

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. J. Westermann

und der

Klinik für Orthopädie
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: Privatdozent Dr. med. M. Russlies

Morphologischer Vergleich verschiedener operativer Knorpelersatztechniken im Schafskniemodell

Eine lichtmikroskopische Untersuchung

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Christin Andrea Bröhl
aus Münster

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. med. E.-M. Ehlers

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. med. M. Russlies

Tag der mündlichen Prüfung: 5.1.2005

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 5.1.2005

gez. Professor Dr. med. P. Dominiak
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Abkürzungsliste

ACT:	autologe Chondrocyten Transplantation
BMP:	bone morphogenetic protein
CPM:	continous passive motion
EZM:	extrazelluläre Matrix
GAGs:	Glykosaminoglykane
OATS:	osteocondral autograft transplantation system
SPSS:	statistical package for social sciences
TGF- β :	transforming growth factor β
UK-SH:	Universitätsklinikum Schleswig Holstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Problemdarstellung	8
1.2	Ziel der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Versuchstiere	18
2.2	Membranen	18
2.3	Operationsverfahren.....	19
2.3.1	Narkose	19
2.3.2	Operation 1	19
2.3.3	Zellzüchtung	19
2.3.4	Operation 2	21
2.4	Einteilung der Versuchsgruppen	22
2.5	Gewebeentnahme	24
2.6	Lichtmikroskopie.....	24
2.6.1	Fixierung, Entkalkung, Einbettung	24
2.6.2	Schnittgewinnung und Färbung	24
2.7	Scoring-Systeme zur histologischen Beurteilung des Regeneratgewebes..	25
2.7.1	Scoring nach O´Driscoll et al. (1986b)	25
2.7.2	Modifiziertes Auswerteschema zur histologischen Beurteilung des Regeneratgewebes	26
2.8	Statistik.....	31
2.8.1	Stichproben und Gruppen	31
2.8.2	Statistische Tests	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Statistische Auswertung	33
3.2	Gruppenzuordnung	33
3.2.1	Kontrollgruppe (K)	33
3.2.2	Kollagen I/III-Membran leer, geklebt (BLK)	34
3.2.3	Kollagen I/III-Membran mit autologen Chondrocyten, geklebt (BZK)	34
3.2.4	Kollagen I/III-Membran mit Unterspritzung autologer Chondrocyten unterspritzt, genäht (BZN)	34
3.2.5	Periostlappen mit Unterspritzung autologer Chondrocyten (PN)	34
3.2.6	Kollagen II-Membran leer, geklebt (CLK)	34

3.2.7	Kollagen II-Membran mit autologen Chondrocyten, geklebt (CZK)	34
3.3	Untersuchung der Synoviapräparate	34
3.4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	35
3.5	Bewertung mit dem O´Driscoll-Score	47
3.6	Bewertung mit dem modifizierten Score	55
4	Diskussion	79
4.1	Gewebemorphologie	79
4.2	Oberflächenbeschaffenheit	85
4.3	Strukturelle Integrität und Dicke des Defektgewebes	85
4.4	Clusterbildung im Defektareal	86
4.5	Degenerative Veränderungen bzw. Clusterbildung in der Umgebung der Defekte	87
4.6	Adhärenz des Defektmaterials	88
4.7	Vergleich der beiden verwendeten Bewertungsscores	89
4.8	Ausblick	92
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Danksagung	109
8	Lebenslauf	110

1 Einleitung

Gelenke sind Verbindungen zwischen Skelettelementen, deren artikulierende Gelenkflächen von hyalinem Knorpel überzogen sind. Der hyaline Knorpel ermöglicht in funktioneller Einheit mit den anderen Gelenkanteilen den reibungsfreien Bewegungsablauf. Obwohl nur wenige Millimeter dick, erfüllt er Aufgaben, die für die Gelenkfunktion unabdingbar sind. Über seine Gleitfähigkeit hinaus ist er zugstabil, druckelastisch und vermag durch Gewichtsverteilung Spitzenbelastungen auf den darunter liegenden Knochen zu verhindern. Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung, da die Gelenkbelastung als Summe aus Körperschwerkraft und Muskelkraft an den Gelenken der unteren Extremität besonders hoch ist und ein Vielfaches des Körpergewichtes betragen kann. Trotz dieser besonderen mechanischen Belastung ermöglicht der hyaline Gelenkknorpel bei den meisten Menschen über einen sehr langen Zeitraum reibungsarme und schmerzfreie Bewegungsabläufe. Dass er in der Lage ist, diesen hohen mechanischen Anforderungen zu genügen, und warum es zu großen Schwierigkeiten kommt, wenn seine strukturelle Toleranz überschritten wird, erklärt sich aus dem Aufbau dieses Gewebes und der Besonderheit seiner Zellen.

Hyaliner Gelenkknorpel ist avaskulär und enthält weder Nerven noch Lymphgefäße, es ist ein bradytrophes Gewebe. Er wird aus dem Stratum synoviale und dem subchondralen Knochen per diffusionem ernährt. Wie andere Binde- und Stützgewebe besteht er aus Zellen, einer formgebenden extrazellulären Matrix (EZM) und Wasser. Die Zellen des hyalinen Gelenkknorpels sind die hochspezialisierten Chondrocyten, welche die EZM bilden, organisieren und schließlich wieder abbauen. In diese Matrix sind die Chondrocyten fest eingebettet und weisen eine besondere zonale Gliederung auf. Mit dem subchondralen Knochen ist der Gelenkknorpel über eine Zone verkalkten Knorpels, der sogenannten Tidemark, verbunden. Darauf folgt eine Schicht, in der sich die Knorpelzellen in Säulen anordnen und runde Formen annehmen. In der obersten Schicht flachen die Zellen ab und ordnen sich mit ihrer Längsachse parallel zu Oberfläche an. Trotz des knappen Nährstoffangebotes für die per diffusionem ernährten Zellen besitzt der einzelne Chondrocyt eine Glykolyserate,

die etwa so hoch ist wie jene in Zellen gut durchbluteter Gewebe (BUCKWALTER und MANKIN 1997a). Die Chondrocyten selbst tragen nur sehr wenig zum Gesamtvolumen des Gewebes bei; etwa ein Prozent des Knorpels eines Erwachsenen besteht aus Zellen (BUCKWALTER und MANKIN 1997a). Bei anderen Arten, vor allem bei kleinen Säugetieren wie Ratten, Mäusen und Kaninchen, die einen dünneren Gelenkknorpel besitzen, ist die Zelldichte deutlich höher als beim Menschen. Die inverse Korrelation von Zelldichte und Knorpeldicke wurde von STOCKWELL schon 1978 beschrieben. Der größte Volumenanteil, etwa 90 Prozent, entfällt auf das Wasser und die EZM (MANKIN et al. 1994), die aus Kollagenen, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Elektrolyten und Lipiden besteht. Die Interaktion des Wassers mit dem formgebenden Gerüst der EZM verleiht dem Knorpel Druckelastizität und Zugstabilität, zwei seiner besonderen mechanischen Eigenschaften (TEMENOFF und MIKOS 2000).

Etwa 60 Prozent des Trockengewichtes der EZM bestehen aus Kollagenen, 25-35 Prozent aus Proteoglykanen, während die Glykoproteine etwa 15-20-Prozent ausmachen (BUCKWALTER und MANKIN 1997a). Im hyalinen Knorpel existieren unterschiedliche Kollagentypen. Den größten Anteil bildet mit 90-95 Prozent des Gesamtkollagens das Kollagen II. Etwa drei Prozent bestehen aus Kollagen XI und ein Prozent aus Kollagen IX. Außerdem kommen in geringen Mengen Kollagene vom Typ V, VI und X vor (BURGESON und NIMNI 1992, BUCKWALTER und MANKIN 1997a).

Für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels ist die Anordnung der Kollagenfasern in der Grundsubstanz von großer Bedeutung. Sie bilden ein funktionsgerechtes trajektorielles System, indem die Fasern im verkalkten Knorpel am Übergang zum Knochen wurzeln, anschließend senkrecht aufsteigen, um schließlich an der Gelenkoberfläche die zellfreie Tangentialfaserschicht zu bilden. In dieser Schicht werden die bei Belastungen entstehenden Druck- und Zugspannungen aufgefangen. Der Faserverlauf lässt sich im histologischen Routinepräparat jedoch nicht verfolgen, da das Kollagen denselben Brechungsindex hat wie die umgebende Interzellulärsubstanz. Sind die Fasern sichtbar, so spricht man von Demaskierung oder Asbestfaserung. Asbestfasern sind zusammengelagerte Kollagenfasern, die infolge von Wasserverlust und

Veränderungen der Glykosaminoglykane (GAGs) sichtbar werden. Das wichtigste Proteoglykan des hyalinen Gelenkknorpels ist das Aggrecan, dessen Glykosaminoglykanketten hauptsächlich aus Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat bestehen. Funktionell entscheidend ist die negative Ladung der sulfatierten Zuckerseitenketten, da sich um diese Ladungen eine Hydrathülle bildet, welche unter anderem dem Stofftransport dient. Aber auch die Druckelastizität des Knorpels geht auf dieses Wasserbindungsvermögen zurück. Da durch Druck von außen Wasser aus den Ladungszentren verdrängt wird, kommen sich die negativ geladenen Gruppen näher und stoßen einander ab. Diese Abstoßungskräfte verhindern eine weitere Kompression. Beim Nachlassen des Druckes kehrt Wasser zu den Ladungszentren zurück (BUCKWALTER und MANKIN 1997a). Neben den Proteoglykanen kommen auch noch Glykoproteine, e z.B. Cartilage oligomeric protein, Anchorin CII, und Fibronectin vor. Sie stabilisieren die EZM und verankern die Chondrocyten in ihr.

Die Perfektion, mit der im menschlichen Gelenk die Probleme der reibungsarmen Gleitbewegung und Stoßdämpfung gelöst sind, begeisterte schon 1892 Walt Whitman. Er schrieb. "The narrowest hinge in my hand puts to scorn all machinery" (WHITMAN 1892). Sie ist nur durch den komplexen Aufbau, die Biochemie des Gewebes und ein exaktes Zusammenspiel seiner Komponenten möglich. Erkauft wird sie jedoch mit dem Unvermögen der Chondrocyten, funktionsfähige Regenerate zu bilden.

1.1 Problemdarstellung

Schon 1743 schrieb HUNTER seine Beobachtung nieder, dass hyaliner Gelenkknorpel nicht in der Lage sei, sich zu regenerieren. Diese These wurde später durch Studien zahlreicher Autoren bestätigt (FULLER und GHADIALLY 1972, MANKIN 1982, BUCKWALTER et al. 1990, BUCKWALTER und MOW 1992). Einer der Gründe dafür ist die niedrige Proliferationsrate der Zellen, ein anderer die geringe metabolische Aktivität des Knorpelgewebes. Diese wird dadurch erklärt, dass der einzelne Chondrocyt zwar sehr stoffwechselaktiv, die Zelldichte innerhalb des Gewebes jedoch sehr gering ist. Die bereits erwähnte Einbettung der Chondrocyten in die von ihnen sezernierte Matrix schützt sie

einerseits, macht aber andererseits eine Migration unmöglich. Reparaturvorgänge werden auch durch die Proteoglykane der EZM erschwert. Auf der einen Seite verleihen sie dem Knorpel seine besonderen mechanischen Eigenschaften, sie verhindern aber auch die Adhäsion von Zellen, die in Knorpeldefekte einwandern, um eine Regeneration einzuleiten. Besondere Bedeutung bei der Beurteilung von Heilungstendenzen im hyalinen Gelenkknorpel muss dem Alter der Versuchstiere bzw. der Patienten beigemessen werden. So zeigen einige Studien, dass mit steigendem Alter die Selbstheilungstendenz von Knorpeldefekten stark abnimmt (DUSTMANN und PUHL 1976, ALDEGHERI et al. 1994, WEI et al 1997). Bei Knorpelverletzungen unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Defekten: chondrale und osteochondrale Defekte. Die Eröffnung von Gefäßen im Knochen löst die Ausschüttung von Stoffwechselprodukten aus, die körpereigene Reparaturmechanismen aktivieren. Es kommt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die mit Hämatom- und Fibrinkoagelbildung einhergeht. Auch die Einwanderung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochen in den Defekt fördert die Bildung von Reparaturgewebe. Das Ersatzgewebe besteht jedoch häufig aus Faserknorpel (MEACHIM und OSBORNE 1970, CAPLAN et al. 1997), der an Stelle des für hyalinen Gelenkknorpel typischen Kollagen II einen sehr hohen Kollagen I-Gehalt aufweist (EYRE und MUIR 1975). Das auf diese Art entstehende Gewebe genügt oft den Anforderungen der Umgebung nicht, da es nicht in der Lage ist, eine Gewichtsverteilung zu bewirken. Gelegentlich bildet sich überhaupt kein Ersatzgewebe und die Defekte bleiben leer. Sowohl die Persistenz der Defekte als auch unzureichende Qualität des Ersatzgewebes können zu starken Bewegungseinschränkungen, Schmerzen und zunehmender Verschlechterung des Knorpelzustandes führen.

Oberflächliche Verletzungen führen zu rein chondralen Defekten. Da durch die fehlende Gefäßöffnung weder mesenchymale Stammzellen noch Wachstumsfaktoren in den Defekt gelangen können, heilen sie besonders schlecht (SHORTKROFF et al. 1996). Von GRANDE et al. (1989) wurde im Tierexperiment gezeigt, dass kleine chondrale Defekte präarthrotische Faktoren darstellen und beschleunigt zur sekundären Arthrose führen. Schon kleine Läsionen im Gelenkknorpel, die durch die Lubrikationsfähigkeit der Synovialflüssigkeit nicht mehr geglättet werden, führen bei jeder Gelenkbewegung

zu Mikrotraumata. Fällt auf diese Weise die gesamte Knorpelsubstanz dem Abrieb zum Opfer, so kommt es im angrenzenden subchondralen Knochen zu Umbauvorgängen wie der subchondralen Osteosklerose und dem Auftreten von Randosteophyten. Diese Phänomene werden als knöcherne Kompensation für den Knorpelverlust angesehen. Bei schwerwiegender Arthrose bleibt als ultima ratio häufig nur die prothetische Versorgung eines zerstörten Gelenkes. Prothesen weisen jedoch nur eine begrenzte Haltbarkeit auf und bergen die Gefahr von Infektionen und Prothesenlockerung (KNUTSON et al. 1986). Vor allem aufgrund der begrenzten Haltbarkeit stellt der prothetische Gelenkersatz für Jugendliche und junge Erwachsene mit traumatischen Knorpelschäden keine wirkliche Alternative dar. Eine Lösung zur effizienten Behandlung in der frühen Phase von Knorpeldefekten ist daher die Entwicklung eines „biologisch aktiven Implantates“, welches die Knorpeloberfläche wiederherstellt, die Ausbildung einer Gelenkarthrose verhindert und letztendlich die Anzahl der zu implantierenden künstlichen Gelenke vermindert. Zu diesem Zweck sind viele Methoden, nicht invasive und invasive entwickelt worden. Zu den nicht invasiven Methoden gehört z.B. continuous passive motion (CPM) (SALTER et al. 1980). Auch der Einsatz von Wachstumsfaktoren, die eine Heilung der Knorpeldefekte fördern sollen, stellt eine nur wenig invasive Methode dar. Hier stehen TGF- β (FRENKEL et al. 2000) und verschiedene bone morphogenetic proteins (BMP) (WOZNEY und ROSEN 1998) im Vordergrund. Diese Faktoren können als freie Substanzen oder an Liposomen gebunden in die Gelenkhöhle eingebracht werden. Die Bindung eines entsprechenden Faktors an Liposomen ermöglicht eine kontinuierliche Freisetzung über einen gewissen Zeitraum. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass keine gelenkeröffnende OP nötig ist. Von Nachteil sind indessen häufige Injektionen in das Gelenk, die die Gefahr von Infektionen bergen und zahlreiche Arztbesuche nötig machen. Dabei ergibt sich zudem die Schwierigkeit, aus der Vielzahl der Faktoren, ihren verschiedenen positiven und negativen Effekten, den unterschiedlichen Wirkungen bei Gabe unterschiedlich hoher Dosen, ihren Interaktionen und dem immer noch unvollständigen Verständnis ihrer Wirkung, praktikable und einheitliche Therapiestrategien zu entwickeln. So kam es z.B. im Tierversuch durch zu hohe TGF- β 1-Dosen in den Gelenken zu Synovialhyperplasie und Osteophytenbildung (BAKKER et al. 2001). Außerdem

zeigten einige Studien, dass die Zellantwort auf Wachstumsfaktoren im Alter stark abnimmt (PFEILSCHIFTER et al. 1993, GUERNE et al. 1995).

Bei den invasiven Methoden werden zwei unterschiedliche Ansätze unterschieden.

- 1) Stimulation von Reparaturmechanismen im Knorpel mit dem Ziel, ein Gewebe entstehen zu lassen, welches eine ähnliche zonale Architektur, Zusammensetzung und mechanische Eigenschaften wie gesunder hyaliner Gelenkknorpel aufweist.
- 2) Transplantation von Gewebe mit dem Ziel der Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels.

Bei der Anregung der Reparatur ist die einfachste und schonendste Methode die Arthroskopie mit Débridement und Gelenklavage (SPRAGUE 1981, BAUMGAERTNER et al. 1990). Bei der Spülung des Gelenkes werden von der Synovia produzierte Entzündungsmediatoren, z.B. Interleukine, ausgewaschen. Durch die Entfernung des zerstörten Gewebes in den Defekten werden Proteoglykane entfernt, die sonst die Anhaftung der, in die Defekte einwandernden Zellen erschweren würden (HUNZIKER und KAPFINGER 1999). Eine weitere Methode macht sich die verbesserte Heilungstendenz von osteochondralen Defekten zu Nutze. Das Knochenmark wird durch Eröffnung des Markraumes bzw. der subchondralen Gefäße mittels kleiner Bohrlöcher zur Einwanderung mesenchymaler Zellen stimuliert, die sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren differenzieren und ein meist faserknorpeliges Ersatzgewebe entstehen lassen (PRIDIE 1959, JOHNSON 1986, SHAPIRO 1993). Obwohl dieses Gewebe nicht die mechanischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels besitzt, berichten Patienten über eine temporäre Linderung der Schmerzsymptomatik und Verbesserung der Gelenkfunktion (INSALL 1974, BENTLEY 1978). Durch den zusätzlichen Einsatz synthetischer Materialien, wie Karbonfasermembranen oder -stiften, die den mesenchymalen Zellen als Leitstruktur dienen, konnten in einer 4-Jahres-Studie gute Ergebnisse erzielt werden (MUCKLE und MINNS 1989, BRITTBERG et al. 1994a). Eine weitere Technik, die eine Verbindung mit dem Markraum schafft, ist die Mikrofrakturierung

(STEADMAN et al. 1997). Dabei wird der subchondrale Knochen mit einem Dorn eingedrückt. Es kommt ebenfalls zur Bildung eines Blutkoagels mit den bereits beschriebenen Effekten. JOHNSON zeigte 1986 und 1990, dass es bei Patienten nach Abrasionsarthroplastik zur Bildung eines Ersatzgewebes kommt, welches teilweise die Architektur von hyalinem Knorpel aufweist. Gleichzeitig wird bei Patienten, die vor der Operation eine radiologisch gesicherte Verschmälerung des Gelenkspaltes hatten, eine Verbreiterung desselben beobachtet, ein Phänomen das der Bildung einer neuen Gelenkfläche zugeschrieben wird. Zur Zeit ist nicht klar, welches Verfahren zur Markraumstimulation bessere Ergebnisse erbringt, was vor allem darin begründet ist, dass keinerlei Zusammenhang zwischen Ausmaß und Typ des Reparationsgewebes und der Linderung von Symptomen hergestellt werden kann. Im Kaninchenmodell weist die subchondrale Knochenanbohrung jedoch bessere Ergebnisse auf als die Knochenabrasion (MENCHE et al. 1996). Es wird vermutet, dass Löcher mit kleinem Durchmesser, die den Knochen zwischen den Defekten intakt lassen, zu einem stabileren Ersatzgewebe führen, als eine komplett abradierte Oberfläche.

Bei der autologen Knorpel-Knochen transplantation werden osteochondrale Transplantate verwandt. Es wird zunächst ein Zylinder mit vollständig entwickeltem Knorpelgewebe und dem darunter liegenden Knochen aus weniger belasteten Gelenkarealen entnommen. Hierbei ist die Auswahl der Entnahmestelle unter Beachtung der Oberflächenwölbung von besonderer Bedeutung. Die osteochondralen Zylinder werden anschließend in den vorbereiteten Defekt eingebracht (OATS-Technik oder Mosaikplastik) (SCHACHAR et al. 1992, BOBIC 1996, HANGODY et al. 1998). Bei kleineren Defekten konnten bei korrekter Indikationsstellung in einer 2-Jahres-Studie gute Ergebnisse erzielt werden. Vor allem wurden eine verbesserte Gelenkfunktion und eine Abnahme der Schmerzsymptomatik erreicht (HORAS et al 2000). Leider zeigte sich aber auch, dass der nach OATS regelhaft verbleibende Spaltraum zwischen Transplantaten und angrenzendem Knorpel in der Langzeitbeobachtung Ausgangspunkt für eine fortschreitende Knorpeldestruktion sein kann. Zu diesem Phänomen kommt es in besonderem Maße, wenn Inkongruenzen im Krümmungsradius der Gelenkflächen verbleiben (BEAVER et al. 1992). Mit guten Ergebnissen wurden auch allogene osteochondrale Transplantate eingesetzt (GARRET 1986,1994). Vorteile sind die

bessere Verfügbarkeit und die über längere Zeit mögliche Kryokonservierung. Es besteht jedoch sowohl die Gefahr der Übertragung von Infektionen als auch immunologischer Reaktionen mit nachfolgender Transplantatdegeneration (RODRIGO et al. 1978).

Besonders eingreifende Verfahren sind Hüft- und Kniegelenksosteotomien (WEISL 1980, INSALL et al 1984, COVENTRY et al 1993), bei denen durch Umstellung der Gelenkflächen die Hauptbelastungszone verlagert wird. Die klinische Erfahrung zeigt, dass auf diese Weise in vielen Fällen die Symptome der Gelenkarthrose, besonders die Schmerzen, vermindert werden. Ob dieses Phänomen durch Entlastung zerstörter Gelenkflächen, durch Verminderung des intraossären Druckes oder durch Bildung neuer Gelenkflächen hervorgerufen wird, ist unklar (BUCKWALTER und LOHMANDER 1994).

Alle bisher genannten Verfahren sind jedoch nicht in der Lage, den hyalinen Knorpel in seiner ursprünglichen Form wiederherzustellen. Knorpelregeneration soll durch die Transplantation von Perichondrium, die schon früh sowohl bei Tieren (ENGVIST 1979a, b, KON 1981) als auch beim Menschen durchgeführt wurde, erreicht werden (PASTACALDI und ENGVIST 1979, BRUNS und BEHRENS 1997). Die Transplantate produzieren ein hyalinknorpeliges Regeneratgewebe, welches bei normaler Nutzung des Gelenkes nach acht bis zwölf Monaten zu frühzeitiger Degeneration neigt (ENGVIST 1979a). Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Perichondrium ist seine begrenzte Verfügbarkeit (KON 1981). Die Vorteile der Transplantation von autologem Periost (O'DRISCOLL und SALTER 1984, 1986a) liegen in seiner embryologischen Abstammung vom Perichondrium und in seiner besseren Disponibilität (POUSSA et al. 1981). Die Kambiumschicht beider Gewebe besteht aus relativ undifferenzierten Mesenchymzellen (OHLSEN 1978), die in der Lage sind, sowohl Knorpel als auch Knochen zu bilden. Einige Studien zeigen sogar, dass bei Versuchen mit freien Periosttransplantaten die Chondrogenese ein Zwischenstadium vor der Osteogenese ist (HAM 1930, COHEN und LACROIX 1955, MORITO 1980). In der Fähigkeit, ebenfalls Knochen bilden zu können, liegt jedoch der Nachteil der beiden Verfahren, da es zur Kalzifikation und enchondralen Ossifikation der Transplantate kommen kann (BAB et al. 1982).

O'DRISCOLL et al. zeigten 2001, dass die chondrogene Potenz von Periosttransplantaten mit steigendem Alter stark abnimmt. Einen anderen Ansatz stellt die Transplantation in Zellkultur expandierter Chondrocyten dar, die in die Knorpeldefekte eingebracht werden. Grundlage für diesen Therapieansatz ist die Möglichkeit, Chondrocyten aus der sie umgebenden Matrix enzymatisch herauszulösen (KLAGSBRUN 1979). Die Zellen werden aus unbelasteten Gelenkbereichen isoliert und unter bestimmten Bedingungen in der Monolayer-Zellkultur vermehrt. In einem zweiten Eingriff erfolgt die Retransplantation in das Gelenk. In der Monolayer-Zellkultur verlieren die Chondrocyten jedoch die für sie typische Morphologie und entdifferenzieren zu fibroblastären Zellen (GREEN 1977). Dadurch verändert sich auch ihr Biosyntheseprofil, wobei sich die Synthese knorpelspezifischer Proteoglykane vermindert, während die Produktion von Kollagen I an Stelle von Kollagen II stark zunimmt (VON DER MARK et al. 1977, GLOWACKI et al. 1983). BENYA und SCHAFFER zeigten 1982 jedoch, dass diese Veränderungen unter bestimmten Kulturbedingungen auch nach langer Zeit noch reversibel sind. Erhalten die Zellen einen adäquaten Stimulus zur Redifferenzierung, so beginnen sie erneut mit der Produktion einer knorpelspezifischen Matrix. Die so gewonnenen Chondrocyten müssen jedoch für einige Zeit innerhalb der Defekte stabilisiert werden. Verwendet man die Zellen ohne Trägermaterial, muss der zuvor angefrischte Defekt mit einem Periostlappen versiegelt werden. Die Zellen werden dann unterhalb des Lappens in den Defekt injiziert (ACT) (BRITTBERG et al. 1994b, SHORTKROFF et al. 1996, BREINAN et al. 1997). MINAS zeigte 1998, dass bei akzeptabler Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden kann. Auch eine 9-Jahres-Studie aus dem Jahre 2000 (PETERSON et al. 2000) weist in Abhängigkeit von der Defektlokalisierung sehr gute Ergebnisse in bis zu 92 Prozent der Fälle nach. Fraglich bei dem Verfahren ist jedoch, in welchem Ausmaß die kultivierten Chondrocyten überhaupt an der Regeneration beteiligt sind. So entdeckten BREINAN et al. 1997 im Hundemodell keine Qualitätsunterschiede in Bezug auf das entstandene Regeneratgewebe zwischen mit Zellen unterspritzten und freien Periosttransplantaten. Am Ende der Untersuchung, nach 18 Monaten, begann die Qualität des entstandenen Ersatzgewebes schon wieder schlechter zu werden, es fand eine frühzeitige Degeneration statt. Sie beobachteten außerdem,

dass durch das Einnähen der Transplantate auch der an die Defekte angrenzende Knorpel geschädigt wurde und zu degenerieren begann.

Eine Vielzahl von biologischen und nicht biologischen Trägern, auf denen in vitro vorkultivierte Zellen ausgesät werden, ist untersucht worden. Dazu gehören vorbehandelte Knochen- oder Knorpelmatrices, verschiedene Koallagengele oder -matrices, Hydroxylapatit, Polytetrafluorethylen, Karbonfasern und synthetische Polymere (BUCKWALTER und LOHMANDER 1994). Die Transplantation von Kollagenmembranen bei der Behandlung osteochondraler Defekte ist seit 1979 bekannt (SPEER et al 1979). Der große Vorteil bei der Verwendung von Trägermaterialien aus Kollagen ist, dass sie nach der Implantation von körpereigenen Enzymen erkannt und daher nahezu ohne reaktive Veränderungen resorbiert werden. Gele haben nur eine geringe mechanische Stabilität und eignen sich daher nur bedingt zu Herstellung von Transplantaten. Membranen aus Kollagen sind den mechanischen Anforderungen besser gewachsen. NEHRER verglich 1997 in einer Studie erstmals das Verhalten von Hundechondrocyten auf einer Kollagen I- bzw. einer Kollagen II-Membran. In der Kollagen II-Membran fand er zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen signifikant höheren Anteil an Zellen, die einen chondrocytären Phänotyp aufwiesen. Auch die Glykosaminoglykanproduktion der Zellen, die auf einer Kollagen II-Membran transplantiert wurden, war signifikant höher. Die immunhistochemische Untersuchung der Kollagen II-Produktion erwies sich allerdings als schwierig, da neu produziertes Kollagen II sich nur schlecht von der sich in Resorption befindlichen Matrix abgrenzen ließ. Die Zellen auf der Kollagen I-Membran produzierten jedoch keinerlei Kollagen II. Eine 1998 ebenfalls von NEHRER durchgeführte Studie mit drei verschiedenen Chondrocytenarten auf Kollagen I- und II-Membranen erbrachte ähnliche Ergebnisse. Im gleichen Jahr untersuchte WAKITANI (1998) das Verhalten von Kaninchenchondrocyten, die auf einem Kollagen I-Gel in Knorpeldefekte im Kniegelenk transplantiert worden waren. Es bildete sich hyalinknorpeliges Ersatzgewebe, welches jedoch auch nach 48 Wochen nicht die zonale Gliederung des normalen hyalinen Gelenknorpels aufwies. Bei der biomechanischen Untersuchung besaß das entstandene Ersatzgewebe bereits nach zwölf Wochen dieselbe biomechanische Resistenz wie gesunder hyaliner Gelenknorpel. Diese Eigenschaft blieb während des gesamten

Untersuchungszeitraumes von 48 Wochen bestehen. In einer aktuelleren Studie (ALLEMANN 2001) zeigte sich, dass modifizierte Kollagenmembranen, die z.B. mit Hyaluronsäure beschichtet sind, eine höhere Kollagen- und Aggrekanproduktion erlauben als die unbeschichteten Kontrollmembranen. Eine Verbesserung des Verfahrens kann außerdem dadurch erreicht werden, dass die Chondrocyten bereits in vitro auf die Membran aufgebracht werden. Die Chondrocyten, die sich während des Wachstums in einer Kulturflasche dedifferenzieren, entwickeln nach der Aussaat auf eine Kollagenmatrix wieder einen chondrocytären Phänotyp. Ein Teil der Zellen wächst in die Matrix ein und bildet Zell-Matrix-Kontakte aus (EHLERS et al. 1999). Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Chondrocyten matrixgekoppelt in die Defekte eingebracht werden können. Es kommt zu gesteigerten Gewebevolumina in den Transplantaten und somit zu einer besseren Qualität (ANGELE et al. 1999).

1.2 Ziel der Arbeit

Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden zur Knorpelreparation bzw. -regeneration. Zielsetzung dieser Studie war der Vergleich verschiedener operativer Knorpelersatztechniken unter morphologischer Beurteilung des entstandenen Ersatzgewebes. Hinsichtlich der Knorpelregeneration konnten einige Untersucher an Kleintiermodellen mit unterschiedlichen Therapieverfahren gute Ergebnisse vorweisen (GRANDE et al. 1989, FRENKEL 1997, WAKITANI et al. 1998). Kleintiere besitzen jedoch eine hohe spontane Knochenneubildungsrate, eine geringe Knorpeldicke und eine höhere Zelldichte (STOCKWELL 1978). Die Interpretation von Versuchsergebnissen ist daher bei Tieren wie Ratten oder Kaninchen auch hinsichtlich der Knorpelneubildung problematisch. Um eine Übertragbarkeit auf den Menschen herstellen zu können, etablierten wir ein Großtiermodell mit einem dem Menschen entwicklungsgeschichtlich und bezüglich der Knorpeldicke näher stehenden Tier, dem Schaf. Es wurden folgende Fragen untersucht:

- 1) Welchen Beitrag zur Knorpelregeneration leisten die autologen Chondrocyten? Gibt es Unterschiede in Bezug auf die Gewebeneubildung

zwischen den mit den verschiedenen Therapieverfahren behandelten Versuchsgruppen?

- 2) Können die eingebrachten Zellen ein differenziertes Ersatzgewebe mit der für den hyalinen Gelenkknorpel typischen zonalen Gliederung bilden?
- 3) Welchen Einfluss hat die Defektlokalisierung auf die Knorpelregeneration?
- 4) Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Kollagenmatrices auf die Gewebekonstruktion im Defektareal?
- 5) Hat die Fixation der Transplantate durch Naht oder durch die Verwendung von Fibrinkleber einen Einfluss auf die Geweberegeneration?
- 6) Ist es sinnvoll und notwendig, den von O'DRISCOLL et al. (1986b) entwickelten Score zur histologischen Beurteilung von Knorpeldefekten weiter zu differenzieren?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 37 weibliche Schafe benötigt. Da sie nicht als reinrassige Versuchstiere gezüchtet werden, wurden Schafe aus landwirtschaftlichem Nutztierbestand verwendet, die zwischen anderthalb und zwei Jahren alt waren. Sie wurden in Freiweidung gehalten und erhielten zusätzlich Krafffutter und Wasser. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit Paragraph 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl.I Seite 1105) mit Genehmigungsschreiben vom 1. September unter der Versuchsnummer X252-72241.122-15 (34-6/98) durchgeführt.

2.2 Membranen

In unseren Versuchen verwendeten wir zwei verschiedene Membranen als Träger für die zu implantierenden Chondrocyten. Bei der einen handelte es sich um eine Kollagen I/III-Membran (Biogide®, Geistlich Biomaterials, Wollhusen, Schweiz). Sie besteht aus Kollagen Typ I/III porcinen Ursprungs, welches in einem von der Herstellerfirma geschützten und daher nicht näher spezifizierten Verfahren gewonnen wird. Durch spezielle Reinigungsverfahren werden Fett- und Proteinreste sowie für eventuelle allergische Reaktionen verantwortliche Telopeptide vollständig entfernt. Das Herstellungsverfahren führt zu einer Bilayerstruktur der Membran. Die fibröse Seite erleichtert das Anwachsen der Zellen, während die andere Seite, als semipermeable Membran, eine zellokklusive Barriere darstellt, aber für das Nährmedium durchlässig ist. Durch ihren hohen Gehalt an elastischen Fasern schrumpft die Membran auch im feuchten Zustand nicht und weist eine hohe Stabilität auf. Sie ist laut Herstellerangaben nach etwa sechs Monaten vollständig resorbiert.

Bei der anderen Membran handelte es sich um eine Kollagen II-Membran, die im Institut für Molekularbiologie der Universität zu Lübeck durch ein geschütztes Verfahren mittels Solubilisierung aus porkinem Knorpel gewonnen wurde.

2.3 Operationsverfahren

2.3.1 Narkose

Die Tiere wurden mit einer intramuskulären Injektion, bestehend aus 0,01 mg/kg Atropin, 1 mg/kg Xylazin und 1 mg/kg Ketamin (S), prämediziert und während der Operation ruhiggestellt. Anschließend erfolgte die Anlage einer Spinalanästhesie mit 1,4-1,8 ml 0,5% Bupivacain.

2.3.2 Operation 1

Für die autologe Chondrocytentransplantation wurde den Tieren der zellgebundenen Therapieformen aus unbelasteten Arealen des patellaren Gleitlagers des gegenseitigen Knies arthroskopisch Knorpel entnommen.

2.3.3 Zellzüchtung

Nach der Knorpelentnahme wurden die Zellen nach dem von EHLERS 1999 beschriebenen Verfahren angezüchtet:

- 1) Materialentnahme
- 2) Zerkleinerung des Materials in 1-2 mm² große Stücke
- 3) Inkubation mit 0,1% Collagenase (Sigma C9891) und 0,5% Hyaluronidase (Sigma H3506) für acht Stunden bei 37°C
- 4) Filtern der Zellsuspension mittels eines Nylonfilters zur Entfernung restlicher Knorpelmatrixbestandteile
- 5) Zentrifugation
- 6) Resuspension in einem Kulturmedium aus Ham's F-12 (Biochrom KG FG0815), 12% fetalem Kälberserum (Biochrom KG S0115), 50 µl/ml

Streptomycin/Penicillin (Biochrom KG A2213), 50µl/ml Glutamin (Biochrom KG K0282) und 50µl/ml nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom KG K0363).

- 7) Kultur der Zellen bis zur Konfluenz in 80cm³ Kulturflaschen bei 37°C, wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂, etwa 4-6 Wochen
- 8) Trypsinisierung und Zählung der Zellen
- 9) Aussaat der Zellen auf die Membranen

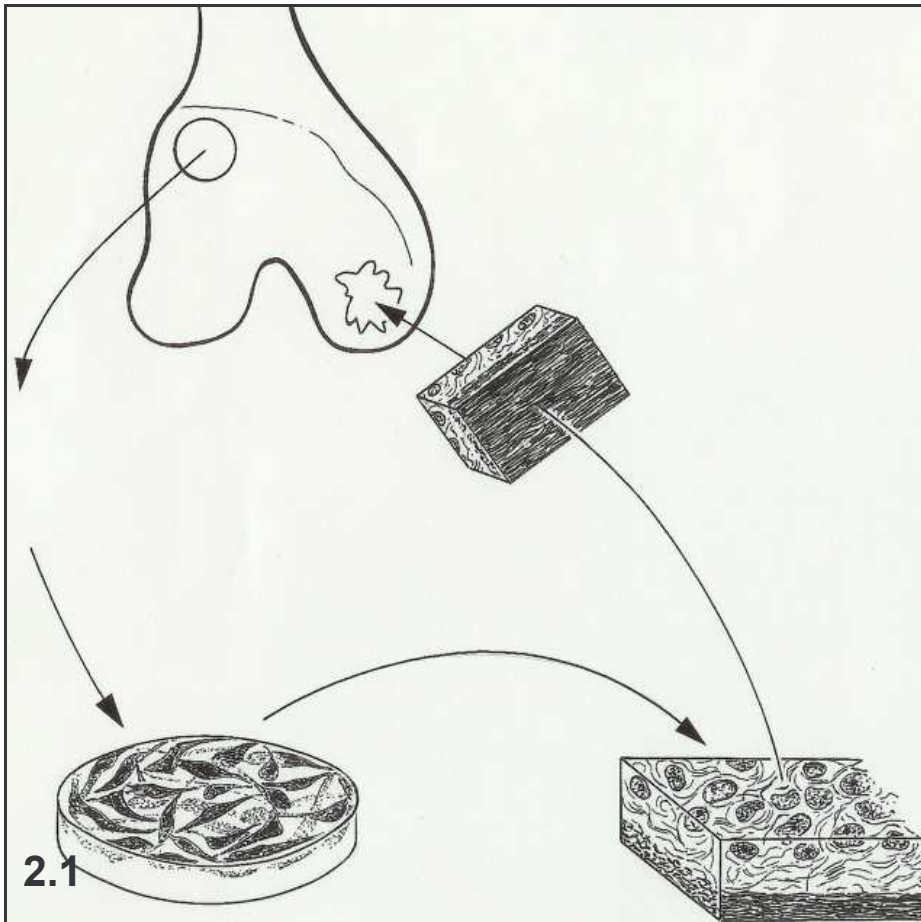


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Entnahme des anzuzüchtenden Knorpels aus nicht belasteten Gelenkarealen, Anzuchtung, Aussaat auf die Membran, sowie Transplantation in den Defekt.

2.3.4 Operation 2

Nach vier Wochen erfolgte eine mediale Arthrotomie. Diese wurde bei den Tieren, denen zuvor bereits Knorpel entnommen wurde auf der Gegenseite durchgeführt. Es wurden vier standardisierte Defekte mit jeweils sieben Millimeter Durchmesser in das Kniegelenk der Schafe gesetzt. Zwei Defekte wurden in der Belastungszone des medialen Kondylus platziert, zwei weitere in ein weniger belastetes Areal auf der patellaren Gleitbahn des Femurs. Es wurde versucht jeweils einen chondralen und einen osteochondralen Defekt zu schaffen, was aufgrund der geringen Knorpeldicke jedoch nur in einigen Fällen gelang. Bei den meisten Defekten wurde der subchondrale Knochen eröffnet (Grafik 10). In den unterschiedlichen Gruppen wurde die vorgesehene Defektdeckung durchgeführt und anschließend das Gelenk wieder schichtweise verschlossen. Die Extremität

wurde nach der Operation zehn Tage im Gips ruhig gestellt und die Tiere isoliert. Im Anschluss erfolgte die Freiweidung.

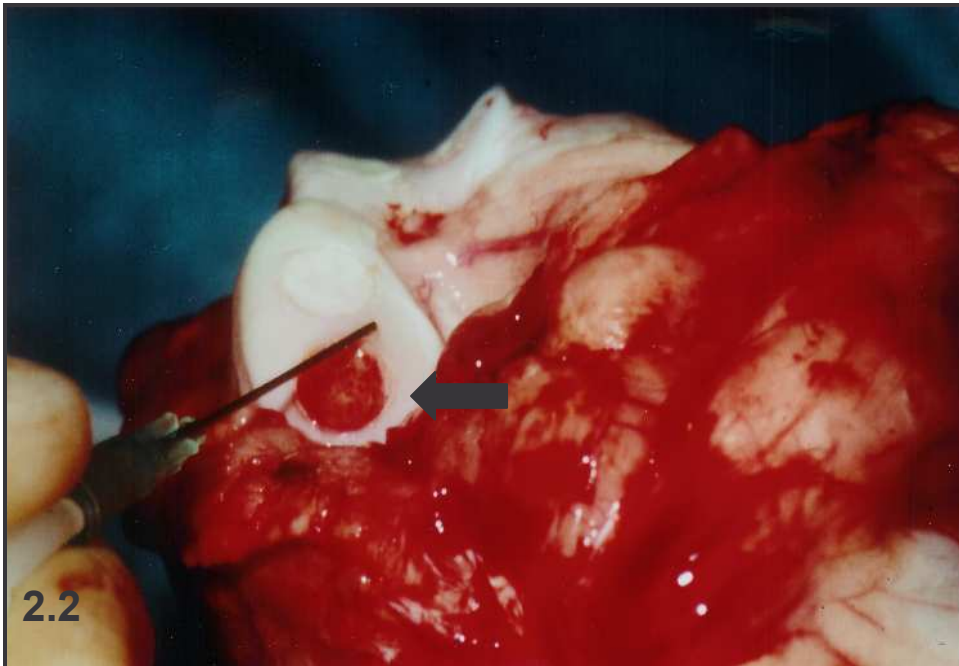


Abb. 2.2: Die Defekte auf der patellofemorale und der kondylären Gelenkfläche werden bei der zweiten Operation gedeckt (Pfeil auf kondylärem Defekt)

2.4 Einteilung der Versuchsgruppen

Die Tiere wurden zur besseren Übersicht mit einem Buchstaben-Zahlen-Code versehen und in sieben Versuchsgruppen eingeteilt. Die Einteilung in die Versuchsgruppen erfolgte in der Klinik für Orthopädie des UK-SH, Campus Lübeck. Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen war bei der histologischen Beurteilung der Defekte nicht bekannt.

- 1) Kontrollgruppe (K): die Defekte werden leer belassen
- 2) Kollagen I/III geklebt, leer (BLK): Einkleben der Kollagen I/III-Membran (Biogide®, Geistlich Biomaterials, Wollhusen, Schweiz) ohne Zellen mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)
- 3) Kollagen I/III geklebt, mit Zellen (BZK): Einkleben der mit 1×10^6 autologen Chondrocyten besäten Kollagen I/III-Membran (Biogide®, Geistlich

Biomaterials, Wollhusen, Schweiz) mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)

- 4) Kollagen I/III genäht, mit Zellen unterspritzt (BZN): Einnähen der Kollagen I/III-Membran (Biogide®, Geistlich Biomaterials, Wollhusen, Schweiz). Unterspritzung mit 1×10^6 autologen Chondrocyten pro Defekt und Abdichtung mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)
- 5) Periost mit Zellen unterspritzt (PZ): Gewinnung eines Periostlappens, Einnähen in den Defekt mit der Kambiumschicht nach unten: Unterspritzung mit 1×10^6 autologen Chondrocyten pro Defekt und Abdichtung des Periostlappens mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)
- 6) Kollagen II geklebt, leer (CLK): Einkleben einer Kollagen II-Membran (Molekularbiologie, Universität Lübeck) ohne Zellen mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)
- 7) Kollagen II geklebt, mit Zellen (CZK): Einkleben einer mit 1×10^6 autologen Chondrocyten besäten Kollagen II-Membran (Molekularbiologie, Universität Lübeck) mit Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno Baxter, Heidelberg)

Die Zugehörigkeit der Tiere zu den einzelnen Gruppen sowie die Abkürzung des Gruppennamens ist aus Tabelle 1 ersichtlich

Tabelle 1

Kontrolle (K)	Kollagen I/III geklebt leer (BLK)	Kollagen I/III geklebt, mit Zellen (BZK)	Kollagen I/III genäht, unterspritzt mit Zellen (BZN)	Periost genäht, unterspritzt mit Zellen (PN)	Kollagen II geklebt, leer (CLK)	Kollagen II geklebt, mit Zellen (CZK)
HB11	HB15	HB21	HB45	HB29	HB4	HB3
HB12	HB16	HB23	HB46	HB41	HB8	HB5
HB13	HB17	HB25	HB47	HB43	HB10	HB34
HB14	HB18	HB26	HB49	HB44	HB39	HB36
HB22	HB19	HB28	HB51	HB48		HB37
	HB20	HB2				HB40

2.5 Gewebeentnahme

Nach einem Jahr Freiweidung erfolgte die Gewinnung des Materials für die Histologie. Aus den therapierten Kniegelenken wurden die Defektareale einschließlich des darunter liegenden Knochens, sowie eine Synoviaprobe aus dem medialen Recessus, entnommen.

2.6 Lichtmikroskopie

2.6.1 Fixierung, Entkalkung, Einbettung

Die Fixierung der Präparate wurde im Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch nach ROMEIS (1989) durchgeführt. Die Synoviapräparate wurden über Nacht fixiert, während die größeren Knorpel-Knochen-Präparate bis zu fünf Tage in der Fixationslösung verblieben. Die Synoviapräparate wurden anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Paraffin überführt und ausgegossen. Bei den Knorpel-Knochen-Präparaten erfolgte vor der Entwässerung und dem Ausgießen noch die Entkalkung in 25% EDTA bei pH 7,4. Hierfür wurden die Präparate in einem Gazesäckchen in die Lösung gehängt und für drei Monate bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. In dieser Zeit wurde die Lösung im ersten Monat alle zwei Wochen, danach alle vier Wochen gewechselt.

2.6.2 Schnittgewinnung und Färbung

Von den Synoviapräparaten wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Knorpel-Knochen-Präparate wurden nach der Entkalkung zugeschnitten, so dass es anschließend möglich war, repräsentative Schnitte durch die Zentren der jeweils nebeneinander liegenden Defekte anzufertigen. Diese Schnitte besaßen eine Dicke von 10 µm und wurden ebenfalls auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach dem Entparaffinieren und der Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit Routinemethoden nach Masson-Goldner und mit Hämatoxylin-Eosin (beide nach ROMEIS 1989) gefärbt und mit Entellan eingedeckt. Die Alcianblaufärbung bei pH 1.0 wurde ebenfalls

nach der Standardmethode (ROMEIS 1989) durchgeführt und mit Kernechtrot gegengefärbt.

2.7 Scoring-Systeme zur histologischen Beurteilung des Regeneratgewebes

Um Gewebe in Knorpeldefekten semi-quantitativ zu beurteilen, sind verschiedene Scores entwickelt worden (O'DRISCOLL 1986b; PINEDA 1992). Bei der Beurteilung mit Hilfe dieser Scores wird speziellen Eigenschaften des Regeneratgewebes ein bestimmter Punktwert zugeordnet. Die maximal erreichbare Punktzahl entspricht intaktem hyalinem Gelenkknorpel.

2.7.1 Scoring nach O'Driscoll et al. (1986b)

In unserer Untersuchung wurde der von O'Driscoll et al. entwickelte Score angewendet. Zunächst wurde das prädominante Gewebe im Defekt beurteilt. Als prädominant galt der Gewebetyp, der 50 oder mehr Prozent des gesamten Defektgewebes ausmachte. Es wurde dabei zwischen hyalinem Knorpel, schlecht differenziertem Faserknorpel und fibrösem Gewebe und/oder Knochen unterschieden. Um den Gehalt an sauren GAGs in der Matrix und damit ihre normale Zusammensetzung zu überprüfen, wurde die Anfärbbarkeit des Defektgewebes in der Safranin-O-Färbung beurteilt. In unserem Fall wurde die Färbung durch eine Alcianblaufärbung bei pH 1.0 ersetzt, welche ebenfalls saure GAGs darstellt.

Zusätzlich wurde die Oberflächenbeschaffenheit des Regeneratgewebes beurteilt. Unabhängig davon wurde die strukturelle Integrität des Gewebes untersucht. Sie zeichnete sich dadurch aus, dass Zysten und Spaltbildungen in dem unter der Oberfläche liegenden Gewebe fehlten. Des Weiteren wurde die Bindung an den umgebenden intakten Knorpel sowie die Dicke des Defektgewebes begutachtet. Bei dem von O'Driscoll beurteilten Kriterium Hypozellularität vergaben wir stets den Höchstpunktwert, da es in keinem Fall zu einer Verminderung der Zellzahl verglichen mit normalem Gelenkknorpel kam. Ebenfalls untersucht wurden die degenerativen Veränderungen im Regeneratgewebe und im angrenzenden Knorpel. Im Regeneratgewebe galten Hypozellularität und Clusterbildung als Degenerationszeichen. Im angrenzenden Gewebe wurden ebenfalls eine

verminderte Zellzahl, die Bildung von Chondrocytenclustern, sowie eine verminderte Anfärbarkeit in der Alcianblaufärbung als degenerative Veränderungen angeführt. Die maximal erreichbare Punktzahl bei diesem Score beträgt 24 Punkte. Dieser Punktwert entspricht dann normalem, intaktem Gelenkknorpel.

2.7.2 Modifiziertes Auswerteschema zur histologischen Beurteilung des Regeneratgewebes

Bei der Bewertung der Schnitte mit Hilfe des Scores von O'Driscoll zeigte sich, dass dieser Bewertungsscore nicht in ausreichendem Maße auf das entstandene Defektgewebe anwendbar war. Um das Gewebe in den Defektarealen treffender charakterisieren zu können, modifizierten wir den von O'Driscoll entwickelten Score. Die größte Veränderung erforderte die Beschreibung des dominanten Gewebetyps. Das Defektgewebe ließ sich nicht eindeutig in die drei von O'Driscoll genannten Untergruppen einordnen. Dieses Phänomen wurde einerseits dadurch erklärt, dass wir weiter differenzierbare Gewebetypen vorfanden, welche dann andererseits häufig nicht mehr als 50% des gesamten Defektareals ausmachten. In unserer Beurteilung erfolgte eine Unterteilung in hyalinen Knorpel, Faserknorpel mit und ohne säulenartige Anordnung der Zellen, faserreiches und zellreiches Bindegewebe sowie subchondralen Knochen. Für die Anteile der Gewebetypen wurden jeweils Punkte von 0-5 vergeben, die ihrem Anteil an 100% des Defektareals entsprachen. Wir wählten die Unterteilung in diese sechs Gewebetypen, um die unterschiedlichen Differenzierungsgrade des Defektgewebes besonders zu unterstreichen. Der häufig in der Literatur verwendete Begriff des „hyalinartigen Knorpels“ ist ungenau. Die Differenzierung zwischen hyalinem Knorpel und Faserknorpel mit bzw. ohne Säulen, ermöglichte eine präzisere Beurteilung des Defektgewebes.

Wir berücksichtigten ebenfalls den subchondralen Knochen, da durch sein Heraufwachsen bei einigen Tieren große Teile der Defekte gefüllt wurden. Analog zum O'Driscoll-Score beachteten wir auch, dass sich einige Defekte gar nicht füllten. Ein weiteres von uns eingeführtes Untersuchungskriterium war die Defekttiefe. Ihre Beurteilung erlaubte eine Aussage darüber, ob das Regeneratgewebe in rein chondralen oder in osteochondralen Defekten

entstanden war. Außerdem verzichteten wir bei der Beurteilung degenerativer Veränderungen auf das Kriterium der Hypozellularität, da es, verglichen mit normalem Gelenkknorpel, in den Defekten zu einer Zellvermehrung kam. Dieser Unterschied zum O'Driscoll-Score erklärte sich vor allem durch die Versuchstierart. Kaninchen haben einen wesentlich zellreicheren Knorpel als Großtiere, und Knorpeldegeneration äußert sich bei Kleintieren in einem Verlust von Chondrocyten. Analog zum O'Driscoll-Score bewerteten wir die Bildung von Chondrocytenclustern, wobei diese nahezu ausschließlich im umgebenden Knorpel und nur in Ausnahmefällen innerhalb der Defekte entstanden. Die Bildung von Clustern bewerteten wir mit Punkten von 0-3. Ebenfalls in Analogie zum von O'Driscoll entwickelten Score untersuchten wir die Adhärenz des Defektgewebes zum umgebenden Knorpel. Bei der Beurteilung dieses Kriteriums vergaben wir ebenfalls Punkte von 0-3 für die unterschiedlichen Adhärenzgrade. Zur Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit unterschieden wir jedoch lediglich zwischen einer planen und einer inkongruenten Oberfläche. Die Bewertung der sauren GAGs in der Knorpelmatrix mit Hilfe der Alcianblaufärbung bei pH 1.0 erfolgte nach demselben Schema wie beim O'Driscoll-Score. Zusätzlich bewerteten wir, ob Unterschiede bezüglich der Gewebequalität in den zwei unterschiedlichen Defektlokalisationen existierten.

Eine Gegenüberstellung der beiden verwendeten Scores findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2

O´Driscoll-Score	modifizierter Score
	<u>Defekttiefe</u> Knorpeldefekt Eröffnung des subchondralen Knochens
<u>Oberflächenbeschaffenheit</u> glatte, intakte Oberfläche 3 oberflächliche Spalten 2 Fissuren 25-100% der Tiefe 1 komplette Zerstörung 0	<u>Oberflächenbeschaffenheit</u> plan inkongruent
<u>dominierendes Gewebe im Defekt</u> hyaliner Knorpel 4 Faserknorpel 2 Bindegewebe und/oder Knochen 0	<u>Gewebemorphologie im Defekt</u> hyaliner Knorpel (HK) Faserknorpel mit Säulen (FS) Faserknorpel ohne Säulen (FOS) faserreiches Bindegewebe (FBG) zellreiches Bindegewebe (ZBG) subchondraler Knochen (SK) keine Defektfüllung 0 0% 1 1-19% 2 20-39% 3 40-59% 4 60-79% 5 80-100%

<u>Bindung an intaktes Gewebe</u>		<u>Adhärenz zum umgebenden Knorpel</u> (Grad 0-3)	
beidseitige Bindung	2	keine Adhärenz zur Umgebung	0
teilweise Bindung	1	ca. ein Drittel des Defektgewebes ist adhären	1
keine Bindung	0	ca. zwei Drittel des Defektgewebes sind adhären	2
		vollständige Einheilung	3
<u>strukturelle Integrität</u>			
normal	2		
leichte Zerstörung, inkl. Zysten	1		
schwere Auflösung	0		
<u>Dicke</u>			
100% Dicke	2		
50-100% Dicke	1		
0-50% Dicke	0		
<u>Hypozellularität</u>			
normale Zellularität	3		
leicht hypozellulär	2		
mäßig hypozellulär	1		
starke Hypozellularität	0		
<u>Clusterbildung</u>			
keine Cluster vorhanden	2		
25% der Zellen	1		
25-100% der Zellen	0		

<u>degenerative Veränderungen im umliegenden Gewebe</u>		<u>degenerative Veränderungen (Clusterbildung) im umliegenden Knorpel (Grad 0-3)</u>	
normale Zellularität, keine Cluster, normale Alcianblaufärbung	3	keine Clusterbildung	0
normale Zellularität, wenige Cluster, mäßige Alcianblaufärbung	2	ca. ein Drittel der Zellen	1
leichte Hypozellularität, leichte Alcianblaufärbung	1	ca. zwei Drittel der Zellen	2
schwere Hypozellularität, keine oder kaum Alcianblaufärbung	0	ausschließlich Cluster	3
<u>Alcianblaufärbung bei pH 1.0</u>		<u>Alcianblaufärbung bei pH 1.0</u>	
normale Färbung	3	normale Färbung	3
mäßige Färbung	2	mäßige Färbung	2
nur leichte Färbung	1	nur leichte Färbung	1
keine Färbung	0	keine Färbung	0
maximale Punktzahl	24		

2.8 Statistik

2.8.1 Stichproben und Gruppen

Die Score-Werte des O'Driscoll-Scores sowie die Werte des in dieser Arbeit entwickelten Scores wurden getrennt statistisch untersucht. Von jedem Schaf wurde ein Kniegelenk untersucht. Innerhalb dieses Gelenkes existierten vier Defekte an zwei unterschiedlichen Lokalisationen. Für die statistischen Analysen konnten also spezielle Gruppen verglichen werden. Da nicht alle Defekte ausgewertet werden konnten, ergab sich theoretisch eine maximale „Stichprobenvergrößerung“ um den Faktor 4. Bei den Stichproben an einem Schafsknie handelte es sich im engeren Sinne nicht um eine „abhängige Stichprobe“, da keine zeitliche Abhängigkeit bezüglich der statistischen Beobachtung bestand. Viel eher lagen Mehrfachbeobachtungen vor. Wie groß die wechselseitigen Einflüsse zwischen den Defektarealen waren, musste als unbekannt vorausgesetzt werden. Dieses Phänomen wurde statistisch problematisiert, indem wir unterschiedliche Gruppenbildungen bezüglich der Defektlokalisationen vornahmen. In dieser Arbeit werden jedoch lediglich die Unterschiede zwischen den patellofemorale und den kondylären Defekten thematisiert.

Die Gruppenbildungen mit den entsprechenden Stichprobenumfängen ergaben sich wie folgt:

O'Driscoll-Score (patellofemorale und kondyläre Defekte):	n=37
Modifizierter Score (patellofemorale und kondyläre Defekte):	n=37
Modifizierter Score (kondyläre Defekte):	n=36
Modifizierter Score (patellofemorale Defekte):	n=34

2.8.2 Statistische Tests

Aufgrund der kleinen Stichprobenumfänge kamen für die statistischen Auswertungen nur parameterfreie Tests in Frage. Um zu testen, ob die Score-Werte der einzelnen Parameter aus der gleichen Grundgesamtheit stammten, wurde der Kruskal-Wallis-Test für k-unabhängige Stichproben (SPSS 11.0) angewendet. Ergaben sich hier bezüglich bestimmter Parameter Signifikanzen ($p < 0,05$), wurden diese Parameter gezielt mit dem Mann-Whitney-Test zwischen der Kontrollgruppe und den experimentellen Gruppen untersucht. Mit dem Chi-Quadrat-Test für Kreuztabellen wurde schließlich getestet, ob bestimmte Parameter unterschiedlich verteilt waren.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der einzelnen Stichproben ergab nur in wenigen Fällen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. In weiteren wenigen Fällen zeigten sich tendenzielle Unterschiede ($p > 0,05$, $< 0,07$). Die weiterhin aufgeführten Ergebnisse der einzelnen Therapiegruppen waren folglich meistens statistisch nicht signifikant. Auch die Untersuchung mit dem Chi-Quadrat-Test ergab nur selten eine signifikant unterschiedliche Verteilung. Die Kreuztabellenanalyse mit diesem Test zeigte für die Stichprobe, in der alle nach dem O'Driscoll-Score bewerteten Defekte zusammengefasst wurden, dass eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Parameter Oberflächenbeschaffenheit ($p = 0,021$) und Clusterbildung ($p = 0,041$) vorlag. Signifikant unterschiedlich verteilt war auch das faserreiche Bindegewebe ($p = 0,043$) bei der Beobachtung der kondylären Defekte, die mit dem modifizierten Score untersucht wurden. Für die patellofemorale Defekte, die mit dem in dieser Arbeit entwickelten Score beurteilt wurden, ergab sich mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nur eine tendenziell unterschiedliche Verteilung des Parameters Faserknorpel ohne Säulen ($p = 0,066$). Für die Gesamtheit der kondylären und patellofemorale Defekte, die mit dem modifizierten Score bewertet wurden, zeigte die Kreuztabellenanalyse mit dem Chi-Quadrat-Test, dass eine signifikant unterschiedliche Verteilung des Parameters hyaliner Knorpel vorlag ($p = 0,014$).

3.2 Gruppenzuordnung

3.2.1 Kontrollgruppe (K)

Ein Gewebepblock ließ sich aufgrund einer Knochenzyste nicht mehr aufarbeiten, ein weiterer Defekt wurde durch eine totale Chondrolyse zerstört, so dass von 20 möglichen nur 17 Defekte beurteilt wurden. Zwei der 17 beurteilten Defekte füllten sich nicht.

3.2.2 Kollagen I/III-Membran leer, geklebt (BLK)

Ein Gewebestück ließ sich aufgrund einer totalen Lyse des Gewebes nicht mehr beurteilen. Deshalb wurden von 24 möglichen nur 22 Defekte bewertet. Alle Defekte waren aufgefüllt.

3.2.3 Kollagen I/III-Membran mit autologen Chondrocyten, geklebt (BZK)

In dieser Gruppe konnten durch Zerstörung eines Gewebestückes ebenfalls nur 22 von 24 Defekten untersucht werden. Einer der Defekte füllte sich gar nicht.

3.2.4 Kollagen I/III-Membran mit Unterspritzung autologer Chondrocyten unterspritzt, genäht (BZN)

In dieser Gruppe wurden 20 Defekte bewertet, die alle gefüllt waren.

3.2.5 Periostlappen mit Unterspritzung autologer Chondrocyten (PN)

In dieser Gruppe wurden ebenfalls 20 Defekte beurteilt.

3.2.6 Kollagen II-Membran leer, geklebt (CLK)

Bedingt durch starke Chondrolyse eines Defektes wurden nur 15 von 16 Defekten untersucht.

3.2.7 Kollagen II-Membran mit autologen Chondrocyten, geklebt (CZK)

Von 24 geschaffenen Defekten konnten nur 22 beurteilt werden, da es im Fall eines Gewebestückes zu einer kompletten Chondrolyse gekommen war, welche eine Beurteilung des Gewebes unmöglich machte. In einem Fall unterblieb die Gewebekonstruktion im Defektareal.

3.3 Untersuchung der Synoviapräparate

Nur in drei der untersuchten Präparate zeigte sich ein entzündliches Infiltrat mit Granulozyten und ödematöser Auflockerung des Stromas. In den anderen Präparaten stellte sich überwiegend reizlose Synovia vom Fasertypus dar.

3.4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

O'Driscoll-Score

Bei der Untersuchung der Defektareale mit Hilfe des von O'Driscoll entwickelten Scores zeigten sich nur in zwei Fällen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Versuchsgruppe, in der die mit Chondrocyten unterspritzte Kollagen I/III-Membran in die Defekte eingenäht wurde, erzielte mit 16,2 Punkten das beste Gesamtergebnis. Alle Gruppen blieben jedoch deutlich unter dem Höchstergebnis von 24 Punkten, welches normalem Gelenkknorpel entsprochen hätte. Die Gewebequalität war in vielen Fällen minderwertig. Meistens bildete sich nur Faserknorpel, Bindegewebe und Knochen.

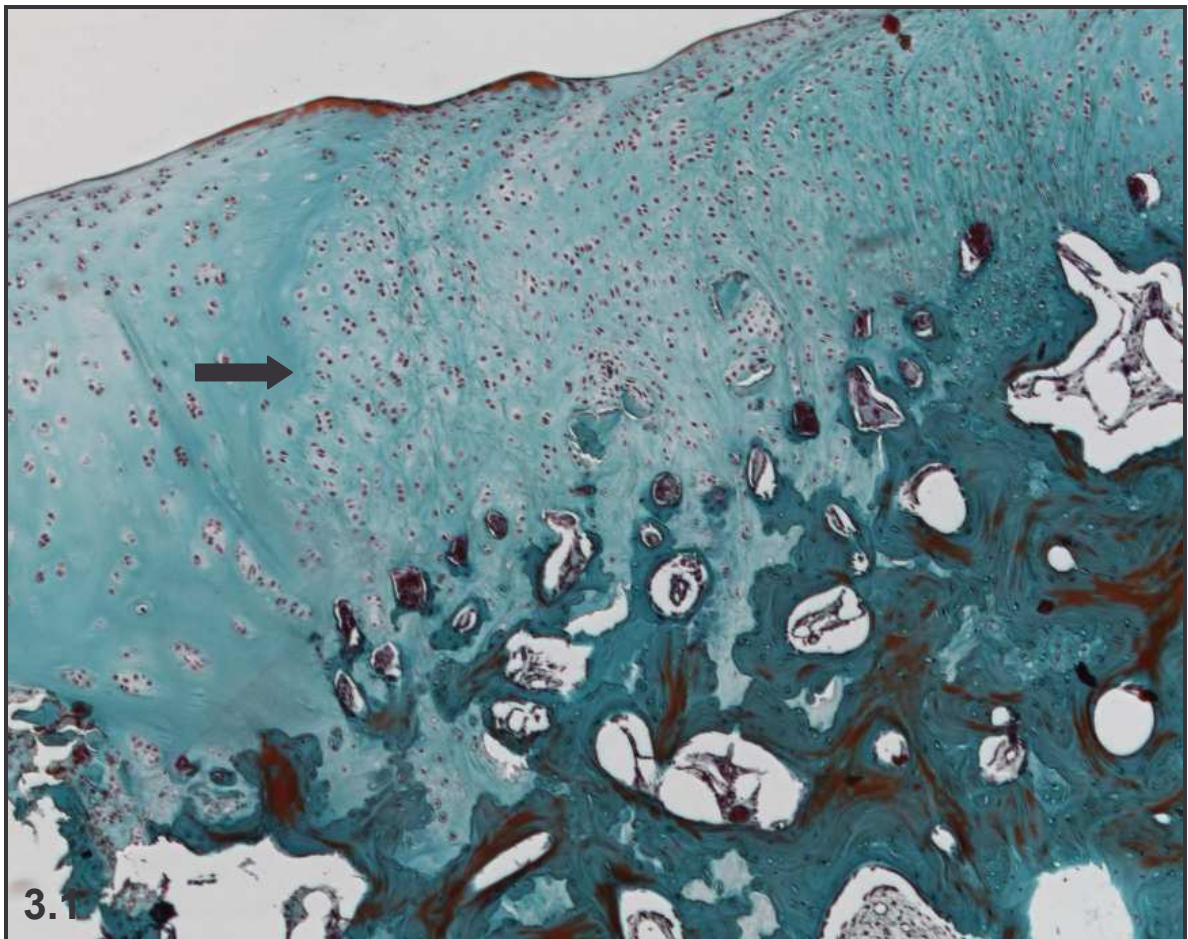


Abb. 3.1: Der Defekt (Gruppe BLK) hat sich mit Faserknorpel und Knochen gefüllt (Pfeil auf Defektgrenze). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Die beste Gewebemorphologie besaß die Gruppe, in der eine leere Kollagen I/III-Membran eingeklebt wurde. Eine glatte und intakte Oberfläche wiesen nur wenige

Defekte auf. Meistens hatten sich oberflächliche Spalten oder sogar tiefere Fissuren gebildet.

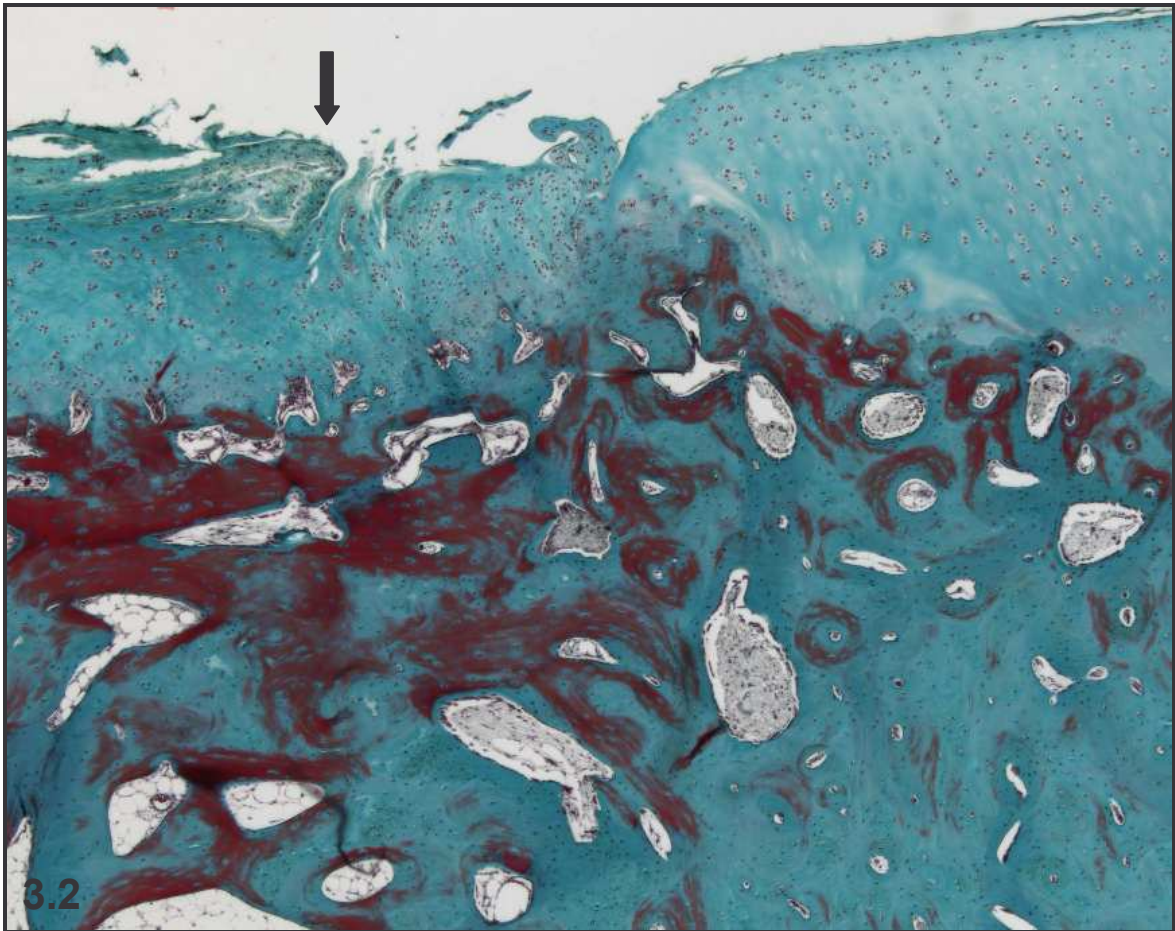


Abb. 3.2: Ausgeprägte Inkongruenz der Defektoberfläche (Pfeil) im Vergleich zum angrenzenden intakten Knorpel (Gruppe PN). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Besonders inkongruent waren die Oberflächen in der Periostgruppe (Abb. 3.2). Die strukturelle Integrität des Defektgewebe blieb meistens erhalten, lediglich in der Periostgruppe war das Gewebe etwas stärker zerstört als in den anderen. In keiner der Versuchsgruppen war das Material in den Defekten über die Hälfte eingesunken. Annähernd dieselbe Dicke wie der umgebende Knorpel hatten die Defekte in der Periostgruppe und in der Versuchsgruppe, in der die mit Chondrocyten unterspritzte Kollagen I/III-Membran eingenäht worden war. Das in den Defekten entstandene Gewebe war nur teilweise an den umgebenden Knorpel angebunden. Auch bei diesem Beurteilungskriterium erreichte die eingenähte mit Chondrocyten unterspritzte Kollagen I/III-Membran das beste Ergebnis.

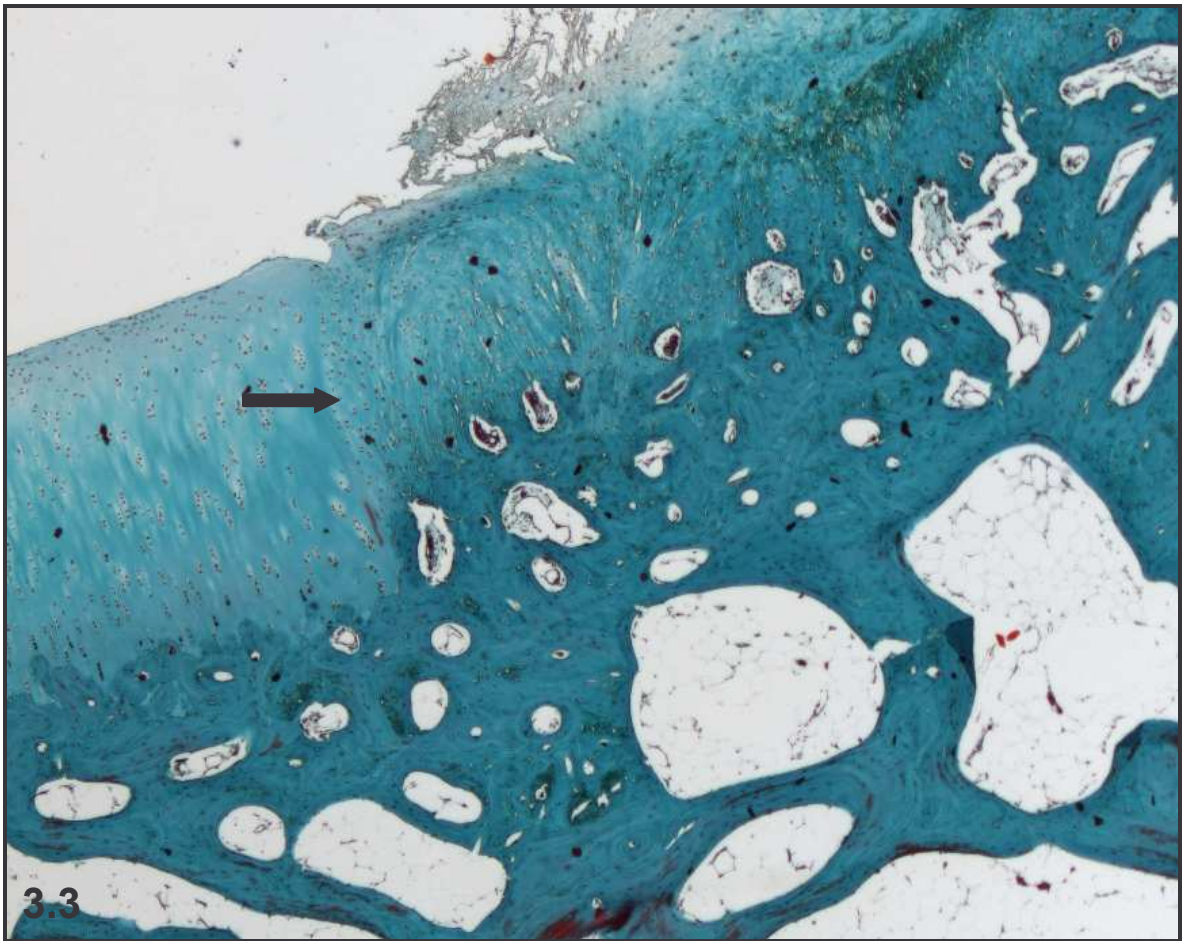


Abb. 3.3: Das Defektgewebe ist gut an das Umgebungsgewebe angebunden (Pfeil auf Defektgrenze), die Oberfläche ist jedoch sehr aufgefasert (Gruppe BLK). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Innerhalb der Defekte bildeten sich kaum Cluster. Bei der Einschätzung dieses Kriteriums erwiesen sich die beiden eingeklebten, mit Zellen besäten Kollagenmembranen als signifikant besser als die Kontrollgruppe. In der Umgebung der Defekte waren die degenerativen Veränderungen ausgeprägter (Abb. 3.4 u. 3.11). In keiner der Gruppen besaß das Umgebungsgewebe eine normale Morphologie ohne Degenerationszeichen.

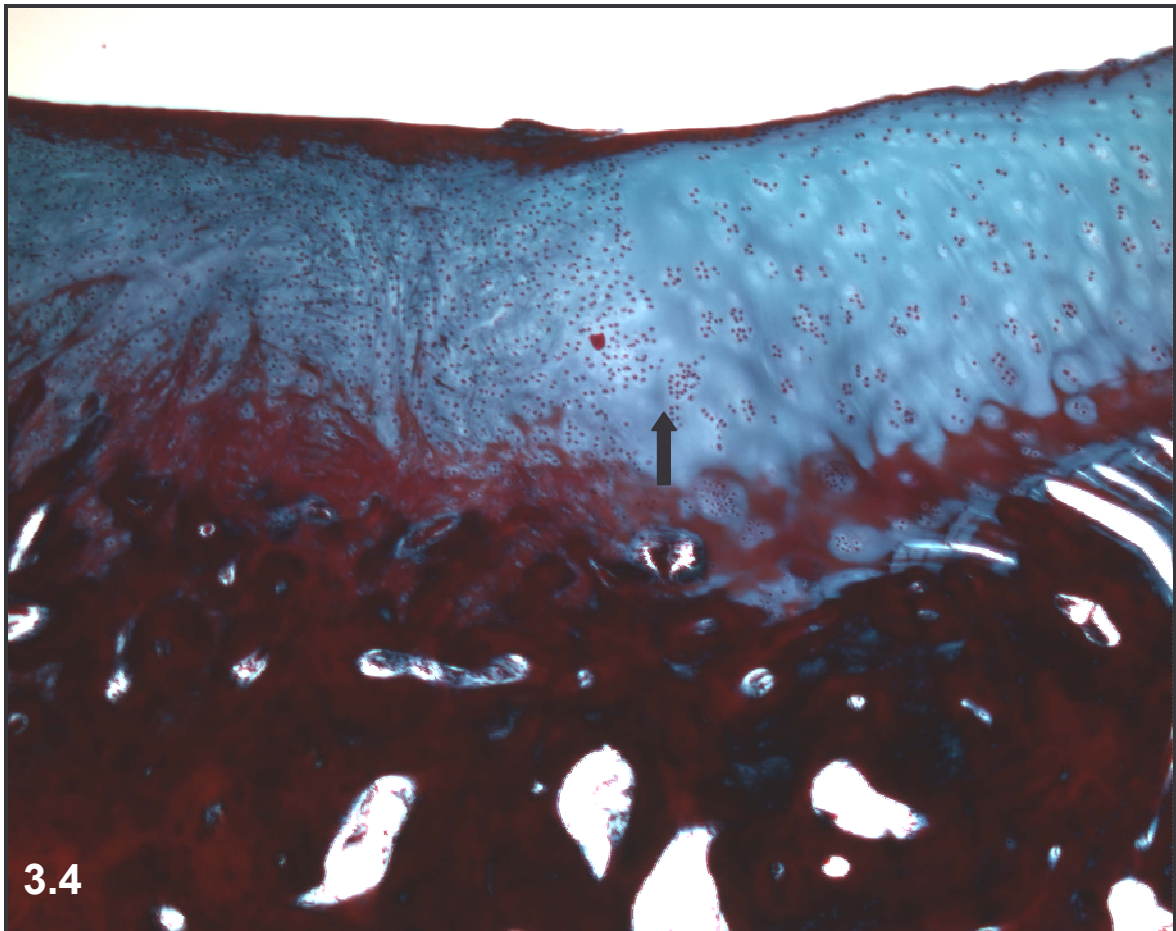


Abb. 3.4: In der Umgebung des Defektes haben sich viele Cluster gebildet (Pfeil). Innerhalb des Defektareals (Gruppe BLK) ist es zu einer starken Zellvermehrung gekommen. LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Auch innerhalb der Defektareale war die Alcianblaufärbung in allen Gruppen vermindert. Am wenigsten saure GAGs bildeten sich in der Periostgruppe (Abb. 3.5). Die Anfärbung mit Alcianblau korrelierte jedoch nicht immer mit der Gewebemorphologie. Es gelang, einzelne Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Betrachtung der Einzelkriterien herauszuarbeiten; es existierte jedoch keine Versuchsgruppe, die in allen oder den meisten Punkten signifikante Vorteile aufwies.

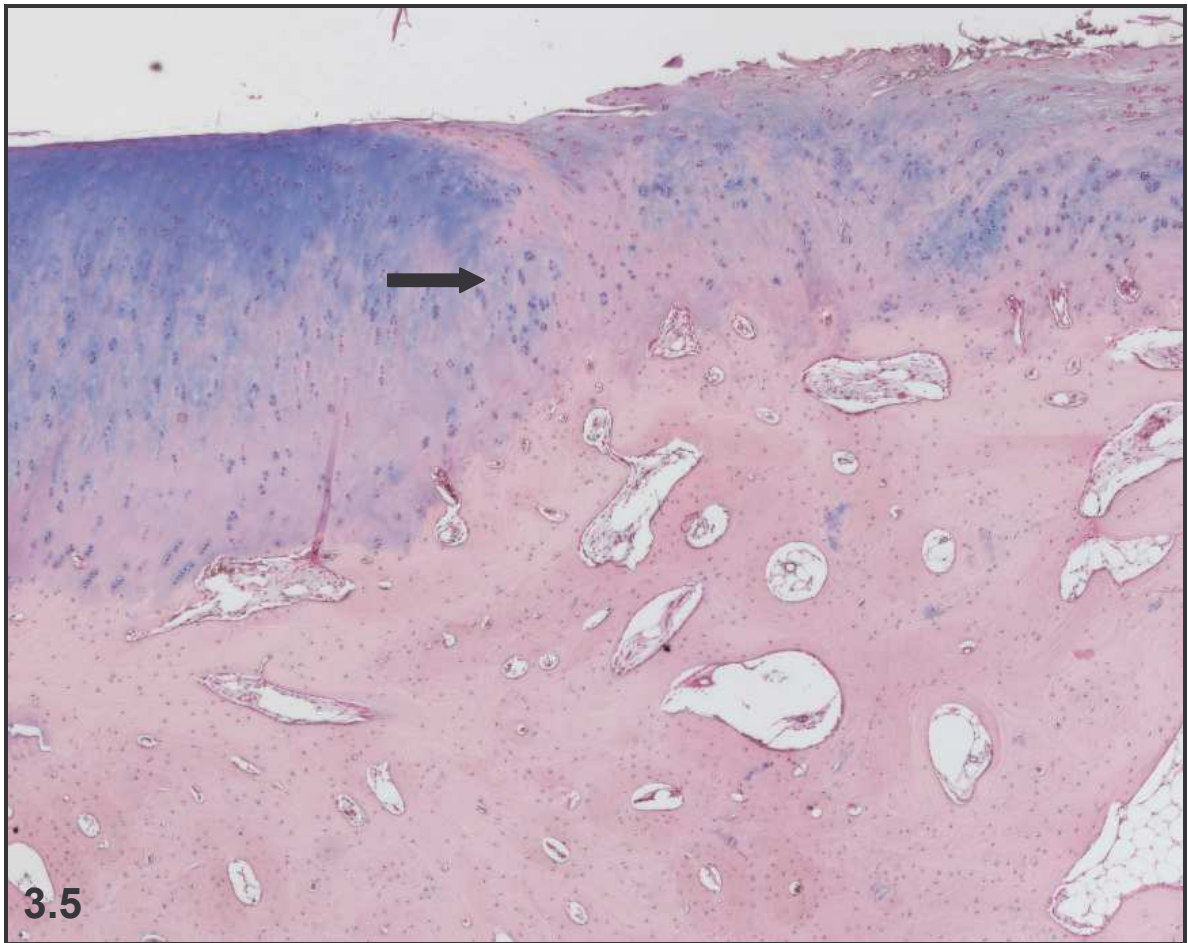


Abb. 3.5: Die Anfärbung mit der Alcianblaufärbung ist im Defektareal (Pfeil auf Defektgrenze) deutlich vermindert (Gruppe PN). LM, Alcianblau pH 1, Verg.: 2,5fach

Modifizierter Score

Bei der Bewertung mit Hilfe des von uns entwickelten Scores zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests auf alle kondylären Defekte zeigte zwar, dass die Parameter faserreiches Bindegewebe und subchondraler Knochen tendenziell nicht aus derselben Grundgesamtheit stammten (FBG $p < 0,068$; SK $p < 0,055$), die Durchführung des Mann-Whitney-Tests ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den übrigen Gruppen bezüglich dieser beiden Parameter. Bei der Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests auf die Stichprobe der patellofemorale Defekte und die der Gesamtgruppe ergaben sich bezüglich sämtlicher Parameter keine signifikanten Unterschiede, so dass der Mann-Whitney-Test nicht durchgeführt wurde. Es existierten jedoch Unterschiede, wenn auch keine statistisch signifikanten, zwischen den beiden

unterschiedlichen Defektlokalisationen. In den kondylären Defekten besaß das entstandene Defektgewebe einen höheren Differenzierungsgrad als in den patellofemorale Defekten. Es bildete sich mehr hyaliner Knorpel und Faserknorpel mit Säulen (Abb. 3.6). Es entstand allerdings auch mehr Knochen als in den patellofemorale Defekten. Insgesamt kamen die beiden Faserknorpelarten am häufigsten innerhalb der Defekte vor.

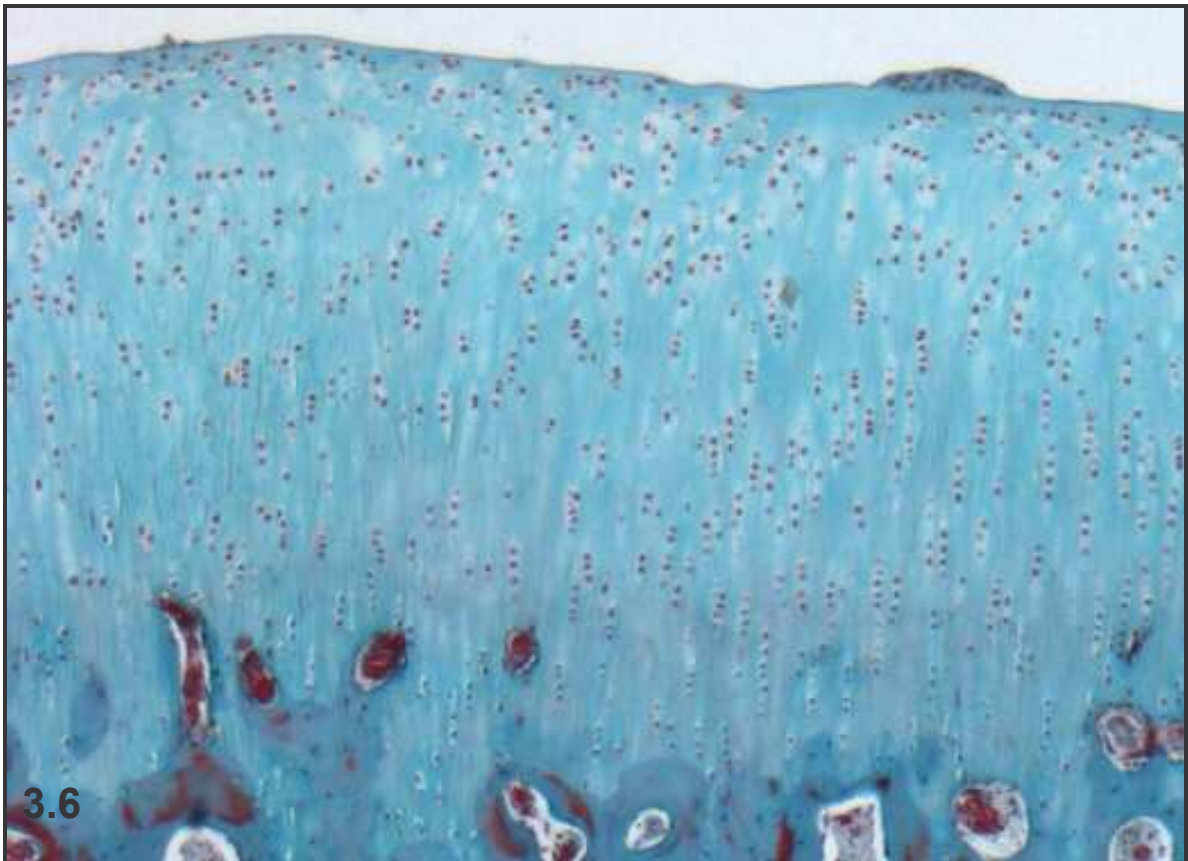


Abb. 3.6: Im Defekt ist Faserknorpel in Säulenordnung entstanden. Die Kollagenfasern sind kaum demaskiert, die Oberfläche ist plan (Gruppe CLK, kondylär). LM, Masson-Goldner, 20-fach.

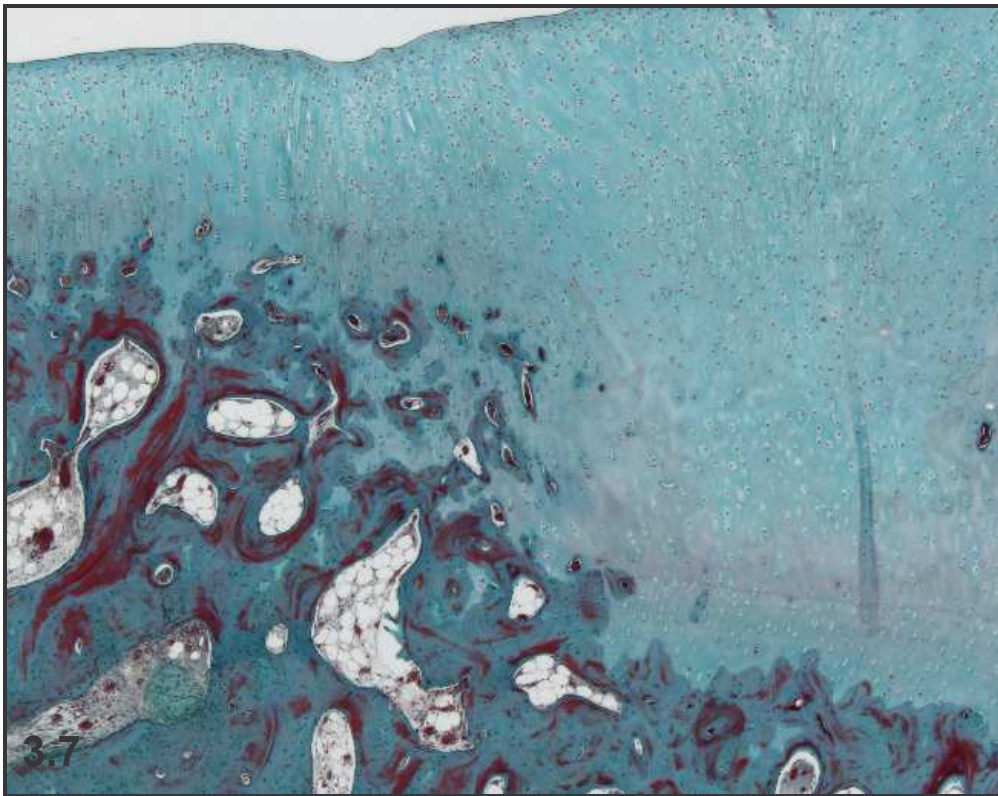


Abb. 3.7: Der Defekt ist mit subchondralem Knochen und Faserknorpel in Säulenordnung gefüllt, plane Oberfläche (Gruppe CLK, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Abb. 3.8: Der Defekt ist ausschließlich mit Faserknorpel ohne zonale Gliederung gefüllt. Die Oberfläche ist aufgefasert (Gruppe CLK, patellofemoral). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Besonders in den kondylären Defekten der Kontrollgruppe und der Periostgruppe trug der subchondrale Knochen stark zur Defektfüllung bei.

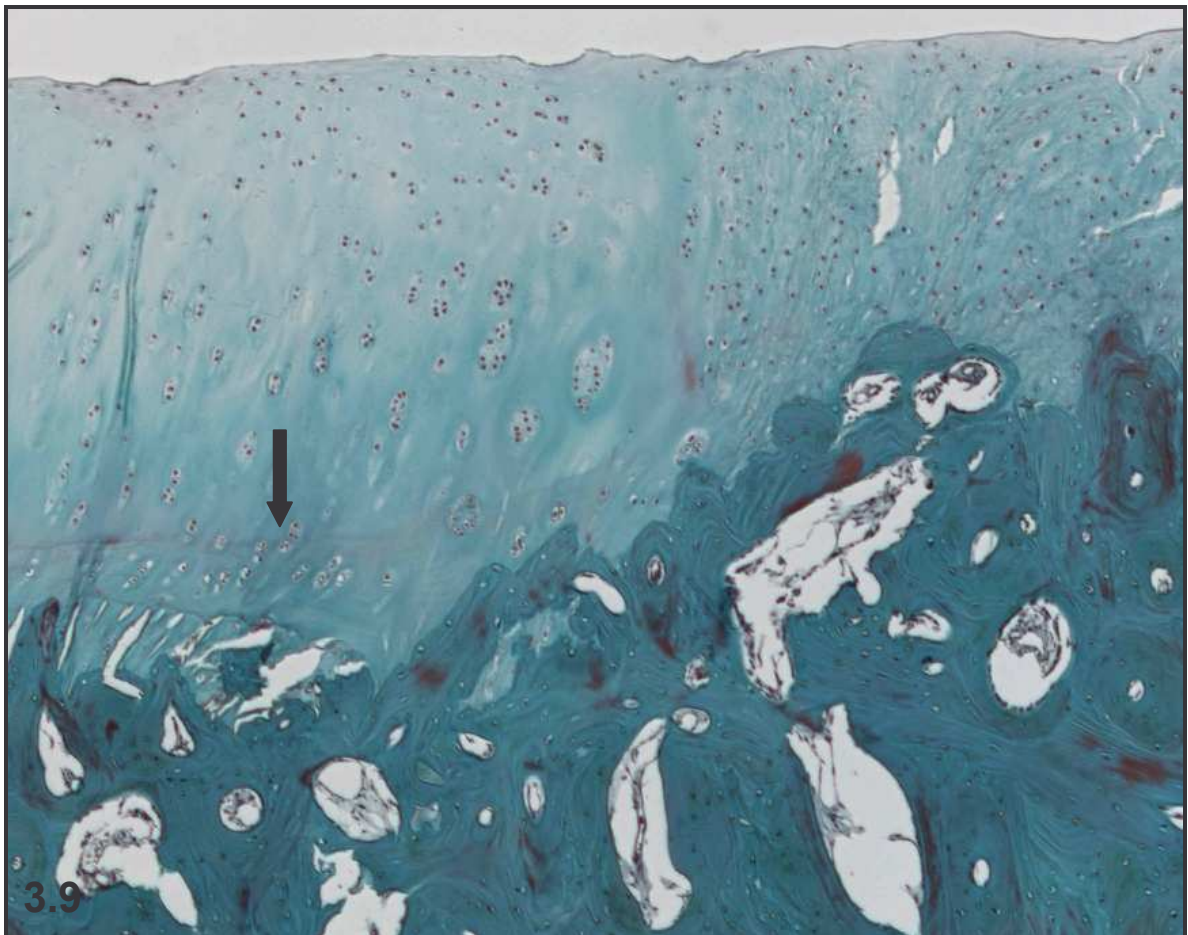


Abb. 3.9: An der ursprünglichen Tidemark (Pfeil) kann man erkennen, dass der subchondrale Knochen in den Defekt hineinwächst (Gruppe PN, kondylär). An der Defektgrenze haben sich Chondrocytencluster gebildet. LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Die kondylären Defekte besaßen in der Regel auch eine glattere Oberfläche als die patellofemorale Defekte (Abb. 3.7 u. 3.8). Die Defekte der Kontrollgruppe und der Gruppe, in der die Kollagen I/III-Membran ohne Zellen eingeklebt wurde, zeigten von allen Gruppen die beste Oberflächenbeschaffenheit. Das in den patellofemorale Defekten entstandene Gewebe heilte jedoch besser in die Umgebung ein (Abb. 3.10 u. 3.11).

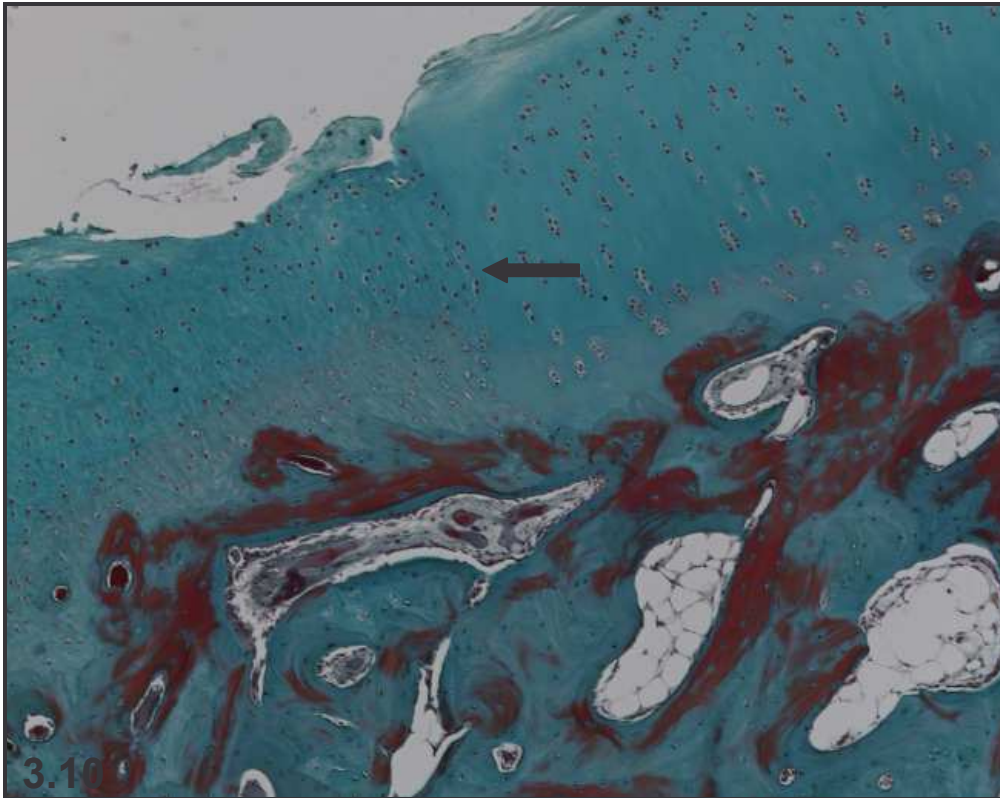


Abb. 3.10: Das Defektgewebe ist sehr gut an die Umgebung angebunden (Pfeil auf Defektgrenze) (Gruppe BZN, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Abb. 3.11: Das Defektgewebe ist gar nicht adhären (Pfeil auf Defektgrenze) (Gruppe BZK, patellofemoral). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5fach

Das Umgebungsgewebe dieser Defekte enthielt auch weniger Cluster. Es bildeten sich allerdings nur in seltenen Fällen so viele Cluster, dass man die Clusterbildung als drittgradig bezeichnen konnte. Zellreiches Bindegewebe im Sinne eines Granulationsgewebes entstand besonders in den Versuchsgruppen, in denen die Membranen mit Kleber fixiert wurden.

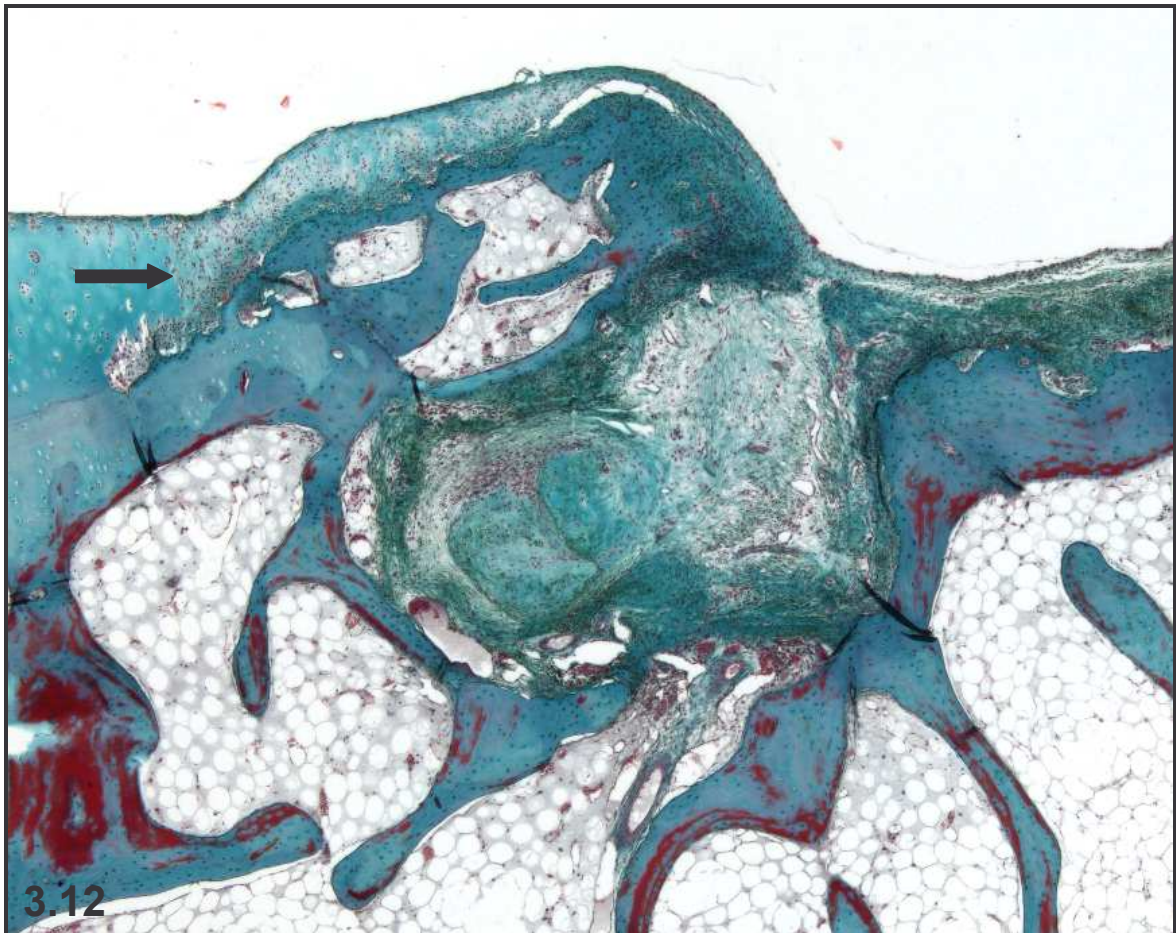


Abb. 3.12: Der gesamte Defekt ist mit zell- und faserreichem Bindegewebe ausgefüllt (Pfeil auf der Defektgrenze), in dem sich zahlreiche Blutgefäße befinden (Gruppe CLK). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

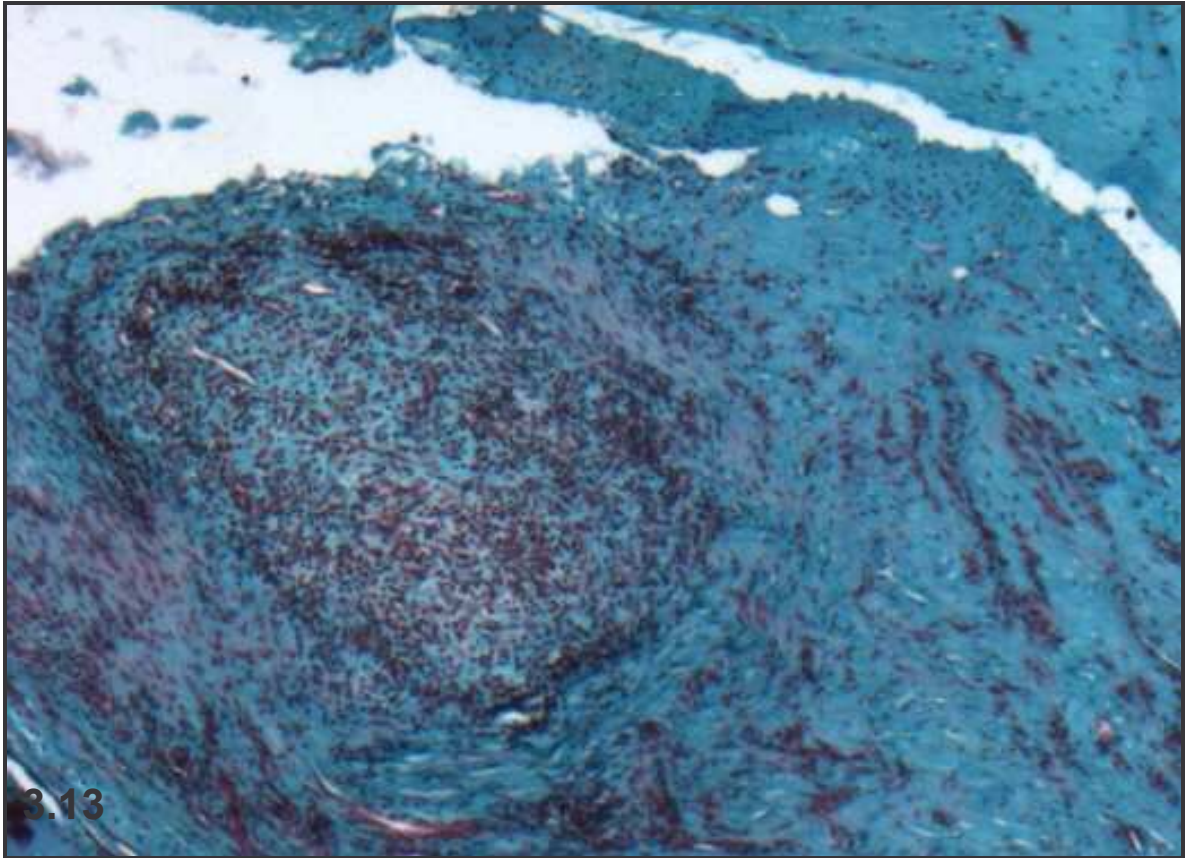


Abb. 3.13: Zellreiches Bindegewebe innerhalb eines Defektes, in dem die Membran mit Kleber fixiert wurde (Gruppe CZK, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 20-fach

Auch in der Produktion der sauren GAGs unterschieden sich die beiden Defektlokalisationen. In den kondylären Defekten war die Anfärbung mit Alcianblau, von einer Ausnahme abgesehen, stärker als in den patellofemorale Defekten.

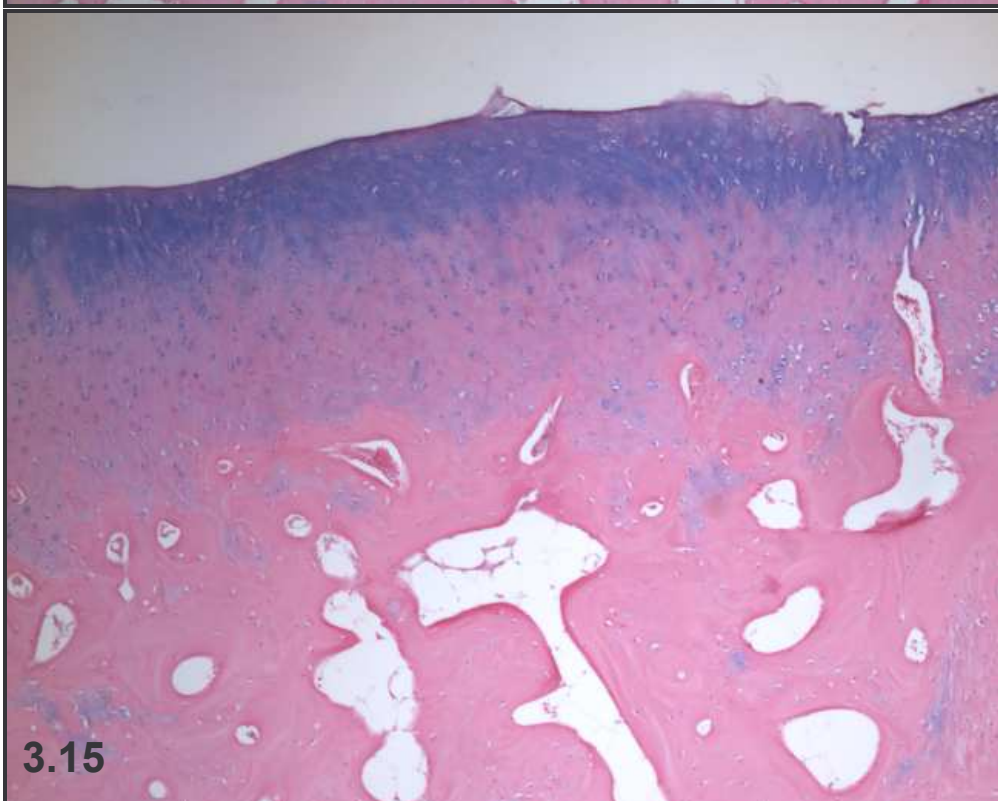
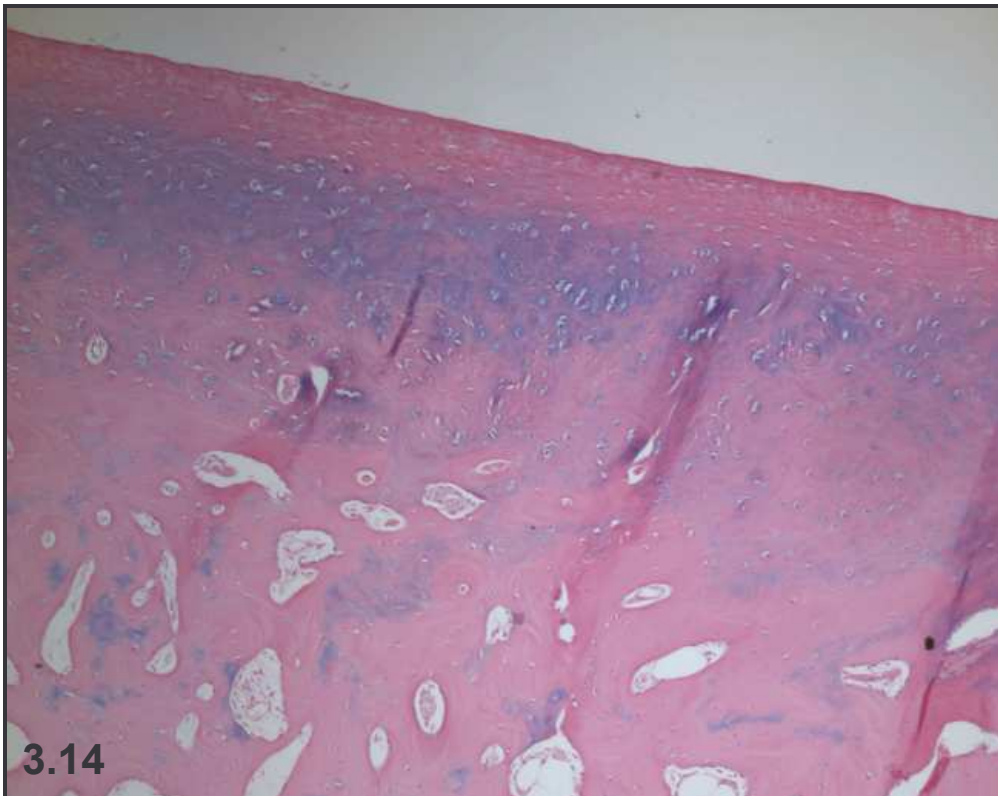


Abb. 3.14: Defekt (Gruppe BLK, patellofemoral) mit deutlich verminderter Anfärbung. LM, Alcianblau pH 1.0, Verg.: 5fach

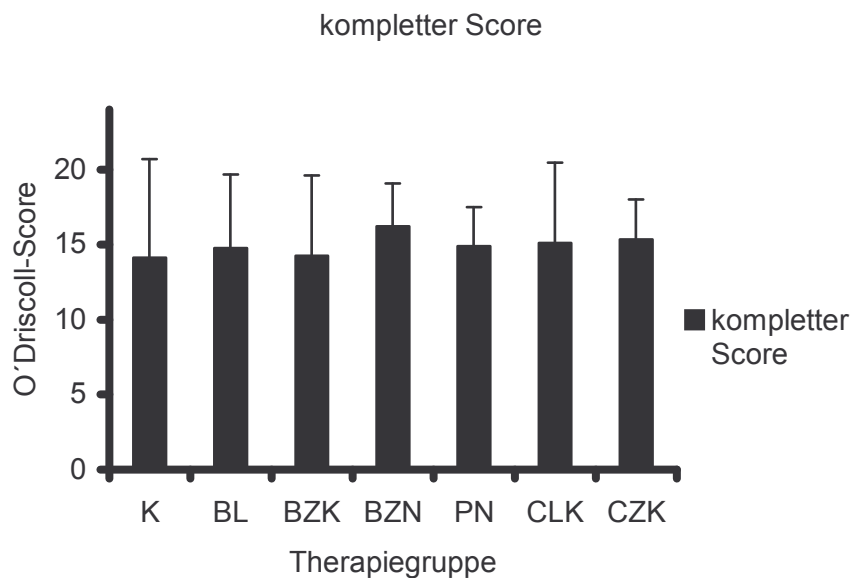
Abb. 3.15: Mit Alcianblau stärker angefärbte Matrix (Gruppe BZK, kondylär). LM, Alcianblau pH 1.0, Verg.: 5fach

Trotz der herausgearbeiteten Unterschiede erwies sich keine Versuchsgruppe als vorteilhaft hinsichtlich aller untersuchten Kriterien. Innerhalb der Versuchsgruppen existierten zudem große Unterschiede zwischen den Defektlokalisationen.

3.5 Bewertung mit dem O'Driscoll-Score

Gesamtergebnis

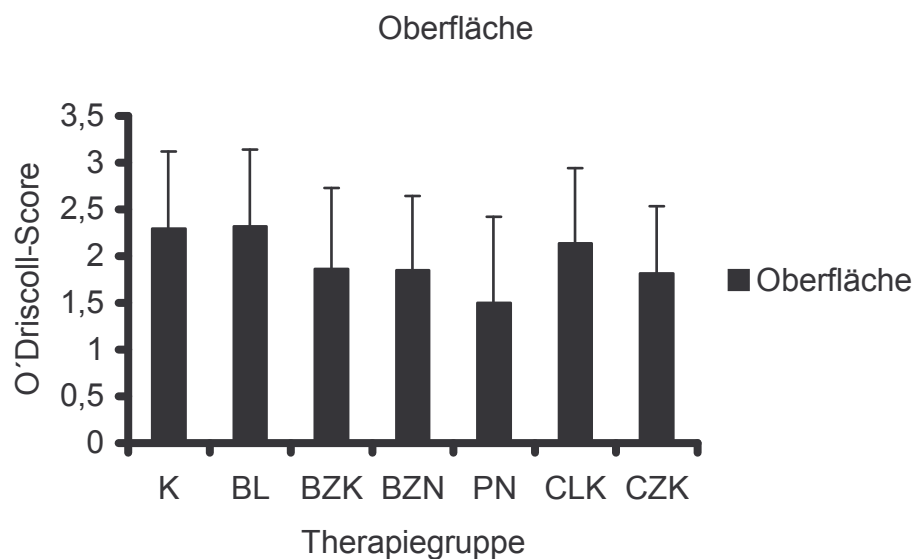
Bei der Betrachtung der Gesamtpunktzahl erzielte die Kontrollgruppe mit 14,1 das schlechteste Ergebnis. Den höchsten Wert erreichte die Gruppe mit der eingenähten und mit Zellen unterspritzten Kollagen I/III-Membran (16,2). Die gleiche Membran, mit Kleber fixiert, erwies sich als wesentlich schlechter (14,2). Nahezu gleichwertig waren die beiden Kollagen II-Membranen (CLK=15,1; CZK=15,3). Auch die leere, eingeklebte Kollagen I/III-Membran und die Defektdeckung mit Hilfe eines Periostlappens erzielten ein annähernd gleiches Ergebnis (BLK=14,8; PN=14,9).



Grafik1: Gesamtergebnis des O'Driscoll-Score

Oberflächenbeschaffenheit

Die Kontrollgruppe und die Versuchsgruppe mit der leeren Kollagen I/III-Membran besaßen, verglichen mit den übrigen Gruppen, die beste Oberflächenbeschaffenheit. In den meisten Fällen bestanden lediglich oberflächliche Spalten und nur selten ausgeprägtere Fissuren (K und BLK=2,3). Die Kollagen I/III-Membran mit Zellen erzeugte sowohl eingeklebt als auch eingenäht eine unregelmäßigere Oberfläche. Es entstanden sowohl Spalten als auch tiefere Fissuren (BZK und BLK=1,9). Besonders ausgeprägt war die Fissurenbildung in der Periostgruppe. Sie besaß die schlechteste Oberflächenqualität (1,5). Die Oberfläche der mit der leeren Kollagen II-Membran therapierten Defekte war meistens glatt und intakt (2,1), während dieselbe Membran, besät mit Zellen, häufiger eine unregelmäßige Oberfläche erzeugte (1,8).

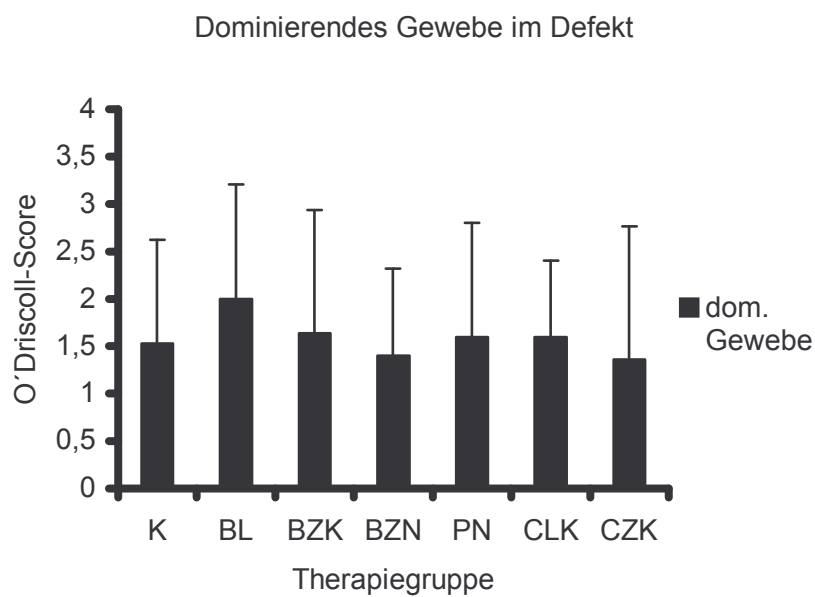


Grafik 2: Oberflächenbeschaffenheit (O'Driscoll-Score)

Dominierendes Gewebe im Defekt

In den meisten Versuchsgruppen wies das Defektgewebe nur eine geringe Differenzierung auf. Größtenteils handelte es sich um Faserknorpel oder Bindegewebe. Besonders in der Periostgruppe kam es auch zu einer ausgeprägten Knochenbildung. Hyaliner Knorpel bildete sich kaum. In den mit der besäten Kollagen II-Membran therapierten Defekten zeigte sich zwar in drei Fällen

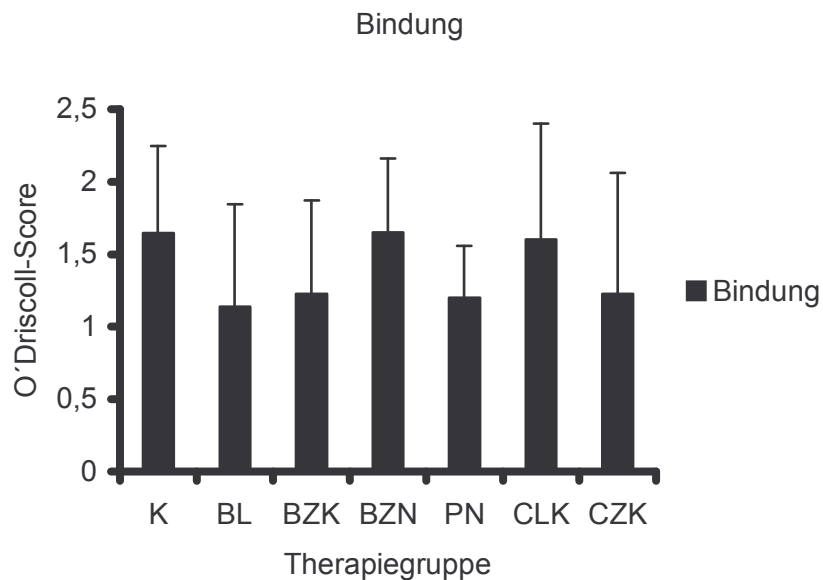
hyaliner Knorpel, es handelte sich hierbei jedoch um alten, nicht komplett ausgestanzten Knorpel. Er war stark zerstört und bestand fast ausschließlich aus Clustern. Auffällig war, dass sich die Gewebequalität in den verschiedenen Gruppen kaum unterschied (BZK, PN und CLK=1,6; K=1,5; BZN und CZK=1,4). Das beste Ergebnis erlangte die leere Kollagen I/III-Membran (2,0). Da sich auch in dieser Gruppe nur wenig hyaliner Knorpel bildete, lag auch dieser Punktwert wie in den anderen Versuchsgruppen weit unter dem maximal erreichbaren.



Grafik 3: Dominierendes Gewebe im Defekt (O'Driscoll-Score)

Bindung an intaktes Gewebe

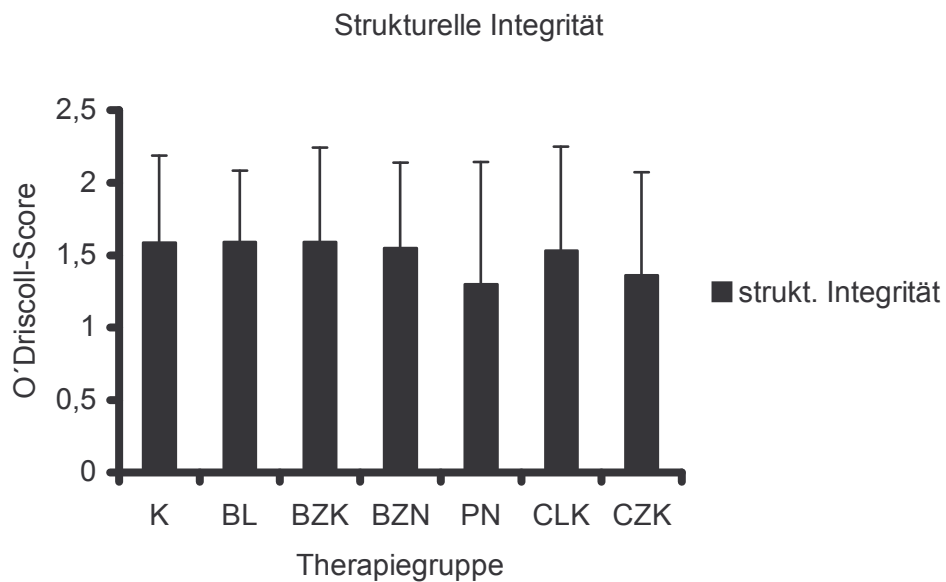
Trotz der schlechten Gewebequalität war das Defektgewebe der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe mit der leeren Kollagen II-Membran gut in die Umgebung eingeeilt (K und CLK=1,6). In der Gruppe, in der die mit Zellen unterspritzte Kollagen I/III-Membran in die Defekte eingenäht wurde, waren die meisten Defekte vollständig eingeeilt, nur in einem Fall fehlte die Integration (BZN=1,7). In den anderen vier Versuchsgruppen war das Regeneratgewebe selten vollständig adhären, meistens fand gar keine oder nur eine teilweise Einheilung in die Umgebung statt (BZK, PN und CZK=1,2; BLK=1,1).



Grafik 4: Bindung an intaktes Gewebe (O'Driscoll-Score)

Strukturelle Integrität

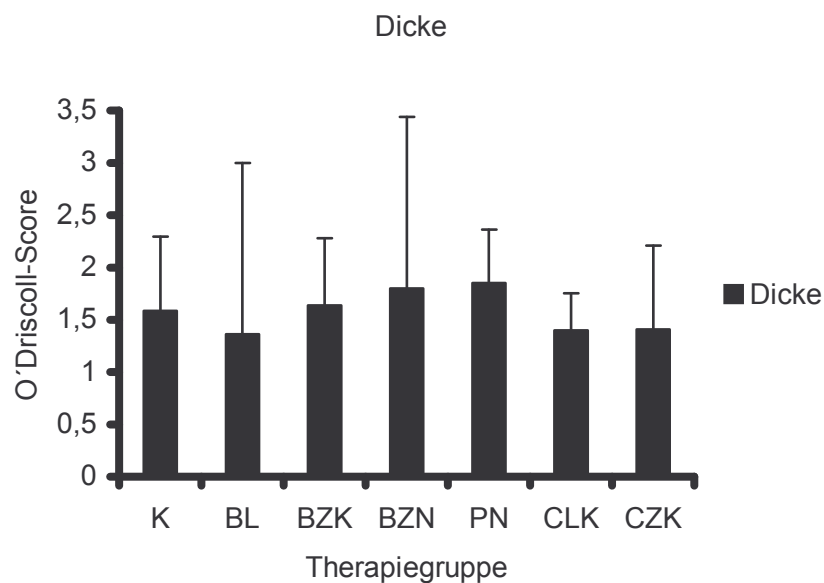
In den meisten Versuchsgruppen war das Regeneratgewebe nur leicht zerstört, so dass ein hoher Punktwert erreicht wurde (K, BLK, BZK und BZN=1,6; CLK=1,5). Dieses Kriterium wurde auch durch die schlechte Gewebequalität in einigen Defekten kaum beeinflusst. In der Gruppe, in der die Defekte mit der besäten Kollagen II-Membran therapiert wurden, war das Gewebe etwas stärker zerstört (1,4). In der Periostgruppe kamen teilweise sogar schwere Auflösungserscheinungen vor (1,3).



Grafik 5: Strukturelle Integrität des Defektgewebes (O'Driscoll- Score)

Dicke

Auch diese Eigenschaft korrelierte wenig mit der Qualität des Defektgewebes. In drei der sieben untersuchten Versuchsgruppen war das Regeneratgewebe gegenüber der Umgebung stärker eingesunken (BLK, CLK und CZK=1,4). In den anderen Gruppen lag es nahezu auf demselben Niveau wie der Umgebungsknorpel (K und BZK=1,6; BZN=1,8). Auffällig war, dass in der Periostgruppe das entstandene Gewebe zwar von schlechter Qualität und häufig zerstört war, es jedoch fast nie dünner war als der umgebende Knorpel (1,9).



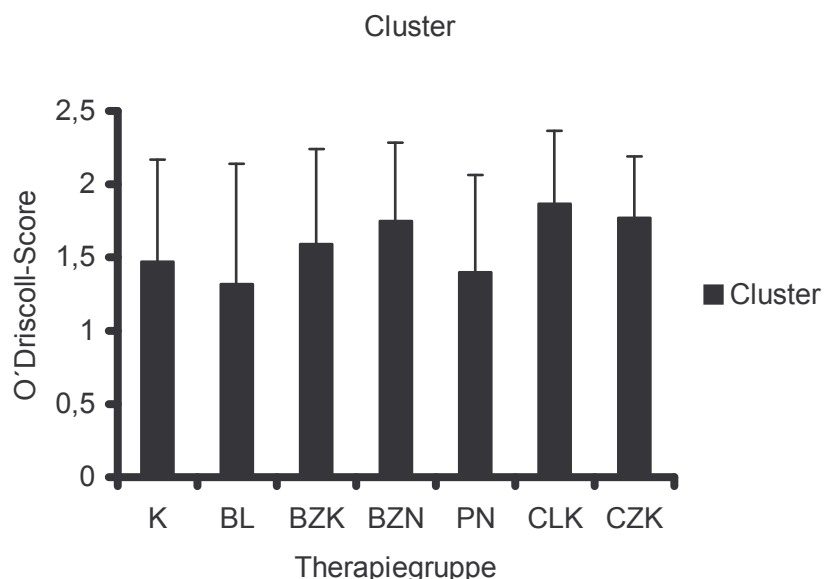
Grafik 6: Dicke des Defektgewebes (O'Driscoll-Score)

Hypozellularität

Für dieses Untersuchungskriterium vergaben wir in jedem Fall die maximale Anzahl von drei Punkten, da es aus den bereits unter Punkt 2.7.1 erwähnten Gründen nicht zu einer Verminderung der Zellzahl kam (Abb.3.4).

Clusterbildung

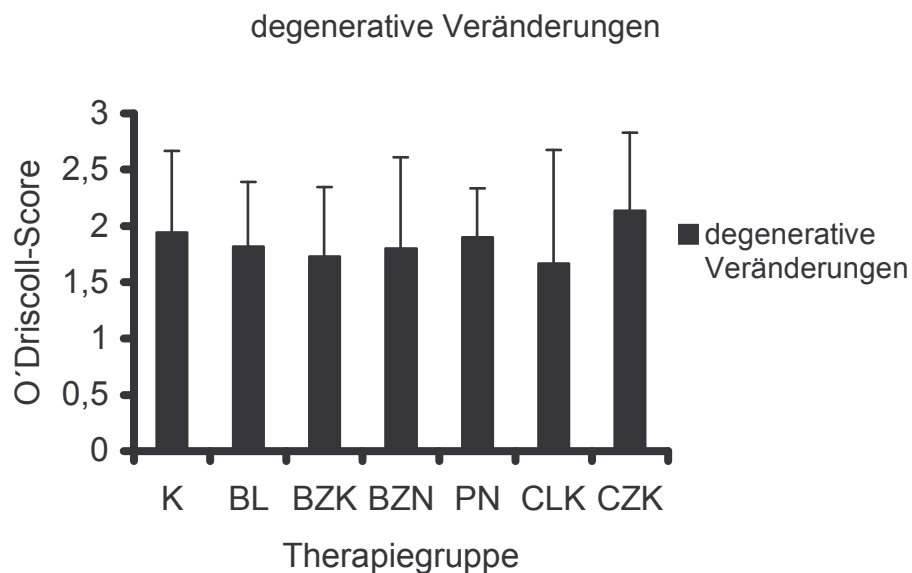
In den meisten Defekten bildeten sich nur sehr wenige Cluster. Diese Beobachtung erwies sich bei zwei Versuchsgruppen als statistisch signifikant. In den Defekten, die mit einer mit Zellen unterspritzten Kollagen I/III-Membran und mit einer eingeklebten Kollagen II-Membran mit Zellen therapiert wurden, entstanden signifikant weniger Cluster als in der Kontrollgruppe (BZN=1,8; $p < 0,05$; CZK=1,8; $p < 0,04$). Nur in zwei der Versuchsgruppen degenerierte das Defektgewebe noch stärker als in der Kontrollgruppe (K=1,5, BLK=1,3, PN=1,4). Die leere Kollagen II-Membran erzeugte die geringste Clusterbildung und erreichte einen Punktwert, der annähernd dem für hyalinen Knorpel entsprach (CLK=1,9).



Grafik 7: Clusterbildung im Defektareal (O'Driscoll-Score)

Degenerative Veränderungen im umliegenden Gewebe

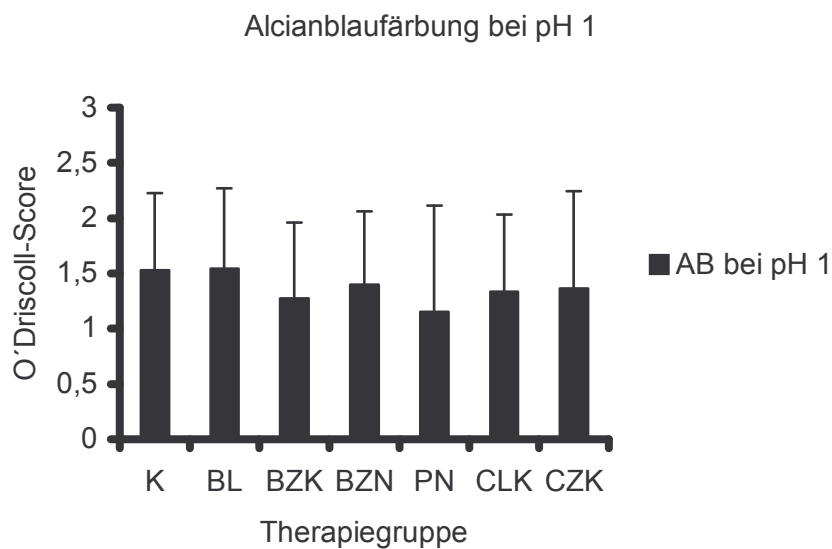
Während die degenerativen Veränderungen innerhalb der Defekte nicht besonders stark ausgeprägt waren, zeigte sich, dass das umliegende Gewebe durch die Therapie geschädigt wurde. In allen Versuchsgruppen unterschied sich die Morphologie des Umgebungsgewebes von der des gesunden hyalinen Knorpels. Es bildeten sich Cluster, und die Produktion saurer GAGs war herabgesetzt. Es existierten jedoch kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (BZK und CLK=1,7; BLK und BZN=1,8; K und PN=1,9). Am geringsten ausgeprägt waren die Veränderungen in der Versuchsgruppe, in der die mit Zellen besäte Kollagen II-Membran verwendet wurde (CZK=2,1).



Grafik 8: Degenerative Veränderungen im umliegenden Gewebe (O'Driscoll-Score)

Alcianblaufärbung bei pH 1.0

Diese Färbung zeigte, dass sich innerhalb der Defekte nur wenig GAG's bildeten. Auch bei diesem Untersuchungskriterium waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht sehr ausgeprägt. Die Defekte der Kontrollgruppe und die der Kollagen I/III-Membran leer waren am stärksten angefärbt (K und BLK=1,5). Die EZM der Defekte in der Periostgruppe enthielt am wenigsten saure Glykosaminoglykane (PN=1,2). Das Färbeverhalten korrelierte jedoch nicht immer mit der Morphologie des dominierenden Gewebes.

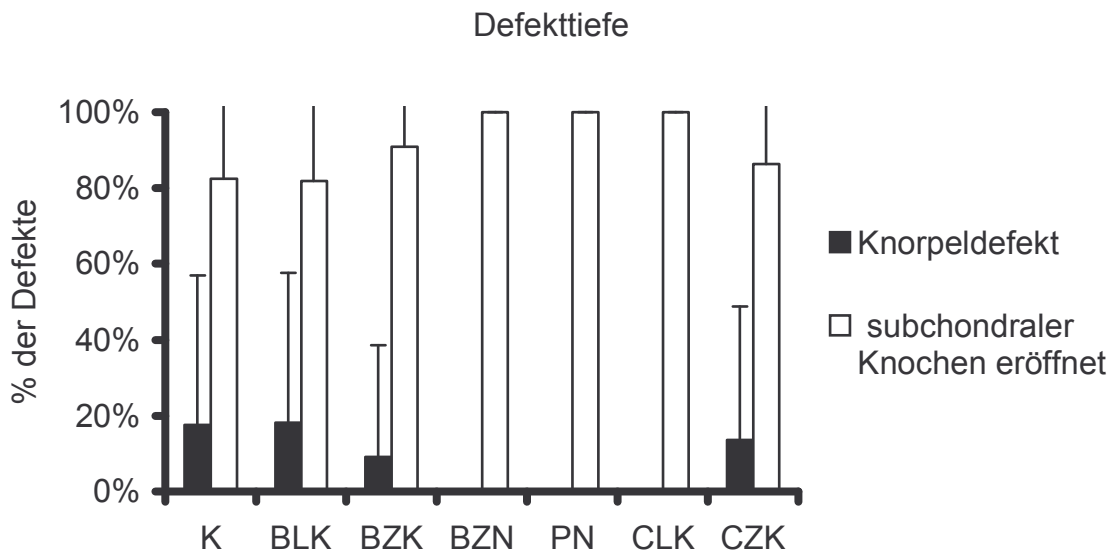


Grafik 9: Alcianblaufärbung bei pH 1.0

3.6 Bewertung mit dem modifizierten Score

Defekttiefe

Von den 138 Defekten, die insgesamt beurteilt wurden, waren nur 12 rein chondrale Defekte. Bei den anderen 126 Defekten war es nicht gelungen, die osteochondrale Grenzlamelle intakt zu lassen. Drei der Versuchsgruppen bestanden ausschließlich aus osteochondralen Defekten.



Grafik 10: Darstellung der Defekttiefe in den Versuchsgruppen (modifizierter Score)

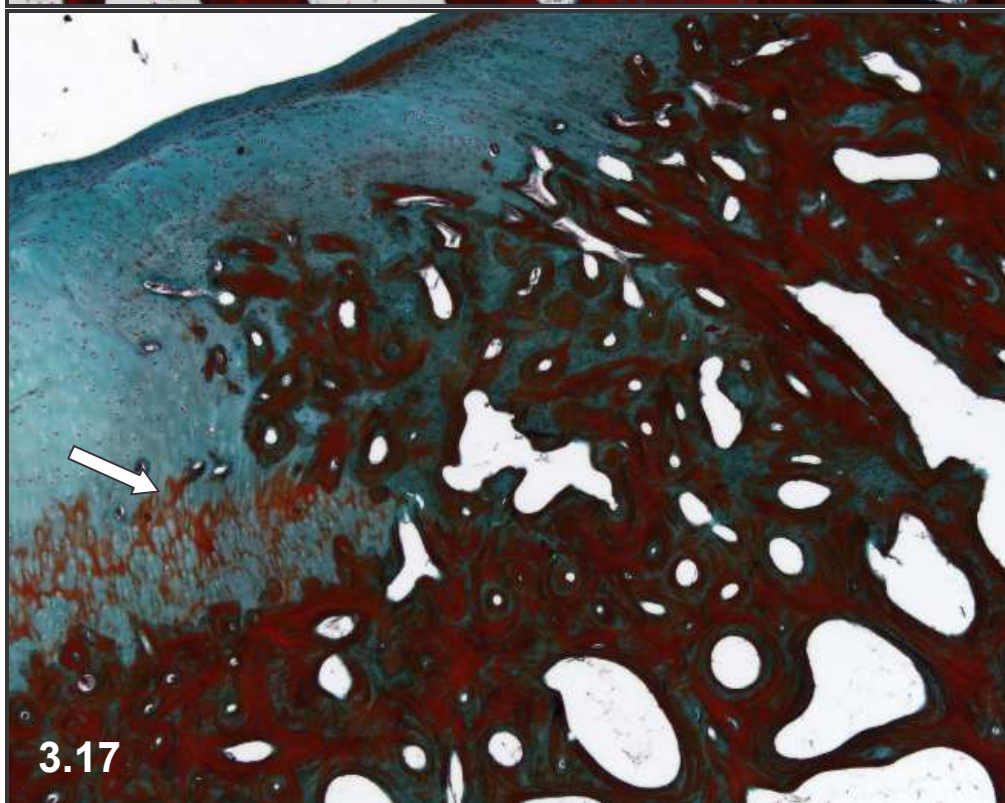
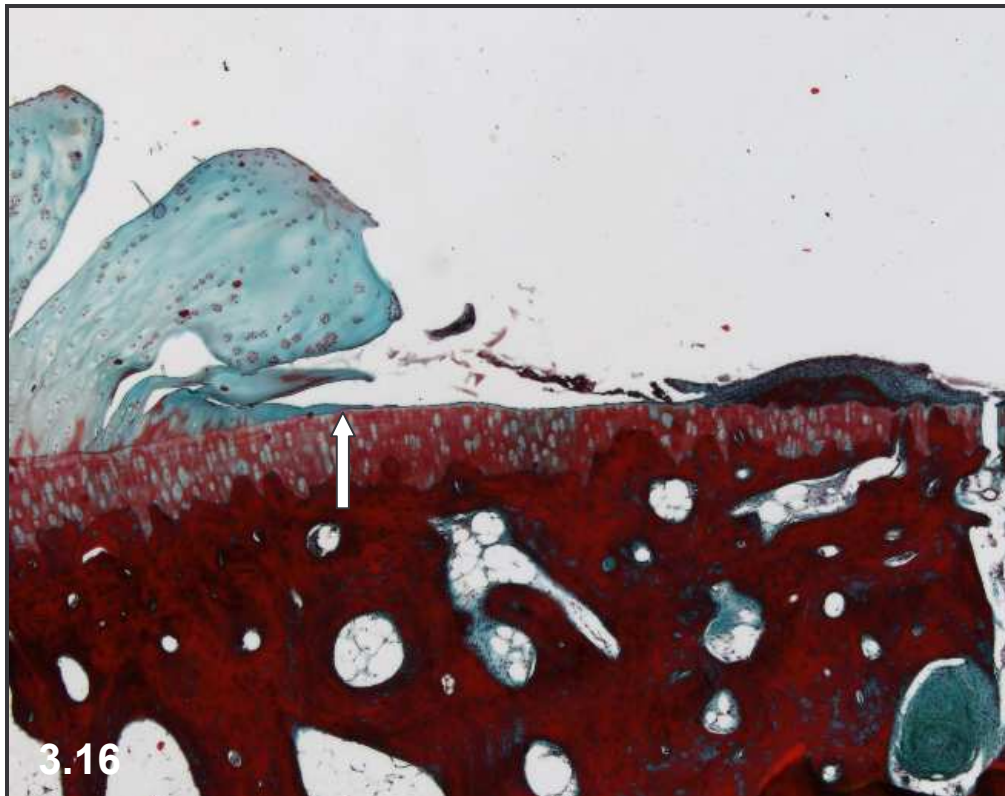


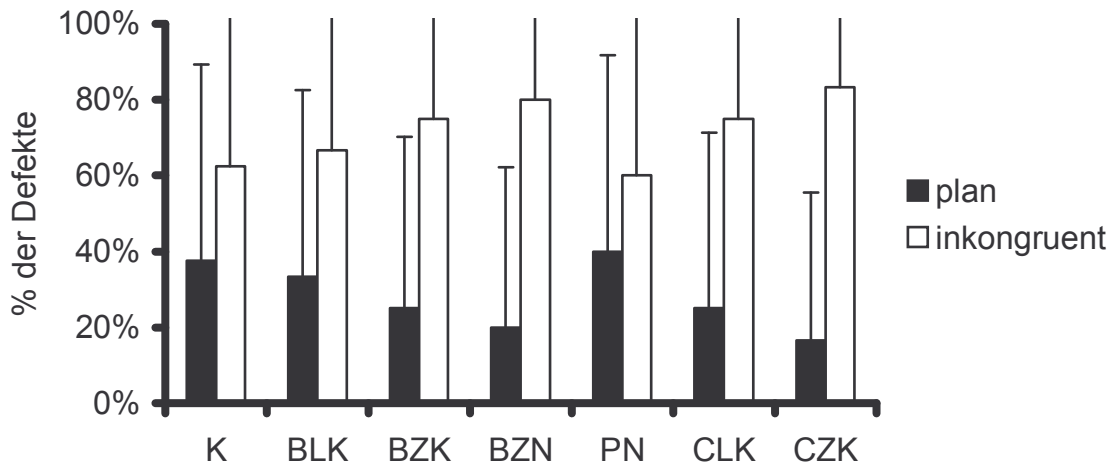
Abb. 3.16: Es handelt sich um einen rein chondralen Defekt, der sich nicht gefüllt hat (Gruppe K). Die alte Tidemark ist noch erkennbar (Pfeil). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Abb. 3.17: Die Tidemark wurde durchbrochen (Pfeil). Große Teile des Defektes werden von subchondralem Knochen gefüllt (Gruppe K). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Oberflächenbeschaffenheit

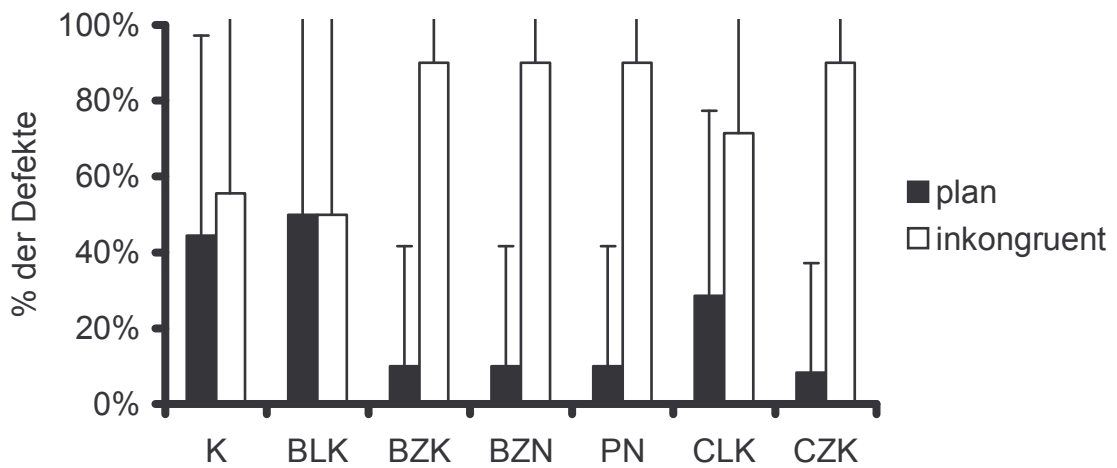
In der Kontrollgruppe besaßen 41 Prozent der untersuchten Defekte eine plane Oberfläche, wobei keine großen Unterschiede zwischen den kondylären und den patellofemoralen Defekten existierten. Die Gruppe, in der die leere Kollagen I/III-Membran eingeklebt wurde, erreichte ein identisches Ergebnis. Die patellofemoralen Defekte besaßen jedoch häufiger eine plane Oberfläche als die kondylären. Diese Membran erzielte sowohl besät als auch unterspritzt mit autologen Chondrocyten schlechtere Ergebnisse. Nur in 18 Prozent (BZK) bzw. in 15 Prozent (BZN) der Fälle war die Oberfläche plan. In diesen beiden Gruppen war die Oberfläche der patellofemoralen Defekte hingegen unregelmäßiger als die der kondylären. Dieses Phänomen beobachteten wir ebenfalls in der Periostgruppe. Nur 25 Prozent aller Defekte besaßen eine plane Oberfläche. Bei den kondylären Defekten waren es 40 Prozent gegenüber 10 Prozent bei den patellofemoralen Defekten. In der Gruppe, in der mit der leeren Kollagen II-Membran therapiert wurde, wiesen auch nur 26 Prozent der Defekte eine glatte und intakte Oberfläche auf. Es existierte kein Unterschied zwischen den beiden Defektlokalisationen. Diese Membran, mit Zellen besät, erzeugte die schlechteste Oberflächenbeschaffenheit aller Gruppen. Nur drei Defekte hatten eine plane Oberfläche. In dieser Gruppe waren die kondylären Defekte ebenfalls regelmäßiger als die patellofemoralen Defekte.

Oberflächenbeschaffenheit der kondylären Defekte



Grafik 11a: Oberflächenbeschaffenheit kondylär (modifizierter Score)

Oberflächenbeschaffenheit der patellofemorale Defekte



Grafik 11b: Oberflächenbeschaffenheit patellofemorale (modifizierter Score)

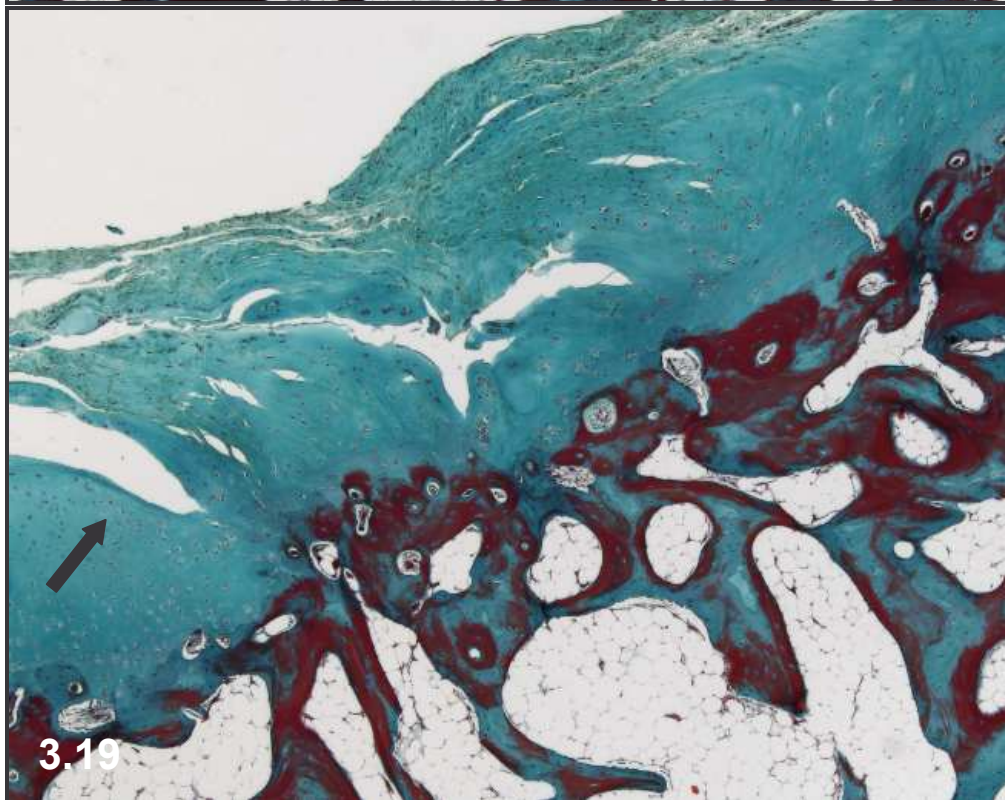
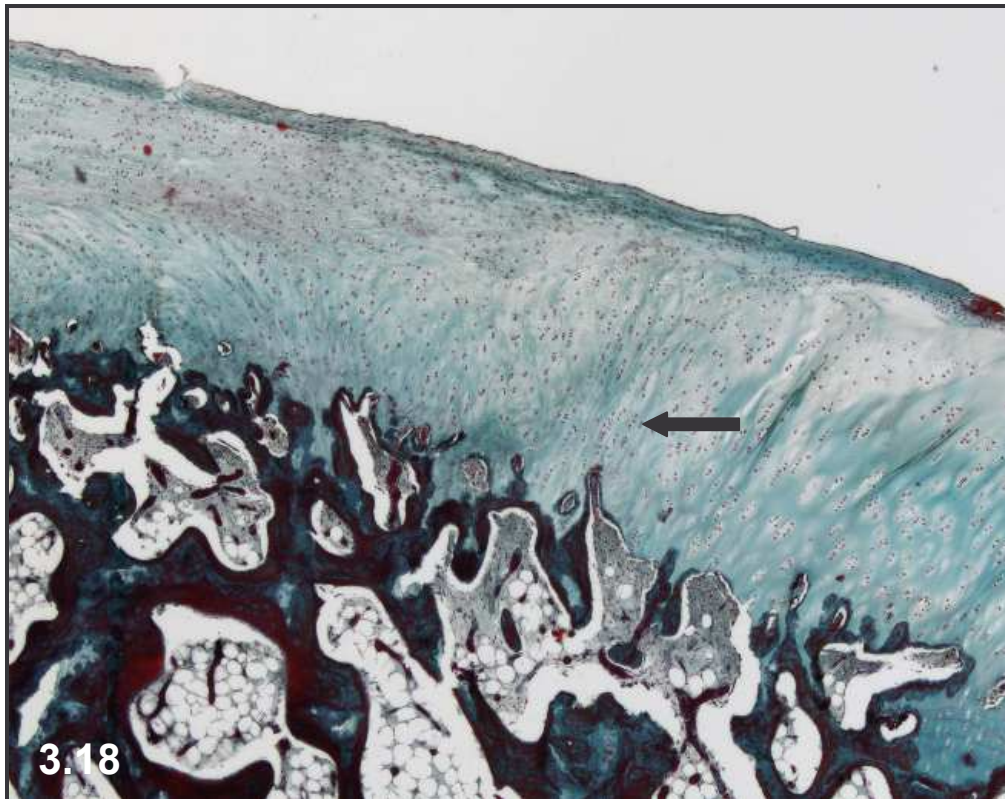


Abb. 3.18: Defekt mit planer Oberfläche und guter Anbindung (Pfeil auf Defektgrenze) an das Umgebungsgewebe (Gruppe BLK, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Abb. 3.19: Defekt mit unregelmäßiger, aufgefaserter Oberfläche und schlechter Anbindung (Pfeil auf Defektgrenze) (Gruppe BLK, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

Gewebemorphologie im Defekt

In der Kontrollgruppe war von den beschriebenen Gewebetypen der Faserknorpel mit Säulen am stärksten vertreten. Er bildete 28 Prozent der Defektfüllung, während hyaliner Knorpel nur einen verschwindend geringen Anteil ausmachte. Weiterhin wurden große Anteile der Defekte durch subchondralen Knochen aufgefüllt (Abb. 3.17). 18 Prozent machte der Faserknorpel ohne Säulen aus. Zell- und faserreiches Bindegewebe waren ebenfalls vorhanden, bildeten aber jeweils weniger als 10 Prozent der Defektfüllung. Betrachtete man die Gewebeverteilung, fielen jedoch Unterschiede zwischen den patellofemorale und den kondylären Defekten auf. In den kondylären Defekten bestand fast 70 Prozent der Gesamtfüllung aus Faserknorpel mit Säulen und subchondralem Knochen. Der Rest entfiel auf die anderen Gewebearten. In den patellofemorale Defekten bildete säulenloser Faserknorpel mit über 30 Prozent den größten Anteil.

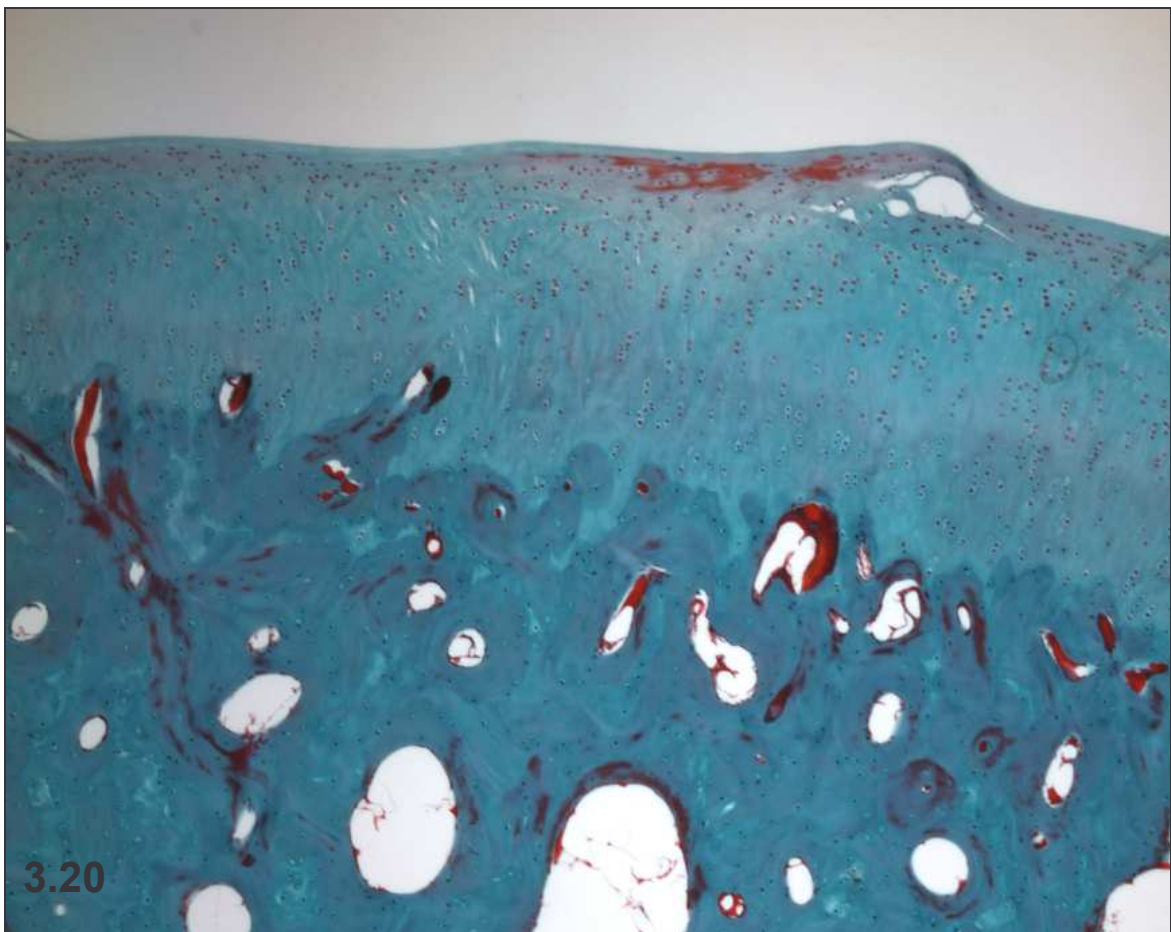


Abb. 3.20: Der Defekt ist mit Faserknorpel mit Säulen gefüllt. Innerhalb des Defektes hat sich nur wenig Knochen gebildet (Gruppe K, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Auch in der mit der leeren Kollagen I/III-Membran therapierten Gruppe existierten erhebliche Unterschiede zwischen den kondylären und den patellofemorale Defekten. Die Defekte dieser Versuchsgruppe besaßen den größten Anteil an hyalinem Knorpel (22%). Bei der Differenzierung der Lokalisationen konnte man jedoch beobachten, dass er hauptsächlich in den Kondylen zu finden war. Säulenloser Faserknorpel hatte mit annähernd 30 Prozent ebenfalls großen Anteil an den Defektarealen, insbesondere in den patellofemorale Defekten. Die beiden Bindegewebsarten kamen mit jeweils unter zehn Prozent nicht häufig vor. Besonders in den kondylären Defekten waren sie kaum vertreten (FBG=1,7%, ZBG=3,3%). Der subchondrale Knochen machte sowohl in den patellofemorale als auch in den kondylären Defekten einen Anteil von etwa 10 Prozent aus.

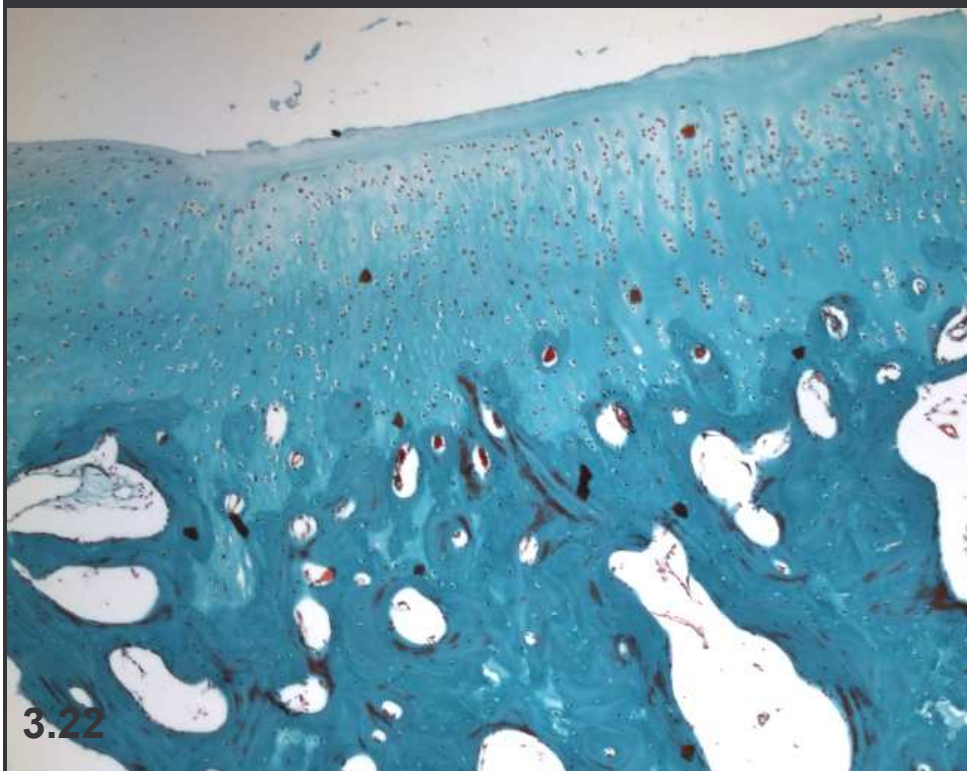
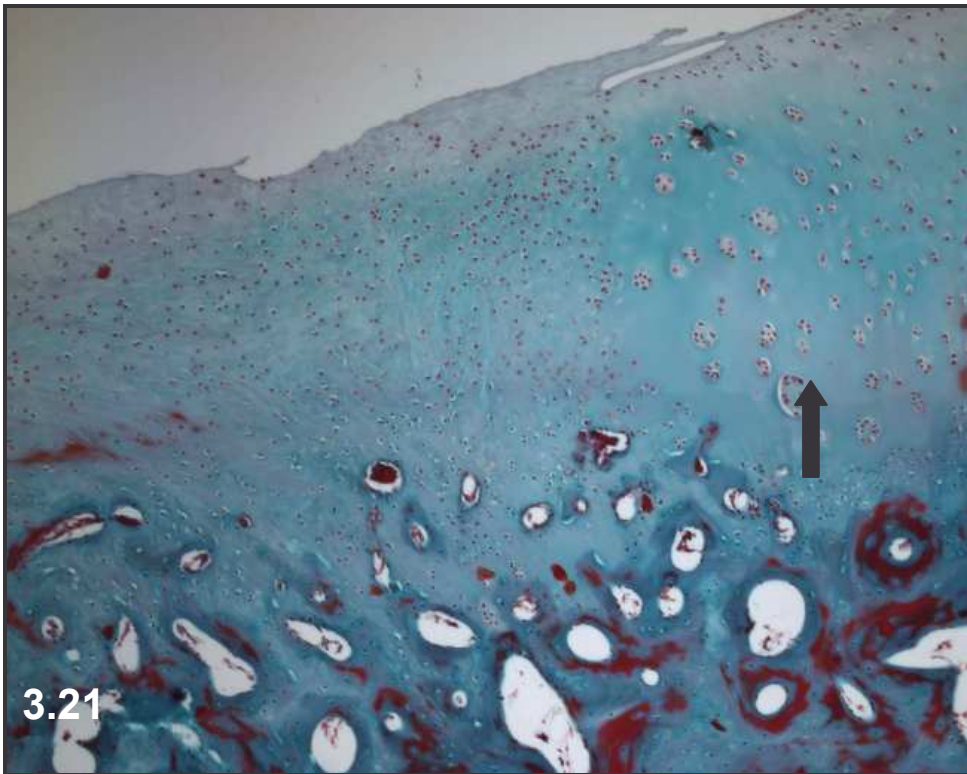


Abb. 3.21: Der Defekt ist gut in die Umgebung eingeeilt, jedoch ausschließlich mit Faserknorpel ohne Säulen gefüllt. Im Randbereich sind Chondrocytencluster (Pfeil) entstanden (Gruppe BLK, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Abb. 3.22: Der Defekt ist angefüllt mit hyalinem Knorpel, der sich in Säulen anordnet (Gruppe BLK, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

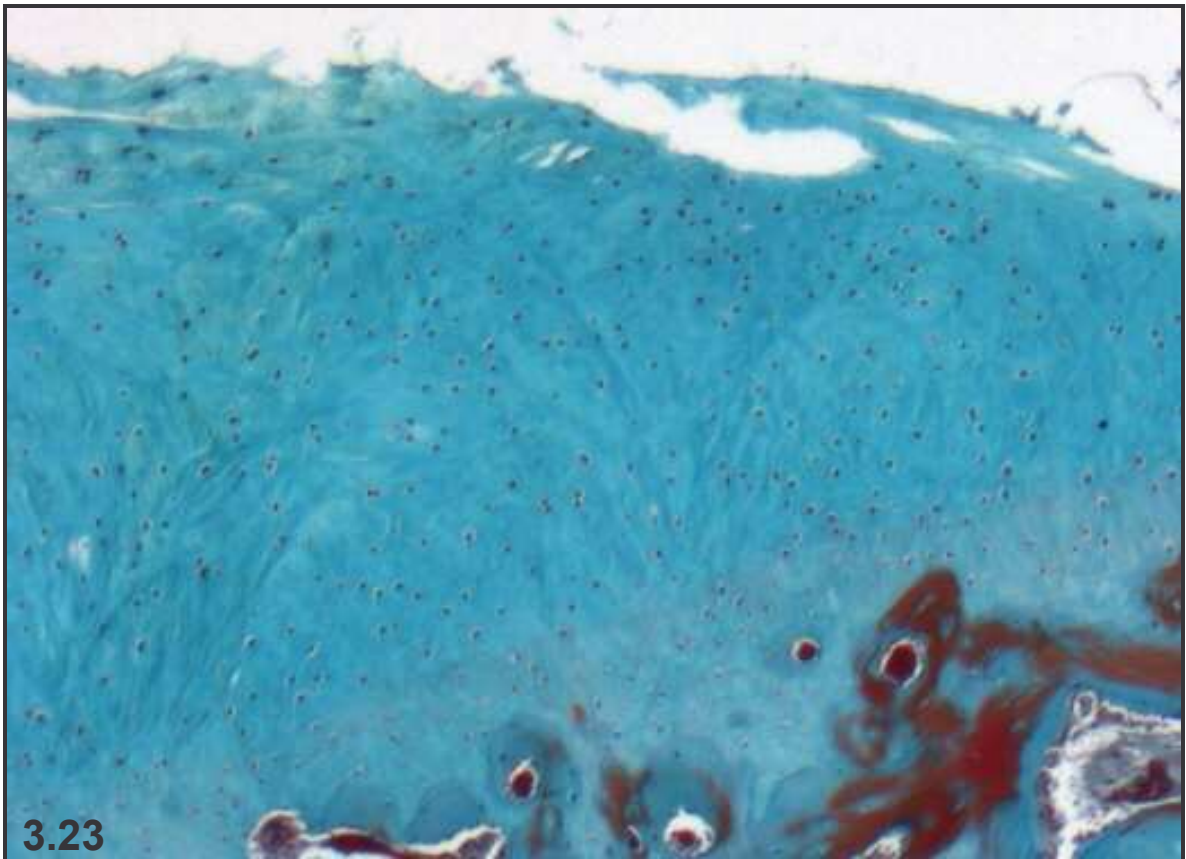


Abb. 3.23: Der Defekt ist mit Faserknorpel gefüllt, dessen Zellen keinerlei Anordnung zeigen (Gruppe BZN, patellofemoral). LM, Masson-Goldner, Verg.: 20-fach

In der Gruppe, in der in die Defekte eine mit Zellen besäte Kollagen I/III-Membran eingeklebt wurde, bestanden immerhin 14 Prozent der Defektareale aus hyalinem Knorpel. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den beiden Defektlokalisationen deutlich. Hyaliner Knorpel entstand ausschließlich kondylär. In den patellofemorale Defekten existierte er nicht. Sehr auffällig war in dieser Versuchsgruppe, dass die sechs verschiedenen Gewebetypen annähernd gleichwertig an der Bildung des Regeneratgewebes beteiligt waren. Demnach entstand auch sehr viel Bindegewebe innerhalb der Defekte, überwiegend jedoch faserreiches Bindegewebe (FBG=20%). Die schlechte Gewebequalität in der Gesamtgruppe wurde vor allem durch die patellofemorale Defekte verursacht. 50 Prozent des gesamten Defektareals wurden hier von den beiden Bindegewebstypen ausgefüllt, wobei faserreiches Bindegewebe mit 32 Prozent den größten Anteil bildete. Der subchondrale Knochen war in beiden Defektlokalisationen wieder annähernd gleich stark vertreten.

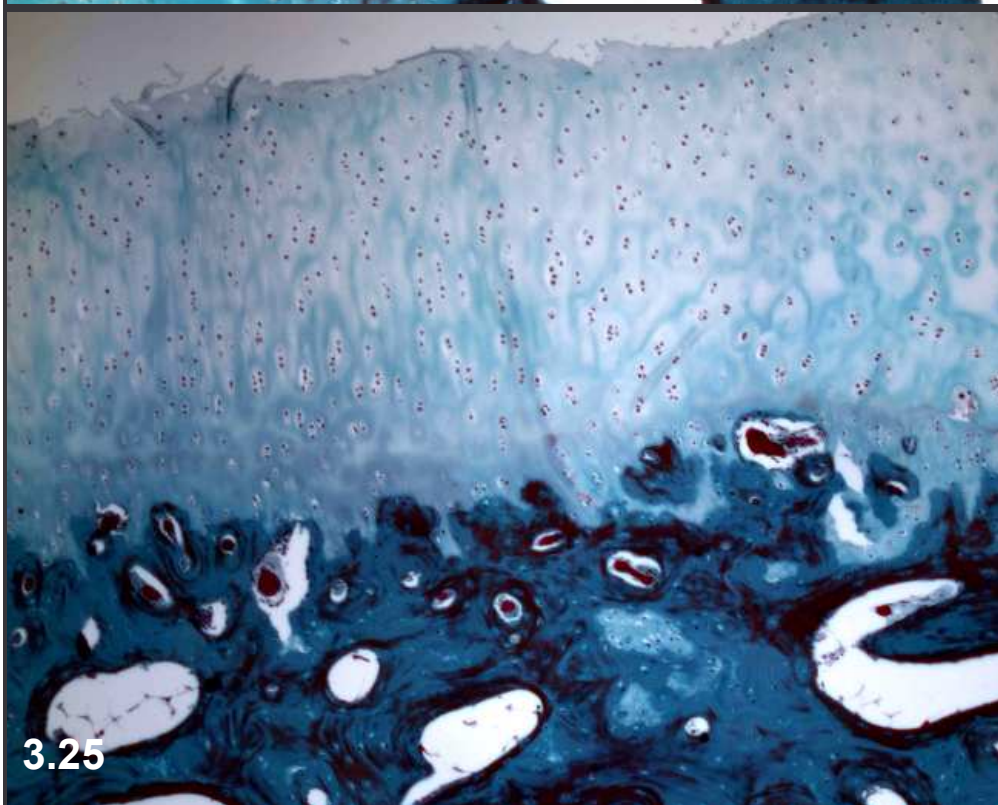
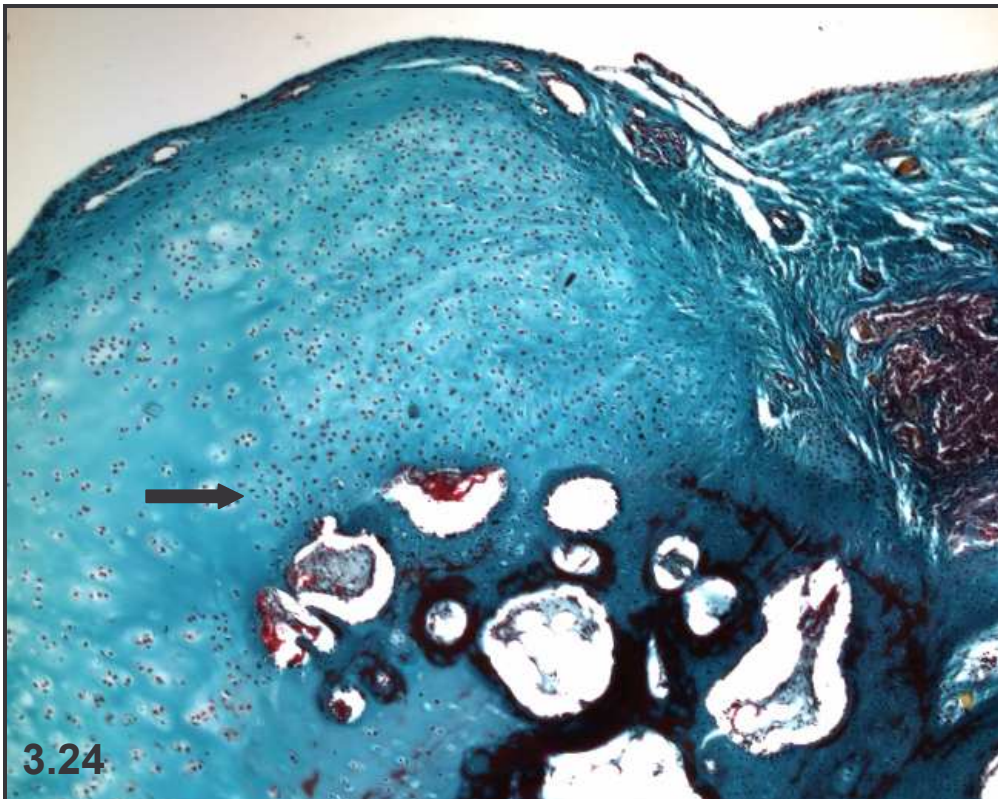


Abb. 3.24: Der Defekt ist fast ausschließlich mit faserigem Bindegewebe gefüllt (Pfeil auf Defektgrenze) (Gruppe BZK, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Abb. 3.25: Im gesamten Defekt hat sich fast ausschließlich hyaliner Knorpel gebildet, dessen Oberfläche an einigen Stellen jedoch etwas unregelmäßig ist (Gruppe BZK, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

In der Gruppe, in der dieselbe Membran durch Naht in den Defekten fixiert und mit autologen Chondrocyten unterspritzt wurde, war die Gewebequalität des Regeneratgewebes minderwertig. In keinem Defekt entstand hyaliner Knorpel. Auch in dieser Gruppe existierten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Defektlokalisationen. In der Gesamtgruppe besaß der säulenlose Faserknorpel den stärksten Anteil. Er überwog auch in den patellofemorale Defekten (FOS=36%). Zwar war er auch kondylär stark vertreten (FOS=30%), den größten Anteil stellte hier jedoch der Faserknorpel mit Säulen (FS=34%). Zellreiches Bindegewebe war in beiden Defektlokalisationen kaum vorhanden. Faserreiches Bindegewebe bildete in den patellofemorale Defekten hingegen den zweitgrößten Anteil (FBG=24%), kondylär kam es selten vor. In dieser Gruppe fiel besonders auf, dass das Defektgewebe in den kondylären Defekten stärker differenziert war als in den patellofemorale.

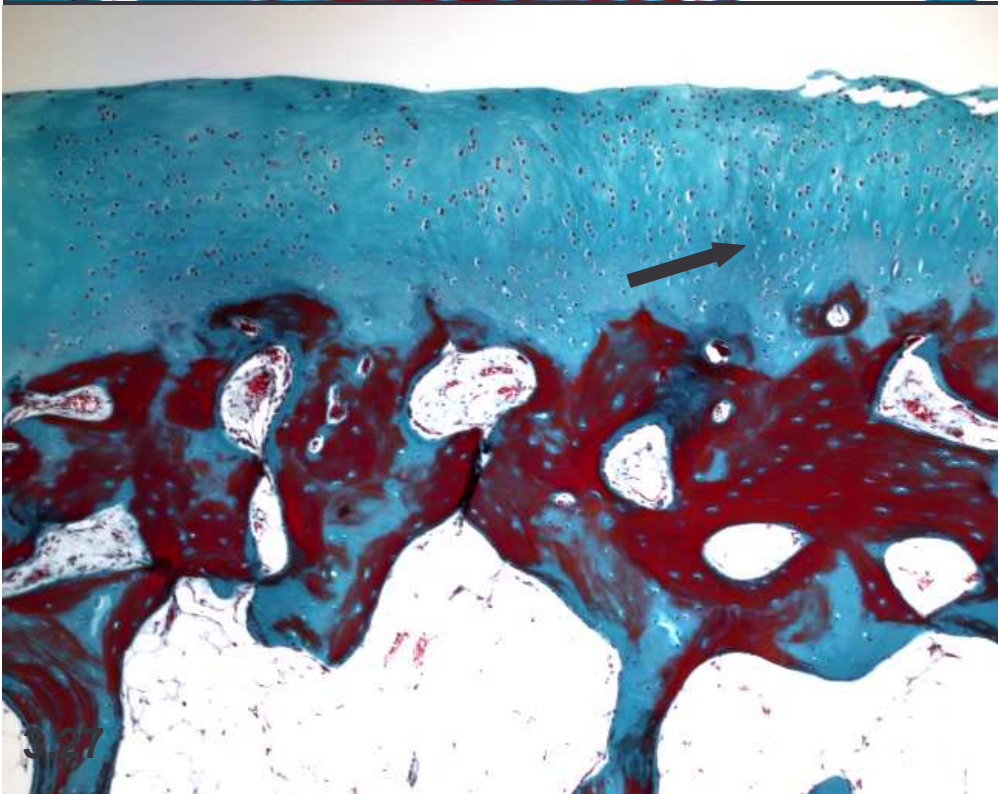
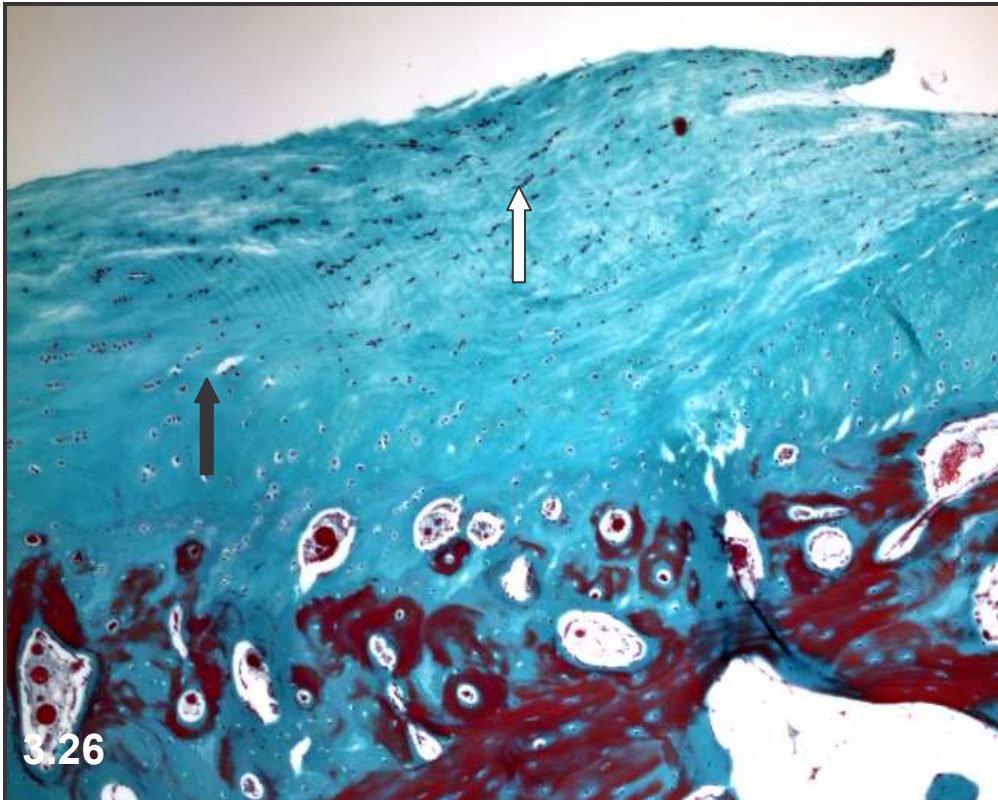


Abb. 3.26: Der Defekt ist mit Faserknorpel ohne Säulen (schwarzer Pfeil) und mit faserreichem Bindegewebe (weißer Pfeil) gefüllt. (Gruppe BZN, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Abb. 3.27: An der Defektgrenze zunächst Faserknorpel, der dann in Säulenordnung (Pfeil) übergeht (Gruppe BZN, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5-fach

Auch in der Periostgruppe konnte man hinsichtlich der Gewebequalität Unterschiede zwischen den Defektlokalisationen beobachten. Auffällig war vor allem der hohe Anteil an subchondralem Knochen in den Defekten (SK=22%). In den patellofemorale Defekten war er mit 12 Prozent sogar weniger stark vertreten als in einigen anderen Gruppen; kondylär bildete er jedoch über 30 Prozent der Defektareale (Abb. 3.9). Nahezu gleich stark vertreten waren die beiden Faserknorpelarten, wobei in den kondylären Defekten der säulenhaltige Faserknorpel den größten Anteil hatte, in den patellofemorale Defekten hingegen der Faserknorpel ohne Säulen. Patellofemorale kam auch das faserreiche Bindegewebe mit 30 Prozent häufig vor. Kondylär existierte hingegen keiner der beiden Bindegewebstypen. Einige der Defekte besaßen sogar einen geringen Anteil an hyalinem Knorpel. Er befand sich jedoch ausschließlich kondylär.

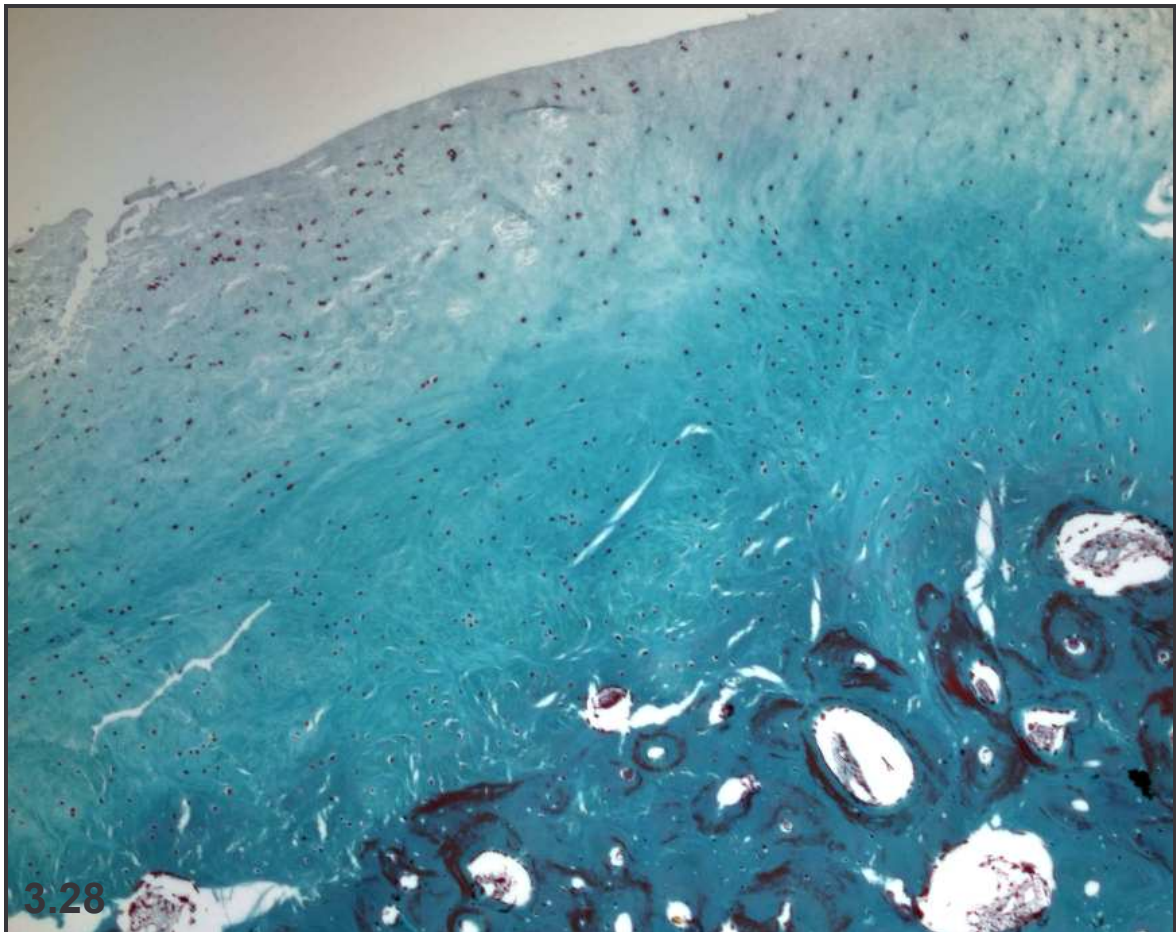


Abb. 3.28: Der Defekt ist fast ausschließlich mit faserigem Bindegewebe gefüllt (Gruppe PN, patellofemorale).
LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Die Unterschiede zwischen den Defektlokalisationen existierten ebenfalls in der Gruppe, die mit der leeren Kollagen II-Membran therapiert wurde. In keinem der Defekte bildete sich hyaliner Knorpel. Die Gewebequalität in den patellofemorale Defekten war in dieser Gruppe schlechter als in den kondylären. Patellofemoral hatte sich viel Bindegewebe gebildet. Die beiden Bindegewebsarten machten zusammen fast 40 Prozent der Defektfüllungen aus (Abb. 3.12). Den insgesamt größten Gewebeanteil besaß patellofemoral der säulenlose Faserknorpel (FOS=31%). Das Gewebe in den patellofemorale Defekten war wenig differenziert. In den kondylären Defekten existierten zwei dominante Gewebe. Faserknorpel mit Säulen (Abb. 3.6) und der subchondrale Knochen bildeten große Anteile der Defektfüllungen (FS=53%, SK=20%). Der Rest entfiel auf die anderen drei Gewebe. Auch in der Gruppe, in der diese mit Zellen besäte Membran in die Defekte eingebracht worden war, war das Gewebe in den patellofemorale Defekten schlechter differenziert als in den kondylären. In den kondylären Defekten hatte der Faserknorpel mit Säulen großen Anteil an den Defektfüllungen (SK=40%). Die beiden Bindegewebsarten waren hingegen nur wenig vertreten. Faserreiches Bindegewebe stellte jedoch in den patellofemorale Defekten den größten Gewebeanteil (FBG=38%). Bezüglich des subchondralen Knochens gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Defektlokalisationen. Bei dem in drei Defekten existierenden hyalinen Knorpel handelte es sich um alten, nicht korrekt ausgestanzten hyalinen Knorpel.

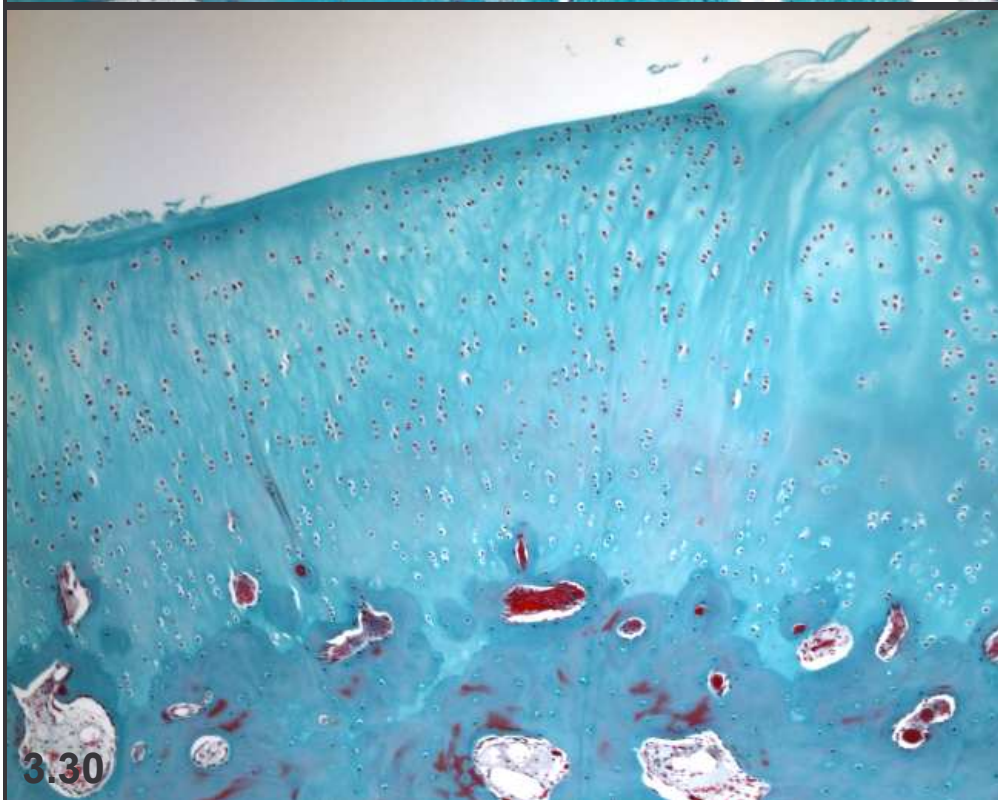
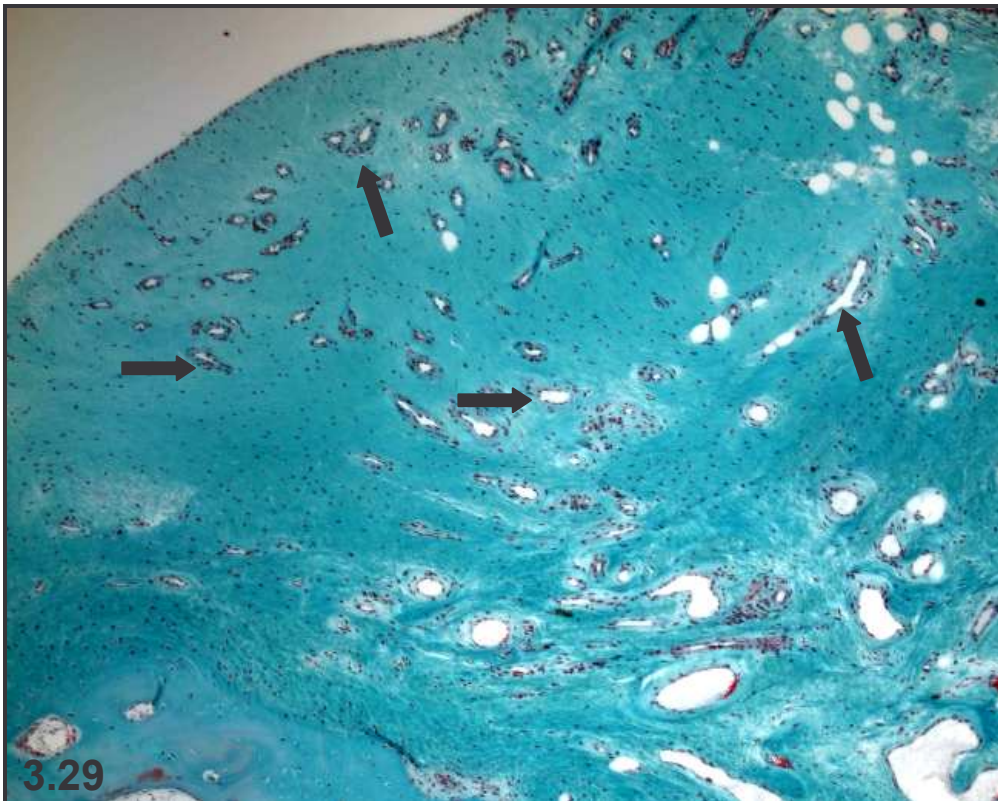
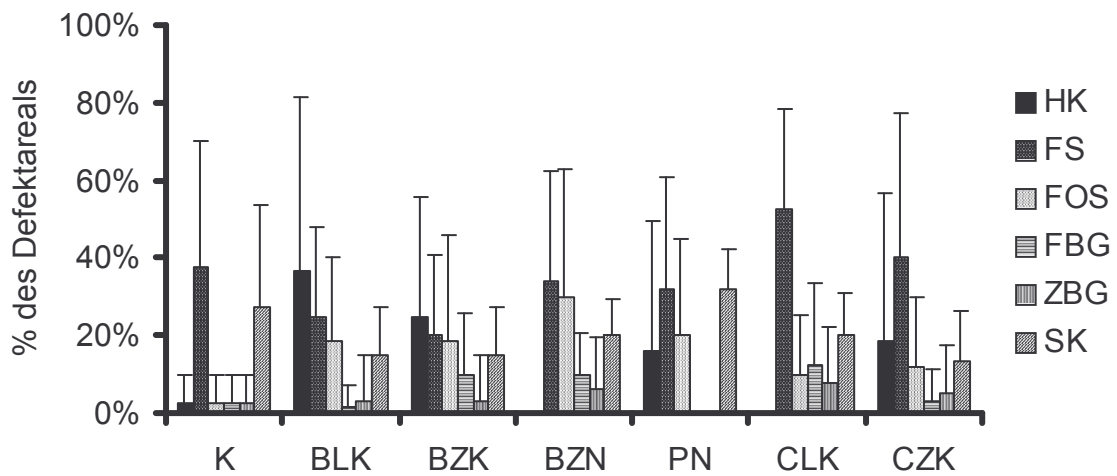


Abb. 3.29: Der gesamte Defekt ist mit faserreichem Bindegewebe gefüllt, in dem sich zahlreiche Blutgefäße (Pfeile) gebildet haben (Gruppe CZK, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

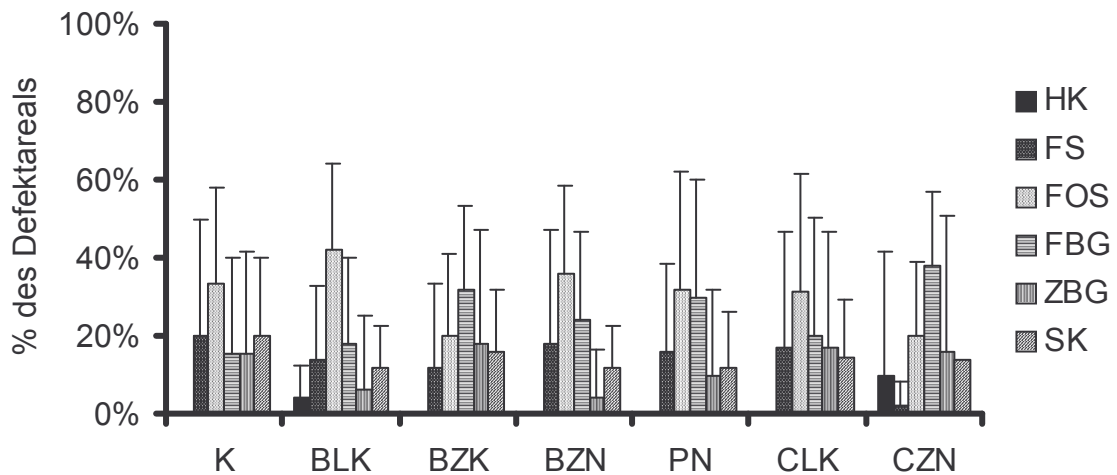
Abb. 3.30: Innerhalb des Defektes hat sich Faserknorpel mit Säulen gebildet, der gut an die Umgebung angebunden ist (Gruppe CZK, kondylär). LM, Masson-Goldner, Verg.: 5-fach

Anteile verschiedener Gewebe in den kondylären Defekten



Grafik 12a: Gewebemorphologie kondylär (modifizierter Score)

Anteile verschiedener Gewebe in den patellofemorale Defekten



Grafik 12b: Gewebemorphologie patellofemorale (modifizierter Score)

Adhärenz zum umgebenden Knorpel (Grad 0-3)

In der Kontrollgruppe unterschieden sich die beiden Defektlokalisationen stark bei der Beurteilung des Adhärenzgrades. Fast 38 Prozent der kondylären Defekte waren überhaupt nicht in Ihre Umgebung eingeeilt, während 77 Prozent der patellofemorale Defekte vollständig adhären waren. Die Adhärenz des Defektgewebes zum gesunden Knorpel in der Umgebung war in der Therapiegruppe mit der leeren Kollagen I/III-Membran ebenfalls schlecht. Dieses Ergebnis wurde vor allem durch die schlechte Adhärenz der kondylären Defekte verursacht. Fast 60 Prozent dieser Defekte waren gar nicht in die Umgebung eingeeilt, wohingegen sämtliche patellofemorale Defekte wenigstens eine erstgradige Adhärenz aufwiesen. Dieselbe, ebenfalls eingeklebte Membran erzeugte, mit Zellen besät eine bessere Adhärenz in den kondylären Defekten (Abb. 3.11). Es waren jedoch Unterschiede innerhalb der Gruppe auffällig. Einerseits waren annähernd 60 Prozent der kondylären Defekte komplett in ihre Umgebung eingeeilt, weitere 25 Prozent waren hingegen überhaupt nicht adhären. Wurde die Membran in die Defekte eingenäht und mit Zellen unterspritzt, zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Defekten bezüglich der Adhärenz zum umgebenden Knorpel. Sowohl in den kondylären als auch in den patellofemorale Defekten waren 70 Prozent der Defekte komplett in die Umgebung eingeeilt.

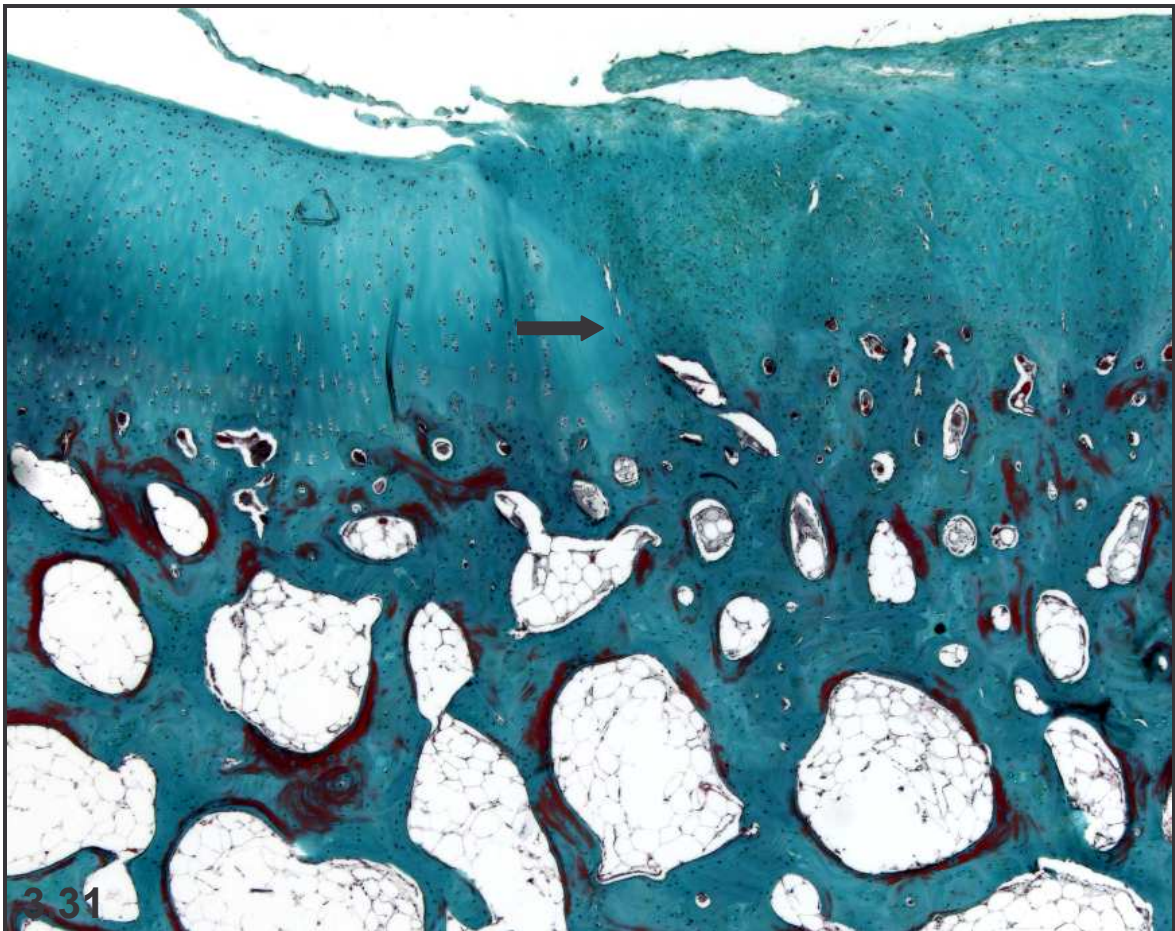
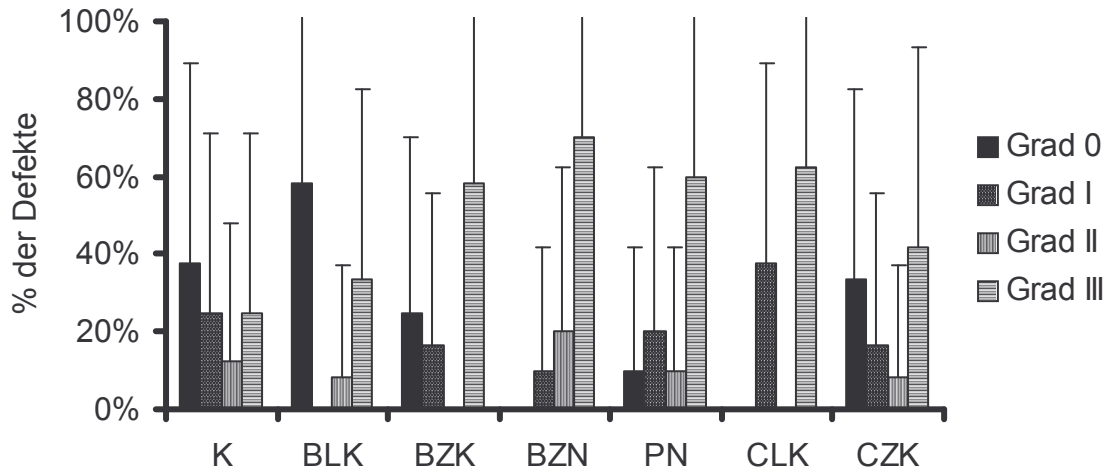


Abb. 3.31: Der Defekt ist sehr gut in die Umgebung eingeeilt (Pfeil auf Defektgrenze), die Oberfläche weist jedoch Unregelmäßigkeiten auf (Gruppe BZN, patellofemorale). LM, Masson-Goldner, Verg.: 2,5fach

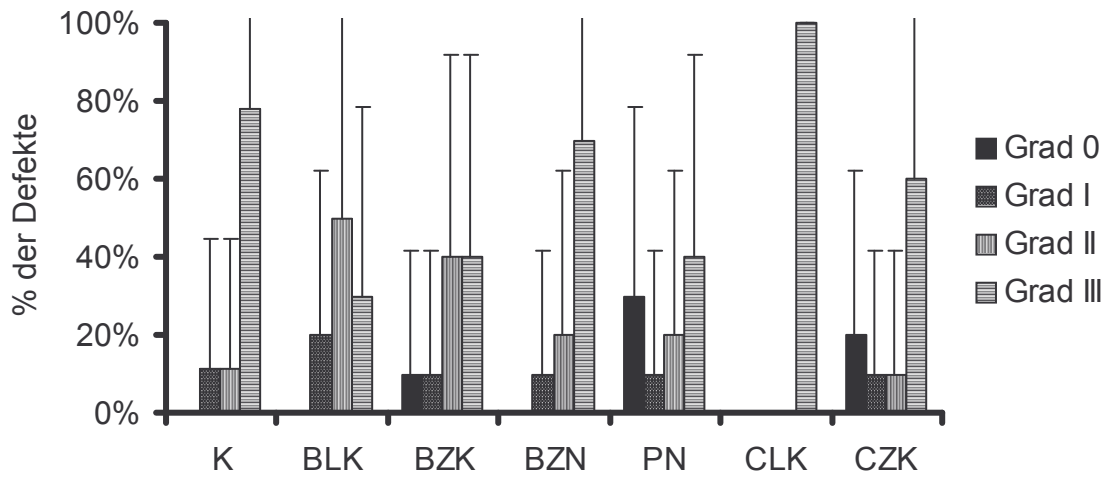
In der Periostgruppe ergab sich ein sehr gemischtes Bild. Immerhin 30 Prozent der patellofemorale und 10 Prozent der kondylären Defekte waren nicht eingeeilt. Andererseits zeigten 50 Prozent der Defekte in dieser Versuchsgruppe eine komplette Adhärenz. Dieses Phänomen lässt sich vor allem auf die gute Einheilung in den kondylären Defekten zurückführen. In der Therapiegruppe, in der die Defekte mit der leeren Kollagen II-Membran gedeckt wurden, war die Adhärenz zur Umgebung trotz minderwertiger Gewebequalität in vielen Fällen gut. Keiner der beurteilten Defekte besaß den Adhärenzgrad 0. Über 60 Prozent der kondylären und alle patellofemorale Defekte waren vollständig in ihre Umgebung eingeeilt. Wurde die Membran mit autologen Zellen besät und dann in die Defekte eingeklebt, besaßen 41 Prozent der Defekte keine oder nur eine erstgradige Adhärenz. Immerhin 50 Prozent waren jedoch komplett eingeeilt. Die Adhärenz der patellofemorale Defekte war in dieser Gruppe besser.

Grad der Adhärenz in den kondylären Defekten



Grafik 13a: Adhärenz kondylär (modifizierter Score)

Grad der Adhärenz in den patellofemorale Defekten

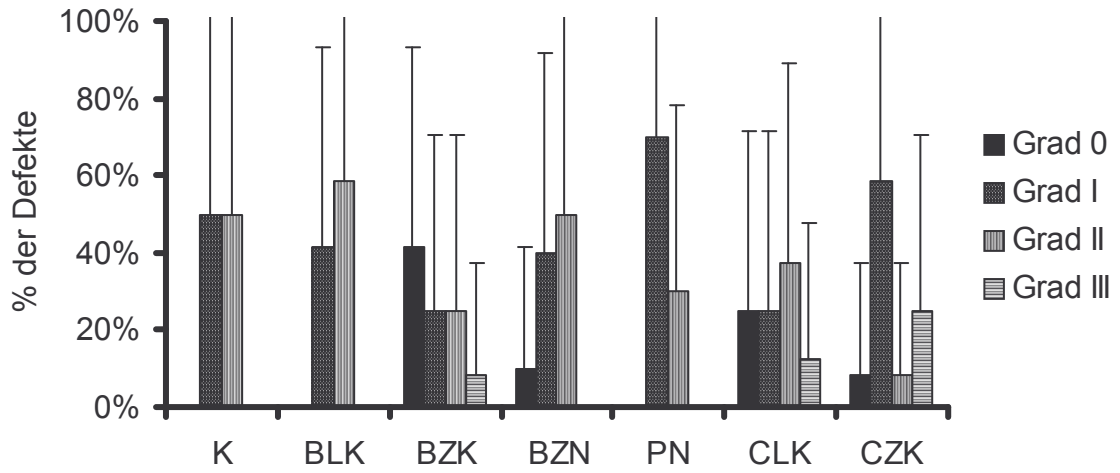


Grafik 13b: Adhärenz patellofemorale (modifizierter Score)

Clusterbildung im angrenzenden Knorpel (Grad 0-3)

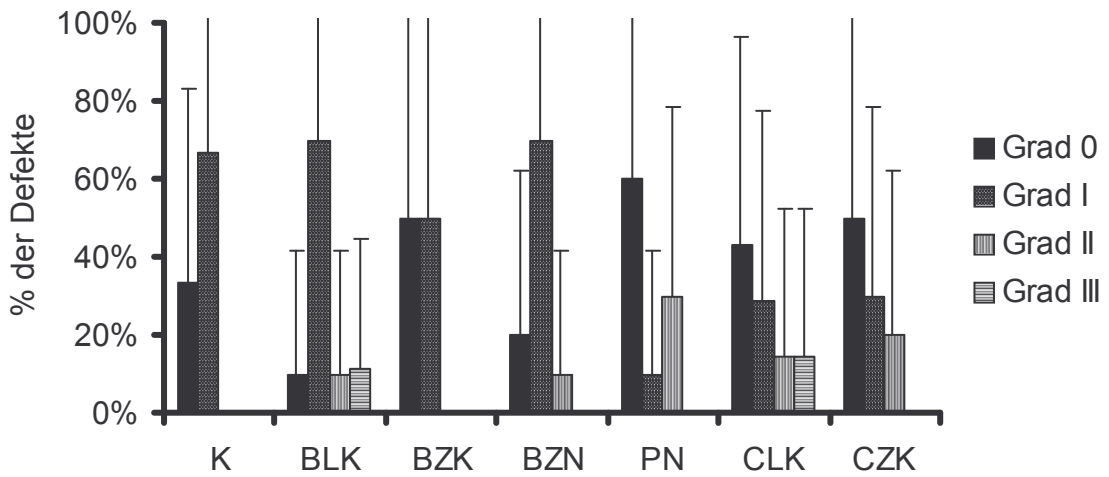
Auch bei der Beurteilung der Clusterbildung unterschieden sich die beiden Defektlokalisationen in der Kontrollgruppe. In der Umgebung der patellofemorale Defekte bildeten sich keine oder nur wenige Cluster. Um die kondylären Defekte herum kamen immer Cluster vor, und sie machten häufig einen größeren Anteil der Zellen aus. Die Behandlung mit der leeren Kollagen I/III-Membran führte ebenfalls zu degenerativen Veränderungen in der Umgebung der Defektareale, die sich vor allem in der Bildung von Chondrocytenclustern äußerten (Abb. 3.21). Diese Cluster traten jedoch, wie schon bei der Kontrollgruppe, häufiger und in größerer Anzahl in der Umgebung der kondylären Defekte auf. Die Clusterbildung in dieser Gruppe war auch ähnlich stark ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe. Besäte man die Membran mit Zellen und klebte sie in die Defekte ein, war die Clusterbildung in der Nachbarschaft der Defekte geringer ausgeprägt als bei den ersten beiden Versuchsgruppen. Aber auch in diesem Fall waren vor allem die kondylären Defekte mit Clustern umgeben. Das Gewebe in der Umgebung der Defekte, in die die Membran eingenäht und mit Chondrocyten unterspritzt wurde, war ebenfalls häufig degenerativ verändert. Im Umfeld der kondylären Defekte zeigte sich in 50 Prozent eine zweitgradige Clusterbildung, ein Phänomen, das um die patellofemorale Defekte herum schwächer ausgebildet war. Auch in der Periostgruppe entstanden die degenerativen Veränderungen hauptsächlich in der Umgebung der kondylären Defekte (Abb. 3.9). Bei 60 Prozent der patellofemorale Defekte zeigten sich gar keine Cluster, in der Umgebung der kondylären Defekte traten sie hingegen immer auf. Eine Clusterbildung, die Grad III entspräche, existierte jedoch in keinem Fall. Die degenerativen Veränderungen folgten in den beiden Gruppen, die mit der Kollagen II-Membran therapiert wurden, demselben Verteilungsmuster. In der Umgebung der Defekte, die mit der zellbeladenen Membran gedeckt wurden, existierten nur in acht Prozent der Fälle überhaupt keine Cluster in der Nachbarschaft der kondylären Transplantate. Patellofemorale war dies bei 50 Prozent der Defekte der Fall.

Grad der Clusterbildung in den kondylären Defekten



Grafik 14a: Clusterbildung im umliegenden Gewebe kondylär (modifizierter Score)

Grad der Clusterbildung in den patellofemorale Defekten

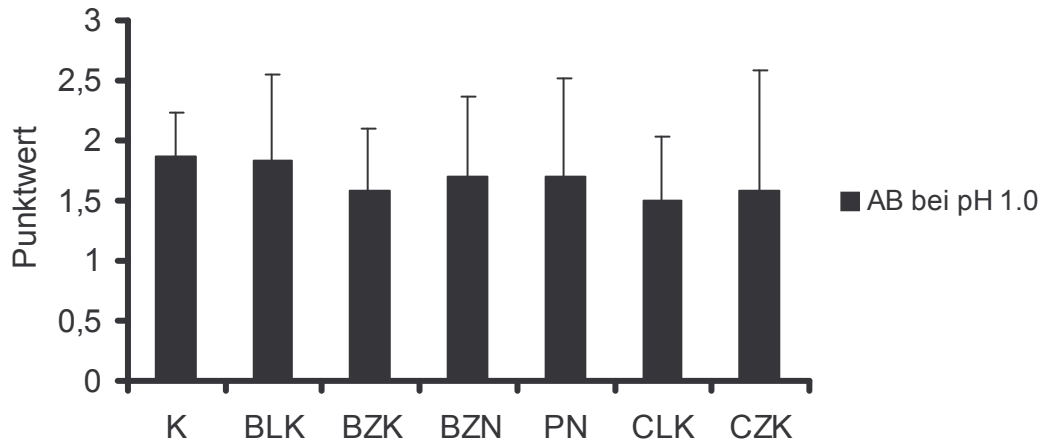


Grafik 14b: Clusterbildung im umliegenden Gewebe patellofemorale (modifizierter Score)

Alcianblaufärbung bei pH 1.0

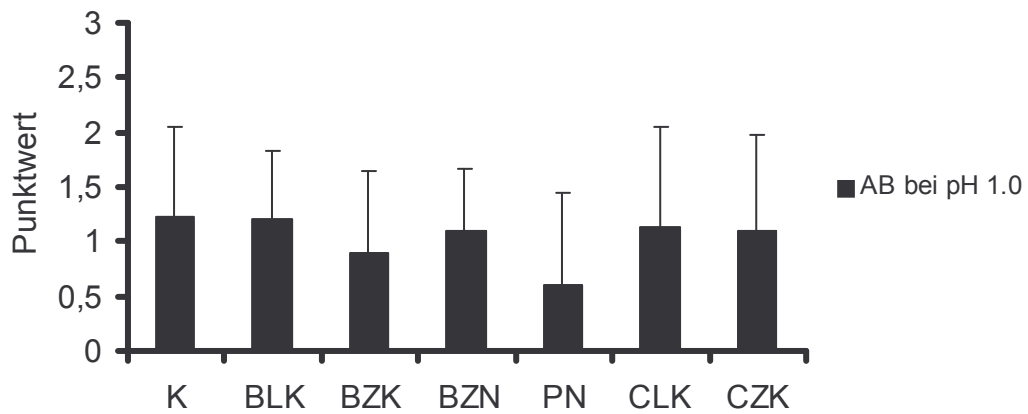
Schon bei der Beurteilung der Alcianblaufärbung mit dem O'Driscoll-Score wurde klar, dass die Defektareale weniger saure GAGs produzierten als gesunder hyaliner Knorpel. Die gesonderte Bewertung der beiden unterschiedlichen Lokalisationen zeigte jedoch außerdem, dass vor allem die Matrix der patellofemorale Defekte kaum angefärbt wurde (Abb. 3.14 u. 3.15). Nur in der Versuchsgruppe, in deren Defekte die mit Zellen unterspritzte Kollagen I/III-Membran eingenäht wurde, enthielt die EZM der patellofemorale Defekte mehr saure GAGs als die der kondylären. Die patellofemorale Defekte der Periostgruppe waren fast gar nicht angefärbt.

Alcianblaufärbung bei pH 1.0 in den kondylären Defekten



Grafik 15a: Alcianblaufärbung kondylär (modifizierter Score)

Alcianblaufärbung bei pH 1.0 in den patellofemorale Defekten



Grafik 15b: Alcianblaufärbung patellofemoral (modifizierter Score)

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene operative Knorpelersatztechniken untereinander und mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe verglichen.

Keine der von uns untersuchten Versuchsgruppen erwies sich bei der Bewertung durch die angewandten Untersuchungsscores als überlegen. Es existierten ausschließlich Unterschiede bei der Beurteilung der einzelnen Untersuchungskriterien, die sich jedoch in den allermeisten Fällen nicht als statistisch signifikant erwiesen. Die Variabilität innerhalb der Versuchsgruppen war oft sehr groß. Diese Tatsache lässt sich durch die ausgeprägten Unterschiede zwischen den beiden Defektlokalisationen erklären. Es gelang nicht, die gewünschte Anzahl streng chondraler Defekten zu schaffen. In allen Gruppen wies das Defektgewebe nur in Einzelfällen die Morphologie von intaktem hyalinen Gelenkknorpel auf. Es bildete sich in den meisten Fällen nur Faserknorpel, Bindegewebe und Knochen. Die Oberfläche war in den seltensten Fällen intakt. Das Gewebe in den Defekten war meistens nur unzulänglich mit der Umgebung verbunden. Der Knorpel in der Nachbarschaft der Defekte degenerierte und zeigte als Auswaschphänomen einen Verlust an saure GAGs. Das Defektgewebe färbte sich häufig nur schlecht mit Alcianblau an, wobei die Gewebequalität häufig nicht mit der Anfärbbarkeit korrelierte.

4.1 Gewebemorphologie

Zahlreiche Studien, in denen verschiedene Möglichkeiten des Knorpelersatzes vorgestellt wurden, wiesen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des innerhalb der Defekte entstandenen Gewebes auf. So berichteten einige Untersucher, dass ein hyalinknorpelartiges Ersatzgewebe entstanden sei (HUNZIKER und ROSENBERG 1996, BUCKWALTER und MANKIN 1998, O'DRISCOLL 1998). Wie schon anfangs erwähnt, ist dieser Begriff ungenau. Warum aber wichen die von uns erhobenen Ergebnisse bezüglich der Gewebemorphologie so stark von denen anderer Studien ab? In allen Versuchsgruppen füllten sich die Defekte hauptsächlich mit Faserknorpel. Die Zellen dieses Faserknorpels ordneten sich häufig als Zeichen einer vermehrten Differenzierung in Richtung hyaliner Knorpel

in Säulen an, die Kollagenfasern waren jedoch demaskiert. Viele der vorangegangenen Studien wurden an Kleintieren durchgeführt. Bei diesen Tieren ist die Knorpel- und Knochenneubildungsrate aber sehr hoch und daher kaum mit der Stoffwechselsituation im menschlichen Knorpel vergleichbar (SOLCHAGA et al. 2001). Ein weiterer bedeutsamer Faktor ist, dass die Untersuchungszeiträume bei diesen Kleintierstudien in der Regel sehr kurz waren. Im Hundemodell wurde jedoch schon 1998 von BREINAN gezeigt, dass am Ende seiner Untersuchungen nach 18 Monaten ein großer Teil des nach Periosttransplantation entstandenen Ersatzgewebes zu degenerieren begann. Eine Folgestudie aus dem Jahr 2001 zeigte, dass die mit einem Periostlappen und unterspritzten autologen Chondrocyten therapierte Versuchsgruppe nach drei Monaten mehr hyalinen Knorpel in den Defekten aufwies als die beiden Kontrollgruppen. Dieser Vorteil ließ sich jedoch schon weitere drei Monate später nicht mehr nachweisen (BREINAN et al. 2001). Da bei unserer Studie keine Zwischenergebnisse erhoben wurden, kann nicht gesagt werden, ob die Qualität des Defektgewebes einmal besser als zum untersuchten Zeitpunkt war. Erstaunlich war auch, dass sich die therapierten Gruppen in Bezug auf die Gewebemorphologie kaum von der nicht behandelten Kontrollgruppe unterschieden. Zwar bildete sich in der Kontrollgruppe nur sehr wenig hyaliner Knorpel, in zwei der therapierten Gruppen entstand jedoch gar kein hyaliner Knorpel. In der Gruppe, in der die leere Kollagen I/III-Membran in die Defekte eingeklebt wurde, also lediglich ein Gerüst für neu entstehendes Gewebe gestellt wurde, bildete sich die größte Menge hyalinen Knorpels. Die leere Kollagen II-Membran führte hingegen nicht zur Bildung hyalinen Knorpels, während eben diese Membran, besät mit autologen Chondrocyten, anscheinend seine Bildung anregte. Auch LEE et al. (2003a) erzielten mit einer mit autologen Chondrocyten besäten und für vier Wochen kultivierten Kollagen II-Membran sehr gute Ergebnisse. Der Anteil an hyalinem Knorpel war höher, der an faserigem Gewebe geringer als in den anderen Versuchsgruppen. Die Untersuchung des Gewebes mit einem Druckstempel bewies jedoch, dass das Defektgewebe viel weniger widerstandsfähig war als normaler Knorpel. Es muss also bei den Therapieverfahren, die autologe Chondrocyten verwenden, die Frage gestellt werden, ob die transplantierten Zellen das Therapieergebnis beeinflussen, oder ob die Membranen bzw. das Periost allein schon therapeutischen Wert besitzen? In zwei Studien wurde gezeigt, dass mit Chondrocyten besäte Kollagenmembranen

ein besseres Reparaturergebnis erzielen als die Membranen allein (FRENKEL et al. 1997, PERKA et al. 2000). Es existieren jedoch auch viele Studien, in denen ein leerer Defekt und nicht die Matrix ohne Zellen als Kontrolle eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser Studien kann der Beitrag, den die Matrices bzw. die Zellen leisteten, nur unzulänglich evaluiert werden (HUNZIKER 2002). Bereits 1989 zeigten GRANDE et al. mit Hilfe radioaktiv markierter, unter einen Periostlappen gespritzten Chondrocyten, dass diese an der Bildung von neuem Knorpel beteiligt waren. Sie machten allerdings nur acht Prozent aller Zellen in den Defekten aus. In einer anderen Studie verglichen die Untersucher Defekte, die durch Einnähen eines Periostlappens mit und ohne Unterspritzung von Zellen therapiert wurden, wobei keinerlei Unterschiede bezüglich der Qualität des Defektgewebes festgestellt worden waren (BREINAN et al. 1997). Des Weiteren muss die Überlegung angestellt werden, in wie weit die unterschiedlichen Membranen das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen. Schon 1998 verglich NEHRER das Verhalten von Hunde-Chondrocyten, die er auf Kollagen I- bzw. Kollagen II-Matrices aussäte. Der Anteil an Zellen mit einem chondrocytären Phänotyp war in der Kollagen II-Matrix zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als in der Kollagen I-Matrix. Er beobachtete auch die GAG-Produktion der Zellen und stellte fest, dass sie auf der Kollagen II-Membran höher war. EHLERS et al. beobachteten 1999 eben dieses Phänomen in vitro an kultivierten Schafs-Chondrocyten. In unserer Studie konnten wir diesen Zusammenhang in vivo nicht nachweisen. Das Gewebe in den Defekten, die mit einer Kollagen II-Membran therapiert wurden, war weder stärker differenziert, noch produzierte es mehr saure GAGs als das in den mit einer Kollagen I/III-Membran therapierten Defekten. Bezüglich dieses Phänomens sind bei der Transplantation in vivo zwei Ansätze vorstellbar: Ist es erfolgreicher, hochdifferenzierte Zellen in einen Defekt zu transplantieren, die jedoch aufgrund dieser Ausdifferenzierung ein geringes bis gar kein Teilungspotenzial haben? Oder ist es sinnvoller, Zellen einzusetzen, die sich noch stärker teilen können, aber dafür geringer differenziert sind? Eine zentrale Hypothese des Tissue Engineering ist die Annahme, dass eine erfolgreiche Knorpelregeneration die Verhältnisse im embryonalen Knorpel widerspiegeln sollte (CAPLAN 2000), da die extrazelluläre Matrix nicht nur strukturelle Aufgaben besitzt, sondern auch Signalwirkung auf die Zellen hat (SOLCHAGA et al. 2001). Die ursprüngliche EZM des embryonalen Knorpels besitzt jedoch einen sehr hohen Kollagen I-Gehalt.

Andererseits wird postuliert, dass es unmöglich ist, den embryologischen Differenzierungsprozess im adulten Knorpel nachzuahmen, da in der Umgebung der Transplantate andere Gewebeverhältnisse vorliegen als im embryonalen Knorpel (HUNZIKER 2002). Unsere Studie unterstützt weder die eine noch die andere These.

Schon früh wurde in der Literatur beschrieben, dass Periosttransplantate dazu neigten, zu verknöchern (BAB et al. 1982). Auch neuere Studien weisen auf dieses zentrale Problem hin (GILLOGLY et al. 1998, HUNZIKER 2002). Es wird vermutet, dass die Verdichtung des subchondralen Knochens und sein Heraufwachsen in den Defekt durch freigesetzte Faktoren aus der Kambiumschicht des Periostlappens hervorgerufen werden. Diese Verdichtung erhöht jedoch die Scherkräfte, die zwischen hartem Knochen und weicherem Knorpel entstehen. Dem entgegen steht eine klinische Studie von PETERSON et al. aus dem Jahre 2000, bei der Patienten bis zu neun Jahre nach Periosttransplantation untersucht wurden. Bei keinem der Patienten wurde eine Mineralisation des Knorpels oder eine Ossifikation beobachtet. Unsere Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass der Knochenanteil im Defektmaterial in der Periostgruppe besonders hoch war. Allein in der gar nicht therapierten Kontrollgruppe entstand noch etwas mehr Knochen. In dieser Versuchsgruppe kann die vermehrte Knochenbildung als Antwort auf den Knorpelverlust verstanden werden, vergleichbar arthrotischen Umbauvorgängen innerhalb eines Gelenkes. Dieser Umbau ist ein Kompensationsmechanismus für den verlorenen Knorpel. Aber auch in den anderen Versuchsgruppen besaß der Knochen stets einen Anteil von über 10 Prozent am Defektareal. Für besonders bedeutsam halten wir in diesem Zusammenhang die Defekttiefe. Entgegen der Planung ist es in den meisten Fällen nicht gelungen, die osteochondrale Grenzlamelle intakt zu lassen. Durch die Eröffnung des Markraumes und die folgende Ausschüttung von Mediatoren aus dem Knochenmark wurde der körpereigene Reparaturmechanismus eingeleitet. Ein Phänomen, welches bei zahlreichen Therapieansätzen zur Knorpelreparatur angewendet wird (MINAS und NEHRER 1997). Allerdings scheint diese Eröffnung auch Auswirkungen auf das Knochenwachstum selbst gehabt zu haben, denn der eröffnete Knochen proliferierte. In Defekten, in denen die osteochondrale Grenzlamelle nicht durchbrochen wurde, wuchs der Knochen

weniger und verdichtete sich nicht so stark. Besonders die Ausschüttung von TGF- β führt zur Ausbildung von Chondro- und Osteophyten (BAKKER et al. 2001). Auch das Heraufwachsen von Gefäßen aus dem subchondralen Knochen scheint in diesem Zusammenhang bedeutsam zu sein. HUNZIKER und DRIESANG zeigten 2003, dass die Unterdrückung der Angiogenese mit Hilfe von Suramin die Bildung von Knochen in osteochondralen Defekten verringerte.

Auch die Fixierung der Transplantate scheint Einfluss auf die Gewebemorphologie gehabt zu haben. Mit Ausnahme der Gruppe, in der die Kollagen I/III-Membran leer verwendet wurde, bildete sich in den Gruppen, in denen die Transplantate eingeklebt wurden, mehr zellreiches Bindegewebe. Dieses zellreiche Bindegewebe stellte morphologisch eine Art Granulationsgewebe mit Fibroblasten, Histiozyten und einsprossenden Kapillaren dar. Warum beeinflusste der Kleber weder die Gruppe, in der die Membran leer eingeklebt wurde, noch die beiden Gruppen, in denen der Kleber nur zur Abdichtung verwendet wurde? 1997 zeigten BRITTBURG et al., dass weder humane, noch Kaninchenchondrocyten die Tendenz besaßen, in Fibrinkleber einzuwandern. Er beschrieb jedoch keinerlei toxische Reaktionen. In einer anderen Studie wurden Chondrocyten in einer Fibrinklebersuspension in osteochondrale Defekte transplantiert. Nach 13 Wochen befanden sich keine lebenden Chondrocyten mehr in den Defekten. Die Kleberreste waren von einem lympho-monozytären Infiltrat umgeben, und der umgebende Knorpel degeneriert. Später wurden die Entzündungszellen durch fibröses Gewebe ersetzt. Diese unerwünschten Effekte wurden offensichtlich durch die unphysiologisch hohen Fibrinkonzentrationen im Kleber ausgelöst (VAN SUSANTE et al. 1999), so dass der direkte Kontakt zwischen Kleber und Chondrocyten ein Absterben der Zellen bewirkte. Der Zelltod löste dann eine Entzündungsreaktion aus, deren Endprodukt das zellreiche Bindegewebe darstellt.

Wir beobachteten unterschiedlichen Differenzierungsgrade des Gewebes in den zwei verschiedenen Defektlokalisationen. Der höhere Differenzierungsgrad in den kondylären Defekten lässt sich möglicherweise durch den auf diesen Defekten lastenden höheren Druck erklären. Dieser übte einen Regenerationsreiz aus, der das Gewebe veranlasste, sich in Richtung des hyalinen Knorpels zu differenzieren. Diese mesenchymale Transformation wurde von PAUWELS 1975

als kausale Histogenese bezeichnet. Nach diesem Konzept wandelt sich mesenchymales Gewebe unter Einwirkung von Kompressionskräften in hyalinen Knorpel um. Bestätigung findet diese These in unserer Beobachtung, dass die beiden Bindegewebsarten in den patellofemorale Defekten wesentlich stärker vertreten waren als in den kondylären. BRITTBURG et al. berichteten 2001, dass bei Patienten nach autologer Chondrocytentransplantation die Gewebequalität in stärker belasteten Arealen besser war als in schwächer belasteten. An explantierten Knorpelzylindern zeigten JIN et al. 2001, dass dynamische Kompression die Protein- und Proteoglykansynthese erhöhte. Die höhergradige Differenzierung des Transplantatgewebes in den kondylären Defekten äußerte sich auch in der stärkeren Alcianblaufärbung. Schon 1999 kultivierten CARVER und HEATH Chondrocyten in einem Perfusionssystem, welches die Zellen intermittierend einem hydrostatischen Druck aussetzte. Diese Zellen produzierten signifikant höhere GAG-Mengen als ohne Druck kultivierte Kontrollen. In unserer Untersuchung färbten sich jedoch auch Präparate kräftig an, die morphologisch als Bindegewebe beurteilt wurden. Die patellofemorale Defekte der Periostgruppe zeigten die geringste Färbereaktion. Die kondylären Defekte dieser Gruppe wiesen trotz der starken Knochenbildung nur eine mäßig veränderte Färbung auf. Die oben erwähnte Theorie von PAUWELS besagt außerdem, dass eine zusätzliche elastische Verformung zur chondralen oder desmalen Verknöcherung des Gewebes im Sinne einer metaplastischen Ossifikation führt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in den kondylären Defekten fast aller Versuchsgruppen mehr Knochen existierte als in den patellofemorale. Möglicherweise war die Einwirkung elastischer Kräfte in den kondylären Defekten stärker und führte daher zu einer metaplastischen Ossifikation. Ebenfalls denkbar wäre, dass die Verdichtung des subchondralen Knochens als frühes Arthrosezeichen aufgefasst werden muss. Besonders die kondylären Defekte der Periostgruppe zeigten eine starke subchondrale Sklerosierung. In den patellofemorale Defekten der Periostgruppe war die Knochenbildung vergleichbar mit der in den anderen Versuchsgruppen.

4.2 Oberflächenbeschaffenheit

Beide Scores zeigten, dass nur die allerwenigsten Defekte eine glatte und intakte Oberfläche besaßen. Ziel der Therapieansätze sollte die Entstehung eines Gewebes sein, welches den mechanischen Ansprüchen im Gelenk genügt, und damit eine schmerzfreie Gelenkfunktion ermöglicht. Vielfach wurde aufgezeigt, dass bereits kleine Unregelmäßigkeiten oder Verletzungen der Knorpeloberfläche als präarthrotische Faktoren gelten müssen (BUCKWALTER und MANKIN 1997b, KIM und HAN 2000). Daher muss ein besonderes Augenmerk auf die schlechte Oberflächenqualität der Defekte gerichtet werden. Sie könnte Ausgangspunkt für erneute arthrotische Umbauvorgänge innerhalb des Gelenks sein. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss einer unregelmäßigen Defektoberfläche auf den umgebenden Knorpel betrachtet werden, da der Gedanke nahe liegt, dass dort bereits degenerative Veränderungen durch die Oberflächenunregelmäßigkeiten entstanden sein könnten. Wir fanden jedoch weder einen statistisch signifikanten noch einen tendenziellen Zusammenhang zwischen diesen beiden Merkmalen. Das Gegenteil war bei der Untersuchung mit dem modifizierten Score der Fall. Nachdem wir die verschiedenen Defektlokalisationen untersucht hatten, fanden wir heraus, dass die kondylären Defekte in den meisten Versuchsgruppen eine glattere Oberfläche besaßen als die patellofemorale Defekte, was sich möglicherweise durch den stärkeren Druck auf die kondylären Defekte erklärt. Er begünstigte eventuell die Ausbildung einer glatteren und intakten Oberfläche.

4.3 Strukturelle Integrität und Dicke des Defektgewebes

Diese beiden Merkmale wurden von uns nur mit Hilfe des O'Driscoll-Scores bewertet. Auch bezüglich dieser beiden Untersuchungskriterien fanden wir keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die strukturelle Integrität des Defektgewebes war in fast allen Gruppen gut. Lediglich die Periostgruppe enthielt Defekte mit etwas stärker zerstörter Füllung. Da in dieser Therapiegruppe die Oberfläche ebenfalls besonders unregelmäßig war, liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen zu vermuten. Er stellte sich in den anderen Gruppen jedoch nicht so deutlich dar.

Auch korrelierte die strukturelle Integrität nicht mit der Gewebemorphologie, denn auch Versuchsgruppen, in denen das dominierende Gewebe eher minderwertig war, erwiesen sich nicht als stärker strukturgestört. Es existierte auch kein Zusammenhang zwischen der Dicke und der histologischen Unversehrtheit des Gewebes. In der Periostgruppe mit der stärksten Transplantatschädigung waren die Defekte gegenüber dem Umgebungsknorpel am wenigsten eingesunken.

4.4 Clusterbildung im Defektareal

Die Zusammenballung von Knorpelzellen zu Clustern wird in der Literatur allgemein als Degenerationszeichen bewertet (ROTHWELL und BENTLEY 1973, BUCKWALTER und MANKIN 1997b). Bei diesem Merkmal zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und zwei der Versuchsgruppen. Sowohl die Kollagen I/III-Gruppe mit Zellen als auch die Kollagen II-Gruppe mit Zellen wiesen signifikant weniger Cluster im Defektareal als die Kontrollgruppe auf. Noch mehr Cluster als in der Kontrollgruppe existierten in der Versuchsgruppe, in der eine leere Kollagen I/III-Membran in die Zellen eingeklebt wurde und in der Periostgruppe. In den Defekten, in die eine leere Kollagen II-Membran transplantiert wurde, fanden sich hingegen kaum Cluster. Diese Gruppe erreichte einen Punktwert, der annähernd gesundem hyalinem Knorpel entsprach. Denkbar wäre, dass diese Membran, die aus dem Hauptkollagen des hyalinen Knorpels besteht, der frühzeitigen Degeneration der eingewanderten Zellen entgegenwirkte. EHLERS beschrieb 1999, dass in Zellkulturversuchen eine Kollagen II-Membran die Ausbildung eines chondrocytären Phänotyps und eine höhere GAG-Produktion förderte. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die in die Defekte eingewanderten Zellen Rezeptoren für Moleküle der EZM besitzen (SOLCHAGA et al. 2001). Wurden die Chondrocyten jedoch an die Matrix gekoppelt in den Defekt eingebracht, schien sich dieses Problem nicht zu ergeben. Das vermehrte Auftreten der Cluster in der Periostgruppe lässt sich vermutlich durch die inkongruente Oberfläche der Defekte und die Strukturstörung des Gewebes erklären.

4.5 Degenerative Veränderungen bzw. Clusterbildung in der Umgebung der Defekte

Von besonderer Bedeutung ist, wie sich die vielfältigen unterschiedlichen Therapieansätze auf die Umgebung des Knorpeldefektes auswirken. Dieser Einfluss wurde anhand der Degenerationszeichen im Umgebungsknorpel untersucht. Wie bereits erwähnt, war die Anzahl der Chondrocytencluster um die Defekte herum wesentlich größer als innerhalb der Defekte. Auch die Alcianblaufärbung war vielfach vermindert. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Verfahren zur Knorpelregeneration nur bedingt in der Lage waren, die weitere Degeneration des Gelenknorpels zu verhindern. Denkbar ist sogar, dass die Therapieverfahren den Umgebungsknorpel zusätzlich schädigten. Bei der Beurteilung dieses Kriteriums mit dem O'Driscoll-Score ergaben sich jedoch keine auffälligen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch eine Untersuchung aus dem Jahr 2003, die aufzeigte, dass bereits die Schaffung von Knorpeldefekten dem an den Wundrändern verbliebenen Knorpel irreversiblen Schaden zufügte (HUNZIKER und QUINN 2003b). Bei der Untersuchung mit dem von uns entwickelten Score fielen jedoch zwei Besonderheiten auf. Einerseits zeigten sich bei der Differenzierung der zwei Defektlokalisationen große Unterschiede in der Anzahl der Cluster, andererseits existierten ebenfalls starke Unterschiede innerhalb der Gruppen. In der Umgebung einiger Defekte hatten sich keine oder kaum Cluster gebildet, während andere Defekte derselben Gruppe starke degenerative Veränderungen in ihrer Umgebung aufwiesen. Dieses Phänomen deutet daraufhin, dass nicht allein das angewendete Therapieverfahren auf das Ergebnis Einfluss hatte. Ein entscheidender Faktor scheint abermals der auf den Defekten lastende Druck zu sein. Patwari et al. zeigte 2004, dass unphysiologisch hoher Druck auf Kälberknorpel zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate führte. Unter Diskussionspunkt 4.2 wurde bereits erwähnt, dass die Clusterbildung in der Umgebung der kondylären Defekte stärker ist als patellofemorale. Der stärkere Druck auf diesem Defektareal wird möglicherweise trotz der Therapie nur ungenügend verteilt und lässt den angrenzenden Knorpel degenerieren. Ebenfalls fraglich ist, ob die Fixierungsart der Transplantate die Clusterbildung beeinflusst. In der Literatur wird erwähnt, dass das Einnähen von Transplantaten zum

Auftreten degenerativer Veränderungen im angrenzenden Knorpel führte (BREINAN et al. 1997). Zwar zeigte sich in einem Fall in der Umgebung eines mittels Naht fixierten Transplantates ein verbliebener Stichkanal im Umgebungsknorpel, die Clusterbildung in der Umgebung dieser Defekte war jedoch nicht ausgeprägter als bei den geklebten Defekten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass den Veränderungen in der Umgebung mindestens ebenso viel Aufmerksamkeit geschenkt werden muss wie den Defekten, da durch die Therapie der angrenzende Knorpel nicht geschädigt werden sollte.

4.6 Adhärenz des Defektmaterials

In allen Fällen war das entstandene Gewebe am Defektgrund ausnahmslos angewachsen. Die Anbindung an das umgebende Gewebe war jedoch in vielen Fällen nicht vollständig. Fraglich ist, welche der Therapiestrategien eine möglichst komplette Einheilung fördert. Bezüglich dieses Merkmals fanden wir keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auffällig war lediglich, dass die Kontrollgruppe eines der besten Ergebnisse besaß. Die beste Einheilung beobachteten wir in der Gruppe, in der die mit Zellen unterspritzte Kollagen I/III-Membran in die Defekte eingenäht worden war. Welchen Einfluss hatten die transplantierten Chondrocyten und die Fixierungsart auf die Adhärenz? Die gezüchteten Chondrocyten schienen die Einheilung in die Umgebung nicht zu beeinflussen. Die anderen drei Versuchsgruppen, bei denen ebenfalls kultivierte Chondrocyten verwendet wurden, waren schlechter an die Umgebung angebunden als die Kontrollgruppe. Denkbar wäre auch, dass durch das Einnähen der Transplantate eine bessere Adhärenz erreicht wurde als durch die Fixierung mittels Fibrinkleber. In der Periostgruppe, in welcher die Transplantate ebenfalls mittels Naht befestigt wurden, war das Defektgewebe schlechter in die Umgebung eingebunden als in der Kontrollgruppe. Spalträume zwischen Transplantat und Umgebung können Ausgangspunkt für erneute arthrotische Umbauvorgänge innerhalb des Gelenkes sein. Wenn die Kontinuität zwischen Defektgewebe und Umgebung nicht gewährleistet ist, führt ungenügende Gewichtsverteilung zu hohen punktuellen Belastungen. Diese Orte sind dann besonders anfällig für enzymatische Auflösung der Knorpelmatrix (KIM und HAN 2000). Denkbar ist auch, dass schlecht mit der Umgebung verbundenes Defektgewebe bei starken

Belastungen ganz aus den Defekten heraus gedrückt wird. Den Einfluss von Druck auf die Adhärenz zeigte die Untersuchung der unterschiedlichen Defektlokalisationen. Die Adhärenz der patellofemorale Defekte war besser als die der kondylären. Obwohl das Gewebe in den kondylären Defekten stärker differenziert war, war es schlechter in die Umgebung eingeeilt. Möglicherweise stellte der auf den Kondylen lastende Druck nicht nur einen Regenerationsreiz dar, sondern erschwerte auch die Einbindung der Transplantate in die Umgebung. Denkbar ist außerdem, dass hoher Druck, der bereits zehn Tage nach der Operation auf die Kondylen einwirkte, das noch frische Transplantat sehr stark belastete. In diesem Zusammenhang ist eine Tierstudie bedeutsam, in der gezeigt wurde, dass eingenähte Periostlappen schon innerhalb der ersten Tage nach der Operation verloren gingen, wenn das betroffene Gelenk nicht für längere Zeit immobilisiert wurde. Und selbst bei den ruhiggestellten Tieren ging ein großer Teil der Periostlappen verloren (DRIESANG und HUNZIKER 2000). Bei der klinischen Anwendung von Knorpelregenerationsverfahren wird daher besonderer Wert auf das postoperative Management gelegt. So wird meistens empfohlen, das Gelenk für sechs bis acht Wochen nur teilzubelasten (LÖHNERT et al. 1999). Auch BRITTBERG et al. beschrieben 2001, dass die Randzone zwischen Defekt- und Umgebungsgewebe die schwächste Stelle des Systems sei und empfahlen daher, bei Nachuntersuchungen keine Proben aus diesen Arealen zu entnehmen.

4.7 Vergleich der beiden verwendeten Bewertungsscores

Wie schon im Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben, wurden die Defekte zunächst mit dem von O'DRISCOLL et al. 1986 etablierten Score bewertet. Der besondere Vorteil eines semiquantitativen Bewertungsschemas ist, dass am Ende der Untersuchung ein absoluter Punktwert steht. Mit Hilfe dieses Wertes stellt man Abweichungen des Defektgewebes vom maximalen Punktwert dar, der gesundem hyalinem Gelenkknorpel entspräche. Auch Einzelkriterien lassen sich präzise beurteilen. Das Verfahren ermöglicht eine einfache und übersichtliche Darstellung von Versuchsergebnissen. Doch genau in der Reduktion einer gesamten Versuchsgruppe auf einen Punktwert liegt auch der Nachteil des Bewertungsverfahrens. Inhomogenitäten, wie wir sie häufig innerhalb einer Gruppe beobachteten, fallen der Mittelung der Ergebnisse zum Opfer und

werden nicht dargestellt. Gerade bei der Beachtung dieser Unterschiede und ihrer möglichen Ursachen liegt eventuell der Schlüssel zur Entwicklung einer erfolgversprechenden Therapie. So ist zum einen die Reduktion des im Defektareal vorkommenden Gewebes auf drei Typen zu wenig. Zum anderen sollte die Verteilung der unterschiedlichen Gewebetypen zum Ausdruck gebracht werden. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn nur das Gewebe Erwähnung findet, das mehr als 50 Prozent des Defektes einnimmt. Des weiteren veränderte O'DRISCOLL den Score von 1986 im Jahre 1988 noch einmal. Statt Faserknorpel spricht er jetzt nur noch von undifferenziertem Mesenchym. Diesen Gewebetyp beobachteten wir in keinem Fall. Wir vermuten, dass O'Driscoll diesem Gewebe einen höheren Punktwert zuordnete als Bindegewebe und Knochen, da entwicklungsgeschichtlich alle Binde- und Stützgewebe aus pluripotenten Zellen undifferenzierten Mesenchyms hervorgehen. Aus diesem nur während der Entwicklung vorkommenden Gewebe könnte also noch Knorpel entstehen.

Bei der Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit beschränkten wir uns darauf, zwischen planer und inkongruenter Oberfläche zu unterscheiden. Unserer Meinung nach genügt diese Differenzierung, da bereits kleine Oberflächenunregelmäßigkeiten als präarthrotische Faktoren zu bewerten sind. Auch die Beurteilungspunkte Dicke und Strukturelle Integrität lassen sich unter diesem Punkt subsummieren. Eine eingesunkene Defektoberfläche wurde von uns als inkongruent bewertet, da durch sie die gesamte Knorpeloberfläche unregelmäßig wird. Auch die strukturelle Integrität fällt in gewisser Weise unter diesen Untersuchungspunkt, da wir in keinem Fall eine komplett plane Oberfläche fanden, unter der sich dann ein völlig destruiertes Defektgewebe befand. Die besondere Erwähnung dieses Merkmals kann jedoch notwendig werden, wenn Schäden innerhalb des Defektgewebes nicht von der Oberfläche ausgehen. Das Kriterium Hypozellularität wird im modifizierten Score nicht erwähnt, da dieses Phänomen in keinem Defekt beobachtet wurde. Aus diesem Grund vergaben wir bei der Anwendung des O'Driscoll-Scores für jeden Defekt die Höchstpunktzahl. Die Cluster innerhalb des Defektes wurden mit dem modifizierten Score nicht bewertet, da sie hauptsächlich im umgebenden Knorpel vorkamen. Dieses Kriterium war jedoch das einzige, bei dem sich statistisch signifikante Unterschiede ergaben, so dass es bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt

werden sollte. Bei der Beurteilung der degenerativen Veränderungen und der Adhärenz zeigte sich, dass die Darstellung der gesamten Versuchsgruppe mit Hilfe eines Wertes zu unpräzise war. Daher entschieden wir uns für eine Darstellung der Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen. Auch eine getrennte Beurteilung der patellofemorale und kondylären Defekte erwies sich als sinnvoll, da bereits klinische Studien existieren, die Unterschiede zwischen verschiedenen Defektlokalisationen darstellen (PETERSON et al. 2000, 2002). Im Tiermodell zeigten RASANEN und MESSNER 1996, dass große Unterschiede zwischen den Knorpelregionen innerhalb eines Gelenkes existieren. Es stellen sich Fragen nach den Faktoren, die unabhängig vom Therapieverfahren das Gesamtergebnis beeinflussen. So spielt zum Beispiel das Alter der Versuchstiere eine entscheidende Rolle, da sich die Gewebequalität bei älteren Tieren verschlechtert (WEI et al. 1997) und die Zellantwort auf anabole Stimuli in reiferen Chondrocyten abnimmt (MARTIN und BUCKWALTER 2002). Die Bedeutung eventuell bestehender Gelenkfehlstellungen wurde bereits erwähnt. Von besonderer Bedeutung ist auch der Zeitpunkt der ersten Belastung und die postoperative Physiotherapie. PETERSON et al. zeigte im Jahr 2000 in einer klinischen Studie, dass die verfrühte Rückkehr zum Leistungssport Transplantatversagen bewirkte. In unserer Untersuchung war das behandelte Gelenk der Versuchstiere für zehn Tage mit Hilfe eines Gipsverbandes ruhiggestellt. Während dieser Zeit belasteten die Tiere das Bein trotz des Gipsverbandes teilweise, danach voll. Besonders statische Belastung führt jedoch zur konsekutiven Herabsetzung des Knorpelstoffwechsels (LEE et al. 2003a).

Die Auswahl des Versuchstiers spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Therapiestandards. O'DRISCOLL et al. entwickelten ihren Score zur Bewertung von Defekten im Kaninchenknie. Dieses Tiermodell spiegelt jedoch nur bedingt die Verhältnisse im menschlichen Knorpel wider. Kleintierknorpel besitzt einen wesentlich größeren Zellanteil als der Knorpel größerer Tieren oder vom Menschen. STOCKWELL fand 1978 einen bis zu 25fachen Unterschied in der Zelldichte zwischen Kleintieren wie Mäusen und größeren Spezies wie dem Menschen. Bei diesen Tieren stellen sich degenerative Veränderungen also als Zellverlust dar. Bei den Schafen kam es jedoch nie zu einer Verringerung der Zellzahl. In den Defekten und in ihrer Umgebung existierten ausschließlich mehr

Zellen als im normalen Gelenkknorpel. Auch hinsichtlich der Knorpeldicke eignet sich das Schaf besser als Versuchstier. Die durchschnittliche Knorpeldicke ist mit 1 mm auf der kondylären Gelenkfläche wesentlich größer als bei Ratten, Mäusen oder Kaninchen und kommt damit der Situation im menschlichen Gelenk näher. Auch verkalkt der Knorpel von Kleintieren schneller als der von größeren Spezies (STOCKWELL 1978, SOLCHAGA et al. 2001).

Bei der Wahl des geeigneten Versuchstieres muss außerdem die mechanische Funktionsweise des Knies beachtet werden. Es wird in der Literatur eindeutig formuliert, dass kein ideales Tiermodell für das menschliche Knie existiert, da der Mensch das einzige Wesen ist, das plantigrad und bipedal läuft (DYE 1987). Die Hauptbelastung tritt also in Extensionsstellung auf, während bei allen Tieren die normale Belastung während der Flexion auftritt. Das Schafsknie weist jedoch annähernd die gleichen bindegewebigen Komponenten wie das menschliche Knie auf. Hierzu gehören gut entwickelte Kreuzbänder und Menisken, asymmetrische Kollateralbänder sowie die Insertion des M. popliteus am lateralen Femurkondylus. Ein bedeutender Unterschied ist jedoch der M. extensor digitorum longus, der beim Schaf am lateralen Femurkondylus entspringt und dessen Sehne das Kniegelenk kreuzt. Der Ursprung dieses Muskels liegt beim Menschen an der proximalen Tibia, so dass keine Überkreuzung des Gelenkes stattfindet. Aufgrund der diversen Unterschiede zwischen den Versuchstieren war eine Modifikation des für Kleintiere angelegten O'Driscoll-Scores nötig.

4.8 Ausblick

Ziel der Arbeit war eine Beurteilung unterschiedlicher Knorpelersatztechniken im Schafskniemodell. Auch wenn diese Studie keine Aussage über das beste Therapieverfahren ergibt, wurde dennoch ein stabiles Tiermodell etabliert, welches weitere Studien ermöglicht. Im weiteren Verlauf sollte die Gruppengröße erhöht werden, um statistisch sichere Aussagen machen zu können. In Zukunft kann auf die Untersuchung rein chondraler Defekte verzichtet werden, da osteochondrale Defekte der klinischen Situation am Patienten eher entsprechen. In klinischen Studien erbrachte die Therapie mit Hilfe von autologen Chondrocyten und Periost gute Langzeitergebnisse (PETERSON et al. 2000, 2002). Daher sollte in

zukünftigen Untersuchungen ein Schwerpunkt auf der Weiterentwicklung der Therapiekonzepte liegen, bei denen Membranen auf Proteinbasis (z.B. Kollagen) verwendet werden. LINDAHL et al. zeigte 2001 in einer Studie, dass trotz hoher Kosten für die ACT mit Periost die Gesamtbelastung für das Gesundheitswesen sank, da sich Behinderungen durch die Erkrankung und die Fehlzeiten am Arbeitsplatz stark verringerten. Trotzdem wäre es angesichts der hohen Kosten für die Zellzüchtung wichtig zu wissen, welchen Einfluss kultivierte und transplantierte Zellen wirklich auf das Therapiergebnis haben. Weitere Studien sollten auch die Wirkung von an die Matrices gekoppelten Wachstumsfaktoren untersuchen.

5 Zusammenfassung

Eine normale Gelenkfunktion ist an einen intakten Gelenkknorpel gebunden. Dieser besitzt jedoch nur begrenzte Möglichkeiten der Regeneration bzw. Reparatur, so dass Schädigungen des Knorpels zu Arthrose führen können. Es existiert bereits eine Vielzahl konservativer und operativer Therapiemethoden, die hinsichtlich ihres Erfolges unterschiedlich bewertet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, im Schafskniemodell verschiedene Therapiemethoden der Knorpelregeneration untereinander und mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden sieben Gruppen gebildet, in denen Schafe jeweils zwei Defekte an der kondylären sowie an der patellofemorale Gelenkfläche erhielten. In der Kontrollgruppe wurden die Defekte leer belassen. In den weiteren Gruppen wurde entweder eine leere oder eine mit autologen Chondrocyten besäte Kollagen I/III-Matrix eingeklebt. In einer weiteren Gruppe wurde die Kollagen I/III-Membran in die Defekte eingenäht und mit Chondrocyten unterspritzt. In einer anderen Versuchsgruppe wurden die Defekte mit einem Periostlappen gedeckt, der anschließend mit autologen Chondrocyten unterspritzt wurde. Die letzten beiden Versuchsgruppen wurden mit einer leeren bzw. einer mit autologen Chondrocyten besäten Kollagen II-Matrix, welche in die Defekte eingeklebt wurde, therapiert.

Die Defekte wurden mit Hilfe des von O'DRISCOLL (1986b) etablierten Scores und mit einem von uns in Anlehnung an dieses Bewertungssystem entwickelten modifizierten Score bewertet. Es zeigte sich, dass keine Therapiegruppe einen signifikanten Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe besaß. Lediglich bezüglich einzelner Untersuchungskriterien konnten Unterschiede ausgemacht werden. Differenzen innerhalb der Therapiegruppen stellten wir beim Vergleich der beiden Defektlokalisationen fest. In den kondylären Defekten war die Qualität des entstandenen Gewebes besser als in den patellofemorale. Auch bei den Untersuchungskriterien Oberflächenbeschaffenheit und Adhärenz zum umgebenden Knorpel erzielten die kondylären Defekte bessere Ergebnisse. In

ihrer Umgebung fanden sich jedoch auch mehr Degenerationszeichen als patellofemoral.

Auch wenn keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen gefunden wurden, ist es uns trotzdem gelungen, ein stabiles Tiermodell zu etablieren, das die Verhältnisse im menschlichen Knorpel besser widerspiegelt als die häufig verwendeten Kleintiere. Zusätzlich modifizierten wir den für Kleintiere entwickelten Score von O'DRISCOLL (1986b) und etablierten damit ein Bewertungssystem, welches den Erfordernissen eines Großtiermodells gerecht wird.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Aldegheri R, Trivella G, Saleh M (1994) Articulated distraction of the hip. Conservative surgery for arthritis in younger patients. Clin Orthop 301: 236-243
- 2) Allemann M, Mizuno S, Eid K, Yates KE, Zaleske D, Glowacki J (2001) Effects of hyaluronan on engineered articular cartilage matrix gene expression in three-dimensional collagen scaffolds. J Biomed Mater Res 55: 13-19
- 3) Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg VM, Johnstone B (1999) Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatine composite sponge. Tissue Eng 6: 545-553
- 4) Bab I, Sela J, Stein H (1982) Transplantation of free perichondral grafts into rabbit articular cartilage is associated with matrix vesicle calcification. Acta Anat 113: 53-60
- 5) Bakker AC, van de Loo FA, Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, Richards CD, van den Berg WB (2001) Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: Evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. Osteoarthritis Cartilage 9: 128-136
- 6) Baumgaertner MR, Cannon WD, Vittori JM, Schmidt JM, Maurer RC (1990) Arthroscopic debridement of the arthritic knee. Clin Orthop Rel Res 253: 197-202
- 7) Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zkor DJ, Gross AE (1992) Fresh osteochondral allografts for posttraumatic defects in the knee. A survivorship analysis. J Bone Joint Surg 74-B: 105-110
- 8) Bentley G (1978) The surgical treatment of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg 60-B: 74-81

- 9) Benya PD und Schaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215-224
- 10) Bobic V (1996) Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 3: 262-264
- 11) Breinan HA, Minas T, Barone L, Tubo R, Hsu HP, Shortkroff S, Nehrer S, Sledge CB, Spector M (1998) Histological evaluation of the course of healing of canine articular cartilage defects treated with cultured autologous chondrocytes. *Tissue Eng* 4: 101-114
- 12) Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M (2001) Autologous chondrocyte implantation in a canine model: Change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res* 19: 482-492
- 13) Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M (1997) Effect of cultured chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg* 79-A: 1439-1451
- 14) Brittberg M, Faxén E, Peterson L, (1994a) Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis: A prospective 4-year follow-up of 37 patients. *Clin Orthop Rel Res* 307: 155-164
- 15) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994b) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895
- 16) Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L (1997) Influence of fibrin sealant (Tisseel®) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials* 18: 235-242
- 17) Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L (2001) Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 337-348

- 18) Bruns J und Behrens P (1997) Perichondriumtransplantation bei Gelenkknorpelschäden. TW Sport und Medizin 9: 90-94
- 19) Buckwalter JA und Lohmander S (1994) Current concepts review. Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development : J Bone Joint Surg 76-A: 1014-1018
- 20) Buckwalter JA und Mankin HJ (1997a) Articular cartilage Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. J Bone Joint Surg 79-A: 600-611
- 21) Buckwalter JA und Mankin HJ (1997b) Articular cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. J Bone Joint Surg 79-A: 612-632
- 22) Buckwalter JA und Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum 41: 1331-1342
- 23) Buckwalter JA und Mow VC (1992) Cartilage repair in osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ (eds), Osteoarthritis, diagnosis and medical/surgical management. WB Saunders: Philadelphia 71-107
- 24) Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB (1990) Articular cartilage: Composition, structure, response to injury and methods of facilitation repair. In: Ewing JW (ed), Articular cartilage and knee joint function. Basic science and arthroscopy, Bristol-Myers/Zimmer, Orthopaedic Symposium, Raven Press: New York 19-56
- 25) Burgeson RE und Nimni ME (1992) Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop Rel Res 282: 250-272
- 26) Caplan AI (2000) Tissue engineering designs for the future: New I ogics, old molecules. Tissue Eng 6: 1-8
- 27) Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997) Principles of cartilage repair and regeneration. Clin Orthop 342: 254-269

- 28) Carver SE und Heath CA (1999) Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating articular cartilage. *Tissue Eng* 5: 1-11
- 29) Cohen J und Lacroix P (1955) Bone and cartilage formation by periosteum. Assay of experimental autogenous grafts. *J Bone Joint Surg* 37-A: 717-730
- 30) Coventry MB, Ilstrup DM, Wallrichs SL (1993) Proximal tibial osteotomy: A critical long-term study of 87 cases. *J Bone Joint Surg* 75-A: 196-201
- 31) Driesang IM und Hunziker EB (2000) Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair. *J Orthop Res* 18: 909-911
- 32) Dustmann HO und Puhl W (1976) Altersabhängige Heilungsmöglichkeiten von Knorpelwunden. *Z Orthop* 114: 749-764
- 33) Dye SF (1987) An evolutionary perspective of the knee. *J Bone Joint Surg* 69-A: 976-983
- 34) Ehlers EM, Fuß M, Rohwedel J, Russlies M, Kühnel W, Behrens P (1999) Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen I/III sponge. *Ann Anat* 181: 513-518
- 35) Engkvist O (1979a) Reconstruction of patellar articular cartilage with free autologous perichondral grafts. An experimental study in dogs. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13: 361-369
- 36) Engkvist O, Skoog V, Pastacaldi P, Yormuk E, Juhlin R (1979b) The cartilaginous potential of the perichondrium in rabbit ear and rib. A comparative study in vivo and in vitro. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13: 275-280
- 37) Eyre DR und Muir H (1975) The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilage of the pig. *Biochem J* 151: 595-602

- 38) Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT (2000) Transforming growth factor beta superfamily members: Role in cartilage modelling. *Plast Reconst Surg* 105: 980-990
- 39) Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM (1997) Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg* 79-B: 831-836
- 40) Fuller JA und Ghadially FN (1972) Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects of articular cartilage. *Clin Orthop Rel Res* 86: 193-205
- 41) Garret JC (1986) Treatment of osteochondral defects in the distal femur with fresh osteochondral allografts: A preliminary report. *Arthroscopy* 2: 222-226
- 42) Garret JC (1994) Fresh frozen osteochondral allografts for the treatment of articular defects in osteochondrosis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop Rel Res* 303: 33-37
- 43) Gillogly SD, Voight M, Blackburn T (1998) Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther* 28: 241-251
- 44) Glowacki J, Trepmann E, Folkmann J (1983) Cell shape and phenotype expression in chondrocytes . *Proc Soc Biol Med* 172: 93-98
- 45) Grande DA, Pitman M, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7: 208-218
- 46) Green W (1977) articular cartilage repair: Behaviour of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Rel Res* 124: 237-250

- 47) Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M (1995) Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum* 38: 960-968
- 48) Ham AW (1930) A histological study of the early phase of bone repair. *J Bone Joint Surg* 12: 827-844
- 49) Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M (1998) Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: Application in clinical practice. *Orthopedics* 21: 751-756
- 50) Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T (2000) Knorpelknochen transplantation versus autogene Chondrocytentransplantation. Eine prospektive vergleichende Studie. *Chirurg* 71: 1090-1097
- 51) Hunter W (1743) Of the structure and disease of articulating cartilages. *Phil Trans Roy Soc* 42-B: 514-521
- 52) Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 432-463
- 53) Hunziker EB und Driesang IM (2003a) Functional barrier principle for growth-factor-based articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 320-327
- 54) Hunziker EB und Kapfinger E (1999) Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg* 80-B: 144-150
- 55) Hunziker EB und Quinn TM (2003b) Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J Bone Joint Surg* 85-A: 85-92
- 56) Hunziker EB und Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: Cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 78-A: 721-733

- 57) Insall J (1974) The priede debridement for osteoarthritis of the knee. Clin Orthop 101: 61-67
- 58) Insall JN, Joseph DM, Msika C (1984) High tibial osteotomy for varus gonarthrosis. A long-term follow-up study. J Bone Joint Surg 66-A: 1040-1048
- 59) Jin M, Frank EH, Quinn TM, Hunziker EB, Grodzinsky AJ (2001) Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. Arch Biochem Biophys 395: 41-48
- 60) Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty. Historical and pathologic perspective: Present status. Arthroscopy 2: 54-69
- 61) Johnson LL (1990) The sclerotic lesion: Pathology and the clinical response to arthroscopic abrasion arthroplasty. In: Ewing JW (ed) Articular cartilage and knee joint function. Basic science and arthroscopy. Raven Press: New York 319-333
- 62) Kim HW und Han CD (2000) An overview of cartilage tissue engineering. Yonsei Med J 41: 766-773
- 63) Klagsbrun M (1979) Large scale preparations of chondrocytes. Methods Enzymol 58: 560-564
- 64) Knutson K, Lindstrand A, Lidgren L (1986) survival of knee arthroplasties. A nation-wide multicentre investigation of 8000 cases. J Bone Joint Surg 68-B: 795-803
- 65) Kon M (1981) Cartilage formation from perichondrium in a weight-bearing joint. An experimental study. Eur Surg Res 13: 387-396
- 66) Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M (2003a) Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. J Orthop Res 21: 272-281

- 67) Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M (2003b) Biosynthetic response of passages chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. *J Biomed Mater Res* 64-A: 560-569
- 68) Lindahl A, Brittberg M, Peterson L (2001) Health economics benefits following autologous chondrocyte transplantation for patients with focal chondral lesions of the knee. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc* 9: 358-363
- 69) Löhnert J, Ruhnau K, Gossen A, Bernsmann K, Wiese M (1999) Autologe Chondrocytentransplantation (ACT) im Kniegelenk. *Arthroskopie* 12: 34-42
- 70) Mankin HJ (1982) current concepts review: The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 64-A: 460-466
- 71) Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Lanotti JP, Ratcliff A (1994) Form and function of articular cartilage. In: Simon SR (ed), *Orthopaedic basic science*. AAOS: Rosemont 1-44
- 72) Martin JA und Buckwalter JA (2002) Aging, articular cartilage senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* 3: 257-264
- 73) Meachim G und Osborne GV (1970) Repair of femoral articular surface in osteoarthritis of the hip. *J Path* 102: 1-8
- 74) Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC; Yaghoubian RS, Pitman MI (1996) A comparison of abrasion burr arthroplasty und subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy* 12: 280-286
- 75) Minas T (1998) Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: Economics and quality of life. *Am J Orthop* 27: 739-744
- 76) Minas T und Nehrer S (1997) Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 20: 525-538

- 77) Morito T (1980) An experimental study on bone and cartilage formation in autogenous periosteal transplantation. *J Tokyo Dent Coll Soc* 80: 1723-1737
- 78) Muckle DS und Minns RJ (1989) Biological response to woven carbon fibre pads in the knee. *J Bone Joint Surg* 71-B: 60-62
- 79) Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1997) Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 38: 95-104
- 80) Nehrer S, Breinan HH, Ashkar S, Shortkroff S, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1998) Characteristics of articular chondrocytes seeded in collagen matrices in vitro. *Tissue Eng* 4: 175-183
- 81) O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 80-A: 1795-1812
- 82) O'Driscoll SW und Salter RB (1984) The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts und the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 66-A: 1248-1257
- 83) O'Driscoll SW und Salter RB (1986a) The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperichondral grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Rel Res* 208: 131-140
- 84) O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB (1986b) The chondrogenic potential of free autologous periosteal grafts for biological resurfacing major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg* 68-A: 1017-1034
- 85) O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB (1988) Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major

- full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg* 70-A: 595-606
- 86) O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzsimmons JS (2001) The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res* 19: 95-103
- 87) Ohlsén L (1978) Cartilage regeneration from perichondrium. Experimental and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 62: 507-513
- 88) Pastacaldi P und Engkvist O (1979) Perichondral wrist arthroplasty in rheumatoid patients. *Hand* 11: 184-190
- 89) Patwari P, Gaschen V, James IE, Berger E, Blake SM, Lark MW, Grodzinsky AJ, Hunziker EB (2004) Ultrastructural quantification of cell death after injurious compression of bovine calf articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 245-52
- 90) Pauwels F (1975) A clinical observation as example and proof of functional adaption of bone through longitudinal growth. *Z Orthop Grenzgeb* 113: 1-5
- 91) Perka C, Schultz O, Lindenhayn K, Spitzer RS., Muschik M, Sittlinger M, Burmester GR (2000) Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. *Clin Exp Rheumatol* 18: 13-22
- 92) Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A (2000) Two- to 9-Year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Rel Res* 374: 212-234
- 93) Pfeilschifter J, Diel I, Pilz U, Brunotte K, Naumann A, Ziegler R (1993) Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J Bone Min Res* 8: 707-717
- 94) Pineda A, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat* 143: 335-340

- 95) Poussa M, Rubak J, Ritsilä V (1981) Differentiation of the osteochondrogenic cells of the periosteum in chondrotrophic environment. *Acta Orthop Scand* 52: 235-239
- 96) Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg* 41-B: 618-619
- 97) Rasanen T und Messner K (1996) Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mater Res* 31: 519-524
- 98) Rodrigo J, Sakovich C, Travis C, Smith G (1978) Osteocartilaginous allografts as compared autografts in the treatment of knee joint osteocartilaginous defects in dogs. *Clin Orthop Rel Res* 134: 342-349
- 99) Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik: Neubearbeitet und herausgegeben von P. Böck. 17. Auflage. Urban & Schwarzenberg: München Wien Baltimore*
- 100) Rothwell AG und Bentley G (1973) Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 55-B: 588-594
- 101) Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Ruble EJ, MacMichael D, Clements ND (1980) The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. an experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 62-A: 1232-1251
- 102) Schachar N, McAllister D, Stevenson M, Novak K, McGaun L (1992) Metabolic and biochemical status of articular cartilage following cryopreservation and transplantation in a rabbit model. *J Orthop Res* 10: 603-609
- 103) Shapiro F, Koide S, Glimcher M (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 75-A: 532-553

- 104) Shortkroff S, Barone L, Hsu H-P, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M (1996) Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: The role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 17: 147-154
- 105) Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI (2001) Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 161-170
- 106) Speer D, Chvapil M, Volz RG, Holmes MD (1979) Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen implantation. *Clin Orthop Rel Res* 144: 326-335
- 107) Sprague NF (1981) Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease. *Clin Orthop* 160: 118-123
- 108) Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK (1997) Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Tech Orthop* 7: 294-299
- 109) Stockwell RA (1978) Chondrocytes. *J Clin Pathol* 31, Suppl 12: 7-13
Temenoff JS und Mikos AG (2000) Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-440
- 110) van Susante JLC, Buma P, Schumann L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RPH (1999) Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage : An experimental study in the goat. *Biomaterials* 20: 1167-1175
- 111) von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller PK (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267: 531-532
- 112) Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI (1998) Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4: 429-444

- 113) Wei X, Gao J, Messner K (1997) Maturation dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. J Biomed Mater Res 34: 63-72
- 114) Weisl H (1980) Intertrochanteric osteotomy for osteoarthritis. A long-term follow-up. J Bone Joint Surg 62-B: 37-42
- 115) Whitman W (1892) Leaves of grass (song of myself). In: Walt Whitman: Complete poetry and collected prose. Library of America: New York 217
- 116) Wozney JM und Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop 346: 26-37

7 Danksagung

Frau Privatdozentin Dr. med. Eva-Maria Ehlers danke ich sehr für die Überlassung des Themas, ihre Geduld und ihre wertvollen Hinweise zur theoretischen und praktischen Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Hanne Strauchmann und Frau Lydia Gutjahr für die umfangreichen Arbeiten bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate. Für die wohlwollende Förderung, auch über seine Zeit als Institutsleiter hinaus, danke ich ganz besonders Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Kühnel. Herrn Professor Dr. med. Jürgen Westermann möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Materials an seinem Institut danken. Für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Erstellung der Statistik danke ich ganz besonders Herrn Privatdozenten Dr. med. Oliver Schmitt. Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, und nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinem Freund Dr. med. Martin Wienecke, der immer wieder die Geduld aufgebracht, hat die korrigierten Fassungen wieder und wieder zu lesen.

8 Lebenslauf

Christin Andrea Bröhl:	geboren am 30.9.1976 in Münster
Schule:	1983-1987: Grundschule Detmold 1987-1993: Christian-Dietrich-Grabbe-Gymnasium Detmold 1993-1994: Einjähriger Auslandsaufenthalt in Costa Rica, Besuch des Colegio de Santa Ana 1994-1996: Gymnasium Carolinum Osnabrück, Abitur
Studium:	1996: Beginn des Humanmedizinstudiums an der Universität Lübeck 1999: Ärztliche Vorprüfung 2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2002-2003: Praktisches Jahr in der Abteilung für Chirurgie der Sana Kliniken Lübeck GmbH, Krankenhaus Süd, im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Lübeck und in der Inneren Abteilung der Sana Kliniken Lübeck GmbH, Krankenhaus Süd 10/2003: Abschluss des Studiums mit Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
Ärztliche Tätigkeit:	1/2004: Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Sana Kliniken Lübeck GmbH, Krankenhaus Süd