

Aus der Klinik für Chirurgie
des Stütz- und Bewegungsapparates
Sektion für Orthopädie
der Universität zu Lübeck
Sektionsleitung: Prof. Dr. med. Martin Russlies

**Vergleich der biomechanischen Eigenschaften von Gelenkknorpel
und Ersatzgeweben nach unterschiedlichen Behandlungsmethoden
lokalisierter Knorpeldefekte**

Eine Studie am Schafsmodell

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Julius Christian Enno Kunow
aus Norden

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Russlies

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Peter Benecke

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.04.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Problemdarstellung.....	5
1.2 Grundlage.....	6
1.2.1 Knorpelgewebe.....	6
1.2.2 Biochemische Grundlagen.....	8
1.2.3 Funktionelle Biomechanik von Knorpelgewebe.....	8
1.2.4 Knorpeldefekte und Arthrose.....	10
1.2.5 Pathophysiologie der Knorpelreparatur und –regeneration.....	12
1.3 Defektbehandlung.....	14
1.3.1 Operative Techniken zur Behandlung von Knorpeldefekten.....	14
1.3.1.1 Mikrofrakturierung.....	14
1.3.1.2 Periostlappen-/Perichondriumtransplantation.....	15
1.3.1.3 Autologe Chondrozyten Transplantation/Implantation (ACT, ACI).....	16
1.3.1.4 Matrix gekoppelte autologe Chondrozyten Transplantation (MACT).....	16
1.3.1.5 Matrix gekoppelte Mikrofrakturierung (AMIC®).....	17
1.4 Biomechanische Grundlagen.....	18
1.4.1 Indentationsversuch.....	19
1.5 Fragestellung.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Das Schafsmodell.....	22
2.2 Behandlungsgruppen.....	23
2.3 Matrices.....	23
2.4 Operationsvorbereitung und Narkose.....	25
2.5 Operation und Kultivierung autologer Chondrozyten.....	26
2.6 Probenentnahme.....	30
2.7 Versuchsaufbau zur biomechanischen Testung.....	31
2.8 Auswertung der Indentationskurven.....	34
2.9 Knorpeldickenmessung.....	37
2.10 Statistische Grundlagen.....	38
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Makroskopische Beobachtung.....	40
3.2 Ergebnisse der Knorpeldickenmessung.....	41

3.3 Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung.....	44
3.3.1 „25s Kriechindex“	44
3.3.2 Elastizitätsmodul.....	47
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
4 Diskussion.....	50
4.1 Methode.....	50
4.2 Großtiermodell.....	54
4.3 Biomechanische Eigenschaften von Knorpel und Ersatzgeweben.....	55
4.4 Schlussfolgerung.....	59
5 Zusammenfassung.....	60
6 Literaturverzeichnis.....	61
7 Anhang.....	68
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	68
7.2 Tabellenverzeichnis.....	70
7.3 Tabellen: Ergebnisse.....	71
7.3.1 Ergebnisse der linken Kniegelenke der Facies patellaris.....	71
7.3.2 Ergebnisse der linken Kniegelenke der Condylus medialis.....	72
7.3.3 Ergebnisse der linken und rechten Kniegelenke Condylus lateralis.....	73
7.3.4 Ergebnisse der rechten Kniegelenke Facies patellaris.....	74
7.3.5 Ergebnisse der rechten Kniegelenke Condylus medialis.....	75
7.4 Bemerkungen zur Berechnungsformel des E-Moduls	76
8 Danksagungen.....	77
9 Lebenslauf.....	78
10 Veröffentlichungen.....	79

1 Einleitung

Hyaliner Knorpel der Gelenkflächen erfüllt in der alltäglichen Belastung große mechanische Aufgaben. Das Gewebe besitzt die Eigenschaft statische und dynamische Kräfte reibungsarm zwischen den Gelenkflächen zu übertragen (Mow et al. 1984). Bei der Behandlung von Knorpeldefekten muss es das Ziel sein, ein dem genuinen Knorpel möglichst ähnliches Gewebe zu erreichen. Diese Studie hatte zum Ziel, einen Vergleich unterschiedlicher operativer Behandlungsmethoden zur Knorpeldefekttherapie anzustellen. Hierbei wurden die biomechanischen Eigenschaften des geschaffenen Ersatzgewebes mittels eines Indentationsversuches überprüft, da diese für die Funktion und deren Beständigkeit eine entscheidende Rolle spielen (Lyyra-Laitinen 1999). Die histologische Untersuchung der geschaffenen Gewebe haben berechtigterweise einen hohen Stellenwert in der Forschung. Daraus sollte aber keinesfalls der Schluss gezogen werden, dass ein gutes histologisches Ergebnis allein auch für entsprechend gute biomechanische Eigenschaften steht. Genauso wenig kann man sich nur auf die biomechanische Testung ohne Berücksichtigung der histologischen Ergebnisse verlassen (Schäfer et al. 2004).

1.1 Problemdarstellung

Knorpeldefekte des hyalinen Gelenkknorpels stellen bis heute eine Herausforderung in der Behandlung dar, unbehandelt können insbesondere große Defekte eine starke Beeinträchtigung für den Patienten bedeuten.

Sie treten als Folge traumatischer Verletzungen, besonders im Kniegelenk, dem Sprunggelenk oder in der Schulter, auf. Darüber hinaus kommen sie als Folge rheumatischer Erkrankungen vor, bei denen es zu einer entzündlichen Immunreaktion gegen Gelenkbestandteile kommt. Folge sowohl traumatischer als auch entzündlicher Knorpeldefekte ist die Arthrose, eine irreversible Schädigung des Knorpelgewebes und letztlich Zerstörung des Gelenks. Hierbei kommt es zu einer vollkommenen Abnutzung des vorhandenen Gelenkknorpels mit der Folge von Schmerzen und Immobilität. Im fortgeschrittenen Stadium bleibt als Therapie nur der künstliche Gelenkersatz, in Form einer partiellen oder totalen Endoprothese, oder die Gelenkversteifung. Die begrenzte Haltbarkeit einer Gelenkprothese (Knutson et al. 1986, Rand und Ilstrup 1991) lässt aber seit langer Zeit nach Alternativen für jüngere Patienten mit lokalisierten Knorpelschäden suchen. Hierbei haben sich verschiedene operative Ansätze entwickelt, die eine subjektive Besserung der Beschwerden für den Patienten nach Möglichkeit durch Bildung eines Ersatzgewebes mit

knorpelähnlichen Eigenschaften erreichen wollen. Es gibt verschiedene Ansätze, die Qualität der geschaffenen Gewebe zu bewerten, z.B. histologische Untersuchungen, klinische Scores unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren (Schmerz, Mobilität und Aktivität), sowie verschiedene Versuchsaufbauten zu biomechanischen Messungen.

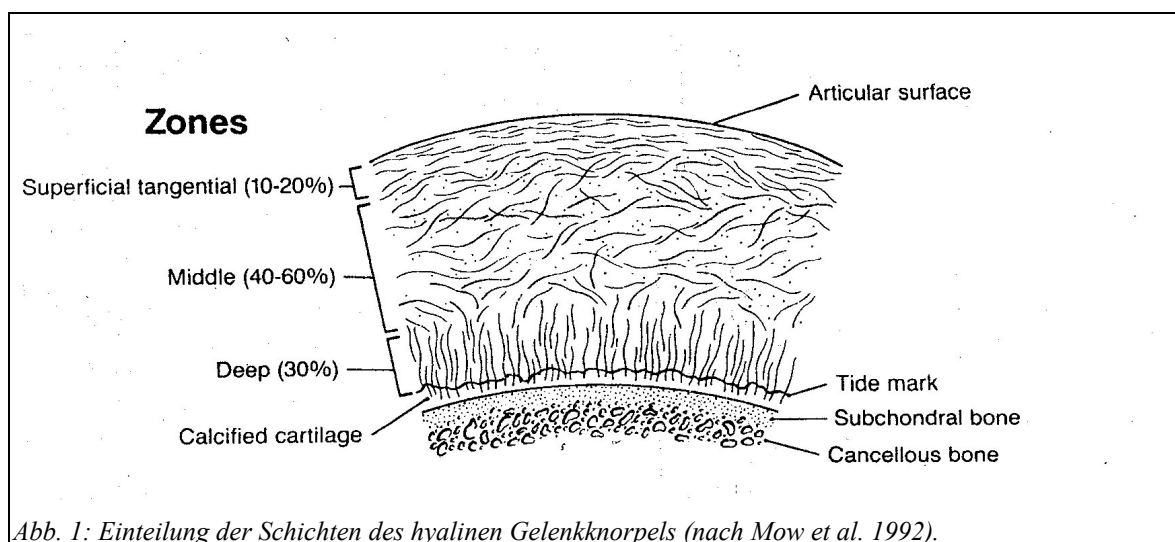
Ziel dieser Studie ist es, die aus verschiedenen Behandlungsmethoden erzeugten Knorpelersatzgewebe hinsichtlich ihrer biomechanischen Eigenschaften mittels Elastizitätsmodul und „25s Kriechindex“ zu evaluieren.

1.2 Grundlage

1.2.1 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe wird histologisch unterschieden in hyalinen, Faser- und elastischen Knorpel. Im synovialen Gelenk findet man hyalinen Knorpel. Dieser hat die Eigenschaft, als bradytrophes Gewebe keine Gefäße zur Versorgung zu haben, seine Ernährung erfolgt *per diffusionem* über die Gelenkflüssigkeit.

Das Knorpelgewebe wird in vier verschiedene Schichten eingeteilt (siehe dazu Abb. 1), die Superfizialschicht als Kontaktzone zum gegenüberliegenden Knorpel der korrespondierenden Gelenkfläche, die Mittel- oder Transitionalzone, die Tiefe Zone und die Zone des kalzifizierten Knorpels (Mankin et al. 1994). Jede Zone hat ihre morphologischen Besonderheiten, die sich aus den spezifischen Anforderungen im Gesamtkomplex ergeben.



So findet sich in der äußersten Superfizialschicht eine überwiegend tangentielle Anordnung der vergleichsweise dünnen Kollagenfasern mit parallel dazu angeordneten, langgezogenen Chondrozyten (siehe auch Abb. 2). Der Proteoglykangehalt, als für die Funktion

zusammen mit dem Kollagenen wichtigster biochemischer Bestandteil, ist in dieser Schicht vergleichsweise gering. Die Transitionalzone ist durch dickere und weniger geordnete Kollagenfasern mit runden Chondrozyten charakterisiert. Sie nimmt 40 – 60% der gesamten Dicke ein. In der tiefen Zone findet sich ein Netzwerk mit dicken, vertikal zur Knorpeloberfläche angeordneten Kollagenfasern, dem niedrigsten Proteoglykangehalt, hier findet sich der geringste Wasseranteil. Aufgrund der säulenartigen Anordnung der Chondrozyten wird diese Schicht auch von einigen Autoren als Zone des Säulenknorpels bezeichnet. Die „Tide mark“ grenzt den Knorpel gegen den kalzifizierten Knorpel ab.

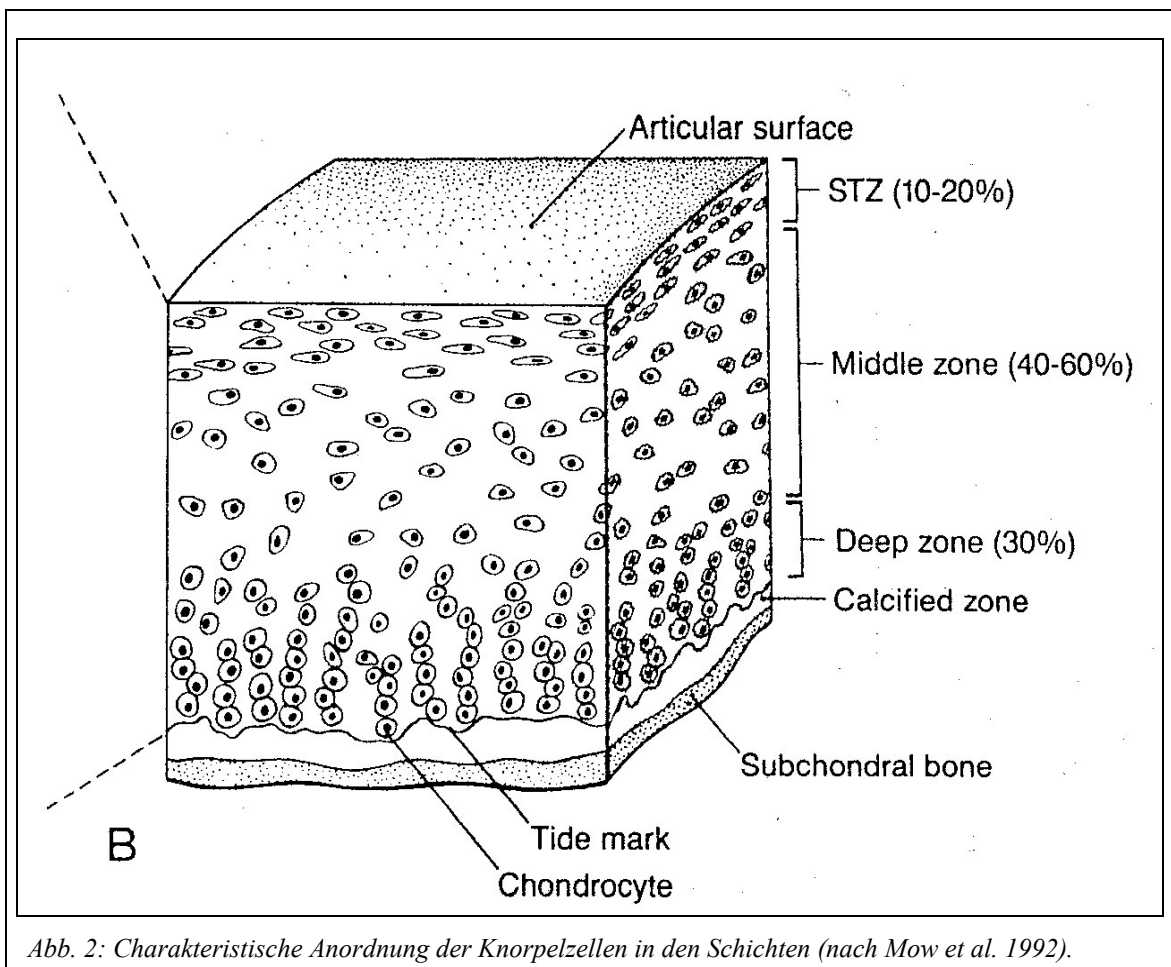


Abb. 2: Charakteristische Anordnung der Knorpelzellen in den Schichten (nach Mow et al. 1992).

Die extrazelluläre Matrix wird unterteilt in eine perizelluläre, territoriale und interterritoriale Matrix. Dies ergibt sich aus der Nähe zum Chondrozyten und die unterschiedliche Zusammensetzung von Kollagen, Proteoglykanen und anderen Matrixkomponenten (Mankin et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist der histologische Begriff des Chondrons wieder aktuell geworden, welcher für einen oder mehrere zusammenliegende Chondrozyten (auch isogene Gruppen genannt) mit perizellulärer und territorialer Matrix steht. Die interterritoriale Matrix, als quantitativ bedeutsamste, bewirkt folglich die für das Knor-

pelgewebe charakteristischen biophysikalischen Eigenschaften, nämlich druck- und biegeelastisch die anliegenden Kräfte und Belastungen als bewegliche Verbindung zweier Knochen zu ermöglichen.

Als weitere Besonderheit ist zu erwähnen, dass Knorpelgewebe keine Gefäße zur Blutversorgung hat und weder Nervenzellen oder -endigungen noch Monozyten oder Immunglobuline zur Immunantwort enthält.

1.2.2 Biochemische Grundlagen

Knorpelgewebe ist wie oben beschrieben ein komplexes Konstrukt aus molekularen und zellulären Bestandteilen. 60 – 80% des Feuchtgewichtes bestehen aus Wasser, die strukturgebenden Moleküle nehmen entsprechend nahezu 20 – 40% ein. Betrachtet man das Trockengewicht, so entfallen auf Kollagene 50%, auf Proteoglykane 30 – 35% und auf nicht kollagene Proteine 15 – 20%. Diese Moleküle binden das Wasser und bieten den Zellen ein Gerüst zur Befestigung (Buckwalter und Rosenberg 1988).

Kollagene, hauptsächlich vom Typ II (80 – 85%), aber auch von den Typen V, VI, IX, X, XI bilden das Fasergerüst, die Proteoglykane mit negativen Ladungen der Seitenketten binden das Wasser in den Zwischenräumen (Buckwalter und Mankin 1997a, Metz 2001).

Durch das Kollagengerüst erhält der Knorpel Form und Zugfestigkeit. Gewebesteifigkeit und Elastizität erlangt das Gewebe durch die Proteoglykane und durch zugfest umwickelte und unter Spannung gehaltene Chondrone (Metz 2001). Entsprechend den alltäglichen physikalischen Anforderungen an das Funktionsgewebe weist Knorpel eine bessere Druckfestigkeit (15 N/mm²) als Zugfestigkeit auf (Leonhardt 1990).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen und chemische Differenzierung der einzelnen Bestandteile haben in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über molekulare und makromolekulare Zusammenhänge geliefert (Buckwalter und Rosenberg 1988, Roughley und Lee 1994).

1.2.3 Funktionelle Biomechanik von Knorpelgewebe

Um das Knorpelgewebe hinsichtlich biomechanischer Eigenschaften zu erklären, dient insbesondere das „biphasische (auch Zwei Phasen-) Model“. Dieses berücksichtigt die Zusammensetzung aus einer unkomprimierbaren festen Phase (Kollagene und feste Bestandteile) und einer unkomprimierbaren flüssigen Phase (Wasser und wasserbindende, lösliche Bestandteile). Wenn nun eine Kraft auf das Gewebe wirkt, kommt es zu einer

Kompression, welche unter anderem durch Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb des Komplexes zustande kommt. Aus diesem Modell können spezifische Materialkoeffizienten errechnet werden, die das intrinsische Verhalten des Kollagen- und Proteoglykangerüsts sowie den Reibungswiderstand gegen Flüssigkeitsverschiebungen beschreiben.

Ein weiterer theoretischer Ansatz berücksichtigt drei Kräfte, die während einer Kompression wirken, nämlich Druck innerhalb der flüssigen und der festen Phase, sowie der auftretende Reibungswiderstand (Mow et al. 1992). Hierbei wird ergänzend zum biphasischen Modell die Ionenkonzentration innerhalb der flüssigen Phase berücksichtigt.

Verschiedene gängige biomechanische Ausdrücke wie Kriechverhalten, also die zunehmende Verformung unter einer konstanten Kraft, oder der Elastizitätsmodul, welcher die Steifheit beschreibt, lassen sich aus den oben genannten Ansätzen ableiten.

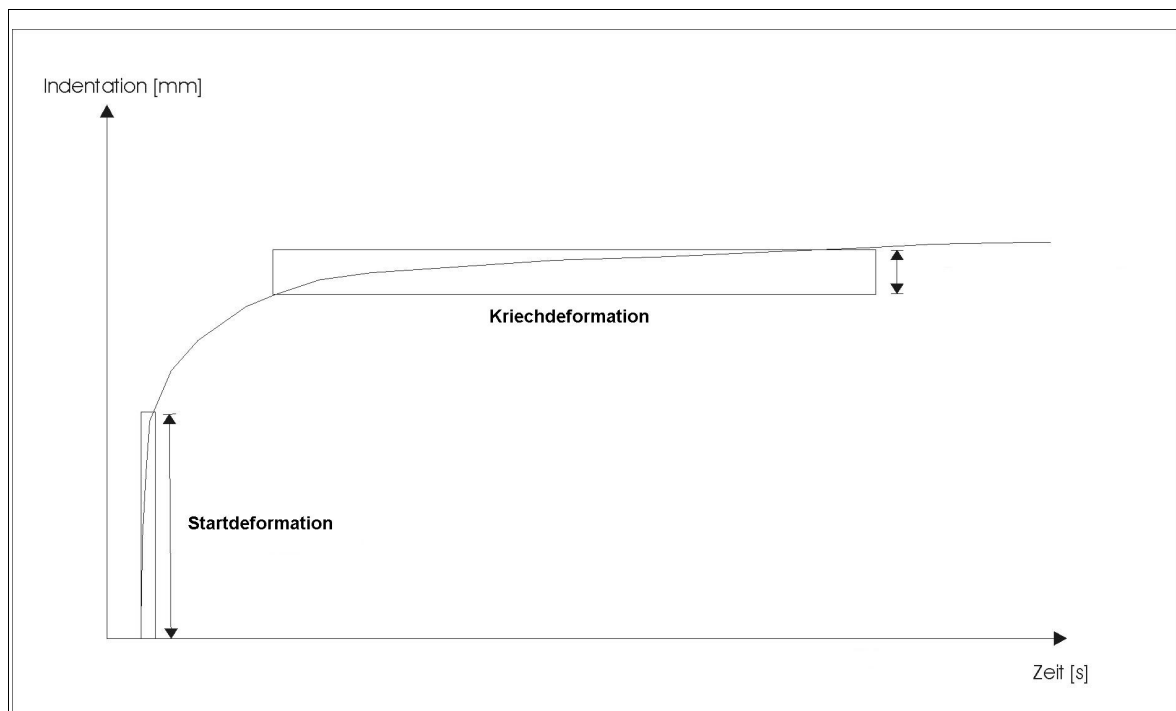


Abb. 3: Schematische Darstellung des Kriechverhaltens. Charakteristischerweise kommt es erst zu einer frühen Startdeformation, die dann in eine annähernd lineare Kriechdeformation übergeht. (eigene Abb.)

Beim Weg-/Zeit-Verhalten im Rahmen einer Deformation kommt es in der ersten Phase zur Startdeformation, welche die frühe Verdrängung des Gewebes in der Indentations- / Zeitkurve beschreibt. Hierbei spielt die Flüssigkeitsverschiebung eine vernachlässigbare Rolle, es wird vielmehr die Steifheit insbesondere der festen Phase abgebildet. Das Kriechverhalten tritt in der zweiten Phase der Kompression (Kraft/Fläche) auf, und hat ein annähernd lineares Verhalten. Dieses nähert sich asymptotisch einem Gleichgewicht, welches bei Knorpelgewebe je Anpresskraft erst nach bis zu 70 Stunden erreicht wird (Mow et. Al

1992). Für Knorpel maßgeblich ist hierbei die Permeabilität des Gewebes. Die Phasen einer Kompression mit Startdeformation und Kriechverhalten erkennt man deutlich in der Schemazeichnung (siehe Abb. 3).

Durch Untersuchungen wurde auch herausgefunden, dass zur Wasserbewegung in der Matrix ($v=17,5 \mu\text{m/s}$) ein Druck von 1 MPa erforderlich ist. Darüber hinaus wurden Abhängigkeiten zwischen Wassergehalt und Permeabilität nachgewiesen, sowie eine indirekte Beziehung zwischen Permeabilität und Proteoglykangehalt (Mankin et al. 1994). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die enge Beziehung zwischen biochemischer Zusammensetzung und biomechanischen Eigenschaften des Gewebes.

Einen direkten Einfluss auf das biomechanische Verhalten hat auch die Dicke des untersuchten Gewebes. So erfolgt die Angleichung an das Gleichgewicht der Komprimierbarkeit direkt proportional zur Dicke des Gewebes (Mow et al. 1992).

Die genauen Materialeigenschaften werden unter Material und Methoden (2.7) beschrieben

1.2.4 Knorpeldefekte und Arthrose

Knorpelgewebe zeigt mit zunehmendem Alter verschiedene degenerative Veränderungen. Sie sind verbunden mit einem fortschreitenden Verlust an Knorpelmenge, dem Versuch der körpereigenen Reparatur, Sklerose des subchondralen Knochens und der Bildung von Knochenzysten und randbildenden Osteophyten (Mankin 1994, Metz 2001).

Knorpeldefekte treten z. B. im Rahmen der idiopathischen Arthrose auf. Klinische Symptome sind Gelenkschmerz, Bewegungseinschränkung, Krepitus und Gelenkdeformität. Am häufigsten findet sich eine Arthrose in Fuß-, Knie-, Hüft-, Rücken- und Handgelenken. (Buckwalter und Mankin 1997b).

Eine häufige Form der Arthrose ist die idiopathische, welche eine starke Altersabhängigkeit aufzeigt. Die seltenere sekundäre Arthrose tritt auf durch inflammatorische wie auch traumatische Schädigung des Gelenkknorpels, oder als Folge einer Vielzahl von erblichen, entwicklungsbedingten, metabolischen oder neurologischen Erkrankungen. Arthrose kann langsam über Jahre fortschreiten.

Die zentrale Rolle des Knorpels bei der Entstehung der Arthrose wird im folgenden deutlich. Histologisch sichtbare Zeichen hierfür sind Ausfransungen und Faserungen, beginnend in der Superficialzone. Diese setzen sich über die tiefer gelegenen Schichten fort, bis hin zur Penetration der „Tide mark“ mit Blutgefäßen und Veränderungen am subchon-

dralen Knochen. Makroskopisch sind Unterbrechungen der oberflächlichsten Schicht und Fibrillationen die ersten Zeichen, gefolgt von Spalten und Unregelmäßigkeiten im Gewebe, die letztendlich bis zum subchondralen Knochen reichen. In dieser Phase wird durch enzymatischen Abbau der Knorpelmatrix mit Verlust von Masse das Fortschreiten der Arthrose beschleunigt.

Die Arthrose wird nach Buckwalter und Mankin (1997b) pathophysiologisch in drei Stadien eingeteilt. Als erstes Stadium wird die Zersetzung und der Umbau des makromolekularen Rahmens mit erhöhter Permeabilität und der Folge von deutlicher Zunahme des Wasseranteils genannt, hervorgerufen u. a. durch eine Aggregation der Proteoglykane und Längenzunahme der Glykosaminoglykane. Dies resultiert in einer Abnahme der Knorpelsteifigkeit.

Das zweite Stadium geht einher mit der zellulären Antwort der Zellen auf die Matrixveränderungen. Folge sind Proliferation weiterer Chondrozyten und sowohl eine anabolische als auch katabolische Antwort im Stoffwechsel der Zellen. Anabolisch werden neue Matrixbestandteile synthetisiert, katabolisch scheinen Nitratmonoxid, Interleukin-1 und folglich Metalloproteinasen hergestellt zu werden. Ein Abbau von Kollagen Typ IX und Typ XI scheint den Kollagen Typ II Rahmen in seiner Festigkeit zu vermindern. Dieses Stadium kann über Jahre anhalten.

Das dritte Stadium wird als Stadium der Abnahme der chondrozytären Antwort bezeichnet. Diese Phase gilt als noch nicht vollständig verstanden. Wohl bekannt ist die auftretende deutliche Abnahme von Knorpelgewebe. Ursächlich werden mechanische Schädigung des makromolekularen Gerüsts und folglich der Zelltod von Chondrozyten angenommen.

Diese Erkenntnisse finden sich in einer experimentellen Studie mit Rindern wieder. Nach lateraler Menishektomie traten eine Zunahme der Phasenverschiebung, des Schermoduls und der Wasserkonzentration im Knorpel der betroffenen Seite auf, begleitet von einer Abnahme des Proteoglykangehaltes in dem mehr belasteten und Zunahme in hypertrophischen Arealen des Knorpels. Gerade die biomechanischen Eigenschaften des weicheren veränderten Gewebes lassen eine Frühphase der Arthrose erkennen (Appleyard et al. 2003).

Als Osteoarthrose bezeichnet man eine Schädigung, die den subchondralen Knochen mit einschließt und als Endstadium anzusehen ist.

Gegenstand intensiver Forschung ist es, anhand verschiedener Marker und Bestandteile Frühzeichen der Arthrose zu entdecken.

1.2.5 Pathophysiologie der Knorpelreparatur und –regeneration

Definition: Reparatur bedeutet die Wiederherstellung eines Defektes mit einem Gewebe, welches dem genuinen Knorpelgewebe ähnelt. Regeneration bedeutet die Bildung eines neuen Gewebes, welches sich von normalem Knorpelgewebe nicht unterscheidet.

Die genaue Kenntnis der Reparaturvorgänge und ihre beeinflussenden Faktoren bei isolierten Knorpeldefekten sind eine für das Verständnis der Thematik grundlegende Voraussetzung. Im folgenden sind verschiedene Erkenntnisse zur Reparatur von hyalinem Knorpel aufgeführt.

Eine tierexperimentelle Studie mit Shetlandponys konnte nachweisen, dass kleine Knorpeldefekte durchaus ein Heilungspotential aufweisen. So konnten 6 Monate nach Defektsetzung 3 mm große runde Defekte nicht mehr nachgewiesen werden, wohingegen 9 mm und größere Defekte sich mit minderwertigem Ersatzgewebe füllten und Zeichen einer Osteoarthritis zu erkennen waren (Convery et al. 1972). In diesem Zusammenhang spricht man auch von der kritischen Defektgröße von Knorpelschäden.

Im Gegensatz hierzu konnte eine komplette Heilung osteochondraler Knorpeldefekte an Kniegelenken unreifer Hunde in einer anderen Studie nur 10% gefunden werden, nach 4 mm messenden runden Defekten wurde in den übrigen Läsionen ein faserknorpeliges Ersatzgewebe gefunden (Calandruccio und Gilmer 1962).

Künstliche Matrices, Wachstumsfaktoren, Perichondrium -, Periost -, Chondrozyten - Transplantation und mesenchymale Stammzellen sind Gegenstand intensiver Forschung zur Erschaffung knorpelartigen Gewebes in chondralen und osteochondralen Defekten.

Neben diesen genannten Einflußgrößen wurde nachgewiesen, dass Kraftwirkung und Bewegung einen Einfluss auf die Heilung von Knorpel hat. So konnte tierexperimentell ein Einfluss auf die Proteoglykanproduktion durch Belastung gefunden werden. Die vermehrte Proteoglykanmenge, die nach 40 km Laufen pro Tag auftrat, täuschte indirekt eine Chondrozytenabnahme vor (Fassbender 1991). Die Art der Bewegung wurde in einer tierexperimentellen Studie mit Knochenhauttransplantation untersucht, wobei die besten Ergebnisse durch die Anwendung von kontinuierlicher passiver Bewegung („*continuous passive*

motion“, CPM) erzielt wurden. Bezüglich der Rate hyalinartigen Knorpelregenerates bestanden keine signifikanten Unterschiede (O’Driscoll 1988).

In einer Studie am Pferd wurde im Vergleich zwischen chondralen Defekten mit und ohne Anbohrung eine signifikant bessere Ersatzgewebsbildung durch Faserknorpel und eine bessere Haftung des Regenerats am Knochen in der Gruppe mit Eröffnung des Knochenmarkraumes durch Anbohrung festgestellt (Vachon et al. 1986).

Bei der Eröffnung des subchondralen Knochens kommt es zum Einwandern von mesenchymalen Stammzellen, die sich im Defekt zu Zellen mit morphologischen Eigenschaften der Chondrozyten entwickeln. Diese haben das Potenzial, faserknorpeliges Gewebe zu bilden. Die verschiedenen chirurgischen Methoden werden unter 1.3.1 (Operative Techniken) vorgestellt.

Schon früh wurden Versuche zur Heilung von osteochondralen Defekten durchgeführt. Bailey und Habel (1960) beschrieben die Heilung in einem Versuch mit adulten Hunden und Welpen. Es wurden komplette osteochondrale Keile aus den Kniegelenken präpariert und dann im Knie belassen. Bei den Welpen kam es zu einer besseren Einheilung im Bereich des Knorpels. Einige Keile traten allerdings aus dem Defekt aus. An diesen Stellen rundeten sich die Kanten ab, und in der Tiefe bildete sich ein als hyaliner Knorpel beschriebenes Gewebe.

Umfangreiche Untersuchungen zur Qualität der Knorpelersatzgewebe an Kaninchen durch Shapiro et al. (1993) zeigten histologische Veränderungen im Verlauf der Reparatur. So wurde in den ersten Wochen nach osteochondralen Defekten ein hyalinartiger Knorpel mit Kollagen Typ II und Proteoglykanmengen ähnlich dem genuinen Knorpel beobachtet, der aber im weiteren Verlauf zunehmend (beginnend nach 36 Wochen) der Beobachtung zu biomechanisch minderwertigem Faserknorpel degenerierte.

Durch neue Antikörper wurde es mittlerweile möglich, die Qualität von Reparaturgewebe gegen normalen Knorpel in frühen Phasen der Reparatur histologisch zu unterscheiden, wenn sich dieser in Standardfärbungen ähnlich darstellt (Lin et al. 1998).

Eine Sonderrolle nehmen Defekte ein, die aufgrund einer Achsabweichung eines Gelenkes auftreten. Hierbei kommt die Osteotomie zur Wiederherstellung der Gelenkachsen zur Anwendung, mit dem Ziel, Druckentlastung defekter Knorpelareale zu schaffen und intakten Knorpel mehr zu belasten. Dabei wird Knochen entfernt oder umgesetzt, um eine Achsenveränderung zu erreichen. In einigen Studien konnte radiographisch eine Zunahme

des Gelenkspaltes und die Bildung faserknorpeliger Oberflächen beobachtet werden (Buckwalter und Mankin 1997b).

1.3 Defektbehandlung

Es gibt verschiedene konservative Ansätze, Knorpelschäden zu behandeln. Zu den konservativen Methoden gehören die Gabe von Nahrungsergänzungstoffen, die in der Gelenkflüssigkeit die für den Knorpelerhalt wichtigen Aminosäuren anreichern sollen.

Kommt es im Rahmen einer progressiven Arthrose zum aktivierten Stadium, sind nicht steroidale Anti-Rheumatika (NSAR) angezeigt, mit dem Ziel der Entzündungshemmung. Darüber hinaus findet eine Behandlung mit Steroiden zur intraartikulären Injektion häufig Anwendung. Bewegungstherapie kann darüber hinaus eine durch Arthrose bedingte Funktionseinschränkungen verzögern.

1.3.1 Operative Techniken zur Behandlung von Knorpeldefekten

Allen Methoden gemeinsam muss eine genaue Diagnose von Begleitverletzungen vorangestellt werden, da so eine mögliche Ursache der Knorpelschädigung mit behandelt werden kann. So sollte z.B. bei Beinachsenabweichung eine Umstellungsosteotomie erfolgen oder bei Kreuzbandinstabilität eine Kreuzbandplastik vorhergehend operativ behandelt werden, um ein weiteres Fortschreiten des Knorpelschadens zu verhindern. Genauso müssen frische osteochondrale Läsionen (Flakes, Fractures) mithilfe resorbierbarer Schrauben und Stifte fixiert werden (Steadman et al. 1999, Erggelet et al. 2000).

Im Folgenden werden einzelne Methoden zu Behandlung von lokalisierten Knorpeldefekten besprochen.

1.3.1.1 Mikrofrakturierung

Mitchell und Shephard beschrieben bereits 1976 eine der Mikrofrakturierung vergleichbare Technik. Durch Perforation des subchondralen Knochens im Bereich von Knorpeldefekten kam es zur Ausbildung von knorpelähnlichem Material. Hierbei nutzt man die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen aus dem Knochenmark.

Bei der klassischen Mikrofrakturierung wird im Rahmen einer Arthroskopie der defekte Knorpel débridiert. Durch den Einsatz von kleinen Meißeln wird der subchondrale Knochen eröffnet, bis zu einer empfohlenen Tiefe von ca. vier Millimetern. Die Mikrofrakturen sollen so dicht wie möglich angebracht werden, allerdings ohne ineinander einzubre-

chen. In der Regel bedeutet das drei bis vier Perforationen pro cm^2 . Vorteile gegenüber der Anbohrung nach Pridie (1959) ergeben sich aus der Vermeidung von Hitzenekrosen, die beim Einsatz von Bohrern auftreten können. Außerdem kommt es zu einer Anrauhung der Oberfläche durch kleine Frakturen, die eine bessere Anheftung des (Blut-)Gerinnsel ermöglichen sollen (Steadman et al. 1999, Steadman et al. 2002). Die Ergebnisse von Folgeuntersuchungen von mit Mikrofrakturierung behandelten Defekten ergaben statistisch signifikante Verbesserungen in klinischen Scores hinsichtlich Funktionalität und Schmerzen (Steadman et al. 2003).

Ein besonderer Vorteil dieser Methode sind die vergleichsweise geringen Kosten bei einem einzeitigen, kurzen Eingriff.

Ein Nachteil der genannten Methode zur Behandlung von Knorpeldefekten stellt die Schaffung eines Regenerats aus überwiegend Faserknorpel dar. Dieser gilt als biomechanisch insuffizient und soll auf Dauer das Fortschreiten der Arthrose nicht verhindern können (Coletti et al. 1972, Mitchell und Shephard 1976, Chen et al 1999). Limitierend ist hierbei die Größe des Defektes, da ab ca. 2- 3 cm^2 Defektgröße das auch als „super clot“ bezeichnete Gerinnsel nicht mehr im Defekt gehalten wird.

1.3.1.2 Periostlappen-/Perichondriumtransplantation

Bei der Periostlappentransplantation macht man sich die regenerativen Fähigkeiten der Knochenhaut zu nutze (Ham 1930, O'Driscoll et al. 1994). Das Periost enthält junge chondroblastäre Zellen, deren Differenzierungsgrad höher als jener der mesenchymalen Stammzellen zu sein scheint (Bruns und Steinhagen 1999). Nach umfangreicher tierexperimenteller Anwendung (O'Driscoll et al. 1988; O'Driscoll et al. 1994; Rubak et al. 1982) wurde die Methode beim Menschen angewandt (Niedermann et al. 1988).

Die Indikation zur Operation mit Periostlappendeckung ist eher bei traumatischer Chondromalazie zu stellen, ebenso konnte eine erfolversprechendere Anwendung an patellaren Defekten als an solchen des femorotibialen Gelenkes in klinischen Studien bestätigt werden (Korkala und Kuokkanen 1995).

Vergleichbar wurde die Methode unter Verwendung von Perichondrium zur Behandlung von Knorpeldefekten beim Menschen mit gutem klinischen Erfolg angewendet (Homminga et al. 1990). Im Tierexperiment am Schaf fanden sich bei der Verwendung von Periost Hinweise auf eine subchondrale Hypertrophie (Russlies et al. 2003).

1.3.1.3 Autologe Chondrozyten Transplantation/Implantation (ACT, ACI)

Isolierte autologe und heterologe Chondrozyten haben das Potential, Knorpelersatzgewebe bilden zu können. Im Tierexperiment am Kaninchen wurde in mit Periost gedeckte Knorpelläsionen eine gute Regeneration mit hyalinem Knorpel erreicht (Peterson et al. 1984). 1994 wurde die Methode daraufhin erstmals am Menschen angewandt (Brittberg et al. 1994, Brittberg et al. 2001). Frühzeitig konnten gute histologische Ergebnisse vorgestellt werden, die aufgrund einer kleinen Fallzahl und einer fehlenden Kontrollgruppe allerdings nur bedingt aussagekräftig waren (Peterson 1996, Richardson et al. 1999).

Technisch erfolgt bei dieser Methode die Gewinnung von Knorpel während einer diagnostischen Arthroskopie. Hieraus werden im Labor in einem speziellen Verfahren autologe Chondrozyten angezüchtet. Nach ca. drei Wochen stehen genügend Zellen in Suspension zur Verfügung. In einem zweiten Eingriff wird nun über eine Arthrotomie im Bereich des Defektes bis zum gesunden Knorpel debridiert, ohne den subchondralen Knochen zu eröffnen. Eine wasserdichte Deckung wird durch das Einnähen und Verkleben eines Periostlappens erreicht. In die so geschaffene Kammer wird die Zellsuspension eingebracht.

Komplikationen umfassen Adhäsionen/Arthrofibrosen, Transplantatablösung, hypertrophe Veränderungen des Transplantates sowie Chondromalazie, Synovialitis und Knieschmerz.

In einer randomisierten Studie wurde bei 80 Patienten entweder Mikrofrakturierung oder ACT zur Behandlung von symptomatischen Knorpeldefekten am Kniegelenk untersucht. In einem klinischen Score (SF-36 PCS) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. In der histologischen Evaluation finden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, obwohl der Anteil von hyalinem Knorpel bei der ACT höher erscheint (Knutsen et al. 2004). Auch die Fünfjahresergebnisse dieser Studie können keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Behandlungsmethoden aufdecken (Knutsen et al. 2007).

Die Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ der DGU und DGOOC hat eine Indikations- und Durchführungsempfehlung zur ACT erarbeitet (Behrens et al. 2004).

1.3.1.4 Matrix gekoppelte autologe Chondrozyten Transplantation (MACT)

Um Nachteile des Periostlappens zu vermeiden wurde ein Ersatz als Zellträger gesucht. Bei der matrix - gekoppelten autologen Chondrozyten Transplantation macht man sich die dreidimensionalen, bioresorbierbaren Vliese aus dem Bereich des „bio tissue engineering“

zu nutze, um die transplantierten Chondrozyten am Defekt zu halten (Behrens et al. 1999). So werden mittlerweile eine Vielzahl von Trägermaterialien mit vitalen Komponenten eingesetzt und finden in verschiedenen Bereichen der Medizin Anwendung (Sittinger 1995, Sittinger et al. 1996). Unter anderem Polyglactin/Polydioxan-Vliese (Perka et al. 2000), sowie Kollagen-Vliese (Gille et al. 2002) finden sich in experimentellen Studien. Die Zellen werden im Anschluss an die Vermehrung auf die Membran gegeben und dort für wenige Tage weiterkultiviert (Russlies et al. 2002).

Um die Risiken für den Patienten und die Kosten zu minimieren gibt es mittlerweile die arthroskopische autologe Chondrozyten Transplantation mit Hilfe von dreidimensionalen Matrices, auf denen die Chondrozyten kultiviert werden (Marcacci et al. 2002). Man verspricht sich davon die durch den Periostlappen verursachten Komplikationen, wie Verkalkung und Hypertrophie, zu minimieren. Außerdem können größere Defekte als beispielsweise bei der osteochondralen Transplantation behandelt werden.

In einer klinisch experimentellen Studie mit kleiner Fallzahl (n=31) untersuchten Haddo et al. (2004) Autologe Chondrozyten Transplantation gekoppelt mit einer Kollagenmembran (Typ I/II, Chondro-Gide[®], Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz). In 70% der Fälle fand sich hyalinartiger Knorpel in einer Biopsie im Rahmen einer Kontrollarthroskopie nach einem Jahr. Auch nach verschiedenen klinischen Scores kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Symptome im Vergleich zum Befinden vor der Operation. Grenzen dieser arthroskopischen Methode finden sich bei patellaren Defekten, die ohne Entwicklung neuer Operationsgeräte nicht zugänglich sind.

Bartlett et al (2005) beurteilten in einer Gegenüberstellung von MACT und klassischer ACT nach einem Jahr beide Methoden als gleichwertig. Weitere Langzeitergebnisse stehen noch aus.

1.3.1.5 Matrix gekoppelte Mikrofrakturierung (AMIC[®])

Bei dieser Methode kommt eine Kombination der Mikrofrakturierung mit Kollagenmembranen zum Einsatz, als Gerüst für das aus mesenchymalen Stammzellen bestehenden Gerinnsels. In einer tierexperimentellen Studie am Kaninchen (Buma et al. 2003) wurde diese Methode in Kombination mit Kollagen Typ II gegen Typ I Membranen histologisch verglichen. Nach vier Wochen zeigten sich mehr Zellen bei der Kollagen Typ I Membran, was nach 12 Wochen nicht weiter gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wurde eine oberflächliche Gewebebildung eines knorpelähnlichen Gewebes bei der Gruppe der Kollagen II

Membran gefunden, wohingegen die Kollagen I Gruppe ein durchgängig faserknorpeliges Gewebe ausbildete. Das makroskopische Ergebnis erfüllte bei diesem Vergleich keine hohen Ansprüche, da die ursprüngliche Kontur nicht bei allen Tieren erreicht werden konnte.

Dorotka et al. (2005) untersuchten Ersatzgewebe nach 16 Wochen im Schafsmodell histomorphologisch. Behandlungsgruppen waren Kollagenmembran I/II/III (überwiegend Typ II), besiedelt mit autologen Chondrozyten in Kombination mit Mikrofrakturierung, die gleichartige Membran ohne Zellen in Kombination mit Mikrofrakturierung, sowie alleinige Mikrofrakturierung und unbehandelte Defekte. Die Untersucher kommen zu dem Schluss, das a.e. die Gruppe der mit autologen Chondrozyten besiedelten Membran in der Lage ist ein „hyalinartiges“ Ersatzgewebe zu produzieren. Die behandelten Defekte lieferten bessere Ergebnisse als unbehandelte. Im Vergleich durch den modifizierten O’Driscoll Score zur Bewertung der histologischen Eigenschaft schnitt die Mikrofrakturierungsgruppe besser als die Mikrofrakturierung in Kombination mit Kollagenmembran ohne Zellen ab.

Behrens et al. (2006) konnten anhand klinischer Scores zufriedenstellende 2- bzw. 5-Jahresergebnisse bei einer Gruppengröße von 25 Patienten veröffentlichen, werteten das Verfahren dennoch als kostenintensiv. Weitere Langzeitergebnisse als kontrollierte Studien zu klinischen Erfolgskontrollen stehen noch aus.

1.4 Biomechanische Grundlagen

Eine genaue Kenntnis von den biomechanischen Eigenschaften von Knorpel sowie der durch operative Methoden und „tissue engineering“ gewonnenen Ersatzgewebe ist für die Grundlagenforschung unerlässlich. Die Evaluation der biomechanischen Gewebeeigenschaften erlaubt eine Aussage über die Qualität unterschiedlicher Knorpelersatzbehandlungen. Im Vergleich zum Ideal des genuinen Knorpel können Defizite der biomechanischen Beanspruchbarkeit aufgezeigt werden. Histologische Untersuchungen der Gewebe auf der Suche nach „hyalinartigem Knorpel“ in den letzten Jahren prägten verschiedenartige histologische Scores (z.B. O’Driscoll et al. 1994). Ersatzgewebe, das morphologisch wesentliche Eigenschaften hyalinen Gelenkknorpels aufweist, ist nicht zwangsläufig mechanisch stabil. Es ist demnach wünschenswert, dass Studien zu Knorpelreparaturverfahren eine mechanische Charakterisierung des gebildeten Gewebes enthalten (Schäfer et al. 2004).

In einer Studie am Kaninchenknie konnte gezeigt werden, dass das Ersatzgewebe nach osteochondralen Defekten weicher als der genuine Knorpel ist, aber deutlich bessere Eigenschaften als unbehandelte Leerdefekte aufwies (Wakitani et al. 1994). Dieses Ergebnis korrelierte mit der mikroskopischen histologischen Auswertung jenes Versuches.

Verschiedene Testverfahren zur Untersuchung von mechanischen Eigenschaften sind bisher durchgeführt worden (Kempson et al. 1971, Coletti et al 1972, Hayes et al. 1972, Mow et al. 1980). Spezielle, traumatisierende Experimente lieferten Informationen über die Eigenschaft des Knorpels in den einzelnen histologischen Schichten (Obeid et al. 1994), erlauben aber folglich keine histologische Evaluation über die Gesamtheit des Knorpelgewebes und spielen folglich bei der Bewertung eines Ersatzgewebes keine Rolle. Einen Ansatz traumatisierender Gewebetestung suchten auch Hori und Mockros (1971). Für Zugversuche mussten mittels Mikrotoms Gewebestreifen und für Kompressionstest geometrische Knorpelknochenzylinder präpariert werden. Die Integrität des Knorpels wurde dadurch verletzt, und der Bezug zum subchondralen Knochen konnte nur bedingt berücksichtigt werden. Eine Testung nahe den physiologischen Bedingungen des Gewebes war so nicht möglich, auch eine anschließende histologische Diagnostik stand nur eingeschränkt zur Verfügung.

Das Testen der Knorpelbiomechanik erfordert also nach Möglichkeit intakte Gelenke. Insbesondere bei der Untersuchung von Knorpelersatzgeweben gestaltetet sich dieses schwierig, da hierbei häufig eine unebene Oberfläche vorliegt. Die durch den Indentationsversuch mit kugeligem Indentor mögliche punktuelle Messung bietet im Gegensatz zu Kompressionsversuchen mit kleinen Knorpelknochenblöcken, bei denen breite Oberflächen untersucht werden, Vorteile.

Die biomechanischen Eigenschaften wie Steifheit, Elastizitätsmodul und Festigkeit werden in Knorpelzylinder - Kompressionstests untersucht. Elastizitäts- und Schermodul als biomechanische Parameter können anhand von kurzen Indentationstests bestimmt werden. Durch lang dauernde Indentations- und Druck - Entlastungsuntersuchung kann experimentell das „creep modulus“ und „equilibrium modulus“ bestimmt werden.

1.4.1 Indentationsversuch

Eine gängige Methode zur Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften eines Materials (Gewebes) stellt somit der Indentationsversuch dar, der in unserem Versuchsaufbau Verwendung findet. Eine genaue Beschreibung folgt unter Material und Methoden.

Indentationsversuche werden angewendet, um die biomechanischen Eigenschaften von Knorpel und Knorpelersatzgeweben zu vergleichen. Insbesondere werden Größen wie Härte und Steifigkeit eines Gewebes oder Materials untersucht.

Die Indentation als Weg-/Zeitverhalten wurde abhängig von der Form des eindringenden Stempels beschrieben. Für geringe Knorpeldicken, wie sie auch im Schafsmodell vorherrschen, schlug man eine Messung mit einem kugeligen Indentor vor. Dieser bietet im Vergleich zu einem planen Indentor eine geringere Verletzbarkeit des Gewebes und eine geringere Abhängigkeit von der Dicke des zu untersuchenden Gewebes (Lyyra-Laitinen et al. 1999).

Das Indentationsexperiment von Knorpel ist relativ einfach durchzuführen und stellt eine gewebeschonende Methode dar und wurde vielfach übernommen und modifiziert (Jurvelin et al. 1987, Lyyra et al. 1999). Dabei wird die Integrität des Knorpelgewebes und die Ultrastruktur der Kollagenfibrillen durch die Testung nicht beeinträchtigt (Mow et al. 1992). Auf der Grundlage des Indentationsversuches gelang es Lyyra-Laitinen et al. (1999) eine arthroskopische Indentationsmessung zur biomechanischen Prüfung *in vivo* zu entwickeln. Das dabei erstellte Gerät wird mittlerweile kommerziell vertrieben (Artscan 1000, Artscan Oy, Helsinki, Finnland).

Ähnlich zum Indentationsexperiment unserer Studie beschrieb Krakovits (1969) ein Verfahren. Hierbei drückte eine Stahlkugel eines bekannten Durchmessers mit einer definierten Kraft in das Gewebe. Anschließend ermittelte er die durch die Kugelimpression hervorgerufene Verformung mit einem Messgerät.

Untersuchungen am Schafsmodell durch Rütter et al. (2003) verwandten einen kugeligen Indentor zur Beurteilung von Knorpel und Ersatzgeweben. Der „25 Sekunden Kriechindex“ ermöglicht eine Auswertung der mechanischen Eigenschaften unabhängig von der Dicke des Gewebes, es wird ein frühes Kriechverhalten des Indentations-/Zeitverhalten beschrieben.

Mithilfe unseres technisch einfachen Versuchsaufbaus (Köller et al. 2008) können Daten zur Errechnung biomechanischer Eigenschaften mit hoher Reproduzierbarkeit erhoben werden.

1.5 Fragestellung

Die Behandlung von Knorpeldefekten stellt eine große Herausforderung in der klinischen Praxis dar. Bislang ist keine Behandlungsmethode in der Lage, ein dem gesunden Knorpel ebenbürtiges Gewebe zu erschaffen.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand biomechanischer Parameter Knorpelgewebe, Knorpeldefekte und durch deren Behandlung gebildete Ersatzgewebe am Schafsmodell zu evaluieren. Durch einen Indentationsversuch mit Weg-/Zeitverhalten sowie der Auswertung der Gewebedicke können die biomechanischen Parameter "25 s Kriechindex" und Elastizitätsmodul bestimmt werden. Die durch fünf unterschiedliche angewandte Behandlungsoptionen geschaffenen Ersatzgewebe werden gegeneinander sowie gegen den genuinen Knorpel und unbehandelte Defekte an zwei Lokalisationen verglichen. Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Gibt es statistisch relevante regionale Unterschiede zwischen Condylus medialis und Facies patellae femoris?
2. Ist der gesunde Knorpel besser als das Ersatzgewebe der behandelten Defekte hinsichtlich Knorpeldicke und biomechanischer Eigenschaften?
3. Ist das Ersatzgewebe behandelter Defekte hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften und Knorpeldicke besser als das Gewebe unbehandelter Defekte?
4. Gibt es signifikante Unterschiede oder Tendenzen im Vergleich der einzelnen Behandlungsmethoden hinsichtlich Biomechanik und Knorpeldicke? Hat die Verwendung unterschiedlicher Kollagenmembranen einen Einfluss auf das Ergebnis?

2 Material und Methoden

2.1 Das Schafsmodell

Bei der Wahl der Tierart wurde das Mischlingsschaf herangezogen. Knorpelgewebe von Tiermodellen zeigen deutliche Unterschiede zum menschlichen Knorpel, insbesondere im Hinblick auf die Knorpeldicke. So haben Kaninchen als am häufigsten gewähltes Objekt Knorpeldicken von nur ca. 0,5 mm. Das Schaf hingegen bietet mit Knorpeldicken um 1,5 mm ein besseres Modell (Breinan et al. 2001), um dem menschlichen Knorpel mit bis zu 7 mm Dicke (Rudert und Wirth 1998) näher zu kommen.

Der Tierversuch wurde unter der Nummer V 252-72241.122-15 (38-5/02) am 24. Juni 2002 vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt. Hierbei wurde auf Übereinstimmung mit § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 geachtet.

Die Mischlingsschafe wurden durch die Tierhaltung der Universität zu Lübeck bereitgestellt, waren bei Versuchsbeginn zwischen ein und anderthalb Jahren alt und wogen zwischen 30 und 62 Kilo (Mittelwert 46 kg und Median 47 kg, Standardabweichung 9,6 kg). Die Schafe erhielten artgerechtes Futter und ausreichend Wasser. Peri- und postoperativ erfolgte die Betreuung durch die Tierhaltung der Universität.

Die Studie wurde mit 30 Schafen durchgeführt, wovon drei vor Ablauf der Standzeit verstarben.

2.2 Behandlungsgruppen

Es erfolgte eine Einteilung in fünf Behandlungsgruppen (n=26) wie in Tabelle 1 gezeigt.

Gruppe 1: (n = 6) MACT I/III	Defektdeckung durch Einkleben bzw. Einnähen einer mit autologen Chondrozyten besetzten Kollagen I/III Matrix Chondro-Gide®, autologer Fibrinkleber oder 6/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
Gruppe 2: (n = 5) MACT II	Defektdeckung durch Einkleben bzw. Einnähen einer mit autologen Chondrozyten besetzten Kollagen II Matrix (autologer Fibrinkleber oder 6/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
Gruppe 3: (n =4) MI	Mikrofrakturierung
Gruppe 4: (n = 6) AMIC I/III	Mikrofrakturierung plus Einkleben bzw. Einnähen einer Kollagen I/III Matrix (Chondro-Gide® autologer Fibrinkleber oder 6/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
Gruppe 5 (n = 5) AMIC II	Mikrofrakturierung plus Einkleben bzw. Einnähen einer Kollagen II Matrix (autologer Fibrinkleber oder 6/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

Tabelle 1: Einteilung der Behandlungsgruppen

Die bei den Gruppen vier und fünf angewandte Technik ist eine Weiterentwicklung entsprechend der unter 1.3.1.5 vorgestellten Methode AMIC®. Hierbei wird versucht, die Mikrofrakturierung mit einer dreidimensionalen Membran zu kombinieren, unter der Vorstellung den aus dem Knochenmarkraum eintretenden mesenchymalen Stammzellen ein Gerüst zu geben. Darüber hinaus wird eine Gewinnung von autologen Chondrozyten wie bei der Matrix assoziierten Chondrozyten Transplantation in einem zweiten Eingriff überflüssig.

2.3 Matrices

Ein Problem der Autologen Chondrozyten Transplantation besteht in der Dedifferenzierung während der Monolayer Kultivierung. Eine dreidimensionale Struktur scheint die Redifferenzierung zu Kollagen Typ II produzierenden Zellen zu unterstützen. So wurden Chondrozyten und Fibroblasten ähnelnde Zellen auf Kollagenmatrices nach siebentägiger Kultur gesehen, die gut mit der Matrix verbunden schienen (Fuß et al. 2000).

Kollagen-I/III-Membran (verwendet in den Gruppen 1 und 4)

Bei dieser Membran, dargestellt in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Abbildungen 4 und 5, handelt es sich um eine handelsübliche Membran Chondro-Gide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz, s. Abb. 4 und Abb. 5)). Die aus Schweinekollagen hergestellte Matrix besteht neben Kollagen Typ I und Typ III auch aus Elastinfasern. Durch spezielle Reinigungsverfahren werden Fett- und Proteinreste sowie die eventuell Allergie verursachenden Teloptide vollständig entfernt. Die genaue Zusammensetzung unterliegt der patentrechtlichen Geheimhaltung der Herstellerfirma.

Die Schichtstruktur der Matrix mit einer zellundurchlässigen Außenschicht verhindert ein Eindringen von Zellen, nicht aber von Flüssigkeit und Nährstoffen. Diese Bilayer-Struktur unterstützt auch die Deckelung der mit Chondrozyten beladenen Matrix. Ein ausgewiesener Vorteil sind die Elastinbestandteile, welche ein Schrumpfen verhindern und somit die dreidimensionale Struktur aufrechterhalten. Des Weiteren konnten Russlies et al. (2002) zeigen, dass die besiedelten Chondrozyten sich mit der Matrix verankern und somit auch nach chirurgischer Manipulation am Trägermaterial haften bleiben. Nachteilig wird aufgeführt, dass der unphysiologische Kollagen I Anteil der Membran den Differenzierungsprozess negativ beeinflussen könnte.



Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Chondro-Gide® Membran

In einer Veröffentlichung von Frenkel et al. (1997) finden sich bei Verwendung einer ähnlichen Membran 25% weniger Kollagen Typ II ohne Besiedelung mit Zellen, dafür ein höherer Anteil an Kollagen Typ I nach Biodegradation des Trägers.

Kollagen II Membran (verwendet in den Gruppen 2 und 5)

Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Kollagenmembran der Fa. Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz. Die Membran porcinen Ursprungs besteht mehrheitlich aus Kollagen Typ II, ebenso sind Kollagen Typ I und Typ III in geringer Menge enthalten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Membran im folgenden als Kollagen II Membran benannt. Die Zusammensetzung ist patentiert und unterliegt der Geheimhaltung des Herstellers.

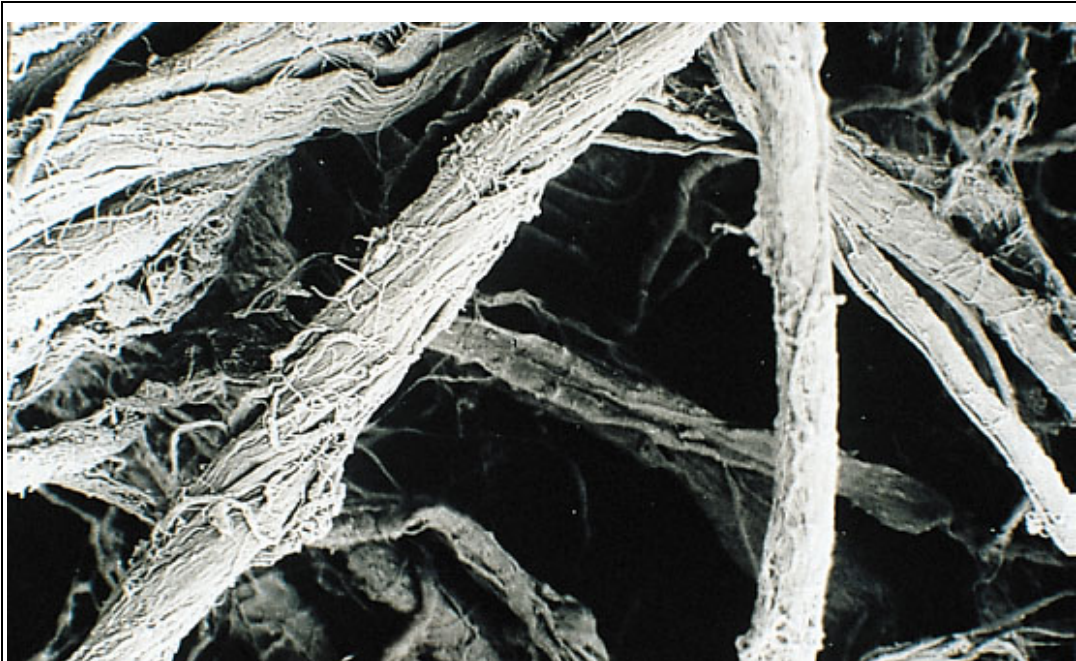


Abb. 5: Stärkere Vergrößerung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme der Chondro-Gide® Membran

2.4 Operationsvorbereitung und Narkose

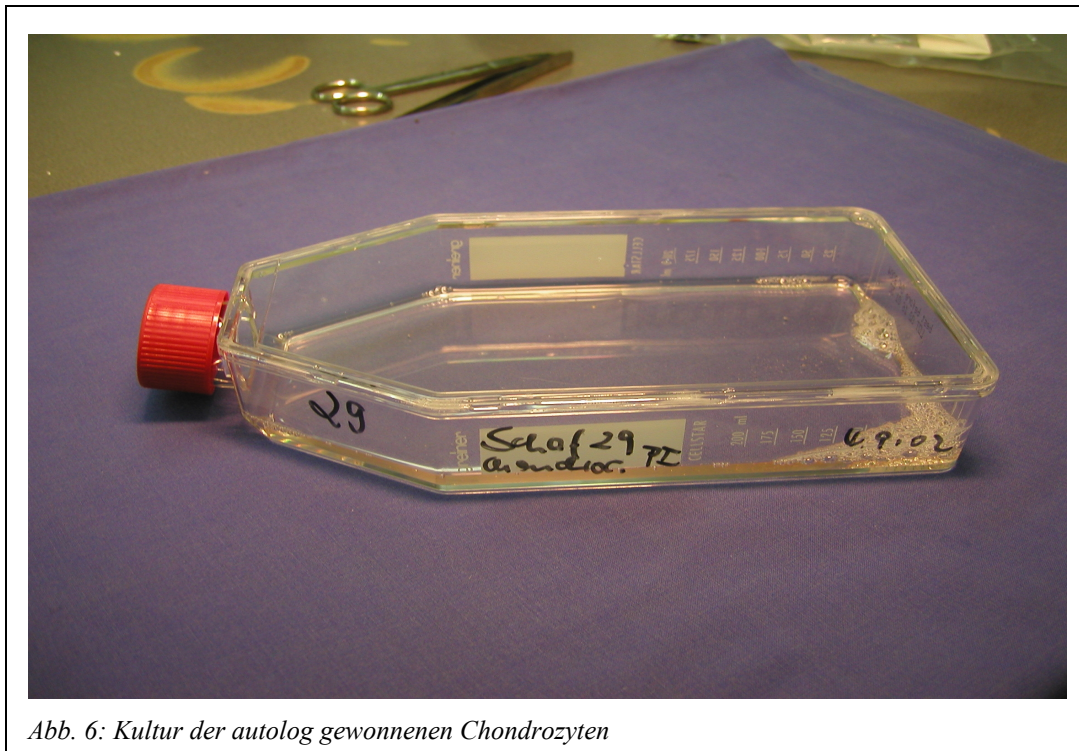
Die Sedation wurde in Anlehnung an eine etablierte Methode zur spinalen Anästhesie am Schaf durchgeführt (Schumacher et al. 2001). Zur Narkoseprämedikation erhielten die Tiere gewichtsadaptiert ein Gemisch aus 0,5 mg Atropinsulfat (Atropin®), 0,05 mg/kg KG Xylazin 2% (Rompun®) und 0,08 mg/kg Ketamin (Ketanest®) intramuskulär.

Daraufhin erfolgte eine Spinalanästhesie in maximaler Flexion der Lendenwirbelsäule mit 1,4-1,6 ml Bupivacain – HCl 0,5% (Carbostesin[®], Astra). Eine bedarfsgesteuerte Gabe von 1-2 mg Midazolam (Dormicum[®], Roche) wurde zur weiteren Sedierung bei spontan atmenden Schafen verwendet. Eine Einmaldosis von 10 Mega Penicillin V zur antibiotischen Prophylaxe wurde verabreicht.

Nach medialer Arthrotomie konnte in Flexionstellung sowohl die Facies patellaris femoris als auch die mediale Femurcondyle ausreichend dargestellt werden. Für die standardisierten Defekte (runde Defekte $r = 3,5$ mm) wurde eine hohle Stanze verwendet, unter Kontrolle durch Lupenbrille wurde das innenliegende Knorpelgewebe entfernt. Hierbei wurde darauf geachtet, nicht den subchondralen Knochen zu verletzen oder zu eröffnen, um ein Eindringen von Knochenmarkstammzellen zu verhindern.

Die Matrices wurden entweder eingenäht (6/0 Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, Deutschland) oder eingeklebt (TissueCol-Kit 2,0 ml Immuno, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland).

2.5 Operation und Kultivierung autologer Chondrozyten



In einem ersten Schritt wurde den Schafen aus den Gruppen 1 und 2 Knorpelbiopsien mittels *sharp gouch* aus den lateral superioren Anteilen der Trochlea Femoris des Schafskniegelenkes gewonnen. Die bis zum subchondralen Knochen gehenden Biopsien wurden gewogen und die Zellen in einem nächsten Schritt isoliert.

Im Anschluss erfolgte die in-vitro Vermehrung in einem Nährmedium aus Ham's F 12 medium (Gibco BRL, Paisley, Schottland) mit 10% fetalem Rinderserum (Biochrom, Berlin, Germany), 1% L- Glutamin 200 mM (Gibco BRL, Paisley, Schottland), 1% nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco BRL, Paisley, Schottland), 10000 U Penicillin/ml und 10000 mg Streptomycin/ml für vier Wochen in Kulturschalen (siehe auch Abb. 6).

Die Chondrozyten wurden danach auf die dreidimensionalen Membranen (Chondro-Gide®, oder Kollagen II Matrix, beide Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) gesät (1 Million Zellen/cm²) und für weitere drei Tage mit autologem Serum kultiviert (Gille et al. 2002).

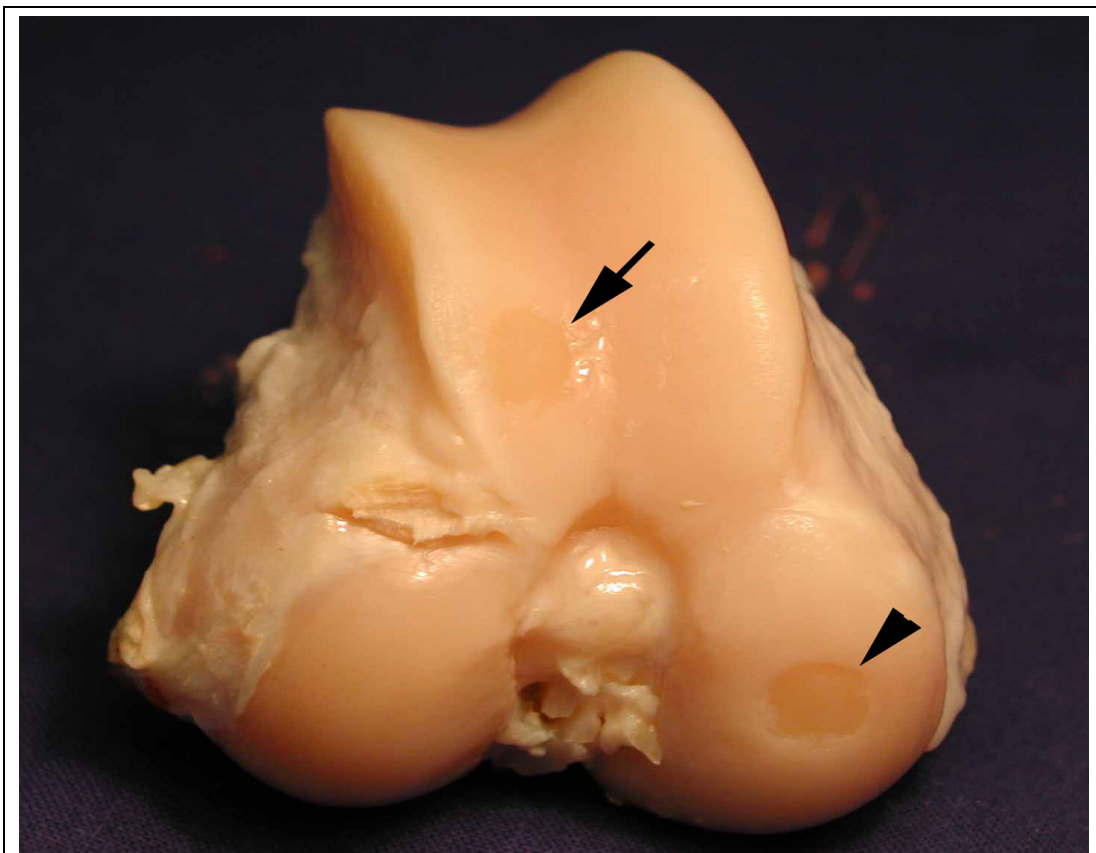


Abb. 7: Defekte der Facies patellaris femoris (Pfeil) und des Condylus medialis (Pfeilspitze) nach einem Jahr.

In einem zweiten Eingriff ca. vier Wochen nach der Knorpelbiopsie der Gruppen 1 und 2 sowie bei den übrigen Gruppen wurden sowohl im linken als auch im rechten Knie zwei standardisierte Defekte von 7 mm Durchmesser am medialen Condylus und an der lateralen Facies patellaris des femoropatellaren Gleitlagers gesetzt. (siehe Abb.7, 8, 9 und 10)



Abb. 8: Einsatz der Stanze am medialen Condylus femoris

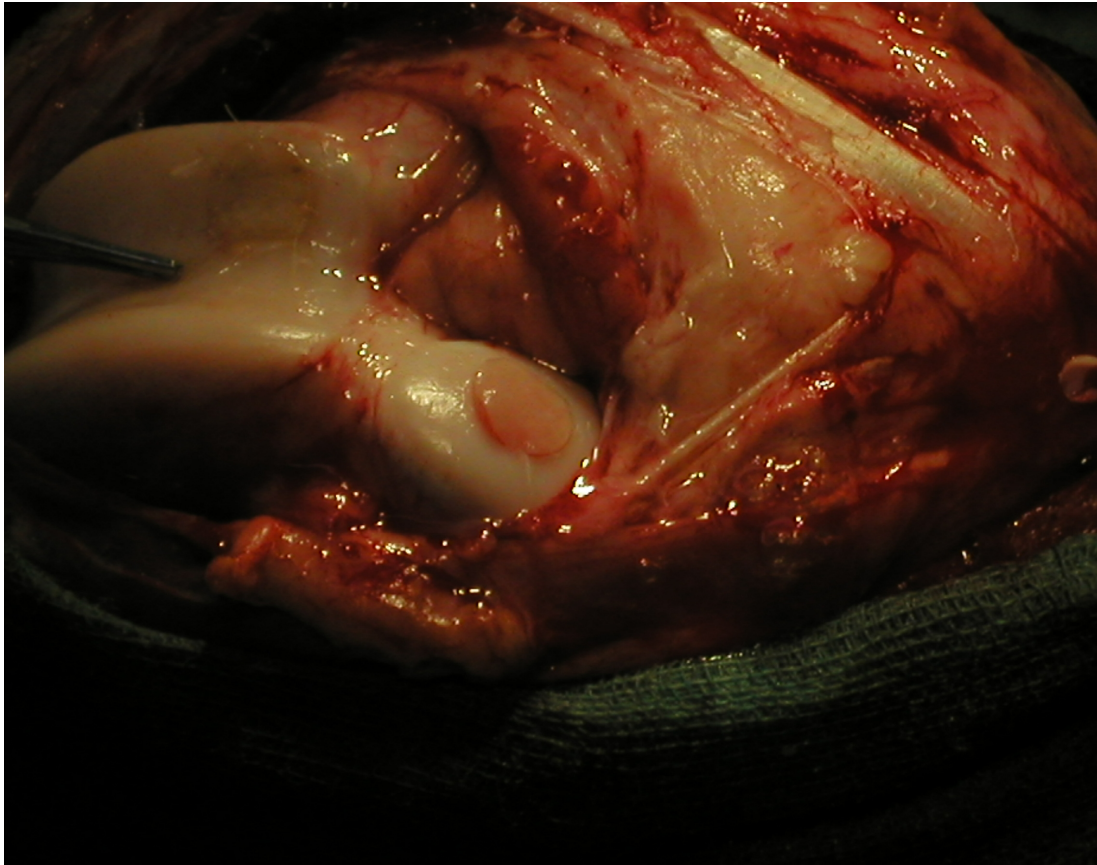


Abb. 9: Operatives Einbringen des Kollagenvlies. Am condylären Defekt liegt das Vlies noch über Niveau, das Vlies des patellaren Defektes ist bereits integriert.

Dann erfolgte die Behandlung des linken Knies entsprechend der Gruppeneinteilung. Die Defekte der rechten Kniegelenke dienten als Kontrolldefekte ohne Behandlung.

Die Abb. 9 zeigt eine in den Defekt eingebrachte Kollagenmatrix. Auf der Abb. 10 sieht man einen durch Mikrofrakturierung behandelten Defekt.

Laut Athanasiou et al. (1991) sind Unterschiede zwischen dem linken und dem rechten Kniegelenk nicht anzunehmen. Russlies et al. (2003) stellten fest, dass innerhalb der Femurcondylen sowie innerhalb des Patellaren Gleitlagers keine regionalen Unterschiede in den biomechanischen Eigenschaften vorhanden sind.



Abb. 10: Operative Defektbehandlung durch Mikrofrakturierung. Sichtbar sind Defekte an der lateralen Facies patellaris femoris (links) und Condylus mediales femoris (rechts)

2.6 Probenentnahme

Nach einer Standzeit von einem Jahr wurden die Schafe terminiert. Es erfolgte die Entnahme der Gelenkflüssigkeit sowie eine Biopsie der Synovia für weitergehende Untersuchungen.

Die Kniegelenke wurden umgehend für die biomechanische Testung präpariert und in 0,9% NaCl bei Zimmertemperatur gelagert, um einer Veränderung durch Austrocknung vorzubeugen. Während der Versuchsdurchläufe erfolgte eine kontinuierliche Befeuchtung mit 0,9% NaCl durch einen Zerstäuber.

Zur Präparation wurden die am Femur inserierenden Muskeln sowie die Gelenkkapsel entfernt und der Femurschaft ca. fünf Zentimeter oberhalb der Knorpelflächen durchtrennt.

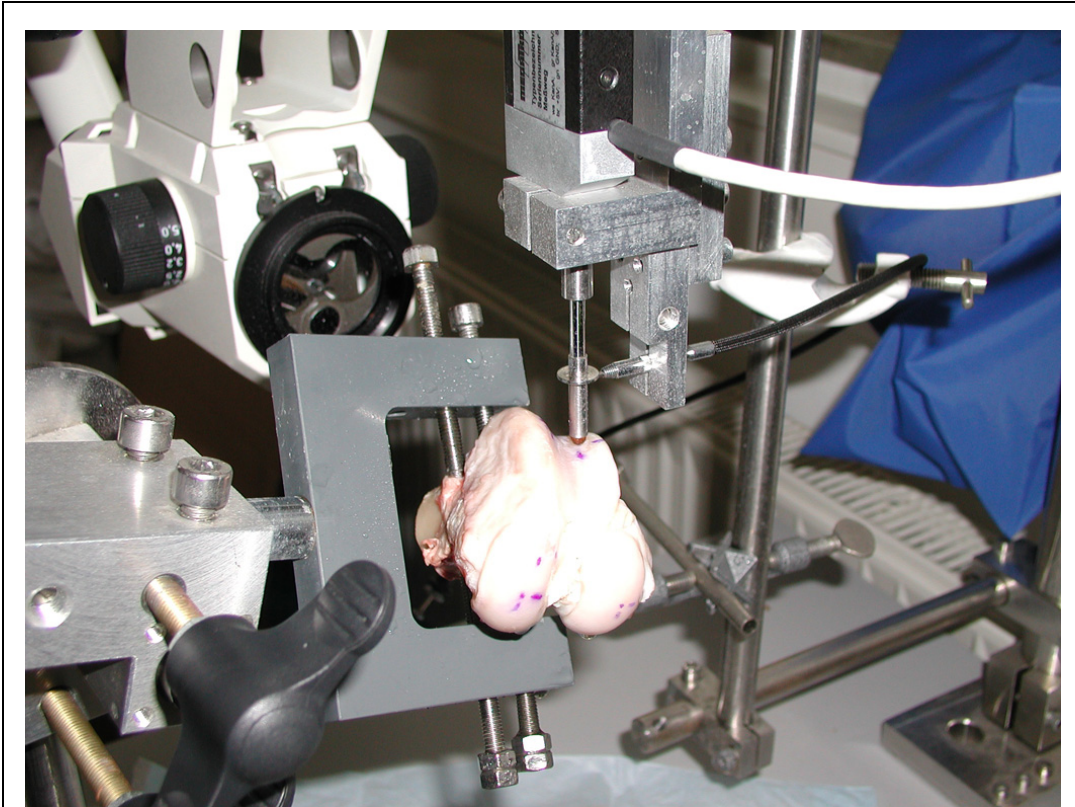


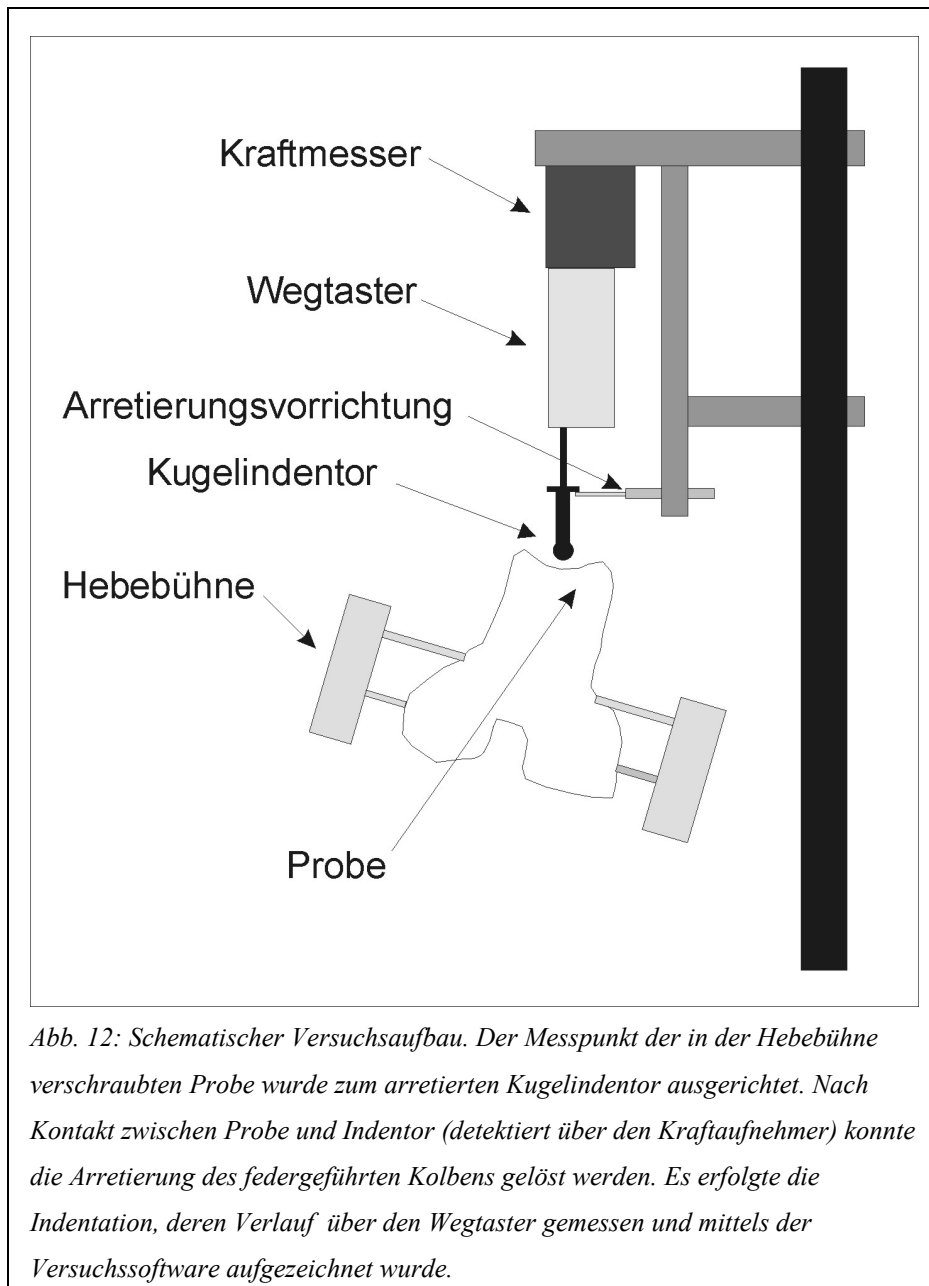
Abb. 11: Versuchsaufbau. Messung einer Probe am condylären Defekt. Zu erkennen ist die an der Hebevorrichtung fixierte Probe und der Kolben mit darüber liegendem Kraftaufnehmer.

2.7 Versuchsaufbau zur biomechanischen Testung

Das Präparat wurde mittels vier Schrauben in den Versuchsaufbau eingespannt. Diese, mit einer mechanischen Hebebühne verbundene Vorrichtung erlaubt die Ausrichtung der Proben in alle Richtungen. Mittels der Hebebühne konnten die Präparate stufenlos dem Indentor entgegengebracht werden, wobei darauf geachtet wurde, dass der Indentor genau senkrecht auf die zu untersuchenden Oberflächen traf (siehe dazu Abb. 11 und 12).

Das Testverfahren wurde in Anlehnung an die Kugeldruckhärteprüfung für Kunststoffe nach DIN 53456 oder EN ISO 2039-1 entwickelt. Der Indentor setzte sich aus einem Wegtaster (Auflösung und Genauigkeit 1 μm) mit federgeführten Kolben und einer runden Tastspitze aus rostfreiem Stahl zusammen. Zusätzlich konnte durch die Integration eines Kraftmessers (Auflösung und Genauigkeit 10 mN) eine Verformung des Knorpels, im Sinne einer Vorkraft verhindert werden. (Abb. 12: Schematischer Versuchsaufbau). Der federgeführte Kolben konnte mit einer Arretierungsvorrichtung festgestellt und ausgelöst werden. Wie bereits bei Russlies et al. (2003) wurde ein sphärischer Indentor verwendet

(Radius 2 mm), da auf diese Art eine Traumatisierung des untersuchten Gewebes gering gehalten wird und diese Form sich für Knorpeldicken kleiner 2 mm bewährt hat. (Lyyra-Laitinen et al. 1999).



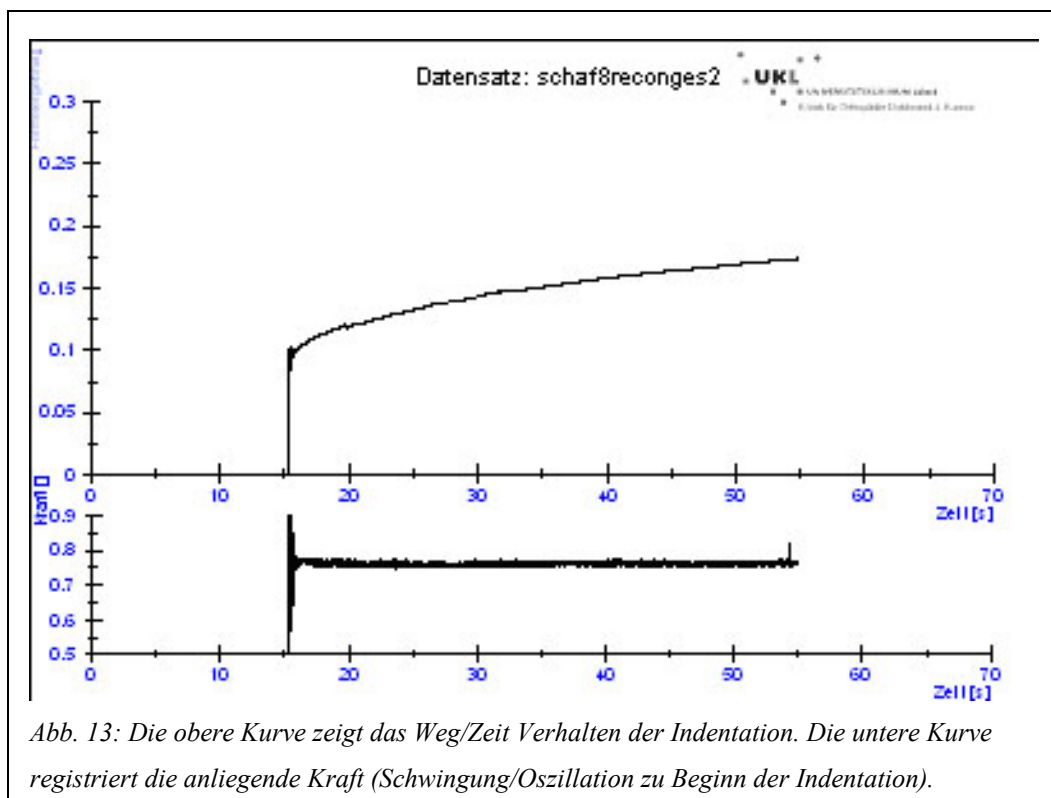
Eine minimale Berührung der Probe vor Beginn eines Messvorgangs konnte mit Hilfe des Kraftmessers detektiert werden. Kurz vor dem Lösen der Arretierung und im folgenden Intervall von ca. 40 Sekunden wurden die Daten für den Eindringversuch aufgezeichnet (siehe dazu Abb. 13), welcher einen im folgenden beschriebenen charakteristischen Kurvenverlauf ergab.

Innerhalb von ca. 0,2 Sekunden nach Lösen der Arretierungsvorrichtung wurde die konstante Kraft von ca. 0,8 N erreicht und wirkte für etwa 35 Sekunden auf die Proben.

Nach dieser Zeit wurde der Indentor erneut in die Ausgangstellung gebracht und die Messung an der definierten Stelle nach zehn Minuten wiederholt. Dieses Intervall wurde eingehalten, um dem Knorpel eine Erholung von der Indentation zum Grundzustand zu ermöglichen. Die zwei erhaltenen Werte gingen als Mittelwert in die Statistik ein.

Die Messungen insbesondere des genuinen Vergleichsknorpels erfolgten an mittels wasserfester Tinte markierten Messpunkten.

Die Maschinenverformung als Ausdruck der Eigenverformung des Messaufbaus betrug in unserem ca. 20 μm . Dieser Wert ergab sich aus Vorversuchen, bei denen wir Messungen mit extrem steifen Materialien wie Stahl oder Keramik durchgeführt hatten. Entsprechend zogen wir diesen Wert bei der Auswertung der Indentationskurven als Standardfehler ab.



Im Anschluss an die biomechanischen Messungen wurden die Präparate umgehend in 4% Formalin fixiert. Alle Proben wurden zur histologischen Aufbereitung dem Institut für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel übergeben.

2.8 Auswertung der Indentationskurven

Durch die Datenaufzeichnung mit der Software Diadem (National Instruments, München) war eine nachträgliche Auswertung des Weg/Zeit-Verhaltens des Eindringens möglich. Die Auswertung erfolgte durch die Software, zusätzlich wurden Sicherheitskopien jedes Versuchsdurchganges erstellt (siehe beispielhaft Abb. 13).

Hierbei wurden zum einen die Startdeformation und die „Kriech-Indentation“ ausgewertet. Beide ließen sich aus dem charakteristischen Kurvenverlauf des biomechanischen Indentationsversuches ermitteln: Dieser typische Kurvenverlauf enthält zwei getrennt zu bewertende Abschnitte. So beobachtet man beim gesunden Knorpel und beim Ersatzgewebe zu Beginn eine schnelle und annähernd lineare Verformung „*instantaneous deformation*“, hier als Startdeformation bezeichnet. (Kempson et al. 1971, Hayes et al. 1972, Lyyra-Laitinen et al. 1999).

Im weiteren Verlauf erkennt man den Übergang zum Kriechverhalten des Knorpels. Bei der Kriechindentation erfolgte die Auswertung der Eindringtiefe während eines 25 Sekunden dauernden Intervalls (siehe Abb. 14).

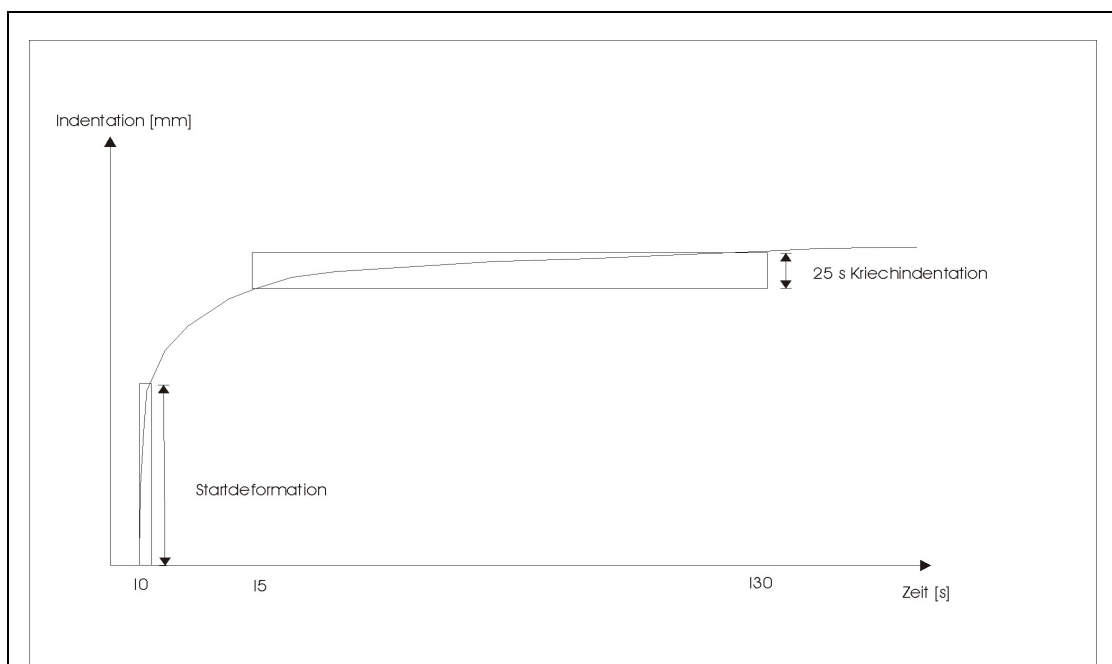


Abb. 14: Schematische Darstellung des Kriechverhaltens. Charakteristischerweise kommt es erst zu einer frühen Startdeformation, die dann in eine annähernd lineare Kriechdeformation übergeht. Zeitpunkt i_0 definiert den Startpunkt, i_5 den Beginn und i_{30} das Ende für die Auswertung der 25 s Kriechindentation. (eigene Abb.)

Oszillationen oder Schwingungen, die sofort nach Auftreffen der Ladung (Kraft) auftraten, fanden sich zum Teil während der Messung in der simultanen Kontrolle der Kraftmessung (siehe auch Abb. 13). Sie treten bei Stoffen mit hoher Viskoelastizität auf, nicht aber bei keramischen Werkstoffen (Coletti 1972).

Anhand Mittelung der zwei durchgeführten Messungen des 25 s Kriechverhaltens unter Berücksichtigung Knorpeldicke wurde der „25 Sekunden Kriech Index“ ermittelt. Hierzu wurden die Messgrößen wie folgt ausgewertet:

Nach Bestimmung des Beginns der Deformation („ i_0 “) wurden nach weiteren fünf Sekunden („ i_5 “) der Startpunkt des Kriechverhaltens definiert. Nun wurde für 25 Sekunden bis zum Endpunkt der Auswertung („ i_{30} “) die „25 s Kriechphase“ („ i_5 - i_{30} “) gemessen.

Durch die Verwendung des Kraftaufnehmers als Erweiterung des Versuchsaufbaus wurde die Anpresskraft des federgeführten Kolbens aufgezeichnet. Dies ist notwendig, um die Startdeformation reproduzierbar messen zu können. Mit einer Messgenauigkeit von 10 mN konnte eine geringe Berührung des arretierten Indentors mit der Präparatoberfläche in der Versuchsoberfläche der Messtechnik Software detektiert werden. Die vergleichsweise unpräzise stereoskopische Feststellung der Berührung von Kugelindentor und Präparatoberfläche war somit nicht erforderlich. Die Startdeformation wurde innerhalb von 0,25 Sekunden vom Beginn der Deformation „ i_0 “ gemessen (siehe Abb. 14).

Nach einer Formel von Kempson et al. (1971) zur Bestimmung des *creep modulus* durch Indentation von Gelenkknorpel errechnet¹ sich aus der gemessenen Startdeformation mit unten stehender Formel der Elastizitäts-Modul (im folgenden als E - Modul bezeichnet):

$$E = \frac{9 F}{16 \sqrt{r}} \left(\frac{1 - e^{-0.42 \frac{h}{a}}}{i} \right)^{\frac{3}{2}}$$

Der E – Modul (auch „Young’s Modulus“) ist ein Materialkennwert aus der Werkstofftechnik, der die mechanische Beanspruchbarkeit eines Stoffes beschreibt. Er berücksichtigt den Zusammenhang zwischen Spannung und Verformung eines Körpers im linear-elasti-

1 Bemerkungen zur Formel im Anhang 7.3

schen Bereich. Der Zahlenwert ist umso größer, je mehr Widerstand ein Körper seiner Verformung entgegensetzt, also desto steifer oder weniger nachgiebig er ist.

Für die Berechnung des E – Moduls werden neben der Indentation auch der Indentorradius, die einwirkende Kraft und die Knorpeldicke berücksichtigt. Die ermittelten Werte erlauben einen bedingten Vergleich zu Werten aus der Härteprüfung von Kunststoffen oder zu Knochen oder Knorpel.

Im folgenden sind einige Beispiele für verschiedene Werkstoffe dargestellt:

- Stahl ca.: 190 000 bis 210 000 N/mm²
- Messing: 78 000 bis 123 000 N/mm²
- Beton: 40 000 bis 45 000 N/mm²
- Holz, parallel zur Faser: 9 000 bis 12 000 N/mm²
- Holz, quer zur Faser: 300 bis 1 000 N/mm²
- Silikonkautschuk: 10 bis 100 N/mm²
- CFK ca.: 150 000 bis 300 000 N/mm²

(Internet: <http://www.wikipedia.de>, „Elastizitätsmodul“, Stand: 12/2005)

Angaben über E-Modulwerte für Knorpel variieren, insbesondere besteht ein Unterschied, ob es sich um eine dynamische Messung oder eine Messung des Kriechverhaltens handelt. Dies wird hauptsächlich damit erklärt, dass während einer dynamischen Belastung, wie der Startdeformation in unserem Versuch, das kovalent gebundene Wasser nicht aus dem Gewebe gequetscht werden kann. Diese Eigenschaft wird auch als dynamische Steifheit bezeichnet (Laasanen et al. 2003). In unserem Fall konnte aufgrund der initialen Oszillationen erst nach ca. 250 ms eine verlässliche Indentationstiefe bestimmt werden, aufgrund dieses kurzen Kriechverhaltens ist der Elastizitätsmodul nur vernachlässigbar beeinflusst und repräsentiert die festen Bestandteile des Knorpel- oder Ersatzgewebes (Köller et al. 2008).

Für die dynamische Belastung finden sich zehn- bis zwanzigfach höhere Werte als für die Kriechbelastung. Quantitativ gelten in der Literatur Werte zwischen 0,3 –1,5 MPa für Kriechbelastung (Mow et al. 1984) und bis zu 18 MPa für dynamische Messungen (Lasaanen et al. 2003). Aus Parallelversuchen an gesunden Schafskniegelenken in unserem Labor ergaben sich Werte von 0,03 bis 10 MPa entsprechend für dynamische Belastung (Köller et al. 2008).

Durch den Vergleich zu Untersuchungen an gesunden Schafskniegelenken wurden Ausschlusskriterien aus der Auswertung definiert. Werte größer 15 MPa für das Elastizi-

tätsmodul sowie Werte kleiner 0,02 für den Kriechindex wurden als Ausreißer von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Es liegt nahe, dass diese Werte härtere Gewebe wie den subchondralen Knochen repräsentieren, und somit im Falle einer Berücksichtigung in den Gruppen ein härteres (höherwertiges) Gewebe vortäuschen würden.

2.9 Knorpeldickenmessung

Die histologische Aufarbeitung der in Formalin gelagerten Proben erfolgte im anatomischen Institut in Kiel (s.o.). Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte nach Fixierung in Formalin (0,4%) und anschließender Entkalkifizierung des Knochens. Daraufhin wurden Dünnschnitte angefertigt, die mit Standard HE oder mit Toluidinblau gefärbt wurden. In unserem Labor wurden dann die Knorpeldicken mit Hilfe eines Stereomikroskops (Zeiss STEMI/SV6, Jena, Deutschland) mit Messskala im Okular ermittelt. Die Messung reichte von der „Tide mark“ bis zur Oberfläche.

Durch die Formalinfixierung war eine exakte Markierung der Indentationsmesspunkte nicht möglich. Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte in der Mitte der Defekte sowie in der Umgebung der jeweiligen Defekte (jeweils 0,5 cm Abstand zum Defektrand). Die mikroskopische Ausmessung wurde an drei oder mehr Stellen im Bereich der Defekte durchgeführt. Die Referenzpunkte für genuinen Knorpel waren analog. Aus den erhobenen Dicken wurde dann der Mittelwert für den jeweiligen Messpunkt gebildet (siehe Abb. 15). Pro Kniegelenk ergaben sich so fünf Messpunkte, zwei aus den Defektarealen (mediale Femurkondyle und femoropatellares Gleitlager) und drei aus Vergleichsmesspunkten.

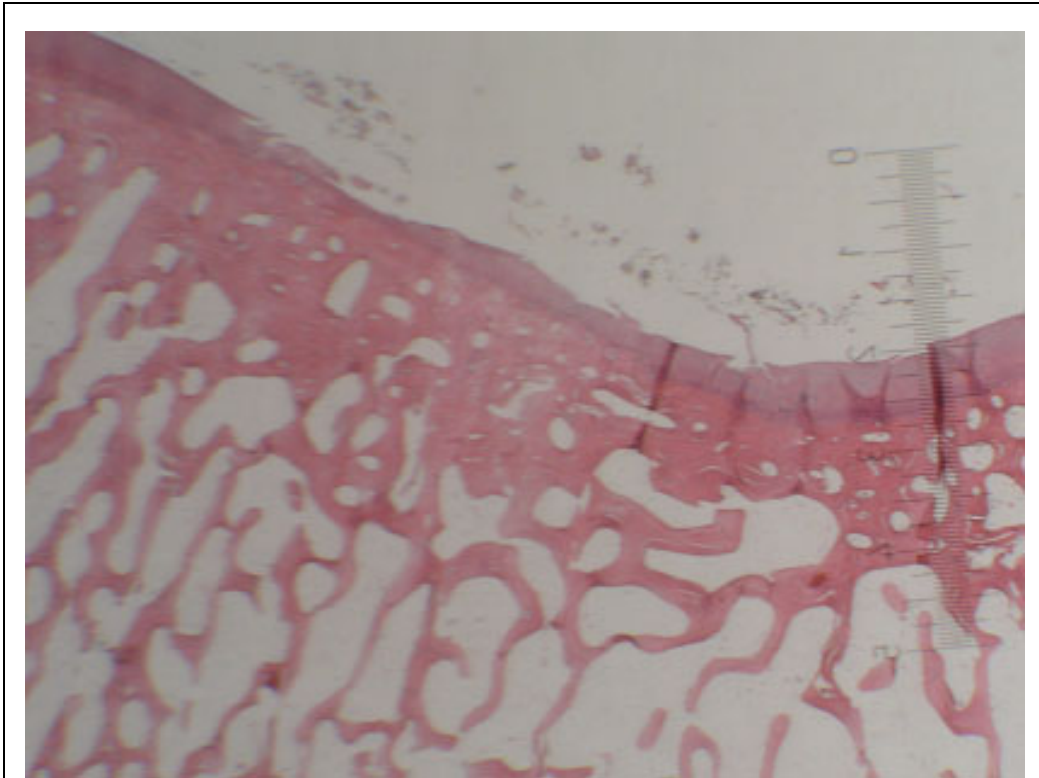


Abb. 15: Defekt des Facies patellaris in HE Färbung.

2.10 Statistische Grundlagen

Die Daten aus den Indentationskurven wurden mit Microsoft® Excel 2000 (Office 2000, Microsoft, USA) erfasst. Die statistische Analyse erfolgte mit Winstat® für Microsoft® Excel (R Fitch Software, Deutschland). Hierbei konnten verschiedene Fragen berücksichtigt werden:

1. Gibt es statistisch relevante regionale Unterschiede zwischen Condylus medialis und Facies patellae femoris?
2. Wie fällt der Vergleich zwischen gesundem Knorpel der Referenzpunkte und der Ersatzgewebe der behandelten Defekte hinsichtlich Knorpeldicke und biomechanischer Eigenschaften aus (Statistische Testung durch den Wilcoxon Test für abhängige Stichproben)?

3. Ist das Ersatzgewebe behandelter Defekte hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften und Knorpeldicke besser als das Gewebe unbehalteter Defekte (Statistische Testung durch den Wilcoxon Test für abhängige Stichproben)?
4. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich Biomechanik und Knorpeldicke (Test U-Test nach Mann-Whitney für unabhängige Stichproben)?

3 Ergebnisse

Nach Beurteilung der makroskopischen Verwertbarkeit der Ergebnisse nach den Kriterien der ICRS erfolgte die statistische Auswertung anhand der Fragestellungen. Für den Gruppenvergleich muss angemerkt werden, dass aufgrund der kleinen Gruppengrößen ($n = 1 - 6$) sich allenfalls Tendenzen herausfinden lassen, auch wenn einzelne Tests innerhalb der Behandlungsgruppen sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$) zeigen. Für die grafische Illustration der Ergebnisse wurden Box-Whisker-Plots gewählt, die sich durch eine übersichtliche Darstellung statistisch relevanter Werte auszeichnet. Um einen Vergleich zu ermöglichen wurden auch Gruppengrößen $n < 2$ graphisch dargestellt. Sie gingen in der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen allerdings nicht in die statistische Testung ein.

Wie bereits erwähnt wurden für den „25s Kriechindex“ Werte kleiner 0,02 mm/mm aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen, genauso wurden Werte größer 15 MPa beim E-Modul ausgeschlossen. Diese Werte repräsentieren vermutlich keinen Knorpel oder Ersatzgewebe sondern den darunter liegenden subchondralen Knochen. Die Einzelergebnisse der Messungen finden sich in den Tabellen im Anhang.

3.1 Makroskopische Beobachtung


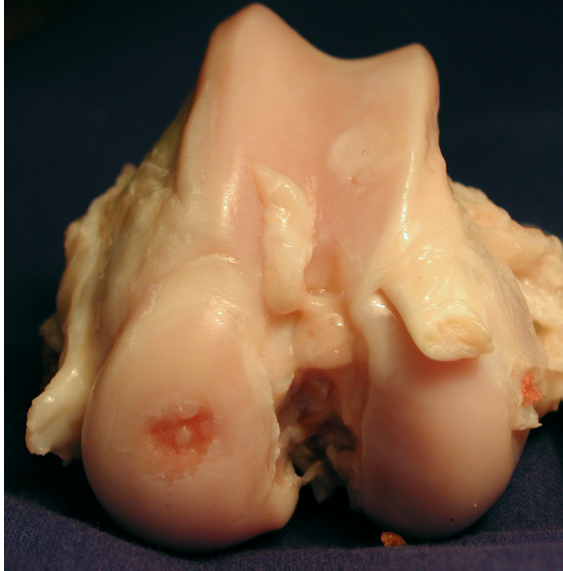
Die angewandten Behandlungsmethoden waren bei der Auswertung dem Untersucher durch einfache Verblindung nicht bekannt. Weder in den behandelten noch in den unbehandelten Gelenken konnten Zeichen der Osteoarthritis wie Osteophyten, Erosionen oder synoviale Hyperproliferationen außerhalb der Defekte gefunden werden. Es zeigte sich in einigen Gelenken eine leichte Synovitis, sowie vermehrte Gelenkflüssigkeit. Diese Zeichen einer entzündlichen Reaktion ließen sich aber keiner Behandlungsmethode gehäuft zuordnen.

Insgesamt zeigten die Defekte am Condylus medialis eine schlechtere Ausfüllung mit Ersatzgewebe als die Defekte an der Facies patellaris femoris.

Der makroskopische Aspekt ließ nur einen eingeschränkten Rückschluss auf die angewandte Behandlungsmethode zu. Zum Teil konnten wir hofartige Ersatzgewebeproliferationen finden, die auf eine Behandlung mittels Mikrofrakturierung hindeuteten. Bei diesen Gruppen kam es in einigen Fällen zu ungleichmäßiger Defektfüllung, die im Bereich der Mikrofrakturierung die größte Dicke von neu gebildetem Ersatzgewebe aufwies. Ebenso

erkannte man in einigen Fällen andeutungsweise Vernarbungen, die vermutlich durch die Fixation der Membran durch Einnähen hervorgerufen worden waren.

Die Leerdefekte waren kaum mit Ersatzgewebe ausgefüllt (siehe Abb. 16). Die Kongruenz der Gelenkflächen war diesen Fällen in der Übergangszone zwischen genuinem Knorpel und Defekt makroskopisch unbefriedigend wiederhergestellt. Dies traf zum Teil auch für die behandelten condylären Defekte zu (siehe Abb. 17).

	
<p><i>Abb. 16: Unbehandelter Leerdefekt nach einem Jahr Standzeit. An beiden Defektlokalisationen hat sich praktisch kein Ersatzgewebe gebildet.</i></p>	<p><i>Abb. 17: Behandelter Defekt der Gruppe I (MACT I/III) nach einem Jahr. Der Defekt am Condylus medialis zeigt eine unbefriedigende Ausfüllung mit Ersatzgewebe, der femoropatellare Defekt zeigt eine ausreichende Füllung.</i></p>

3.2 Ergebnisse der Knorpeldickenmessung

Grundsätzlich erfolgte eine Erfassung der Gewebedicke der Defekte der behandelten und unbehandelten Defekte, sowie der Gewebedicke der jeweils in der Umgebung gelegenen dazugehörigen Vergleichsmesspunkte aus genuinem Knorpel. Zusätzlich konnte zwischen den Regionen Facies patellaris femoris und dem Condylus medialis femoris unterschieden werden.

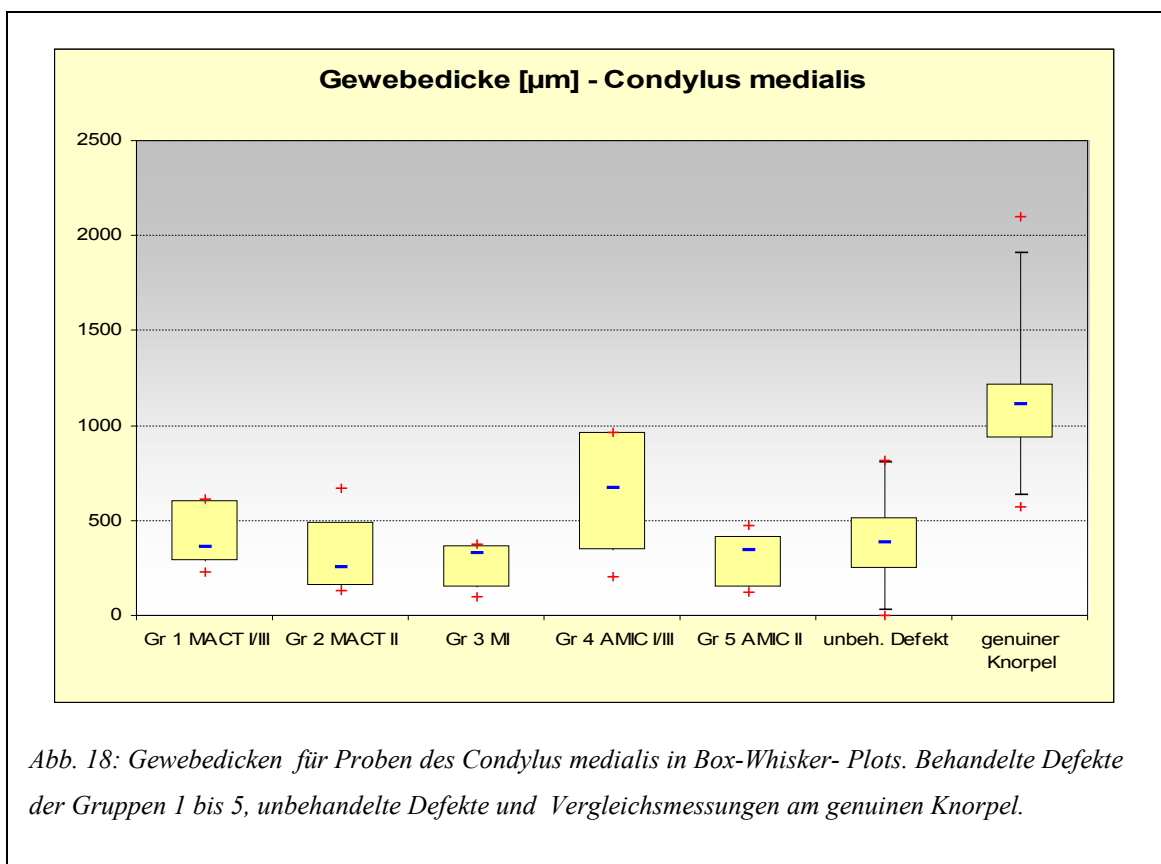
Es fanden sich signifikante regionale Unterschiede zwischen den Gewebedicken des Condylus medialis und denen der Facies patellaris des genuinen Knorpels. Das Ersatzgewebe behandelter Defekte zeigte an beiden Defektlokalisationen signifikant weniger

Ergebnisse

<i>Gewebedicke</i>	<i>Condylus medialis</i>	<i>Facies patellaris femoris</i>
Gesund	1125 ± 290	667 ± 160
Unbehandelt	402 ± 205	212 ± 121
Gruppe 1 (MACT I/III)	410 ± 161	387 ± 178
Gruppe 2 (MACT II)	309 ± 212	304 ± 128
Gruppe 3 (MI)	280 ± 126	268 ± 196
Gruppe 4 (AMIC I/III)	645 ± 308	408 ± 148
Gruppe 5 (AMIC II)	293 ± 144	310 ± 125

Tabelle 2: Mittelwerte der Gewebedicke [μm] mit Standardabweichung für den gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.

Gewebe als an den Vergleichsmesspunkten. An der Facies patellaris wurde tendenziell mehr Gewebedicke gemessen als an den unbehandelten Leerdefekten. Für die Gruppen 1 (MACT Typ I/III) und 4 (AMIC I/III) ist dieses Ergebnis signifikant ($p < 0,05$).



Für die condylären Defekte findet sich nicht signifikant mehr Gewebe als im unbehandelten Defekt. In der Gruppe 4 wurde tendenziell mehr Ersatzgewebe gebildet (siehe Abb. 18). Innerhalb der einzelnen Gruppen finden sich für die behandelten Defekte an der Facies patellaris keine signifikanten Unterschiede. Im Test nach Mann & Whitney lieferten die Ergebnisse der Gewebedicke der behandelten Defekte Gruppe 4 (AMIC I/III) am medialen Condylus signifikant ($p < 0,05$) mehr Gewebedicke als die der Gruppe 5 (AMIC II), ansonsten finden sich keine signifikanten Resultate (siehe auch Abb. 18 und 19).

Zusätzlich fiel auf, dass die Gewebedicken der Ersatzgewebe behandelter Defekte am Condylus medialis und der Facies patellaris ähnlich groß waren (siehe Tabelle 2).

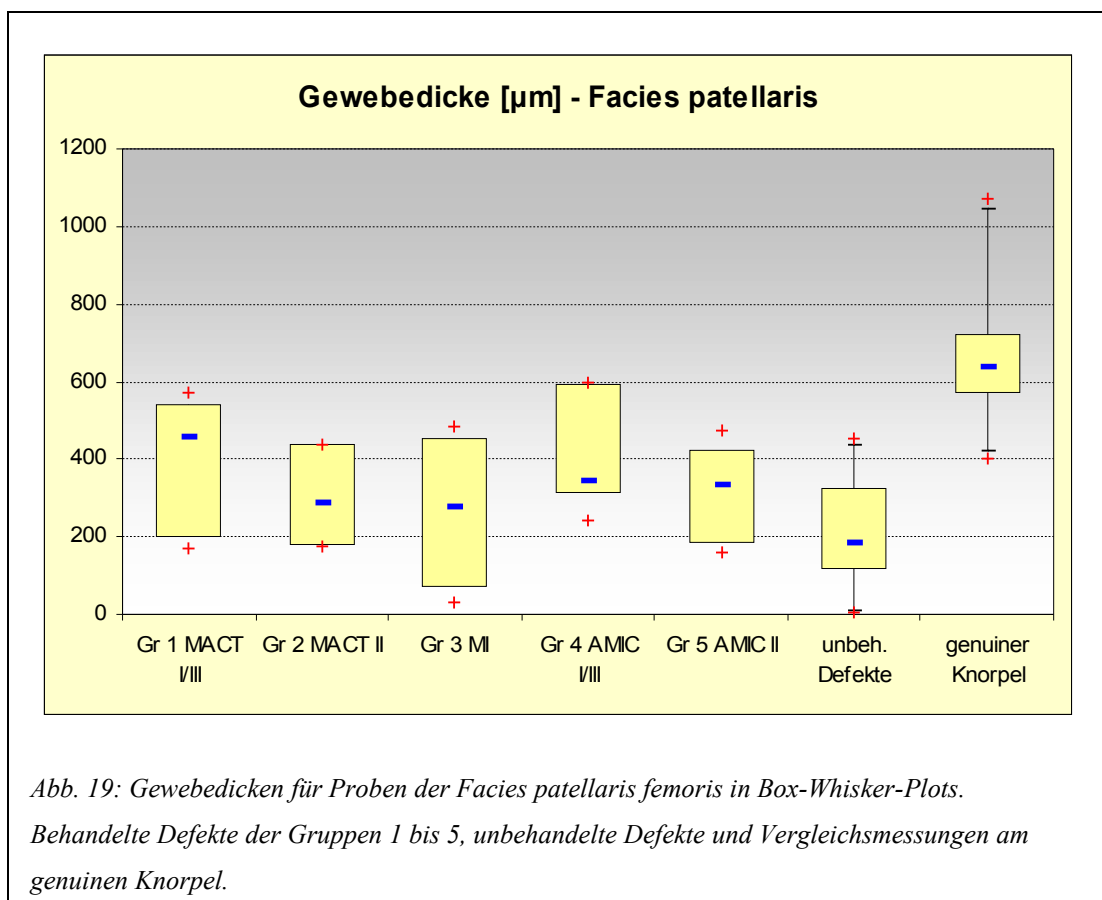


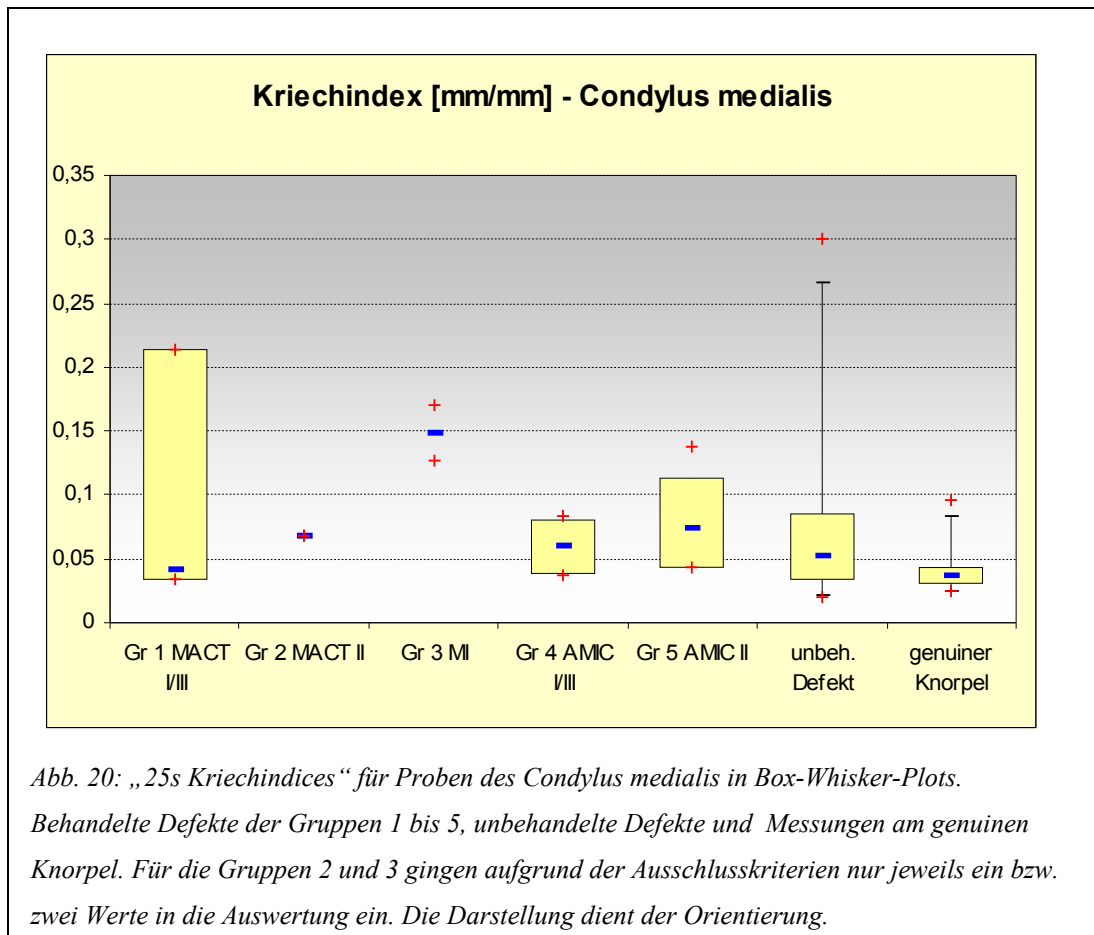
Abb. 19: Gewebedicken für Proben der Facies patellaris femoris in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Vergleichsmessungen am genuinen Knorpel.

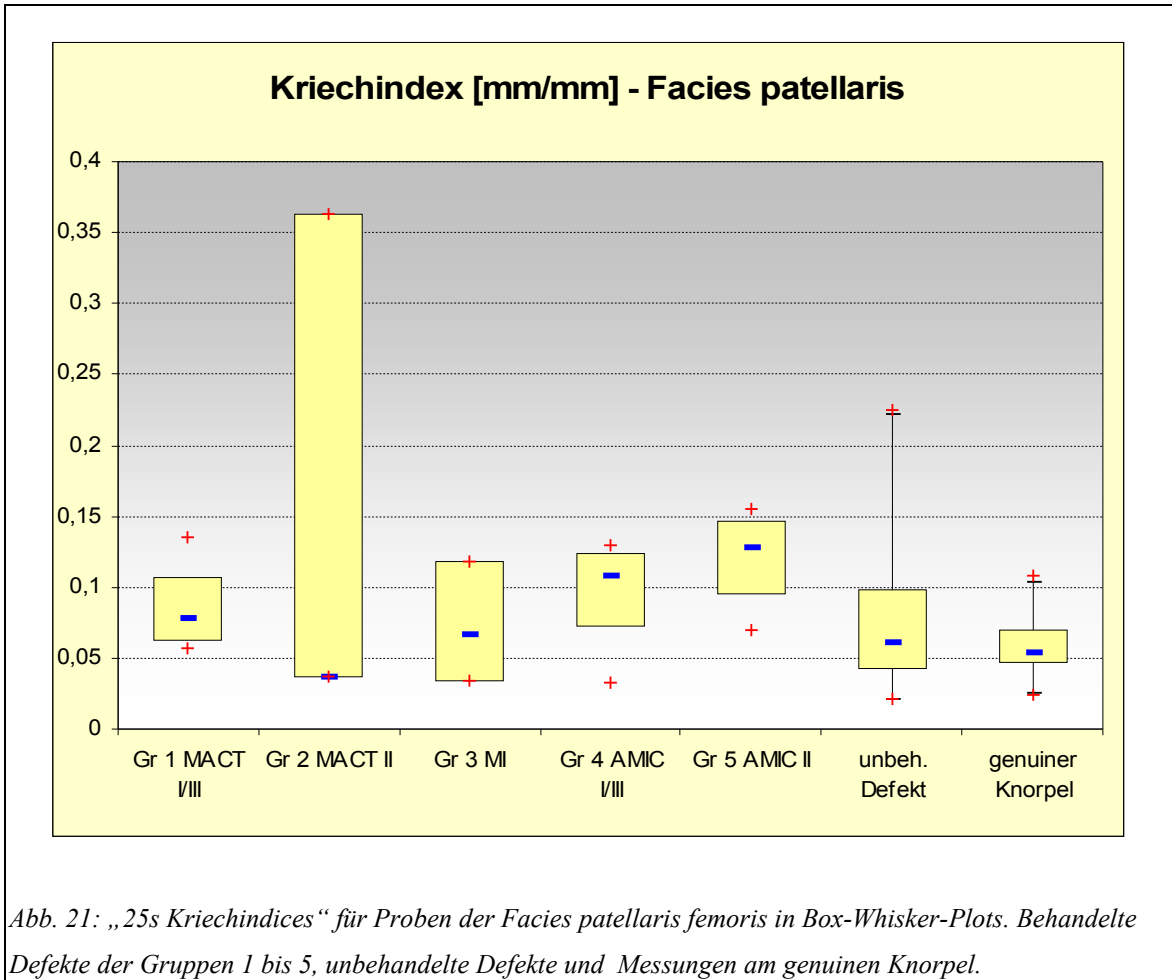
3.3 Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung

3.3.1 „25s Kriechindex“

<i>Kriechindex</i>	<i>Condylus medialis</i>	<i>Fac. patellaris femoris</i>
Gesund	39 ± 15	57 ± 20
Unbehandelt	71 ± 60	79 ± 57
Gruppe 1 (MACT I/III)	96 ± 101	84 ± 30
Gruppe 2 (MACT II)	146 ± 0	146 ± 188
Gruppe 3 (MI)	148 ± 30	73 ± 42
Gruppe 4 (AMIC I/III)	60 ± 20	98 ± 36
Gruppe 5 (AMIC II)	77 ± 39	122 ± 31

Tabelle 3: Mittelwert des „25s Kriechindex“ [$\mu\text{m}/\text{mm}$] mit Standardabweichung für die gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.





Aufgrund der Ausschlusskriterien konnten für die Gruppen 2 (MACT II) und 3 (Mikrofrakturierung) bei den condylären Defekten nur ein bzw. zwei Werte für die statistische Auswertung berücksichtigt werden. Diese beiden Gruppen wurden entsprechend nicht in der statistischen Testung am Condylus medialis berücksichtigt, gingen aber in der graphischen Darstellung für einen orientierenden Vergleich mit ein.

Der genuine Knorpel liefert an den condylären Vergleichsmesspunkten einen niedrigeren Kriechindex entsprechend eines härteren Gewebes als das genuine Knorpelgewebe an der Facies patellaris femoris. Die zusammengefassten unbehandelten Defekte zeigen an beiden Defektlokalisationen eine weite Streubreite.

In der Gegenüberstellung zwischen genuinem Knorpel der Vergleichsmesspunkte und den zusammengefassten behandelten Gruppen findet sich ein signifikant höherer Kriechindex für die behandelten Defekt bei den Proben an der Facies patellaris femoris ($p < 0,002$). Der entsprechende Vergleich der condylären Defekte findet ein deutlich weiches Gewebe beim Ersatzgewebe der behandelten Defekte, allerdings ist dieses Ergebnis statistisch nicht

signifikant (siehe Abb. 20 und 21). Der Vergleich zwischen behandelten und nicht behandelten Defekten liefert keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Defektlokalisationen.

In der Prüfung der einzelnen statistisch auswertbaren Gruppen 1, 4 und 5 der condylären behandelten Defekte gegen den genuinen Knorpel finden sich statistisch signifikant weichere Ersatzgewebe für die Gruppen vier ($p < 0,02$) und fünf ($p < 0,007$), für die Gruppe 1 fällt das Ergebnis nicht statistisch signifikant aus.

Im Vergleich der Werte der durch die Behandlungsmethoden eingeteilten Gruppen an der Facies patellaris femoris ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. In der Testung der einzelnen Gruppen zeigen die Gruppen 4 und 5 signifikant weichere Gewebe als der genuine Knorpel, die anderen Gruppen zeigen die gleiche Tendenz ohne statistische Signifikanz.

Darüber hinaus deutet sich an, dass die Messungen für die Gruppen 3 bis 5 im Vergleich zu den Gruppen mit matrixgekoppelter, autologer Chondrozytentransplantation (Gruppe 1 und 2) ein biomechanisch weicherer Ersatzgewebe findet. Diese Tendenz lässt sich nicht statistisch signifikant testen (siehe Abb. 20 und 21). Zusätzlich deutet sich an, dass die Gruppen 1 und 4 (Verwendung der Kollagen I/III Membran Condro-Gide®) im Vergleich zu der den Gruppen 2 und 5 verwendeten Kollagen Typ II Membran ein tendenziell härteres Gewebe liefern.

3.3.2 Elastizitätsmodul

	Condylus medialis	Facies patellaris femoris
	MPa	MPa
Gesund	2,63 ± 1,86	8,13 ± 3,16
Unbehandelt	5,17 ± 3,58	12 ± 17
Gruppe 1 (MACT I/III)	3,99 ± 0,87	4,25 ± 2,12
Gruppe 2 (MACT II)	7,36 ± 0	4,05 ± 4,84
Gruppe 3 (Mikrofrakturierung)	2,75 ± 3,31	4,18 ± 5,06
Gruppe 4 (AMIC I/III)	3,42 ± 2,17	3,31 ± 2,87
Gruppe 5 (AMIC II)	4,01 ± 3,50	3,01 ± 3,10

Tabelle 4: Mittelwerte des E- Moduls [MPa] mit Standardabweichung für die gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.

Werte größer 15 MPa wurden für den E-Modul ausgeschlossen und gingen als Ausreißer nicht mit in die Auswertung ein.

Für den E-Modul des genuinen Knorpelgewebes findet sich wie beim „25s Kriechindex“ ebenfalls ein signifikanter regionaler Unterschied zwischen dem Condylus medialis und der Facies patellaris, der E-Modul der Facies patellaris ist signifikant höher, was für ein härteres Gewebe spricht.

Im Vergleich sind die behandelten Defekte an der Facies patellaris femoris signifikant weicher als der genuine Knorpel ($p < 0,001$). Auch die unbehandelten Defekte zeichnen sich durch signifikant weichere Eigenschaften als der genuine Knorpel aus (Abb. 22). Im Vergleich der zusammengefassten behandelten gegen die unbehandelten Defekte finden sich keine signifikanten Unterschiede in der statistischen Prüfung.

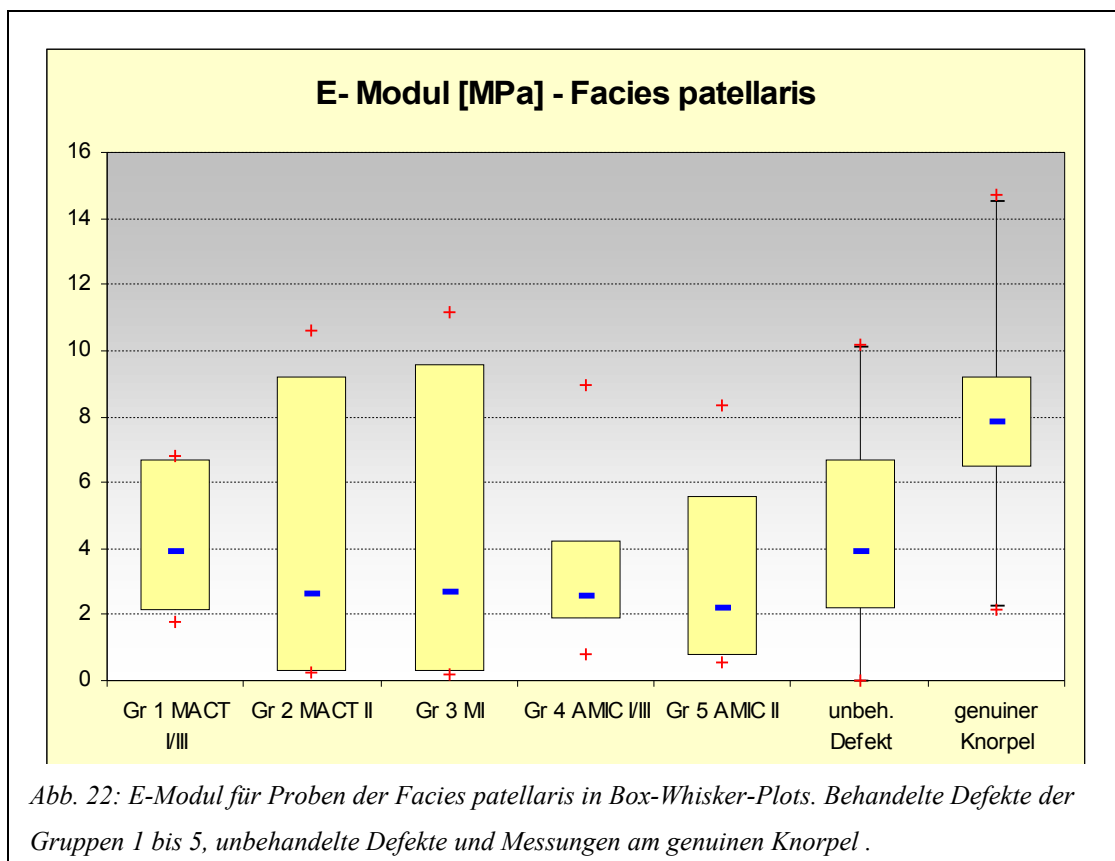
Vergleicht man die einzelnen Gruppen der behandelten Defekte an der Facies patellaris femoris gegen den genuine Knorpel, finden sich außer für die Gruppen 2 und 3 hochsignifikant (Gruppe 1 und 4) bis signifikante (Gruppe 5) niedrigere (weichere) Ergebnisse als für den genuine Knorpel.

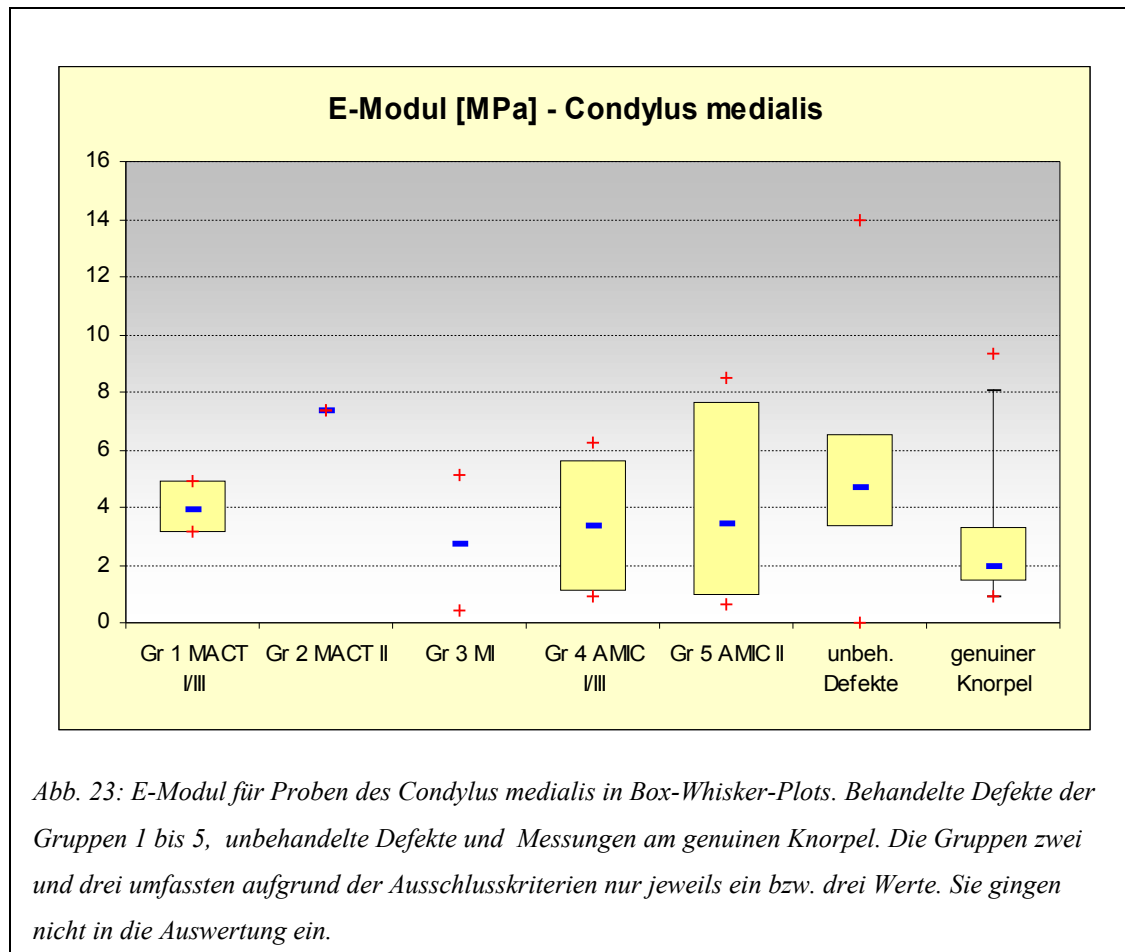
Am Condylus medialis finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen den Ergebnissen der zusammengefassten behandelten Defekte mit denen der unbehandelten Defekte sowie denen des genuinen Knorpels der Vergleichsmesspunkte. (siehe Abb. 23)

Vergleicht man die Gruppen 1, 4 und 5 an dieser Defektlokalisierung untereinander, so lassen sich ebenso wenig statistisch signifikante Ergebnisse prüfen, wie im Vergleich dieser Gruppen gegen den genuinen Knorpel.

In der Untersuchung der einzelnen Gruppen der unterschiedlichen Behandlungsmethoden gegeneinander findet sich in der statistischen Prüfung beider Defektlokalisierungen kein signifikanter Unterschied, es können allenfalls anhand der deskriptiven Statistik Tendenzen entnommen werden. Diese zeigen erneut tendenziell höhere Werte (entsprechend härterer Gewebe) für die Gruppen 1 und 2 (membrangekoppelte autologe Chondrozytentransplantation) im Vergleich zu den Gruppen 4 und 5 (AMIC®). Ebenfalls erkennt man die wie beim „25s Kriechindex“ angedeutete Tendenz für höhere Werte für die Gruppen 1 und 4 mit Verwendung der Kollagen Typ I/III (Chondro-Gide®) im Vergleich zu den Gruppen 2 und 5 (Kollagen Typ II Membran).

Für die unbehandelten Defekte der Facies patellaris femoris sowie für den genuinen Knorpel fallen eine breite Verteilung der Werte auf (siehe Abb. 22). Gleiches findet sich bei den entsprechenden Werten am Condylus mediales.





3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund der Gruppengrößen ist lediglich eine tendenzielle Aussage ohne statistische Signifikanz zulässig.

Im Vergleich der behandelten Defekte gegen den genuinen Knorpel fand sich einheitlich weniger Gewebe, mit biomechanisch weicheren Eigenschaften bei den Ersatzgeweben. Die Ergebnisse der behandelten Defekte übertrafen die der unbehandelten Defekte.

Der Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. In mit Zellen kultivierten Matrices entstand tendenziell biomechanisch härteres Gewebe. An beiden Gelenklokalisationen wurde in den Gruppen 1 (MACI I/III) und 4 (AMIC I/III) die meiste Gewebedicke gebildet. Kongruent wurde in diesen Ersatzgeweben ein biomechanisches Gewebe geschaffen, dass eher den Eigenschaften des genuinen Knorpels nahe kommt. Unter Verwendung der Matrix mit knorpeligenem Kollagen II (Gruppe 2 und 5) entstand weniger Ersatzgewebe mit tendenziell schlechterem Ergebnis.

4 Diskussion

4.1 Methode

In unserem Versuchsaufbau wird am Schafsmodell mittels Indentationsversuch das Ersatzgewebe behandelte, unbehandelte Defekte sowie genuiner Knorpel gegeneinander verglichen. Die von uns angewandte Methode als Weiterentwicklung des nach Russlies et al. (2003) beschriebenen Versuches zeichnet sich durch eine besondere Schonung des Gewebes aus, die, weder gewebeschädigend noch –verbrauchend, eine anschließende histologische Auswertung der gewonnenen Gewebeproben ermöglicht. Ein Vergleich zu den wenigen anderen bisher publizierten biomechanischen Ergebnissen von Gelenkknorpel und Ersatzgeweben ist nur eingeschränkt möglich, da es bisher nur wenige Untersuchungen mit vergleichbarer Methode gibt (Lee et al. 2000).

Gelenkknorpel ist täglich dauerhafter Belastung ausgesetzt, welche bei dynamischer Krafteinwirkung in („instantaneous“) Startdeformation und anschließende fortwährende, kriechende („creep“) Kriechdeformation unterschieden wird. Diese biphasische Funktion des Knorpels ergibt sich aus den biomechanischen Eigenschaften als Resultat von Flüssigkeitsverschiebungen in der molekularen Matrix, welche als Gerüst für die komplexe Reaktion des Knorpels auf Belastung verantwortlich ist (Jurvelin et al 1988). Für die Funktion von Knorpelgewebe spielen beide Parameter eine Rolle. Im aufrechten Gang z. B. kommt nach beginnender Startdeformation durch intermittierende Krafteinwirkung im Verlauf das Kriechverhalten in besonderem Maß zum Tragen. Diese durch die zeitabhängige Messgröße „Kriechindentation“ erfasste Eigenschaft wird in unserer Auswertung auf die histologische Knorpeldicke bezogen. Daraus ergibt sich der „25s Kriechindex“. Hohe Werte für den Kriechindex bedeuten eine schnellere und stärkere Verformung, und somit eine niedrigere Steifigkeit (Russlies et al. 2003).

Die Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften von Knorpel oder eines Ersatzgewebes spiegelt aussagekräftig die Qualität des Gewebes wider. Dies ist im Vergleich verschiedener Behandlungsoptionen von Knorpeldefekten sowie in der Detektion von Frühphasen der Arthrose wichtig (Hayes et al. 1972, Lyyra-Laitinen et al. 1999).

Durch Erweiterung des Versuchsaufbaus zu Russlies et al. (2003) um einen Kraftaufnehmer konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Startdeformation erreicht werden, die letztlich eine Bestimmung des Elastizitätsmoduls erlaubte. Die Anzeige der während des Versuchsdurchganges auf den Indentor einwirkenden Kraft ermöglichte das Erkennen

einer minimalen Berührung der Tastspitze mit der Probe, wodurch ein kontrollierter Start des Versuchsablaufes ermöglicht wurde. Auf die fehlerreiche stereoskopische Einschätzung, ob eine Berührung zwischen Indentor und Gewebeoberfläche bestand, konnte dadurch verzichtet werden.

Durch unseren modifizierten Versuchsaufbau konnte somit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Werte für die Startdeformation zur Errechnung des Elastizitätsmoduls erreicht werden, als ergänzendes Parameter zur Beurteilung der dynamischen Phase der Gewebeeigenschaften.

Die Auswertung zweier voneinander unabhängiger Parameter „25s Kriechindex“ zur Beschreibung konstanter sowie des E-Moduls als Charakteristikum dynamischer biomechanischer Eigenschaften ermöglichte eine genauere Bewertung der untersuchten Gewebe. Dadurch war es möglich, von Knorpelgewebe deutlich abweichende Gewebeeigenschaften zu detektieren, auch wenn diese einen plausiblen Wert im „25s - Kriechindex“ darstellten. Messungen an Stellen mit zu dünnem Gewebe konnten auf diese Weise besser entdeckt werden, und von vornherein aus der Auswertung ausgeschlossen werden.

Die als Ausreißer ausgeschlossenen Werte in unserem Versuchsaufbau könnten möglicherweise durch eine zu große Anpresskraft des federgeführten Wegtasters mit ca. 0,8 N bedingt sein, wenn weiches und dünnes Gewebe untersucht wurde (Köller et al. 2008). In zukünftigen Experimenten zur Messung von Ersatzgeweben erscheint es uns deshalb sinnvoll, auf eine über die Schwerkraft des Indentors hinausgehende Anpresskraft zu verzichten, um eine zu starke Startdeformation bei weichen Geweben zu vermeiden. Dies könnte sich insbesondere für die Bestimmung der Startdeformation von Ersatzgeweben zur Ermittlung des E-Moduls als vorteilhaft erweisen, da auf diese Weise eine genauere Differenzierung der weicheren Gewebe möglich wäre.

Wichtige Voraussetzungen wie eine Erholung durch Wiederausdehnung des Knorpel- oder Ersatzgewebes war durch Pausen zwischen den Versuchsdurchgängen gewährleistet (Köller et al. 2008). Darüber hinaus konnte durch eine unmittelbare Untersuchung nach der Terminierung der Schafe sowie eine ständige Befeuchtung der Proben eine Auswertung erreicht werden, die in vivo Bedingungen nahe kommt. Es konnte so auch auf das Einfrieren der Proben mit dem Risiko einer möglichen Veränderung der biomechanischen Eigenschaften verzichtet werden (Viidik und Lewin 1966).

Im Gegensatz zur Gewebedickenbestimmung der Defektgewebe und des genuinen Knorpels von Russlies et al. (2003) mit zwei angewandten Methoden konnte durch die einheitliche histologische Methode in unserem Versuchsaufbau auf eine einheitliche Dickenbestimmung in der Auswertung zurückgegriffen werden.

Bei der in unserem Versuch durchgeführten Dickebestimmung findet sich dennoch ein systematischer Fehler, da bei der Fixierung der Proben für die histologischen Schnitte eine Schrumpfung des Gewebes auftritt. Dieser muss beim quantitativen Vergleich unserer Ergebnisse zu anderen Studien berücksichtigt werden. Die gemessenen Werte für die Knorpeldicke fielen entsprechend geringer aus als *in vivo*. Da alle Proben durch die gleiche Methode fixiert und präpariert wurden, ist von einem relativ gleichen Fehler auszugehen, der keinen Einfluss auf die Relation der Ergebnisse hat. Für die biomechanischen Parameter Elastizitätsmodul (Kempson et al. 1971) und „25s Kriechindex“ (Russlies et al. 2003) ist dieser Fehler entsprechend analog zu berücksichtigen. Eine genaue Quantifizierung des Fehlers ist aufgrund fehlender Daten nicht möglich.

Die Mittelung der Knorpeldicken erfolgte durch mindestens drei Messungen mit dem Mikroskop. Hierbei wurde in der Mitte des sichtbaren Defektes gemessen, da auch die Indentationsversuche in der Mitte der Defekte durchgeführt wurden. Letztendlich konnte nur zufällig genau an der Stelle der Indentation die Gewebedicke bestimmt werden. Exemplarisch findet sich im Anhang ein Hinweis auf die Einflussgröße der Dicke auf die Auswertung des E – Moduls (siehe Anhang 7.4, Seite 74).

In zukünftigen Experimenten könnte die Messung der Gewebedicke mittels Nadelindentation erfolgen, da hier genau an der Stelle der Kugelindentationsmessung der Knorpel bestimmt werden kann. Eine hierdurch zu erwartende Zerstörung des Gewebes ist nur minimal und beeinträchtigt die anschließende histologische Auswertung der Probe kaum. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Dickenbestimmung angewandt (Wakitani et al. 1994, Lee et al. 2000), stand allerdings zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in unserem Labor nicht zur Verfügung.

Der Vergleich der Ersatzgewebe erfolgte in unserem Versuch mit dem die Defekte umgebenden Gelenknorpel. Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sowohl die behandelten wie auch die unbehandelten Defekte eine Milieuveränderung im Sinne einer anlaufenden Arthrose bewirkten. Dieses könnte auch die Morphologie des umgebenden Knorpels verändern. Zusätzlich ist denkbar, dass die unterschiedlichen Behandlungsme-

thoden einen Einfluss auf den genuinen Knorpel in der Umgebung im gleichen Gelenk hatten. In der Literatur beschrieben Obeid et al. (1994) veränderte biomechanische Eigenschaften eines klinisch, radiologisch und morphologisch gesunden Knorpelgewebes, welches sich in der Umgebung von unikompartimenteller Arthrose befand. Die Untersuchung ergab signifikant dünnere und weichere Gewebeeigenschaften, Kriecheigenschaft und Druckfestigkeit zeigten leicht nachgiebigere Werte.

Die Eigenschaften des in der Umgebung der behandelten und unbehandelten Defekte gelegenen Knorpelgewebes erscheint dennoch für einen qualitativen und quantitativen Vergleich geeignet zu sein, insbesondere durch den Vergleich zu Messungen an unbeeinträchtigten Schafskniegelenken aus Parallelversuchen in unserem Labor, die vergleichbare Werte ergaben (Köller et al. 2008).

Russlies et al. (2003) beschrieben anhand des „25 s Kriechindex“, dass innerhalb der Regionen Condylus medialis und Facies patellaris femoris keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften vorlagen. Darüber hinaus fanden sich innerhalb der Regionen vergleichbare Knorpeldicken beim Gelenknorpel. Somit erscheint ein standardisierter Vergleich mit genuinem Knorpel der gleichen Region, wie in unserem Versuch erfolgt, sinnvoll.

Im Vergleich der Defektlokalisationen am medialen Condylus gegen die Facies patellaris femoris wurde ähnlich viel Defektgewebe nach der Behandlung gebildet, entsprechend den Ergebnissen von Russlies et al. (2003). Dieses könnte möglicherweise die schlechteren Ergebnisse für die Ersatzgewebe am medialen Condylus erklären, da der genuine Gelenknorpel hier etwa anderthalb mal so dick ist. Ein mögliches weiteres Wachstum der Ersatzgewebe konnte aufgrund der fehlenden zeitlichen Verlaufsbeobachtung in unserem Versuchsaufbau nicht überprüft werden.

Möglich erscheint auch, dass aufgrund der weniger tiefen Defekte an der Facies patellaris femoris die Ersatzgewebe dort einer höheren mechanische Beanspruchung ausgesetzt waren, was einen Wachstumsanreiz darstellt. Diskrepant dazu steht die Erkenntnis, dass der mediale Condylus anatomisch bedingt stärkeren Belastungen ausgesetzt ist und somit einen stärkeren Wachstumsanreiz haben müsste.

In einer Studie an 36 Schafen, in der chondrale Defekte von 7 mm mit Rippenperichondrium behandelt wurden, beschrieb Bruns (1992) makroskopisch wie histologisch schlechtere Ergebnisse für Defekte, die in belasteten Regionen des Condylus medialis femoris

gesetzt worden waren. Als mögliche Ursache diskutierte er eine zu hohe mechanische Beanspruchung mit Zerstörung des initial eventuell fragileren Ersatzgewebes an dieser Lokalisation oder auch ein mögliches Ausreißen von eingebrachten Membranen durch Scherbelastung. Ein direkter Hinweis auf ein Ausreißen der Membranen in einzelnen Kniegelenken fand sich nicht, kann aufgrund der biomechanischen Ergebnisse allein natürlich nicht ausgeschlossen werden. Eine Vergleichsmöglichkeit zu vor der Standzeit von einem Jahr untersuchten Tieren war in unserem Versuch nicht vorgesehen, zwei nach ca. sechs Monaten verendete Tiere unterschieden sich makroskopisch nicht von nach einem Jahr untersuchten Tieren. Russlies (2002) konnte bei vorzeitig verendeten Schafen (nach drei, neun und 30 Tagen) in einem vergleichbaren Versuchsaufbau alle Transplantate in situ finden.

4.2 Großtiermodell

Die meisten tierexperimentellen Studien zur Untersuchung von Knorpel und Knorpelersatzgeweben wurden an Kaninchen durchgeführt. Athanasiou et al. (1991) merkten im Vergleich verschiedener Tiermodelle kritisch an, dass der physiologische Krümmungswinkel im Kniegelenk von Kaninchen zum Menschen veränderte biomechanische Eigenschaften aufweise, der den Verhältnissen beim Menschen wenig ähnelt. Bei einem Großtiermodell wie dem Schaf mit geringerer Flexionshaltung fand man eine dem Menschen ähnlichere Belastungssituation. Das Schaf diente folglich in verschiedenen vergleichbaren Experimenten als Untersuchungsobjekt (Bruns 1992, Akens et al. 2001, Siebert et al. 2001, von Rechenberg et al. 2003, Appleyard et al. 2003, Russlies et al. 2003, Oakley et al. 2004).

In unserem Versuch fielen interindividuelle Schwankungen der einzelnen Ergebnisse bis zum Faktor 2 auf. Dieses bestätigt sich aus der Testung von unbehandelten Schafskniegelenken mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau aus unserem Labor (Köller et al. 2008). Außerdem fiel eine intraindividuelle Schwankbreite auf, die einen direkten Links - Rechts - Vergleich innerhalb einzelner Schafe nicht sinnvoll erscheinen ließ. Für die statistische Auswertung erfolgte eine Mittelung durch Zusammenfassung in Gruppen.

Athanasiou et al. (1991) fanden heraus, dass bei den Spezies Mensch, Hund, Affe und Rind der Knorpel am patellaren Gleitlager die geringste Steifigkeit besitzt. Im Vergleich zwischen Condylus medialis und Trochlea patellae konnten diese gefundenen regionalen Unterschiede in unserem Versuch bestätigt werden. Für die Knorpeldicke des genuinen

Knorpels findet sich signifikant mehr Gewebe am medialen Condylus ($p < 0,00001$). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass für den „25s Kriechindex“ an dieser Lokalisation signifikant kleinere Werte ($p < 0,0001$) entsprechend einem steiferen Gewebe vorlagen. Ergänzend findet sich auch für den E-Modul ein signifikant härterer Gelenkknorpel am Condylus medialis ($p < 0,02$).

Aufgrund des Probenumfangs, also der Anzahl der insgesamt in die Auswertung eingegangenen Schafe, kann man die Ergebnisse hinsichtlich der statistischen Aussagefähigkeit eher als Tendenzen auffassen. Es ist möglich, dass die Ergebnisse einen Fehler aufweisen, also aufgrund zu geringer Probenzahlen ein statistisch signifikantes Ergebnis nicht entdeckt werden konnte. Die Ergebnisse können allerdings als Trends aufgefasst werden, und in folgenden Studien als Grundlage dienen.

Eine höhere Probenzahl dieses Grundlagen erforschenden Versuches erscheint aufgrund der entsprechenden Anforderungen des Tierschutzgesetzes weder sinnvoll noch genehmigungsfähig.

4.3 Biomechanische Eigenschaften von Knorpel und Ersatzgewebe

Unsere Studie hatte zum Ziel, verschiedene Optionen der Knorpeldefektbehandlung zu evaluieren. Hierbei wurde eine besondere Gewichtung auf die biomechanische Qualität der erzeugten Ersatzgewebe gelegt, da diese neben der histologischen Differenzierung eine wichtige Aussage über die Belastungsfähigkeit zulassen.

Die Fixationsmethode der Membranen hatte offenbar keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die statistische Bewertung der Ergebnisse lässt die Bevorzugung einer der beiden Methoden nicht zu. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Erkenntnisse (Russlies et al. 2003). Unter Berücksichtigung der „Herausforderung Nahttechnik“ an den Operateur (Bruns 1992) ist gegebenenfalls die Fixierung mittels Fibrinkleber aufgrund der einfacheren Handhabung vorzuziehen. Eine Schädigung des umliegenden Knorpels durch das Nahtmaterial kann zudem so verhindert werden.

Der Vergleich zwischen genuinem Knorpel und Ersatzgewebe anhand biomechanischer Parameter fiel in unserem Versuch eindeutig aus. Das durch unterschiedliche Behandlungsmethoden geschaffene Ersatzgewebe weist eine signifikant niedrigere Steifigkeit als der genuine Knorpel der Vergleichsmesspunkte auf. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen unterschiedliche Studien, die verschiedene Methoden zur biomechanischen Testung

anwandten (Colletti et al. 1972, Wakitani et al. 1994, Frenkel et al. 1997, Lee et al. 2000, Russlies et al. 2003).

Wakitani et al. (1994) konnten im Kaninchen hyalinähnlichen Knorpel nach osteochondralen Defekten gefüllt mit autologen Stammzellen aus dem Knochenmark oder Periost nachweisen. Sie vermuteten biogene Faktoren, die Einfluss auf die Differenzierung der Stammzellen zu Knorpelzellen nahmen. In der biomechanischen Testung gab es ein insgesamt härteres Gewebe für die beiden behandelten Defekte im Vergleich zum weicheren Gewebe der unbehandelten Leerdefekte. Im Vergleich der biomechanischen Qualität zum genuinen Knorpel schnitt das Ersatzgewebe mit weicheren Eigenschaften deutlich schlechter ab.

In einer weiteren Studie an Kaninchen untersuchten Frenkel et al. (1997) die biomechanischen sowie histologischen Eigenschaften von Ersatzgeweben nach osteochondralen Defekten. Eine Gruppe wurde mit einer mit autologen Chondrozyten kultivierten Kollagen Typ 1 Membran behandelt, eine weitere Gruppe mit einer zellfreien Kollagen Typ 1 Membran, eine letzte Gruppe setzte sich aus unbehandelten Defekten als Referenz zusammen. Die Ersatzgewebe waren weniger steif als der genuine Knorpel, innerhalb der Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Ausschließlich unter Berücksichtigung der histologischen Auswertung konnte eine Empfehlung für die Besiedelung der Membran mit autolog kultivierten Zellen gegeben werden, da die hierdurch gebildeten Gewebe einen höheren Gehalt an für hyalinen Knorpel charakteristischen Kollagen Typ 2 enthielten. Anhand unserer Ergebnisse kann keine Empfehlung für eine bestimmte Behandlungsmethode gefunden werden, die sich aus der biomechanischen Auswertung ergibt, da sich keine signifikanten Unterschiede finden. Aufgrund der größeren Gewebedicke der behandelten Defekte ist eine Therapie grundsätzlich zu empfehlen.

In einer ebenso am Kaninchen durchgeführten Studie untersuchten Lee et al. (2000) biomechanische und biochemische Eigenschaften von Knorpelersatzgewebe nach Behandlung von chondralen Defekten. Zwischen der Behandlung Mikrofrakturierung, Mikrofrakturierung in Kombination mit einer Kollagen Typ II Membran und einer mit autologen Chondrozyten besiedelten Kollagen Typ II Membran konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Interessanterweise wurde die Beobachtung gemacht, dass die Gewinnung der Chondrozyten für die autologe Kultivierung einen Effekt auf die biomechanischen Eigenschaften dieses Knorpels hätte. Dieser tritt aber nur innerhalb der ersten

Wochen auf und war im zeitlichen Verlauf nicht mehr nachweisbar, und hätte aufgrund der Standzeit von einem Jahr in unserem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Körpereigene Reparaturmechanismen mittels mesenchymaler Stammzellen zeigten degenerative Veränderungen im Ersatzgewebe nach längerer Zeit. So kam es bei einer Studie an Kniegelenken von Kaninchen ca. 12-24 Wochen nach Anbohrung zu Fibrillationen in einem Ersatzgewebe, dass nach acht Wochen noch eine hyalinartige mikroskopische Erscheinung hatte (Shapiro et al. 1993).

Zusammenfassend zeigt die oben aufgeführte Literatur, dass die biomechanischen Eigenschaften des genuinen Knorpels durch Ersatzgewebe noch lange nicht generiert werden können, was auch unsere Ergebnisse eindeutig belegen. Für das nähere Verständnis der Knorpelersatzgewebe scheint ein längerer Beobachtungszeitraum wie in unserem Versuchsaufbau mit einer Standzeit von mindestens einem Jahr von deutlichem Vorteil. Die zum Teil ermutigenden Ergebnissen aus in erster Linie histologischen Untersuchungen von Knorpelersatzgeweben zeigten im zeitlichen Verlauf eine Tendenz zur Degeneration. Ein längerer Zeitraum zur Verlaufsbeobachtung wäre für folgende Versuche somit unabdingbar.

In der dieser Studie vorausgehenden Untersuchung aus unserem Labor von Russlies et al. (2003) an Schafskniegelenken fand sich ebenfalls ein signifikant weiches Ersatzgewebe, welches durch klassische Autologe Chondrozyten Transplantation mit Periostdeckung, eine Kollagen I/III Membran in Kombination mit autologen Chondrozyten (genäht oder geklebt) oder einer Kollagen II Membran in Kombination mit Zellen geschaffen worden war. Nach einem Jahr Standzeit erfolgte die Auswertung des „25s Kriechindex“. Eine selbst hergestellte Kollagen Typ II Membran ähnlich der in unserem Versuch verwendeten lieferte tendenziell weichere Werte als das durch die anderen Methoden geschaffene Gewebe, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Durch zusätzliche Untersuchung der Mikrofrakturierung sowie der AMIC Technik in unserem Versuchsaufbau konnte eine wichtige Erweiterung und ein Vergleich zu klinisch relevanten Therapieoptionen erreicht werden. Die nur einen operativen Eingriff erfordernde AMIC Technik und Mikrofrakturierung gibt es aus ökonomischen Gesichtspunkten einen Vorteil für diese Methoden durch geringere Operationskosten, mit gleichwertigen Ergebnissen. In einer Wirtschaftlichkeitsanalyse konnten Clar et al. (2005) keine Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisqualität im Vergleich der Autologen Chondrocyten Trans-

plantation (sowohl als ACT als auch MACI), der Mikrofrakturierung oder der Mosaikplastik finden. Ein möglicher Vorteil der ACT/MACI - Technik aufgrund besserer histologischer Ergebnisse und theoretisch längerer Haltbarkeit könnte durch weitere Studien mit Langzeitbeobachtung gefunden werden.

Eine systematische Übersichtsauswertung der Cochrane Datenbank durch Wasiaik et al. (2006) zu unterschiedlichen Behandlungsoptionen von Knorpeldefekten konnten lediglich vier klinische Studien in Ihre Auswertung einbeziehen, ohne einen signifikanten Vorteil für eine der untersuchten Methoden zu finden.

Die viel diskutierte Studie am Menschen (Knutsen et al 2004, Knutsen et al. 2007) zum Vergleich zwischen ACT und Mikrofrakturierung konnte im klinischen Score nach zwei sowie nach fünf Jahren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede finden.

Der Vergleich der verschiedenen verwendeten Kollagenmembranen in unserem Versuch führte zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis. Es konnten lediglich Tendenzen festgestellt werden, dass die Verwendung der Membran von Kollagen II ein biomechanisch vergleichsweise schlechtes Gewebe erzeugte. Diese Tendenz war auch bei Russlies et al. (2003) gefunden worden.

Kollagenmembranen vom Typ I verglichen gegen Membranen vom Typ II in einer Studie am Kaninchen (Buma et al. 2003) zeigten nach vier Wochen bessere Ergebnisse durch mehr nachweisbare Zellen bei der Kollagen I Membran. Nach zwölf Wochen Standzeit waren keine Unterschiede zwischen den beiden Kollagenmembran Typen mehr nachweisbar. Diskutiert wird die proinflammatorische Wirkung des Kollagen 2, die durch Injektion im Tiermodell Arthritis erzeugt (Bendele et al. 1999).

Unsere Ergebnisse unterstreichen in diesem Kontext die Notwendigkeit biomechanischer Untersuchungen, um Aussagen über die funktionellen Eigenschaften von Ersatzgeweben treffen zu können.

Bei der Reparatur von Knorpeldefekten kommt es zur Bildung von Faserknorpel und hyalinartigem Knorpel. Beide haben in ihren biomechanischen Eigenschaften deutliche Nachteile gegenüber genuinem Knorpelgewebe. Dies ist vornehmlich auf die unterschiedliche biochemische Zusammensetzung von Kollagen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen zurückzuführen.

In unserem Versuch brachten die Gruppen der mit autologen Chondrozyten kombinierten Kollagenmembranen in der Tendenz etwas bessere (biomechanisch härtere) Eigenschaften hervor als die Kombination einer Mikrofrakturierung mit der Kollagenmembranen ohne Zellen. Dies bestätigt die allgemein vorherrschende Meinung der Bildung von faserknorpeligen, entsprechend biomechanisch weicheren Geweben durch Mikrofrakturierung. Die histologische Auswertung wird eine wichtige Ergänzung der Ergebnisse aus der biomechanischen Testung liefern.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse im Vergleich der verschiedenen Behandlungsmethoden von lokalisierten Knorpeldefekten in unserem Versuch lassen keine eindeutige Empfehlung für eine bestimmte Behandlungsmethode zu. Die Ergebnisse aus unseren Versuchen müssen aufgrund der niedrigen Stückzahlen statistisch als Tendenzen, nicht als Ergebnisse mit Signifikanz aufgefasst werden.

Die Tatsache, dass sich keine Methode im direkten Vergleich deutlich von den anderen absetzen konnte, erscheint vor dem Hintergrund immer wichtiger werdenden ökonomischer Faktoren eine besondere Bedeutung zu haben. Die deutlichen Kostenunterschiede der einzelnen Behandlungsmethoden heben unter Berücksichtigung histologischer und klinischer Ergebnisse anderer Studien den Stellenwert der Mikrofrakturierung als preiswertere Methode mit geringerem zeitlichem Aufwand hervor, die auch in Kombination mit einer Kollagenmatrix gute Ergebnisse liefert. Die Verwendung einer Kollagenmatrix mit überwiegend Kollagen Typ II brachte nicht den erhofften Vorteil der Bildung eines besseren Ersatzgewebes gegenüber der bekannten Kollagen Typ I/III Matrix.

Ein biomechanischer Versuchsaufbau ist unerlässlich um Aussagen über funktionelle Eigenschaften wie der Belastbarkeit und somit Widerstandsfähigkeit der entstandenen Knorpelersatzgewebe zu treffen.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung von Knorpelschäden stellt bis heute eine große Herausforderung dar. Der Einsatz autolog gezüchteter Chondrozyten hat die Knorpeldefektbehandlung in den vergangenen Jahren beeinflusst, ebenso körpereigene Reparationsfähigkeit mithilfe mesenchymaler Stammzellen. Die vorliegende Studie evaluiert Knorpelersatzgewebe verschiedener Behandlungsmethoden hinsichtlich ihrer biomechanischen Qualität. Hierbei werden insbesondere Mikrofrakturierung mit und ohne Kollagenmembran und autologe matrixgekoppelte Chondrozytentransplantation am Schafsmodell verglichen.

Material und Methoden: Es wurden chondrale Defekte von 7 mm Durchmesser jeweils am medialen Femurcondylus und an der Facies patellaris femoris beider Kniegelenke gesetzt, welche mit fünf verschiedenen Methoden am linken Kniegelenk behandelt wurden. Die rechte Seite diente mit unbehandelten Defekten als Kontrolle, unbeschädigtes Knorpelgewebe in der Umgebung der Defekte als Normalkontrolle. Gruppe 1: mit Zellen beladene Kollagen I/III Membran; Gruppe 2: mit Zellen kultivierte Kollagen II Membran; Gruppe 3: Mikrofrakturierung; Gruppe 4: Mikrofrakturierung gedeckt mit Kollagen I/III Membran (ohne Zellen); Gruppe 5: Mikrofrakturierung gedeckt mit Kollagen II Membran. Die Membranen wurden entweder in den Defekt genäht, oder mit Fibrinkleber fixiert.

Die Untersuchung fand nach einem Jahr Standzeit statt. Die biomechanische Prüfung erfolgte durch Einsatz eines Indentationsversuches mit kugeligem Indentor. Durch Auswertung des Indentationsverhaltens von Start- und Kriechdeformation unter Berücksichtigung der Gewebedicke ergab sich der „25s Kriechindex“ sowie der Elastizitätsmodul.

Ergebnisse: Die Knorpelersatzgewebe war deutlich weicher als der genuine Knorpel. Die behandelten Defekte an der Facies patellae bildeten mehr Gewebe als die unbehandelten Defekte. Die biomechanische Evaluierung der verschiedenen Behandlungsgruppen konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigen. Tendenziell lieferten die Gruppen der mit Zellen kultivierten Kollagenmembranen härteres Gewebe. Es fand sich kein Unterschied zwischen den angewandten Fixierungsmethoden (genäht oder geklebt). Die Verwendung einer überwiegend aus Kollagen Typ II bestehenden Membran ergab tendenziell schlechtere Ergebnisse als die handelsübliche Kollagen Typ I/III Membran.

Mit Behandlung von Knorpeldefekten wird deutlich besseres Ersatzgewebe geschaffen als ohne, genuiner Knorpel entsteht nicht. Mikrofrakturierung (mit Kollagen I/III Membran) stellt eine ökonomisch sinnvolle Behandlungsoption dar.

6 Literaturverzeichnis

- Akens M, von Rechenberg B, Bittmann P, Nadler D, Zlinszky K, Auer J: Long term in vivo studies of a photo-oxidized bovine osteochondral transplant in sheep. *BMC Musculoskeletal disorders* (2), 9-22 (2001)
- Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC: Interspecies comparison of in situ intrinsic mechanical Properties of distalfemoral cartilage. *J Orthop Res* (9), 330 – 340, (1991)
- Appleyard RC, Burkhardt D, Ghosh P, Read R, Cake M, Swain MV, Murrell GAC: Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 11, 65-77 (2003)
- Bailey RW, Habel DW: The fate o surgically created osteochondral fractures in adult and young dogs. *Surg Forum* 11, 438-440 (1960)
- Bartlett W, Skinner J, Gooding C, Carrington R, Flanagan A, Briggs T, Bentley G: Autologous chondrocyte Implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 87-B, 640-645 (2005)
- Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plotz W: Neues Therapieverfahren für lokalisierte Knorpeldefekte. Ermutigende Resultate mit der autologen Chondrozytenimplantation. *MMW Fortschr Med* 141(45),49-51 (1999)
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Errgelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenauer J, Nehrer S, Niethard FU, Nth U, Perka C, Richter W, Schäfer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K: Indikations- und Durchführungsempfehlung der Arbeitsgemeinschaft „ Geweberegeneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop* 142, 529-539 (2004)
- Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M: Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* 13 (3), 194-202, (2006)
- Bendele A, Mc Comb J, Gould T, Mc Abee T, Sennello G, Chlipala E, Guy M: Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol*, 27, 134-142, (1999)
- Breinan HA, Hsu HP, Spector M: Experimental models of cartilage repair: Condral defects in animal models. *Clin Orthop Res*, 219-230 (2001)
- Brittberg M, Lindahl A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331, 889-895 (1994)

- Brittberg M, Tallheden T, Sjörgren- Jansson E, Lindahl A, Peterson L: Autologous Chondrocytes Used for articular cartilage repair. An update. Clin Orthop Res, 337-348 (2001)
- Bruns J: In vitro und in vivo Untersuchung zur Perichondriumtransplantation beim Schaf zur Behebung von tiefreichenden Knorpeldefekten. In: Gebhardt C: Fibrinklebung in der Allgemein- und Unfallchirurgie, Orthopädie, Kinder- und Thoraxchirurgie, 87-197, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, (1992)
- Bruns J, Steinhagen J: Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Orthopädie 28, 52-60 (1999)
- Buckwalter JA, Rosenberg LC: Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Electron Microsc Rev 1 (1), 87-112 (1988)
- Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. J Bone Joint Surg Am 79, 600-611 (1997)
- Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: part II: Degeneration, and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. J Bone Joint Surg (79-A), 612-632 (1997)
- Buma P, Pieper JS, van Tienen T, van Susante J, van der Kran P, Veerkamp J, van den Berg W, Veth R, Kuppevelt T: Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects- A study in rabbits. Biomaterials 24, 3250-3263 (2003)
- Calandruccio RA, Gilmer WS: Proliferation, regeneration and repair of articular cartilage of immature animals. J Bone Surg Am (44), 431-455 (1962)
- Clar C, Cummins E, McIntyre L, Thomas S, Lamb J, Bain L, Jobantupra P, Waugh N: Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess 9 (47). iii-iv, ix-x, 1-82 Review (2005)
- Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE: Repair of articular Defects: Part II. Treatment Options. Am J Orthop 28 (2), 88-96 (1999)
- Coletti JM, Akeson WH, Woo SL-Y: A comparison of the physical behaviour of normal cartilage and the athroplasty surface. J Bone Joint Surg (Am) 54, 147-160 (1972)
- Convery FR, Akeson WH, Keown GH: The repair of large osteochondral defects: a experimental study in horses. Clin Orthop 82, 253 (1972)
- DIN 53456: Prüfung von Kunststoffen – Härteprüfung durch Eindruckversuch: (Januar 1973) (zurückgezogen vom Normenausschuss)
- DIN EN ISO 2039-1: Kunststoffe – Bestimmung der Härte – Teil 1, Kugeleindruckversuch (ISO 2039-1: 2001) Deutsche Fassung EN ISO 2039-1: (Juni 2003)

- Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S: Repair of articular cartilage defects by microfracture an a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 26, 3617-3629 (2005)
- Erggelet C, Mandelbaum B, Lahm A: Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe – Klinische Grundlagen. *Z Sportmed* 51 (2), 48-54 (2000)
- Fassbender HG: Pathogenetische Aspekte der Arthrose und ihre therapeutischen Aspekte. *Z Rheumatol* 50, Suppl 1, 65-68 (1991)
- Frenkel SR, Chen GG, McCord G, Macon N, Morris E: The effect of BMP-2 in a collagen bilayer implant for articular cartilage repair in a rabbit model. *Trans Soc Biomat*, 22-24 (1997)
- Fuß M, Ehlers EM, Rohwedel J, Russlies M, Kühnel W, Behrens P: Characteristics of human chondrocytes, osteoplasts and fibroblasts seeded onto a I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat* 182, 563-564 (2000)
- Gille J, Ehlers EM, Okroi M, Russlies M, Behrens P: Apoptotic chondrocyte death in cell-matrix biocomposites used in autologous chondrocyte transplantation. *Ann Anat* 184(4), 325-332 (2002)
- Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, Cannon SR, Briggs TW: The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee*, 11(1), 51-55 (2004)
- Ham AW: A histological study of the early phase of bone repair. *J Bone Joint Surg* 12, 827 (1930)
- Hayes WC, Keer LM, Herrmann G, Mockros LF: A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *J Biomech* 5, 541-551 (1972)
- Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Van der Linden AJ: Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 72 : 1003-1007 (1990)
- Hori RY, Mockros RF: Indentation tests of human articular cartilage. *J Biomech* 9(4), 259-268 (1976)
- Jurvelin J, Kiviranta I, Arokoski J, Tammi M, Helminen HJ: Indentation study of the biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *Eng Med* 16(1), 15-22 (1987)
- Jurvelin J, Saamanen AM, Arokoski J, Helminen HJ, Kiviranta I, Tammi M: Biomechanical properties of the canine knee articular cartilage as related to matrix proteoglycans and collagen. *Eng Med*: 17(4), 157-162 (1988)

- Kempson GE, Freeman MAR, Swanson SAV: The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. *J Biomech.* 4, 239-250 (1971)
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O: Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(3), 455-64 (2004)
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen T, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O: A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89 – A, 2105- 2112 (2007)
- Knutson K, Lindstrand A, Lidgren L: Survival of knee arthroplasties. A nation-wide multicentre investigation of 8000 cases. *J Bone Joint Surg (br)* 68, 795-803 (1986)
- Köller W, Kunow J, Ostermeyer O, Stomberg P, Boos C, Russlies M: A simple measuring device for laboratory indentation tests on cartilage. *Biomed Tech* 53, 59-64 (2008)
- Korkala O, Kuokkanen H: Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *Arch Orthop Trauma Surg* 114, 253-256 (1995)
- Krakovits G: Die Elastizität der Gelenkknorpel. *Anat Anz* 124, 113-119 (1969)
- Laasanen MS, Töyräs J, Korhonen RK, Rieppo J, Saarakkala S, Nieminen MT, Hirvonen J, Jurvelin JS: Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* 40, 133-140 (2003)
- Leonhardt H: Binde- und Stützgewebe. In : Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Band 3, 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1990)
- Lee CR, Grodzynski JA, Hsu HP, Martin DS, Spector M: Effect of harvest an selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res* 2000, 18 (5), 790-799 (2000)
- Lin PP, Buckwalter JA, Olmstead M, Caterson B: Expression of proteoglycan epitopes in articular cartilage repair tissue. *Iowa Orthop J*, 18, 12-18 (1998)
- Lyyra T, Kiviranta I, Vaatainen U, Helminen HJ, Jurvelin JS: In vivo characterization of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee. *J Biomed Mater Res* 48(4), 482-487 (1999)
- Lyyra-Laitinen T, Niinimäki M, Toyraas J, Lindgreen R, Kivirantal , Jurvelin JS: Optimization of the arthroscopic indentation instrument for the measurement of thin cartilage stiffness. *Phys Med Biol* 44, 2511-2524 (1999)

- Mankin H, Mow V, Buckwalter J: Form and function of articular cartilage. In: Simon S (Hrsg.) Orthopaedic basic science. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1-44 (1994)
- Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loreti I: Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10(3), 154-9 (2002)
- Metz J: Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. In: Erggelet, M. Steinwachs: Gelenkknorpeldefekte. 1. Aufl., 4-13, Steinkopf, Darmstadt, (2001)
- Mitchell N, Shephard N: The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg (Am)* 58, 230-233 (1976)
- Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG: Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression : Theory and experiments. *J Biomech Eng* 102, 73 – 84 (1980)
- Mow VC, Holmes MH, Lai WM: Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech.* Vol 17 (5):377-394 (1984)
- Mow VC, Newton PM, Grelsamer RP: Biomechanics of articular cartilage and meniscus. In: Fu FH, Harner CD, Vince KG: *Knee surgery*, 101-130, Williams & Wilkins, Baltimore, 1992
- Niedermann B, Boe S, Lauritzen J, Rubak JM: Glued periosteal grafts in the knee. *Acta Orthop Scand* 56, 457-460 (1985)
- Oakley SP, Lassere MN, Portek I, Szomor Z, Ghosh P, Kirkham BW, Murrell GAC, Wulf S, Appleyard RC: Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12(8), 667-679 (2004)
- Obeid EM, Adams MA, Newman JH: Mechanical properties of cartilage in knees with unicompartmental osteoarthritis. *J Bone Joint Surg (Br.)* 76 (2), 315-319 (1994)
- O'Driscoll SW, Salter RB: The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autograft under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg (Am)* 70, 595-606 (1988)
- O'Driscoll SW, Recklies AD, Poole AR: Chondrogenesis in periosteal explants. *J Bone Joint Surg (Am)* 76, 1042-1051 (1994)
- Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, Sittinger M, Schultz O: Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J Biomed Mater Res.* 49(3), 305-11 (2000)

- Peterson L, Menche D, Grande D: Chondrocyte transplantation – an experimental model in the rabbit. In: Transactions from the 30th Annual Orthopedic Research Society, Atlanta, February 7-9. Palatine, III: Orthopedic Research Society (1984), 218 Abstract
- Peterson L: Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthopaedica Belgica* 62, Suppl. I (1996)
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A: Two to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374, 212-234 (2000)
- Pridie KH: A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg (Br)* 41, 618-619 (1959)
- Rand JA, Illstrup DM: Survivorship analysis of total knee arthroplasty. Cumulative rates of 9200 total knee arthroplasties. *J Bone Joint Surg* 73-A, 397-409 (1991)
- Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Robert S: Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am Br* 81-B, 1064-1068 (1999)
- Roughley PJ, Lee ER: Cartilage Proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994, 28, 385-397 (1994)
- Rubak JM, Poussa M, Ritsilä V: Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop Scand* 53, 181-186 (1982)
- Rudert M, Wirth CJ: Knorpelregeneration und Knorpelersatz. *Orthopädie* 27, 309-321 (1998)
- Russlies M, Behrens P, Wunsch L, Gille J, Ehlers EM: A cell-seeded biocomposite for cartilage repair. *Ann Anat* 184(4), 317-323 (2002)
- Russlies M: Entwicklung und Evaluation unterschiedlicher Verfahren zur Knorpeldefekt-Therapie im Schafmodell. *Med. Habil. Schr. Lübeck* (2002)
- Russlies M, Rütger P, Köller W, Stomberg P, Behrens P: Biomechanische Eigenschaften von Knorpelersatzgewebe nach verschiedenen Methoden der Knorpeldefektbehandlung beim Schaf. *Z Orthop* 141, 465-471 (2003)
- Schäfer D, Seidel J, Martin I, Jundt G, Heberer M, Grozinsky A, Vunjak-Novakovic G, Freed L: Engineering und Charakterisierung von funktionalem osteochondralem Ersatzgewebe. *Orthopäde* (33): 721-726 (2004)
- Schumacher J, Russlies M, Eichler W, Grossherr M, Klotz KF: Comparison of three sedation regimes for spinal anesthesia in sheep. *Lab animal* 30, 40-44 (2001)
- Shapiro F, Koide S, Glimcher M: Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 75A (4), 532 – 553 (1993)

- Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C: Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten – Tierexperimentelle Untersuchung an einem Schafmodell. *Z Orthop* 139, 382-386 (2001)
- Sittinger M: Tissue engineering: artificial tissue replacement containing vital components. *Laryngorhinootologie* 74, 695-699 (1995)
- Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J: Resorbable Polyesters in Cartilage engineering: Affinity and Biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mat Res* 33, 57-63 (1996)
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ: Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopädie*, 28, 26-32 (1999)
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK: Microfracture to treat full-thickness defects: surgical technique, rehabilitation and outcomes. *J Knee Surg.* 15, 170-176 (2002)
- Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG: Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19(5), 477-484 (2003)
- Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA: Evaluation of the repair process of cartilage defects in the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *Am J Vet Res* 47, 2637 (1986)
- Viidik A, Lewin T: Changes in tensile strength characteristics and histology of rabbit ligaments induced by different modes of postmortal storage. *Acta Orthop Scand* 37, 141-155 (1966)
- von Rechenberg B, Akens MK, Nadler D, Bittmann P, Zlinszky K, Kutter A, Poole AR, Auer JA: Changes in subchondral bone in cartilage resurfacing-an experimental study in sheep using different types of osteochondral grafts. *Osteoarthritis Cartilage* 11(4), 265-277 (2003)
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 76, 597 (1994)
- Wasiak J, Clar C, Villanueva E: Autologous cartilage implantation for full-thickness articular cartilage defects on the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, CD003323 (2006)
- Waters NE: The indentation of thin rubber sheets by spherical indentors. *Br. J. appl. Phys.* Vol. 16, 557-563 (1965)

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Schichten des hyalinen Gelenkknorpels (nach Mow et al. 1992).....	6
Abb. 2: Charakteristische Anordnung der Knorpelzellen in den Schichten (nach Mow et al. 1992).	7
Abb. 3: Schematische Darstellung des Kriechverhaltens. Charakteristischerweise kommt es erst zu einer frühen Startdeformation, die dann in eine annähernd lineare Kriechdeformation übergeht. (eigene Abb.).....	9
Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Chondro-Gide® Membran.....	24
Abb. 5: Stärkere Vergrößerung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme der Chondro-Gide® Membran.....	25
Abb. 6: Kultur der autolog gewonnenen Chondrozyten.....	26
Abb. 7: Defekte der Facies patellaris femoris (Pfeil) und des Condylus medialis (Pfeilspitze) nach einem Jahr.....	27
Abb. 8: Einsatz der Stanze am medialen Condylus femoris.....	28
Abb. 9: Operatives Einbringen des Kollagenvlies. Am condylären Defekt liegt das Vlies noch über Niveau, das Vlies des patellaren Defektes ist bereits integriert.	29
Abb. 10: Operative Defektbehandlung durch Mikrofrakturierung. Sichtbar sind Defekte an der lateralen Facies patellaris femoris (links) und Condylus mediales femoris (rechts)	30
Abb. 11: Versuchsaufbau. Messung einer Probe am condylären Defekt. Zu erkennen ist die an der Hebevorrichtung fixierte Probe und der Kolben mit darüber liegendem Kraftaufnehmer.	31
Abb. 12: Schematischer Versuchsaufbau. Der Messpunkt der in der Hebebühne verschraubten Probe wurde zum arretierten Kugelindentor ausgerichtet. Nach Kontakt zwischen Probe und Indentor (detektiert über den Kraftaufnehmer) konnte die Arretierung des federgeführten Kolbens gelöst werden. Es erfolgte die Indentation, deren Verlauf über den Wegtaster gemessen und mittels der Versuchssoftware aufgezeichnet wurde.	32
Abb. 13: Die obere Kurve zeigt das Weg/Zeit Verhalten der Indentation. Die untere Kurve registriert die anliegende Kraft (Schwingung/Oszillation zu Beginn der Indentation).....	33
Abb. 14: Schematische Darstellung des Kriechverhaltens. Charakteristischerweise kommt es erst zu einer frühen Startdeformation, die dann in eine annähernd lineare Kriechdeformation übergeht. Zeitpunkt i_0 definiert den Startpunkt, i_5 den Beginn und i_{30}	

das Ende für die Auswertung der 25 s Kriechindentation. (eigene Abb.).....	34
Abb. 15: Defekt des Facies patellaris in HE Färbung.....	38
Abb. 16: Unbehandelter Leerdefekt nach einem Jahr Standzeit. An beiden Defektlokalisationen hat sich praktisch kein Ersatzgewebe gebildet.....	41
Abb. 17: Behandelte Defekt der Gruppe 1 (MACT I/III) nach einem Jahr. Der Defekt am Condylus medialis zeigt eine unbefriedigende Ausfüllung mit Ersatzgewebe, der femoropatellare Defekt zeigt eine ausreichende Füllung.....	41
Abb. 18: Gewebedicken für Proben des Condylus medialis in Box-Whisker- Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Vergleichsmessungen am genuinen Knorpel.....	42
Abb. 19: Gewebedicken für Proben der Facies patellaris femoris in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Vergleichsmessungen am genuinen Knorpel.....	43
Abb. 20: „25s Kriechindices“ für Proben des Condylus medialis in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Messungen am genuinen Knorpel. Für die Gruppen 2 und 3 gingen aufgrund der Ausschlusskriterien nur jeweils ein bzw. zwei Werte in die Auswertung ein. Die Darstellung dient der Orientierung.	44
Abb. 21: „25s Kriechindices“ für Proben der Facies patellaris femoris in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Messungen am genuinen Knorpel.....	46
Abb. 22: E-Modul für Proben der Facies patellaris in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Messungen am genuinen Knorpel	49
Abb. 23: E-Modul für Proben des Condylus medialis in Box-Whisker-Plots. Behandelte Defekte der Gruppen 1 bis 5, unbehandelte Defekte und Messungen am genuinen Knorpel. Die Gruppen zwei und drei umfassten aufgrund der Ausschlusskriterien nur jeweils ein bzw. drei Werte. Sie gingen nicht in die Auswertung ein.....	50
Abb. 24: Kurvenschar nach der Berechnungsformel für den E-Modul.....	77

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Behandlungsgruppen.....	23
Tabelle 2: Mittelwerte der Gewebedicke [μm] mit Standardabweichung für den gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.....	42
Tabelle 3: Mittelwert des „25s Kriechindex“ [$\mu\text{m}/\text{mm}$] mit Standardabweichung für die gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.	44
Tabelle 4: Mittelwerte des E- Moduls [MPa] mit Standardabweichung für die gesunden Knorpel sowie für die unbehandelten und behandelten Defekte nach Gruppen.....	48

7.3 Tabellen: Ergebnisse

7.3.1 Ergebnisse der linken Kniegelenke der Facies patellaris

Ergebnisse der linken Kniegelenke (behandelte Defekte und Vergleichsmesspunkte)

	Nr.	Facies patellaris femoris			Facies patellaris femoris		
		Defekt			Kontrolle		
		Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex	Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex
Gruppe 1	1	273	6,83	<i>0,013</i>	933	2,64	0,047
	3	227	1,80	0,057	640	7,68	0,055
	4	170	2,29	0,135	580	14,72	0,055
	19	460	3,95	0,078	840	4,67	0,048
	20	573	3,94	0,079	653	7,86	0,061
	21	507	6,67	0,068	627	8,85	0,059
Mittelwert		368	4,25	0,084	712	7,74	0,054
Gruppe 2	22	440	4,78	0,038	987	6,50	0,036
	24	287	26,93	<i>0,003</i>	640	7,38	0,054
	25	173	0,26	0,038	573	13,74	0,059
	26	433	10,63	<i>0,012</i>	733	4,70	0,048
	27	190	0,55	0,363	540	13,63	0,050
Mittelwert		305	4,06	0,146	695	9,19	0,049
Gruppe 3	6	200	4,69	0,068	527	10,94	0,108
	10	353	0,68	0,117	573	16,35	0,092
	23	487	11,15	0,034	400	9,13	0,056
	31	32	0,20	<i>1,234</i>	981	7,72	0,029
Mittelwert		268	4,18	0,073	620	9,26	0,071
Gruppe 4	8	600	2,57	0,130	573	9,17	0,080
	11	340	0,78	0,100	467	23,78	0,087
	12	240	2,66	0,033	667	10,32	0,039
	13	347	2,25	0,123	580	7,17	0,052
	14	587	2,63	0,118	1073	6,67	<i>0,010</i>
	15	340	8,98	0,085	727	8,00	0,025
Mittelwert		409	3,31	0,098	681	8,27	0,049
Gruppe 5	16	213	2,89	0,122	720	6,29	0,051
	18	373	1,07	0,129	647	2,15	0,077
	28	160	2,22	0,138	540	8,78	0,060
	29	333	0,57	0,155	700	8,46	0,081
	30	473	8,31	0,070	687	18,02	0,036
Mittelwert		311	3,01	0,122	659	6,42	0,061

Die Kursiv gedruckten Werte wurden von der Statistik ausgeschlossen.

7.3.2 Ergebnisse der linken Kniegelenke der Condylus medialis

Ergebnisse der linken Kniegelenke (behandelte Defekte und Vergleichsmesspunkte)

	Nr.	Condylus medialis			Condylus medialis		
		Defekt			Kontrolle		
		Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex	Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex
Gruppe 1	1603	3,17	0,034		1300	3,89	0,027
	3340	<i>89,64</i>	<i>0,005</i>		1300	1,59	0,032
	4303	<i>282,41</i>	<i>0,015</i>		1033	2,48	0,036
	19613	4,90	0,041		897	0,92	0,038
	20373	3,91	0,213		867	1,81	0,051
	21227	<i>22,68</i>	<i>0,006</i>		947	5,74	0,038
Mittelwert	410	3,99	0,096	1057	2,74	0,037	
Gruppe 2	22667	<i>25,44</i>	<i>0,012</i>		1480	3,37	0,026
	24320	7,37	0,069		947	2,14	0,036
	25133	<i>4248,09</i>	<i>0,004</i>		853	1,58	0,046
	26253	<i>324,61</i>	<i>0,004</i>		1067	1,46	0,034
	27173	<i>1386,37</i>	<i>0,003</i>		1213	1,46	0,035
Mittelwert	309	7,37	0,069	1112	2,00	0,035	
Gruppe 3	6373	<i>46,38</i>	<i>0,008</i>		573	2,59	0,096
	10100	0,41	0,170		1453	4,67	0,038
	23287	<i>32,29</i>	<i>0,012</i>		1200	2,38	0,029
	31363	5,09	0,127		2101	9,31	<i>0,013</i>
Mittelwert	281	2,75	0,148	1332	4,74	0,054	
Gruppe 4	8580	5,39	0,053		920	2,04	0,052
	11207	0,93	0,084		793	5,19	0,055
	12960	1,19	0,036		1220	2,07	0,027
	13393	6,24	0,080		1113	1,84	0,041
	14967	2,88	0,067		1167	1,74	0,025
	15767	3,91	0,040		1167	1,49	0,037
Mittelwert	646	3,42	0,060	1063	2,40	0,039	
Gruppe 5	16340	<i>27,97</i>	<i>0,043</i>		1053	3,25	0,040
	18360	8,52	0,044		1140	1,35	0,036
	28173	4,94	0,138		1113	1,76	0,038
	29120	0,66	0,088		1087	0,88	0,054
	30473	1,94	0,074		1420	1,44	0,029
Mittelwert	293	4,02	0,077	1163	1,74	0,039	

Die kursiv gedruckten Werte wurden von der Statistik ausgeschlossen.

7.3.3 Ergebnisse der linken und rechten Kniegelenke Condylus lateralis

Ergebnisse der linken und rechten Kniegelenke (Vergleichsmesspunkte des Condylus lateralis)

	Nr.	Condylus lateralis links			Condylus lateralis rechts		
		Kontrolle			Kontrolle		
		Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex	Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex
Gruppe 1	1	1073	fehlt	0,000	fehlt	fehlt	fehlt
	3	1027	2,46	0,025	693	8,21	0,074
	4	1020	4,46	0,023	600	12,61	0,062
	19	893	5,33	0,044	893	1,57	0,045
	20	847	3,46	0,049	867	4,30	0,051
	21	653	4,58	0,057	827	3,57	0,044
Mittelwert		919	4,06	0,040	776	6,06	0,055
Gruppe 2	22	980	6,74	0,036	1800	7,85	0,023
	24	733	10,91	0,056	687	6,07	0,059
	25	953	5,55	0,035	867	4,41	0,053
	26	913	2,29	0,042	493	2,71	0,077
	27	767	5,08	0,042	867	7,39	0,040
Mittelwert		869	6,11	0,042	943	5,69	0,050
Gruppe 3	6	513	4,06	0,099	580	4,85	0,099
	10	847	5,56	0,062	600	6,87	0,070
	23	1313	15,13	0,034	1013	16,05	0,028
	31	1717	3,29	0,015	627	1,72	0,059
Mittelwert		1098	4,31	0,065	705	4,48	0,064
Gruppe 4	8	827	4,47	0,056	780	4,26	0,061
	11	567	13,96	0,081	573	9,17	0,083
	12	1420	4,19	0,027	1027	4,10	0,038
	13	fehlt	fehlt	fehlt	720	4,17	0,061
	14	1353	8,21	0,025	560	8,73	0,071
	15	713	13,65	0,059	700	10,63	0,050
Mittelwert		976	8,90	0,049	727	6,84	0,061
Gruppe 5	16	613	2,70	0,058	620	1,38	0,056
	18	733	4,84	0,065	773	4,77	0,058
	28	760	6,45	0,054	667	5,15	0,059
	29	787	5,89	0,067	700	8,14	0,079
	30	1293	4,43	0,022	720	1,91	0,044
Mittelwert		837	4,86	0,053	696	4,27	0,059

Die Kursiv gedruckten Werte wurden von der Statistik ausgeschlossen.

7.3.4 Ergebnisse der rechten Kniegelenke Facies patellaris

Ergebnisse der rechten Kniegelenke (unbehandelte Defekte und Vergleichsmesspunkte)

	Nr.	Facies patellaris femoris			Facies patellaris femoris		
		Defekt			Kontrolle		
		Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex	Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex
Gruppe 1	1	387	8,52	0,000	fehlt	fehlt	fehlt
	3	453	9,47	0,060	567	5,24	0,078
	4	267	75,86	0,009	453	5,27	0,052
	19	187	2,47	0,115	600	3,69	0,085
	20	47	0,72	0,064	573	4,95	0,076
	21	13	0,09	1,050	460	6,08	0,077
Mittelwert		226	4,25	0,080	531	5,05	0,074
Gruppe 2	22	400	3,85	0,054	580	2,46	0,052
	24	160	6,63	0,075	540	4,70	0,065
	25	93	22,44	0,021	687	10,42	0,047
	26	180	4,83	0,036	767	4,41	0,040
	27	140	6,35	0,057	547	6,84	0,044
Mittelwert		195	5,42	0,049	624	5,77	0,049
Gruppe 3	6	187	5,26	0,027	433	5,31	0,129
	10	287	2,78	0,162	400	6,32	0,146
	31	373	36,46	0,012	1707	16,37	0,018
	23	260	28,75	0,050	467	4,93	0,080
Mittelwert		277	4,02	0,080	752	5,52	0,094
Gruppe 4	8	7	0,02	5,025	533	7,23	0,097
	11	53	3,91	0,131	553	12,52	0,084
	12	293	23,41	0,022	547	6,70	0,047
	13	353	2,16	0,072	533	6,25	0,046
	14	367	33,78	0,023	627	1,43	0,065
	15	387	10,17	0,061	720	3,69	0,045
Mittelwert		243	4,06	0,062	586	6,30	0,064
Gruppe 5	16	147	0,95	0,201	613	2,09	0,059
	18	153	1,21	0,052	633	6,64	0,078
	28	87	2,84	0,081	553	8,05	0,060
	29	147	3,08	0,225	633	7,44	0,097
	30	267	11,83	0,066	807	10,82	0,042
Mittelwert		160	3,98	0,125	648	7,01	0,067

Die Kursiv gedruckten Werte wurden von der Statistik ausgeschlossen.

7.3.5 Ergebnisse der rechten Kniegelenke Condylus medialis

Ergebnisse der rechten Kniegelenke (unbehandelte Defekte und Vergleichsmesspunkte)

	Nr.	Condylus medialis Defekt			Condylus medialis Kontrolle		
		Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex	Gewebedicke	E - Modul	Kriechindex
Gruppe 1	1	fehlt	fehlt	fehlt	253	0,81	0,231
	3	567	0,54	0,099	920	4,11	0,047
	4	300	3,52	0,089	1287	4,46	0,023
	19	507	3,87	0,045	1347	1,45	0,033
	20	3	0,02	0,300	693	1,47	0,068
	21	453	5,49	0,050	960	2,55	0,034
Mittelwert		366	2,69	0,117	910	2,47	0,073
Gruppe 2	22	773	12,57	0,028	833	1,08	0,041
	24	213	40,57	0,033	1140	2,51	0,030
	25	340	4,01	0,074	1173	1,79	0,029
	26	207	21,66	0,017	1447	1,56	0,030
	27	513	4,56	0,045	1133	2,23	0,027
Mittelwert		409	7	0,045	1145	2	0,031
Gruppe 3	6	520	2,93	0,089	640	2,40	0,097
	10	313	4,90	0,077	1300	2,26	0,032
	31	265	13,94	0,057	2400	4,79	0,012
	23	380	37,17	0,032	1353	3,18	0,027
Mittelwert		370	7,26	0,064	1423	3,16	0,042
Gruppe 4	8	400	20,89	0,044	773	2,41	0,056
	11	233	22,25	0,066	807	6,44	0,054
	12	820	4,81	0,023	1467	2,65	0,020
	13	380	15,50	0,037	1027	4,06	0,041
	14	767	6,73	0,028	1387	2,48	0,023
	15	413	15,31	0,021	1713	3,24	0,019
Mittelwert		502	5,77	0,036	1196	3,55	0,036
Gruppe 5	16	93	1,58	0,166	880	1,16	0,053
	18	607	5,77	0,039	1170	1,79	0,033
	28	447	7,76	0,055	1127	1,75	0,035
	29	173	6,49	0,144	1447	1,25	0,187
	30	353	3,71	0,071	1800	1,59	0,020
Mittelwert		335	5,06	0,095	1285	1,51	0,066

Die Kursiv gedruckten Werte wurden von der Statistik ausgeschlossen.

7.4 Bemerkungen zur Berechnungsformel des E-Moduls

Die auf Seite 35 angegebene Formel wurde von Kempson et. al. (1971) nach einer Veröffentlichung von Waters (1971) zur Berechnung des E-Moduls bei Indentorversuchen angewendet. Als Eingangswerte dienen die Kraft F , der Indentorradius r , die Knorpeldicke h , die Eindringtiefe i und daraus abgeleitet der Eindringradius a .

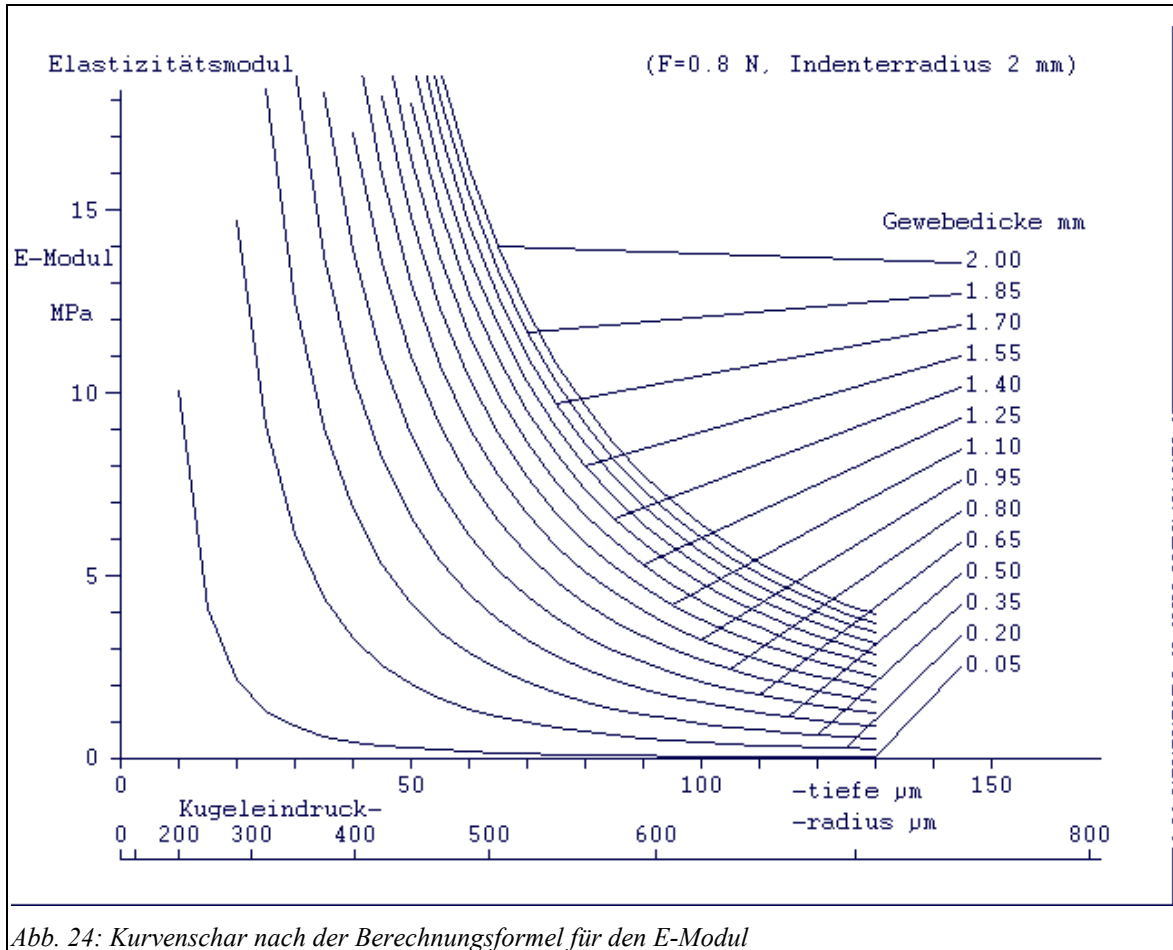


Abb. 24: Kurvenschar nach der Berechnungsformel für den E-Modul

Aus Abb. 24 fällt die Steilheit der Kurven für kleine Eindringtiefen und kleine Gewebedicken auf. Beispielhaft ändert sich bei einer Eindringtiefe von $i = 30 \mu\text{m}$ der E-Modul um eine Größenordnung (von 1 MPa auf 13 MPa), je nachdem ob die Gewebedicke 0.05 mm oder 0.35 mm beträgt.

Das weist auf eine Problematik dieser E-Modul Bestimmung hin: wenn bei der Berechnung statt der aktuellen Gewebedicke am Kugelindentor auf Mittelwerte zurückgegriffen werden muss, ist das Ergebnis unsicher. Verlässliche und untereinander vergleichbare Zahlenwerte kann man nur bei Anwendung größter Sorgfalt erreichen.

8 Danksagungen

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Martin Russlies, als Direktor der Sektion für Orthopädie des UKSH, Campus Lübeck, für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Versuche, und mich durch Diskussionsbereitschaft und kompetente Anleitung unterstützte.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Peter Behrens, Herrn Dipl.-Ing. Dr. rer. biol. hum. Wolfgang Köller, Herrn Dr. med. Justus Gille für die Einarbeitung in die Thematik und Vermittlung grundlegender Fertigkeiten zum wissenschaftlichen Arbeiten, für die kompetente Anleitung, Unterstützung, Erreichbarkeit und Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Peter Stomberg, Mitarbeiter im Labor für Biomechanik, für seine Hilfestellungen.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bodo Kurz sowie den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Erstellung der histologischen Schnitte.

Mein Dank gilt darüber hinaus den Mitarbeitern der Tierhaltung der Universität zu Lübeck, insbesondere Herrn Jacobsen.

Ein Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung, insbesondere meinem Vater Dr. -Ing. Reinhard Kunow für seine Hilfestellungen in technischen Fragen. Hervorheben möchte ich zuletzt meine Frau Leonie, für die liebe Begleitung auf dem Weg zur Dissertation.

9 Lebenslauf

Name: Julius Christian Enno Kunow

Geburtsdatum: 28.05.1979

Geburtsort : Norden

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

1985 bis 1989 Grundschole Nenndorf, Rosengarten, Niedersachsen

1989 bis 1991 Orientierungsstufe Nenndorf, Rosengarten, Niedersachsen

1991-1998 Gymnasium Hittfeld

1998 Abitur

1998 bis 1999 Wehrdienst LLbrig31, Oldenburg/Old., Niedersachsen

Medizinstudium an der Universität zu Lübeck

Oktober 1999 Immatrikulation

2001 Physikum, Ärztliche Vorprüfung

2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Frühjahr 2005 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr Klinik für Innere Medizin, Klinikum Neustadt/Holstein

Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig - Holstein, Campus Lübeck

Department of Orthopaedic Surgery, Tygerberg Hospital, Südafrika

April 2006 3. Staatsexamen und Approbation

Promotion

November 2002 Beginn der Studie in der Klinik für Orthopädie Universitätsklinikum S-H, Campus Lübeck

2004 Abschluss der Experimente

Berufliche Tätigkeit

Mai 2006 Assistenzarzt der Klinik für Innere Medizin Klinikum Neustadt/Holstein

10 Veröffentlichungen

Posterpräsentation:

„Biomechanical properties of cartilage repair tissues after different cartilage repair procedures in sheep “ auf dem ICRS Congress 5th Symposium, Gent, Belgien 2004

Vortrag:

„Qualität von Knorpelersatzgeweben unterschiedlicher Knorpeldefektbehandlung“, 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. 90. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. 45. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Verband für Physiotherapie – Zentralverband der Physiotherapeuten/ Krankengymnasten., Berlin, November 2004

Vortrag:

„Biomechanical properties of cartilage repair tissue after different surgical treatments in a sheep model“, Norddeutsche Orthopädenvereinigung, 54. Jahrestagung, Hamburg, Juni 2005

Veröffentlichung:

Köller W, Kunow J, Ostermeyer O, Stomberg P, Boos C, Russlies M: A simple measuring device for laboratory indentation tests on cartilage. Biomed Tech 53, 59-64 (2008)