

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum

Die Studie war Teil eines Tierversuchsprojekts in dem der Einfluß einer systemischen Wachstumshormongabe auf verschiedene körpereigene Mechanismen evaluiert wurde. Aufgrund des Tibiadefekts am rechten Hinterbein wurde der osteochondrale Defekt am linken Hinterbein in einer Zone mit geringer Belastung angelegt, um eine möglichst frühe Vollbelastung des linken Hinterbeines nach Operation zu gewährleisten. Auch der Defektdurchmesser lag aus diesem Grund unter dem kritischen Bereich.

Verborgen gebliebene Zusammenhänge mit der mit einem Knochendefekt versehenen rechten Hintergliedmaße sind nicht völlig auszuschließen.

Das Ziel der Studie war es, die Wirkung von Wachstumshormon auf die initiale Heilung von osteochondralen Defekten zu evaluieren. Mit 4 bzw. 6 Wochen war die Ausheilung des osteochondralen Defekts nicht abgeschlossen. Es wurden daher zwei relativ frühe Zeitpunkte in der Heilung ausgewertet, wobei die Standzeiten der operierten Tiere an die Heilung des jeweiligen Defekts im Bereich der rechten Tibia angepaßt werden mußten.

Die 6 Tiere, deren Defekt 12 Wochen ausheilte, waren geeignet, Aussagen über das endgültige Heilungsverhalten von osteochondralen Defekten unter der Gabe von Wachstumshormon zu treffen, aufgrund der geringen Fallzahlen haben die Daten zu diesen Präparaten aber nur beschreibenden Charakter. Anhand der vorliegenden Studie können daher ausschließlich Aussagen über die initiale Heilung der osteochondralen Defekte getroffen werden.

Längere Standzeiten nach Setzen eines solchen Defekts zur Überprüfung der im Regenerat gebildeten Knorpelqualität (hyalin oder fibrös) bis hin zu mehreren Jahren, um auch mögliche Versagensmuster des neugebildeten Knorpels beobachten zu können, sind als Ergänzung zu dieser Studie anzustreben.

5.1.2 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Obwohl mit dem gewählten Versuchsdesign ein im hohen Maße standardisierter osteochondraler Defekt kreiert werden könnte, waren bei der histomorphometrischen Auswertung Abweichungen von der mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Tiefe ab Knorpel-Knochen-Grenze von 1 mm gewünschten Defektgröße zu beobachten. Sowohl in der

waagerechten wie auch in der senkrechten Defektausdehnung lagen teils größere, teils aber auch kleinere Defekte vor. Eine mögliche Erklärung für im Durchmesser kleinere Defekte liegt in der Aufarbeitung der Präparate begründet. Das zum Sägen verwendete Sägeblatt ist mit einer Stärke von 1 mm im Verhältnis zum Defekt relativ groß. Die Mitte des Defekts war nicht immer einfach zu bestimmen, da sowohl der umliegende gesunde Knorpel über die Defektränder „geflossen“ war, als auch bei längeren Standzeiten das Regenerat makroskopisch der Struktur und Färbung des umliegenden Gewebes stark ähnelte. So ist es möglich, daß nicht immer exakt in der Mitte des Defekts gesägt wurde.

Im Durchmesser größere Defekte entstanden möglicherweise bei der Operation durch eine mangelhafte Fixation der Hülse und ein dadurch bedingtes Abgleiten des Bohrers.

Eine Defekttiefe von über 1 mm ab Knorpel-Knochen-Grenze ist einerseits mit der vermutlich unterschiedlichen Festigkeit der Knochenplatte unter dem Knorpel erklärbar, durch die die Hülse in die Knochenplatte gedrückt werden konnte. Andererseits ist eine Beschädigung der direkt unter dem Bohrer liegenden Knochenbälkchen denkbar, was im weiteren Heilungsverlauf zu den teilweise stark ausgedehnten Resorptionsbereichen im Knochen unter dem Defekt führen kann.

Jedoch könnte auch ein Zusammenhang zwischen der Wachstumshormongabe und der Beobachtung solcher Knochenresorptionszonen bestehen, da in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe der 4-Wochen Tiere mehr Resorption zu beobachten war. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Aus diesen Gründen wurde für die Messung eine einheitliche Defekttiefe von 1,5 mm gewählt und falls notwendig eine noch unter dieser Tiefe liegende Resorptionszone zusätzlich erfaßt.

5.1.3 Histomorphometrie

Eine unter 1 mm liegende Defekttiefe zum Zeitpunkt der Auswertung, muß nicht automatisch bedeuten, daß der Defekt zum Zeitpunkt der Operation nicht bei 1 mm Tiefe lag. In der histomorphometrischen Auswertung war es nur möglich, neugebildeten Geflechtknochen von Lamellenknochen zu unterscheiden. Bereits in Lamellenknochen umgewandelter Geflechtknochen war nicht von Lamellenknochen zu unterscheiden, der bereits vor dem Setzen des Defekts bestanden hatte.

Die Defektfläche als Summe der gemessenen Einzelwerte war in der Regel größer als die vom Programm gemessene Gesamtdefektfläche, dies trat vor allem in der Gruppe I auf. Die Abweichung betrug maximal 18%.

Ausschlaggebend für das Auftreten dieser Differenz vor allem in der Gruppe I schien der noch hohe Anteil an unstrukturiertem, lockerem Bindegewebe zu sein. Dieser führte zum einen während des Schneidens der Präparate zu Faltenbildung und Rissen, und zum anderen ließ er sich mit den verwendeten Färbungen nur dezent darstellen. Schwach angefärbte Strukturen waren mit der gewählten binären Auswertmethode schwer zu klassifizieren, da sie sich nicht deutlich vom weißen Hintergrund unterschieden. 6 und 12 Wochen nach dem Setzen des Defekts war dieser bereits mit strukturiertem, färberisch deutlich darstellbarem Gewebe gefüllt. Dies ermöglichte eine eindeutige Zuordnung, was ein möglicher Grund dafür ist, daß sich die gemessenen und errechneten Gesamtdefektflächen in diesen Gruppen nicht wesentlich unterschieden.

Für die signifikant geringere Gesamtdefektfläche der wachstumshormonbehandelten Tieren der Gruppe II im Vergleich zu den entsprechenden Tieren der Gruppe I gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze. Da die Begrenzung der Defektfläche in der Tiefe mit 1,5 mm ab der osteochondralen Grenze und nach oben durch die gelenkseitige Knorpelfläche eindeutig war, kann die Varianz der Defektflächen nur über ein unterschiedliches Festlegen der seitlichen Defektausdehnung erfolgt sein. Die wachstumshormonbehandelten Tiere der Gruppe II wiesen signifikant mehr neugebildeten Kallus und auch Knochen auf, als die Tiere der Gruppe I. War der neugebildete Geflechtknochen 6 Wochen nach der Operation bereits teilweise in Lamellenknochen umgebaut und gleichzeitig die osteochondrale Grenze in diesen Defektrandbereichen schon wiederhergestellt, so wurde möglicherweise die seitliche Defektausdehnung durch den Untersucher zu gering eingeschätzt.

Vorteil der computergestützten Auswertung ist eine einfache Bedienung und damit vergleichbare Auswertung durch unterschiedliche, histologisch auch wenig geschulte Personen. Fehlerquellen waren immer an den Punkten zu finden, an denen subjektive Entscheidungen getroffen werden mußten. Hier sind vor allem das Festlegen der seitlichen Defektausdehnung, das manuelle Eingrenzen der knöchernen Komponente und das subjektive Beurteilen des Knorpelanteils zu nennen.

Beim manuellen Eingrenzen der knöchernen Komponente mußte der Untersucher beurteilen, wo sich die Grenze zwischen Knochenmarksraum und Bindegewebe befand. Da diese Grenze fließend war, war dies eine mögliche Fehlerquelle. Beim Erfassen des im Safranin-Orange / Lichtgrün Präparat leuchtend Orange gefärbten Knorpels, wurde dieser zwar zunächst automatisiert erfaßt, es bestand jedoch die Möglichkeit, die Intensität manuell nachzuregeln. Auch hier bestand damit die Möglichkeit einer Verfälschung des tatsächlichen Sachverhalts. Daher weisen in diesem Bereich der manuellen Korrekturmöglichkeiten die zwanzig

stichprobenartigen Gegenmessungen durch einen unabhängigen zweiten Untersucher die größten Abweichungen auf.

Weitere Fehlerquellen waren sicher die im Makro enthaltenen bildverbessernden Komponenten. Hierbei schien vor allem die Bereinigung von Artefakten eine Rolle zu spielen. Knochenbälkchen, die eine Größe unterhalb des festgelegten Grenzwerts aufwiesen, wurden als Artefakte gewertet und entfernt. Dies mag eine geringfügige Verkleinerung des gemessenen Knochenanteils bzw. Vergrößerung des Knochenmarkraums zur Folge gehabt haben. Die Fläche an neugebildetem Kallus blieb davon unbeeinflusst, die Kallusdichte könnte vor allem bei „lockerem“ Kallus zu niedrig ausgefallen sein.

5.1.4 Scoring

Beim Vergleich der Scores ist zu berücksichtigen, daß die Punktvergabe entgegengesetzt erfolgt, d.h. eine hohe Punktzahl bei O'Driscoll *et al.* einen fortgeschrittenen Heilungsgrad eines Knorpeldefekts, bei Wakitani *et al.* hingegen einen frühen Heilungsgrad bedeutet. Diese Tatsache war deutlich in den beiden Boxplots erkennbar. Mit zunehmender Heilungsdauer wurden die Summenwerte beim Score nach O'Driscoll *et al.* höher (die maximal zu erreichende Punktzahl lag bei 24 Punkten), beim Score nach Wakitani *et al.* niedriger (gegen 0). Viele Scorepunkte sind in ihren Kriterien jedoch trotz entgegengesetzter Punktbewertung identisch: Zellmorphologie (I bei O'Driscoll *et al.*, A bei Wakitani *et al.*), Anfärbungsgrad der Matrix (II bei O'Driscoll *et al.*, B bei Wakitani *et al.*), die Regularität der Oberfläche (III bei O'Driscoll *et al.*, C bei Wakitani *et al.*), hier besitzt der Score nach O'Driscoll *et al.* eine zusätzliche Möglichkeit, die strukturelle Integrität zu beurteilen (IV), die Höhe des neugebildeten Regenerats im Defekt (V bei O'Driscoll *et al.*, D bei Wakitani *et al.*) sowie die Integration („*bonding*“) des Regenerats in das umliegende Gewebe (VI bei O'Driscoll *et al.*, E bei Wakitani *et al.*). Hinzu kommen beim Score nach O'Driscoll *et al.* zwei Kriterien, um Degenerationserscheinungen im ausgeheilten knorpeligen Regenerat zu ermessen. *Zelluläre Degenerationserscheinungen (VII)* und *Auftreten von Chondrozytenclustern (VIII)* werden bewertet. Desweiteren können Degenerationserscheinungen im anliegenden intakten Gelenkknorpel ermessen werden: *Degenerative Veränderungen im anliegenden Knorpel (IX)*. Beide Scores zeigen deutlich eine Zunahme der Regeneratqualität über den Zeitverlauf und zudem noch Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen Placebo- und wachstumshormonbehandelten Tieren. Allerdings sind die meisten Kriterien nicht zur Beurteilung der Zusammensetzung und damit des Heilungszustands des neugebildeten

Regenerats geeignet. Bei beiden Scores gibt es dafür lediglich einen Parameter, nämlich den der Zellmorphologie. Dieser ist allerdings beim Score nach O'Driscoll *et al.* wesentlich geeigneter, da er die einzelnen Schritte der Regeneratbildung differenzierter beschreibt. Lediglich der Parameter der Regenerathöhe eignet sich noch zur Beschreibung von Unterschieden im ausgewerteten Heilungszeitraum. Dies waren dann auch die beiden Kriterien, die die Unterschiede sowohl zwischen den Gruppen als auch innerhalb dieser hervorgerufen haben. Der Parameter der Anfärbbarkeit war in dieser Studie eng mit dem untersuchten Heilungszeitraum verknüpft und bewirkt somit nur eine Verstärkung der durch das Kriterium der Zellmorphologie hervorgerufenen Unterschiede. Alle anderen Kriterien, wie die Beschaffenheit der Regeneratoberfläche, dessen Vernetzung mit dem anliegenden intakten Knorpel und degenerative Erscheinungen in Regenerat und anliegendem intaktem Knorpel, sind zur Beschreibung von so „jungen“ Regeneraten wie in dieser Studie beschrieben, ungeeignet. Vereinzelt traten zwar arthrotische Veränderungen im weiteren Defektbereich auf, diese waren aber die Ausnahme. Allerdings waren schon Veränderungen in dem dem Defektbereich seitlich anliegenden intakten Knorpel in Form von leichter Zellarmut und dem Auftreten von sogenannten „Geisterhöfen“ zu beobachten. Diese schienen subjektiv auch nach 6 Wochen (Gruppe II) stärker als nach 4 Wochen (Gruppe I), was aber mit den Scoresystemen nicht zu verdeutlichen war.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß, obwohl beide Scores Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und auch innerhalb dieser demonstrierten, diese für die Bewertung von Regeneraten mit kurzer Heilungszeit nur bedingt geeignet erscheinen.

5.1.5 Immunhistochemie

5.1.5.1 Wachstumsfaktoren

Ziel der Studie war es zum einen, ein reproduzierbares immunhistochemisches Färbeprotokoll für die vorliegenden knöchernen und knorpeligen Strukturen zu etablieren, vor allem auch mit Antikörpern gegen ausgewählte Wachstumsfaktoren, denen bei der Knorpel- bzw. Knochenheilung eine tragende Rolle zugesprochen wird. Das von uns benutzte ABC-Peroxidase bzw. alkalische Phosphatase System erfüllte diese Anforderungen. Alle von uns verwendeten Antikörper zeigten positive Reaktionen in den verwendeten porcinen Präparaten. Parallel gefärbte humane Positivkontrollen sowie Negativkontrollen bestätigten die Spezifität der Färbungen.

Zum anderen sollten einige für die Knorpel- und Knochenentstehung wichtige Wachstumsfaktoren im Regenerat nachgewiesen werden. Während man von den IGFs und ihren Rezeptoren weiß, daß sie bei Mensch und Schwein weitgehend identisch sind, gibt es über die BMPs und speziell über BMP-6 keine Angaben über Homologien ihrer Proteinstrukturen zwischen diesen beiden Spezies. Allerdings muß man davon ausgehen, daß diese ähnlich wie bei allen Wachstumsfaktoren sehr hoch sind, da es sich hierbei um stark konservierte Strukturen handelt. Deshalb wurde in dieser Studie ein gegen humanes BMP-6 gerichteter Antikörper verwendet und aufgrund der Qualität und Selektivität der Färbung, die vergleichbar zu der der Positivkontrolle waren, wurde angenommen, daß dieser Antikörper in hohem Maße mit porcinem BMP-6 kreuzreagiert.

Bei dem verwendeten Antikörper gegen TGF- β handelte es sich um einen panspezifischen Antikörper gegen humanen TGF- β 1, das Dimer aus porcinem TGF- β 1 und 2, TGF- β 1.2, porcinen TGF- β 2 sowie gegen amphibischen TGF- β 5. TGF- β 5 wurde bisher bei Säugetieren nicht nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, daß er bei diesen nicht existiert. Eine Kreuzreaktion mit TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 ist jedoch möglich. Ebenso ist eine Kreuzreaktion des gegen humanen TGF- β 1 gerichteten Antikörpers mit porcinem TGF- β 1 vorhanden. In der vorliegenden Studie sollte aber lediglich der Nachweis von TGF- β im Defektbereich erbracht werden ohne in die einzelnen TGF- β zu unterscheiden.

Die zum Teil sehr starke Hintergrundfärbung machte eine computergestützte Auswertung unmöglich. Bei einzelnen Präparaten war mit keinem der gegen Wachstumsfaktoren gerichteten Antikörper eine Farbreaktion feststellbar. Allerdings war die Gefäßdarstellung mit dem Antikörper gegen *α -smooth muscle actin* bei diesen Präparaten durchweg erfolgreich. Dieser Antikörper gilt gemeinhin als sehr unempfindlich gegen Schwächen in der Vorbehandlung des Präparats, wie Austrocknung oder längere Fixationszeiten. Dies könnte die Ursache für das vereinzelt „Totalversagen“ von Präparaten bei allen gegen Wachstumsfaktoren gerichteten Antikörpern sein.

5.1.5.2 Gefäßdarstellung

Da die Gefäßdarstellung mit anti-FVIII nicht zu einem auswertbaren Ergebnis führte, wurde im weiteren Versuchsverlauf mit anti- *α -smooth muscle actin* gearbeitet. Dieser Antikörper ist nicht in der Lage, neugebildete Gefäße zu erfassen, die nur aus Endothelzellen, die ein Lumen formen, bestehen. Bei der Verwendung dieses Antikörpers muß also berücksichtigt werden, daß nicht alle Gefäße detektiert wurden, vor allem neugebildete Gefäße blieben

unberücksichtigt. Diese machten aber bei genauer Überprüfung der Präparate nur einen Bruchteil aus. Es ist davon auszugehen, daß die ermittelten Gefäßzahlen, vor allem in der Gruppe I (4 Wochen), zwar etwas niedriger als die tatsächlich im Defekt vorhandene Anzahl waren, die ermittelten Ergebnisse in ihrer Aussagekraft davon aber unbeeinflusst sind.

Jede einzelne angefärbte Einheit wurde als ein Gefäß gezählt, unabhängig von ihrer Größe oder ob sie ein Lumen aufwies. Damit bestand die Möglichkeit einer Mehrfachzählung eines längeren, quer angeschnittenen, Gefäßes. Als Folge könnte die gezählte Gefäßzahl etwas über der tatsächlichen gelegen haben, was aber wiederum die Aussagekraft der Ergebnisse nicht verändert, dieser Fehler durchgehend bei allen Präparaten identisch ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Ganganalyse

Die Ganganalyse ergab eine augenfällige initiale Entlastung der linken Hintergliedmaße (Klein, Mittlmeier *et al.* 2000). Zum Beginn der Studie wurde der osteochondrale Defekt als geringfügiger belastend für das Tier als die Defektosteotomie am rechten Hinterbein eingestuft. Literaturangaben über ganganalytische Untersuchungen an Schweinen bzw. solche, die mit Tieren mit osteochondralen Knieläsionen durchgeführt wurden, waren nicht recherchierbar. Vor dem Hintergrund der im Rahmen der Versuchsdurchführung erhobenen ganganalytischen Daten sollten jedoch derartige Doppelversuche an beiden Hintergliedmaßen von Schweinen kritisch bewertet werden.

5.2.2 Histomorphometrie

Die beobachtete Abnahme der bindegewebigen Anteile und Zunahme der knöchernen und knorpeligen Komponenten entspricht dem erwarteten Heilungsschema. Die tägliche Gabe von Wachstumshormon schien diesen Ablauf nicht maßgeblich zu beschleunigen. 6 Wochen nach Setzen des Defekts war bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren signifikant mehr neugebildeter Knochen und signifikant weniger ungefüllter Defektbereich zu finden. Trendweise war dieser Befund 12 Wochen nach der Operation zu bestätigen.

Es läßt sich feststellen, daß es bei den in dieser Studie kreierte osteochondralen Defekten initial zu resorptiven Prozessen am Defektrand und -grund zu kommen schien.

Die Spannweite der gemessenen Werte war sehr groß. Innerhalb der Gruppen waren „gute“ Placebotiere von „schlechten“ wachstumshormonbehandelten Tieren nicht zu unterscheiden.

Diese Unterschiede schienen von individuellen Faktoren abzuhängen: Die Reaktion auf eine Applikation von externem Wachstumshormon von Individuum zu Individuum unterschiedlich, wie auch das individuelle Heilungspotential.

Diese Annahmen können dazu führen, daß in dem beobachteten Zeitraum die Gabe von Wachstumshormon eine initiale Beschleunigung der Regenerationsprozesse nur tendenziell bewirkte.

5.2.3 Vergleich Histomorphometrie – Scoresysteme

Wie bereits erwähnt, scheint das Scoring zur Beurteilung der Heilung der osteochondralen Defekte in dieser Studie nur bedingt geeignet und zwar aufgrund des kurzen Heilungszeitraums. Allerdings sind die Scores trotz der soeben angesprochenen Problematik nicht nur in der Lage, Unterschiede zwischen den Gruppen, sondern auch solche innerhalb der einzelnen Gruppen darzustellen. Das Scoring erfordert im Vergleich zur computergestützten bildanalytischen Auswertung einen wesentlich geringeren Zeitaufwand. Nach Meinung der Autorin sind für diesen Vorgang jedoch eine größere histologische Erfahrung und ein höheres Maß an Kenntnissen über den Ablauf der Heilung osteochondraler Defekte vonnöten. Dies wiederum macht das Scoring zu einem hochgradig von subjektiven Einflüssen abhängigen Auswertungssystem. Durch die Verwendung der computergestützten bildanalytischen Auswertung sollte versucht werden, solche subjektiven Einflüsse weitgehend zu vermeiden. Dies gelang jedoch nicht vollständig. Die Festlegung der seitlichen Defektausdehnung erfolgte manuell und war damit vom Untersucher abhängig, ebenso die Vermessung der Knorpelfläche. Allerdings wichen durch einen zweiten unabhängigen Untersucher getätigte stichprobenartige Kontrollmessungen nur geringfügig von den dieser Arbeit zugrundeliegenden Messungen ab. In dieser Studie erfolgte nach Kenntnis der Autorin erstmalig die Beschreibung der flächenmäßigen bzw. prozentualen Zusammensetzung des Regeneratgewebes in einem definierten osteochondralen Defekt zu den beschriebenen frühen Heilungszeitpunkten. Dies war sinnvoll, da Unterschiede im Heilungsverhalten der in dieser Studie kreierte osteochondralen Defekte zwischen den mit Wachstumshormon behandelten und den Placebotieren in einer Beeinflussung der Regeneratzusammensetzung, bzw. einer Akzentuierung der Bildung einzelner Anteile, vermutet wurden. Anhand der gewonnenen Daten lassen sich auch Verhältnismäßigkeiten zwischen den einzelnen Komponenten ermitteln, da sie immer im Bezug zur Gesamtdefektfläche stehen.

5.2.4 Immunhistochemie

5.2.4.1 Wachstumsfaktoren

„Aktive“ Zelltypen (Fibroblasten, Chondro- und Osteoprogenitorzellen, Chondro- und Osteoblasten und –klasten) waren, unabhängig vom Zeitpunkt nach der Defektsetzung, positiv dargestellt. Ebenfalls oftmals positiv gefärbt waren „ruhende“ Zellen (Osteo- und Chondrozyten), die dem Regenerationsprozeß benachbart lagen. Dies wies auf eine Aktivierung der entsprechenden Zellen hin. In Knochenbälkchen randständige Osteozyten wandelten sich zu Knochengrundsubstanz produzierenden Osteoblasten. Dem Defektbereich anliegende Chondrozyten versuchen durch vermehrte Matrix- und anscheinend auch Wachstumsfaktorenproduktion ihren Beitrag zur Defektheilung zu leisten.

Ausdifferenzierte Zellen im Defektbereich, wie die Chondrozyten des wachstumsfugenartigen und Faserknorpels waren, sobald sie von ihrer entsprechenden Grundsubstanz umgeben waren, immunhistochemisch negativ, produzierten also keine Wachstumsfaktoren mehr.

5.2.4.2 Gefäßverteilung

Sowohl die absolute Anzahl an Gefäßen, als auch die Gefäßzahl/mm² Bindegewebe nahm zunächst von Gruppe I (4 Wochen) zu Gruppe II (6 Wochen) zu, um dann in Gruppe III (12 Wochen) deutlich reduziert zu sein. Daraus läßt sich ableiten, daß 4 Wochen nach Setzen des Defekts eine rege Gefäßeinsprossung stattgefunden hat. Die größtmögliche Gefäßversorgung des Regenerates erfolgte aber erst später im zeitlichen Bereich von 6 Wochen nach der Operation, denn hier waren deutlich mehr Gefäße pro mm² Bindegewebe bei einem geringeren Anteil an Bindegewebe im Defekt nachzuweisen.

Nach 12 Wochen waren kaum noch Gefäße zu detektieren, was zum einen damit zusammenhängt, daß die Defektbereiche fast vollständig mit avaskulärem Knorpelgewebe aufgefüllt waren. Zum anderen waren in dem verbliebenen bindegewebigen Anteil kaum noch Gefäße nachzuweisen.

4 Wochen nach der Operation war kein Einfluß auf die Gefäßbildung im Regenerat durch die tägliche Gabe von Wachstumshormon feststellbar, da sowohl die absolute Gefäßanzahl, als auch die Anzahl der Gefäße pro mm² Bindegewebe bei den mit Wachstumshormon und den mit Placebo versorgten Tieren der Gruppe I fast identisch waren.

6 Wochen nach Setzen des Defekts differieren die Placebo und die mit Wachstumshormon behandelten Tiere stark. Bei den Placebotieren nahm sowohl die absolute Anzahl der Gefäße

als auch die Anzahl der Gefäße pro mm² Bindegewebe zu, d.h. die Gefäßversorgung hatte zugenommen. Die mit Wachstumshormon behandelten Tiere hatten damit 6 Wochen nach der Operation nicht nur weniger Gefäße pro Defekt aufzuweisen, sondern auch weniger Gefäße pro mm² Bindegewebe, was, eine gleiche Qualität des Bindegewebes vorausgesetzt, eine drastische Verringerung der den Defektbereich versorgenden Gefäße darstellte. Demgegenüber bedeutete die vergleichbare absolute Gefäßanzahl und Anzahl an Gefäßen pro mm² Bindegewebe der gesamten Gruppe I (4 Wochen) und der mit Placebo versorgten Tiere der Gruppe II (6 Wochen) auch eine vergleichbare Situation in der Gefäßversorgung des Defektbereichs. Die Gabe von Wachstumshormon könnte also zum einen eine schlechtere Gefäßversorgungssituation herbeigeführt haben, die sich 6 Wochen nach Setzen des osteochondralen Defekts beobachten ließ. Zum anderen ist es möglich, daß das Stadium der maximalen Gefäßversorgung bei den mit Wachstumshormon versorgten Tieren zu diesem Zeitpunkt bereits überschritten war und der bindegewebige Anteil des Regenerats differenzierter, was sich mit den verwendeten Färbungen nicht darstellen ließ.

Die Defekte der Tiere der Gruppe III (12 Wochen) wiesen so gut wie gar keine Gefäße mehr auf, allerdings auch fast gar keine bindegewebigen Strukturen. Mit Wachstumshormon behandelte und Placebotiere zeigten keinen Unterschied in ihrer Gefäßversorgung. In beiden Teilgruppen befand sich, trotz der unterschiedlichen Ausgangssituation 6 Wochen nach Setzen des Defekts (Gruppe II), im Defektbereich avaskuläres Knorpelgewebe. Wenn also die Gabe von Wachstumshormon eine schlechtere Gefäßversorgung nach einer Heilungszeit von 6 Wochen bewirkt haben sollte, so schien dies die Regeneratqualität nach weiteren 6 Wochen und damit die weitere Heilung nicht beeinflusst zu haben.

Festzuhalten ist, daß in dieser Studie die Gefäßversorgung im Defektbereich zunächst von Gruppe I (4 Wochen) zu Gruppe II (6 (Wochen) zunahm, um dann in Gruppe III (12 Wochen) nicht mehr vorhanden zu sein.

5.3 Vergleich mit anderen Studien

In dieser Studie wurde erstmalig der Einfluß der systemischen Gabe von Wachstumshormon auf die Heilung von osteochondralen Defekten im Minischwein untersucht. Auch die zur Schaffung der Defekte verwendete Methode ist eigens für diese Studie entwickelt worden. Aus diesem Grund sind Schlußfolgerungen aus Vergleichen mit anderen Studien aufgrund der Verwendung anderer Tierspezies und Standzeiten oder abweichender Defektgestaltung entweder unmöglich oder sehr vorsichtig zu ziehen.

5.3.1 Heilungsverlauf

Die beobachtete Abnahme der bindegewebigen Anteile und Zunahme der knöchernen und knorpeligen Komponenten im Laufe der Heilung entspricht dem in der Literatur beschriebenen Heilungsschema osteochondraler Defekte. Die Defektheilung verläuft kegelförmig vom Defektgrund ausgehend in Richtung Defektzentrum und –oberfläche, wie bei anderen Untersuchern beschrieben (Calandruccio und Gilmer 1962; DePalma, McKeever *et al.* 1966; Crawford und Campbell 1969; Convery, Akeson *et al.* 1972; Kettunen und Rokkanen 1973; Sadiq, Rao *et al.* 1973; Dustmann und Puhl 1976; Dustmann und Puhl 1977; Frost 1979; Mankin 1982; Kawabe und Yoshinao 1991; Klompmaker, Jansen *et al.* 1992; Moran, Kim *et al.* 1992; Shapiro, Koide *et al.* 1993; Wakitani, Goto *et al.* 1994; Hunziker und Rosenberg 1996; Klompmaker, Veth *et al.* 1996; Caplan, Elyaderani *et al.* 1997; Hunziker und Rosenberg 1997; Nakajima, Goto *et al.* 1998; O'Driscoll 1998; Hunziker 1999). Ein initiales Fließen der angrenzenden intakten Knorpelmatrix in Richtung Defektmitte konnte beobachtet werden (Calandruccio und Gilmer 1962; Ghadially und Ghadially 1975; Bruns, Kersten *et al.* 1997). Ebenfalls war die Ausbildung einer gelenkseitigen Synovialmembran in anderen Studien bereits beschrieben worden (Nakajima, Goto *et al.* 1998).

Auch 12 Wochen nach Setzen des Defekts befand sich, wie teilweise in der Literatur beschrieben, kein hyaliner oder „hyalinartiger“ Knorpel im Defektbereich, alle Defekte waren mit Faserknorpel gefüllt (Silver und Glasgold 1995). Nicht immer waren neugebildetes und gesundes Knorpelgewebe fest miteinander verbunden (O'Driscoll, Keeley *et al.* 1988; Shapiro, Koide *et al.* 1993).

Beim Vergleich dieser Studie mit den angeführten Arbeiten muß berücksichtigt werden, daß meist kleine Versuchstiere verwendet wurden. Das bedeutet zum einen möglicherweise eine abweichende Zeitspanne für identische Heilungsstadien, möglicherweise zeigen kleinere Spezies wie Ratten und Mäuse ein deutlich schnelleres Heilungsverhalten. Zum anderen bedeuten identische Defektgrößen bei unterschiedlichen Spezies nicht identische Belastungen und daraus resultierendes Heilungsverhalten. Nach Kenntnis der Autorin gibt es keine Literatur, die diese Problematik der unterschiedlichen Heilungsgeschwindigkeit osteochondraler Defekte bei verschiedenen Spezies behandelt. Zuletzt soll noch die unterschiedliche Lokalisation der osteochondralen Defekte erwähnt werden. Aufgrund unterschiedlicher Belastungen wirken unterschiedliche mechanische Rahmenbedingungen auf den Defekt ein, was wiederum einen Vergleich erschwert. Auch zu dieser Problematik konnte keine Literatur gefunden werden.

Bei den kreierte osteochondralen Defekten schienen initial resorptive Prozesse am Defektrand und -grund aufzutreten. Literaturangaben zu dieser Beobachtung konnten auch hier nicht gefunden werden.

5.3.2 Beeinflussung des Heilungsverlaufs

Beim Vergleich mit anderen Arbeiten besteht wiederum das Problem, daß dort mit kleinen Versuchstieren und mit wenig standardisierten Defekten gearbeitet wurde. Auch wurde nie artgleiches, sondern immer Wachstumshormon anderer Spezies verabreicht, meist in Kombination mit anderen Wirkstoffen (Rokkanen und Kettunen 1972; Chrisman 1975; Hendricson, Havdrup *et al.* 1982). Trotzdem sprechen die Untersucher von signifikant mehr neugebildetem Knorpel, eine Beobachtung, die sich in dieser Studie nicht bestätigen ließ.

Bail *et al.*, die bei Yucatan-Miniaturschweinen artgleiches Wachstumshormon systemisch applizierten, während sie eine Distractionsosteogenese an der Tibia durchführten, fanden bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren eine gleiche Kallusdichte bei größerer Kallusmenge (Bail, Raschke *et al.* 1998). Diese Ergebnisse decken sich mit den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen, 6 Wochen nach Setzen des Defekts war bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren signifikant mehr neugebildeter Knochen und weniger ungefüllter Defektbereich zu finden.

Es war eine Tendenz zu erkennen, daß die Gabe von Wachstumshormon in dem beobachteten Zeitraum eine initiale Beschleunigung der Regenerationsprozesse zu bewirken schien (Bail, Kolbeck, Klein, Schmidmaier, Roenne, Haas *et al.* 2000; Bail, Kolbeck, Klein, Schmidmaier, Roenne und M. 2000).

Die vom subchondralen Knochen ausgehende zentrifugale Gefäßeinsprossung wurde bereits in der Literatur beschrieben (Rokkanen und Kettunen 1972). Desweiteren wird eine durch die Applikation von externem Wachstumshormon ausgelöste erhöhte Gefäßdichte bei der Frakturheilung erwähnt (Zielinski und Czerwinski 1975; Kiyosue 1990). Dies ließ sich für die in dieser Studie untersuchte Heilung von osteochondralen Defekten nicht bestätigen. Die hier beobachtete signifikant reduzierte Gefäßversorgung der mit Wachstumshormon versorgten Tiere der Gruppe II (6 Wochen) kann durch die Applikation des Hormons verursacht worden sein. Berücksichtigt man, daß der bindegewebige Regeneratanteil bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren schon differenzierter war und die Gefäße dementsprechend größer und zahlenmäßig geringer, so repräsentiert diese „reduzierte Gefäßversorgung“ möglicherweise ein fortgeschritteneres Heilungsstadium.

5.3.3 Vergleich mit anderen Methoden

Beim Vergleich der Verwendung von externem Wachstumshormon mit der Anwendung von Wachstumsfaktoren müssen die unterschiedlichen Applikationsweisen berücksichtigt werden. Wachstumsfaktoren wurden entweder über ein Trägermaterial oder eine Injektion lokal appliziert. Wachstumshormon wurde in allen Studien systemisch verabreicht (Rokkanen und Kettunen 1972; Chrisman 1975; Hendricson, Havdrup *et al.* 1982). Die lokale Anwendung verringert die Gefahr von Nebenwirkungen an anderen Organsystemen. Eine lokale Verabreichung von Wachstumshormon zur Heilung von osteochondralen Defekten ist der Autorin nicht bekannt.

Die die Wachstumsfaktoren betreffenden Ergebnisse sind zwiespältig. Der Nachweis einer effektiven Wirksamkeit *in vitro* bedeutet nicht automatisch eine identische Wirkung des betreffenden Wachstumsfaktors *in vivo*. Auch scheint die Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren stark abhängig von der Applikationsart, bzw. der Freisetzungskinetik des entsprechenden Trägermediums zu sein (Bax, Wozney *et al.* 1999).

Identische Wachstumsfaktoren können in Studien zur Frakturheilung und solchen zur Heilung osteochondraler Defekte gegensätzliche Resultate erbringen. Während basischer FGF in einer Studie zur Frakturheilung nicht beschleunigend zu wirken schien (Andreshak, Rabin *et al.* 1997), beschleunigt er intraartikulär verabreicht die Heilung osteochondraler Defekte (Jentzsch, Wellmitz *et al.* 1980; Petzold, Wellmitz *et al.* 1980; Cuevas, Burgos *et al.* 1988; Shida, Jingushi *et al.* 1996). Ebenso zeigte BMP-2 in einer Studie zur Frakturheilung keine die Heilung verbessernden Effekte (Bax, Wozney *et al.* 1999). In Studien zur Heilung von osteochondralen Defekten jedoch induzierte der lokale Einsatz von BMP-2 eine Verbesserung der Regeneratqualität (Sellers, Peluso *et al.* 1997; Frenkel, Saadeh *et al.* 2000; Sellers, Zhang *et al.* 2000). TGF- β beschleunigt die Frakturheilung (Lind 1998; Schmidmaier, Wildemann *et al.* 2000), bewirkt in arthrotische Mäuseknie injiziert aber neben einer erhöhten Proteoglykansynthese auch eine Erhöhung der Osteophytenzahl (van Beuningen, van der Kraan *et al.* 1994; Glansbeek, van Beuningen *et al.* 1998; van Beuningen, Glansbeek *et al.* 1998). Lediglich IGF-I scheint in der Lage, sowohl die Heilung von Frakturen, als auch die von osteochondralen Defekten im Sinne einer Beschleunigung des Heilungsablaufs zu verbessern (Hunziker, Wagner *et al.* 1994; Einhorn und Trippel 1997; Wakitani, Imoto *et al.* 1997; Schmidmaier, Wildemann *et al.* 2000). Die Kombination von Wachstumsfaktoren, die allein eingesetzt in der Lage sind, entsprechende Heilungsvorgänge zu beschleunigen, führt nicht automatisch zu einer Summierung der positiven Effekte (Neidel 1992).

Ein systemisch erhöhter Spiegel an IGF-I steht im Verdacht, die Entstehung von Brust-, Prostata- und Lungenkrebs sowie die Entstehung von kolorektalen Tumoren zu begünstigen (Chan, Giovannucci *et al.* 1998; Hankinson, Willett *et al.* 1998; Giovannucci 1999; Ma, Pollak *et al.* 1999; Shim und Cohen 1999; Grimberg und Cohen 2000; Khandwala, McCutcheon *et al.* 2000; Wu, Yu *et al.* 2000). Andere Nebenwirkungen für eine systemische Therapie mit exogenem Wachstumshormon sind ebenfalls belegt (Hintz 1992; Inzucchi 1997).

Ob die anderen eingangs erwähnten Hormone in ihrer heilungsbeschleunigenden Wirkung der des Wachstumshormons vergleichbar sind und welche Nebenwirkungen bei ihrer Verabreichung auftreten, bleibt zu klären. Sowohl die Ergebnisse der Studien zur Gabe von exogenem TSH als auch diese der Versuche, in denen PTH verabreicht wurde, sind widersprüchlich. Es wurden sowohl heilungsbeschleunigende (Rokkanen und Kettunen 1972; Holzer, Majeska *et al.* 1999), als auch die Heilung verzögernde Effekte (Udupa und Gupta 1965; Tylkowski, Wezeman *et al.* 1976; Urabe, Hotokebuchi *et al.* 1999; Kudo, Mizuta *et al.* 2000) beobachtet.

Biodegradierbare Materialien sind in jeder gewünschten Form und Materialeigenschaft unbegrenzt verfügbar. Kombiniert mit in Kultur vermehrten autologen Zellen scheinen sie für das Auffüllen von osteochondralen Defekten das Material der Zukunft darzustellen. Eine mögliche Kombination mit lokal sukzessive freigesetzten Wirkstoffen, die die Einheilung des Implantats beschleunigen, ist denkbar. Hier scheint der lokale Einsatz von IGF-I momentan vielversprechend. Bei nicht erhöhtem systemischen IGF-I-Spiegel sind keine Nebenwirkungen zu erwarten.

Wachstumshormon entfaltet seine Wirkung zu großen Teilen über IGF-I. Der kontinuierliche lokale Einsatz von Wachstumshormon bei der Heilung osteochondraler Defekte ist nach Wissen der Autorin nicht erschöpfend erforscht. Möglicherweise sind die Effekte auf die Heilungsvorgänge ähnlich positiv wie die von IGF-I. Möglicherweise käme ein zur Zeit unbekannter Effekt, den der direkte Einfluß des Wachstumshormons auf das Regeneratgewebe ausübt, hinzu. Ein lokaler Einsatz von Wachstumshormon bei gleichzeitig nicht erhöhtem systemischem Wachstumshormonspiegel dürfte keine Nebenwirkungen auslösen. Sollte es gelingen, Wachstumshormon ähnlich den Wachstumsfaktoren lokal protrahiert freizusetzen, so ist der Einsatz von Wachstumshormon in Kombination mit Zell- oder Matrixtransplantaten zur Verbesserung der Heilung von größeren osteochondralen Defekten denkbar.

5.4 **Schlußfolgerung**

Die computergestützte Auswertung erlaubte eine reproduzierbare Auswertung durch unterschiedliche, histologisch auch wenig geschulte Personen. Die Zusammensetzung des Regenerats konnte quantitativ dargestellt werden und der Bezug auf die Gesamtdefektfläche ermöglichte den Vergleich der einzelnen Präparate miteinander.

Mit Hilfe der beiden verwendeten Scores zum Beurteilen des Heilungsgrades osteochondraler Defekte konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufgezeigt werden. Scores sind jedoch in hohem Maße von den histologischen Kenntnissen und auch der individuellen Interpretation des Untersuchers abhängig und daher subjektiv.

Für die in der Studie gewählten frühen Heilungszeitpunkte lieferte die Erhebung quantitativer Daten daher mehr Information über die im Heilungsverlauf auftretenden Gewebetypen als die Beurteilung über einen Score.

Bei den in der Studie immunhistologisch nachgewiesenen Wachstumsfaktoren konnte kein Expressionsmuster entdeckt werden. Die Gabe des Wachstumshormons schien weder zu einer erhöhten noch zu einer veränderten Expression der Wachstumsfaktoren geführt zu haben. Alle untersuchten Wachstumsfaktoren wurden von allen aktiven Zelltypen zu jedem der betrachteten Zeitpunkte gleichzeitig gebildet. Ein Rückgang der aktiven Zellarten bedeutete gleichzeitig einen Rückgang an positiv darstellbaren Zellen.

Die systemische Gabe von Wachstumshormon zur Verbesserung sowohl der Defektheilungszeit als auch der Qualität des Regenerats ist fraglich. Zwar bewirkten die Wachstumshormongaben in dem hier vorgestellten Versuchsaufbau initial eine schnellere Heilung, jedoch war die Qualität des Regenerats nicht verbessert.

Berücksichtigt man die Nebenwirkungen, die mit einer systemischen Wachstumshormontherapie auftreten können, und die durch eine derartige Therapie entstehenden Kosten, so ist der Einsatz von Wachstumshormon in diesen Dosen über einen längeren Zeitraum bei der Heilung von osteochondralen Defekten durch die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse nicht zu befürworten. Eine lokale protrahierte Applikation von Wachstumshormon beinhaltet eine Reduktion der verwendeten Hormonmenge und damit auch der systemischen Nebenwirkungen. Ein derartiger Einsatz von Wachstumshormon in Kombination mit Zell- oder Matrixtransplantaten zur Verbesserung der Heilung von größeren osteochondralen Defekten sollte nach Meinung der Autorin erprobt werden.