich eine 5 bis 10fache Zunahme des Fibronectingehaltes, dies beruht auf einer höheren Extraktibilität oder einer gesteigerten Synthese von Fibronectin [Jones 1987]. Eine gesteigerte Fibronectinsynthese im arthrotischen Knorpel wäre mit der allgemein in Osteoarthritis-Knorpel beobachteten Matrixsynthesesteigerung z. B. für Glucosaminoglykane und Kollagen II zu vereinbaren [Palmski 1982, Poole 1991]. Tenascin erschien mit zunehmendem Arthroseverlauf oberflächennah in der territorialen Matrix der Chondrozyten und der Chondrozytenclustern des arthrotischen Gelenkknorpels [Chevalier 1994]. Pannusgewebe zeigte auch eine deutliche Expression von Tenascin. Zytokinwirkung an den Chondrozyten oder passive Diffusion sind für die oberflächennahe Tenascinanreicherung während der Osteoarthrosenentstehung verantwortlich. In tieferen Schichten des gesunden Knorpels wird Tenascin durch die Chondrozyten produziert [Salter 1993]. Höchstwahrscheinlich wird die Tenascinproduktion in humanem Osteoarthritis-Knorpel durch Interleukin-1 β induziert [Chevalier 1996].

Wirkung der Low-Level-Laser-Bestrahlung auf vorgeschädigten Knorpel in vivo

Für die Untersuchungen wurde der Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 692,6 nm ausgewählt, da sich Laserlicht in diesem Wellenlängenbereich durch eine hohe Gewebeabsorption und niedrige Wasserabsorption auszeichnet. In den operationsmikroskopisch erhobenen makroskopischen Beurteilungen zeigte sich im Mittelwertsvergleich eine bedeutend bessere Beurteilung der mit einer Energiedichte von 1 J/cm² bestrahlten Kaninchen gegenüber der Kontrollgruppe. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung zeigte sich in Bezug auf das Gesamtscoring ein signifikanter Unterschied der mit 1 J/cm² bestrahlten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den mit 1 J/cm² gelaserten Kaninchen zeigten sich sowohl in der HB und in der NHB nicht so gravierende arthrotische Veränderungen. Gerade die Übergangszone zeigt bei der mit 4 J/cm² gelaserten Gruppe bessere Bewertungen. Dies erklärt die potenzielle biostimulierende Wirkung der mit 1 J/cm² bestrahlten Gruppe, da hierbei die Superfizialschicht verlorengegangen ist. Auch Hermann berichtet über Synthesesteigerung der Chondrozyten an kultivierten Knorpelstücken in Monolayerkultur [Hermann 1988]. Die beobachtete Chondrozytendichteerhöhung der 1 J/cm²-Lasergruppe und 4 J/cm²-Lasergruppe gegenüber der Kontrollgruppe könnte entweder auf einer gehemmten Glucosaminoglycanproduktion oder einer mitotischen Aktivitätssteigerung des Knorpels beruhen, die im arthrotischen Knorpel immer vorhanden ist [Gardner 1994, Hulth 1971]. Durch die Anwendung von Lasern im nahen Infrarotbereich kommt es zu einer Oberflächenversiegelung des arthrotischen Knorpels, so dass ein weiteres Austreten von Glucosaminoglykanen aus dem arthrotischen Knorpel verhindert wird [Raunest 1995, Reed 1994]. Der Knorpel behält so seine Osmolarität und seine Festigkeit. Die aufgezeigten Ergebnisse sprechen für einen positiven Effekt von Laserstrahlung mit einer Leistungsdichte von 4,5 mW/cm² und einer Energiedichte von 1 J/cm² auf arthrotischen Knorpel in vivo. Der positive Effekt beruht voraussichtlich auf einer Matrixsynthesesteigerung und einer Zelldichteerhöhung der Chondrozyten.

Proteoglykanabbau unter Laserbestrahlung

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war die Evaluierung des Verlaufes der Arthrose nach makroskopischen Gesichtspunkten und der Veränderungen des Proteoglykan- bzw. Glykosaminoglykangehaltes in einem tierexperimentellen Arthrosemodell. Weiterhin wurde der Einfluss der Bestrahlung mit einem niedrigenergetischen Laser mit einer Wellenlänge von 692,6 nm auf den Verlauf der Arthrose nach gleichen Gesichtspunkten untersucht.

Die Evaluierung von Veränderungen des Proteoglykangehaltes wurde mittels der Dimethylmetylenblau-Methode vorgenommen. Seit der Einführung dieser Methode in die chemischen Nachweismethoden von sulfatierten Glykosaminoglykanen 1974 durch Taylor und Jeffrey ist das Verfahren durch Weiterentwicklungen immer praktikabler geworden. Das Problem der Farbin Konstanz, die 18 Minuten nach Zusetzen des Farbstoffs beschrieben wurde, konnte durch den Zusatz von 1% BSA-PBS gelöst werden.

Der spektrophotometrische Nachweis mit Hilfe von Dimethylmetylenblau erwies sich als ein sehr spezifisches Verfahren für einen quantitativen Vergleich der Glykosaminoglykangehalte in den entnommenen Knorpelproben.

Die Sensibilität der spektrophotometrischen Analyse gegenüber der Makroskopie wird in der Verlaufsgruppe (Gruppe A) deutlich. Veränderungen, hervorgerufen durch die experimentelle Arthroseinduktion, ließen sich wesentlich früher in der Abnahme der gemessenen Absorptionsmessungen nachweisen, als sie makroskopisch gesehen wurden. Der Einfluss der degenerativen Veränderung auf den Proteoglykangehalt des Knorpels wurde bereits nach 7 Tagen anhand der spektrophotometrischen Messergebnisse gesehen. Dagegen wurden die ersten makroskopischen Veränderungen erst nach 17 Tagen beobachtet. Die in der Literatur bei histologischen Auswertungen beschriebenen frühesten Veränderungen des Glykosaminoglykangehaltes, bei denen sich makroskopisch noch kein pathologischer Befund zeigte, konnten bestätigt werden [Pfander 1996, Carney 1985].

Für zukünftige Untersuchungen kann der spektrophotometrisch quantitative Nachweis von Glykosaminoglykanen nach Extraktion mit Guanidin-HCl als ein einfaches und präzises Verfahren angesehen werden. Mit dieser Methode kann der Einfluss von diversen Faktoren auf den Verlauf der Arthrose in vivo zuverlässig evaluiert werden.

Die größten Veränderungen pro Zeiteinheit der gemessenen Absorptionswerte im Verlauf der Arthrose fanden sich nach 30 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt entsprachen die makroskopischen Veränderungen einem mäßigen bis schweren Schädigungsgrad. Jenseits des 17. Tages zeigte sich eine Korrelation zwischen makroskopischer Veränderung und Veränderungen in der Größe der gemessenen Absorptionswerte. Insgesamt waren die beobachteten Knorpelläsionen im Kaninchengelenk in ihrer Inzidenz, Progression und Schwere vergleichbar mit denen in anderen Tiermodellen bei Pferden, Schweinen oder Hunden [Gardner 1994, McDevitt 1976].

Die bisherigen Studien zur Biostimulation haben gezeigt, dass die wesentlichen biostimulatorischen Effekte in einem Wellenlängenbereich zwischen 630 und 980 nm zu erwarten wären [Hagemann 1992, Karu 2005]. Der in dieser Studie verwendete Laser sollte zusätzlich Licht mit einer Wellenlänge aus dem Bereich emittieren, in dem die Absorption der Energie durch Wasser am geringsten ist. Die verwendete Laserenergie sollte hauptsächlich durch das organische Gewebe absorbiert werden und auf dieses seine größte Wirkung haben. Die gewählten Energiedichten (1 bzw. 4 J/cm²) liegen im niedrigen Energiedichtebereich, bei dem photochemische Effekte zu erwarten sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig spektrophotometrischen Analyse der Veränderungen des Knorpels nach Bestrahlung mit Laserlicht verwendet. In den operationsmikroskopisch erhobenen makroskopischen Bewertungen zeigten sich bei Kniegelenken, die mit einem Low-Level-Laser behandelt wurden, häufiger geringere Befunde als bei Kniegelenken, die keiner Bestrahlung unterzogen wurden. Knorpelgewebe, das mit einer Energiedichte von 4 J/cm² bestrahlt wurde, wies ebenfalls häufiger niedrigere Arthrosegrade auf als Knorpelgewebe, das nur mit 1 J/cm² bestrahlt wurde bzw. die Kontrollprobe. Folglich wurden die besten Ergebnisse nach einer Low-Level-Laser-Bestrahlung mit 4 J/cm² erzielt. Somit kann durch die Steigerung der Bestrahlungszeit bei gleicher Leistung ein signifikant größerer positiver Effekt auf die Absorptionswerte erzielt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die Abnahme der Proteoglykane im Verlauf der Arthrose bei einer Bestrahlung mit Energiedichte von 4 J/cm² wesentlich besser aufhalten lässt als durch eine Bestrahlung mit Energiedichte von 1 J/cm². Dies deutet darauf hin, dass durch eine Low-Level-Laser-Bestrahlung im Verlauf der Arthrose eine Stoffwechselsteigerung im hyalinen Knorpel erreicht werden kann.

Das Verständnis der Lichtregelung des Zellstoffwechsels und des Grundes für die Syntheserhöhung ist noch immer lückenhaft. Wie Karu bereits andeutete, dient die Zytochrom-C-Oxidase als möglicher Fotoakzeptor, wenn Zellen mit monochromatischem Rot bis nahem Infrarotlicht bestrahlt werden. Seine Wechselwirkung mit der Strahlung führt zu vier Effekten: Veränderungen in den Redox-Eigenschaften der Bestandteile der Atmungskette nach Fotoanregung ihrer elektronischen Zustände, Erzeugung von Singulett-Sauerstoff, lokalisierte, transiente Erwärmung der Absorptionschromophore und erhöhte Superoxid-Anionenproduktion mit anschließender H_2O_2 -Konzentrationserhöhung (Dismutationsprodukt) [Karu 1998]. Durch die Zytochromabsorption fungiert das Photon als Träger biologischer Energie, da das Zytochromsystem in den Mitochondrien das Photon absorbieren und den Elektronentransport anregen kann, wodurch Bioenergie in Form von ATP aus ADP erzeugt wird [Liu 2003]. Als Teil der Elektronentransportkette absorbieren die Zytochrome äußerst stark in dem in unserer Studie verwendeten Wellenlängenbereich, was für diese Theorie spricht.

In verschiedenen Studien wurde die Wirkung des Dioden-Lasers (Ga-Al-As) an Knorpelgewebe untersucht. Hierbei konnten stimulatorische Effekte auf die Proliferation und die Proteoglykansynthese an humanen Knorpelzellen gezeigt werden [Morrone 2000]. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Bestrahlung des arthrotischen Knorpels im Tierexperimenten, es konnte nach der Bestrahlung mit Low-Level-Laser eine gute Knorpelregeneration erzielt werden [Guzzardella 2000 und 2001].

7. Stand und Perspektiven des biologischen Resurfacing von Knorpel

7.1 Aktueller Stand der autologen Chondrozytentransplantation (ACT)

Bereits im Jahre 1743 erklärte Hunter: „Vom Zeitalter des Hippokrates bis heute ist es allgemein bekannt, dass ein ulzerierter Knorpel eine schwierige Angelegenheit ist und dass er sich nicht wieder reparieren lässt, wenn er einmal zerstört ist“. Die Unfähigkeit des Knorpels, sich nach Traumata selbst zu regenerieren und die therapeutische Unmöglichkeit, weitere degenerative Prozesse, welche zu einer Osteoarthrose führen, zu stoppen, wurde in den letzten 250 Jahren vielerorts beschrieben.

Es gibt zahlreiche Versuche, nützliche klinische Konzepte zu entwickeln, um geschädigten Gelenkknorpel wieder herzustellen, deren Effektivität bisher weitgehend nicht bewiesen werden konnte (Gelenkspülung und Knorpelglättung, Pridiebohrung, Abrasionsarthroplastik, Mikrofrakturierung, Mosaikplastik, Knorpel-Knochen-Stanze, Periost- und Perichondriumtransplantation).

Das Konzept, Zellen verschiedener Herkunft zu isolieren und dann in Knorpelläsionen zu transplantieren, basiert auf biologischen Vorgängen, welche erstmals bereits vor 30 Jahren beobachtet wurden und zu einer Ausfüllung der Knorpeldefekte führten. Für diesen Zweck geeignete Zellen sind fetale Chondroblasten, adulte Chondrozyten und mesenchymale Zellen [Brittberg 1994 und 1996, Wakitani 1994]. Zur Deckung und Auffüllung fokaler Knorpeldefekte können auch andere chondrogene Gewebe wie Periostlappen und Perichondriumlappen verwendet werden [O'Driscoll 1988, Bruns 1999]. Die Techniken der Transplantation chondrogener Gewebe und Zellen werden in jüngster Zeit gerne als biologische Methoden der Gelenkflächenreparatur bezeichnet und haben als „biologisches Resurfacing“ das Ziel, eine hyaline Knorpelmatrix erfolgreich wiederaufzubauen.

Gerade die Technik der Vermehrung körpereigener Knorpelzellen unter Laborbedingungen und deren nachfolgende Replantation (autologe Chondrozytentransplantation (ACT)) stellt eine häufig verwendete und in der Effektivität doch noch umstrittene Methode dar. Das Grundprinzip der reinen Zelltransplantation besteht in der Biopsie geringer Knorpelmengen, der in In-vitro-Vermehrung der Chondrozyten und der Replantation unter einem Periostlappen, der den Knorpeldefekt deckt [Brittberg 1994]. In weiterer Folge sollen die transplantierten Zellen, beeinflusst durch Faktoren der lokalen Umgebung, den Defektbereich durch die Produktion einer Knorpelmatrix allmählich ausfüllen [Brittberg 1999, Weise 1999]. Im Idealfall soll es mit dieser Behandlungsmethode bei tiefen Knorpeldefekten möglich sein, die komplexe Struktur des hyalinen Gelenkknorpels nachzubilden und die Ausbildung eines faserigen Ersatzknorpels im Sinne einer Defektheilung zu verhindern.

Vor der Ära des „biologischen Resurfacing“ gab es diverse Methoden zur symptomatischen Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Zu diesen Verfahren gehörten Gelenkspülung und Knorpelglättung sowie Verfahren zur Faserknorpelbildung (Pridiebohrung, Abrasionsarthroplastik und Mikrofrakturierung).

Die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten mittels Gelenkspülung und/oder Knorpelglättung (auch als Lavage, Gelenktoilette und/oder Debridement bezeichnet) dient der Auswaschung von abgelösten Knorpelfragmenten, Knorpelfasern und Proteoglykanaggregaten, die gemeinsam mit Entzündungsmediatoren auf die Synovitis wirken können, oder der mechanischen Abtragung oberflächlich strukturveränderter Knorpelanteile. Die Beschwerdesymptomatik 3 Jahre nach

einer Lavage verbesserte sich in nur 45% der behandelten Patienten, zu keiner Veränderung kam es bei 20% der Patienten und bei 35 % der Patienten verschlechterte sich der Zustand [Jackson 1991]. Eine Kombination beider Verfahren führte nach 3 Jahren in 68% der Behandlungsfälle zu zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen. In einer Studie von Ogilvie-Harris und Fitialos führte die Behandlung mit arthroskopischem Kniegelenksdebridement nach 4 Jahren bei 53% der Patienten zu zufriedenstellenden Ergebnissen [Ogilvie-Harris 1991]. Schneider berichtete von einer Studie, bei der 182 Patienten mit arthroskopischem Kniegelenkdebridement behandelt und über einen Nachuntersuchungszeitraum von 10 Jahren beobachtet wurden [Schneider 1990]. Nach 1 Jahr führte die Behandlung in 2/3 der Fälle zur Linderung der Schmerzen, nach 5 Jahren in 1/3 der Fälle und nach 10 Jahren nur noch in 5% der Fälle. Die Behandlung der Beschwerdesymptomatik durch Lavage und/oder Debridement eines Knorpeldefektes wird weiterhin über die Jahre kritisch diskutiert, da durch diese Techniken der umliegende Knorpel nicht zu einer regenerierenden Antwort angeregt wird und degenerative Prozesse nicht aufgehalten werden können [Hubbard 1996, Shapiro 1993].

Seit vielen Jahren werden verschiedene Behandlungsmethoden angewendet, die durch Penetration der subchondralen Knochenplatte zum Einwandern von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark führen und somit eine Revaskularisierung bewirken. Zu diesen Methoden gehören:

- Pridiebohrung
- Abrasionsarthroplastik
- Mikrofrakturierung.

Typischerweise besteht jedoch das Ersatzgewebe nicht aus hyalinem Knorpel [Lyyra 1995, Shapiro 1993, Wakitani 1994]. Stattdessen bildet sich Faserknorpel, der durch die Expression von Typ I-Kollagen, seltener durch Typ II-, Typ VI- oder Typ IX-Kollagen charakterisiert ist [Buckwalter 1990]. Der Faserknorpel degeneriert jedoch nach etwa 2 Jahren schneller als nativer Gelenkknorpel, da er biomechanisch weniger belastbar ist und damit zur Verschlechterung der Gelenkfunktion führt [Lyyra 1995, Wirth 1996, Häuselmann 1997]. Friedmann zeigte in einer Kurzzeitstudie, dass die Abrasionsarthroplastik bei 110 Patienten mit Knorpeldefekten im Knie bei 34% der Patienten ein Jahr postoperativ zu keiner Veränderung führte, in 6% der Fälle verschlechterte sich sogar der Zustand. Die besten Ergebnisse wurden bei Patienten im Alter von unter 40 Jahren beobachtet [Friedmann 1984]. Rand beschrieb, dass von 28 Patienten nach durchschnittlich 3,8 Jahren 39% eine marginale Verbesserung zeigten, bei 29% der Patienten war keine Änderung erkennbar und bei 32% der Patienten verschlechterte sich der Zustand. Nach durchschnittlich 3 Jahren musste bei 50% dieser Patienten eine Knie totalendoprothese implantiert werden [Rand 1991]. Eine retrospektive komparative Studie von 126 Patienten führte nach durchschnittlich 16 Monaten bei 67% der Patienten, die mit Abrasionsarthroplastik kombiniert mit Debridement behandelt worden waren, und bei 79% der Patienten nach Debridement zu zufriedenstellenden Ergebnissen [Bert 1989].

Zu den neueren Methoden gehören Verfahren der Verpflanzung von osteochondralen Transplantaten (Mosaikplastik, Knorpel-Knochen-Stanze).

Bei Verwendung von autologen osteochondralen Transplantaten (Knorpel-Knochen-Zylinder), die aus weniger belasteten Regionen des Gelenks stammen, werden diese in einen lokal begrenzten Knorpeldefekt eingebracht. Anfänglich viel versprechende Resultate führten in 30% der Fälle 2-5 Jahre postoperativ zur allmählichen oder abrupten Verschlechterung des Zustandes

[Wagner 1972]. Als Ursachen führen verschiedene Autoren Passungenauigkeiten der Stanzzyylinder, einen Mangel an Stabilität des Transplantats, Reaktionen der Synovialis, das Alter der Patienten und die Größe der Transplantate an [Hangody 1997, Grifka 2000]. Ein erheblicher Nachteil der autologen Mosaikplastik sind die neu gesetzten Defekte an den Entnahmestellen, die zusätzliche Schmerzen verursachen und bei Nachuntersuchungen eine Auffüllung mit fibrösem Knorpel zeigten [Imhoff 1999]. Neben der limitierten Verfügbarkeit von autologen Knorpel-Knochen-Zylindern bereiten die individuelle Knorpelschichtdicke und die Inkongruenz der Gelenkflächen von Spender- und Empfängerseite Schwierigkeiten. Die Passungenauigkeiten der Oberflächenwölbungen können nur erosiv durch Fräsen ausgeglichen werden, jedoch ist eine heterotope Zylinderentnahme nachträglich nicht korrigierbar. In einem durchschnittlichen Untersuchungszeitraum von 3,7 Jahren zeigten alle Patienten nach der Behandlung mit autologen Transplantaten aus dem Condylus, bei denen präoperativ keine oder nur eine leichte Arthrose diagnostiziert wurde, postoperativ eine beginnende oder sich verschlechternde Arthrose. Weiterhin Schmerzen nach Belastung hatten 75% der Patienten [Wirth 1991]. Outerbridge beschrieb bei 50% der untersuchten Patienten die Bildung von Osteophyten als reaktive Knochenneubildung in autologen Patellatransplantaten [Outerbridge 1995]. Mehrere Autoren empfahlen die Mosaikplastik für osteochondrale Defekte bis zu einer Größe von 1-2 cm² [Pascher 1999, Wirth 1991], 2-3 cm² bis 3,5 cm² [Erggelet 1999, Marco 1993] und 1-4 cm² [Hangody 1997 und 1999].

Neuere Methoden zielen auf die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten unter Verwendung chondrogener Materialien (Periost- und Perichondriumtransplantation).

Periost (Knochenhaut) und Perichondrium (Knorpelhaul) enthalten osteogene bzw. chondrogene Vorläuferzellen und Wachstumsfaktoren. Die intraartikulären Bedingungen, unter denen sich diese Zellen zu Knochen oder zu Knorpel umformen können, sind bislang nicht umfassend geklärt. Experimentelle Untersuchungen am Patienten zeigten anfänglich eine gute Restitution der Gelenkknorpeldefekte, jedoch beschrieben mehrere Autoren, dass die Perichondriumtransplantation nach 2-5 Jahren bei bis zu 70% der behandelten Patienten zur endochondralen Ossifikation im Reparaturgewebe führte [Minas 1997, O'Driscoll 1997]. Eine mögliche Erklärung ist die Beobachtung der Typ III-Kollagenexpression in In-vitro-Zellkulturen von Perichondriumbiopsaten; die Zellen differenzierten zu Osteoblasten [McPherson 1997]. Weitere Komplikationen sind Transplantat- und Regeneratverlust, die Hypertrophie des Regenerats und die fortschreitende Arthrose in teilweise bis zu 50% der Behandlungsfälle [Bouwmeester 1996, Beckers 1993]. Bulstra zeigte mit seinen In-vitro-Experimenten, dass sich die pluripotenten Stammzellen des Perichondriums zu Chondrozyten differenzieren und Matrix bilden können [Bulstra 1990]. Die Bildung der Matrix wurde jedoch nur über einen Zeitraum von 10 Tagen verfolgt. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass das für Gelenkknorpel typische Kollagen Typ II in einer Zeitspanne von 2-3 Wochen stark exprimiert wird. Werden die Zellen jedoch länger kultiviert, beginnen sie vermehrt mit der Bildung von Kollagen Typ I und III [Marlovits 1998]. In der Studie von Lorentzon wurde die Erfolgsquote mit 96% sehr guten und guten Ergebnissen nach durchschnittlich 3,5 Jahren angegeben [Lorentzon 1998]. Degenerative Veränderungen der Patellaränder oder eine Verkleinerung des femoropatellaren Gelenkspaltes zeigten 73% der Patienten, Kalzifizierungen im Regeneratgewebe 20%. Nur 27% der Patienten wiesen eine ähnliche Festigkeit des Knorpelregenerats zum umliegenden Knorpel auf. Die Autoren sprachen von der Bildung von hyalinähnlichem Knorpel, ohne jedoch eine Kollagentypisierung vorgenommen zu haben.

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) ist ein Verfahren zur Induktion der Knorpelregeneration, das in vivo hyalinähnlichen Gelenkknorpel erzeugt. Arthroskopisch wird dem Patienten eine reiskorngroße Probe gesunden Gelenkknorpels biotisch entnommen. Bei der Herstellung der Transplantate werden die Knorpelzellen enzymatisch aus der Knorpelmatrix herausgelöst, da diese die Zellteilung im Gewebe inhibiert (Sokoloff 1982). Die Zellen werden für 2-3 Wochen unter dem Zusatz von patienteneigenem Serum unter standardisierten Bedingungen vermehrt. Vor der Transplantation wird der Knorpeldefekt präpariert, mit einem Periostlappen (knochenseitige Matrix auf den Defekt) bedeckt, vernäht und anschließend die Chondrozytensuspension in den Defekt injiziert. Der Periostlappen enthält Wachstumsfaktoren, die den Prozess der Redifferenzierung der transplantierten Chondrozyten und den erneuten Matrixaufbau regulieren [Bonaventure 1994]. Die initiale Auffüllung des Defekts mit Knorpel erfolgt bereits 6-8 Wochen nach der ACT [Ergelet 1999]. Nach etwa einem Jahr hat der hyalinähnliche Knorpel an Festigkeit zugenommen. Die Chondrozyten sind säulenartig in der extrazellulären Matrix organisiert. Langzeituntersuchungen (bis zu 10 Jahre) zeigten viel versprechende Ergebnisse. Peterson stellte 2- bis 10-Jahres-Ergebnisse einer Studie mit 219 ACT-behandelten Patienten im Alter bis 50 Jahre vor [Peterson 1998]. Exzellente bis gute Ergebnisse zeigten 92% der Patienten mit durchschnittlich 4,4 cm² großen isolierten Gelenkknorpeldefekten am Femurcondylus und 86% der Patienten mit Osteochondrosis dissecans (OD). Die histologischen und immunhistologischen Ergebnisse der Regenerate zeigten einen hyalinähnlichen Knorpel in 74% der Behandlungsfälle. Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der klinischen Scores, den mechanischen Eigenschaften und der histologischen Qualität des Regenerats und der Zufriedenheit der Patienten nachgewiesen werden.

Minas beobachtete zwei Jahre nach ACT-Behandlung eine Erfolgsquote von 70% bei 70 Patienten. Interessanterweise wurde die ACT hier sowohl zur Behandlung von isolierten chondralen und multifokalen Läsionen als auch zur Behandlung bei Patienten mit früher Osteoarthritis, generalisierter Chondromalazie und zur Behandlung von Defekten an korrespondierenden Gelenkflächen (kissing lesions) eingesetzt. Die durchschnittliche Defektgröße betrug 5,5 cm². Die dauerhafte Regeneration des hyalinen Knorpels in den isolierten und multifokalen Defekten wurde mit sehr gut bis gut bewertet [Minas 1998]. Schneider zeigte in einer einjährigen Studie bei 79% bis 96% der Patienten sehr gute bis gute Ergebnisse nach dem Larson- und dem Cincinnati-Score [Schneider 1999].

Bei den autologen Knorpelzelltransplantaten handelt es sich um ein Arzneimittel, dessen Herstellung und dessen In-Verkehr-Bringen der Genehmigung nach dem Arzneimittelgesetz durch die jeweilige Landesgesundheitsbehörde am Herstellungssitz des pharmazeutischen Unternehmens unterliegen. Das autologe Knorpelzelltransplantat wird jeweils individuell und streng autolog für den Patienten hergestellt. Aus diesem Grund sind die In-Prozess-Kontrollen während der Herstellung entsprechend aufwendig. Ein wesentlicher Bestandteil der Qualitätssicherung ist die Gewährleistung eines maximal möglichen Schutzes vor bakterieller, Pilz- und Kreuzkontamination. Die Herstellung, Prüfung und Verpackung erfolgen nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik in einer reinraumtechnischen Anlage im Isolator, der die Anforderungen der Reinraumklasse A erfüllt. Jeder Isolator bildet ein gasdichtes, geschlossenes System, in dem das Personal nur über hochstrapazierfähige Handschuhe, nicht in direktem Kontakt mit dem Arzneimittel, arbeitet. Das Arzneimittel verbleibt während der gesamten Herstellung und Prüfung innerhalb des Isolators.

Aus In-vitro-Studien ist bekannt, dass der Verlust der knorpeltypischen Eigenschaften der in Monolayer vermehrten Knorpelzellen durch die Verwendung geeigneter dreidimensionaler Kultivierungssysteme bzw. Trägermaterialien weitgehend verhindert werden kann [Marlovits 2000]. Die zellbiologischen Grundlagen der Redifferenzierung und der Aufrechterhaltung der knorpelzelltypischen Eigenschaften in drei-dimensionalen Kulturen sind ebenfalls weitgehend unbekannt und rein deskriptiver Natur. Als Trägermaterialien kommen sowohl Polymer- als auch Kollagenvliese in Betracht. Das Konzept der Kombination von Zellen mit biokompatiblen Trägermaterialien in dreidimensionalen Zellkultursystemen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen im Rahmen des Tissue engineering verfolgt. Für das biologische Resurfacing von Gelenkknorpeldefekten sollen bereits in vitro hergestellte Gelenkflächen zur Transplantation verwendet werden. Das dreidimensionale Netzwerk des Trägermaterials fördert dabei das Einwachsen der Chondrozyten; der als Platzhalter dienende Träger wird später aufgelöst und durch eigene Matrix ersetzt [Wakitani 1994]. Das Verfahren der Kombination von Kollagenvliesen mit kultivierten Knorpelzellen wurde von Behrens als matrixgekoppelte autologe Chondrozytenimplantation (MACI (matrix-guided autologous chondrocyte implantation)) beschrieben und klinisch angewendet [Behrens 1999].

Die technischen Herausforderungen der Kultivierung von Knorpelzellen in dreidimensionalen Trägermaterialien liegen neben dem Erreichen einer ausreichenden Zellvermehrung auch in der Verwendung geeigneter Materialien. Diese sollen für alle Teilschritte der Knorpelsynthese den kultivierten Zellen ein optimales Primärmilieu bieten, zur Stabilisierung der knorpelspezifischen Eigenschaften im dreidimensionalen Kultursystem beitragen und nach Transplantation eine hohe Empfängerveträglichkeit garantieren [Weise 1999]. Die Verwendung eines Trägermaterials für die transplantierten Knorpelzellen hat neben den biologischen Vorteilen eines dreidimensionalen Kultursystems auch manuellchirurgische Vorteile. Das Zell-Kollagenkonstrukt kann exakt der Defektgröße angepasst und die Gelenkoberfläche remodelliert werden. Die zeitaufwendige und technisch nicht unproblematische Entnahme und Fixierung des Periostlappens ist damit nicht mehr erforderlich.

Wie auch bei der Transplantation autologer Chondrozyten unter einem Periostlappen ist das transplantierte Zell-Kollagenvlies ein unausgereiftes Gewebe, das erst verschiedene Stadien der Einheilung durchlaufen muss. In der Proliferationsphase wird der Defekt mit primitivem weichem Ersatzgewebe ausgefüllt (0.-6. Woche). In der Transitionsphase werden histologisch makromolekulare Matrixbestandteile gebildet und sie geht einher mit einer „Verhärtung“ des Gewebes (7.-26. Woche). Die Remodellierungsphase (ab der 27. Woche) beinhaltet die weitere zelluläre Aktivität mit Matrixproduktion, begleitet von weiterer mechanischer Verhärtung [Minas 1999]. Die postoperative Nachbehandlung und Physiotherapie trägt diesem Konzept Rechnung und beinhaltet zunächst die schrittweise passive Bewegungstherapie zur Verbesserung der Knorpelregeneration und zur Verminderung der Wahrscheinlichkeit von intraartikulären Adhäsionen, die entlastende Mobilisierung für 6 bis 12 Wochen nach der Operation zur Vermeidung der mechanischen Überbelastung des Transplantates und isometrische Muskelübungen zum Muskelaufbau und zur Minimierung des Risikos einer Muskelatrophie [Minas 1999].

Ähnlich der ACT erfolgt für die MACI-Technik die Indikationsstellung für symptomatische, überwiegend traumatisch entstandene tiefe chondrale und osteochondrale Defekte der gewichtstragenden Gelenkflächen des Kniegelenkes bei jungen Patienten mit hoher Compliance zum Rehabilitationsprogramm. Neben diesen meist unipolaren Grad III- oder Grad IV-Läsionen

(Outerbridge) im Bereich der Femurkondylen stellen ebenfalls symptomatische tiefe Defekte der Trochlea femoris und der Patella sowie die Osteochondrosis dissecans (OD) Indikationen dar. Als weitere Voraussetzungen gelten das Fehlen von Achsfehlstellungen, Bandinstabilitäten und stark eingeschränkte Gelenkbeweglichkeit.

Trotz ermutigender erster klinischer Erfahrungen mit der autologen Chondrozyten-Kollagen-Transplantation zur Therapie umschriebener Gelenkknorpeldefekte, werden erst die Langzeituntersuchungen den entgültigen Effekt und die Wirksamkeit dieser Technik bestätigen oder widerlegen [Marlovits 2001, Behrens 2002].

In einer weiteren neuen Entwicklung bei der ACT konnten dreidimensionale Zellkultursysteme ohne exogenen Wachstumsfaktor oder Trägerstoffe entwickelt werden. Menschliche Chondrozyten wurden als Sphäroide kultiviert. Die Gewebemorphologie und die Proteinexpression wurden anhand von Kryoschnitten der Sphäroide histologisch und immunhistologisch untersucht. Das Gewebe war charakterisiert durch die In-vitro-Synthese der hyalinen knorpelspezifischen Proteine Kollagen Typ II und S-100. Die Sphäroide sollen eine schnelle Adhäsion zeigen, sodass keine Periost- oder Membranabdeckung erforderlich ist. Durch das einfache Handling auch ohne Kleber oder chondrale Naht ist die Operationszeit deutlich verkürzt. Die Funktionalität des Gelenkknorpels soll durch Expression der hyalinspezifischen Marker und chondrogener Wachstumsfaktoren erhalten bleiben, es soll zur Regeneration eines biomechanisch belastbaren Gelenkknorpels kommen. Es wird eine sehr gute Integration des regenerierten Gewebes in den umgebenden Gelenkknorpel beschrieben. Durch rasche Expression hyalinspezifischer Marker (Proteoglykane, Kollagen Typ II, S-100, CEP-68), durch Suppression der Kollagen Typ I-Expression und durch Expression chondrogener Wachstumsfaktoren (TGF-Beta, IGF-1, PDGF, FGF-2) wird die Regeneration von hyalinem Knorpel induziert [Anderer 2002].

Nach mehr als 15000 Anwendungen seit 1987 ist die ACT inzwischen weltweit ein klinisch etabliertes Verfahren [Peterson 2002 und 2003], dessen Kostenerstattung jedoch uneinheitlich geregelt ist. Während in Österreich und Italien eine geregelte Kostenerstattung für die ACT existiert, werden die Kosten von US-amerikanischen Krankenversicherungen nur bei bestimmten Indikationen und von den gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland allenfalls nach Einzelfallverhandlung und -entscheidung übernommen. Für die ausstehende Anerkennung der ACT als erstattungspflichtiges Verfahren in Deutschland ist neben dem Wirksamkeitsnachweis und der Zweckmäßigkeit die Wirtschaftlichkeit ein entscheidendes Kriterium. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse bestehen für geeignete Indikationen bei den nationalen Fachgesellschaften der Unfallchirurgen und Orthopäden kaum mehr Zweifel an der Wirksamkeit und Zweckmäßigkeit der Methode. Ein wirtschaftlicher Vergleich der verschiedenen Methoden war bisher nur schwer möglich, da neben der ACT auch für die anderen Verfahren (Abrasionsarthroplastik, Gelenkspülung, Mikrofrakturierung, Pridiebohrung, Mosaikplastik) keine validen Daten zur Wirtschaftlichkeit existieren. Bis vor kurzem waren noch keine Langzeitergebnisse oder Resultate aus prospektiv randomisierten Studien verfügbar. Trotz dieser Probleme wurden in der Vergangenheit mehrere Wirtschaftlichkeitsuntersuchungen zur ACT veröffentlicht, die entweder auf Modellrechnungen, Nachuntersuchungen oder Expertenbefragungen basieren. So schlussfolgerte Minas auf der Basis prospektiv erhobener Daten von 44 Patienten, dass die ACT die Lebensqualität der Patienten verbessert und eine kosteneffektive Methode zur Behandlung umschriebener Knorpelschäden darstellt [Minas

1998]. Lindahl untersuchte den volkswirtschaftlichen Nutzen der ACT anhand der Daten von 57 Patienten, die zwischen 1987 und 1996 transplantiert wurden. Durch die ACT konnten die Fehlzeiten am Arbeitsplatz erheblich reduziert und die medizinischen Folgekosten stark gesenkt werden, wodurch die anfänglich höheren Behandlungskosten der ACT im Beobachtungszeitraum wieder relativiert wurden [Lindahl 2001].

In einer Studie von Wildner erfolgte zur ökonomischen Bewertung der ACT eine inkrementelle Kosten-Effektivitäts-Analyse anhand Literaturdaten und Expertenangaben. Der Begriff „inkrementell“ bezieht sich auf die während der fernen Lebenszeiten anfallenden Mehrkosten gegenüber dem jeweiligen Vergleichsverfahren sowie auf einen gegenüber dem Vergleichsverfahren zusätzlichen Nutzen. Die Bewertung erfolgte aus der Sicht der Kostenträger (Krankenkassen), da die für eine Beurteilung aus gesellschaftlicher Perspektive benötigte Datengrundlage sowohl in Deutschland als auch in anderen Ländern fehlt. Unter Berücksichtigung der zum Studienzeitpunkt verfügbaren Evidenz konnte gezeigt werden, dass sich unter den Modellannahmen durch 1000 ACT-Behandlungen 310 nachfolgende Endoprothesenimplantationen und etwa drei Todesfälle im Zusammenhang mit einer Endoprothesenimplantation vermeiden lassen. Zudem wurde errechnet, dass bei einer Behandlung von jährlich 3400 isolierten Knorpeldefekten mit konventionellen Verfahren im Verlauf des weiteren Lebens etwa 2000 Gelenkersatzoperationen notwendig werden. Bei der ACT kann diese Zahl auf die Hälfte gesenkt werden. Zahlreiche Autoren schlussfolgerten, dass die ACT aus Sicht der Kostenträger ein potenziell kosteneffektives Verfahren darstellt, sofern sich die Ergebnisse in weiteren klinischen und gesundheitsökonomischen Untersuchungen erhärten [Minas 2003, Lindahl 2001].

Aus diesem Grunde sind alle bisherigen Untersuchungen und Ergebnisse in Bezug auf Induktion eines regenerierenden Knorpelgewebes sowie Fusion des neuen Knorpelgewebes mit dem gesunden Knorpel bei isolierter Chondropathie von enormer volkswirtschaftlicher Bedeutung. Das „biologische Resurfacing“ von Chondrozyten mit den Stichworten ACT, MACI, Sphäroide, Fusion durch Wärme und/oder Low-Level-Laser-Therapie, wird zukünftig eine weit größere volkswirtschaftliche und sozialökonomische Bedeutung bekommen. Die entscheidenden Fortschritte in den letzten Jahren brachten die Ergebnisse auf histologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Grundlage, sodass nach Evaluierung der ultrastrukturellen Veränderungen und Reaktionen die klinische Anwendung erfolgen kann.

7.2 Möglichkeiten des Lasereinsatzes in der arthroskopischen Chirurgie

Die ersten Endoskopien am Kniegelenk wurden in den 20er Jahren von Bircher, Tagaki und Ijino zur diagnostischen Zwecken durchgeführt. Im deutschsprachigen Raum haben sich insbesondere Glinz, Hensche, Kieser und Rudolph in den 70er Jahren um die Einführung der Arthroskopie in den klinischen Alltag verdient gemacht [Rudolph 1999]. Mit der Einführung der Videokette wurde die Arthroskopie als ein exaktes, schonendes und risikoarmes Verfahren zur Diagnostik und Therapie von Gelenkerkrankungen anerkannt.

Trotz der stetigen Weiterentwicklung und Verfeinerung des arthroskopischen Instrumentariums, konnten wegen der zwangsläufig räumlich beengten Verhältnisse in den Gelenken insbesondere Knorpeldruckschäden durch das relativ grobe mechanische Instrumentarium nie ganz vermieden werden. Die Einführung der Lasertechnologie mit ihrem vergleichsweise feineren Applikationsinstrumentarium und dem teilweise berührungsfreien Arbeiten könnte neue Wege zur deutlich schonenderen Vorgehensweise bei arthroskopischen Operationen eröffnen. Dies betrifft sowohl die traditionellen Verfahren der Knorpelglättung bzw. -resektion als auch die Knorpeltransplantation. Allerdings wird der Lasereinsatz am Knie seit einigen Jahren sehr kontrovers beurteilt. Zurzeit finden die Laser ihre routinemäßige Anwendung bei Meniskusbearbeitung, Abrasionschondroplastik, arthroskopischem lateralen Release und Synovektomie. Die Wahl des adäquaten Lasersystems für die arthroskopische Anwendung ist in jedem Fall von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Therapie.

Bis Anfang der 90er Jahre dominierte in der arthroskopischen Chirurgie der erstmalig 1985 von Whipple und Caspari eingesetzte CO₂-Laser [Imhoff 1995, Rudolph 1999]. Aufgrund der hohen Absorption der CO₂-Laserstrahlung im Wasser dringt der Laserstrahl nur etwa 0,2 mm in das Gewebe ein, und beim Einsatz von hohen Leistungen kann das bestrahlte Gewebe berührungsfrei an der Oberfläche verdampfen. Das verbleibende Gewebe weist nur eine etwa 0,1 mm starke Zone thermischer Gewebeschädigung auf. Die optischen Eigenschaften des CO₂-Lasers erlauben aber bis heute nur eine Lichttransmission über starre Spiegelgelenkarme und sind dadurch im Gelenk, speziell in engen Gelenkräumen, nur bedingt einsetzbar. Mit dem CO₂-Laser konnte erstmals in der periarthroskopischen Chirurgie ein im klinischen Alltag brauchbarer Laser eingesetzt werden. Rudolph berichtet über 342 periarthroskopischen Operationen mit einem CO₂-Laser, die in seiner Klinik in der Zeit von April 1988 bis Oktober 1990 durchgeführt wurden. Dabei wurden gute Ergebnisse der CO₂-Laseranwendung bei entsprechender Indikation und technisch korrekter Durchführung der Operationen am Meniskus, Synovialis und Knorpel erzielt [Rudolph 1993 und 1999]. Die makroskopischen Befunde bei Kontrollarthroskopien zeigten gute Narbenbildung, insbesondere nach Eingriffen an der Synovialis. Verwachsungen oder derbe Narbenbildung konnten nicht beobachtet werden. Außer einer leicht erhöhten Rate postoperativer Ergussbildung konnten keine laserspezifischen Komplikationen festgestellt werden. Als Vorteile der CO₂-Laseranwendung werden vor allem das kontaktfreie Operieren, sehr gute Schneideigenschaften, gute Ablationsrate, ausreichende Koagulationseigenschaften, die die Blutungsgefahr minimieren, und gute postoperative Narbenbildung angesehen. Die Nachteile des CO₂-Lasers sind der operative und zeitliche Aufwand durch die starre Laserstrahlführung und Handhabung im Gasmedium. Insbesondere nach Laseranwendungen im Gasmedium konnten häufiger subkutane Emphyseme beobachtet werden [Imhoff 1995]. Diese Nachteile führten schließlich dazu, dass gegenwärtig der fokussierte CO₂-Laserstrahl keine Rolle mehr in der Gelenkchirurgie spielt.

Obwohl anfänglich sehr große Hoffnungen bezüglich der Anwendung von Dauerstrich-Nd:YAG-Lasern mit der Wellenlänge 1064 nm und 1320 nm bei den endoskopischen Operationen gehegt wurden, da ihre Strahlung mit flexiblen Lichtleitern und im flüssigen Medium angewendet werden kann, hat sich schnell herausgestellt, dass anders als bei der Behandlung von Weichgewebe, bei der Knorpelabrasion keine befriedigenden Resultate mittels dieser Lasersysteme erzielt werden können. Inzwischen herrscht eine einstimmige Meinung, dass diese Systeme vollkommen ungeeignet für die arthroskopische Chirurgie sind. Durch die geringe Absorption, die diese Wellenlängen im Wasser erfahren und starke Absorption im pigmentierten spongiösen Blut bei einer optischen Eindringtiefe von ca. 2 cm wird die Laserenergie tief im subchondralen Knochen deponiert. Dadurch kommt es zu erheblichen thermischen Nebenwirkungen, die sich bereits nach kurzer Zeit in Form von großflächigen Knorpeldefekten und Osteonekrosen nachweisen lassen [Gerber 1996, Schmolke 1997, Janzen 1997].

Aufgrund der physikalischen Voraussetzungen in Hinblick auf die Laser-Gewebe-Wirkung wäre der Excimerlaser mit der Wellenlänge von 308 nm, dessen Licht durch flexible Faser transmittiert werden kann, für die Knorpelbearbeitung gut geeignet. Gegenwärtig werden kommerziell angebotene medizinische Excimerlasersysteme vor allem für den Bereich der Augenheilkunde angeboten. Aufgrund der niedrigen Pulsenergie ist die Ablationsrate beim Einsatz dieses Lasersystems am Knorpel für eine effiziente Knorpelgewebearbeitung nicht ausreichend. Mit der Entwicklung von Excimerlasern mit höheren Pulsenergien könnte dieses Lasersystem effektiver bei arthroskopischen Operationen eingesetzt werden und zukünftig eine größere Bedeutung erlangen. Gerber berichtet über die Anwendung des Excimerlasers zu Knorpelglättung in vivo in einem tierexperimentellen Früharthrosemodell [Gerber 1996]. Dabei wurde in allen bearbeiteten Knorpelzonen das Aufwachsen einer bindegewebigen Abdeckschicht beobachtet, unabhängig davon, ob die aufgeraute Oberfläche mit histologisch nachgewiesener Früharthrose mit Laser geglättet oder unberührt gelassen wurde. Eine gleiche Abdeckschicht wurde in humanen Spezimen von Knieprothesenimplantationen gefunden, ist dort aber bei weiter fortgeschrittener Arthrose auf tief aufgelockertem Grund nur noch lückenhaft vorhanden. Darunter fand sich eine partielle Erholung des durchweg erhaltenen Restknorpels nach Laserexposition, wohingegen die Arthrosemodellbezirke während der sechsmonatigen Beobachtungszeit eine zunehmende Ausdünnung des Restknorpelschicht und Verschlechterung der Zellvitalität aufwiesen. Dies schien durch die Excimerlaserbehandlung aufgehalten zu sein. Ähnlich wurden die für die voll angekurbelte Arthroseantwort typischen überschießenden Brutkapselbildungen durch die Laserapplikation unterdrückt. In den tiefen Schichten erholte sich die im Immunoassay gemessene Proteoglykanproduktion nach einer anfänglichen Depression besser, und es wurde die Entwicklung eines Verbandes normaler Chondrozyten mit stärkerer Zelldichte als in den Arthrosemodellzonen beobachtet [Rudolph 1999]. Dies steht im Einklang mit der von uns beobachteten Verdichtung von gesunden Chondrozyten durch niederenergetische Laserexposition.

Entgegen diesen Ergebnissen stellten andere Forscher Schädigungen der Zellkulturen nach deren Excimerlaserbestrahlung fest [Fischer 1993]. Dies wäre jedoch auf die extrem ungünstigen Experimentbedingungen zurückzuführen, da die verwendeten Energiedichten viel höher als die klinisch einsetzbaren Parameter waren.

Ähnlich für die Knorpelbearbeitung geeignete physikalische Voraussetzungen wie der Excimerlaser bietet der gepulste Ho:YAG-Laser mit der Wellenlänge bei 2100 nm im Infrarotbereich. Allerdings wird der klinische Einsatz dieses Lasers bei den arthroskopischen Knieoperationen von verschiedenen Forschergruppen unterschiedlich bewertet [Trauner 1990, Pullin 1996, Vangsness 1997, Horan 1999, Lane 2001, Saunier 2003]. Bei der Applikation des gepulsten Ho:YAG-Lasers im flüssigen Medium werden transiente Dampfblasen erzeugt, bei deren Kollaps vorübergehend relativ hohe Druckspitzen auf das Gewebe einwirken. Diese werfen die Frage nach einem mechanisch-akustischen Schädigungsmechanismus auf. Gerber untersuchte den Einfluss unterschiedlicher Laserparameter und Bestrahlungswinkel auf die Eigendynamik der Dampfblasen und das bestrahlte Knorpelgewebe und stellte fest, dass die Dynamik der durch den Laserpuls gebildeten transienten Dampfblasen charakteristischen Gesetzmäßigkeiten folgt. Die beim Blasenkollaps gemessenen Druckwerte nehmen mit steigender Pulsenergie nur anfänglich zu, und die Zeit bis zum Beginn des Blasenkollapses auf der Knorpeloberfläche bleibt konstant. Videographisch wurden bei höheren Pulsenergien (1500 mJ) nach 400 μ s ausgeworfene Gewebepartikel sichtbar, die die Blasendynamik störten. Damit soll sich der akustische Prozess in Hinblick auf die weitere Druckzunahme mit steigender Pulsenergie selbst limitieren. Die Abtragung kann dann als Folge einer weitgehend thermischen Lasereinwirkung angesehen werden. Mit steigender Pulsenergie nimmt die Gewebeschädigung somit zu. Bei Pulsrepetition mit unverschobener Faser und gleichbleibender Pulsenergie limitiert sich die Abtragung mit der Zeit ebenfalls, da sich die Wasserschicht zwischen Faserspitze und Gewebe erweitert, bis kein Gewebe mehr in Reichweite liegt. Dabei läuft eine thermische Aufladung des in weiterer Entfernung angrenzenden Gewebes in einem gewissen Rahmen fort. Bei verschobener Faser entsteht durch Überlappung der Abtragungskrater eine Rille, und die biophysikalischen Einwirkungen verteilen sich auf den bestrichenen Bereich. Bei niederen Pulsenergien (500 mJ) wird die Blasendynamik nur unwesentlich durch Abtragungspartikel gestört, da nur ein Teil der zudem geringeren Pulsenergie für die Abtragung verfügbar ist. Darüber hinaus ist der Blasenkollapsdruck relativ klein. Ein diesbezügliches Plateau wird bei ca. 1000 mJ erreicht, wobei die Zunahme der Gewebeabtragung bzw. Schädigung aufgrund des thermischen Effektes davon unbeeinflusst bleibt. Anders verhält sich die Blasendynamik in Abhängigkeit vom Bestrahlungswinkel. Die Beeinträchtigung der Symmetrie der Blase durch die schräg oder tangential bestrahlte Knorpeloberfläche führt zu geringeren Kollapsdrücken. Hier besteht eine direkte Korrelation von Bestrahlungswinkel und gemessenen Druckwerten. Diese zeigen einen signifikanten Druckabfall bei Bestrahlungswinkel zwischen 60° und 30°. Auch die Gewebeabtragung und -schädigung nimmt bei immer flacherer Bestrahlung mit gleich bleibender Pulsenergie ab. Bei parallel zu Oberfläche gehaltener Laserfaser konnte keine Veränderung der Knorpeloberfläche beobachtet werden, auch wenn die Blase während des Kollapsvorgangs an der Oberfläche haften bleibt und somit die Energie darauf konzentriert wird [Gerber 1996].

Die histologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Bestrahlung mit dem Ho:YAG-Laser bei Pulslängen zwischen 250 und 1000 μ s, Pulsenergien zwischen 500 und 1500 mJ und Bestrahlungswinkeln von 90°, 60° und 30° an der Knorpeloberfläche charakteristische, klar umrandete Vertiefungen entstehen, welche dem Abtragungsbereich entsprechen. Diese sind nach Einwirken von Einzelpulsen kraterförmig und entsprechen nach Pulswiederholung mit verschobener Faser einer Rille, deren Tiefe und Breite von der Höhe der Pulsenergie abhängt. Das Ablationsmuster wird vom Bestrahlungswinkel noch deutlicher, dagegen kaum von der Veränderung der Pulslängen beeinflusst. So ist bei abnehmender Winkeleinstellung eine

Reduktion der Ablationstiefe bei gleichzeitiger Zunahme der Breite des abgetragenen Bereiches zu beobachten. Durch Pulswiederholung lässt sich ein stärkerer Glättungseffekt erzielen. Eine senkrechte Einwirkung des Lasers führt zu einer beidseitigen faserigen Aufwertung des Ablationsrandes. Die Tiefe der Zone, in der die Veränderungen an den Chondrozyten auftreten, ist etwa doppelt so groß wie die optische Eindringtiefe des Ho:YAG-Lasers in Wasser (ca. 400 μm). Lateral erstreckt sich diese Zone bis zu 450 μm in nicht direkt von der Laserstrahlung getroffenes Gewebe. Das abgetragene Volumen und die Ausbreitung der Läsion in der unmittelbaren Umgebung entsprechen dem Bereich der direkten Absorption und somit dem primär thermischen Effekt des Ho:YAG-Lasers und weist eine entsprechend dem Laserstrahl gerichtete geometrische Anordnung auf. Die verhältnismäßig schweren Gewebe- und Zellalterationen im nächst anliegenden Bereich entstehen als Folge des sekundären thermischen Effektes durch Wärmediffusion. Zusätzlich wird im Randbereich regelmäßig ein weiteres epizentrisch angeordnetes Alterungsbereich beobachtet, dessen Entstehen sich nicht durch thermische Effekte erklären lässt. In der entferntesten Zone mit den geringsten Zellveränderungen befinden sich die Kerne in der dem Abtragungskrater abgewandten Hälfte des Zellhofs. Diese Kernverschiebung muss als Folge des akustisch-mechanischen Effektes angesehen werden. Aufgrund dieser Untersuchungen könnten die negativen Berichte über die klinischen Einsätze des Ho:YAG-Lasers am Knorpel mit der Anwendung der falschen Technik erklärt werden. Gleichzeitig könnten die Richtlinien für die operative Vorgehensweise zur Minimierung des thermischen Schäden optimiert werden. Demnach werden um Tiefenschädigung zu vermeiden bei den Ho:YAG-Laseranwendungen am Knorpel die Energiedichten aus dem niedrigen Bereich empfohlen. Der Knorpel sollte nur in einem Winkel von ca. 30° defokussiert bestrahlt werden. Es sollte dabei beachtet werden, dass je kleiner der Bestrahlungswinkel, desto geringer Abtragung und Tiefenwirkung und breiter der Oberflächeneffekt.

In den letzten Jahren ist der Ho:YAG-Laser in mehreren experimentellen und klinischen Studien erprobt worden.

Mikroskopische Untersuchungen von Trauner nach Knorpelbearbeitung zeigen Zonen der thermischen Schädigung von 550 μm [Trauner 1995]. In unseren Untersuchungen betrug die Größe der Schädigungszone beim Einsatz des Ho:YAG-Lasers 300-400 μm . Die Schwellengrenze zur Knorpelabtragung betrug laut Trauner 50 J/cm², dagegen wird sie von Schier mit 30 J/cm² angegeben. Moller fand in einer vergleichenden Studie an einem Kaninchen-Arthrose-Modell heraus, dass nach mechanischem Debridement die Knorpeloberfläche nach drei Monaten relativ glatt war und Risse sowie Defekte mit Faserknorpel aufgefüllt. Nach Knorpelbearbeitung mit dem Ho:YAG-Laser zeigten sich zeitweise Knorpelnekrosen mit Schädigung des subchondralen Knochens und deutlichen Entzündungszeichen in der näheren Umgebung [Schier 1996, Pullin 1996].

Collier berichtete über den Effekt der Ho:YAG-Laserbearbeitung von Pferdeknoorpel in Hinblick auf Defekttiefe und Heilungstendenz. Der mit Laser behandelte Knorpel hatte eine bessere Zellularität und einen höheren Proteoglykangehalt als der Knorpel in den Kontrollgruppen. Bei Anwendung von höheren Energien kam es jedoch zum Zellverlust und Nekrosen im subchondralen Knochen, was auf die Folgen des photoakustischen Effektes zurückgeführt wurde [Schier 1996, Rozbruch 1996].

Trauner untersuchte kurz- und langfristige Auswirkungen des Ho:YAG-Lasers auf Knorpelgewebe [Trauner 1995]. Nach zehn Wochen zeigte sich noch keine Heilung der erzeugten Defekte des hyalinen Knorpels. Die Auffüllung mit Faserknorpel, die zwei bzw. vier

Wochen nach der Behandlung gesehen wurde, konnte nicht mehr beobachtet werden. Nach vier Wochen zeigten sich Chondrozytennekrosen in einer Entfernung von bis zu 900 μm vom Kraterrand. Die zunehmende Schädigung wurde als Folge des akustischen Effektes gedeutet.

Hendrich führte die kernspintomographische Messung der Temperaturverteilung im Knorpelgewebe nach Ho:YAG-Laserapplikation durch. Die frischen Leichenknorpelpräparate mit Knorpelschäden (Grad II und III nach Outbridge) wurden mit dem Laser unter MRT-Kontrolle behandelt. Dabei wurde eine Pulsenergie von 1 J mit einer Wiederholungsrate von 10 Hz für 5 s in einem Abstand von 1 mm zur Gewebeoberfläche verwendet. Die maximale Temperaturerhöhung betrug 35°C, eine Erhöhung der Temperatur um mehr als 10°C in der subchondralen Grenzlamelle wurde in keinem Fall beobachtet.

Die Arbeitsgruppe um Lübbers und Siebert hat in einer prospektiv randomisierten Studie die Ergebnisse der Ho:YAG-Laseranwendung über die Zeit von 2 Jahren mit den Ergebnissen konventioneller mechanischer Knieoperationen bei 320 Patienten verglichen [Lübbers 1996]. Die Indikationen für die Behandlung waren Meniskusläsionen, Chondromalazie, kombinierte Meniskus-Knorpel-Läsionen, Synovialitis und femoropatelleres Schmerzsyndrom. Durch die Therapie wurde in der Lasergruppe bei allen Kniegelenkaffektionen ein signifikanter Anstieg in den Werten des nach Klein modifizierten Lysholm-Scores nach zwei Jahren verzeichnet. Bei den mechanisch behandelten Patienten hingegen war dies im Fall der Chondromalazie und Synovialitis nicht möglich gewesen. Die Einsatzfähigkeit der unterschiedlichen Instrumentarien sowie der Wirkungsweise des Lasers wurden in den einzelnen Gruppen unterschiedlich bewertet. In allen Gruppen fiel die ausgezeichnete Fähigkeit des Ho:YAG-Lasers zur Blutstillung bei flächiger Anwendung auf. Die Fähigkeit des Lasers zur Blutstillung durch direkte Koagulation mit dem Instrumentarium beim Abtragen des Gewebes ermöglicht die Durchführung der Arthroskopie ohne Sichtbehinderung durch Blutungen. Die oft befürchteten verlängerten Operationszeiten traten nicht auf. Bei der Behandlung von Chondromalazie, kombinierter Meniskus-Knorpel-Läsion sowie Synovialitis wurde ein günstiger Effekt der Laserbehandlung mit dem Ho:YAG-Laser im Vergleich zu den konventionellen Behandlungsmöglichkeiten erzielt. Bei der Betrachtung des Medikamentenverbrauchs fiel auf, dass die mit dem Laser behandelten Patienten postoperativ weniger Analgetika und Antiphlogistika benötigten. Im weiteren Verlauf der Nachuntersuchungen waren die mit dem Laser therapierten Patienten seltener auf zusätzliche Medikamente angewiesen, was auf die bessere Linderung der Beschwerdesymptomatik hinweist. Es wird ausdrücklich betont, dass die korrekte klinische Anwendungsweise und adäquate Parameterwahl die guten Ergebnissen dieser Studie beeinflusst haben. Somit postulieren Lübbers und Siebert, dass die Laserbehandlung unter diesen Bedingungen bei der Chondromalazie eingesetzt werden kann, um diesen sonst rasch progredienten, sich selbst unterhaltenden Prozess der fortschreitenden Knorpeldestruktion zu bessern. Allerdings kann dadurch wahrscheinlich nur eine temporäre Beschwerdereduktion erzielt werden.

Schmolke, der grundsätzlich den Ho:YAG-Laser für die Anwendung am Knie für geeignet hält, weist auf die Kontroversen und Gefahren der Laseranwendung hin [Schmolke 1997]. Seiner Meinung nach muss bei der arthroskopischen Knorpelbearbeitung zwischen zwei Therapieansätzen unterschieden werden. Zum einen die Entfernung von mechanisch störenden Knorpelfragmenten, zum anderen die Induktion von Ersatzknorpel. Der therapeutische Nutzen einer alleinigen Knorpelglättung ist meist gering. Ausnahmen sind die posttraumatische Chondromalazie und Fälle mit rezidivierender Ergussbildung ohne andere erkennbare Ursache. Durch Glättung des Herdes kann die Bildung neuer Knorpelfragmente verhindert werden.

Kontrovers beurteilt wird die Oberflächenversiegelung, die bei der Bearbeitung von Knorpel mit dem Ho:YAG-Laser auftritt. Die Folge der Chondroplastik ist eine Diffusionssperre, die die Degeneration der basalen Schichten fördert.

Aufgrund der experimentellen Untersuchungen werden große Hoffnungen bezüglich der Möglichkeiten der Er:YAG-Laseranwendung zur nahezu athermischen Knorpelbearbeitung geäußert. Das Licht mit der Wellenlänge von 2940 nm weist eine sehr hohe Absorption in Wasser und ist aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften sehr gut für die Bearbeitung von Knorpel geeignet. Unsere experimentelle Untersuchungen haben bewiesen, dass beim Einsatz dieses Lasers die thermische Schädigungszone im Vergleich zu anderen evaluierten Laser am geringsten ist. Zwar gibt es zurzeit keine für den klinischen Alltag zuverlässigen flexiblen Lichtleiter, was die Anwendung des Lasers auf die offene Chirurgie limitiert, jedoch wurde in unserem experimentellen Aufbau die potenzielle Anwendbarkeit des Er:YAG-Lasers durch eine geeignete Faser erfolgreich überprüft. Es ist zu erwarten, dass zukünftig die kommerziell zur Verfügung stehenden adäquaten Fasern den theoretischen Einsatz des Er:YAG-Lasers im arthroskopischen Bereich ermöglichen werden. Allerdings waren unsere ersten In-vivo-Einsätze des Lasers unter operativen Bedingungen eher entmutigend. Aufgrund der fehlenden Koagulationseigenschaften kann keine Blutstillung erfolgen, so dass in einigen Fällen das austretende Blut die intraoperative Sicht maßgeblich einschränken kann. Die Verwendung von Spülung kann dieses Problem nur teilweise beheben, so dass zu erwarten ist, dass es bei der klinischen Anwendung des Er:YAG-Lasers zu verlängerten Operationszeiten und zur Steigerung der postoperativen Komplikationsraten kommen könnte. Das schränkt erheblich die guten Aussichten dieses Lasers auf den mittelfristigen arthroskopischen Einsatz ein.

In neuester Zeit wird für die Knorpelablation die RF-Technik. Zahlreiche Autoren befassen sich mit der Wirkung sowohl monopolarer als auch bipolarer RF-Chirurgie [Kaplan 2000, Vangness 2002 und 2003, Edwards 2002]. Vangness berichtet, dass die Ablationtiefe bei der Anwendung dieser Technik ca. 650 μm beträgt. Edwards fand, dass die monopolaren Applikatoren im Stande sind, den Knorpel präziser und schonender abzutragen. Allerdings kommt es bei der Anwendung der RF-Technik zur Knorpelglättung regelmäßig zu einer deutlichen Schmelzung („Karamelisation“) bzw. Karbonisation des oberflächlichen Knorpelgewebes. Zusätzlich weist Saunier darauf hin, dass die RF-technik langfristig keinen finanziellen Vorteil gegenüber der Lasertechnik bietet [Saunier 2005].

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass die Anwendung der Laser in der arthroskopischen Kniechirurgie zurzeit wieder heftig umstritten ist. Die zum Teil widersprüchlichen experimentellen und klinischen Ergebnisse weisen auf eine Reihe von Gefahren bei der Laseranwendung am Knie hin. Zurzeit gibt es keinen Laser, der sowohl aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften als auch technischen Voraussetzungen alle Anforderungen der arthroskopischen Operationen optimal erfüllen könnte. Vor allen zurzeit verfügbaren Lasersystemen weist der Ho:YAG-Laser die beim Einsatz in der Arthroscopie günstigste Eigenschaften auf. Dieser Laser wird deshalb gegenwärtig am häufigsten klinisch eingesetzt. Allerdings muss beachtet werden, dass der Anwender über hinreichende Kenntnisse verfügen muss, da der Effekt der Behandlung maßgeblich von der Arbeitsweise und adäquaten Parametern abhängig ist.

Insgesamt gibt es hinreichende Hinweise darauf, dass durch die Anwendung von moderaten Energiedichten bei der Laserbehandlung die Knorpelregeneration durchaus beeinflusst werden

könnte. Somit bleibt zu hoffen, dass mit der Weiterentwicklung der Lasertechnologie neue und bessere Voraussetzungen für die arthroskopische Laseranwendung geschaffen werden.

7.3 Einfluss der Laserbestrahlung auf den Zellstoffwechsel

Biologische Aktivität beruht auf Potentialdifferenzen, die den Zellstoffwechsel aufrecht erhalten. Diese Differenzen (Triebkraft) beruhen auf Konzentrationsketten sowie biochemischen Reaktionen welche mit einer Enthalpieabnahme / Entropiezunahme im Wechselspiel miteinander verbunden sind. Die vitale biologische Zelle befindet sich im Zustand des Fließgleichgewichtes [Bertalanffy 1977]. Im komplexen biochemischen System der Zelle greifen eine Vielzahl von unterschiedlichen biochemisch überwachten Kreislaufprozessen und /Reaktionskaskaden ineinander. Eine Störung kann negative Folgen für das Gesamtsystem haben. Damit dies nicht sofort dramatische und existentielle Folgen hat, ist das System flexibel ausgelegt, d.h. es kann Abweichungen innerhalb bestimmter Grenzbereiche tolerieren.

Das Fließgleichgewicht des menschlichen Körpers unterliegt einer systemischen Temperatur von ca. 37°C. Da eine Vielzahl von chemischen Reaktionen bei dieser Temperatur nur sehr langsam oder gar nicht erfolgen, verfügt das System über spezialisierte Biopolymere (Enzyme), die selbst unter diesen Bedingungen einen effizienten Reaktionsumsatz ermöglichen. Ihnen stehen gleichwertige Reaktionsinhibitoren zur Regulation gegenüber.

Neben dem Vorhandensein der Reaktionspartner, einer entsprechenden Umgebung in Form einer Kompartimentierung oder räumlichen Anordnung/Lokalisation hat die Reaktionstemperatur einen wesentlichen Einfluss auf den Ablauf (Richtung und Geschwindigkeit) der chemischen Reaktion. Die Bedeutung der Temperatur und ihren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde 1899 von Arrhenius postuliert:

$$k' = A \exp \left[- \frac{E}{RT} \right]$$

k' ist die Größe für die Bildung der Reaktionsprodukte, R die universelle Gaskonstante, E ist die Aktivierungsenergie der Reaktion und A wird als Stoßfaktor bezeichnet. Diese Größe ist in seiner Zusammensetzung komplex, enthält u.a. den sterischen Faktor, ist zudem selbst von der Temperatur und von E abhängig.

Im Hinblick auf den Stoßquerschnitt und die damit verbundene Bildung aktivierter Übergangskomplexe wurde die quantitative Formulierung absoluter Reaktionsgeschwindigkeiten von H. Eyring 1935 beschrieben:

$$k' = \kappa^* \frac{k_B T}{h} \exp \left[- \frac{\Delta H^*}{RT} \right] \exp \left[\frac{\Delta S^*}{RT} \right]$$

k_B : Boltzmann Konstante; h : Plank'sche Wirkungsquantum; ΔH^* und ΔS^* sind Zustandsgrößen des aktiven Zustands, κ^* ist als Wahrscheinlichkeit definiert, mit der der aktivierte Zustand zu einem Endzustand führt.

Der intrazelluläre Stoffwechsel hängt somit aus biophysikalischer Sicht von Konzentrationsgradienten und mechanischen Transportvorgängen ab. Das Auftreten von Temperaturgradienten innerhalb einer Zelle kann diese Vorgänge wesentlich beeinflussen.

Solche Temperaturgradienten können während der Bestrahlung der biologischen Gewebe mit Laserlicht entstehen. Bisher wurde dieser Aspekt ausführlich im Zusammenhang mit der laserinduzierten Thermotheapie (LITT) für Gewebevolumina untersucht [Roggan 1997]. Da auf der mikroskopischen Ebene einzelner Zellen solche Untersuchungen bisher nicht bekannt sind, soll durch Modellrechnungen der Temperaturgradient innerhalb der Zelle bei Laserbestrahlung abgeschätzt werden.

Aus der Definition des Wärmeleitkoeffizienten λ für eine idealisierte kugelsymmetrische Zelle mit dem Radius r folgt für den Temperaturgradienten $\frac{dT}{dr}$ bei einem Wärmefluss ϕ vom Kern in die

Zelle

$$\frac{dT}{dr} = \frac{\phi}{4\pi\lambda} \cdot \frac{1}{r^2}$$

Der Wärmefluss ϕ aus dem Kern kann aus der in einem gewissen Volumen absorbierten Laserenergie abgeschätzt werden, wenn man den Kern als alleinigen Absorber annimmt.

Als Beispiel betrachten wir die Bestrahlung mit einem Laser mit einer Leistung von 10 mW und einem Spotdurchmesser von 5 mm. Für eine Zelle mit einem Durchmesser von 10 μm bei einem Kerndurchmesser von 1 μm , einem bestrahlten Volumen von 0,05 cm^3 (1 $\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,05 \text{ cm}$) und einer Wärmeleitfähigkeit $\lambda=0,5 \text{ W/K}\cdot\text{m}$ ergibt das einen Temperaturgradienten von etwa 300 K/m.

In der Realität kann dieser Gradient nur für kurze Zeit bestehen, da durch den Wärmefluss ein Temperatursausgleich eintritt. Eine alternative Abschätzung des Temperaturgradienten soll deshalb diesen Effekt berücksichtigen.

Der Temperaturanstieg in einem Körper wird durch die deponierte Energie E , seine Masse m und seine Wärmekapazität c bestimmt:

$$\Delta T = E/m \cdot c$$

Die Masse einer kugelsymmetrischen Zelle wird aus ihrem Volumen sowie ihrer mittleren Dichte ρ berechnet. In erster Näherung werden die numerischen Werte c und ρ gleich denen von Wasser gesetzt.

Die deponierte Energie E berechnet sich aus der mittleren Leistungsdichte P , der bestrahlten Querschnittsfläche A und der Bestrahlungszeit t . Unter Vernachlässigung der Streuung nimmt die Laserintensität in einer Eindringtiefe D nach dem Lambert-Beer-Gesetz in seiner einfachsten Form, d.h. für ein homogenes Medium mit dem Absorptionskoeffizienten μ_a auf den Bruchteil $e^{-\mu_a D}$ ab.

$$E = P \cdot A \cdot t \cdot (1 - e^{-\mu_a D})$$

Bei geringen Bestrahlungszeiten $t \ll t_0$, wobei t_0 die charakteristische Relaxationszeit der Wärmeleitung ist, kann die resultierende Erwärmung als adiabatisch angesehen werden. Die Relaxationszeit hängt neben den thermischen Eigenschaften des Gewebes vom Durchmesser des Absorptionszentrums (Zellkern) ab. Für ein Absorptionszentrum mit einem Durchmesser von

1 μm gilt $t_0 \sim 1 \text{ ms}$. Für die folgende Betrachtung wird die Bestrahlungszeit ebenfalls auf 1 ms gesetzt.

Infolge des kleinen Durchmessers des Absorptionszentrums ist der Faktor $\mu_a D$ klein gegen 1. Das Glied $(1 - e^{-\mu_a D})$ lässt sich damit in eine Taylorreihe entwickeln: $(1 - e^{-\mu_a D}) \sim \mu_a D$.

Für eine kugelsymmetrische Zelle ist ΔT proportional zu μ_a und unabhängig von D . Weiterhin ist ΔT proportional zu P und t , solange die Werte im adiabatischen Regime liegen.

Die Ergebnisse für eine Leistung von 10 m W/cm^2 einem Spottedurchmesser von 5 mm und einer Bestrahlungszeit von 1 ms für Fibroblasten sind in der Abb. 91 dargestellt. Die spektralen Absorptionskoeffizienten der Fibroblasten stammen aus eigenen Untersuchungen am Doppel-Ulbrichtkugel-Messplatz.

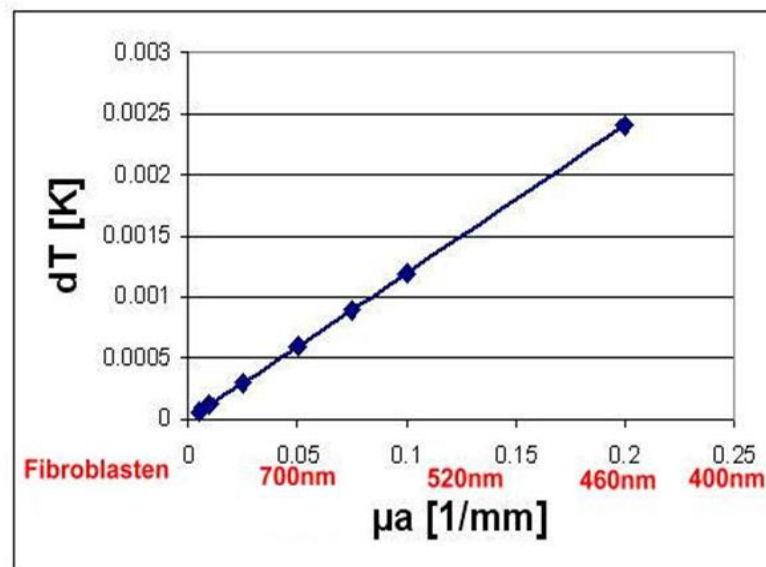


Abb. 91: Temperaturüberhöhung des Absorptionszentrums gegenüber der Umgebung.

Für Fibroblasten ergeben sich daraus bei 520 nm Absolutwerte für den Temperaturgradienten von 600 K/m am Rand des Zellkerns und 120 K/m in einem Abstand von 5 μm .

Die durchgeführten Modellrechnungen weisen darauf hin, dass die Bestrahlung der biologischen Gewebe mit niedrigerenergetischen Lasern zum Entstehen von Temperaturgradienten auf der zellulären Ebene führen kann. Allerdings sind Temperaturgradienten in diesen Größenordnungen bisher mit den herkömmlichen Verfahren nicht messbar.

Wärmestimuliertes Verhalten des Zellstoffwechsels

In der biologischen Zelle finden thermisch wie auch photochemisch induziert chemische Reaktionen statt. Hierbei werden u.a. Radikale und reaktive Verbindungen erzeugt. Damit Zellfunktionen nicht irreversibel beschädigt werden, darf die Reaktivität selektiv nur bis unterhalb der Zerstörungsschwelle verändert werden. Die hohe Reaktivität von u.a. in-situ erzeugten Radikalen bzw. reaktiven Verbindungen führt hauptsächlich zu einer Reaktion mit Proteinen [Hawkins 2001]. Die Erzeugung der Oxidantien selbst kann durch exogene Faktoren einschließlich von Strahlung erfolgen. Um das reale Ausmaß des Schädigungspotenzials für unterschiedliche reaktive Spezies zu erfassen, muss das Produkt aus Reaktionskonstante und der Konzentration des Zielmoleküls betrachtet werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Peptide/Proteine die bioorganische Hauptkomponente darstellen, kann somit das Ausmaß der Zerstörung bzw. der Grad der Proteindenaturierung in erster Näherung zur Definition einer Zerstörungsschwelle herangezogen werden. Unter Berücksichtigung der Schädigung über alle Proteine kann somit ein Schädigungsintegral Ω definiert werden:

$$\Omega(t) = A \int_0^t \exp \left[\frac{-E_d t}{RT} \right]$$

Die Temperaturabhängigkeit von A wird hierbei vernachlässigt und vor das Integral gezogen. Die Proteindenaturierung setzt schon ab 45°C ein. Im Mikrosekundenbereich werden Faltungsprozesse initiiert, die durch eine irreversible Modulation der räumlichen Molekülkonfiguration ermöglicht werden. Es ist somit möglich, eine kritische Temperatur für jedes Protein für $\tau=1$ s zu ermitteln, bei der eine vollständige Schädigung ($\Omega=1$) erzielt wird. In biologischen Geweben kann eine Temperaturveränderung z.B. durch Einwirkung von Laserstrahlung induziert werden. Nach Maßgabe der dynamischen gewebeoptischen Parameter sind Strahlungsabsorption und Streuung die entscheidenden Größen der Laser-Gewebe-Interaktion und für die Größe der Eindringtiefe verantwortlich. In der Gewebematrix sind eine Vielzahl von lokal fixierten Streuzentren und Absorbern integriert, deren Gesamtheit für die Abschwächung der Strahlung verantwortlich ist. Voraussetzung für die Absorption sind eine geeignete Orientierung und Lokalisation der Absorber innerhalb der Matrix. Hinzu kommen molekülspezifische Eigenschaften unter Berücksichtigung der unmittelbaren Umgebungsbedingungen, die die Größe der Absorption beeinflussen. Durch die Absorption kann der Zustand d.h. die Aktivität einer Zelle im Verband verändert werden. Absorber innerhalb der Zellen sind NADH, Flavine und Porphyrine wie z.B. das oxidierte Cytochrom oder die Katalase. Die Konzentration des oxidierten Cytochroms in der Zelle korreliert mit dem Grad der

Oxygenierung. Die Cytochromoxidase selbst ist das terminale Enzym innerhalb des Systems der Atmungskette und in der mitochondrialen Zellmembran lokalisiert. Da die Weichgewebematrix über einen Schichtenaufbau verfügt, muss ein potenzieller Wärmetransport auch über Grenzflächen hinweg erfolgen. Aktive Transportprozesse unterstützen den Wärmefluss. Bezogen auf das Bild für die (bio)molekulare Hierarchieebene führt eine Temperaturerhöhung u.a. zu einer erhöhten Stoßfrequenz von Reaktionspartnern, wenngleich auch nicht mit optimaler Orientierung zueinander. Zeitgleich verändert sich der Einfluss der Aktivierungsenergie. Auf subzellulärem Niveau führt die unmittelbare, direkte Temperaturerhöhung in einer räumlich begrenzten Umgebung ggf. zur Stoffwechselaktivierung bzw. -inaktivierung und/oder zur Schädigung essenzieller supramolekularer Strukturen.

In erster Näherung kann die „isolierte“ Zelle als batch-reactor mit einer Vielzahl von zeitgleich, zumeist irreversibel, verlaufenden Reaktionen vorwiegend mit der Reaktionsordnung 0 aufgefasst werden. Handelt es sich um Reaktionen, bei denen die Konzentration des Produktes über einen gewissen Zeitraum periodisch schwankt, liegt eine so genannte "oszillierende Reaktion" vor. Für die Schwankungen sind Zwischenprodukte verantwortlich, die die Reaktionsgeschwindigkeit einer oder mehrerer Teilreaktionen beeinflussen (Rückkopplungsmechanismen). Zur Definition werden die Gesamtheit der enzymkatalysierten Stoffumsetzungen und ihrer Geschwindigkeiten oder Flüsse unter einer bestimmten Umweltbedingung unter dem Begriff „Fluxom“ zusammengefasst. Das System „Zelle“ enthält als Reaktionsraum Phasengrenzflächen. Zur Beschreibung muss daher die „effektive Reaktionsgeschwindigkeit“ genutzt werden, welche die chemischen Reaktionen selbst wie auch die physikalischen Transportvorgänge berücksichtigt. Die Induktion eines partiellen chemischen Ungleichgewichts wie auch die Belastung bio-organischer Strukturen bewirken somit Mechanismen/Maßnahmen innerhalb des Zielortes, welche in ihrer Wirkung weit reichende Folgen haben können.

Menschliche Zellen sind mit ihren Enzymkomplexen auf eine Arbeitstemperatur um 37°C optimiert. Systemische Temperaturerhöhungen über 41°C sind durch Endothelschäden und darauf folgende disseminierte intravasale Gerinnung unmittelbar lebensbedrohlich. Subletale Zellschäden werden durch eine Aktivierung in latenter Form ständig zytoplasmatisch vorliegender Hitzeschockproteine beantwortet. Dadurch wird eine erhöhte zelluläre Thermotoleranz erreicht und die Expression verschiedener Stressproteine bewirkt. Erhöhte Temperaturen können eine Denaturierung von Proteinen und Aufhebung der Membranintegrität bewirken. Manche Zelltypen und Gewebe reagieren besonders empfindlich auf Temperaturveränderungen.

Die kurzzeitige Induktion hoher Temperaturgradienten innerhalb des zellulären Systems darf lediglich eine „Reizung“ der zellulären Matrix verursachen und mithin eine vollständig reversible Schädigung der Zelle darstellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass derartige lokale Temperaturspitzen insgesamt zur partiellen Manipulation des biochemischen Reaktionssystem und seiner Umgebung bzw. von zellulären Struktureinheiten führen. Wenngleich Enzyme unabhängig von den Bedingungen der Umgebung oder des Metabolismus der Zelle gebildet werden und die Produktion z.B. über die Genexpressionsrate reguliert wird, kann die optimale Funktion von Enzymen hierbei beeinträchtigt werden. Es sind somit temporäre Eingriffe in den biochemischen Reaktionsverlauf vorgegeben. Das Ausmaß der Störung ist von ΔT und den Reaktantkonzentrationen abhängig.

Die Mitochondrien sind als dynamische intrazelluläre Organellen der Zelle, die zentrale Aufgaben im oxidativem Metabolismus und der Apoptose wahrnehmen, von besonderer Bedeutung. In ihrer Morphologie stellen Mitochondrien ovale Partikel mit einer Länge von 1-2 μm und einer Dicke von 0,5–1 μm dar. Sie erzeugen ca. 80 % der Energie einer funktionsfähigen Zelle. Ihre wichtigste biochemische Leistung ist die oxidative Phosphorylierung, die aus zwei funktionellen Abschnitten, der Elektronentransportkette und der Phosphorylierungsreaktion (Bildung von ATP (Adenosintriphosphat)) besteht. Während der Krebszyklus in der mitochondrialen Matrix stattfindet, sind die Enzymkomplexe der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Einige der größten und äußerst labilen Enzyme aus diesem Komplex enthalten bis zu ca. 41 verschiedene Proteinuntereinheiten. Dort wird die ATP-Bildung durch eine ATP-Synthetase katalysiert. Die innere mitochondriale Membran selbst ist für niedermolekulare Metaboliten nur selektiv passierbar. In ihr enthaltene Carrier bedingen diese Selektivität und steuern die Durchflussrate. Das aktive Enzym erfordert eine intakte Membranstruktur. Fehlfunktionen sind zumeist mit mitochondrialen Erkrankungen gekoppelt. Letztlich ist die Freisetzung der gebundenen Energie mit der Translokation von Protonen von der Matrixseite zur Außenseite der mitochondrialen Membran gekoppelt.

Nanokalorimetrische Untersuchungen an isolierten Mitochondrien führten zu einem Messwert von $0,12 \pm 0,9 \text{ mW/mg}$ Mitochondrien [Sanders 1982]. Dabei wurde mittels chemischer Stimulation die Wärmeproduktion und die Funktion der Atmungskettenenzyme – ohne katabolische Prozesse in der Zelle – direkt mit dem Messwert korreliert. In der gleichen Studie wurden auch Kardiomyocyten (Kaninchen) unter Verwendung isolierter Einzelzellen oder anhand von Zellclustern untersucht. Innerhalb einer Zeitspanne von 3 min nach der Stimulation wurde ein Messwert von $0,136 \text{ mK}$ ermittelt, der einer Größe von $1,71 \pm 0,94 \text{ nW/Zelle}$ entspricht.

Insgesamt weist der zelluläre Metabolismus protonengenerierende als auch -konsumierende Prozesse auf, so dass ein ständiger turnover von Protonen/Ionen stattfindet. Dieser Protonengradient besitzt eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung zellulärer Stoffwechselfvorgänge (Protonenpumpen). Innerhalb einer durch die Pufferkapazität der Zelle bzw. die ihrer Organellen abgedeckten Bandbreite besteht ein Schutz vor schnellen pH-Änderungen. Der im Cytoplasma aktuell vorliegende pH-Wert ist das Resultat der Interaktion zwischen dem biochemischen und dem biophysikalischen pH-Wert. Das zeitliche Regime der zellulären Antwort auf eine pH-Änderung beruht dabei zum einen auf der “short-term”-Regulation durch zelluläre Puffer- und Transportsysteme, zum anderen basiert er auf einer “long-term”-Regulation durch zeitlich verzögerte chemische Prozesse im Metabolismus. Die allgemeine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und pH-Wert im Cytoplasma ist bekannt [Gout 2001]. Nach Sanders et al [Sanders 1982] wird die Kontrolle des intrazellulären pH-Werts entscheidend von den vorhandenen Substratkonzentrationen beeinflusst. Kurzzeitig ist es daher möglich, den pH-Wert metabolisch bzw. biophysikalisch aufrechtzuerhalten.

Dem Ausmaß der reversiblen Protonen- bzw. Ionenverschiebung kann ein Signalcharakter zugeordnet werden. Die Veränderung muss über einen Schwellenwert hinweg erfolgen, damit es zu einer Art Übertragung bzw. der Initiation von Folgeereignissen kommt. Trotz der präzisen Regulation der intrazellulären Protonenverteilung können shifts der Protonenkonzentration ausgelöst werden, welche eine “Boten”-Funktion im zellulären Signaltransfer haben. Die strikte Regulation des zellulären pH-Wertes setzt allerdings feste Grenzen, oberhalb derer eine

Abweichung vom Normzustand für die Zelle als Signal erkennbar wird und eine Prozesskaskade auslöst. Die Notwendigkeit der Überschreitung von Schwellenwerten schützt vor permanenter Signalüberflutung durch häufig auftretende fluktuierende pH-Schwankungen. Eine lokale Generierung dezidiertter pH-Signaturen ist möglich, damit die Zelle auch zwischen verschiedenen, zeitgleich aktiven Signalen differenzieren kann (pH-Landschaften). Im Gegensatz zu pH-shifts sind Signaturen der Calcium-Verteilung als "second messenger" charakterisiert. Es wurden zellspezifische, zytoplasmatische "Ca-fingerprints" beschrieben, mit deren Hilfe Zellen spezifisch auf unterschiedliche Stimuli in Form von Oszillationen, Wellen oder Spikes reagieren können.

Intrazelluläre pH-Gradienten können durch kurzzeitige Verschiebungen der ihnen zugrunde liegenden Fluxgleichgewichte zur Generierung von pH-shifts genutzt werden. Dabei sind nicht nur Gradienten zwischen einzelnen Zellorganellen von Bedeutung, sondern auch Unterschiede in der lokalen Protonenkonzentration einer Organelle. So weisen z.B. die Thylakoide der Chloroplasten Protonengradienten auf, welche als Teil des Schutzmechanismus gegenüber intensivem Lichteinfluss wirken [Ewy 2000].

Letztlich ist die Auslösung einer Reizschwelle (Erkennung) mit dem Überschreiten einer Mindestkonzentration verbunden (Signalthöhe). In der Folge tritt dann im Rahmen des zellulären Selbstschutzes eine Signalsättigung ein. Eine positive Reaktion kann hierbei anhand des Umfangs der Reaktion (Stärke) in Verbindung mit seiner Wirksamkeit aufgefasst werden. So kann die Summe oder mitunter eine singuläre lokale Fluktuation von Protonengradienten als Folge externer Stimulation, in Verbindung der damit gekoppelten bio-chemischen Reaktionskaskaden, eine in ihrer Wirksamkeit förderliche Gesamtreaktion des Systems darstellen.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass zu den schnellsten gemessenen Reaktionen, die auf einer Strahlungsabsorption beruhen, mit 0,5 ps die photochemische Strukturänderung der lichtabsorbierenden Gruppe Retinal von Rhodopsin in der Retina gehört [Herbst 2002]. Die dreidimensionale Orientierung in diskreten (flexiblen) Domänen der Proteine findet dabei im Nanosekundenbereich statt [Munoz 1997]. Für simple Proteine mit einer Polypeptidkette wurde experimentell wie theoretisch bestätigt, dass die Proteine unabhängig vom Faltungsweg das Energieminimum als nativen Zustand annehmen (thermodynamische Hypothese) [Govindarajan 1998, Kim 1990]. Es existieren jedoch ebenso Proteine, die im nativen Zustand nicht im Zustand der minimalen freien Enthalpie gefaltet sind, so dass es zu einer Weiterfaltung in den Zustand minimaler Energie, der biologisch inaktiv ist, kommen kann. Beispiel dafür ist der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1), dessen aktive „native“ Form metastabil ist und innerhalb von 6 Stunden in eine stabile inaktive Form übergeht [Berkenpas 1995].

Angesichts dieser Überlegungen können insbesondere die Auswirkungen von Wärmeanwendung auf langsam wachsendes Gewebe mit hohem Stoffwechselumsatz wie z.B. das regenerierende Knorpelgewebe große Bedeutung haben. Das bradytrophe Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und extrazellulärer Matrix. Die Morphologie, die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten werden hauptsächlich durch die extrazellulären Matrixproteine Kollagen und Fibronectin beeinflusst [Enomoto 1993].

Die Beta 1-Subfamilie der Integrine vermitteln die Signalübertragung zwischen Chondrozyten und den Matrixproteinen. Die Interaktion zwischen Integrinen und Matrixproteinen führt zu

spezifischen Antworten der anabolen intrazellulären Signalkaskade in den Chondrozyten [Shakibaei 1995, 1997 und 2001]. Von großer wissenschaftlicher Bedeutung wäre der Nachweis einer Aktivierung dieser Signalkaskade in den Chondrocyten durch Wärmeanwendung.

Die Beta 1-Integrinrezeptorgruppe ist von entscheidender Bedeutung für die Signalübertragung in den Chondrozyten. Die vermehrte Expression dieses Rezeptors spricht nach aktuellem Kenntnisstand für eine angeregte Signalkaskade in Richtung Zellkern [Shakibaei 1999], mit dem Ziel vermehrter Produktion von extrazellulärer Matrix. Weiterhin wird postuliert, dass der Alpha 5, Beta 1-Integrinrezeptor den intrazellulären Shc-Grb2-Komplex in Chondrozyten aktiviert, so dass die Differenzierung der Knorpelzellen gewährleistet ist [Wary 1996]. Fibronectin als wichtige extrazelluläre Matrixkomponente hat eine bedeutende Funktion für das Überleben der Chondrozyten [Martin 2000]. Jones findet in oberflächlichen Schichten von osteoarthrotischem Knorpelgewebe größere Mengen Fibronectin als Zeichen für laufende Reparaturmechanismen [Jones 1987]. Die Frage, ob eine Wärmeanwendung regulatorisch positiv in diesen Regelkreis der Regeneration eingreifen kann, könnte im Rahmen von weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene mit den vorgenannten Temperaturgradientenmessungen darstellen.

Die intrazelluläre Signalkaskade wird durch die Adhäsion von Chondrozyten an Kollagen Typ II über die Beta 1-Integrin-Rezeptoren aktiviert [Shakibaei 1999]. Die zytoskeletalen Signalproteine (Vinculin und Paxillin) werden nach Phosphorylierung aktiviert. Eine Aktivierung dieser intrazellulären Signalkaskade z.B. durch Behandlung mittels Laserbestrahlung niedriger Energiedichte scheint ein integrinvermittelter Effekt zu sein [John 2003]. Durch die Bindung von Kollagen Typ II an Beta 1-Integrin in humanen Chondrozyten kann über die Vermittlung der zytoskeletalen Proteine eine Aktivierung von Shc entstehen. Erk 1/Erk 2-MAP-Kinase-Kaskade wird durch den Signalweg der Komplexbildung des Shc mit Grb 2 aktiviert [Shakibaei 1999]. Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs scheint für die Regulierung der Genexpression durch integrinvermittelte Signale bedeutsam zu sein. Dieser Aktivierungsprozess ist von extremer Bedeutung für das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation der Chondrozyten.

Bei einem Zelltod bzw. einer Lyse der Chondrozyten wird die Aktivierung von Erk 1/Erk 2 gehemmt [Shakibaei 2001]. Wenn durch die Erhöhung eines bestimmten Temperaturgradienten (unter Wärmebehandlung der Chondrozyten) auch die Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Kaskade stimuliert werden kann, könnte der thermische Effekt einer Low-Level-Laser-Therapie die entscheidende Bedeutung für das Überleben, die Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten haben. Wenn die extrazellulären Matrixkomponenten die Rezeptoren und die intrazellulären Signalproteine des Knorpelgewebes unter einer Laserbestrahlung mit einer deutlichen Synthesesteigerung reagieren, kann höchstwahrscheinlich auf der Ebene eines Temperaturunterschiedes zwischen intra- und extrazellulärem Raum ein stimulierender Wärmeeffekt diskutiert werden, welcher zur Wachstumsstimulation von Knorpelzellkulturen und/oder zur Beschleunigung der Regeneration des arthrotischen Knorpelgewebes im klinischen Alltag erfolgreich eingesetzt werden könnte.

7.4 Gewebefusion durch selektiven Wärmeeintrag und ihre Bedeutung für das biologische Resurfacing vom Knorpelgewebe

In unseren früheren Untersuchungen konnten wir die potenzielle Möglichkeit der Anwendung von Lasern zur Gewebefusion evaluieren [Ahmadi 1992]. Mit der Weiterentwicklungen dieser Methode stehen auch neue Techniken der Gewebefusion zur Verfügung, die nach entsprechenden Modifikationen des Verfahrens neue Perspektiven für die Anwendung des selektiven Wärmeeintrages auch bei der autologen Chondrozytentransplantation eröffnen.

Die Nutzung von Laserschweißverfahren zum Verbinden von Gewebe hat das Potenzial, sich zu einem bedeutenden Meilenstein in der Chirurgie zu entwickeln, insbesondere da das Verfahren auch laparoskopisch bzw. endoskopisch eingesetzt werden kann. Für die zunehmende Anwendung der Lasertechnik zur Gewebefusion setzt langsam eine weitreichende Akzeptanz ein. Im Vergleich zu herkömmlichen Nahttechniken zur Geweberekonstruktion verspricht das neue Verfahren ein schnelles, einfaches und weniger traumatisierendes Verfahren mit geringerem Naht- und Nadeltrauma, verminderter Fremdkörperreaktion und einer Minimierung der Blutungsgefahr [Godlewski 1995, Dalsing 1992, Chikamatsu 1995]. Durch Laserschweißen zustande gekommene Fusionen weisen eine schnellere Heilung auf [Frazier 1985]. Durch lasergestützte Gewebefusion ist der komplette Wundverschluss möglich. Im Fall von Gefäßfusion erreicht man intraoperativ eine wasserfeste Anastomose. Beim Einsatz der Methode zur Wiederherstellung von Nervenverbindungen wird das zufällige Wuchern sich regenerierender Axone bzw. das Eindringen von Fibroblasten verhindert [Eppley 1989].

Bei den klinischen Anwendung der bisherigen lasergestützten Gewebefusionierung bestehen aber noch immer zwei wesentliche Probleme. Zum einen besitzt eine so erzeugte Anastomose eine relativ geringe Verbindungsfestigkeit, besonders in der akuten Heilungsphase bis zu 5 Tagen postoperativ [Jain 1979, Grubbs 1988]. Zum anderen muss man nach wie vor mit einer nicht zu vernachlässigenden thermischen Schädigung des umgebenden Gewebes infolge einer direkten Erhitzung durch den Laser rechnen [Kopchok 1988, Chow 1990]. Bedenken gibt es auch wegen technischer Probleme bezüglich Gewebeausrichtung, einem nicht klar definierbaren „Endpunkt“ des Verfahrens und schlechter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [Bass 1995, Thomsen 1995].

Anastomosen geringer Stärke können zu einem Aneurysma oder gar zum Riss der Rekonstruktion führen. Nach Laseranastomosierung wird über eine Fehlerrate von 8%-90% berichtet. Im Vergleich dazu liegt die Fehlerrate bei genähten Geweberekonstruktionen zwischen 0% und 12% [Frazier 1985, Lawrence 1991]. Einige Forscher berichten über die Notwendigkeit zusätzlicher Nähte, um die Erfolgsquote ihrer Laseranastomosen zu verbessern [Cilesiz 1996]. Dies erschwert die Operation und steigert das Risiko postoperativer Komplikationen. In einem anderen Ansatz wurde eine zusätzliche Gewebeschicht, wie venöse Transplantate bei Gefäßrekonstruktionen oder Epineurium bei Nervenrekonstruktion [Abramson 1991, Korff 1992] auf das anastomotische Areal appliziert. Zwar werden mit diesem Ansatz auch Fremdkörperreaktionen verhindert, doch muss geeignetes Gewebematerial präpariert werden, und die Operation ist technisch sehr anspruchsvoll.

Die thermische Schädigung des Gewebes ist ein besorgniserregender Aspekt bei Laserbehandlungen. Gewebeschiessen mittels Laser erfolgt durch eine laserinduzierte Erwärmung des Gewebes auf Temperaturen, die eine unmittelbare, irreversible Schädigung der strukturellen Gewebeproteine durch Zellnekrose und -denaturierung hervorrufen kann. Die

daraus folgende Proteindenaturierung erfolgt nicht spezifisch im Zielgewebe, und der Temperaturanstieg kann unter Umständen nicht lokalisiert werden. Die Denaturierung ist ein durch das lokale Temperatur-Zeit-Verhalten bestimmter kinetischer Prozess, der durch ein einfaches Arrheniusmodell genähert werden kann [Pearce 1993, Çilesiz 1996]. Das Ausmaß der Reaktion verhält sich linear proportional zur Zeit und ist eine exponentielle Funktion der Temperatur. Im Ergebnis dieser exponentiellen Abhängigkeit ist die Temperatur der dominierende Parameter zur Regelung des Ausmaßes der Reaktion.

Das Ziel eines thermischen Lasergeweberekonstruktionsverfahrens ist die Koagulation eines gewünschten Gewebevolumentums mit minimalen Auswirkungen im benachbarten gesunden Gewebe. Aufgrund seiner geringen Eindringtiefe ($<20 \mu\text{m}$) in Weichgewebe wird der CO_2 -Laser für die Laserrekonstruktion dünner Gewebeschichten favorisiert. In dicken Gewebeschichten kommt es jedoch bei der Anwendung des CO_2 -Lasers zu einem unvollständigen Verschluss des anastomosierten Bereiches. In diesem Fall kann nur durch Anwendung hoher Leistungsdichten oder langer Expositionszeiten eine zuverlässige Gewebeverbindung erreicht werden [Kopchok 1988]. Bei hohen Leistungsdichten besteht die Gefahr der Gewebeverkohlungs, die zu einer sekundären Zersetzung der Rekonstruktion oder Aneurysmenbildung führt. Lange Expositionszeiten bewirken eine Wärmeausbreitung über die ursprüngliche Absorptionszone hinaus. Dies ist besonders problematisch, wenn die Wärme sich horizontal vom anastomotischen Bereich zum umgebenden gesunden Gewebe ausbreitet. Histologische Untersuchungen belegen, dass bei Anwendung von Laserstrahlung mit hohen Leistungsdichten über lange Zeiten mit dem Ziel eine effiziente Gewebefusion herzustellen, hochgradige thermische Schädigungen im Gewebe erzeugt werden [Kopchok 1988, Chow 1990]. Der Argonlaser hat eine höhere Eindringtiefe in Weichgewebe (ca. $300\text{-}700 \mu\text{m}$) und ist daher besser geeignet für den Einsatz zur Herstellung von Verbindungen dickerer Gewebeschichten. Dabei entstehen jedoch Probleme bei der Dosimetrie. Aufgrund von Schwankungen des Hämoglobin- und Melaningehaltes des Gewebes, der lokalen Gewebedicke und des Hydratationszustandes ergeben sich Schwierigkeiten mit der exakten Bestimmung der notwendigen Laserenergie [Self 1996]. Die Spanne zwischen einer gelungenen und einer misslungenen Gewebeverbindung ist sehr schmal. Eine zu geringe Leistungsdichte ergibt eine schwache Anastomose. Eine zu hohe Leistungsdichte hingegen bewirkt eine extreme thermische Schädigung des Gewebes, wobei die Gewebeproteine vertrocknen und schrumpfen, wodurch die Flexibilität und Festigkeit der Naht verringert wird.

Um diese Problematik zu umgehen, werden in neuester Zeit bei der Herstellung der Anastomosen mittels Laser zwei innovative Maßnahmen verwendet:

- die Zugabe von endogenem und exogenem Material als Lötmedium und
- die Verwendung laserwellenlängenspezifischer Chromophore.

Die Zugabe von endogenem und exogenem Material an der Gewebeverbindung unterstützt eine stabile Kantenausrichtung (das Material fungiert als schwacher Klebstoff vor der Denaturierung) und die Kräftigung der Wunde, besonders in der akuten postoperativen Heilungsphase, während das darunter liegende Gewebe vor übermäßiger, durch direkte Absorption des Laserlichts entstehender thermischer Schädigung abgeschirmt wird. Zu diesem Zwecke werden Materialien wie u.a. Blut, Plasma, Fibrinogen und Albumin verwendet [Bass 1994, Poppas 1993, McNally 1999, Soller 2003].

Durch die Verwendung laserwellenlängenspezifischer Chromophore erfolgt die Absorption in der eingefärbten Region und dem umgebenden Gewebe unterschiedlich. Ein Vorteil dieses

Verfahrens ist, dass das Areal großflächig bestrahlt werden kann, während die Energie selektiv nur durch das Ziel absorbiert wird. Folglich wäre eine exakte Fokussierung des Laserstrahls eventuell nicht mehr notwendig. Durch die verbesserten Absorptionseigenschaften des eingefärbten Gewebes könnten geringere Leistungsdichten verwendet werden, um den erforderlichen Effekt zu erzielen, was die Verfahrenssicherheit erhöht. Als Beispiele für den Einsatz von Farbstoffen zur Unterstützung des Laserschweißverfahrens seien genannt: Carbon Black und Fen 6 beim Nd:YAG-Laser, Indocyaningrün beim Diodenlaser mit der Wellenlänge von ca. 800 nm, Eisenoxid und Fluoreszein beim KTP-Laser sowie basisches Fuchsin, Methylviolett, Kristallviolett und Fluoreszeinisothiocyanat beim Argonlaser [Kokosa 1997, Ravzi 1996, Poppas 1993, Brooks 1992, Self 1996].

Eine Reihe von experimentellen Studien wurde durchgeführt, um die intracelluläre Eindringtiefe der Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge zu bestimmen. Die Lichtverteilung und -verbreitung in biologischen Geweben wird beeinflusst durch die gewebespezifischen optischen Eigenschaften. Daher sind die relevanten Parameter durch exakte Kalkulation der Lichtdosimetrie bestimmt. Die diagnostische Sicherheit wird durch genaue Prozessanalyse der individuellen und lokalen Abweichung gesteigert. Die erhobenen Daten der in vitro untersuchten kultivierten Zellen können als Anhalt für In-vivo-Untersuchungen von Geweben dienen [Roggan 1993, Cheong 1990, Roggan 1995, Ritz 1997, Welch 1997].

Welch konnte die unterschiedliche Wärmereaktion der einzelnen Gewebeschichten nach Laserbestrahlung differenzieren, indem er die verschiedenen Temperaturgradienten mathematisch nachwies [Welch 1984]. Die Wärmeleitung und -abgabe in unterschiedlichen Geweben ist direkt abhängig von der Dichte des Gewebes, der Grundtemperatur, der spezifischen Wärmeentwicklung und der generellen Temperaturerhöhung. Anhand eines Haut- und Retinamodells wird direkt proportional die spezifische Wärmeerhöhung und der dazugehörige Gewebsschaden erfasst.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich alle Anwender über die thermischen Effekte während der Laserbestrahlung einig sind. Das Mass der Lichtintensität, der Temperatur und der Gewebeschädigung sind kritisch in Bezug auf Modifikation und Validierung der Modelle anzusehen.

An Muskel- und Lungengewebe konnte unter einer Wärmebestrahlung von 0,06 bis 0,12 W/cm² eine Perfusionssteigerung der Gewebe nachgewiesen werden. Jedoch in unterschiedlicher Weise auf Grund der unterschiedlichen Gewebedichte. Mit der Gewebetemperatur verändert sich die Perfusion [Liu 2003, Davies 1994, Harasaki 1998, Xu 1998, Saidel 2001].

In einer Studie von Kaneps wurde der Einfluss von Wärme- und Kälteumschlägen auf die Gewebeheilung von der Metacarpalen Region bei Pferden analysiert [Kaneps 2000]. Die konventionellen Hot und Cold Packs zeigen relativ geringe Veränderungen in der Gewebetemperatur. Jedoch Eis- und Warmwasserumschläge mit Temperaturen von 40 bis 45 Grad Celsius scheinen optimale Gewebewirkungen zu zeigen mit entsprechenden therapeutisch wirksamen Temperaturunterschieden im Gewebe.

Die zelluläre Toleranz von Fibroblastenzellen der Säugetiere nach gepulster Laserbestrahlung wird von Simanovskii beschrieben [Simanovskii 2005]. Der Schaden der Zelle ist bei kurzem Impuls (z. B. 300 μ s) bis zu einer Temperatur von 180 Grad Celsius noch tolerabel. Die Zelle überlebt. Die Analyse der Ergebnisse haben gezeigt, dass die maximale Temperatur nach der Pulsdauer dem Arrheniusgesetz folgt [Huettmann 2003, Framme 2002].

Youn beschäftigte sich mit der Frage, ob die Retardierung des Knorpelgewebes nach non-ablativer Laserbestrahlung durch die thermische Denaturierung oder die Dehydratation verursacht wird [Youn 2005]. Mit dem PS-OCT-System konnte Nasenseptum-Knorpelgewebe unter der Anwendung des Nd:YAG-Lasers im Rahmen des non-ablativen Verfahrens lokal bestrahlt werden. Youn fand heraus, dass die retardierenden Knorpelveränderungen primär durch eine Dehydratation hervorgerufen werden. Diese Ergebnisse entsprachen auch den Beobachtungen anderer Autoren [Lai 1991, Sobol 1996, Wang 1996, Maitland 1997, Bagratashvili 1997].

8 Zusammenfassung

In Abhängigkeit von den Laserparametern – Wellenlänge, Leistungsdichte und Expositionszeit – sowie den optischen und thermischen Gewebeeigenschaften können durch die Laserbestrahlung von biologischen Geweben drei Typen von Gewebereaktionen erzielt werden: photochemische-, thermische- und Photodekompensationseffekte. Die daraus resultierende Möglichkeit der Laseranwendung zur Behandlung von zahlreichen Erkrankungen ist zum medizinischen Alltag geworden. Eine zunehmende Bedeutung gewinnt die Laserchirurgie bei der Behandlung von bradytrophen Geweben. Die Therapie mit niedrigenergetischen Lasern (Low Level Lasertherapie (LLLT)) findet zwar ihren klinischen Einsatz, bisher jedoch ohne wissenschaftlichen Nachweis des eigentlichen Wirkmechanismus. In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Prozesse des wärmestimulierten Verhaltens vom Zellstoffwechsel des Knorpelgewebes unter besonderer Berücksichtigung sowohl des Einflusses der thermischen Effekte als auch der Einwirkung der LLLT auf die Synthesesteigerung evaluiert.

Die Schneideigenschaften verschiedener Lasersysteme am humanen Knorpel wurden in Bezug auf die klinische Einsetzbarkeit, Qualität des Schnitts, Größe der thermischen Schädigungszone und Vorhandensein von Karbonisation untersucht. Hier kommt dem Einsatz des Er:YAG-Lasers zur Bearbeitung von Knorpelgewebe eine besondere Bedeutung zu.

Zunächst liegen die Ergebnisse von In-vitro-Untersuchungen der Lasersysteme am Knorpelgewebe vor. Die Morphologie, die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten werden durch die extrazellulären Matrixproteine Fibronectin und Kollagen beeinflusst. Beta 1-Subfamilie der Integrine vermitteln die Signalübertragung zwischen Chondrozyten und den Matrixproteinen, wobei die Interaktion zu spezifischen Antworten der anabolen intrazellulären Signalkaskade in den Knorpelzellen führt. Mit einem niedrigenergetischen Diodenlaser (780 nm) bei drei unterschiedlichen Energiedichten (1 J/cm², 4 J/cm² und 6 J/cm²) sind die Matrixkomponenten in osteoarthrotischem Knorpel untersucht worden. Bei dreimaliger Bestrahlung mit einer Energiedichte von 4 J/cm² zeigten Kollagen Typ II und Fibronectin die höchste Synthesesteigerung. Durch die Aktivierung der Beta 1 Integrinrezeptorgruppe bei diesem Bestrahlungsmuster ist eine erhöhte Signalübertragung in den Chondrozyten beschrieben. Zytoskeletale Signalproteine (Vinculin und Paxilin), Aktivierung von Shc und Erk 1/Erk 2-MAP Kinase-Kaskade werden erhöht, um somit die Integrine-Rezeptoren zu aktivieren. Dieser Aktivierungsprozess ist wichtig zum Überleben, zur Differenzierung und zur Proliferation der Chondrocyten. Diese Signalproteine sind bei dem Bestrahlungsmuster erhöht. Auch der stimulierende Einfluss einer Nd:YAG-Laserbestrahlung auf Knorpelgewebe ist beschrieben. Bei einer Bestrahlung mit einer Gesamtenergie von 30 bis 100 Joule und einer Leistungsdichte von 10 bis 30 Watt/cm² lassen sich sowohl bei gesunden tierischen als auch bei osteoarthrotisch geschädigtem menschlichem Knorpel die Matrixsynthesen steigern. Es ist anzunehmen, dass thermische Effekte für die Synthesesteigerung am Knorpelgewebe mitverantwortlich sind.

Bei In-vivo-Untersuchungen von verschiedenen Lasersystemen (Nd:YAG-, CO₂-, Ho:YAG- und Excimer-Laser) wurden in der arthroskopischen Knorpelchirurgie Auswirkungen auf die gesamte funktionelle Einheit der inneren Gelenkanteile nachgewiesen. Gelenkkapsel, Synovia und Gelenkknorpel werden in unterschiedlichster Weise beeinflusst. Als herausragendes Ergebnis konnte nach experimenteller Knorpelabrasion mit dem Nd:YAG-Laser (1064 nm) nach vorübergehender serofibrinöser Synovialitis eine durch verstärkte Vaskularisierung bedingte Chondrozytenproliferation beobachtet werden. Bei weiteren Untersuchungen zum Abbau von

Proteoglykanen im osteoarthrotisch veränderten Knorpel konnte unter niedrigerenergetischer Laserbestrahlung (692,6 nm) eine mildere Veränderung der Gelenke mit geringerem Proteoglykanabbau nachgewiesen werden. Makroskopische, mikroskopische und immunhistochemische Veränderungen nach Laserbestrahlung mit niedriger Energiedichte konnten tierexperimentell gefunden werden. Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Glucosaminoglykane, Fibronectin, Tenascin und Zytokine spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Unter der Wirkung einer Diodenlaserbestrahlung (692,6 nm) mit einer Energiedichte von 4 J/cm^2 konnte die Arthrosegradientstehung deutlich reduziert werden. Eine Abnahme des Proteoglykans und Zunahme des Kollagen Typ VI als Charakteristikum für gesunden Knorpel nach Bestrahlung der Osteoarthrose spricht für eine Stoffwechselsteigerung im hyalinen Knorpel. Tenascin des gesunden Knorpels erfährt unter der Bestrahlung im osteoarthrotischen Knorpel eine wesentliche Produktionssteigerung.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die anatomischen und biochemischen Unterschiede eine Übertragung der im experimentellen Arthrosemodell des Kaninchens gewonnenen Erkenntnisse auf die Verhältnisse in der humanen Arthrose nur mit Einschränkung zulassen.

Trotz allem konnte gezeigt werden, dass die niedrigerenergetische Laserbestrahlung sowohl des tierexperimentellen als auch humanen osteoarthrotischen Knorpels den Zellstoffwechsel auf einer bestimmten Ebene bei definierten Bedingungen positiv beeinflusst. Eine übergeordnete Rolle für die Syntheserhöhung scheinen Licht, Zeit und Wärme zu spielen. Die Zytochrom C-Oxidase dient als möglicher Fotoakzeptor bei der Bestrahlung von Zellen mit monochromatischem Rot- bis nahem Infrarotlicht. Durch die Zytochromabsorption fungiert das Photon als Träger biologischer Energie und somit als Anregung für den Elektronentransport. Bei diesem Prozess wird Bioenergie in Form von ATP aus ADP erzeugt. In den Studien der unterschiedlich verwendeten Wellenlängenbereiche absorbieren die Zytochrome als Teil der Elektronentransportkette äußerst stark. Aus dieser Theorie heraus und den Ergebnissen der Wirkungen des Dioden-Lasers auf stimulierenden Effekt der Proliferation der Proteoglykansynthese am humanen Gelenkknorpel heraus sind Temperaturerhöhung und Wärmeentwicklung die entscheidenden Parameter.

Seit vielen Jahrzehnten stellen der lokale Knorpelschaden und die Osteoarthrose ein wesentliches klinisches Problem dar: schmerzbedingte Medikamenteneinnahme, zunehmende Immobilisierung, langfristige Arbeitsunfähigkeiten, endoprothetische Versorgung, sozioökonomische Kostenexplosion bis hin zu vielen operativen Eingriffen. Neben sog. gewebsstimulierenden intraartikulären Injektionen, Gelenkspülung und Knorpelglättung, Pridiebohrung, Abrasionsarthroplastik, Mikrofrakturierung, Mosaikplastik, Knorpel-Knochen-Stanze, Periost- und Perichondriumtransplantation stellt heutzutage die Autologe Chondrocytentransplantation (ACT) bei lokalem Knorpelschaden und individueller Entscheidung die Alternative dar. Bei ausgedehntem Knorpelschaden und/oder hohem Lebensalter steht dem Individuum nur der künstliche Ersatz mit Prothese nach eventuell vorheriger Korrekturosteotomie zur Verfügung.

Auf der Suche nach wachstumsfördernden bzw. -erhaltenden Maßnahmen für das verletzte oder arthrotische Knorpelgewebe in Kombination mit den herkömmlichen Maßnahmen könnte eine zusätzliche oder alleinige niedrigerenergetische Laserbestrahlung unter definierten Bedingungen der Schlüssel zum Erfolg sein. Hierbei sind die neuesten Erkenntnisse des wärmestimulierten Verhaltens des Zellstoffwechsels von entscheidender Bedeutung.

Der intrazelluläre Stoffwechsel hängt biophysikalisch von Konzentrationsgradienten und mechanischen Transportvorgängen ab. In Modellrechnungen konnte gezeigt werden, dass

während der Bestrahlung des Gewebes mit niedrigenergetischen Lasern Temperaturgradienten innerhalb einer Zelle entstehen können, die diese Vorgänge beeinflussen. In biologischen Geweben – somit auch im Knorpelgewebe – kann eine Temperaturveränderung z.B. durch Einwirkung von Laserstrahlung induziert werden. Unter Berücksichtigung der dynamischen gewebeoptischen Parameter sind Strahlungsabsorption und Streuung die entscheidenden Größen der Laser-Gewebe-Interaktion. Fixierte Streuzentren und Absorber sind in die Gewebematrix integriert. Diese führen zu einer Abschwächung der Strahlung und letztendlich zum Schutz der Zelle und der Zellorganellen. Durch die Absorption kann die Zelle im Verband verändert werden. NADH, Flavine und Porphyrine wie z.B. das oxidierte Zytochrom oder die Katalase sind Absorber innerhalb der Zellen. Eine Temperaturerhöhung führt zur Aktivierung der Transportprozesse. Auf subzellulärem Niveau führt die unmittelbare, direkte Temperaturerhöhung in einer räumlich begrenzten Umgebung ggf. zur Stoffwechselaktivierung bzw. -inaktivierung und/oder zur Schädigung essenzieller supramolekularer Strukturen. Aus dieser Theorie heraus darf die kurzfristige Induktion hoher Temperaturgradienten innerhalb des zellulären Systems eine Reizung der zellulären Matrix verursachen und mithin eine vollständig reversible Schädigung der Zelle darstellen.

Würde sich diese Theorie in weiteren wissenschaftlichen Grundlagenuntersuchungen bestätigen, bürden diese Erkenntnisse eine enorme wissenschaftliche und klinische Relevanz mit erheblichen sozioökonomischen Konsequenzen in der Behandlung des lokalen und generellen Knorpelschadens.

9 Literaturverzeichnis

- Abramson DL, Shaw W, Kamat B, Harper A, Rosenberg CR: Laser-assisted venous anastomosis: A comparison study. *J Reconstruct Microsurg* 1991; 7: 199-203.
- Ahmadi A: Laser-induzierte Gewebefusion. Experimentelle Studie über die Gefäßanastomosenherstellung durch Laser, am Beispiel der Arteria femoralis des Kaninchens. Habilitationsschrift des Universitätsklinikums Steglitz der Freien Universität Berlin 1992.
- Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, Von der Mark K: Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1993; 91: 829-837.
- Albelda SM: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68: 4-17.
- Albrecht H, Rohde E, Zgoda F, Müller G: Lasersysteme. In: Kramme (Hrsg.): *Medizintechnik. Verfahren, Systeme, Informationsverarbeitung*. Springer 2002: 296-318.
- Alexander CJ: Osteoarthritis: a review of old myths and current concepts. *Skeletal Radiol* 1990; 19: 327-333.
- Altman RD, Dean DD: Osteoarthritis research: animal models. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 19(1): 21-25.
- Anderer U, Libera J: In vitro Engineering of Human Autogenous Cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17(8): 1420-1429.
- Anderson RR, Parrish BS, Parrish JA: The optics of human skin. *J Invest Derm* 1981; 77(1): 13-19.
- Asari A, Miyauchi S, Kuriyama S, Machida A, Kohno K, Uchiyama Y: Localization of hyaluronic acid in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 1994; 4: 513-522.
- Axelssons S: Human and experimental osteoarthrosis of the temporomandibular joint. Morphological and biochemical studies. *Swed Dent J* 1993; 91: 1-45.
- Bäumler W, Abels C, Szeimies RM: Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy in Dermatology. *Medical Laser Application* 2003; 18(1): 47-56.
- Bagratashvili V, Sobol EN, Sviridov AP, Popov AP, Omel'chenko AI, Howdle SM: Thermal and Diffusion Processes in Laser-Induced Stress Relaxation and Reshaping of Cartilage. *J Biomechanics* 1997, 30(8): 813-817.
- Bass LS, Libutti SK, Oz MC, Rosen J, Williams MR, Nowygrod R, Treat MR: Canine choledochotomy closure with diode laser-activated fibrinogen solder. *Surgery* 1994; 115: 398-401.
- Bass LS, Treat MR: Laser tissue welding: a comprehensive review of current and future clinical applications. *Las Surg Med* 1995; 17: 315-349.
- Beckers JM, Bulstra SK, Kuijer R, Bouwmeester SJ, Linden AJ: Analysis of the clinical results after perichondral transplantation for cartilage defects of the human knee. 19th Symposium of the European Society of Osteoarthritis, Nordwijkerhout Netherlands 1993: 157.
- Behrens P, Bruns J, Erggelet C, Esenwein S, Gaissmaier C: Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) und Tissue Engineering. *DGU-Mitteilungen und Nachrichten* 2002; 45: 34-41.
- Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Ruslies M, Plotz W: Neues Therapieverfahren für lokalisierte Knorpeldefekte – Ermutigende Resultate mit der autologen Chondrozytentransplantation. *MMW Fortschr Med* 1999; 45: 49-51.
- Bellamy N: Osteoarthritis clinical trials: candidate variables and clinimetric properties. *J Rheumatol* 1997; 24: 768-78.

Bergh H van den, Ballini JP, Sickenberg M: Photodynamic Therapy for Subfoveal Choroidal Neovascularisation in Various Diseases among which Age-related Macular Degeneration: An Update. *Medical Laser Application* 2003; 18(1): 65-78.

Berkenpas M, Lawrence D, Ginsburg D: Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *EMBO* 1995 ; 14; 2969–2977.

Bertalanffy LV, Beier W, Laue R: *Biophysik des Fließgleichgewichts*. Akademie-Verlag, Berlin 1977.

Bert JM, Maschka K: The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis – a five year follow up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy* 1989; 5: 25-32.

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al.: Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99: 1534-1545.

Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P Reexpression of cartilage specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994; 212: 97-104.

Bosatra M, Jucci A, Oliario P, Quacci D, Sacchi S: *In-vitro* fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. An electron microscopic study. *Dermatologica* 1984; 168: 157-162.

Boulton M, Marshall J: He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. *Lasers Life Sci* 1986; 2: 125-134.

Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, Linden AJ van der, Bulstra SK: Long term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 1996; 21: 313-317.

Breugel HHFI, Bär PRD.: Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biostimulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992; 12: 528-537.

Brierley VH, Ayad S, Grante ME: Types II, VI and IX collagens in normal and osteoarthrotic articular cartilage. *Biochem Soc Trans* 1991; 19: 379.

Brighton CT, Unger AS, Stambough JL: In vitro growth of bovine articular cartilage chondrocytes in various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 1984; 2: 15-22.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895.

Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L: Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 2001; 391 Suppl: 337-348.

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L: Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996; 326: 270-283.

Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop* 1999; 367(Suppl): 147-155.

Brooks SG, Ashley S, Fisher J, Davies GA, Griffiths J, Kester RC, Rees MR: Exogenous chromophores for the argon and Nd:YAG lasers: a potential application to laser-tissue interactions. *Las Surg Med* 1992; 12: 294-302.

Brown RA, Jones KL: The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *Rheumatol* 1990; 17: 65-72.

Bruns J, Steinhage J: Transplantation of chondrogenic tissue in the treatment of lesions of the articular cartilage. *Orthopäde* 1999; 28; 52-60.

Buckwalter J, Rosenberg L, Hunziker E: *Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods of facilitating repair*. Raven Press New York 1990.

- Bulstra S, Homminga G, Buurman W, Terwindt-Rouwenhorst E, Linden A van der: The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro. *J Orthop Res* 1990; 3: 328-335.
- Burton-Wurster N, Butler M, Harter S, Colombo C, Quintavalla J, Swartzendurber, Arsenis C, Lust G: Presence of Fibronectin in articular cartilage in two animal models of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1986; 13: 175-182.
- Byers PD, Maroudas A, Oztop F, et al.: Histological and biochemical studies on cartilage from osteoarthrotic femoral heads with special reference to surface characteristics. *Connect Tissue Res* 1977; 5: 41-49.
- Calderhead RG: Basics. In: Ohshiro T, Calderhead RG (ed): *Low Level Laser Therapy A Practical Introduction*. John Wiley & Sons 1988: 1.1-1.6.
- Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W, Yang BB: Beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol* 1999; 18: 343-355.
- Carney SL, Billingham ME, Caterson B, Ratcliff A, Bayliss MT, Hardingham TE, Muir H: Changes in proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritis cartilage. *Matrix* 1992; 12: 137-147.
- Castro DJ, Abergel RP, Meeker C, et al.: Effects of the Nd:YAG laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. *Ann Plast Surg* 1983; 11 :214-222.
- Cheong WF, Prah SA, Welch AJ: A review of the optical properties of biological tissue. *IEEE J Quant El* 1990;26 (12): 2166-2185.
- Chevalier X, Claudepierre P, Groult N, Godeau GJ: Influence of Interleukin 1 on tenascin distribution in human normal and osteoarthritic cartilage: A quantitative immunohistochemical study. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 772-775.
- Chevalier X., Groult N, Larget-Piet B, Zari L, Nornebeck W: Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1013-1022.
- Chikamatsu E, Sakurai T, Nishikimi N, Yano T, Nimura Y: Comparison of laser vascular welding, interrupted sutures, and continuous sutures in growing vascular anastomoses. *Las Surg Med* 1995; 16: 34-40.
- Cholewa D, Waldschmidt J: Laser Treatment of Hemangiomas of Larynx and Trachea. *Lasers in Surg and Medicine* 1998; 23: 221-232.
- Chow JWN, Flemming AF: Laser assisted microvascular anastomosis: a histological study. *Laser Med Sci* 1990; 5: 281-287.
- Cilesiz I, Springer T, Thomsen S, Welch AJ: Controlled temperature tissue fusion: argon laser welding of canine intestine in vitro. *Lasers Surg* 1996; 18: 325-334.
- Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH: The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998; 76: 275-288.
- Cruz-Esteban C, Wilke WS: Innovative treatment approaches for rheumatoid arthritis. Non-surgical synovectomy. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995; 9: 787-801.
- Dalsing MC, Packer CS, Kueppers P, Griffith SL, Davis TE: Laser and suture anastomosis: passive compliance and active force production. *Lasers Surg* 1992; 12: 190-198.
- Danielsson LG: Incidence and prognosis of coxarthrosis. *Clin Orthop* 287:13-18, 1993
- Davies CR, Fukumura F, Fukamachi K, Muramoto K, Himley C, Massiello A, Chen JF, Harasaki H: Adaptation of tissue to a chronic heat load. *ASAIO J.* 1994; 44: 514-517.
- Dieppe P: Some recent clinical approaches to osteoarthritis research. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 20(1): 2-11.

- Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I: Mechanical properties of the normal tibial cartilage-bone complex in relation to age. *Clin Biomech* 1998; 13: 351-358.
- Dingle JT, Davies ME, Mativi BY, Middeltown HF: Immunohistochemical identification of interleukin-1 activated chondrocyte. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 889-897.
- Dörschel K: Aufbau eines Lasers. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik*. Ecomed 1989(a), aktuelle Ergänzungslieferung: II-2.2.
- Dörschel K, Müller G: Physikalische Grundlagen des Lasers – Verstärker mit Rückkopplung. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik*. Ecomed 1989(b), aktuelle Ergänzungslieferung: II-2.1.
- Dore S, Pelletier JP, Dibattista JA, et al.: Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1 binding proteins. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 253-263.
- Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G: Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11: 540-545.
- Ebert DW, Bertone AL, Roberts C: Effect of irradiation with a low-intensity diode laser on the metabolism of equine articular cartilage *in-vitro*. *Am J Vet Res* 1998; 59: 1613-1618.
- Edwards RB, Lu Y, Rodrigues E: Thermometric determination of cartilage matrix temperatures during thermal chondroplasty: comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. *Arthroscopy* 2002; 18: 339-346.
- Egan JM: A viscoelastic analysis of the tensile weakening of deep femoral head articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng* 2000; 214: 239-247.
- Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D: Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1993; 205: 276-285.
- Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nakashima K, Mukudai Y, Boettiger D, Pacifici M, Kurisu K, Suzuki F: Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1124-1132.
- Eppley BL, Kalenderian E, Winkelmann T, Delfino JJ: Facial nerve graft repair: suture versus laser-assisted anastomosis. *J Oral Maxillofac* 1989; 18: 50-54.
- Erggelet C: Perspektiven der Knorpelregeneration. *Implant* 1999; 2: 7-8.
- Evans Ch: Cartilage and synovium. In: Baratz M.E., Watson A.D., Imbriglia J.E. (Hrsg.) *Orthopedic Surgery: The Essentials*. Thieme Medical Publishers Inc, New York: 1999; 33.
- Ewy RG, Dilley RA: Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes. *Plant Physiol* 2000; 122: 583-585.
- Fassbender HG, Zwick J: Results of new research in the area of osteoarthritis. *Wien Med Wochenschr* 1995; 145: 96-98.
- Ficat RP, Ficat C, Gedon P, Toussaint JB: Spongiolization: A new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop* 1979; 144: 74-83.
- Fischer R, Krebs R, Scharf HP: Cell vitality in cartilage tissue culture following Excimer laser radiation: An in vitro examination. *Laser Surg Med* 1993; 13:629.
- Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B: Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 260: 318-322.
- Framme C, Schuelle G, Roider J, Kracht J, Birngruber R, Brinkmann R: Threshold determinations for selective retinal pigment epithelium damage with repetitive pulsed microsecond laser systems in rabbits. *Ophthalmic Surgery and Lasers* 2002; 33(5): 400-409.

- Frazier OH, Painvin GA, Morris JR, Thomsen S, Neblett CR: Laser-assisted microvascular anastomoses: angiographic and anatomopathologic studies on growing microvascular anastomoses: preliminary report. *Surgery* 1985; 97: 585-589.
- Friedmann MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD: Preliminary results with abrasions arthroplasty in osteoarthritic knee. *Clin Orthop* 1984; 182: 200-205.
- Friedmann H, Lubart R, Laulich I: A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B Biol* 1991; 11: 87-95.
- Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW: Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 1999; 28: 242-255.
- Fuchs B, Berlien HP, Philipp C: Stellenwert des Lasers in der Medizin. Reidenbach: Lasertechnologien und Lasermedizin. Ecomed 1996; 13: 99-109.
- Gagne TA, Chappell AK, Johnson JL, McPherson JM, Oldham CA, Tubo RA, Vaccaro C, Vasios GW: Enhanced proliferation and differentiation of human articular chondrocytes when seeded at low cell densities in alginate *in-vitro*. *J Orthop Res* 2000; 18: 882-890.
- Garner DL: Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat* 1994; 184:465-476.
- Garino JP, Lotke PA, Sapega AA, Reilly PJ, Esterhai JL: Osteonecrosis of the knee following laser assisted arthroscopic surgery: a report of six cases. *Arthroscopy* 1995; 11: 467-474.
- Gerber BE, Asshauer T, Delacrétaiz G, Jansen T, Oberthür T: Biophysikalische Grundlagenuntersuchungen zur Wirkung der Holmium-Laserstrahlung am Knorpelgewebe und deren Konsequenzen für die klinische Applikationstechnik. *Orthopäde* 1996; 25: 21-29.
- Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD, Evans CH: Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000; 11: 289-307.
- Godlewski G, Rouy S, Tang J, Dauzat M, Chambettaiz F, Salathe RP: Scanning electronic microscopy of microarterial anastomoses with a diode laser: comparison with conventional manual suture. *J Reconstruct Microsurg* 1995; 11: 37-41.
- Goldman MP, Fitzpatrick RE: *Cutaneous Laser Surgery. The Art and Science of Selective Photothermolysis*. Mosby 1999.
- Goldring MB, Berenbaum F: Human chondrocyte culture models for studying cyclooxygenase expression and prostaglandin regulation of collagen gene expression. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999; 7: 386-388.
- Gout E, Boisson AM, Aubert S, Douce R, Bligny R: Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol* 2001; 125: 912-925.
- Govindarajan S, Goldstein R: On the thermodynamic hypothesis of protein folding. *Proc Nat Acad Sci* 1998; 95: 5545-5549.
- Grifka J, Anders S, Löhnert J, Baag R, Feldt S: Regeneration von Gelenkknorpel durch die autologe Chondrozytentransplantation. *Arthroskopie* 2000; 13: 113-122.
- Gross CM: Die photoablativen Effekte des Excimer-Lasers in der Angioplastie. Müller, Berlien: Fortschritte in der Lasermedizin 10. Ecomed 1994.
- Gross P, Marti B: Sportliche Aktivität und Arthrose-Risiko. *Schweiz Med Wochenschr* 1997; 127: 967-977.
- Grubbs PE, Wang S, Corrado M, Basu S, Rose DM, Cunningham JN: Enhancement of CO₂ laser microvascular anastomosis by fibrin glue. *J Surg Res* 1988; 45: 112-119.

- Grundmann K, Zimmermann B, Barrach HJ, Merker HJ: Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. *Virchows Arch A Path Anat and Histol* 1980; 389: 167-187.
- Günther M, Haubeck HD, van de Leur E, et al.: Transforming growth factor β 1 regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 395-405.
- Guerne PA, Carson DA, Lotz M: IL-6 production by human articular chondrocytes: Modulation of their synthesis by cytokines, growth factors, and hormones *in-vitro*. *J Immunol* 1990; 144: 499-505.
- Gulisano M, Delrio AN, Fadda M, Mqarceddu S: Human articular cartilage during osteoarthritis: a study under the scanning electron microscope. *Ital J Anat Embryol* 1993 ; 98: 175-185.
- Guzzardella GA, Morrone G, Torricelli P, Rocca M, Tigani D, Brodano GB, Ferrari D, Fini M, Giardino R: Assessment of low-power laser biostimulation on chondral lesions: an "*in-vivo*" experimental study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 441-449.
- Guzzardella GA, Tigani D, Torricelli P, Fini M, Martini L, Morrone G, Giardino R: Low-power diode laser stimulation of surgical osteochondral defects: results after 24 weeks. *Artif Cells Blood Substit Immobi Biotechnol* 2001; 29: 235-244.
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107: 17-27.
- Häuselmann HJ, Hunziker EB: Läsionen des Gelenkknorpels und ihre Behandlung. *Schweiz Med Wochenschr* 1997; 127: 1911-24.
- Hagemann R, Walter JH, Zgoda F: Wirkungsmechanismen von Laserstrahlung im biologischen Gewebe. Eigenschaften von biologischen Geweben. In Berlien HP, Müller G *Angewandte Lasermedizin, Ecomed* 1992; II-3:1-18.
- Hammerschmidt DE: Osteoarthritis/osteoarthritis. *J Lab Clin Med* 1997; 130:232.
- Hangody L: Die Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks mit der Mosaikplastik. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 1999.
- Hangody L, Kish G, Karpai Z, Szerb I, Udvarhelyi I: Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997(a); 5: 262-267.
- Hangody L, Kish G, Karpai Z, Szerb I, Eberhardt R: Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique – a preliminary report. *Foot Ankle Int* 1997(b); 18: 628-634.
- Harasaki H, Davies CR, Matsuyoshi T, Okazaki Y, Wika K, Fukamachi K: Heat dissipation from artificial hearts: Characterizing tissue responses and defining safe levels. In: Akutsu T, Koyanagi H (eds.): *Heart Replacement: Artificial Heart VI*. Springer 1998: 41-49.
- Hardie EM, Carlson CS, Richardson DC: Effect of Nd:YAG laser energy on articular cartilage healing in the dog. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 595-601.
- Harmer SL, DeFranco AL: Shc contains two Grb2 binding sites needed for efficient formation of complexes with SOS in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4087-4095.
- Hawkins CL, Davies MJ: Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochem Biophys Acta* 2001: 1504; 196–219.
- Heinegard D, Oldberg A: Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989; 3: 2042-2051.

- Helfmann J: Thermische Wirkungen. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.): Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik. Ecomed 1989(a), aktuelle Ergänzungslieferung: II-3.3.
- Helfmann J: Nichtlineare Prozesse. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.): Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik. Ecomed 1989(b), aktuelle Ergänzungslieferung: II-3.4.
- Herbst J, Heyne K, Diller R: Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization. *Science* 2002; 297(5582): 822–825.
- Herman JH, Khosla RC: In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism. *J Rheumatol* 1988; 15: 1818-1826.
- Hibst R: Einführung und Fragestellung. In: Müller GJ, Berlien HP (ed): Technik, Wirkungsweise und medizinische Anwendungen von Holmium- und Erbium-Lasern. Landsberg ecomed, 1996: 9-11.
- Holderbaum D, Tariq MH, Moskowitz RW: Genetics and osteoarthritis: Exposing the iceberg. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 397-405.
- Hopf JG, Hopf M, Koffroth-Becker C.: Minimal invasive Chirurgie obstruktiver Erkrankungen der Nase mit dem Diodenlaser. *Lasermedizin* 1998/99; 14: 106-115.
- Hopf M, Hopf JUG., Rohde E, Müller G, Scheller EE, Scherer H: Endoscopically Controlled Laser Therapy of Recurrent Epistaxis with the 940 nm Diode Laser. *Medical Laser Application* 2002; 17(3): 231-241.
- Horan PJ, Popovic NA, Islinger RB: Acute and long-term response of the meniscus to partial meniscectomy using the holmium:YAG laser. *Arthroscopy* 1999; 15: 155-164.
- Huettmann G, Radt B, Birngruber R: Inactivation of proteins by irradiation of gold nanoparticles with nano- and picosecond laser pulses. *SPIE Proc.* 2003; 5142: 88-95.
- Hynes RO: Integrins versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
- Imhoff AB: The use of lasers in orthopaedic surgery. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1995; 3(5): 192-203.
- Imhof AB, Öttl GM, Burkhart A, Traub S: Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde* 1999; 28: 33-44.
- Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, Kojima T, Iwata H, Ionescu M, Poole AR: Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 11: 2503-2511.
- Jackson RW: Arthroscopic Treatment of degenerative arthritis. In: McGinty JB (ed): *Operative arthroscopy*. Raven Press. New York 1991: 319-323.
- Jacoby RK, Jayson MIV: The organ culture of adult human articular cartilage, from patients with osteoarthritis. *Rheumat and Rehab* 1976; 15: 116-122.
- Jain KK, Gorisch W: Repair of small blood vessels with neodymium-YAG laser: a preliminary report. *Surgery* 1979; 85: 684-688.
- Janzen DL, Kosarek FJ, Helms CA: Osteonecrosis after contact neodymium:yttrium aluminum garnet arthroscopic laser meniscectomy. *Am J Roentgenol* 1997; 169: 855-858.
- John T: In vitro Untersuchungen zur Wirkungsweise von niedrigenergetischer Laserbestrahlung auf die Syntheseleistung und Signaltransduktions-Kaskade humaner Chondrocyten. Dissertation Freie Universität Berlin 2003.
- Johnson L: Characteristics of the immediate postarthroscopic blood clot formation in the knee joint. *Arthroscopy* 1991; 7: 14-23.

- Jones KL, Brown M, Ali SY, Brown RA: An immunohistochemical study of fibronectin in human osteoarthritic and disease free articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 809-815.
- Jones AC, Doherty M: The treatment of osteoarthritis. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 33: 357-363.
- Jones KL, Brown M, Ali SY, Brown RA: An immunohistochemical study of fibronectin in human osteoarthritic and disease free articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 809-815.
- Kaneps AJ: Tissue Temperature Response to Hot and Cold Therapy in the Metacarpal Region of a Horse. *AAEP Proc.* 2000; 46: 208-213.
- Kaplan L, Uribe JW: The acute effects of radiofrequency energy in articular cartilage: an *in vitro* study. *Arthroscopy* 2000; 16: 2-5.
- Karu T: *The science of Low-Power Laser Therapy.* Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers; 1998.
- Karu TI, Kolyakov MS: Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005; 23:4.
- Karu TI, Kolyakov SF: Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005; 23(4): 355-361.
- Kim P, Baldwin R: Intermediates in folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 631-660.
- Kim HK, Moran ME, Salter RB: The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving an subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg (Am)* 1991; 73: 1301-1315.
- Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K: Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 1984; 186: 231-239.
- Kokosa JM, Przjazny A, Bartels KE, Motamedi ME, Hayes DJ, Wallace DB, Frederickson CJ: Laser-initiated decomposition products of indocyanine green (ICG) and carbon black sensitized biological tissues. *SPIE Proc.* 1997; 2974: 26A.
- Kopchok GE, White GH, Fujitani R, Vlasak J, Dykhovsky L, Grundfest WS: CO₂ and argon laser vascular welding: acute histological and thermodynamic comparison. *Lasers Surg Med* 1988; 8: 584-588.
- Korff M, Bent SW, Having MT, Schwaber MK, Ossof RH, Zeale DL: An investigation of the potential for laser nerve welding. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 106: 345-50.
- Kollmer C: Experimental evaluation of stimulatory effects of Nd:YAG lasers on canine articular cartilage. In: Sherk HH (ed): *Lasers in orthopaedics.* Lippincott Co., 1990: 140-146.
- Korver THV, van de Stadt E, Kiljan GP, van Kampen GJP, van der Korst JK: Effects of loading on the synthesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage *in vitro*. *J Rheumatol* 1992; 19: 905-912.
- Kou L, Labrie D, Chylek P: Refractive indices of water and ice in the 0.65 to 2.5 μm spectral range. *Appl Opt* 1993; 32(19): 3531-3538.
- Kovach IS: A molecular theory of cartilage viscoelasticity. *Biophys Chem* 1996; 59: 61-73.
- Krabatsch Th, Hetzer R: *Transmyokardiale Laserrevaskularisation. Stand und Ausblicke.* Müller, Berlin: Fortschritte in der Lasermedizin 11. Ecomed 1996.
- Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B: Low level 809-nm diode laser-induced *in-vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 30: 365-369.
- Kriegel W, Narden N, Offenbacher M, et al.: "State of the art" in epidemiology of arthroses. An overview of important studies of etiology and sequelae. *Z Rheumatol* 1995; 54: 223-240.

- Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in-vitro*. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* 1982; 93: 743-50.
- Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, et al.: Laser photobioactivation mechanisms: In vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med* 1990; 10: 201-207.
- Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL: Laser photobioactivation mechanismus: *In-vitro* studies using asorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med* 1990; 10:201-207.
- Lai W, Hou J, Mow V: A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomed Eng* 1991; 113: 245-258.
- Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, et al.: Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci* 1986; 1: 61-77.
- Landthaler M, Hohenleutner U: *Lasertherapie in der Dermatologie*. Springer 1999.
- Lane JG, Amiel M.E., Greenfield R.: Matrix assessment of the articular cartilage surface after chondroplasty with the holmium:yttrium-aluminum-garnet laser. A long-term study. *Am J Sports Med* 2001; 29: 704-748.
- Lawrence PF, Merrell SW, Goodman GR: A comparison of absorbable suture and argon laser welding for lateral repair of arteries. *J Vasc Surg* 1991; 14:183-189.
- Lemare F, Steinberg N, Le-Griel C, et al.: Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beds: restoration of the dedifferentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 1998; 176: 303-313.
- Lindahl A, Brittberg M, Peterson L: Health economics benefits following autologous chondrocyte transplantation for patients with focal chondral lesions of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9: 358-363.
- Lippiello L, Hall D, Mankin HJ: Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Clin Invest* 1977; 59: 593-600.
- Liu EH, Saidel GM, Harasaki H: Model Analysis of Tissue Responses to Transient and Chronic Heating. *Annals of Biomedical Engineering* 2003; 31: 1007-1014.
- Liu TC, Jiao JL, Li Y, Yeung YY, Liu SH: Membrane mechanism of low intensity laser biostimulation on a cell. In: Simunovic Z (ed): *Lasers in Medicine, Surgery and Dentistry, Part III*. Croatia Zrinski 2003: 83-105.
- Loeser RF: Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 2000; 37: 109-116.
- Lorentzon R, Alfredson H, Hildingson C: Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998; 6: 202-208.
- Lübbers C, Siebert WE: Die arthroskopische Holmium-YAG-Laseranwendung im Vergleich zu konventionellen Verfahren am Kniegelenk. *Orthopäde* 1996; 25: 64-72.
- Lui H, McKenna LA, Dean MF: The macromolecular characteristics of cartilage proteoglycans do not change when synthesis is up-regulated by link protein peptide. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428: 191-200.
- Lyyra T, Jurvelin J, Pitkänen P, Väätäinen U, Kiviranta T: Indentation instrument for the measurement of cartilage stiffness under arthroscopic control. *Med Eng Phys* 1995; 17: 395-399.
- Maitland DJ, Walsh JT: Quantitative measurements of linear birefringence during heating of native collagen. *Laser Surg Med* 1997; 20: 310-318.
- Makower AM, Wroblewski J, Pawlowski A: Effects of IGF-1, EGF and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat growth plate. *Exper Cell Res* 1988; 179: 498-506.

- Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB Jr, Erggelet C, Minas T, Peterson L: Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 1998; 26: 853-861.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: 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* 1971; 53A: 523-537.
- Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. *J Bone Joint Surg* 1981; 63A: 131-139.
- Mankin HJ, Lippiello L: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg* 1970; 52A: 424-434.
- Manicourt DH, Poilvache P, Egerden A, Eugene JMA, et al.: Synovial fluid levels of tumor necrosis factor α and oncostatin m correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 281-288.
- Marco F, Lopez-Oliva F, Fdez-Arroya JM, Pedro JA de, Perez AJ, Leon C, Lopez-Duran L: Osteochondral allografts for osteochondritis dissecans and osteonecrosis of the femoral condyles. *Int Orthop* 1993; 17: 104-108.
- Marlovits S, Moser D, Kruber D, Grasslobler M, Kutscher-Lissberg F, Marlovits T, Vecsei V: Morphological observations of the aged human articular chondrocytes in cell culture. *Bone* 1998; 22(Suppl): C151.
- Marlovits S, Tichy B, Gruber D, Stocker R, Vecsei V: Humane articulare Chondrozyten in dreidimensionalen Kultursystemen. *Osteosynthese International* 2000; 8 (Suppl): 125-127.
- Marlovits S, Pajenda G, Trattinig S, Vecsei V: Großflächiger biologischer Gelenkflächenersatz des Kniegelenks durch eine autologe Chondrozyten-Collagen-Transplantation – Fallbericht des ersten Patienten in Österreich. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113(13-14): 531-539.
- Martin JA, Buckwalter JA: The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 2000; 37: 129-140.
- Matsui H, Shimizu M, Tsuji H: Cartilage and subchondral bone interaction in osteoarthrosis of human knee joint: a histological and histomorphometric study. *Microsc Res Tech* 1997; 37: 333-342.
- Mayne R, Brewton RG: Extracellular matrix of cartilage: collagen. In: Woessner JF, Howell DS (Hrsg.): *Joint cartilage Degradation: Basic and Clinical Aspects*. Marcel Dekker Inc., New York 1993: 81-90.
- McDevitt CA, Muir H: Biochemical changes in the cartilage of the knee joint in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J Bone Joint Surg* 1976; 58: 94-101.
- McNally KM, Sorg BS, Welch AJ, Dawes JM, Owen ER: photothermal effects of laser tissue soldering. *Phys Med Biol* 1999; 44: 983-1002.
- McPherson JM, Tubo R, Barone L: Chondrocyte transplantation. *Arthroscopy* 1997; 13: 541-547.
- Meachim G, Ghadially FN, Collins DH: Regressive changes in the superficial layer of human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1965; 24: 23-30.
- Mercuri FA, Doege KJ, Arner EC, et al.: Recombinant human aggrecan g1-g2 exhibits native binding properties and substrate specificity for matrix metalloproteinases and aggrecanase. *J Biol Chem* 1999; 274: 32387-32395.
- Minas T: Cartilage repair techniques including chondrocyte transplantation. Their role in focal chondral damage to the Knee. Presentation abstract. Annual Meeting American Academy of Orthopedic Surgeons, New Orleans 1998.

- Minas T, Nehrer S: Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1997; 20: 525-538.
- Minas T, Peterson L: Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med* 1999; 18: 13-44.
- Minas T: Autologous chondrocyte implantation in the arthritic knee. *Orthopedics* 2003; 26: 945-947.
- Mitchell N, Shepard N: Effect of patellar shaving in the rabbit. *J Orthop Res* 1987; 5: 388-392.
- Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M: Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int* 2002; 26: 1-18.
- Mohr W, Wessinghage D: Zur Ultrastruktur der Detritus-Synovialitis („Hydroxylapatit-Synovialitis?“). *Z Orthop* 1981; 119: 463-468.
- Moore RJ, Fazzalari NL, Manthey BA, Vernon-Roberts B: The relationship between head-neck-shaft angle, calcar width, articular cartilage thickness and bone volume in arthrosis of the hip. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 432-436.
- Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H: Effect of low-intensity Argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Las Surg Med* 1994; 15: 191-199.
- Morini S, Pannarale L, Braidotti P, et al.: A morphological study on femoral heads in human hip joint osteoarthritis. *Ital J Anat Embryol* 1996; 101: 29-43.
- Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, Tigani D, Brodano GB, Fini M, Giardino R: Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: an experimental study. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 321-36.
- Muller B, Kohn D: Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method. *Orthopäde* 1999; 28: 4-10.
- Müller G: Development trends and market potential of biomedical laser application. In: *Optical Instrumentation for Biomedical Laser Applications*. SPIE 1986(a); 658: 2-8.
- Müller GJ, Berlien HP, Scholz C: Der Laser in der Medizin. *Umschau* 1986(b); 4: 233-240.
- Müller GJ, Müller Stolzenburg N: Biologische Wirkung der Laserstrahlung – Potentielle Risiken für Haut und Augen. *Biotronik* 1989(a); 1: 55-60.
- Müller G, Schaldach B: Basic Laser Tissue Interaction. In: Müller GJ, Berlien HP (ed.): *Advances in Laser Medicine II. Safety and Laser Tissue Interaction*. Ecomed 1989(b): 17-25.
- Müller G, Scholz C: Laser in der Medizin – eine interdisziplinäre Herausforderung. In: *Biomedizinische Technik* 1988, Band 33, Ergänzungsband 2: 85-88.
- Müller-Stolzenburg N, Stein E, Berlien HP: Medizinische Anwendungsprinzipien des Lasers. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik*. Ecomed Verlag 1989, aktuelle Ergänzungslieferung: III-1.
- Müller U, Philipp CM, Fleige B, Berlien HP: Laser Therapy of Vulval and Cervical Dysplasias. *Medical Laser Application* 2003; 18(29): 123-128.
- Munoz V, Thompson PA, Hofrichter J, Eaton WA: Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation. *Nature* 1997; 390: 196-199.
- Muschter R, Hofstetter A: Laseranwendungen in der Urologie, Teil 2. *Lasermedizin* 1997; 1-2(13): 10-17.
- Muschter R, Knipper A, Maghraby H, Thomas S: Laserlithotripsy – Experience with Different Laser Systems in the Treatment of Urinary Calculi. *SPIE Proc* 1200; 1990: 118-123.

- Neame PJ, Tapp H, Azizan A: Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1327-1340.
- Neidel J, Schroers B, Sintermann F: The effects of high-dose methotrexate on the development of cartilage lesions in a lapine model of osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 117: 265-269.
- Nemoto O, Harumoto Y, Masahiro M, Masayuki S: Stimulation of TIMP-1 production by oncostatin m in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1996; 39:560-572.
- Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K: Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthritis. *Virchows Arch Cell Pathol Incl Mol* 1993; 63: 249-255.
- Newman AP: Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 1998; 2: 309-324.
- Norton LA: Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin Orthop Rel Res* 1981; 167: 280-290.
- O'Driscoll SW: Periosteal transplantation: articular cartilage regeneration-chondrocyte transplantation and other technologies. Symposium of the American Academy of Orthopedic Surgeons, San Francisco 1997.
- O'Driscoll SW: The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 1998; 80: 1795-1812.
- O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: 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)* 1988; 4: 595-606.
- Ogilvi-Harris DJ, Fitsialos DP: Arthroscopic management of the degenerative knee. *J Arthroscopie* 1991; 7: 151-157.
- Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ: Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* 1989; 7: 35-42.
- Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE: The use of the lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 65-72.
- Palmolski MJ, Brandt KD: Immobilization of the knee prevents osteoarthritis after cruciate ligamen resection. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1201-1208.
- Panula HE, Nieminen J, Parkkinen JJ: Subchondral bone remodeling increase in early experimental osteoarthritis in young beagle dogs. *Acta orthop Scand* 1998; 69: 627-632.
- Pascher A, Windhager R: Die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) zur Behandlung von lokaler Knorpelschäden. *J Arthros Orthopädie* 1999; 6: 16-18.
- Pearce J, Thomsen S: Kinetic models of laser tissue fusion processes. *Biomed Sci Instrum* 1993; 29: 355-360.
- Peterkofsky B, Diegelmann R: Use of a mixture of proteinase-free collagenases for specific assay of radioaktive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 1971; 10: 988-994.
- Peterson L: Autologous chondrocyte transplantation: 2-10 year follow up in 219 patients. Annual Meeting of the American Academy of Orthopedic Surgons, New Orleans, LA, USA, 1998: 19-23.
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A: Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30: 2-12.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A: Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(Suppl 2): 17-24.

- Pfander D: Experimentelle Osteoarthrose im Kniegelenk des Kaninchens – makroskopische, mikroskopische und immunhistochemische Veränderungen – Einfluß von sichtbarem Laserlicht niedriger Leistungsdichte auf einen experimentellen Knorpelschaden *in-vivo*. Diss. FU Berlin 1996.
- Poetke M, Philipp C, Berlien HP: Laser Therapy of Haemangiomas and Vascular Malformations – Techniques and Strategies. *Medical Laser Application* 2004; 19(1): 33-44.
- Philipp C, Rohde E, Berlien HP: Treatment of congenital vascular disorders (CVD) with laser-induced thermotherapy (LITT). Müller, Roggan: *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy SPIE Press* 1995(a): 443-458.
- Philipp C, Rohde E, Berlien HP: Nd:YAG laser procedures in tumor treatment. *Sem Surg Oncol* 1995(b); 11: 290-298.
- Plaetzer K, Kissling T, Verwanger T, Krammer B: The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application* 2003; 18819: 7-18.
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S: Composition and structure of articular cartilage. A template for tissue repair. *Clin Orthop* 2001; 391(suppl): 26-33.
- Poole AR, Rizkalla G, Ionescu M, Rosenberger LC, Bogoch E: Increased content of the C-proptid of type II collagen in osteoarthritic human articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc.* 1991; 16: 343.
- Poole CA, Shirley A, Schofield JR: Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science* 1988; 90: 635-643.
- Poppas D, Sutaria P, Sosa RE, Mininberg D, Schlossberg S: Chromophore enhanced laser welding of canine ureters *in vitro* using a human protein solder: a preliminary step for laparoscopic tissue welding. *J Urol* 1993; 150: 1052-1055.
- Pridie KH: A methode of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg (Br)* 1959; 41: 618-619.
- Puett DW, Griffin MR: Published trials of nonmedical and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 1994; 121: 133-140.
- Pulai JJ, Del Carlo M Jr, Loeser RF: The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes *in-vitro*. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1528-1535.
- Pullin JG, Collier MA, Das P: Effects of holmium:YAG laser energy on cartilage metabolism, healing, and bio-chemical properties of lesional and perilesional tissue in a weight-bearing model. *Arthroscopy* 1996; 12: 15-25.
- Puttick MPE, Wade JP, Chalmers A, et al.: Acute local reactions after intraarticular hyalan for osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 1995; 22: 1311-1314.
- Putz R: Knorpelgewebe. In: Benninghof: *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg, München 1994.
- Rand JA: Role of arthroscopy in osteoarthritis of the Knee. *Arthroscopy* 1991; 7: 358-363.
- Raunest J: *Laseranwendung in der Gelenkchirurgie*. Hefte zu „Der Unfallchirurg“. Springer: Berlin, Heidelberg, New York 1995.
- Ravzi HA, Muschter R, Anson K, Vargas JC, Perlmutter AP: Alteration of laser-tissue interaction with the 805 nm diode laser using indocyanine green in the canine prostate. *Lasers Surg Med* 1996; 19: 184-189.
- Reed SC, Jackson RW, Glossop N, Randle J: An *in-vivo* study of the effect of excimer laser irradiation on degenerate rabbit articular cartilage. *Arthroscopy* 1994; 10: 78-84.

- Ritz JP, Roggan A, Albrecht D, Schädel D: Comparison of the optical properties of human liver tissue and liver metastases and investigation of the dynamic temperature behavior of optical tissue properties. *SPIE Proc.* 1997; 2371: 500.
- Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR: Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest* 1992; .90:2268-77.
- Roggan A: Dosimetrie thermischer Laseranwendungen in der Medizin. Müller, Berlin: Fortschritte in der Lasermedizin 11. Ecomed 1997.
- Roggan A, Albrecht H, Dörschel K, Minet O, Müller G: Experimental set-up and Monte-Carlo model for determination of optical properties in the wavelength range 330-1100. *SPIE Proc.* 1995; 2323: 21.
- Roggan A, Beuthan J, Schründer S, Müller G: Diagnostik und Therapie mit dem Laser. *Physikalische Blätter* 1999; 55(3): 25.
- Roggan A, Bindig U, Wäsche W, Zgoda F: Eigenschaften von biologischen Geweben. In: Berlin HP, Müller G (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin, Lehrbuch und Handbuch für Praxis und Klinik.* Ecomed 1989, aktuelle Ergänzungslieferung: II-3.1.
- Roggan A, Minet O, Schröder C, Müller G: Measurements of optical properties using integrating sphere technique. In: Müller G (ed.): *Medical Optical Tomography: Functional Imaging And Monitoring.* SPIE 1993; IS11: 149.
- Roggan A, Müller G: Applicator development and irradiation planning in laser-induced thermotherapy LITT). *Biomed Tech* 1997; 42; 332-3.
- Rohde E, Meseke-von Rheinbaben I, Roggan A, Podbielska H, Hopf M, Müller G: Interstitial Laser-Induced Thermotherapy (LITT): Comparison of In-Vitro Irradiation Effects of Nd:YAG (1064 nm) and Diode (940 nm) Laser. *Medical Laser Application* 2001; 16(2): 81-90.
- Rolle A: Laser Applications in Lung Parenchyma Surgery. *Medical Laser Application* 2003; 18(4): 271-280.
- Rozbruch SR, Wickiewicz TL, Di Carlo EF: Osteonecrosis of the knee following arthroscopic laser meniscectomy. *Arthroscopy* 1996; 12: 245-250.
- Rozenblatt-Rosen O, Mosonogo-Ornan E, Sadot E, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Ginsberg D, Yayon A: Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J Cell Sci* 2002; 115:553-62.
- Rudolph H, Studtmann V: Anwendungsmöglichkeiten der Laser am Bindegewebe und Knorpel. In Draft W, Rudolph H: *Gewebekleber – Laser in plastischen Chirurgie – Möglichkeiten der interdisziplinären Zusammenarbeit.* Thieme Verlag 1993: 60-63.
- Rudolf H, Studtmann V: Laseranwendung in der periartroskopischen Chirurgie. In: Berlin HP, Müller G (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin 1999 (aktuelle Ergänzungslieferung).*
- Saidel GM, Davies CR, Liu EH, Harasaki H: Temperature and perfusion responses of muscle and lung tissue during chronic heating in vivo. *Med Biol Eng Comput* 2001; 39: 126-133.
- Sajdera SW, Hascall VC: Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. *J Biol Chem* 1969; 244: 77.
- Saleh KJ, Jaroszynski G, Woodgate I, Saleh L, Gross AE: Revision total hip arthroplasty with the use of structural acetabular allograft and reconstruction ring: a case series with a 10-year average follow-up. *J Arthroplasty* 2000; 15: 951-8.
- Salminen H, Vuorio E, Saamanen AM: Expression of Sox9 and type IIA procollagen during attempted repair of articular cartilage damage in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 947-55.

Salter RB, Hamilton HW, Wedge JH, Tile M, Torode IP, O'Driscoll SW, Murnaghan JJ, Saringer JH: Clinical application of basic research on continuous passive motion for disorders and injuries of synovial joints: a preliminary report of a feasibility study. *J Orthop Res* 1984; 1:325-42.

Salter DM, Huges DE, Simpson R: VLA-integrins in osteoarthrotic cartilage. *Br J Rheumatol* 1992; 3(suppl): 11.

Salter DM: Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br J Rheumatol* 1993; 32:780-786.

Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL: Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 231-234.

Sanders D, Slayman CL: Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism. *Neurospora J Gen Physiol* 1982; 80; 377-402.

Saunier J: Thermal Energy in Arthroscopy. What's New in 2003? *Medical Laser Application* 2003; 18(4):312-321.

Schier M., Imhoff A.: Einsatzmöglichkeiten des Holmium-YAG-Lasers in der arthroskopischen Knie- und Schulterchirurgie. In: Berlien H.-P., Müller G. (Hrsg.): *Angewandte Lasermedizin* 1996 (aktuelle Ergänzungslieferung).

Schmolke S, Rühmann O, Lazovic D: Die Anwendung des Lasers in der Operativen Orthopädie. *Orthopäde* 1997; 26: 267-272.

Schneider T, Liebau C, Krämer R, Merk H: 10-Jahre-Analyse nach arthroskopischem Kniegelenkdebridement bei Gonarthrose. *Arthroskopie* 1999; 12: 17-21.

Schultz RJ, Krishnamurthy S, Thelmo W, et al.: Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: a preliminary study. *Laser Surg Med* 1985; 5: 577-588.

Schulze M, Kuettner KE, Cole AA: Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models. *Orthopäde* 2000; 29:100-106.

Schulze-Tanzil G, De Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M: Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002; 308:371-379.

Schuppan D, Riecken EO: Molecules of the extracellular matrix: potential role of collagens and glycoproteins in intestinal adaptation. *Digestion* 1990; 46(Suppl 2): 2-11.

Self AB, Coe DA, Seeger JM: Limited thrombogenicity of low temperature, laser-welded vascular anastomoses. *Lasers Surg Med* 1996; 18: 241-247.

Senior K: Osteoarthritis research: on the verge of a revolution. *Lancet* 2000; 355: 208.

Shakibaei M: Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histopathol* 1995(a); 10: 339-349.

Shakibaei M: Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody *in-vitro*. *Exp Cell Res* 1998; 240: 95-106.

Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ: Signal transduction by beta 1 integrin receptors in human chondrocytes *in vitro*: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 1999; 342; 615-623.

Shakibaei M, Merker HJ: Beta 1-Integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res* 1999; 296; 565-573.

Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, De Souza P, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ: Inhibition of mitogen-activated protein kinase induced apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 2001; 276; 13289-13294.

Shakibaei M, De Souza P, Merker PJ: Intern expression and collagen type II implicated in

maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int* 1997; 2: 115-125.

Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ: Changes in integrin expression during chondrogenesis *in-vitro*: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 1995(b); 10:1061-1069.

Shapiro F, Koide S, Glimscher M: Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 532-553.

Simanovskii D, Sarka M, Irani A, Connell-Rodwell CO, Contag C, Schwettman A, Palanker D: Cellular tolerance to pulsed heating. *SPIE Proc.* 2005; 5695: 1-6.

Simha NK, Fedewa M, Leo PH, et al.: A composites theory predicts the dependence of stiffness of cartilage culture tissues on collagen volume fraction. *J Biomech* 1999; 32: 503-509.

Sobol EN, Bagratashvili VN, Sviridov AP, Shechter AB, Downes S, Jones N: Stress relaxation and cartilage shaping under laser relaxation. *SPIE Proc.* 1996; 2681: 358-363.

Soller EC, Hoffman GT, McNally-Heintzelman KM: Optimal parameters for arterial repair using light-activated surgical adhesives. *Biomed Sci Instrum* 2003; 39: 18-23.

Spivak JM, Grande DA, Ben-Yisha A, Menche DS, Pitmann MI: The effect of low level Nd:YAG laser energy on articular cartilage *in-vitro*. *J Arthroscopy* 1992; 8: 36-43.

Sandy JD, Adams ME, Billingham MEJ, et al.: In vivo and in vitro stimulation of chondrocyte biosynthetic activity in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 388-397.

Srivastava VML, Malemud CJ, Hough AJ, et al.: Preliminary experience with cell culture of human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 165-169.

Sun Y, Stürmer T, Günther KP, Brenner H: Inzidenz und Prävalenz der Cox- und Gonarthrose in der Allgemeinbevölkerung. *Z Orthop* 1997; 135: 184-192.

Tahiliani PD, Singh L, Auer KL, LaFlamme SE: The role of conserved amino acid motifs within the integrin beta3 cytoplasmic domain in triggering focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 7892-7898.

Takagi T, Jasin HE: Interactions between anticollagen antibodies and chondrocytes. *Arthritis and Rheum* 1992; 35: 224-230.

Taylor KB, Jeffre GM: A new basic metachromatic dye, I:9-dimethyl methylene blue. *Histochem J* 1969; 1: 199-204.

Tesch GH, Handley CJ, Cornell HJ, Herington AC: Effects of free and bound insulin-like growth factors on proteoglycan metabolism in articular cartilage. *J Orthop Res* 1992; 10: 14-22.

Thawer HA, Houghton PE: Effect of laser irradiation on the growth and development of fetal mouse limbs in an *in-vitro* model. *Lasers Surg Med* 1999; 24: 285-295.

Thomsen S, Chan E, Stubing I, Menovsky T, Welch AJ: Importance of wound stabilization in early wound healing of laser skin welds. *SPIE Proc.* 1995; 2395: 490-496.

Tiphlova O, Karu T: Role of primary photoacceptors in low-power laser effects: action of He-Ne laser radiation on bacteriophage T4-escherichia coli interaction. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 67-69.

Toricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, Giardino R: Laser biostimulation of cartilage: *in-vitro* evaluation. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 117-120.

Trauner KB, Nishioka NS, Flotte T: Acute and chronic response of articular cartilage to Holmium-YAG laser irradiation. *Clin Orthop* 1995; 310: 52-57.

Trauner KB, Nishioka NS, Patel D: Pulsed holmium:yttrium-aluminum-garnet (Ho:YAG) laser ablation of fibrocartilage and articular cartilage. *Am J Sports Med* 1990; 18: 316-320.

- Treppo S, Koepp H, Quan EC, Cole AA, Kuettner KE, Grodzinsky AJ: Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res* 2000; 18:739-748.
- Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, et al: Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone and Joint Surg* 1993; 75A: 177-189.
- Van der Rest M, Mayne R: Typ XI-collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross inked to type II collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 1615-1618.
- Vansgness CT, Ghaderi B, Brustein M: Ablation rates of human meniscal tissue with the Ho:YAG laser: the effects of varying fluences. *Arthroscopy* 1997; 13: 148-150.
- Vansgness CT, Polousky JD, Hedman TP: Radiofrequency thermal effects on the human meniscus: an in vitro analysis. *Arthroscopy* 2002; 18: 492-495.
- Vansgness CT, Polousky JD, Parkinson AB: Radiofrequency thermal effects on the human meniscus: an in vitro study of systems with monopolar and bipolar electrodes. *Am J Sports Med* 2003; 31: 253-256.
- Vogl TJ, Mack MG, Roggan A: Magnetresonanztomographisch gesteuerte laserinduzierte Thermotheapie von Lebermetastasen. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 37: 2039-2047.
- Vogl TJ, Mack MG, Straub R, Eichler K, Engelmann K, Zangos S, Woitazek D: MR Guided Laser-Induced Thermotheapie (LITT) of Malignant Liver and Soft Tissue Tumours. *Medical Laser Application* 2001; 16(2): 91-102.
- Vogl TJ, Mack MG, Straub R, Roggan A, Felix R: Percutaneous MRI-guided laser-induced thermotheapie for hepatic metastases of colorectal cancer. *The Lancet* 1997; Vol. 350/9070:29-30.
- Von der Mark K: Knorpel als regenerationsfähiges Gewebe. *Zeitschrift für Rheumatologie* 1998; 57: 173.
- Wagner H: Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. *Z Orthop* 1972; 110: 708-715.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-592.
- Waldschmidt J, Dessouky M El, Cholewa D: Laseranwendung in der offenen und endoskopischen Chirurgie der Lunge beim Kind. *Reidenbach: Lasertechnologien und Lasermedizin* 13. Ecomed 1996: 169-175.
- Waldschmidt J, Giest H, Meier-Junghänel L, Lohse K: Video Assisted Laser Surgery in Pediatric Thoracoscopy. *Medical Laser Application* 2004; 19(1): 24-31.
- Waldschmidt J, Hoffmann K, Waheeb S: Technique and Results of Thoracoscopic Laser Application in newborns and children. *Lasermedizin* 1997; 1-2(13): 3-9.
- Wang XJ, Milner TE, Chang MC, Nelson JS: Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry. *J Biomed Opt* 1996; 1: 212-216.
- Wardale RJ, Duance VC: Quantification and immunolocalisation of porcine articular growth plate cartilage collagens. *J Cell Sci* 1993; 105: 975-984.
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG: The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87: 733-743.
- Webber RJ, Sokoloff L: In vitro culture of rabbit growth plate chondrocytes. I. Age-dependence of response to fibroblast growth factor and „chondrocyte growth factor“. *Growth* 1981; 45: 252-268.

- Wei L, De-Bri E, Lundberg A, Svensson O: Mechanical load and primary guinea pig osteoarthritis. *Acta Orthop Scand* 1998 (a); 69: 351-357.
- Wei L, Svensson O, Hjerpe A: Proteoglycan turnover during development of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Osteoarthr Cart* 1998 (b); 6: 410-416.
- Weidlich R, Stepp H, Beyer W, Baumgartner R, Kriegmair M, Knüchel-Clarke R, Hofstetter A: Photodynamic Therapy of Transitional Cell Carcinoma Using 5-Aminolevulinic Acid. *Medical Laser Application* 2003; 18(1): 79-86.
- Weise K, Krackhardt T, Fritz J, Hörnlein S, Gaissmaier C: Die autologe Chondrozytentransplantation – Grundlagen, aktueller Stand und Ausblick. *DGU Mitteilungen und Nachrichten* 1999; 39: 28-39.
- Welch AJ: The Thermal Response of Laser Irradiated Tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics* 1984; QE-20 (12): 1472-1481.
- Welch AJ, Gardner C, Richards-Kortum R, Chan E: Propagation of fluorescent light. *Lasers Surg Med* 1997; 21: 166.
- Wiberg C, Hebdome E, Khairullina A, Lamande SR, Oldberg A, Timpl R, Morgelin M, Heinegard D: Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J Biol Chem* 2001; 276: 18947-18952.
- Wirth T, Rauch G, Schuler P, Griss P: Das autologe Knorpel-Knochen-Transplantat zur Therapie der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1991; 129: 80-84.
- Wirth C, Rudert M: Current concepts-techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy* 1996; 12: 300-308.
- Wu JJ, Lark MW, Chun LE, Eyre DR: Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *J Biol Chem* 1991; 266: 5625-5628.
- Xu LX, Zhu L, Holmes KR: Thermoregulation in the canine prostate during transurethral microwave hyperthermia. Part I: Temperature response. *Int J Hyperthermia* 1998; 14: 29-37.
- Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, et al: Effects of high-molecular weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 1994; 298: 296-304.
- Youn JI, Vargas G, Wong BJF, Milner T: Depth-resolved phase retardation measurements for laser-assisted non-ablative cartilage reshaping. *Phys Med Biol* 2005; 50: 1937-1950.

10 Danksagung

Zur Entstehung der vorliegenden Arbeit haben viele Personen und Institutionen beigetragen.

Mein Dank gilt daher dem Klinikum Benjamin Franklin an der Freien Universität, wo ich an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie unter fürsorglicher Leitung von meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr.med Rahmanzadeh den Grundstock für diese Arbeit im Rahmen meiner Tätigkeit als Oberarzt legen durfte. In diese Zeit fallen auch die richtungsweisenden Teilergebnisse, durch die die von mir betreuten Doktoranden zum Gelingen beigetragen haben.

Nach meiner Bestellung zum Chefarzt am Hubertuskrankenhaus gilt mein Dank dann aber auch dem Vorstand des Vereins zur Errichtung evangelischer Krankenhäuser in Berlin, der mir weiterhin die Betreuung von Promotionsarbeiten und damit auch die Weiterführung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit ermöglicht hat.

Eine Vielzahl von experimentellen Ergebnissen wäre ohne die nachhaltige Unterstützung durch das Institut der FU „Laser- und Medizin- Technologie, Berlin“ unter Leitung von Prof. Dr.-Ing. Prof.h.c., Dr.h.c.mult. Gerhard J. Müller, dem Direktor des Instituts für med. Physik und Lasermedizin im CC6, der Charité, nicht möglich gewesen. Prof. Müller hat mich durch sein engagiertes und förderndes Interesse in all den Jahren der Entstehung der vorliegenden Arbeit ermutigt und unterstützt.

Mein Dank gilt auch Frau Dr.med. E. Rohde, die mich durch kritische Diskussionen und wesentliche Hinweise richtungsweisend unterstützt hat.

Die Fertigstellung der Arbeit wäre aber ohne die unermüdliche und geduldige Tätigkeit von Frau S. Grenz bei dem Schreiben und Formattieren nicht möglich gewesen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Frau und meinen Kindern für die Geduld und Unterstützung an den zahlreichen Abenden, Feiertagen und Wochenenden, die ich der Fertigstellung dieser Schrift widmen musste.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eike Stell', with a long horizontal flourish extending to the right.

Berlin, im April 2008

Unterschrift