

Aus dem
Zentrum für Operative Medizin,
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes M. Rueger

**Langzeituntersuchungen über das Einheilungsverhalten von
autologen osteochondralen Transplantaten im Tiermodell**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Klaus Baumbach
aus Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

19.07.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. N. Meenen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

PD Dr. Dr. M. Heiland

Für Katrin

Der Weise, tief bekümmert, spricht:

An guten Mitteln fehlt es nicht,
Zu brechen jeden Leids Gewalt –
Nur kennen müßte man sie halt!

EUGEN ROTH

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----------|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Einführung..... | 5 |
| 1.2 Knorpel..... | 6 |
| 1.2.1 Knorpelarten..... | 6 |
| 1.2.2 Nerven- und Gefäßversorgung..... | 7 |
| 1.2.3 Histologischer Aufbau..... | 7 |
| 1.2.3.1 Chondrozyten..... | 8 |
| 1.2.3.1.1 Entwicklung..... | 8 |
| 1.2.3.1.2 Funktion und metabolische Aktivität..... | 9 |
| 1.2.3.2 extrazelluläre Grundsubstanz..... | 10 |
| 1.2.3.2.1 Gewebsflüssigkeit..... | 10 |
| 1.2.3.2.2 Glykosaminoglykane und Proteoglykane..... | 10 |
| 1.2.3.2.2.1 Biochemischer Aufbau der Proteoglykane..... | 10 |
| 1.2.3.2.2.2 Funktion..... | 11 |
| 1.2.3.2.3 Kollagen..... | 12 |
| 1.2.3.2.3.1 Molekularer Aufbau..... | 13 |
| 1.2.3.2.3.2 Kollagen im hyalinen Knorpel..... | 13 |
| 1.2.3.3 Struktur des Gelenkknorpels..... | 14 |
| 1.2.3.3.1 Oberflächliche Zone..... | 14 |
| 1.2.3.3.2 Übergangszone..... | 14 |
| 1.2.3.3.3 Tiefe Zone..... | 15 |
| 1.2.3.3.4 Kalzifizierte Zone..... | 16 |
| 1.2.4 Knorpelwachstum..... | 16 |
| 1.2.5 Knorpelregression..... | 16 |
| 1.3 Verletzung und Spontanheilung des Gelenkknorpels..... | 17 |
| 1.3.1 Partial-thickness Defekte..... | 17 |
| 1.3.2 Full-thickness Defekte..... | 19 |
| 1.4 Therapie von Knorpelverletzungen..... | 20 |
| 1.4.1 Unterstützende Verfahren..... | 20 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.4.1.1 | Lavage..... | 20 |
| 1.4.1.2 | Shaving..... | 20 |
| 1.4.2 | Knochenmarksstimulation..... | 21 |
| 1.4.2.1 | Pridie-Bohrung..... | 21 |
| 1.4.2.2 | Microfracture..... | 22 |
| 1.4.3 | Transplantationsverfahren..... | 22 |
| 1.4.3.1 | Transplantation von Periost und Perichondrium..... | 23 |
| 1.4.3.2 | Autologe Chondrozytentransplantation..... | 24 |
| 1.4.3.3 | Autologe Knorpel-Knochen-Transplantation..... | 25 |
| 1.4.3.4 | Mosaikplastik..... | 27 |
| 1.4.3.5 | Allogene Knorpel-Knochen-Transplantation..... | 27 |
| 1.5 | Problemstellung..... | 28 |
| 2. | Material und Methoden | 29 |
| 2.1 | Versuchstiere..... | 29 |
| 2.2 | Operation..... | 29 |
| 2.2.1 | Anästhesie..... | 29 |
| 2.2.2 | Operationstechnik..... | 30 |
| 2.2.3 | Postoperative Analgesie und Überwachung..... | 31 |
| 2.3 | Tötung..... | 32 |
| 2.4 | Radiologische Untersuchung..... | 33 |
| 2.4.1 | Röntgen..... | 33 |
| 2.4.2 | Magnetresonanztomographie..... | 33 |
| 2.5 | Histologische Untersuchung..... | 33 |
| 2.5.1 | Acrylat..... | 34 |
| 2.5.1.1 | Entwässerung..... | 34 |
| 2.5.1.2 | Einbettung..... | 34 |
| 2.5.1.3 | Schleifen..... | 35 |
| 2.5.1.4 | Schneiden..... | 35 |
| 2.5.1.5 | Färben..... | 36 |
| 2.5.1.5.1 | Toluidinblau..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.1.5.2 Kossa / van Gieson..... | 36 |
| 2.5.1.5.3 Hämalaun-Eosin..... | 37 |
| 2.5.2 Paraffin..... | 38 |
| 2.5.2.1 Entkalkung..... | 38 |
| 2.5.2.2 Entwässerung..... | 38 |
| 2.5.2.3 Einbettung..... | 38 |
| 2.5.2.4 Schneiden..... | 39 |
| 2.5.2.5 Färben..... | 39 |
| 2.5.2.5.1 Toluidinblau..... | 39 |
| 2.5.2.5.2 Hämalaun-Eosin..... | 39 |
| 2.5.2.5.3 Immunhistologie..... | 40 |
| 3. Ergebnisse | 42 |
| 3.1 Versuchstiere..... | 42 |
| 3.2 Ergebnisse 2 Wochen..... | 43 |
| 3.2.1 Radiologische Befunde..... | 43 |
| 3.2.2 Histologische Befunde..... | 45 |
| 3.3 Ergebnisse 8 Wochen..... | 51 |
| 3.3.1 Radiologische Ergebnisse..... | 51 |
| 3.3.2 Histologische Ergebnisse..... | 52 |
| 3.4 Ergebnisse 26 Wochen..... | 57 |
| 3.4.1 Radiologische Ergebnisse..... | 57 |
| 3.4.2 Histologische Ergebnisse..... | 58 |
| 3.5 Ergebnisse 52 Wochen..... | 63 |
| 3.5.1 Radiologische Ergebnisse..... | 63 |
| 3.5.2 Histologische Ergebnisse..... | 65 |
| 4. Diskussion | 71 |
| 4.1 Diskussion des Tiermodells..... | 73 |
| 4.2 Diskussion der Ergebnisse..... | 74 |
| 4.2.1 Knöcherne Einheilung des Transplantats..... | 74 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.2 Knorpelige Einheilung des Transplantats..... | 75 |
| 4.2.3 Erhalt der physiologischen Knorpelstruktur..... | 79 |
| 4.3 Diskussion des Operationsverfahrens..... | 84 |
| 4.4 Diskussion alternativer Therapieverfahren..... | 86 |
| 4.4.1 Vergleich zwischen autologer Chondrozytentransplantation und autologer osteochondraler Transplantation..... | 89 |
| 4.5 Beantwortung der Fragen aus der Problemstellung..... | 91 |
| 5. Zusammenfassung | 93 |
| Literatur | 94 |
| Abkürzungsverzeichnis | 106 |
| Danksagung | 107 |
| Lebenslauf | 108 |

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Schon im Jahr 1743 berichtete der Chirurg und Forscher Hunter über die fehlende Fähigkeit des Knorpels zur spontanen Heilung: "If we consult the standard Chirurgical Writers from *Hippocrates* down to the present Age, we shall find, that an ulcerated Cartilage is universally allowed to be a very troublesome Disease; that it admits of a Cure with more Difficulty than a carious Bone; and that, when destroyed, it is never recovered." [83] Dies bestätigte sich im Laufe der folgenden Jahrhunderte. 1853 erklärte Paget: „There are, I believe, no instances in which a lost portion of cartilage has been restored, or a wounded portion repaired, with new and well-formed permanent cartilage, in the human subject." [136] Auch heute hat sich an dieser Einschätzung nichts geändert, Newman schrieb 1998: "Articular cartilage can tolerate a tremendous amount of intensive and repetitive physical stress. However it manifests a striking inability to heal even the most minor injury." [130]

Gelenkschmerzen und Bewegungseinschränkungen sind bei älteren Menschen weit verbreitet [32]. Die Ursache für Gelenkschmerzen liegt meistens in degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels (primäre Arthrose) oder in traumatisch bedingtem Verlust von Knorpel [179]. Traumatische Knorpelschäden können im Verlauf von Jahren zu weiterer Degeneration des verbleibenden Gelenkknorpels führen (sekundäre Arthrose). [125,179]. Dies kann letztendlich einen vollständigen Gelenkersatz nötig machen [173].

Um diese letzte Alternative zu vermeiden oder zumindest hinauszuzögern, wird seit langer Zeit versucht, eine Therapie für Verletzungen des Gelenkknorpels zu finden [21,88,99,132,133,146,169,170,176]. Ein entscheidender Durchbruch ist jedoch bis heute nicht gelungen [125].

Eines dieser Therapieverfahren, das heute im klinischen Einsatz weit verbreitet ist, ist die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation [140]. Dabei wird ein osteochondraler Zylinder aus einer gering belasteten Stelle des Gelenks entnommen und in den Knorpeldefekt implantiert [88].

1.2 Knorpel

Knorpel kommt häufig an Stellen mit großer Druckbeanspruchung im Körper vor und ist optimal geeignet, den dabei auftretenden Kräften zu widerstehen [96]. Seine Aufgabe liegt in der Aufnahme der auf ihn wirkenden Kräfte und deren Verteilung auf die angrenzenden Knochen [147]. Im Vergleich zu anderen Gewebearten kann er relativ großen und langandauernden Zug- und Druckbeanspruchungen widerstehen, ohne seine permanente Form zu verändern. Der Knorpel gibt dem auf ihn wirkenden Druck in begrenztem Umfang nach, kehrt jedoch nach Ende der Beanspruchung wieder in seine Ausgangsform zurück. Daher kann er die wirkenden Kräfte abfedern, ohne selber beschädigt zu werden [96].

1.2.1 Knorpelarten

Knorpel lässt sich in 3 Typen mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation im Organismus einteilen. Sie unterscheiden sich durch Menge und Organisation von Extrazellulärsubstanz und Chondrozyten:

Elastischer Knorpel enthält in der extrazellulären Grundsubstanz neben Proteoglykanen v. a. Kollagenfasern des Typs II und elastische Fasern [102]. Die Kollagenfasern sind maskiert, d. h. die Fasern sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen, da ihr Brechungsindex dem der umgebenden Grundsubstanz gleicht [147]. Elastischer Knorpel kommt v. a. im Ohr sowie im Kehlkopf vor [96].

Faserknorpel enthält in der Extrazellulärsubstanz außer Proteoglykanen Kollagenfasern des Typs I, die entsprechend der jeweiligen Beanspruchungsrichtung verlaufen. Da sie nicht maskiert sind, sind sie in Standardfärbungen gut zu erkennen. Zwischen den Kollagenfibrillen liegen die Chondrozyten einzeln oder in kleinen isogenen Gruppen. Oft bilden sie längere Säulen [96,102]. Physiologisch kommt Faserknorpel z. B. in der Symphysis pubica oder in den Disci intervertebrales vor [96,168]. Bei der Spontanheilung von osteochondralen Defekten kann ein dem Faserknorpel ähnliches Gewebe entstehen [116,130,168].

Hyaliner Knorpel bildet im Organismus den Gelenkknorpel und kommt auch in der Trachea oder als Rippenknorpel vor [96]. Die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels erscheint lichtmikroskopisch homogen, in ihr befinden sich jedoch maskierte Kollagenfasern Typ II [93,96,147].

1.2.2 Nerven- und Gefäßversorgung im hyalinen Knorpel

Knorpel ist frei von Nerven und enthält weder Blut- noch Lymphgefäße. Die Schmerzwahrnehmung und Propriozeption erfolgt daher ausschließlich über Nervenfasern in Synovium, Kapsel, Muskulatur und subchondralem Knochen. Die Ernährung der Chondrozyten wird durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit geleistet [54]. Dabei müssen die Nährstoffe 2 Barrieren überwinden: Um aus den Blutgefäßen in die Synovialflüssigkeit zu gelangen, müssen sie die Synovialmembran passieren. Um nun von der Synovialflüssigkeit die Chondrozyten erreichen zu können, muss die dichte Matrix des Knorpels durchquert werden. Diese ist stark mit polyanionischen Glykosaminoglykanen angereichert, die die Passage deutlich erschweren [116]. Die Knorpelzellen können also nur schlecht ernährt werden. Daher ist Knorpel ein bradytrophes Gewebe [96].

1.2.3 Histologischer Aufbau

Wie alle Stützgewebe besteht Knorpel aus Zellen und der dazwischen liegenden extrazellulären Matrix [147].

Die Knorpelzellen befinden sich in von extrazellulärer Grundsubstanz umgebenen Höhlen. Diese Knorpelhöhlen sind im nativen Knorpel durch die Zellen vollständig ausgefüllt, erst durch die histologische Präparation kommt es zu einer Schrumpfung der Chondrozyten, so dass ein echter Hohlraum zwischen Zellen und Grundsubstanz entsteht. Häufig befinden sich mehrere Chondrozyten in einer Knorpelhöhle. Diese Chondrozyten sind isogen, d. h. sie haben sich durch Mitosen aus einer einzigen Knorpelzelle entwickelt [96,102].

Die Zellen mit der sie direkt umgebenden Grundsubstanz bezeichnet man als Chondron [168] bzw. Territorium [147]. Zwischen den Chondronen befindet sich die weniger basophile „interterritoriale Matrix“ [168], die den Hauptteil des Gelenkknorpels ausmacht [130].

1.2.3.1 Chondrozyten

1.2.3.1.1 Entwicklung

Knorpelgewebe ist mesenchymalen Ursprungs. Mesenchymale Stammzellen sind pluripotente Vorläuferzellen, die in Abhängigkeit von verschiedenen Signalen in unterschiedliche Gewebearten wie z.B. Knorpel, Knochen, Knochenmark oder Bindegewebe differenzieren können [37,115].

In der Entwicklung zu Chondrozyten runden sich die Mesenchymzellen zunächst ab und differenzieren zu Chondroblasten. Ab dieser Entwicklungsstufe beginnen die Zellen damit, Grundsubstanz zu synthetisieren und an die Umgebung abzugeben [96,115]. Durch die zunehmende Sekretion der Grundsubstanz entfernen sich die Zellen voneinander und werden damit zu Chondrozyten [147]. Im Rahmen der Knochenentstehung kann Knorpel durch Knochen ersetzt werden. Dabei hypertrophieren die Chondrozyten zunächst und werden dann abgebaut und durch Knochenzellen ersetzt (Abb. 1) [37,38].

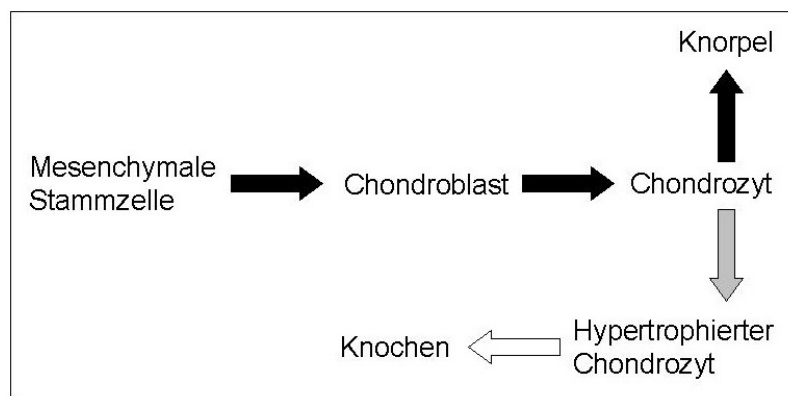


Abb. 1: In der Knorpelentwicklung differenziert die Mesenchymzelle über den Chondroblast zum Chondrozyt. In der Knochenentwicklung hypertrophieren die Chondrozyten und werden schließlich durch Osteoblasten ersetzt.

1.2.3.1.2 Funktion und metabolische Aktivität

Knorpel ist ein relativ zellarmes Gewebe. Das Zellvolumen entspricht nur ca. 2% des absoluten Volumens von adultem menschlichem Knorpel [145]. Bedingt durch die fehlende Gefäßversorgung sind die vorhandenen Chondrozyten nur in geringem Maße metabolisch aktiv [96]. Dies versetzt sie in die Lage, auch unter fast vollständig anaeroben Bedingungen zu existieren, macht sie aber andererseits für toxische Einflüsse sehr empfindlich und verhindert, dass größere Verletzungen heilen können [54].

Früher galt Knorpel als inert. Heute weiß man, dass sich Knorpel veränderter Beanspruchung durch Umbau anpassen kann. Die Komponenten der Interzellularsubstanz unterliegen einem ständigen Turnover durch die Chondrozyten [54]. Reguliert über Zytokine und Wachstumsfaktoren synthetisieren Chondrozyten sowohl die Matrixbestandteile [54] als auch die für deren Abbau zuständigen Proteasen sowie die dazugehörigen Proteaseinhibitoren [54,77].

Zu schnellen Umbau- und Heilungsprozessen nach einer Verletzung tragen vor allem die Proteoglykane bei. Der Umbau des Kollagennetzwerks erfolgt sehr viel langsamer. So haben beispielsweise Proteoglykane eine Halbwertszeit von ungefähr 8-14 Tagen in adultem Rinderknorpel. Die Halbwertszeit von Kollagen II dagegen beträgt in unreifem Knorpel über 100 Tage, in adultem Knorpel viele Jahre. Mit zunehmender Entfernung von der Knorpelzelle verlangsamt sich der Turnover bzw. verlängert sich die Halbwertszeit. Daher ist bei Verletzungen ein Anstieg der Synthese der Grundsubstanz auch besonders in der Umgebung der Chondrozyten zu beobachten [148].

Die Höhe der metabolischen Aktivität und die Fähigkeit der Chondrozyten, sich Veränderungen anzupassen, sind abhängig vom Alter des Organismus. In jungen Lebewesen teilen sich Chondrozyten schnell und synthetisieren große Mengen Grundsubstanz. Bei adulten Organismen dagegen verlangsamen sich zelluläre Prozesse, die Zellzahl geht zurück und die Chondrozyten teilen sich nur noch äußerst selten [130].

1.2.3.2 Extrazelluläre Grundsubstanz

Die Knorpelgrundsubstanz besteht zu 60-80% aus Wasser [54]. Der feste Anteil setzt sich v. a. aus Hyaluronsäure und Proteoglykanen sowie Kollagenen zusammen. Auch Mineralien sind enthalten [54,96].

1.2.3.2.1 Gewebsflüssigkeit

Im Wasser der Grundsubstanz ist u. a. eine große Menge Kationen enthalten, die als Ladungsausgleich für die negativ geladenen Glykosaminoglykane wirken. Über die Flüssigkeit findet der Stoffaustausch zwischen Chondrozyten und den den Knorpel umgebenden Kapillaren bzw. der Synovialflüssigkeit statt. Außerdem trägt das durch die Komponenten der Grundsubstanz festgehaltene Wasser zur Fähigkeit des Knorpels bei, Druckbelastungen zu widerstehen und nach Verformung wieder die Ausgangsform anzunehmen [179].

1.2.3.2.2 Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Proteoglykanaggregate füllen den größten Teil des Raums zwischen den Kollagenfasern aus [179]. Sie sind zusammen mit Kollagen und der Gewebsflüssigkeit verantwortlich für die Fähigkeit des Knorpels, Druckbelastungen zu widerstehen [23,115]. Sie ermöglichen es dem Knorpel nach einer Verformung wieder in seine ursprüngliche Form zurückzukehren [33].

1.2.3.2.2.1 Biochemischer Aufbau der Proteoglykane

Proteoglykane bestehen zu einem großen Teil aus Glykosaminoglykanen (GAGs). Glykosaminoglykane sind Polymerketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten [144].

Grundsätzlich kann man sulfatierte und nicht-sulfatierte Glykosaminoglykane unterscheiden. Hyaluronsäure ist das im Körper am häufigsten vorkommende nicht-sulfatierte GAG [95]. Chondroitinsulfat ist ein Beispiel für ein sulfatiertes GAG [95], das vor allem als Chondroitin-6-Sulfat im adulten Knorpel von großer Bedeutung ist, während es als Chondroitin-4-Sulfat hauptsächlich im unreifen Gelenkknorpel zu finden ist [116]. Außer Chondroitinsulfat findet man im

Knorpel weitere Glykosaminoglykane, v. a. Keratansulfat, aber auch Dermatansulfat oder Heparansulfat [179].

Proteoglykane bestehen aus verschiedenen Glykosaminoglykanen, die an ein zentrales Core-Protein gebunden sind [96]. Oft assoziieren viele Proteoglykane an ein Hyaluronsäure-Molekül [144], ein GAG, das stets ohne Core-Protein vorliegt [95]. Die Bindung erfolgt über sog. „Link-Proteine“ [96] (Abb. 2).

Das wichtigste Proteoglykan im Knorpel ist das Aggrekan, das sich zu 90% aus Chondroitinsulfat zusammensetzt [144]. Bis zu 100 Aggrekan-Moleküle können an eine zentrale Hyaluronsäure-Kette binden und so ein großes Aggregat bilden [168].

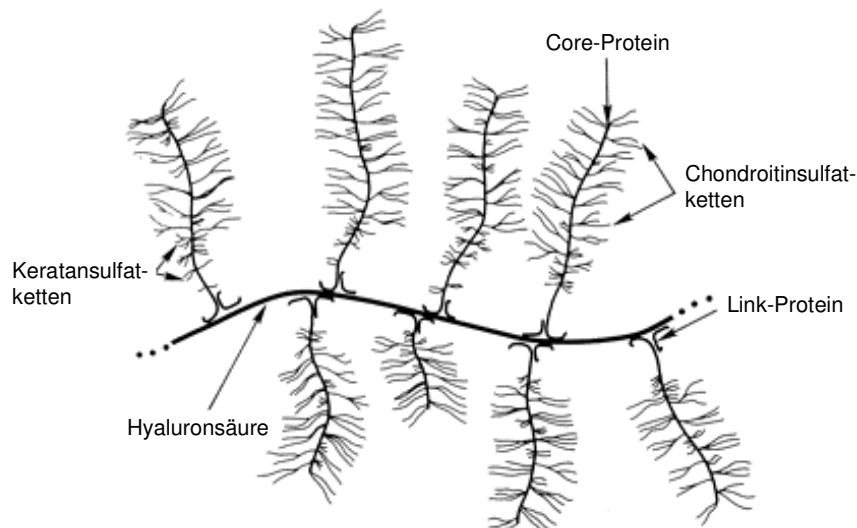


Abb. 2 [29]: Proteoglykane sind Komplexe aus Glykosaminoglykanen, die an ein zentrales Core-Protein gebunden sind. Sie bilden häufig große Aggregate, indem sie über ein Link-Protein an ein Hyaluronsäure-Molekül binden.

1.2.3.2.2 Funktion

Proteoglykanaggregate sind an Organisation und Stabilität der Grundsubstanz beteiligt und zu einem großen Teil verantwortlich für die Widerstandsfähigkeit

des Gelenkknorpels sowie für seine Fähigkeit, nach Verformung in die ursprüngliche Form zurückzukehren [33].

Besonders die Fähigkeit des Knorpels, Druckbelastungen zu widerstehen beruht auf dem engen Zusammenspiel der Proteoglykane und des Kollagennetzwerks, in dem diese gefangen sind [23]. Da sich um die negativ geladenen Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten mehrschichtige Hydrathüllen ausbilden, können Proteoglykane große Mengen Wasser speichern [96]. Die Tendenz der Proteoglykan-Hyaluronsäure-Komplexe, noch weiter osmotisch anzuschwellen, wird begrenzt durch das sie umgebende Kollagennetzwerk. Zwischen diesen beiden Faktoren bildet sich ein Gleichgewicht [23,54,93].

Bei Druckbelastung des Knorpels wird das Wasser von den Ladungszentren der Proteoglykane verdrängt. Die negativen Ladungen kommen sich dadurch näher und die zunehmenden Abstoßungskräfte zwischen den Ladungen wirken einer weiteren Kompression immer stärker entgegen. Auf diesem Mechanismus beruht die hohe Druckelastizität des Knorpels [23,54,96,130]. Aufgrund der niedrigen Permeabilität des Gelenkknorpels kann Wasser nur langsam verdrängt werden. Es schützt daher die festen Knorpelbestandteile vor einem zu sprunghaften Belastungsanstieg [130].

1.2.3.2.3 Kollagen

Kollagene bilden den Hauptfaseranteil der meisten Binde- und Stützgewebe. Durch ihre hohe Zugfestigkeit verleihen sie diesen Geweben mechanische Stabilität [144]. Bei Säugetieren machen sie ca. 30% der Gesamtproteinmasse aus [35].

Bis zum Jahr 1998 waren insgesamt 19 verschiedene Kollagentypen bekannt [46,144]. Die verschiedenen Typen sind jedoch nicht in gleichen Mengen im Körper vorhanden, ca. 90% des Kollagens im Organismus gehört den Typen I bis III an. Die Typen IV bis XIX kommen jeweils nur in relativ geringen Mengen vor, sie werden auch Minoritäten-Kollagene genannt [144]. Die Kollagentypen lassen sich in verschiedene Klassen einteilen [35] bzw. in fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene unterscheiden [144].

1.2.3.2.3.1 Molekularer Aufbau

Kollagenmoleküle bestehen vor allem aus einer Tripelhelix, die sich aus 3 umeinander superspiralisierten linksgedrehten α -Helices zusammensetzt [46]. Stabilisiert wird die Tripelhelix nur durch intrahelikale Wasserstoffbrückenbindungen [35]. Die Superspiralisation, die räumlich erst dadurch ermöglicht wird, dass in der Primärstruktur jede dritte Position von einem Glycin besetzt ist, macht das Molekül gegen proteolytische Enzyme (mit Ausnahme spezialisierter Metalloproteinasen) sehr widerstandsfähig [46].

Die Tripelhelices der interstitiellen Kollagene lagern sich unter physiologischen Bedingungen zu Fibrillen zusammen, die wiederum zu größeren Kollagenfasern assoziieren [46].

1.2.3.2.3.2 Kollagen im hyalinen Knorpel

Im hyalinen Knorpel sind bis zu 95% des vorhandenen Kollagens dem Typ II zuzuordnen. Weiterhin kommen die Kollagentypen VI, IX, X, XI und XII vor [46]. Das Zusammenspiel zwischen Proteoglykanen und dem 3-dimensionalen Netzwerk der Kollagenfasern ist verantwortlich für die Widerstandsfähigkeit des Knorpels gegenüber Druckbelastungen. Im unbelasteten Zustand begrenzen die Kollagenfasern das osmotische Schwellungsbestreben der Proteoglykane (s. 1.2.3.2.2) [23,54].

Die Chondrone werden einzeln und als Gruppen von Kollagenfibrillen umgeben. Es entsteht so eine Verschachtelung, die dem Schutz der Chondrozyten dient. Unter der Knorpeloberfläche liegen die Kollagenfasern besonders dicht. Hier werden die bei Belastung entstehenden Druck- und Zugspannungen aufgefangen [96]. Zusätzlich dient Kollagen der Verankerung der Matrix am subchondralen Knochen [93].

Kollagene des Typs X werden vor allem von hypertrophierten Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation synthetisiert. Beim ausgewachsenen Menschen ist es nur in der Kalzifizierten Zone des Knorpels vorhanden. Seine Funktion ist nicht bekannt, entgegen früherer Annahmen scheint Kollagen X nicht direkt mit der Kalzifizierung in Zusammenhang zu stehen [35].

1.2.3.3 Struktur des Gelenkknorpels

Bereits 1925 beschrieb Benninghoff [7] die Einteilung des Gelenkknorpels in 4 Zonen, die sich in der Ausrichtung der Kollagenfasern und Zellen unterscheiden.

1.2.3.3.1 Oberflächliche Zone

Diese Zone bildet die Oberfläche, auf der das Gelenk bei Bewegung gleitet [130]. Es lassen sich in ihr noch einmal zwei Schichten unterscheiden [168]. Außen befindet sich eine unabhängige zellulose Schicht (Lamina splendens), die v. a. parallel zur Gelenkoberfläche verlaufende Kollagenfasern enthält. Diese kollagenfaserhaltige Schicht ist nur locker mit den darunter liegenden Schichten verbunden. Man geht davon aus, dass nur in der Knorpelperipherie eine feste Verbindung mit den tieferen Schichten des Knorpels und dem Synovialgewebe besteht. Diese Schicht wird als äußerer Mantel des Knorpels angesehen. Er wirkt sowohl Kompression von außen als auch einer Schwellung von innen entgegen [180].

In der zweiten, tiefer liegenden Schicht liegen abgeflachte Chondrozyten, deren Zellkörper sich entlang der Gelenkoberfläche ausgerichtet haben [168]. Die Kollagenfasern sind in Netzwerken angeordnet, die als dicht gestaffelte Schichten oder Blätter parallel zur Gelenkoberfläche verlaufen. Benachbarte Blätter verschmelzen oder sind über Fasern verbunden [93]. Die Kollagenfasern laufen durchgehend bis in die Tiefe Zone weiter [42].

1.2.3.3.2 Übergangszone

Die Chondrozyten dieser Zone sind runder als die der Oberflächlichen Zone [168]. Wie in der Oberflächlichen Zone sind die Kollagenfasern in dicht gestaffelten Schichten oder Blättern angeordnet. Die Schichten gehen bogenförmig in die horizontal liegenden Kollagenschichten der Oberflächlichen Zone über [93,168].

1.2.3.3.3 Tiefe Zone

Die Kollagenfasern verlaufen hier in Bündeln senkrecht zur Gelenkoberfläche. Die Bündel sind untereinander über Fasern eng verbunden [93]. Sie gehen in die schichtweise angeordneten Kollagenfasern der Übergangszone über. Die Chondrozyten sind in senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Säulen angeordnet [168]. Die Zelldichte ist hier im Vergleich zu den anderen Zonen am geringsten [145].

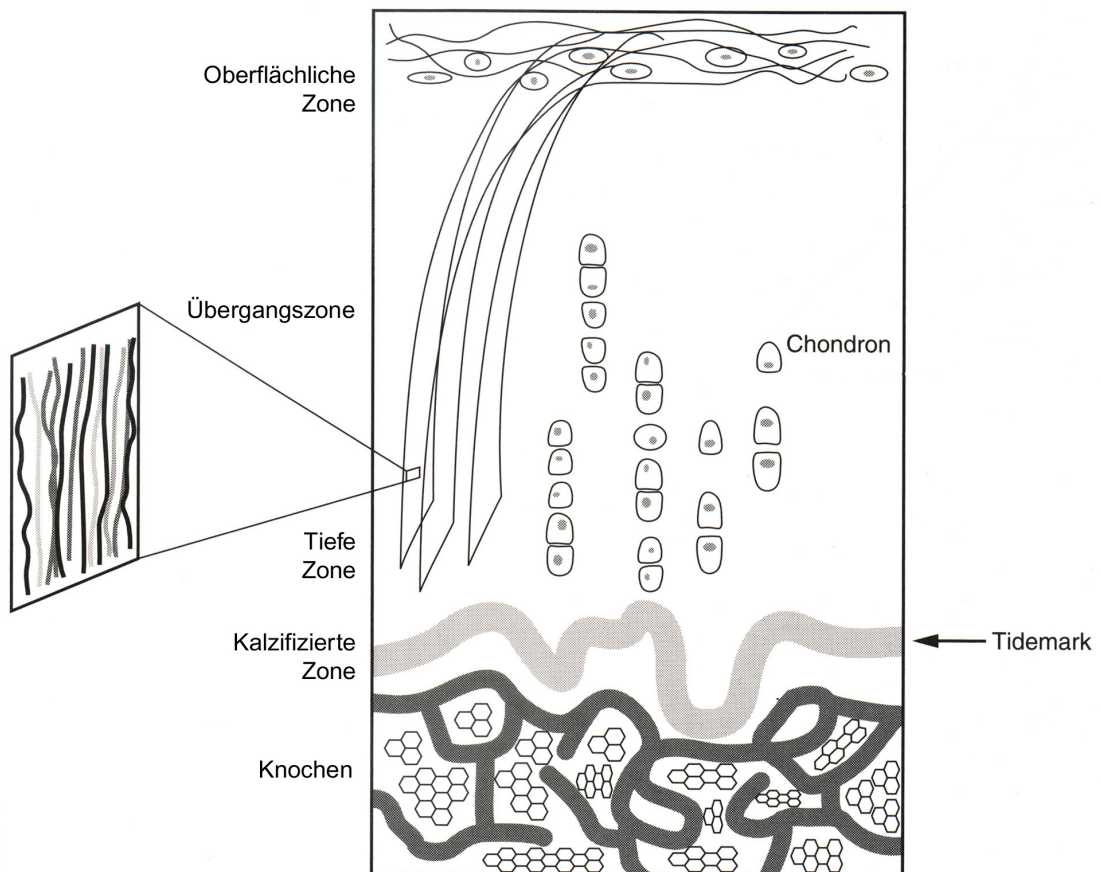


Abb. 3 [168]: Hyaliner Gelenknorpel lässt sich histologisch in 4 Schichten unterteilen: In der gelenkspaltnahen Oberflächlichen Zone sind Zellkörper und Kollagenfasern entlang der Gelenkoberfläche ausgerichtet. Die Kollagenfasern laufen in Schichten angeordnet bogenförmig über die Übergangszone in die Tiefe Zone. Hier verlaufen sie senkrecht zur Gelenkoberfläche. Die Knorpelzellen ordnen sich säulenförmig an. Die aus verkalktem Knorpel bestehende Kalzifizierte Zone bildet die mechanische Verbindung zum subchondralen Knochen.

1.2.3.3.4 Kalzifizierte Zone

Diese Zone liegt direkt dem subchondralen Knochen an und verbindet mechanisch Knorpel und Knochen. Die hier säulenförmig angeordneten, runden Chondrozyten sind von verkalkter Interzellulärsubstanz umgeben [130]. Die Kollagenfasern liegen wie in der Tiefen Zone in vertikal angeordneten Bündeln vor. Benachbarte Bündel sind durch Faserzüge verbunden. Die Grenze zur Tiefen Zone bildet ein dünner basophiler Streifen aus an Matrixvesikel assoziierten Mineralien („tidemark“) [168].

1.2.4 Knorpelwachstum

Man unterscheidet 2 Formen des Knorpelwachstums:

Das „Interstitielle Wachstum“ tritt nur in der frühen Phase des Knorpelwachstums auf. Der Knorpel wächst, indem sich die vorhandenen Chondrozyten mitotisch teilen. Die isogenen Tochterzellen bleiben jeweils beieinander liegen und beginnen mit der Bildung der Interzellulärsubstanz. Das interstitielle Wachstum wird mit zunehmender Verhärtung der Interzellulärsubstanz geringer und stoppt schließlich völlig.

Beim „Appositionellen Wachstum“ differenzieren die dem Knorpel unmittelbar anliegenden Zellen des Perichondriums zu Chondroblasten und produzieren Interzellulärsubstanz. Der Knorpel wächst also durch Zunahme von außen [96].

1.2.5 Knorpelregression

Häufig treten mit zunehmendem Alter regressive Veränderung im hyalinen Knorpel auf. Zunächst hypertrophieren die Chondrozyten und gehen schließlich zugrunde. Vermutlich durch Wasserverlust und Veränderung der Glykosaminoglykane kommt es zu einer Demaskierung und Zusammenlagerung der Kollagenfasern, die als sog. Asbestfasern in der Interzellulärsubstanz sichtbar werden. Schließlich wachsen Gefäße in den Knorpel ein und es kommt zu Kalkeinlagerungen („verkalkter Restknorpel“) [96].

1.3 Verletzung und Spontanheilung des Gelenkknorpels

Das Spontanheilungsverhalten des Gelenkknorpels wird u. a. bestimmt durch das Fehlen von Nerven und Blutgefäßen.

Die Abwesenheit von Nerven im Knorpel verhindert, dass Verletzungen des Knorpels dem Patienten bewusst werden, solange die Synovia nicht in Mitleidenschaft gezogen wird [116].

Eine ausreichende Blutversorgung ist für den klassischen Heilungsprozess vaskularisierter Gewebe Voraussetzung. Auf dem Blutweg können die nötigen Entzündungszellen sowie undifferenzierte Zellen zur Reparatur des Defekts das geschädigte Gewebe erreichen. Diese zuwandernden Zellen fehlen dem gefäßlosen Knorpel. Zu einer Entzündungsreaktion, die in vaskularisierten Geweben ein wichtiger Teil der Wundheilung ist, kann es nicht kommen. Im Knorpel stehen lediglich die vorhandenen Chondrozyten zur Heilung eines Defektes zur Verfügung. Diese können die Synthese der Grundsubstanz erhöhen, ihre Fähigkeit zur Reparatur eines Defekts ist aber auch aufgrund ihrer geringen Zahl begrenzt [118].

Grundsätzlich kann man 2 verschiedene Formen von Knorpeldefekten mit unterschiedlichem Spontanheilungsverhalten unterscheiden: Full-thickness Defekte, bei denen die Verletzung bis in den subchondralen Knochen reicht und oberflächliche Partial-thickness Defekte, bei denen der Knochen intakt ist [130].

1.3.1 Partial-thickness Defekte

Chondrale Schäden (Partial-thickness) des Knorpels von adulten Organismen weisen keine Spontanheilung auf [116,159]. Lediglich in der näheren Umgebung des Defekts sind vorübergehend Zeichen von Proliferation [116,118] und erhöhter metabolischer Aktivität der überlebenden Chondrozyten zu erkennen [68,116,118]. Diese proliferierenden Knorpelzellen formen Zellnester, sog. Chondrozytencluster, die charakteristisch für eine Knorpelverletzung bzw. Arthrose sind [32,55,77,105,117]. Die Proliferation und der Aktivitätsanstieg der überlebenden Chondrozyten führt aber kaum zu einer effektiven Defektheilung

[116,118]. FULLER und GHADIALLY stellten fest, dass es sogar in noch nicht ausgewachsenen Kaninchen 6 Monate nach dem Setzen eines chondralen Defektes zu keiner signifikanten Heilung kommt [64].

Zwischen der Proliferationszone und dem eigentlichen Defekt liegt eine Zone, in der die vorhandenen Chondrozyten zugrunde gehen [181]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass der auf Knorpelverletzungen oder übermäßige mechanische Belastung folgende Zelltod zumindest teilweise apoptotisch ist [43,47-50,110,181]. Da die Zelluntergänge nach einer Knorpelverletzung im Laufe der Zeit zunehmen, bietet sich hier evtl. die Möglichkeit frühzeitig einzugreifen und weitere Apoptosen zu verhindern [50].

Zur Erklärung des schlechten Spontanheilungsvermögens werden verschiedene Faktoren diskutiert. So müssen sich reife Knorpelzellen nicht mehr teilen, wie dies beispielsweise in der Haut und anderen sich ständig regenerierenden Geweben der Fall ist. Auch die metabolische Aktivität der Knorpelzellen ist im Vergleich zu anderen Geweben gering [179]. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die fehlende Vaskularisierung des Knorpels, wodurch der Knorpel keinen Zugang zu Entzündungszellen oder undifferenzierten Reparaturzellen hat. Für die Reparatur des Defekts bleiben also nur die vorhandenen Chondrozyten. Diese sind zwar in der Lage, sich zu teilen und Interzellulärschubstanz zu produzieren, ihre Zahl ist aber für eine Heilung zu gering [116]. Im Gegensatz zu Full-thickness Defekten besteht auch kein Zugang zu Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [179].

Weiterhin scheinen die Proteoglykane der Knorpelgrundsubstanz antiadhäsive Eigenschaften zu besitzen. Dadurch wird verhindert, dass mesenchymale Stammzellen, die beispielsweise aus der Synovialmembran einwandern könnten, sich im Knorpeldefekt anheften können [85,87].

Partial-thickness Defekte zeigen zwar keine Spontanheilung, sie sind aber oft stabil und führen nur selten zu Arthrose [122,182].

1.3.2 Full-thickness Defekte:

Bei osteochondralen Defekten (full-thickness Defekten) wird sowohl der Knorpel als auch der darunter liegende Knochen beschädigt [130]. Da die Gefäße des Knochens beschädigt werden, kommt es zu einem Heilungsprozess ähnlich wie in anderen vaskularisierten Geweben. Zunächst füllt sich der Defekt zügig mit Blut und es bildet sich ein fibrinhaltiges Gerinnsel, in dem auch Zellen aus Knochenmark und Blut eingeschlossen sind [116]. Die nun folgende Bildung von Reparaturgewebe im Defekt erfolgt ausschließlich durch mesenchymale Zellen aus dem Knochenmark und nicht durch die Chondrozyten des überlebenden Knorpels [166]. An der Basis regeneriert der subchondrale Knochen bis zur ursprünglichen Höhe [130]. Darüber bildet sich knorpeliges Gewebe, das den Defekt füllt [166]. FURUKAWA et al. stellten fest, dass das Reparaturgewebe deutlich mehr Kollagen I enthält als normaler hyaliner Gelenkknorpel. Kollagen I ist u. a. typisch für Faserknorpel. Sein Anteil nimmt zwar im Laufe eines Jahres zugunsten von Kollagen II ab, bleibt jedoch über dem des gesunden Gelenkknorpels. Dies sei ein möglicher Grund für die Tatsache, dass der Reparaturknorpel den mechanischen Belastungen auf Dauer nicht standhalten kann [65]. In Langzeituntersuchungen fanden SHAPIRO et al. bereits 12 bis 20 Wochen nach dem Setzen eines Defekts erste Anzeichen von Degeneration des Reparaturgewebes, die bis zum Ende der Studie nach 48 Wochen ständig zunahmen [166].

Neben dem Alter der Versuchstiere ist die Größe einer Verletzung relevant für den Heilungserfolg [130]. JACKSON et al. untersuchten Full-thickness Defekte mit einem Durchmesser und einer Tiefe von 6 mm und stellten fest, dass sich Schäden dieser Größe nicht mit Faserknorpel (oder hyalinem Knorpel) füllen. Stattdessen beobachteten sie einen zunehmenden Abbau von Knochen und Knorpel am Rand des Defekts. Dies führte zu einer Vergrößerung des Schadens und schließlich zum Einbruch des umgebenden Knorpels und Knochens in den Defekt. Sie fanden lediglich über der sklerosierten knöchernen Defektwand eine dünne Schicht aus Faserknorpel [1,89]. CONVERY et al. beobachteten dagegen bei kleinen Defekten von unter 3 mm Durchmesser eine vollständige Heilung [44].

1.4 Therapie von Knorpelverletzungen

Zur Behandlung von verletztem Gelenkknorpel existiert eine große Zahl unterschiedlicher Therapieverfahren. Diese verfolgen dabei jeweils eine von zwei grundsätzlichen Strategien: Bei einigen Ansätzen wird versucht das intrinsische Heilungsvermögen des Knorpels zu aktivieren, indem ein Zugang zu den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks geschaffen wird. Andere Verfahren beruhen auf der Transplantation von intaktem Knorpelgewebe oder Gewebe bzw. Zellen, die in der Lage sind, neuen Knorpel zu bilden [131].

Zusätzlich gibt es einige unterstützende Verfahren, die nicht der Therapie eines Knorpelschadens dienen, sondern lediglich die Beschwerden des Patienten lindern sollen [140].

1.4.1 Unterstützende Verfahren

1.4.1.1 Lavage

Durch eine Spülung des betroffenen Gelenks entfernt man sowohl Entzündungsmediatoren als auch lose Knorpelfragmente und Fibringerinnsel [140]. Dies kann häufig vorübergehend die Beschwerden deutlich verringern. Es erfolgt jedoch keine eigentliche Reparatur des Knorpelschadens [149]. Die Lavage wird daher insbesondere bei jungen Patienten nur unterstützend in Kombination mit anderen Verfahren angewendet [140].

1.4.1.2 Shaving

Abgescherte Knorpelanteile von verletztem Knorpel im Gelenk können zu mechanischen Problemen, im schlimmsten Fall zu einer kompletten Gelenkblockade führen. Außerdem können sie eine Synovitis oder einen Gelenkerguss zur Folge haben [140].

Beim Shaving bzw. dem von MAGNUSSON erstmals 1941 beschriebenen Débridement [112] werden instabile und freie Knorpelfragmente entfernt. Dies führte bei seinen Nachuntersuchungen über einen Zeitraum von 5 Jahren in ca. 50% der Fälle zu einer zufrieden stellenden Verbesserung der Symptome. Eine

Heilung des verletzten Knorpels kann jedoch nicht erreicht werden und das Fortschreiten der Arthrose wird nicht verlangsamt [36]. Im umgebenden gesunden Knorpel wurden sogar signifikant mehr Nekrosen sowie Auffaserungen des Knorpels beobachtet, als dies ohne eine Operation der Fall gewesen wäre [98].

1.4.2 Knochenmarkstimulation

Bei diesen Verfahren perforiert man die subchondrale Knochenlamelle, so dass Blut aus der Spongiosa in den Knorpeldefekt fließen kann. In das entstehende Gerinnsel wandern Blutgefäße ein, gefolgt von mesenchymalen Stammzellen. Diese differenzieren zu Knorpelzellen und sind dann zur Synthese von extrazellulärer Matrix fähig. Viele Studien haben jedoch gezeigt, dass das so entstehende Reparaturgewebe vor allem aus Faserknorpel besteht, der bezüglich der Beanspruchungen in einem Gelenk gegenüber hyalinem Knorpel minderwertig ist [140].

1.4.2.1 Pridie-Bohrung

Bei dieser bereits 1959 von PRIDIE entwickelten Operationstechnik wird der Zugang zu pluripotenten Stammzellen über eine anterograde Bohrung durch die subchondrale Knochenlamelle in die gut durchblutete Spongiosa geschaffen [146]. Aus dem entstehenden Gerinnsel entwickelt sich ein faserknorpeliges Reparaturgewebe, das zwar im Vergleich zum hyalinen Gelenkknorpel mechanisch minderwertig ist, aber zu einer Reduktion der Beschwerden führen kann. Obwohl die Frage nach einem langfristigen Therapieerfolg bis heute nicht sicher geklärt ist, ist die Pridie-Bohrung auch in modernen Therapiekonzepten noch verbreitet [128]. Sollte der Defekt für eine anterograde Anbohrung nicht zugänglich sein, kann auch eine retrograde Bohrung durchgeführt werden [140]. Allerdings ist das bei der retrograden Anbohrung nach Beck entstehende Reparaturgewebe im Vergleich zur Pridie-Bohrung minderwertiger [162].

1.4.2.2 Microfracture

Das Microfracture-Verfahren kann grundsätzlich bei allen bis auf den subchondralen Knochen reichenden Knorpeldefekten eingesetzt werden [137]. Diese Technik findet zunehmend Verbreitung, u. a., da sie sich gut arthroskopisch durchführen lässt [17].

Zunächst werden alle instabilen Knorpelfragmente im oder am Rand des Defekts entfernt. Falls vorhanden, wird die kalzifizierte Oberfläche des Defekts vorsichtig entfernt, ohne jedoch den darunter liegenden Knochen zu beschädigen [171,175-177].

Mit einem Stößel werden dann arthroskopisch 2-4 mm tiefe Löcher in den subchondralen Knochen geschlagen. Der Abstand zwischen den Perforationen sollte 3 – 4 mm betragen. Damit wird eine hohe Lochdichte erreicht. Die Löcher sind jedoch noch nicht so nah zusammen, dass sie ineinander einbrechen und es zu weiterer Zerstörung des Knochens kommt [175-177]. Von den geschlagenen Löchern gehen radiär feine Fissuren aus, aus denen weiteres Blut austritt [137]. Das aus dem Knochen einströmende Blut bildet im Defekt ein Gerinnsel, das auf der durch die Mikrofrakturierung entstandenen rauen Knochenoberfläche gut anhaftet [175-177].

Postoperativ ist eine kontinuierliche passive Bewegung durch eine Motorschiene erforderlich [171,175-177].

Steadman et al. untersuchten über 1200 Patienten bis zu 7 Jahre postoperativ nach und beobachteten eine deutliche Verbesserung der Schmerzsituation 3, 5 und 7 Jahre nach der Operation. Histologisch enthielt das Reparaturgewebe allerdings sowohl Faserknorpel als auch hyalinen Knorpel [177].

1.4.3 Transplantationsverfahren

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse der bisher beschriebenen Operationstechniken wurden Verfahren zur Transplantation von Knorpel entwickelt. Da Knorpel jedoch nicht auf Knochen haftet, ist eine isolierte Transplantation von Knorpel nicht möglich. Stattdessen kann Knorpel zusammen mit dem subchondralen Knochen transplantiert werden. Der

Knochen heilt schnell ein und fixiert so das Implantat sicher [140]. Auch andere Gewebe mit chondrogenem Potential (z. B. Periost oder Perichondrium) können in Knorpeldefekte transplantiert werden.

1.4.3.1 Transplantation von Periost und Perichondrium

Die Transplantation von Perichondrium in einen Knorpeldefekt wurde erstmals 1972 von SKOOG et al. beschrieben [169,170]. RUBAK et al. [154-156] und O'DRISCOLL et al. [132,133] beschreiben entsprechende Transplantationen von Periostlappen. Das transplantierte Periost wird dabei meist an der Tibia entnommen, Perichondrium stammt meist vom Rippenknorpel. Nach der Entnahme werden die Transplantate im Knorpeldefekt durch eine Naht oder durch Fibrinkleber fixiert [140]. Die Fähigkeit von Periost und Perichondrium, unter entsprechenden Bedingungen hyalinartigen Knorpel zu bilden, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [34,133-135,151]. 1990 berichteten HOMMINGA et al. über 25 Patienten mit 30 Knorpelverletzungen die durch eine Perichondriumtransplantation behandelt worden waren. 3 bis 12 Monate nach der Operation durchgeführte Arthroskopien zeigten, dass 28 der 30 Defekte vollständig mit gelenkknorpelähnlichem Gewebe gefüllt waren [79]. Bei Periosttransplantationen ist die klinische Erfahrung bisher noch gering [130]. Die Überlegenheit einer der beiden Gewebearten ist bis heute nicht bewiesen [25].

Als Indikation für eine Transplantation gelten tiefe Gelenkknorpeldefekte bis zu einer Größe von etwa 2 x 3 cm die durch Trauma, Fehlstellungen oder Osteochondrosis dissecans entstanden sind. Die Patienten sollten nicht älter als 55 Jahre sein [25]. SERADGE et al. stellten bei Vergleichen von Patientenalter und Heilungserfolg nach einer Perichondriumtransplantation an der Hand eine kontinuierliche Abnahme guter Behandlungsergebnisse mit steigendem Alter fest. Bei dieser Studie wurde bereits ab einem Alter von 40 Jahren bei keinem der Patienten mehr ein guter Heilungserfolg erzielt [164]. Besteht bereits eine manifeste Arthrose ist eine Periost- oder Perichondriumtransplantation kontraindiziert [13,25].

1.4.3.2 Autologe Chondrozytentransplantation

Bei der autologen Chondrozytentransplantation wird die 1982 von BENYA und SHAFFER veröffentlichte Tatsache ausgenutzt, dass es möglich ist, Knorpelzellen aus Gelenkknorpel zu isolieren und diese *in vitro* so zu vermehren, dass Kollagen II-synthetisierende differenzierte Chondrozyten entstehen [10].

Unter Anwendung dieser Ergebnisse versuchten GRANDE et al. 1989 [71] patellare Knorpeldefekte in Kaninchen durch eine Transplantation *in vitro* kultivierter autologer Chondrozyten zu therapieren. Sie entnahmen dafür in einer Biopsie Knorpelzellen und vermehrten diese durch Zellkultur. Anschließend nähten sie Periostlappen über die Knorpeldefekte und spritzten darunter die kultivierten Chondrozyten. 6 Wochen nach der Implantation beobachteten sie histologisch eine durchschnittlich 82%ige Füllung des Defekts, im Vergleich zu einer durchschnittlich 18%igen Füllung der unbehandelten Kontrolldefekte. Das Reparaturgewebe ähnelte hyalinem Knorpel.

1994 veröffentlichten BRITTBERG et al. erste klinische Ergebnisse dieser Methode [21]. 16 bis 66 Monate nach der Behandlung eines Knorpeldefektes an der Femurkondyle mit autologer Chondrozytentransplantation zeigten 14 von 16 Patienten gute bis sehr gute Ergebnisse. Bei 15 Patienten wurden Biopsien entnommen und histologisch untersucht. Davon ähnelte bei 11 Patienten das Reparaturgewebe hyalinem Knorpel. 5 durchgeführte Immunhistologien wiesen Kollagen II nach. Von 7 Patienten mit patellaren Knorpeldefekten konnten jedoch nur die Ergebnisse von zwei Patienten als gut oder sehr gut eingestuft werden.

PETERSON et al. führten Nachuntersuchungen an 61 Patienten in einem Abstand von 5 bis 11 Jahren (Durchschnitt 7,4) nach einer autologen Chondrozytentransplantation durch. Davon zeigten 51 Patienten gute oder sehr gute Ergebnisse. Von 12 untersuchten Biopsien ähnelten 8 hyalinem Knorpel. PETERSON et al. schlossen daraus, dass mit diesem Verfahren bei einer Mehrheit der Patienten ein dauerhaft stabiles Reparaturgewebe erreicht werden kann [141].

Schlechtere Ergebnisse wurden von BREINAN et al. berichtet. Sie therapierten Knorpeldefekte im Tiermodell durch autologe Chondrozytentransplantation und verglichen die Heilungsergebnisse mit der Heilung untherapierter Leerdefekte. Auch 18 Monate nach der Operation konnten sie keine Unterschiede im Heilungsverhalten beobachten [18].

1.4.3.3 Autologe Knorpel-Knochen-Transplantation

Die erstmals 1908 von LEXER [109] beschriebene osteochondrale Transplantation ist gegenwärtig das Therapieverfahren mit dem größten klinischen Erfolg [140]. Indikationen sind fokale chondrale und osteochondrale Läsionen, Osteochondrosis-dissecans-Herde sowie begrenzte Osteonekrosen [88].

Zunächst wird an der Defektstelle ein Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen, so dass der Defekt eine definierte Form und Größe erhält und das Transplantat gut aufnehmen kann. Das Transplantat wird an einer gering belasteten Zone des Gelenks entnommen. Dies kann der retropatellare oder der dorsale Teil der Femurkondylen oder auch die interkondyläre Notch sein [140]. Der entnommene Zylinder wird nun in den Defekt eingesetzt. Er ist dort durch die „Press-fit-Technik“ verankert, d. h., der transplantierte Knorpel-Knochen-Zylinder ist geringfügig größer als der Defekt. Durch diesen Größenunterschied ist der Zylinder im Defekt fixiert [88]. Der Entnahmedefekt wird mit Zylindern aus dem Beckenkamm gefüllt. Deren Periost differenziert im Gelenk zu Faserknorpel [124].

Die Entnahme der Zylinder kann mit Hilfe einer diamantbesetzten Fräse erfolgen (Diamond Bone Cutting System, DBCS) [124]. Beim arthroskopisch durchführbaren Osteochondralen Autologen Transfer System (OATS) wird der Zylinder durch einen Meißel entnommen. Bei diesem Verfahren ist allerdings der Durchmesser des Transplantats auf 15 mm begrenzt [36]. 1972 berichtete Wagner über an 26 Patienten durchgeführte osteochondrale Transplantationen. Von diesen Patienten wurden 20 nachuntersucht. WAGNER konnte in allen

nachuntersuchten Fällen röntgenologisch eine gute Einheilung der Transplantate nachweisen [184].

SIEBERT et al. untersuchten die Einheilung osteochondraler Transplantate histologisch. Sie zeigten, dass der knöcherne Teil des Zylinders gut in das Gelenk einheilt, jedoch war auch nach 6 Monaten noch keine Integration des transplantierten Knorpels in das angrenzende Gewebe nachweisbar [167].

MEENEN et al. führten osteochondrale Transplantationen an 52 Patienten mit Knorpeldefekten durch. 24 Monate nach der Operation konnten die Ergebnisse aller Patienten mit traumatisch bedingten oder durch Osteochondrosis dissecans verursachten Knorpelschäden als gut oder sehr gut eingestuft werden. 76,9% der Patienten, bei denen eine Arthrose diagnostiziert wurde, hatten gute oder sehr gute Ergebnisse [123].

Der Nachteil dieses Therapieverfahrens liegt in der Entstehung eines Knorpelschadens in zuvor gesundem Knorpel durch die Entnahme des Spenderzylinders [106,140].

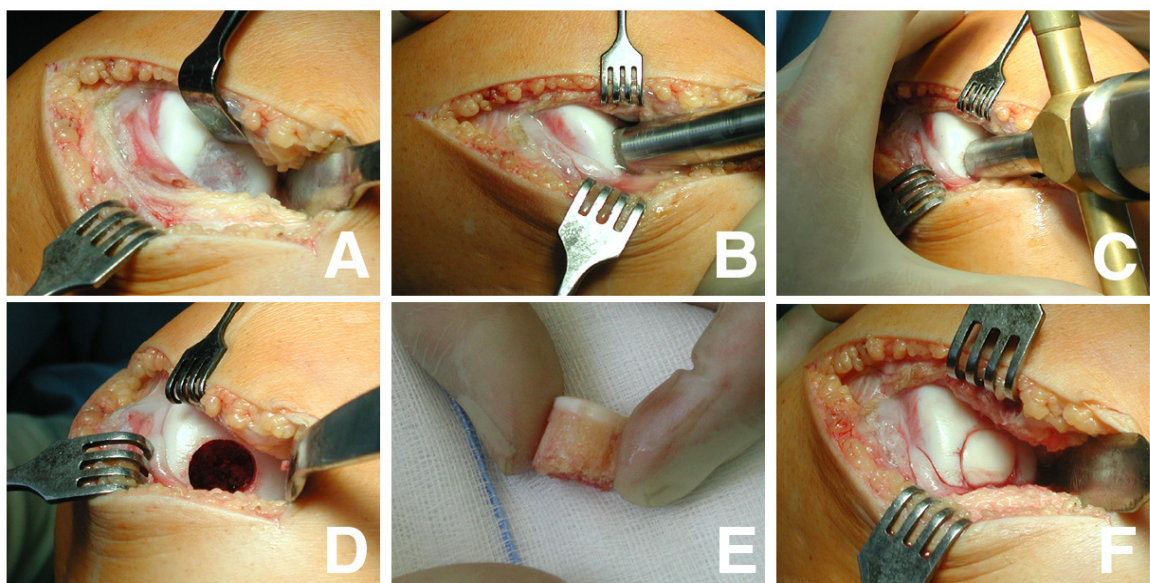


Abb. 4 [140]: Autologe osteochondrale Transplantation bei einem 45jährigen männlichen Patient. A: Knorpeldefekt am medialen Femurkondylus des rechten Kniegelenks B, C: Entnahme des defekten Knorpels mit dem subchondralen Knochen D: zur Transplantation vorbereiteter ehemaliger Defekt E: in einer gering belasteten Gelenkregion entnommener osteochondraler Spenderzylinder F: Defekt nach der Implantation des Zylinders.

1.4.3.4 Mosaikplastik

Eine Variante der osteochondralen Transplantation wurde 1998 von HANGODY et al. beschrieben [74]. Statt eines großen Zylinders werden mehrere kleinere Transplantate an gering belasteten Stellen des Gelenks entnommen. Mit diesen wird der Defekt wie in einem Mosaik aufgefüllt. Die Räume zwischen den einzelnen Zylindern füllen sich wie nach einer Anbohrung des subchondralen Knochens mit Faserknorpel. Das Ziel war es, auf diese Weise eine bestmögliche Kongruenz der neu geschaffenen Gelenkoberfläche zu erreichen. Von 57 Patienten, die HANGODY et al. in einem Abstand von mehr als 3 Jahre nach einer Operation untersuchte, erreichten 91% gute oder sehr gute Ergebnisse [75].

1.4.3.5 Allogene Knorpel-Knochen-Transplantation

Die allogene Transplantation hat den Vorteil, dass bei diesem Verfahren kein Entnahmedefekt erzeugt wird. Außerdem ist es möglich, die anatomische Gelenkoberfläche optimal wiederherzustellen, indem das dem ursprünglichen Defekt entsprechende Areal des Spendergelenks transplantiert wird [140].

Allogene Transplantationen von Knochen beinhalten jedoch das Risiko einer Übertragung von Infektionskrankheiten wie beispielsweise HIV [3,26,27,39].

Bei Versuchen, xenogene Transplantationen von Knorpel und Knochen durchzuführen, kam es zu deutlichen immunologischen Abwehrreaktionen [160]. Dieser Therapieansatz ist daher weitgehend aufgegeben worden [8].

1.5 Problemstellung

Bisherige Untersuchungen über die autologe osteochondrale Transplantation sind oft klinische Studien, in denen Nachuntersuchungen an operierten Patienten durchgeführt werden. Histologische Untersuchungen beschränken sich auf die Analyse von Gewebeproben, die durch eine Nadelbiopsie entnommen worden sind. Die histologische Untersuchung kompletter Defekte nach einer erfolgten Transplantation wurde lediglich in Kurzzeitstudien durchgeführt.

Bisher fehlen histologische Untersuchungen über die langfristige Einheilung osteochondraler Transplantate in Knorpeldefekte.

Folgende Fragen sollen daher untersucht werden:

- Wie heilt der knöcherne Anteil des Transplantats im Verlauf eines Jahres in den Defekt ein?
- Welches Anwachsverhalten zeigt der knorpelige Anteil des Transplantats im Verlauf eines Jahres? Kommt es am Rand des Defekts zu einer kontinuierlichen Verbindung zwischen dem Knorpel des Transplantats und der Umgebung?
- Welche Veränderung zeigt der Knorpel des Transplantats im Verlauf eines Jahres? Sind Anzeichen einer Degeneration vorhanden?

2. MATERIAL UND METHODEN

An 14 Schweinen wurde an den medialen Femurkondylen beider Kniegelenke eine autologe osteochondrale Transplantation durchgeführt. Nach 2, 8 und 26 Wochen wurden jeweils 3 Tiere, nach 52 Wochen wurden 4 Tiere getötet und anschließend radiologisch und histologisch untersucht.

2.1 Versuchstiere

Die Studie wurde an 13 adulten Göttinger Minipigs (3 männliche, 10 weibliche) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Defektsetzung waren die Tiere im Mittel 35 (18-53) Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 30 (15-39) kg.

Der Antrag auf Durchführung der Tierversuche wurde unter der Projekt-Nr. 34-00 bei der Stadt Hamburg, Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Veterinär- und Gesundheitswesen gestellt und genehmigt.

2.2 Operation

2.2.1 Anästhesie

Vor der Narkoseeinleitung wurde das Schwein durch eine i. m. Injektion einer Mischung aus Stresnil (Azaperon; Janssen Cilag GmbH, Neuss) und Ketamin 10 (Ketaminhydrochlorid; Atarost GmbH & Co, Twistring) (je 1ml/10 kg Körpergewicht) sediert. Dem sedierten Tier wurde nun ein intravenöser Zugang in eine Ohrvene gelegt und die Narkose durch einen Bolus von 10ml Propofol-Lipuro 1% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) i. v. eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch Gabe von 10 ml/h Propofol-Lipuro 1% über einen Perfusor.

Das intubierte Schwein (Tubus-Größe 7,5) wurde durch eine Model MA-1B Respiration Unit (Bennett Respiration Products Inc., Santa Monica, Kalifornien) mit einer Atemfrequenz von 10 / min und einem Atemzugvolumen von 500 ml

beatmet. Die Überwachung des Tieres erfolgte durch ein an Zunge oder Ohr befestigtes Pulsoxymeter.

Die Narkose dauerte ca. 90 min.

2.2.2 Operationstechnik

Präoperativ wurde den Tieren 2x 1g Elzogram 1.0 (Cefazolin-Natrium; Lilly Deutschland GmbH, Gießen) i.v. zur Infektionsprophylaxe appliziert.

Der Zugang zum Gelenk erfolgte durch einen ca. 5 cm langen Hautschnitt vom medialen Patellarand bis zur medialen Tuberositas tibiae. Nach sorgfältiger Präparation bis zur Gelenkkapsel wurde diese eröffnet und die Patella nach lateral luxiert. Somit konnte über einen Zugang sowohl die Entnahme des Spenderzylinders aus dem patellaren Gleitlager, als auch die Implantationsstelle am medialen Kondylus erreicht werden.

Für die Transplantation wurden diamantbesetzte Fräsen (Surgical Diamond Instruments (SDI), medArtis AG, Deisenhofen) verwendet. Dies entspricht dem von Draenert & Draenert entwickelten „Diamond Bone Cutting System (DBCS)“ [56].

Der „Defekt“, der das Transplantat aufnehmen sollte, wurde kaudal am medialen Femurkondylus geschaffen. Dazu wurde zunächst mit einer Stanze (Außendurchmesser 4,5mm) ein Ring in den Knorpel geschlagen. Mit einer diamantbesetzten Hohlfräse von gleichem Durchmesser wurde dann in Fortsetzung des Rings ein Zylinder bis zu einer Tiefe von 8 mm in den subchondralen Knochen gefräst. Das vorherige Stanzen des Knorpels verhindert, dass dieser beim Fräsen ausfranst. Um Hitzeschäden durch das Fräsen zu minimieren, wurde das Gewebe mit einer an die Bohrpistole angeschlossenen NaCl-Druckinfusion gekühlt. Nun wurde eine Hohlstanze mit einem Hammer in den um den Zylinder gefrästen Ring geschlagen. Die sich am Ende der Stanze befindenden Hähkchen griffen dabei in den knöchernen Teil des Zylinders. Durch eine Drehung der Stanze kam es zum kontrollierten Bruch der noch verbliebenen knöchernen Verbindung zum Gelenkknochen am unteren Ende des Zylinders.

Auf die gleiche Weise wurde nun im patellaren Gleitlager des Femurs ein 10 mm langer Spenderzylinder (Durchmesser 4,6 mm) entnommen. Der Entnahmedefekt wurde mit in PBS gelöstem Calciumphosphat (Merck KGaA, Darmstadt) bis auf das Niveau der Gelenkoberfläche aufgefüllt. Nach der Entnahme wurde der Zylinder mit einem Skalpell angespitzt und auf eine Länge von 8 mm gekürzt, um das Einbringen des Transplantats in den Defekt zu erleichtern.

Das Einsetzen des Spenderzylinders in den Defekt erfolgte zunächst manuell und bei Bedarf zusätzlich mit Hilfe eines Teflonstößels bis eine kongruente Gelenkoberfläche hergestellt worden war. Der Unterschied zwischen den Durchmessern von Entnahmedefekt und Spenderzylinder sorgte für eine sichere Verankerung des Zylinders („press-fit“).

Anschließend folgte ein 3-schichtiger Wundverschluss. (Abb. 5)

2.2.3 Postoperative Analgesie und Überwachung

Während der ersten Woche nach der Operation wurden täglich Vigilanz-, Gang- und Wundkontrollen durchgeführt. Anschließend erfolgten die Kontrollen 2x wöchentlich.

Direkt nach der Operation erhielten die Tiere 1000 mg Metamizol-Natrium supp. (Novaminsulfon-ratiopharm Zäpfchen, ratiopharm GmbH, Ulm). Waren nach der Operation Anzeichen für Schmerzen zu beobachten, wurde den Tieren über 3 Tage ausschleichend Temgesic (Buprenorphin-HCl; Essex Pharma GmbH, München) i. m. appliziert. Am ersten Tag erhielten die Tiere 2x 0,02 mg/kg Körpergewicht, am 2. Tag 2x 0,0125 mg/kg Körpergewicht und am 3. Tag 2x 0,00625 mg/kg Körpergewicht.

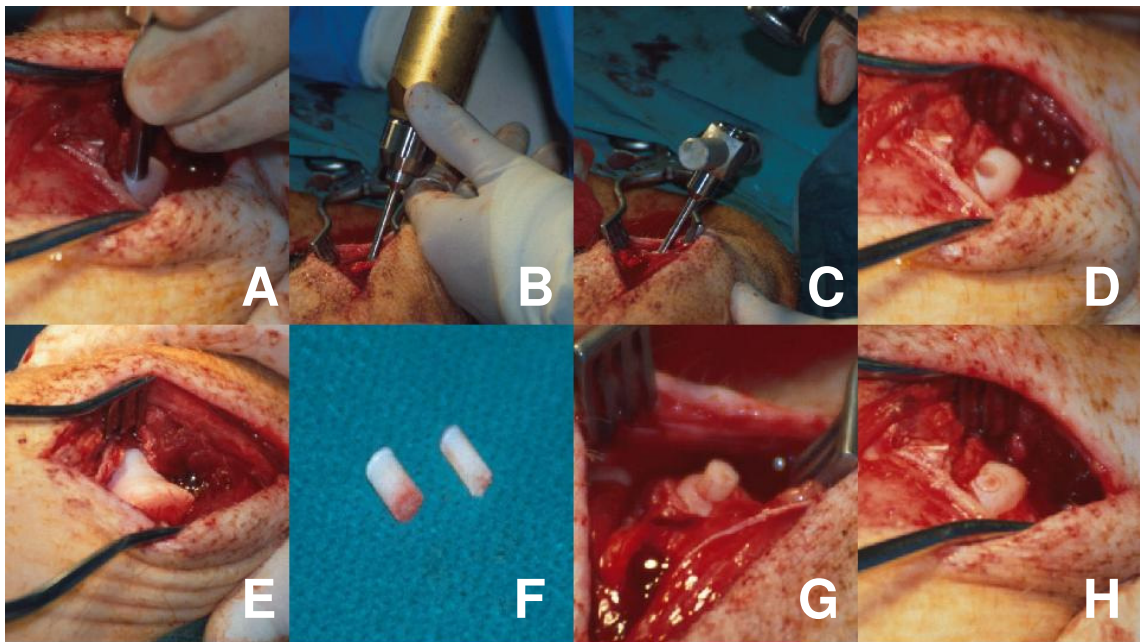


Abb. 5: Autologe osteochondrale Transplantation am Göttinger Minipig. A: Stanzen eines Rings in den Knorpel des medialen Femurkondylus B: Fräsen eines Zylinders in den Knochen C: Entnahme des Knorpel-Knochen-Zylinders mit einer Hohlstanze D: Zur Aufnahme des Spenderzylinders vorbereiteter Defekt E: Entnahme des Spenderzylinders auf gleiche Weise im patellaren Gleitlager F: Spenderzylinder (links) und der bei der Vorbereitung des Defekts entnommene Zylinder (rechts) G: Einsetzen des Spenderzylinders in den Defekt H: Medialer Femurkondylus nach der Transplantation

2.3 Tötung

Wie bei der Narkoseeinleitung wurden die Tiere zunächst durch Stresnil und Ketamin 10 i. m. (je 1ml/10 kg Körpergewicht) sediert und ein Zugang in eine Ohrvene gelegt. Die Schweine wurden dann durch 20ml T-61 (Embutramid, Mebezoniumjodid, Tetracainhydrochlorid; Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) i.v. getötet. Postmortal wurden die hinteren Extremitäten abgetrennt und untersucht.

2.4 Radiologische Untersuchung

2.4.1 Röntgen

Mit einem Siemens Optitop (Siemens AG, Erlangen) wurden Seit- und a.-p.-Aufnahmen erstellt. Es wurde eine Ladungsmenge von 3,6 mAs, eine Beschleunigungsspannung von 60 kV und ein kleiner Fokus gewählt. Der Fokus-Film-Abstand betrug 105 cm. Es wurden ein 18x24 cm großer Kodak X-Sight G/RA Diagnostic film (Kodak GmbH, Stuttgart) und Trimax 8 Verstärkerfolien (Systemempfindlichkeit 400) (3M Deutschland GmbH, Neuss) verwendet.

2.4.2 Magnetresonanztomographie

Die Untersuchungen wurden in einem Magnetom Vision MR-Tomographen (Siemens AG, Erlangen) mit einer Extremitätenspule (Siemens AG, Erlangen) bei 1,5 T durchgeführt. Zur Darstellung in coronarer und sagittaler Ebene wurden eine fettsupprimierte protonendichtegewichtete FSE-Sequenz mit einer Schichtdicke von 2 mm und eine T2 3D-DESS-Sequenz mit einer effektiven Schichtdicke von 2 mm verwendet.

2.5 Histologische Untersuchung

Nach der Tötung und der Abtrennung der hinteren Extremitäten wurden die für die Histologie vorgesehenen Kniegelenke eröffnet und Femur und Tibia voneinander getrennt. Der Femurkondylus wurde mit einer Säge abgetrennt und zur Fixierung für 2 Wochen in 4 %iges mit PBS gepuffertes Formalin (pH 7,4) gegeben.

Nach der Fixierung wurden die Femurkondylen für die histologische Verarbeitung zugeschnitten (EXAKT-Trennschleifsystem 310 (Makro), EXAKT Apparatebau GmbH & Co.KG, Norderstedt). Von einem Tier wurde jeweils eine Kondyle in Methacrylat eingebettet. Um zusätzlich eine immunhistologische Untersuchung zu ermöglichen, wurde die andere Kondyle entkalkt und in Paraffin eingebettet.

2.5.1 Acrylat

2.5.1.1 Entwässerung

Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe automatisch entwässert (Gewebeeinbettautomat, Modellreihe 2050, Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau). Die Präparate blieben jeweils 2h in jeder Lösung. Tab. 1 zeigt die bei der automatischen Entwässerung durchlaufenen Lösungen und die Verweildauer der Präparate in der jeweiligen Lösung.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| Lösung | Ethanol 70% I | Ethanol 70% II | Ethanol 80% I | Ethanol 80% II | Ethanol 96% I | Ethanol 96% II |
| Dauer | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h |
| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | Ethanol 96% III | Ethanol 100% I | Ethanol 100% II | Ethanol 100% III | Ethanol 100% IV | Ethanol 100% V |
| | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h | 2 h |

Tab. 1: Stufen der Entwässerung vor der Einbettung in Methylmethacrylat

2.5.1.2 Einbettung

Ansatz Infiltrationslösung

- entstabilisiertes Methylmethacrylat 1I (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
- LPG 100ml (WIV, Schwetzingen)
- Benzoylperoxid 3,3g (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Ansatz Gießlösung

- entstabilisiertes Methylmethacrylat 1I (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
- LPG 100ml (WIV, Schwetzingen)
- Benzoylperoxid 5,5g (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Die Präparate wurden zunächst 2x 24 Stunden in der Infiltrationslösung gelagert. Direkt vor dem Gießen wurde der Gießlösung zur Beschleunigung der Polymerisation 5µl N,N-Dimethyl-p-toluidin (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) / ml Gießlösung hinzugefügt. Die Einbettung des Präparates erfolgte in kleinen Glasgefäßen. Um ein Wiederfinden des Defektes nach der Einbettung zu erleichtern, wurde der Abstand des Defektes vom Rand des Präparats gemessen. Da es bei der Aushärtung der Gießlösung zu einer Erwärmung kommt, lagerten die Präparate zur Aushärtung für 24 Stunden in fingerhohem Wasser im Kühlschrank bei 5°C.

2.5.1.3 Schleifen

Nach dem Entfernen des Glases vom Acrylatblock wurde in der Umgebung des Präparates überflüssiges Acrylat mit einer Schleifmaschine (Phoenix Alpha, Wirtz-Buehler GmbH, Düsseldorf; Schleifscheiben: WS flex 18 C, Durchmesser 200mm, Körnung 80, Hermes Schleifmittel GmbH & Co.KG, Hamburg) entfernt und der Block für das Schneiden am Mikrotom in die richtige Form geschliffen.

2.5.1.4 Schneiden

Ansatz Chromalaun-Gelatine

- 0,5g Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt) in 50 ml Aqua dest. lösen
- 2ml Chromalaun (4g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Merck KGaA, Darmstadt) in 100ml Aqua dest.)
- eine Messerspitze Thymol (Merck KGaA, Darmstadt)

Die in Acrylat eingebetteten Präparate wurden an einem Rotationsmikrotom (MicroTec CUT 4060 E, Ganter Werkzeug- und Maschinenbau GmbH, Walldorf) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 4µm. Um das Schneiden zu erleichtern wurden Präparat und Messer mit WIV-Schneidflüssigkeit (WIV, Schwetzingen) angefeuchtet. Die Schnitte wurden auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete

Standardobjektträger aufgezogen und zum Strecken mit einigen Tropfen Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt) beschichtet. Anschließend wurden die Objektträger zum Schutz mit Folien (Plastic Cover Slips, Oncor, Gaithersburg, MD, USA) bedeckt, in Pressen eingespannt und 12 Stunden im Brutschrank bei 60°C gelagert. Dies stellte die Verbindung zwischen Schnitt und Objektträger her und sorgte dafür, dass die Streckflüssigkeit verdunstete.

2.5.1.5 Färben

Zum Herauslösen des Acrylats wurden die Präparate zunächst 3x 10 Minuten in Entplaster ((2-Methoxyethyl)-Acetat, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) gebadet. Dann durchliefen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe (jew. 2 min in: 2x Ethanol 100%, 1x 96%, 1x 80%, 1x 70%, 1x 50%). Der am Objektträger verbleibende Alkohol wurde in Aqua dest. abgespült.

2.5.1.5.1 Toluidinblau

Die Präparate wurden 45 min in 1%igem Toluidinblau (pH 4,5, Toluidine Blue O, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefärbt. Anschließend durchliefen sie die aufsteigende Alkoholreihe mit den Ethanolkonzentrationen 50%, 70%, 80%, 96%, 2x 100%. Dabei mussten die Präparate im 100%igen Alkohol für 3 min verweilen, in die niedriger konzentrierten Lösungen wurden sie nur kurz eingetaucht. Anschließend folgte ein Bad für 3x 2 min in Xylol.

2.5.1.5.2 Kossa / van Gieson

Ansatz Sodaformol

- 12,5g Natriumcarbonat (Merck KGaA, Darmstadt)
- 62,5ml 37%iges Formalin
- 187ml Aqua dest.

Ansatz van Gieson

- 2,5g Fuchsin S (Chroma-Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart-Untertürkheim)
- 5ml konz. Salpetersäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 100ml Glycerin (Merck KGaA, Darmstadt)
- 900ml gesättigte Pikrinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Die Präparate blieben zunächst 5 min in 3 %igem Silbernitrat (Merck KGaA, Darmstadt) und wurden dann 10 min in Aqua dest. gespült. Sie wurden nun nacheinander jeweils 5 min in Sodaformol und Natriumthiosulfat (Merck KGaA, Darmstadt) gebadet. Jedem der beiden Bäder folgte ein 10 minütiges Spülen in Leitungswasser. Nach einer 20 minütigen Gegenfärbung in v.-Gieson-Farbe durchliefen die Präparate die aufsteigende Alkoholreihe mit den Schritten 80%, 96%, 2x 100%. In jedem der Alkoholbäder wurden die Präparate nur kurz eingetaucht. Vor dem Eindecken wurden die Präparate noch 3x 5 min in Xylol gebadet.

2.5.1.5.3 Hämalaun-Eosin

Nach der Entwässerung wurden die Präparate 45 min in Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt. Anschließend standen die Präparate zum Bläuen 10 min in Leitungswasser. Nach einem 5 sekündigen Bad in 2%igem Lithiumcarbonat (Merck KGaA, Darmstadt) wurden die Objektträger erneut 3 min in Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden für eine Minute in 80%iges Ethanol getaucht und dann 5 min mit Eosin (0,2% Eosin G (Merck KGaA, Darmstadt) in 80%igem Ethanol) gefärbt. Sie wurden kurz in Leitungswasser gespült und dann durch die aufsteigende Alkoholreihe (80%, 96%, 2x 100%) geführt. Sie wurden dabei jeweils nur kurz eingetaucht. Es folgten 3x 2 min in Xylol.

2.5.2 Paraffin

2.5.2.1 Entkalkung

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Präparate für 2 Monate entkalkt. Die Entkalkung erfolgte in 10%iger EDTA-Lösung (pH 7,2-7,4, Titriplex III, Merck KGaA, Darmstadt). Die EDTA-Lösung wurde 1x wöchentlich erneuert.

2.5.2.2 Entwässerung

Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließend in Xylol automatisch entwässert und anschließend in Paraffintöpfe getaucht (Gewebeeinbettautomat, Modellreihe 2050, Bavimed). Tab. 2 zeigt die bei der automatischen Entwässerung durchlaufenen Lösungen und die Verweildauer der Präparate in der jeweiligen Lösung.

| | | | | | | |
|---------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Lösung | Ethanol 70% I | Ethanol 70% II | Ethanol 80% I | Ethanol 96% I | Ethanol 96% II | Ethanol 100% I |
| Dauer | 6 h | 6 h | 6 h | 6 h | 6 h | 6 h |
| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | Ethanol 100% II | Xylol I | Xylol II | Paraffin I | Paraffin II | Paraffin III |
| | 6 h | 1 h | 2 h | 1 h | 1 h | 1 h |

Tab. 2: Stufen der Entwässerung vor der Einbettung in Paraffin

2.5.2.3 Einbettung

Zunächst wurde am Präparat ausgemessen, welchen Abstand der Defekt vom Präparatrand (spätere Unterseite des Paraffinblocks) hat. Dies sollte die Lokalisation des Defekts im undurchsichtigen Paraffinblock beim Schneiden erleichtern. Beim Einbetten in Paraffin (Vogel Histo-Comp Gewebeeinbettmittel,

Vogel Medizinische Technik und Elektronik, Giessen) wurde das Präparat so in der Gussform platziert, dass im Mikrotom ein Anschnitt des Defekts senkrecht zur Gelenkoberfläche möglich war.

2.5.2.4 Schneiden

Vor dem Schneiden wurden die Präparate über Nacht im Kühlschrank bei 7°C gelagert. Die histologischen Schnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (Typ HN 40, Jung AG, Heidelberg) angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Für die immunhistologische Untersuchung wurden SuperFrost®Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) verwendet. Schnitte, die mit HE und Toluidinblau gefärbt werden sollten, wurden auf mit Eiweiß-Glycerol beschichtete Standardobjektträger aufgezogen. Die Schnittdicke betrug 5µm.

2.5.2.5 Färbung

Nach dem Schneiden wurden die Präparate 30 Minuten in einem Brutschrank bei 60°C auf den Objektträgern fixiert. Dabei denaturierte das Eiweiß und stellte damit eine Verbindung zwischen Präparat und Objektträger her. Noch warm wurde durch 2x 6 min im Xylol das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst. Anschließend durchliefen die Präparate die absteigende Alkoholreihe (jew. 2 min in: 2x Ethanol 100%, 1x 96%, 1x 80%, 1x 70%, 1x 50%). Danach wurden die Objektträger in Aqua dest. bewegt, bis das restliche Ethanol entfernt war.

2.5.2.5.1 Toluidinblau

Die Färbung der Paraffinschnitte mit Toluidinblau entsprach dem bei Acrylatschnitten angewendeten Verfahren.

2.5.2.5.2 Hämalaun-Eosin

Die Präparate wurden 6 min in Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt und dann 2 min in Leitungswasser gespült. Zum Differenzieren wurden

die Objektträger kurz in 0,3%igen HCl-Alkohol getaucht, gefolgt von erneutem Spülen in Leitungswasser. Zum Bläuen wurden die Präparate 8 min in frischem Leitungswasser gebadet. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden sie 2 min in Eosin (0,2% Eosin G (Merck KGaA, Darmstadt) in 80%igem Ethanol) gefärbt. Die Objektträger wurden erneut kurz in Aqua dest. gespült und durchliefen dann die aufsteigende Alkoholreihe mit den Ethanolkonzentrationen 80%, 96%, 2x 100% (jew. 3x eingetaucht). Es folgte ein Bad von 3x 2 min in Xylol.

2.5.2.5.3 Immunhistologie

Ansatz TBS

1l Vorratslösung enthält in Aqua dest. gelöst:

- 16g Tris (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)
- 137g Trizme Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 15,6g NaCl (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)

Zur Herstellung der Arbeitslösung wird die Vorratslösung 1:20 mit Aqua dest. verdünnt.

Nachdem die Präparate 2 Std. bei 60°C im Brutschrank gelagert worden waren, wurde das Paraffin in Xylol (2 x 5 min) herausgelöst. Die Präparate wurden für 3 min in 100%iges Ethanol überführt und durchliefen dann die absteigende Alkoholreihe (jew. 5 min in: 1x 96%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 50%). Der verbliebene Alkohol wurde in über 2 min Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Objektträger 2 x 5 min in TBS gebadet.

Um einen möglichst sparsamen Einsatz insbesondere der Antikörper zu ermöglichen, wurden die Präparate auf dem Objektträger mit einem DAKO-Pen (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) umkreist. Dies verhindert ein großflächiges Verlaufen der aufgetropften Lösungen. Alle Inkubationen erfolgten in einer Feuchtkammer. Zwischen den Inkubationen wurden die Präparate in TBS gewaschen.

Zunächst erfolgte die Antigendemaskierung durch 1mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 0.1M Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt) (pH 5,5-5,6). Die 4stündige Inkubation erfolgte bei

37°C. Um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren, erfolgte nach einem Waschen in TBS für 2 x 5 min eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit in TBS gelöstem 10%igem Schweineserum (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark).

Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Kollagen I (Anti-Human Type I collagen, Kat.-Nr. AF-5610, Mediacorp Inc., Montréal, Kanada) bzw. Kollagen II (Anti-Human Type II collagen, Kat.-Nr. AF-5710, Mediacorp Inc., Montréal, Kanada) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 7°C über Nacht. Der primäre Antikörper wurde 1:100 verdünnt in DAKO Antibody Diluent (DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) verwendet.

Am folgenden Tag wurden die Präparate gewaschen und dann mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline, biotinyliert, DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200 für 1 Stunde bei Raumtemperatur bedeckt.

Nach der Inkubation wurden die Präparate für 3 x 5 min gewaschen. Die anschließende Färbung erfolgte mit dem Vectastain ABC-Kit Alkaline Phosphatase AK 5000 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). Nach dem Färben wurden die Präparate in Leitungswasser gewaschen und anschließend 30 s in 1:2 verdünntem Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) gegengefärbt. Die Präparate wurden 10 min in fließendem Leitungswasser gebläut und dann noch feucht mit Crystal/Mount Eindeckmedium (Biomedica Corp., Foster City, USA) bedeckt. Die Schnitte wurden 5 min auf der Heizplatte bei 70-80°C getrocknet und anschließend mit einem Tropfen Clarion Eindeckmedium (Biomedica Corp., Foster City, USA) eingedeckelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Versuchstiere

An 14 Göttinger Minipigs wurde an den medialen Femurkondylen beider Kniegelenke eine autologe osteochondrale Transplantation durchgeführt. Jeweils 3 Tiere sollten nach 2, 8 und 26 Wochen sowie 4 Tiere nach 52 Wochen getötet und untersucht werden. Insgesamt wurden 26 Kniegelenke operiert.

Je ein Schwein der 2 Wochen- und der 26 Wochen- Kohorte verstarb vorzeitig an einer Infektion mit *Escherichia coli*. Diese Tiere wurden nicht mit in die Studie aufgenommen. Es wurden also nur die Ergebnisse von jeweils 2 nach 2 bzw. 26 Wochen getöteten Schweinen gewertet. Alle anderen Tiere zeigten keine Zeichen einer lokalen oder systemischen Infektion. Nach der initialen Wundheilung zeigte keines dieser Tiere Vigilanz- oder Bewegungsauffälligkeiten.

| Standzeit | 2 Wochen | 8 Wochen | 26 Wochen | 52 Wochen |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| Zahl der Tiere | 2 | 3 | 2 | 4 |
| Zahl d. Kondylen | 4 | 6 | 4 | 8 |

Tab. 3: Anzahl der pro Kohorte untersuchten Tiere und Kondylen

3.2 Ergebnisse 2 Wochen nach Operation

3.2.1 Radiologische Befunde

Im konventionellen Röntgenbild (Abb. 6A) wird deutlich, dass eine knöcherne Integration zwei Wochen nach der Operation noch nicht erfolgt ist. Das Transplantat ist noch deutlich von seiner Umgebung abgrenzbar. Der Zylinder kann als regelrecht versenkt bewertet werden. Er liegt knöchern auf dem Höhenniveau des Transplantatlagers und zeigt im Übergang zu diesem keine Stufen oder Vorsprünge. Seiner Umgebung liegt das Transplantat eng an und füllt das für die Transplantation geschaffene Bohrloch vollständig aus. Pathologische Befunde im Sinne degenerativer Veränderungen sind nicht zu erheben.

Auch die magnetresonanztomographische Darstellung (Abb. 6B) bestätigt die regelrechte Versenkung des Knorpel-Knochen-Zylinders. Die Oberflächenkontur des Kondylus' wird durch den Transplantatzylinder gut nachgebildet. Der Knochenzylinder ist von einem hyperintensiven Saum entsprechend hyalinem Gelenkknorpel bedeckt. Die Knorpeldicke des Transplantats entspricht der Umgebung des Transplantats und der Knorpel zeigt radiologisch keine pathologischen Veränderungen. Eine kongruente Gelenkoberfläche scheint postoperativ gewahrt. Auf Knochenebene ist in der Magnetresonanztomographie deutlich ein Ödem in der unmittelbaren Umgebung des eingesetzten Zylinders zu erkennen.

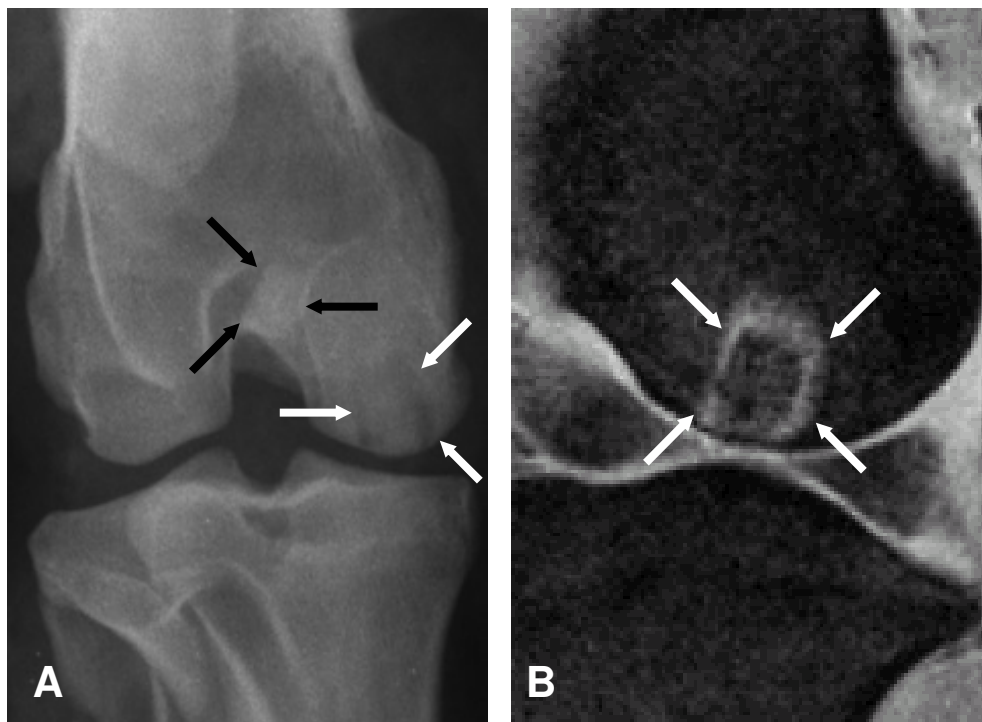


Abb. 6: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. A: Konventionelles Röntgen. Der transplantierte Knorpel-Knochen-Zylinder ist vom umgebenden Knochen gut abzugrenzen (weiße Pfeile). Es besteht noch keine Kontinuität zwischen Knochenzylinder und Transplantatbett. Auch der mit Biozement verschlossene Entnahmedefekt ist zu erkennen (schwarze Pfeile). B: Magnetresonanztomographie, T2-gewichtete 3D-DESS-Sequenz. Die Pfeile weisen auf das Transplantat. Es ist auf Knochenebene von einem unscharf berandeten hyperintensiven Saum umgeben und dadurch gut von seiner Umgebung abzugrenzen. Der knöchernen Zylinder ist von einem hyperintensiven Band bedeckt, dass in seiner Intensität der Darstellung des umgebenden Knorpels entspricht und in diesen kontinuierlich übergeht. Der Zylinder ist regelrecht versenkt und bildet eine zur Umgebung kongruente Gelenkoberfläche.

3.2.2 Histologische Befunde

Auch histologisch ist der Transplantatzylinder 2 Wochen nach der Operation sowohl auf knöcherner als auch auf Knorpelzebene gut abzugrenzen.

Der Knochen des Transplantats sowie die knöchernen Umgebung erscheinen vital. An den Grenzen des eingesetzten Zylinders sind auf zellulärer Ebene Umbauprozesse des Knochens zu beobachten. Osteoblasten und Osteoklasten haben damit begonnen, den Zylinder in die Umgebung zu integrieren (Abb. 8C, 8D). Es ist jedoch noch nicht zu einer sicheren Verankerung des Knorpel-Knochen-Zylinders in das Transplantatbett gekommen. Die Begrenzung des Zylinders ist noch klar zu erkennen. Nur vereinzelt kann bereits die Ausbildung knöcherner Brücken zwischen dem Transplantat und seiner Umgebung beobachtet werden (s. Abb. 7).

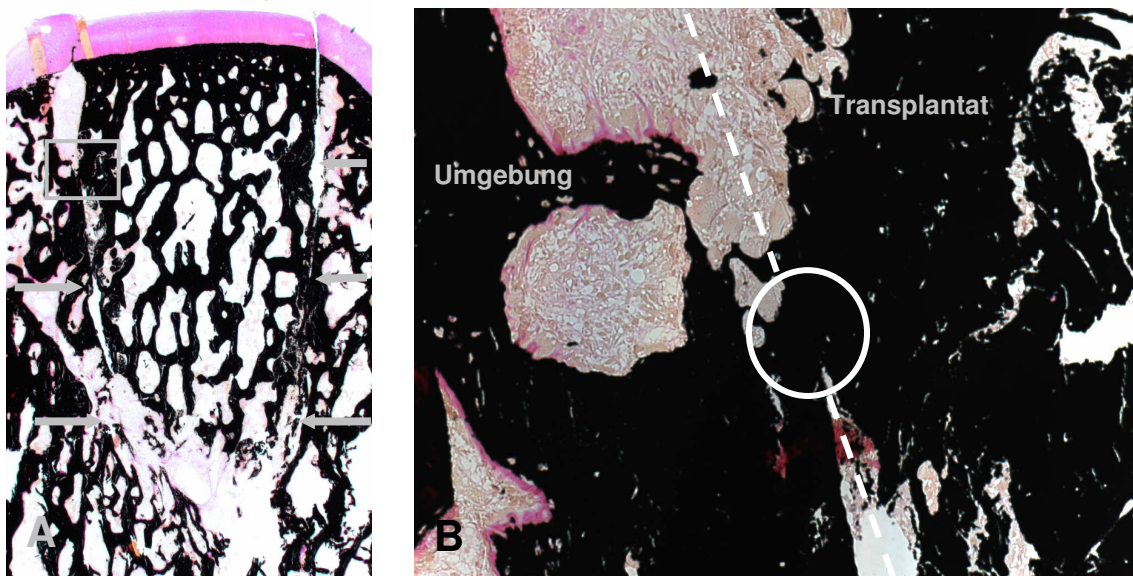


Abb. 7: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. A: Der Knochen des Transplantats ist durch einen Spaltraum klar von dem umgebenden Knochen des Femurkondylus' getrennt (Pfeile). B: Der Kreis kennzeichnet eine knöchernen Brücke, die sich zwischen Transplantat und Umgebung gebildet hat. Acrylateinbettung, Kossa/van Gieson-Färbung, Originalvergrößerung A:12,5-fach, B:100-fach.

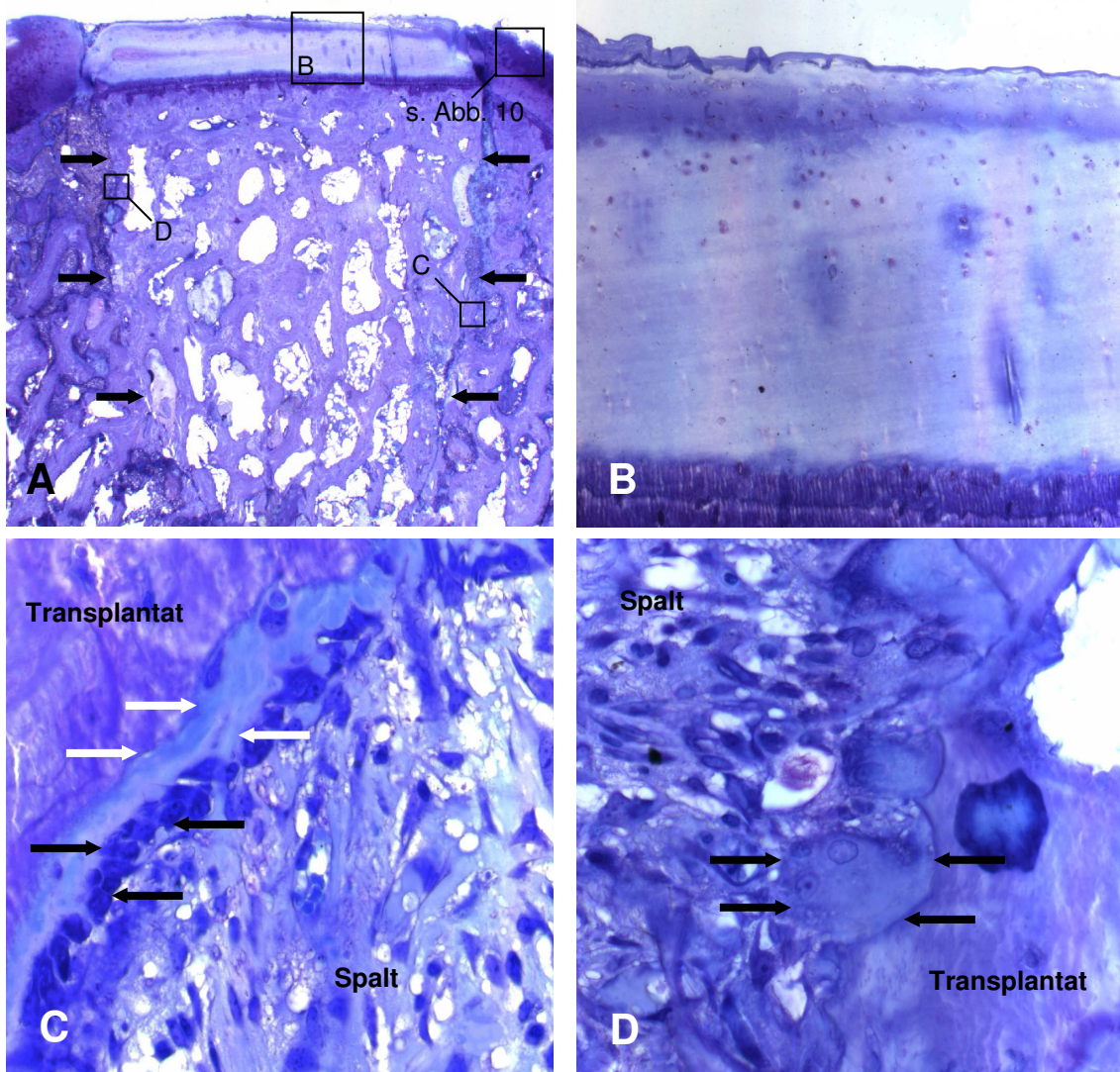


Abb. 8: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. A: Das Transplantat (schwarze Pfeile) ist regelrecht versenkt und bildet eine kongruente Gelenkoberfläche. Der transplantierte Knorpel enthält angefärbte Zellkerne, die Matrix ist als Hinweis für Glykosaminoglykane blau angefärbt. Anfärbung und Zellzahl (B) sind jedoch geringer als im Knorpel des umgebenden Kondylus'. C: Die schwarzen Pfeile weisen auf einen Saum aus Osteoblasten am transplantierten Knochen. Deutlich ist die frisch gebildete Mineralisationszone zu erkennen (weiße Pfeile). D: Am transplantierten Knochen kommt es zu einer lakunären Resorption. Die Pfeile zeigen einen mehrkernigen Osteoklasten in einer Lakune. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 100-fach, C, D: 400-fach.

Die transplantierten Zylinder wurden regelrecht versenkt und liegen auch auf Knorpelzebene ihrer Umgebung eng an. Der Transplantatknorpel füllt jeweils den Defekt optimal aus, am Transplantationsort sind keine Lücken oder Unregelmäßigkeiten der Gelenkoberfläche entstanden. Das Oberflächenniveau des Transplantates entspricht dem Niveau der Umgebung, eine kongruente Gelenkoberfläche bleibt also gewahrt. In einer der operierten Kondylen ist das Transplantat seitlich verkippt, so dass sich keine optimale Gelenkoberfläche bilden konnte. Dennoch ist der Transplantatknorpel gut in seine Umgebung integriert. Er ist vital und zeigt im Vergleich zu nativem hyalinem Gelenkknorpel keine Auffälligkeiten (s. Abb. 9).

In allen operierten Kondylen hat der transplantierte Knorpel seine glatte Oberfläche erhalten und zeigt keine Anzeichen für Fissuren. Die Grundsubstanz wird als Ausdruck des Gehalts an Glykosaminoglykanen mit Toluidinblau angefärbt. Der Knorpel ist vital und enthält Chondrozyten in der für hyalinen Knorpel typischen Anordnung.

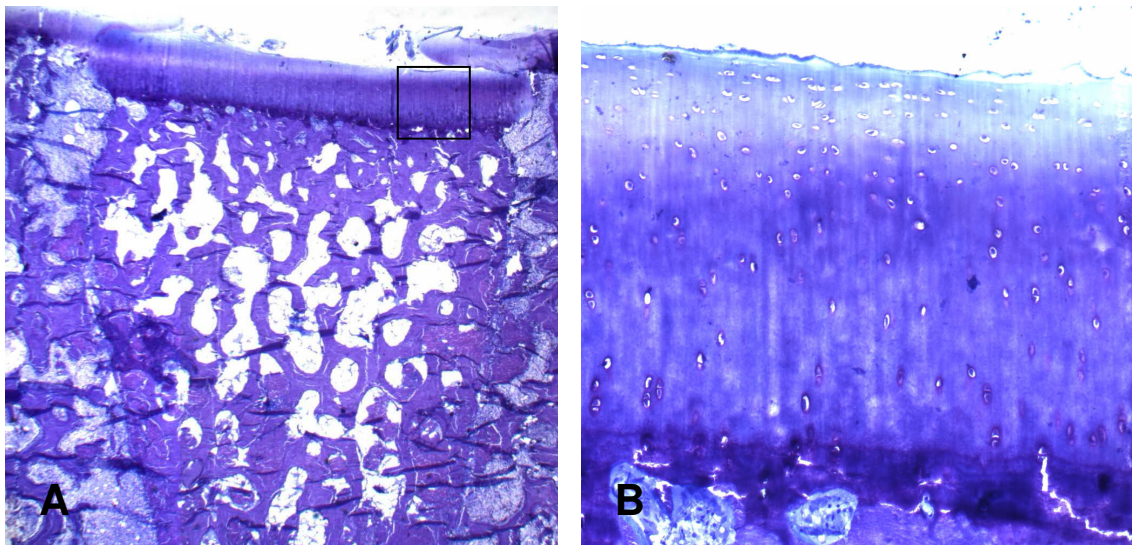


Abb. 9: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. Färbeverhalten und Zellzahl entsprechen normalem hyalinem Knorpel. Das Transplantat ist etwas abgesackt und die Gelenkoberfläche liegt teilweise unter dem Niveau des Gelenkknorpels. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 100-fach.

In den Kondylen eines der operierten Tiere ist im Vergleich zu nativem Knorpel die Zahl angefärbter Chondrozyten jedoch insbesondere in den tieferen Schichten verringert. Auch die Stärke der Anfärbung mit Toluidinblau ist schwächer als bei normalem hyalinem Knorpel oder dem Knorpel des umgebenden Kondylus' (vgl. Abb. 8A, 8B). In den Kondylen des anderen Tieres ist der transplantierte Knorpel völlig unauffällig. Er lässt sich nicht von dem Knorpel des umgebenden Femurkondylus' unterscheiden und entspricht in allen Charakteristika nativem hyalinem Gelenkknorpel (s. Abb. 9).

Der um das Transplantatlager gelegene Knorpel des Femurkondylus' ist in allen Präparaten vital. Die kräftige Anfärbbarkeit mit Toluidinblau spricht für einen hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen in der Grundsubstanz. Anzahl und Verteilung der Chondrozyten entsprechen den Verhältnissen bei nativem Knorpel. In direkter Nähe zum Bohrlochrand ist der Knorpel jedoch zellfrei, angefärbte Zellkerne finden sich erst in einem geringen Abstand zum Defekt. Bei einem Präparat zeigt sich direkt neben dem Transplantatlager an der Gelenkoberfläche eine Fissur des Knorpels (s. Abb. 10).

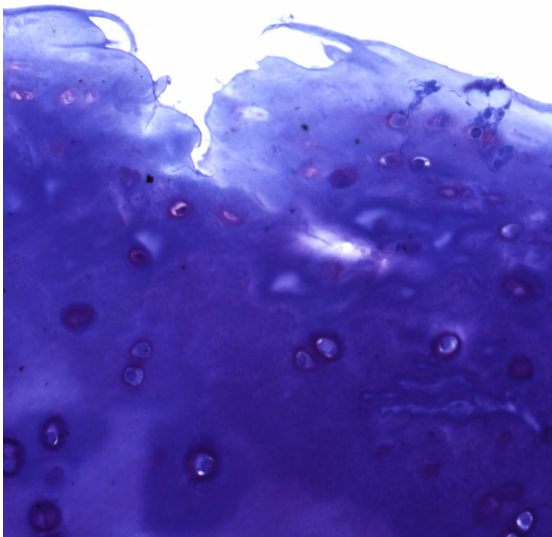


Abb. 10: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation (Übersicht s. Abb. 8). Die Oberfläche des an das Transplantat angrenzenden Knorpels des Femurkondylus weist eine Fissur auf. Der Knorpel zeigt eine physiologische Zellverteilung und Matrixanfärbung mit Toluidinblau. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung 200-fach.

Bei allen untersuchten Kniegelenken ist zwei Wochen nach der Transplantation zwischen dem Knorpel des Transplantats und seiner Umgebung weiterhin ein Spaltraum erkennbar. An den Kontaktstellen des Knorpels sind keine Anzeichen von Heilungs- oder Umbauprozessen zu erkennen (s. Abb. 11).

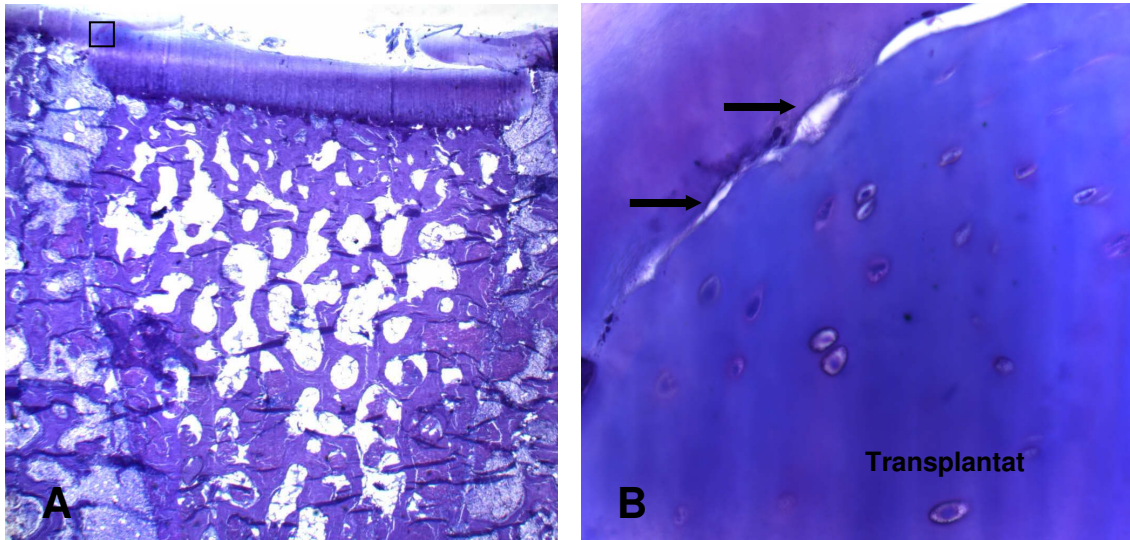


Abb. 11: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. B: Man erkennt den Spalt (Pfeile) zwischen Transplantat (rechts) und dem ursprünglichen Gelenkknorpel (links). Es sind keine Umbauprozesse zu beobachten. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 400-fach.

In der Immunhistologie lässt sich der Knochen bei Verwendung von einem gegen Kollagen I gerichteten Antikörper kräftig anfärben, der Knorpel wird nur unspezifisch gegengefärbt (s. Abb.12). Umgekehrt färbt der Anti-Kollagen II Antikörper nur den Knorpel. Am Knochen ist ausschließlich die unspezifische Gegenfärbung zu beobachten (s. Abb.13). Das Färbeverhalten entspricht damit bei beiden Färbungen normalem hyalinem Gelenkknorpel.

Abb. 12: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. Die homogene rote Färbung des Knochens zeigt die hier vorhandene Reaktion des Anti-Kollagen I Antikörpers. Der Knorpel lässt nur die unspezifische Gegenfärbung erkennen. Paraffineinbettung, immunhistologische Färbung für Kollagen I, Originalvergrößerung 12,5-fach.

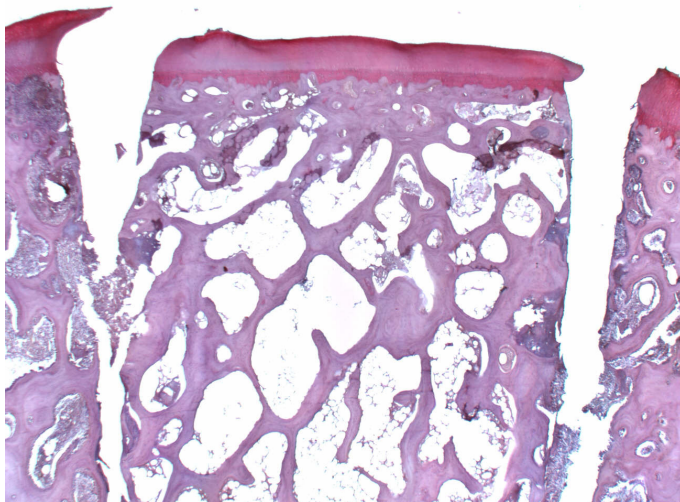
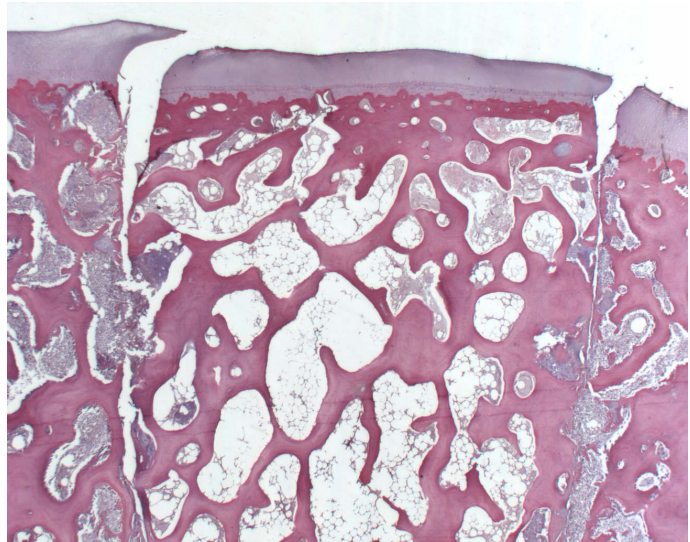


Abb. 13: Defekt 2 Wochen nach der Transplantation. Der Knorpel ist gleichmäßig immunhistologisch gefärbt, der Knochen ist dagegen nur unspezifisch gegengefärbt. Paraffineinbettung, immunhistologische Färbung für Kollagen II, Originalvergrößerung 12,5-fach.

3.3 Ergebnisse 8 Wochen nach Operation

3.3.1 Radiologische Befunde

Acht Wochen nach der Operation ist das Transplantat im konventionellen Röntgen nur noch im subchondralen Bereich von seiner Umgebung abgrenzbar. Auch in der MRT ist der Zylinder im knöchernen Bereich radiologisch im Wesentlichen als eingeeilt zu bewerten. Eine Erhöhung der Signalintensität im Sinne eines Knochenödems kommt nicht mehr zur Darstellung. Im Bereich des Defekts stellt sich auf dem Knochenzylinder ein knorpelintenser Saum dar, der dem Transplantatknorpel entsprechen dürfte. Sowohl auf dem konventionellen Röntgenbild wie auch in der MRT scheint der Knochen-Knorpel-Zylinder minimal eingesunken zu sein.

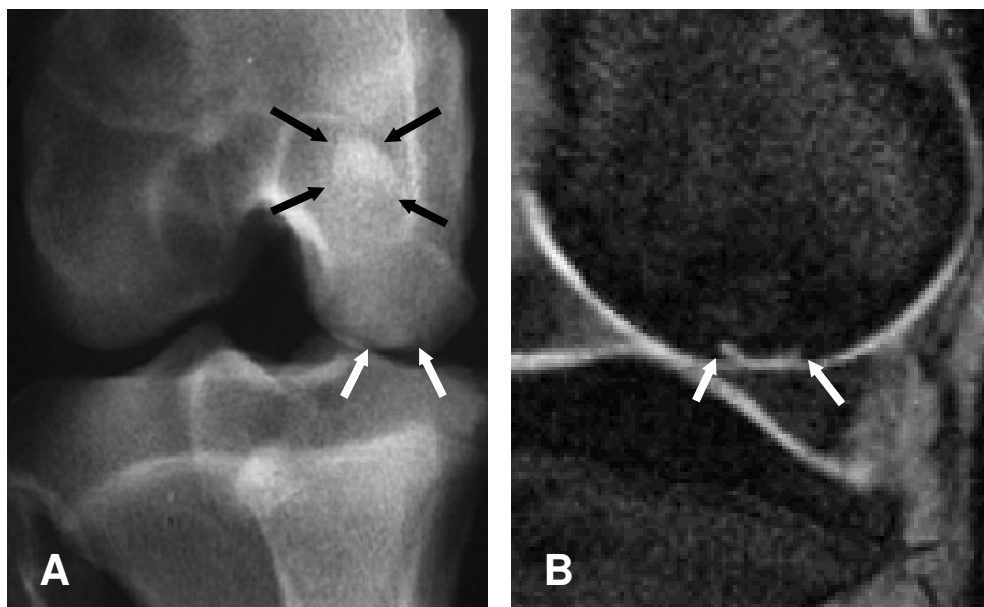


Abb. 14: Defekt 8 Wochen nach der Transplantation. A: Konventionelles Röntgen. Das Transplantat ist nur im subchondralen Bereich von der Umgebung abgrenzbar und scheint hier minimal eingesunken (weiße Pfeile). Der mit Biozement aufgefüllte Entnahmedefekt ist noch gut zu erkennen (schwarze Pfeile). B: Magnetresonanztomographie, T2-gewichtete 3D-DESS-Sequenz. Knöchern ist das Transplantat im Bereich der Spongiosa nur noch schwer abzugrenzen, der Knochenzylinder ist von einem knorpelintenseren Saum bedeckt. Analog zum konventionellen Röntgen ist der Zylinder minimal eingesunken (weiße Pfeile).

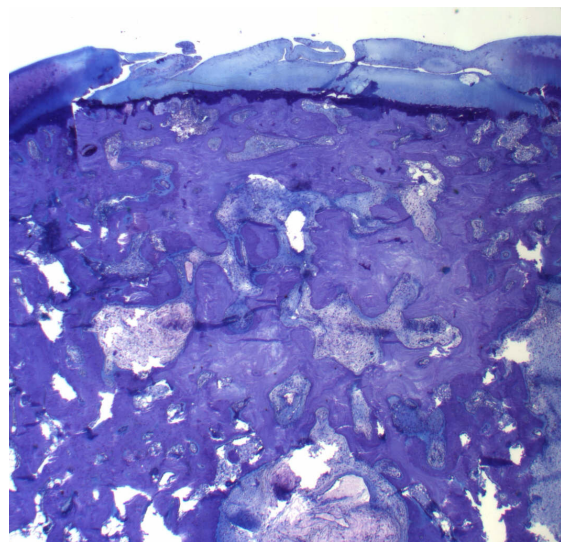
3.3.2 Histologische Befunde

Auch histologisch ist der knöcherne Teil des Transplantats acht Wochen nach der Operation deutlich schwerer von der Umgebung abzugrenzen, als dies zwei Wochen nach der Operation der Fall war. Mit einer Ausnahme (s. S. 53, Abb. 16) wurden alle Knorpel-Knochen-Zylinder regelrecht versenkt und liegen ihrer Umgebung sowohl auf knöcherner als auch auf knorpeliger Ebene eng an.

Der Zylinder scheint inzwischen knöchern stabil in das Transplantatbett integriert zu sein und weist nach acht Wochen eine Vielzahl durchgängiger, den Defektrand überbrückender Knochenbälkchen auf. Eine durchgängige Trabekelstruktur ist jedoch noch nicht vorhanden. Die Trabekel des Transplantats erscheinen im Vergleich zur knöchernen Umgebung gröber und verdickt. Weiterhin sind Osteoblasten und Osteoklasten zu erkennen, die eine Integration und ein Remodeling des knöchernen Transplantats durchführen.

In allen operierten Kondylen ist der transplantierte Knorpel klar erhalten geblieben. Eines der Präparate weist jedoch eine deutliche Veränderung gegenüber nativem Gelenkknorpel auf. Es zeigen sich Fissuren des Knorpels und damit eine unregelmäßige Gelenkoberfläche. Es ist zu einer Demaskierung und Desorganisation des Kollagenetzwerks gekommen, stellenweise hat sich Bindegewebe gebildet (s. Abb. 15).

Abb. 15: Defekt 8 Wochen nach der Transplantation. Der Knorpel des Transplantats weist deutlich Fissuren und abgeschwächte Anfärbbarkeit mit Toluidinblau auf. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung 12,5-fach.



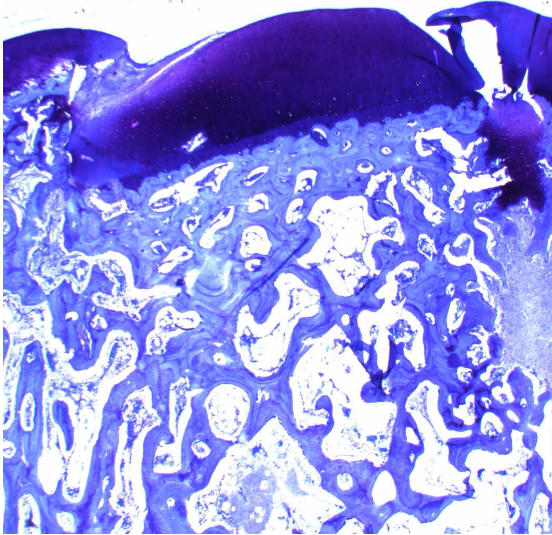


Abb. 16: Defekt 8 Wochen nach der Transplantation. Das Transplantat ist beim Einsetzen abgekippt. Dennoch ist der transplantierte Knorpel vital. Zellverteilung und Färbeverhalten entsprechen nativem hyalinem Knorpel, es sind keine pathologischen Befunde zu erheben. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung 12,5-fach.

In allen anderen operierten Kondylen ist die strukturelle Integrität des Transplantatknorpels nicht beeinträchtigt. Der eingesetzte Knorpel zeigt keine Anzeichen für Fissuren und bildet eine glatte und zu seiner Umgebung kongruente Gelenkoberfläche.

Wie bereits nach 2 Wochen ist 8 Wochen nach der Operation in einigen Transplantaten die Zahl der Chondrozyten im Vergleich zu nativem hyalinem Knorpel verringert: In einem Drittel der Kondylen zeigen sich im transplantierten Knorpel keine angefärbten Zellkerne. Zwei Drittel der Präparate zeigen histologisch deutlich angefärbte Zellkerne. Bei der Hälfte dieser Kondylen ist die Zahl der angefärbten Nuclei abschnittsweise im Vergleich zu nativem Gelenkknorpel verringert. Bei der anderen Hälfte entsprechen Anzahl und Verteilung der Chondrozyten genau den Verhältnissen bei hyalinem Knorpel.

In allen Präparaten weist die Anfärbbarkeit des transplantierten Knorpels mit Toluidinblau auf in der Grundsubstanz vorhandene Glykosaminoglykane hin. In Knorpelbereichen mit einer geringen Zellzahl ist die Anfärbung mit Toluidinblau im Sinne eines verminderten Gehalts an Glykosaminoglykanen leicht bis mittelstark abgeschwächt. In Bereichen mit regulärer Zellzahl entspricht die Anfärbung physiologischem Gelenkknorpel. Diese Transplantate sind auch 8 Wochen nach der Transplantation histologisch nicht von nativem hyalinem Knorpel zu unterscheiden.

Der um das Transplantatlager gelegene Knorpel des Femurkondylus' zeigt in keinem der Präparate pathologische Veränderungen. Nur in dem direkt an den Spaltraum zum Transplantat angrenzenden Bereich des Knorpels sind in keinem der untersuchten Präparate angefärbte Zellkerne zu erkennen, es stellen sich hier lediglich leere Lakunen dar. Mit zunehmender Entfernung zum Bohrloch lässt sich jedoch eine physiologische Zellverteilung beobachten. In der Übergangszone zum azellulären Bereich befindet sich eine schmale Zone, in der die Chondrozyten in Zellclustern angeordnet sind (s. Abb.17D). Die Anfärbbarkeit mit Toluidinblau ist nur in einem Präparat und in diesem auch lediglich in der Nähe des Bohrlochrandes abgeschwächt.

Bei 50% (3 von 6) der untersuchten Kondylen ist der Knorpel des eingesetzten Zylinders weiterhin durch eine Spalte von seiner Umgebung getrennt. Es sind keine Anzeichen eines Heilungsprozesses in diesem Bereich zu erkennen. Bei den anderen 50% (3 von 6) der Kondylen ist es in unterschiedlicher Ausprägung an einigen Stellen des Defektrands zu einer fraglichen Verbindung des transplantierten Knorpels zum Knorpel des Femurkondylus gekommen. Eines der Präparate zeigt faserknorpeliges Gewebe, das den Spaltraum am Rand des Transplantatknorpels füllt. Bei den anderen beiden Präparaten liegen die Knorpelanteile von Transplantat und Transplantatlager einander lückenlos an, es ist keine trennende Spalte mehr vorhanden. Eine Gewebeneubildung zeigt sich hier nicht (s. Abb. 18).

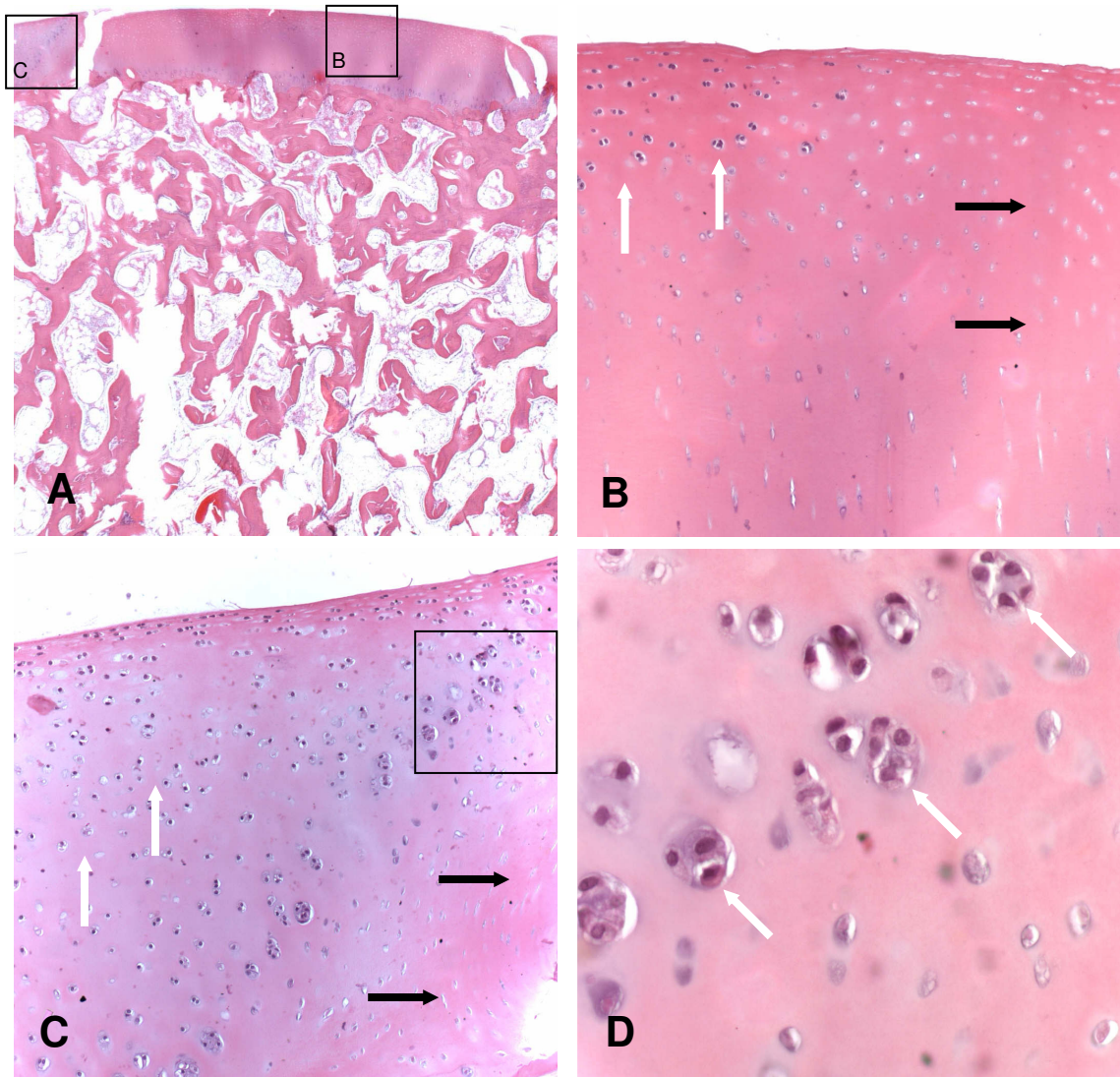


Abb. 17: Defekt 8 Wochen nach der Transplantation. A: Der Transplantatzylinder wurde regelrecht versenkt. Der genaue Defektrand ist auf Knochenebene nicht mehr sicher abzugrenzen. Der transplantierte Knorpel ist gut erhalten und füllt den Defekt annähernd lückenlos aus. Seine Oberfläche bildet eine zur Umgebung kongruente Gelenkoberfläche. B: Der Transplantatknorpel enthält insbesondere in der Transplantatmitte angefärbte Zellkerne (weiße Pfeile), in anderen Bereichen zeigen sich jedoch nur leere Lakunen (schwarze Pfeile). C: Der Knorpel des umgebenden Kondylus' zeigt eine physiologische Zellverteilung (weiße Pfeile). Nur in direkter Nähe zum Bohrloch zeigen sich Chondrozytencluster (Vergrößerung D) und unmittelbar am Bohrloch eine zellfreie Zone (schwarze Pfeile). Paraffineinbettung, HE-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B-D: 100-fach.

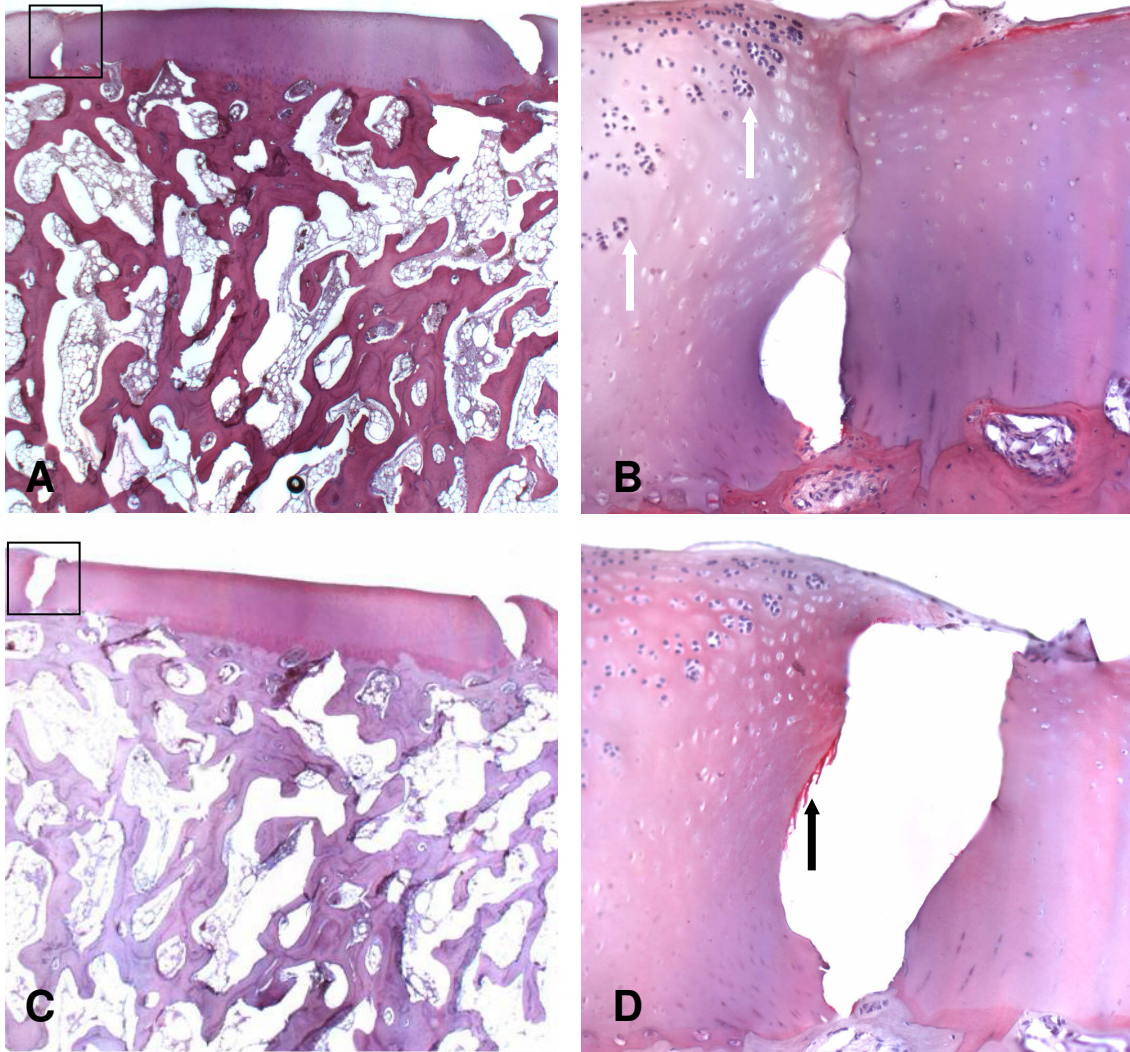


Abb. 18: Defekt 8 Wochen nach der Transplantation. Die immunhistologische Anfärbung entspricht dem Färbeverhalten von normalem hyalinem Knorpel. Deutlich ist der Übergang vom zellreichen zum zellarmen Bereich im Knorpel des Femurkondylus zu erkennen (weiße Pfeile). Am linken Defektrand des für Kollagen I gefärbten Präparats liegt der transplantierte Knorpel seiner Umgebung lückenlos an. Bei dem für Kollagen II gefärbten Präparat besteht hier eine Spalte. An dieser Lokalisation können jedoch Kollagenfasern des Typs II nachgewiesen werden, die in den Spaltraum ragen (schwarzer Pfeil). Paraffineinbettung, immunhistologische Färbung für Kollagen I (A, B) und Kollagen II (C, D), Originalvergrößerung A, C: 12,5-fach und B, D: 100-fach.

3.4 Ergebnisse 26 Wochen nach Operation

3.4.1 Radiologische Befunde

26 Wochen nach der Operation lässt sich der Transplantationsdefekt im Nativröntgen nicht mehr abgrenzen. Der Femurkondylus zeigt einen blanden Befund.

Auch in der Magnetresonanztomographie ist der Knochen des Transplantatzylinders unauffällig und radiologisch als sicher eingeeilt zu bewerten. Auf dem Knochenzylinder stellt sich ein hyperintenser Saum dar, der das Volumen des ehemaligen transplantierten Knorpels einnimmt. Dieser Saum ist deutlich heller als der angrenzende Knorpel und entspricht der Darstellung von Gelenkflüssigkeit. Dass sich noch eine deutlich ausgedünnte Knorpelschicht auf dem Transplantat befindet, ist nicht ausgeschlossen und MR-tomographisch nicht auflösbar.

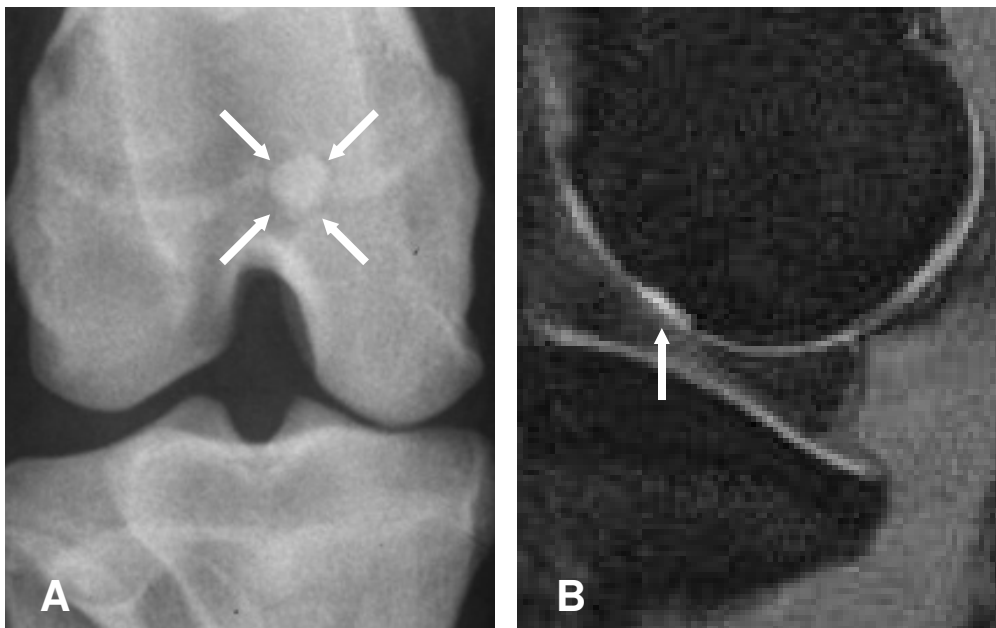


Abb. 19: Defekt 26 Wochen nach der Transplantation. A: Konventionelles Röntgen. Das Transplantat ist nicht mehr abzugrenzen. Lediglich der mit Biozement aufgefüllte Entnahmedefekt ist noch gut zu erkennen (Pfeile). B: Magnetresonanztomographie, T2-gewichtete 3D-DESS-Sequenz. Das Transplantat ist auf Knochenebene nicht mehr abgrenzbar. Der Bereich des ehemaligen transplantierten Knorpels ist mit Flüssigkeit gefüllt, die sich im Vergleich zum umgebenden Gelenkknorpel deutlich signalintenser darstellt (Pfeil).

3.4.2 Histologische Befunde

In der 26 Wochen Kohorte konnten nur die Kniegelenke von 2 Tieren ausgewertet werden. Knöchern sind alle Transplantate vollständig eingeeilt. Die Defektränder lassen sich auf Knochenebene in keinem Präparat mehr abgrenzen. Stellenweise ist die Struktur des Trabekelwerks im Bereich der Transplantate noch vergrößert und die Knochenmasse scheint erhöht zu sein.

50% (2 von 4) der operierten Kondylen zeigen eine deutliche Veränderung des transplantierten Knorpels im Vergleich zu nativem Gelenkknorpel. In diesen Präparaten ist der Transplantatknorpel von tiefen vertikalen und horizontalen Fissuren durchzogen, die den Knorpel in Fragmente unterteilen und in unterschiedlicher Ausprägung zu einem Verlust der knorpeligen Gelenkoberfläche führen (s. Abb. 20). Bei einem Präparat ist es stellenweise zu einer Freilegung der subchondralen Knochenlamelle gekommen. Die Matrix des Knorpels ist histologisch durch eine deutliche Demaskierung und Desorganisation des Kollagennetzwerks gekennzeichnet. Dennoch enthält der Knorpel abschnittsweise Chondrozyten, andere Teilbereiche des Knorpels sind jedoch vollständig azellulär. Insbesondere im Bereich einer verminderten Zahl angefärbter Zellkerne ist auch die Anfärbbarkeit der Grundsubstanz mit Toluidinblau im Vergleich zur Umgebung abgeschwächt. Bei einem in Acrylat eingebetteten Präparat lassen sich mittels Kossa-Färbung Kalzifikationsherde im transplantierten Knorpel nachweisen (s. Abb. 21).

In den immunhistologisch untersuchten Präparaten zeigen sich jedoch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu nativem Gelenkknorpel.

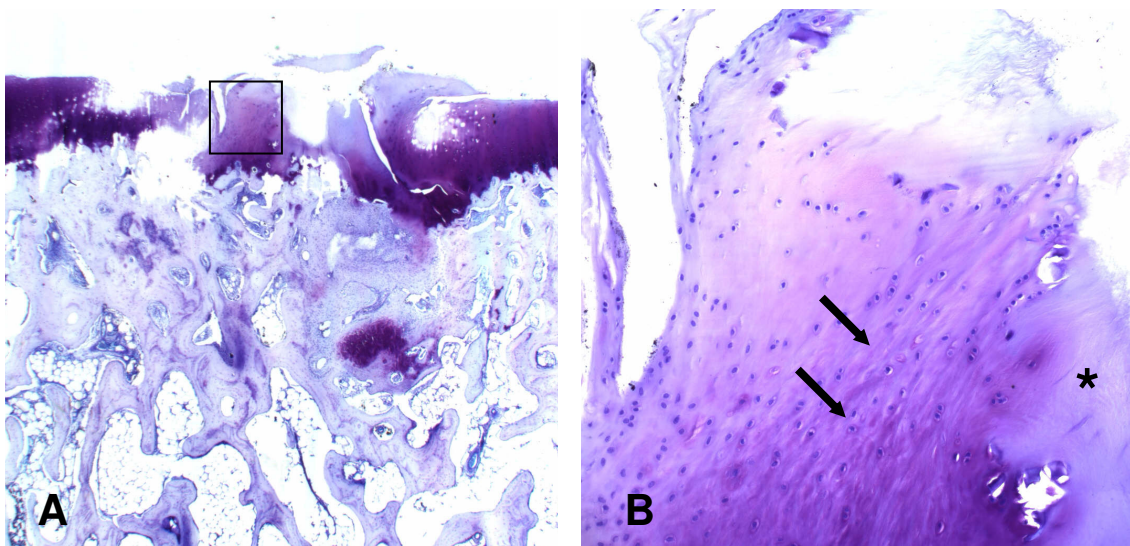


Abb. 20: Defekt 26 Wochen nach der Transplantation. Der Knorpel ist von Fissuren durchzogen und teilweise aufgefasert. Die Anfärbarkeit der Matrix ist abgeschwächt, in der Matrix ist das Kollagenetzwerk teilweise demaskiert (Pfeile). Einige Knorpelanteile sind vollständig zellfrei (*). Paraffineinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 100-fach.

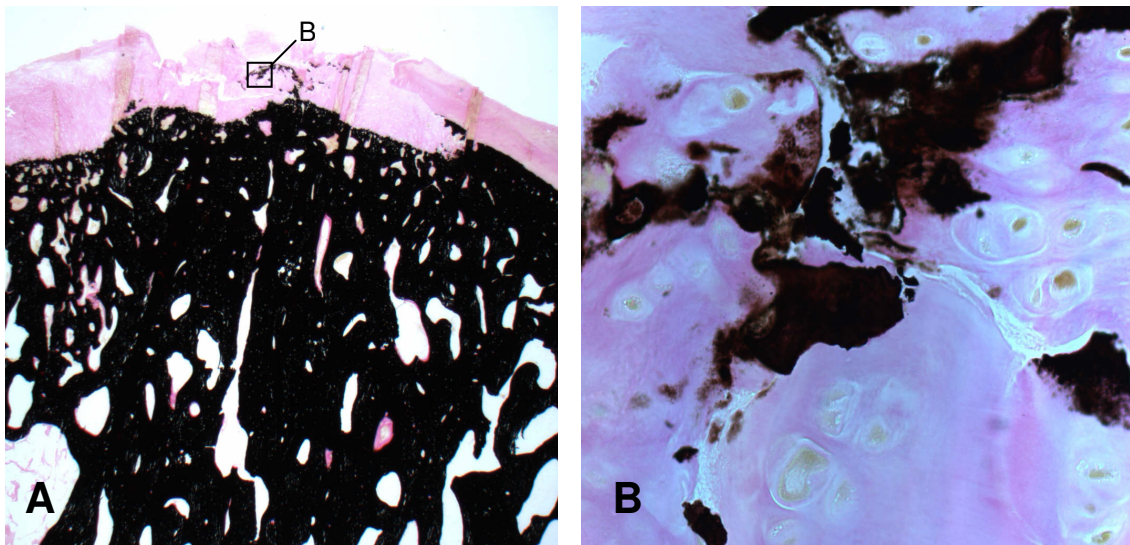


Abb. 21: Defekt 26 Wochen nach der Transplantation. Das Transplantat ist knöchern sicher eingeeilt. Der transplantierte Knorpel zeigt deutliche Fissuren und bildet keine homogene Gelenkoberfläche. Im Bereich des Transplantatknorpels färben sich Kalzifikationsherde schwarz an (B). Acrylateinbettung, Kossa/van Gieson-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 400-fach.

Die anderen 50% (2 von 4) der Präparate zeigen einen deutlich vitaleren und intakten Knorpel am Transplantationsort. Der transplantierte Zylinder füllt den Defekt gut aus. Auch 26 Wochen nach der Operation besteht in diesen Präparaten eine homogene Gelenkoberfläche ohne Fissuren oder Unregelmäßigkeiten. Das Oberflächenniveau des Gelenkknorpels entspricht am Transplantationsort dem Niveau des umgebenden Femurkondylus'.

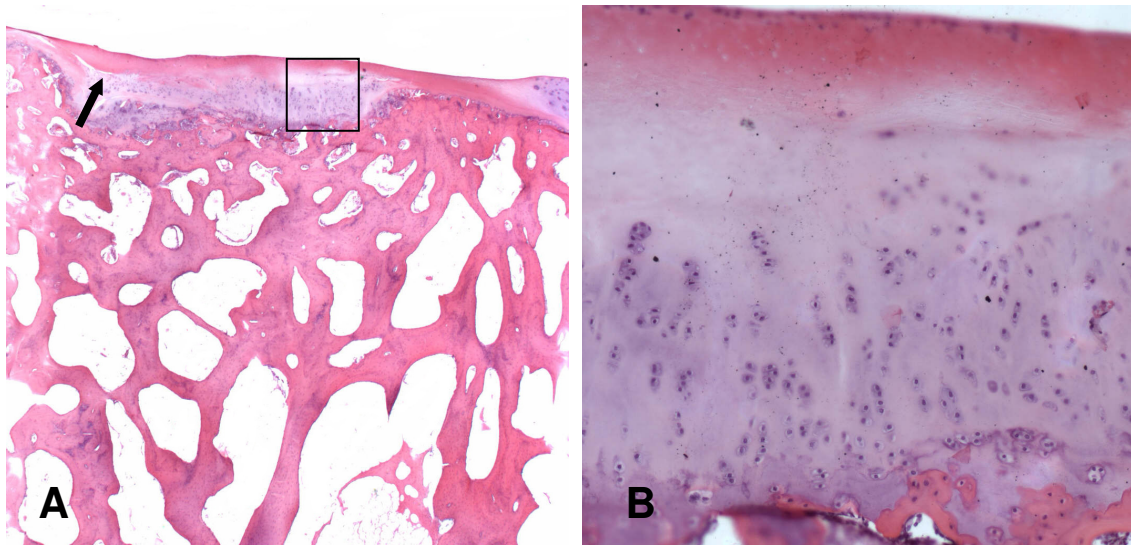


Abb. 22: Defekt 26 Wochen nach der Transplantation. Das Niveau der subchondralen Knochenlamelle des eingesetzten Zylinders liegt unterhalb des Umgebungsniveaus. Der Höhenunterschied wird durch einen dickeren Gelenkknorpel ausgeglichen, so dass eine homogene Gelenkoberfläche resultiert. Auf dem tiefer liegenden transplantierten Knochen befindet sich vitaler zellreicher hyaliner Knorpel. Über diesem Knorpel und von ihm streckenweise durch Spalten getrennt (Pfeil) befindet sich gelenkspaltnah eine zellarme Knorpelschicht, die homogen in den Knorpel des umgebenden Kondylus' übergeht. Der gelenkspaltnahe Knorpel gleicht die durch das abgesunkene Transplantat verursachten Höhenunterschiede der Gelenkoberfläche vollständig aus. Paraffineinbettung, HE-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 100-fach.

Der transplantierte Knorpel enthält in großen Abschnitten eine Zellverteilung, die nativem hyalinem Knorpel entspricht, abschnittsweise ist der Knorpel jedoch auch frei von angefärbten Zellkernen (s. Abb. 22). Die Grundsubstanz zeigt eine deutliche Anfärbung mit Toluidinblau als Ausdruck des hohen Glykosaminoglykangehalts. Wie bereits in den anderen Kohorten beschrieben, ist auch in diesen Präparaten in zellarmen Bereichen die Anfärbbarkeit mit Toluidinblau abgeschwächt.

Bei der Betrachtung des Spaltraumes zwischen dem transplantierten Knorpel und dessen Umgebung zeigen alle Präparate mögliche Anzeichen einer Einheilung des Transplantatknorpels im Sinne einer kontinuierlichen Gewebebrücke zwischen dem Knorpel des Kondylus' und des Transplantats. Die beiden Knorpelanteile liegen einander lückenlos an, der Übergang zwischen ihnen ist im histologischen Bild teilweise verwaschen (s. Abb. 23).

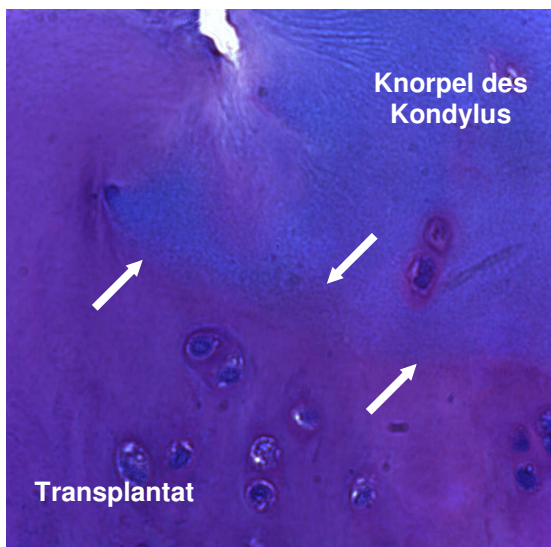


Abb. 23: Rechter Defektrand 26 Wochen nach der Transplantation. Die Matrix des transplantierten Knorpels geht homogen in die Knorpelgrundsubstanz des Kondylus über. Der Übergang wirkt leicht verwaschen, die genaue Grenzlinie ist nicht mehr eindeutig definierbar (Pfeile). Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung 400-fach.

Der den Defekt umgebende Knorpel stellt sich bei den Kondylen eines der Tiere vital dar und zeigt lediglich in unmittelbarer Nähe zum Defekt degenerative Veränderungen im Sinne eines Verlustes anfärbbarer Zellkerne. Dies entspricht dem Befund der 2- und 8-Wochen Kohorte. Bei den Kondylen des anderen Tieres ist in dem Knorpel, der den Defekt umgibt, ein Verlust der Färbung von Matrix und Zellkernen zu beobachten. In den oberen Knorpelschichten zeigen sich vereinzelt Fissuren. Erst mit einem gewissen Abstand vom Bohrlochrand entspricht der Gelenkknorpel normalem hyalinem Knorpel (s. Abb. 24B).

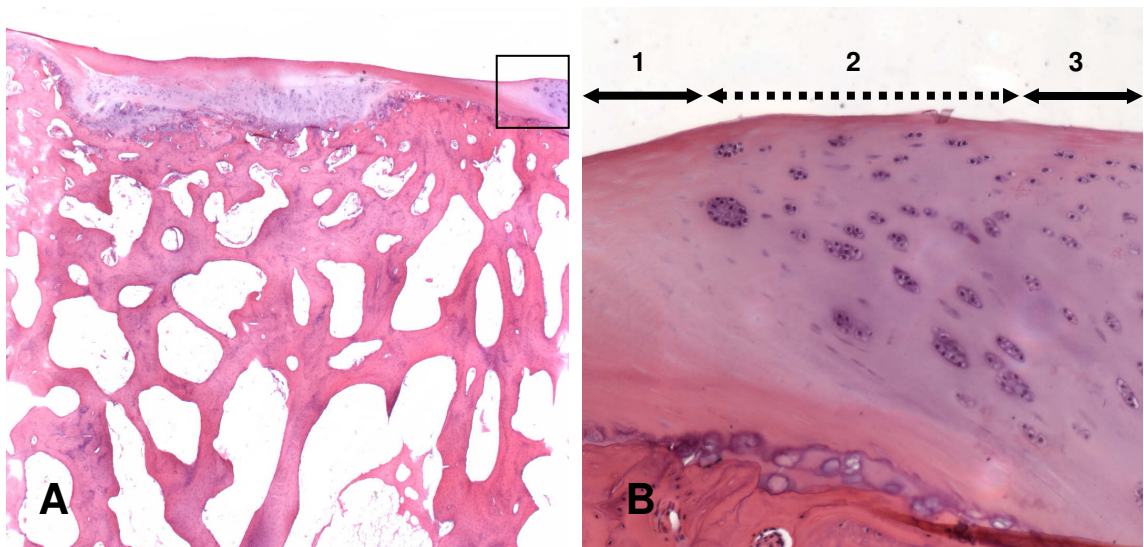


Abb. 24: Defekt 26 Wochen nach der Transplantation (vgl. Abb. 22). Der Knorpel des Femurkondylus' ist in direkter Umgebung des Bohrloches azellulär (1). Erst in einem gewissen Abstand findet sich eine physiologische Zellverteilung (3). Im Übergang zum zellfreien Bereich lagern sich die Chondrozyten zu Zellclustern zusammen (2) Paraffineinbettung, HE-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B:100-fach.

3.5 Ergebnisse 52 Wochen nach Operation

3.5.1 Radiologische Befunde

Wie bereits nach 26 postoperativen Wochen ist das Transplantat im konventionellen Röntgen vollständig eingeheilt. In Kenntnis der Befundlokalisation lässt sich lediglich eine leichte Mulde in der Femurkontur erkennen (weißer Pfeil). Der mit Biozement gefüllte Entnahmedefekt ist nach 52 Wochen in seiner Begrenzung unscharf und ermöglicht nicht mehr die sichere Abgrenzung wie noch nach 26 Wochen.

Auch in der Magnetresonanztomographie gelingt die knöchernen Abgrenzung des Transplantats nicht. Pathologische Befunde im Bereich des Knochens sind nicht zu erheben. Die Oberfläche des Transplantats ist analog zur konventionellen Aufnahme muldenförmig eingesunken, wobei sie stufenlos in die Umgebung übergeht. Das Signal des Transplantatknorpels ist heterogen, vereinbar mit einer beginnenden Degeneration.

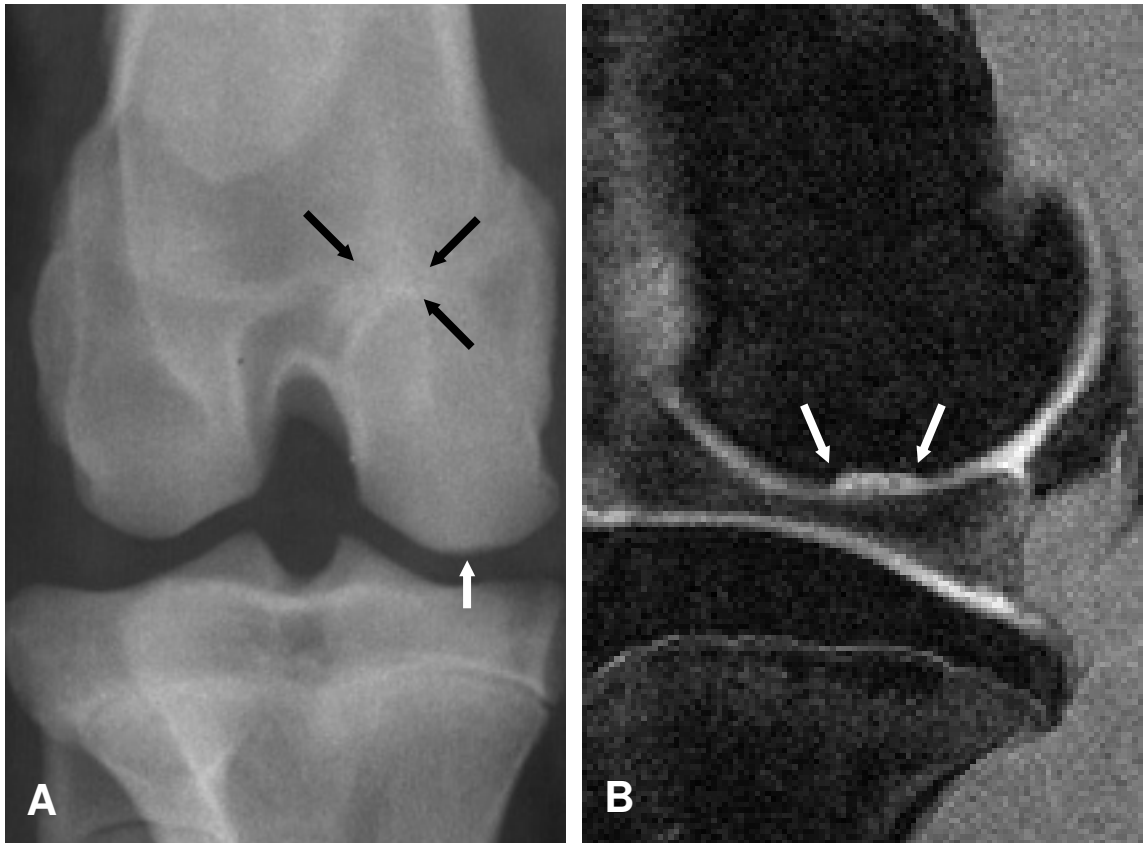


Abb. 26: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. A: Konventionelles Röntgen. Das Transplantat ist vollständig eingeeilt. Eine minimale Konkavität der Femuroberfläche lässt sich erahnen (weißer Pfeil). Die schwarzen Pfeile weisen auf den mit Biozement gefüllten Entnahmedefekt. B: Magnetresonanztomographie, T2-gewichtete 3D-DESS-Sequenz. Wie im konventionellen Röntgen ist das Transplantat auf Knochenebene nicht mehr abgrenzbar, zeigt aber einen muldenförmigen Defekt mit homogenem Übergang in die Umgebung. Der Transplantatknorpel hat in etwa die gleiche Signalintensität wie der ihn umgebende Knorpel, er ist jedoch inhomogener.

3.5.2 Histologische Befunde

Auch histologisch sind die Transplantate auf Knochenebene gut eingeehlt und nicht mehr abzugrenzen. Die Trabekelstruktur entspricht der Knochenmorphologie des umgebenden Femurkondylus'. Nur vereinzelt erscheinen die Trabekel noch verdickt und die Knochenmasse leicht erhöht.

Knorpelig füllt das Transplantat den Defekt in 75% (6 von 8) der Präparate gut aus. Das Oberflächenniveau des Transplantats entspricht dem Niveau der Umgebung, eine kongruente Gelenkoberfläche bleibt also gewahrt. Die Anfärbung der Matrix mit Toluidinblau zeigt die in jedem Präparat vorhandenen Glykosaminoglykane.

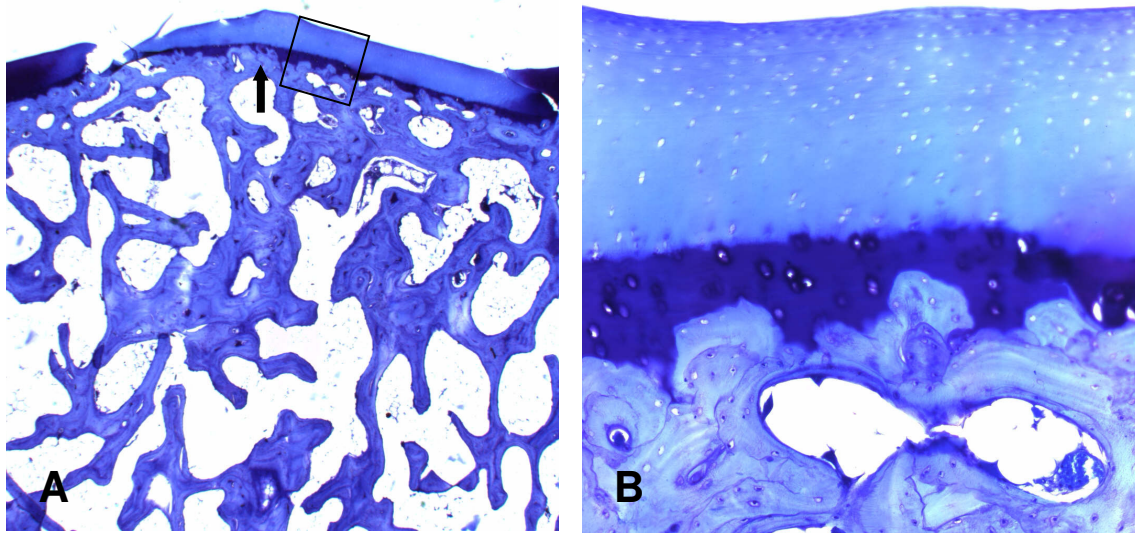


Abb. 27: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. Der Knick des Präparats ist artefaktbedingt (Pfeil, vgl. gleiches Präparat in Abb. 28). Der Zylinder wurde regelrecht versenkt und liegt seiner Umgebung eng an. Die Trabekelstruktur ist unauffällig und zeigt kaum Unterschiede zwischen dem eingesetzten Zylinder und dem Transplantatbett. Der transplantierte Knorpel ist strukturell gut erhalten und zeigt keine Fissuren. Im transplantierten Knorpel sind keine angefärbten Zellkerne zu erkennen, es zeigen sich nur leere Lakunen. Die Anfärbung der Matrix mit Toluidinblau ist im Vergleich zur Umgebung abgeschwächt. Paraffineinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 100-fach.

Allerdings lassen sich in 4 von 8 Kondylen nur wenige oder keine Zellkerne anfärben, es stellen sich lediglich leere Lakunen dar. Jeweils in diesen Bereichen ist auch die Anfärbarkeit mit Toluidinblau im Vergleich zur Umgebung herabgesetzt (s. Abb. 27). Vereinzelt zeigen sich in diesen Präparaten Fissuren im transplantierten Knorpel. In den immunhistologischen Färbungen zeigen sich keine Auffälligkeiten, die Verteilung von Kollagen Typ I und II entspricht in allen Präparaten den Verhältnissen bei nativem hyalinem Knorpel (s. Abb. 28).

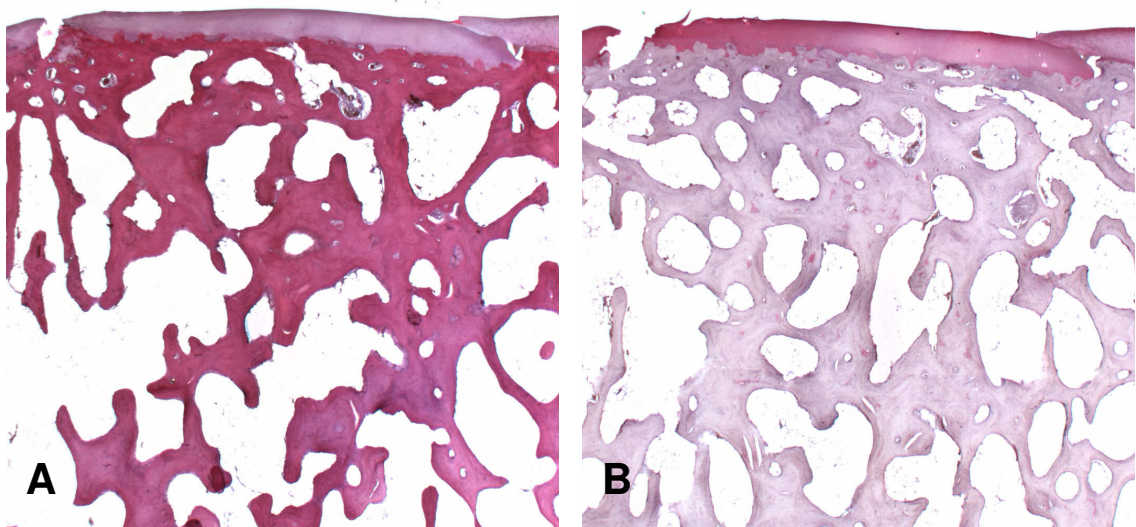


Abb. 28: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. Die immunhistologische Untersuchung zeigt ein physiologisches Färbeverhalten von Knorpel und Knochen. Der Knorpel des Transplantats und des umgebenden Femurkondylus' zeigen eine homogen kräftige Anfärbung für Kollagen II (B) und eine schwache Färbung für Kollagen I (A). Paraffineinbettung, immunhistologische Färbung für Kollagen I (A) und Kollagen II (B), Originalvergrößerung 12,5-fach.

2 Präparate zeigen einen Knorpel, der hyalinem Gelenkknorpel entspricht. Auch hier wurden die transplantierten Zylinder regelrecht versenkt und liegen auf Knochen- und Knorpelzebene ihrer Umgebung eng an. Der Transplantatknorpel füllt jeweils den Defekt optimal aus, am Transplantationsort sind keine Lücken oder Unregelmäßigkeiten der Gelenkoberfläche entstanden. Das

Oberflächenniveau des Transplantates entspricht dem Niveau der Umgebung, eine kongruente Gelenkoberfläche bleibt also gewahrt. Der Knorpel ist vital und enthält zahlreiche Chondrozyten in der für hyalinen Knorpel typischen Anordnung. Die Grundsubstanz wird als Ausdruck des Gehalts an Glykosaminoglykanen mit Toluidinblau angefärbt.

In einer der beiden Kondylen ist die Zahl der angefärbten Zellkerne in einer gelenkspaltnahen Zone des transplantierten Knorpels vermindert. Hier finden sich nur vereinzelt Chondrozyten, die zu Zellclustern zusammengelagert sind und von einer kräftig metachromatisch gefärbten Zone umgeben sind. Zwischen den Zellclustern ist die Anfärbbarkeit mit Toluidinblau in diesem Präparat abgeschwächt. Mit Ausnahme des direkt an den Defektrand grenzenden Bereichs entspricht der größte Teil des transplantierten Knorpels nativem hyalinem Knorpel. Hier zeigen sich eine physiologische Zellverteilung und eine kräftige Anfärbung der Matrix. Vereinzelt sind auch in diesem Bereich Chondrozytencluster zu beobachten.

Bei der anderen der beiden Kondylen entspricht der Knorpel schließlich in allen Charakteristika nativem hyalinem Gelenkknorpel (s. Abb. 29). Der transplantierte Knorpel enthält Chondrozyten in physiologischer Zahl und Anordnung. Die Matrix des Knorpels ist mit Toluidinblau kräftig angefärbt und zeigt keinen Unterschied zu dem Knorpel des Femurkondylus'. Im Gegensatz zu den anderen oben beschriebenen Präparaten ist es auch zu keinem Zellverlust im Übergangsbereich zwischen transplantiertem Knorpel und dem umgebenden ursprünglichen Gelenkknorpel gekommen. Am linken Rand des Bohrlochs zeigt sich bis unmittelbar an den Rand des Transplantats sowohl im Knorpel des Kondylus' als auch im Transplantatknorpel eine physiologische Zellstruktur. Am rechten Bohrlochrand sind nur die Zellen, die direkt an den Spaltraum zwischen Transplantatknorpel und Umgebung angrenzen, zu Chondrozytenclustern organisiert. Allerdings zeigt sich an der Gelenkoberfläche des Transplantatknorpels eine kleine Fissur, die von einer lokalen Abschwächung der Toluidinblauanfärbung umgeben ist. Die Struktur des Knorpels ist durch die Fissur zu diesem Zeitpunkt aber nicht beeinträchtigt.

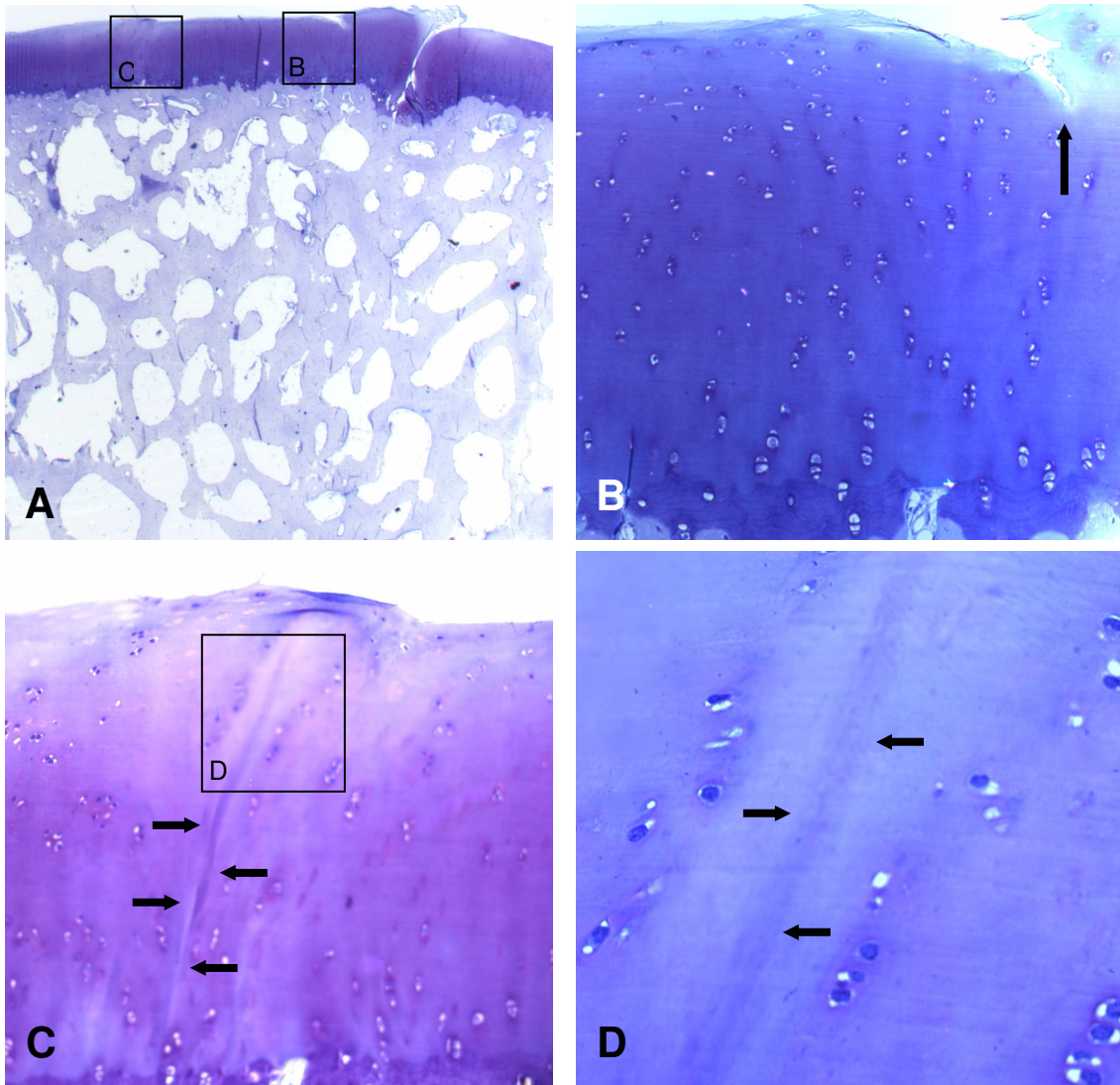


Abb. 29: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. Es besteht eine kongruente Gelenkoberfläche. Der Knorpel des Transplantats und des Kondylus' sind vital und zeigen mit Ausnahme einer Fissur an der Gelenkoberfläche (Pfeil) keine Veränderungen im Vergleich zu nativem hyalinem Knorpel. Knöchern ist das Transplantat gut eingeeilt. Es sind keine Inhomogenitäten der Trabekelstruktur erkennbar. C, D: Am Defektrand ist es zu einer lückenlosen Integration der Knorpelmatrix von Transplantat und umgebendem Kondylus gekommen (Pfeile). Die Grundsubstanz ist bis dicht an den Rand und auch im Übergang homogen mit Toluidinblau angefärbt. Auf beiden Seiten bis unmittelbar an den Defektrand sind Chondrozyten angefärbt. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B, C: 100-fach, D: 400-fach.

Die beiden bisher noch nicht beschriebenen Präparate zeigen schließlich im Bereich des transplantierten Knorpel-Knochen-Zylinders einen Knorpel, der durch tiefe Fissuren septiert ist. Der Knorpel ist vollständig zellfrei; die Anfärbbarkeit mit Toluidinblau ist deutlich reduziert (s. Abb. 30). Jedoch ist auch bei diesen 52-Wochen-Präparaten immunhistologisch kein pathologischer Befund zu erheben. Das immunhistologische Färbeverhalten entspricht nativem hyalinem Knorpel.

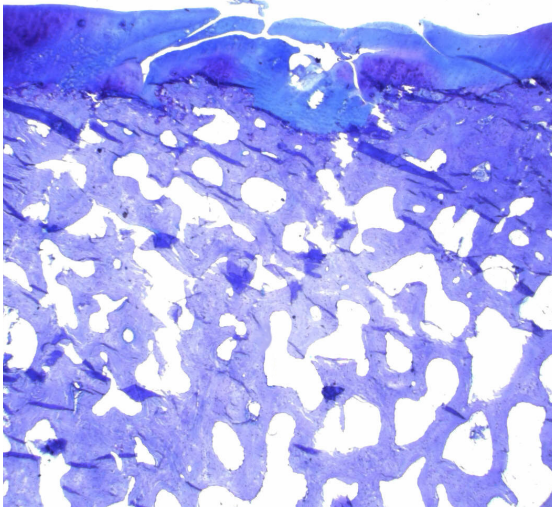


Abb. 30: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. Der transplantierte Knorpel ist von tiefen Fissuren durchzogen. Seine Anfärbbarkeit mit Toluidinblau ist abgeschwächt und es sind nur wenige Zellkerne angefärbt. Der Knorpel des umgebenden Kondylus zeigt ab einem gewissen Abstand vom Bohrloch keine Auffälligkeiten. Acrylateinbettung, Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung: 12,5-fach.

Der Knorpel des umgebenden Femurkondylus' ist vital und wird von diesen Veränderungen des Transplantatknorpels nicht in Mitleidenschaft gezogen. Bei diesen - wie auch bei allen anderen Präparaten der 52-Wochen Kohorte - sind Veränderungen im Sinne einer verringerten Zahl angefärbter Zellkerne und einer verminderten Anfärbbarkeit mit Toluidinblau nur in direkter Umgebung des Bohrlochs zu beobachten. Mit einer gewissen Entfernung zu dem Defekt entspricht der Kondylenknorpel nativem hyalinem Gelenknorpel. Hier spricht die kräftige Anfärbbarkeit mit Toluidinblau für einen hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen in der Grundsubstanz. Anzahl und Verteilung der

Chondrozyten entspricht in allen Präparaten den Verhältnissen bei nativem Gelenkknorpel. In einem Präparat zeigt sich diese physiologische Färbung und Zellverteilung bis unmittelbar an den Bohrlochrand (s. Abb. 29).

Betrachtet man den jeweiligen Spaltraum zwischen transplantiertem Knorpel und der Umgebung, so zeigen sich 52 Wochen nach der Transplantation bei 87,5% (7 von 8) der untersuchten Kniegelenke in unterschiedlicher Ausprägung Anzeichen einer Einheilung (s. Abb. 29C, 29D). Wie in den vorherigen Kohorten ist auch hier trotz der mechanischen Belastung bei der histologischen Präparation ein lückenloser Übergang der Knorpelanteile von Transplantat und Transplantatlager zu erkennen. Diese Verbindung kommt nur an den Defekträndern zustande, an denen ein direkter Kontakt der beiden Knorpelanteile vorliegt. So zeigt sich beispielsweise in Abb. 29A am linken Defektrand eine direkter Übergang der Knorpelanteile (Vergrößerung s. C, D) Am rechten Defektrand besteht ein größerer Spaltraum zwischen dem Knorpel des Transplantats und dem Knorpel des Kondylus'. Dort sind kein Anliegen der Knorpelanteile und keine Reaktion der Knorpelränder zu erkennen.

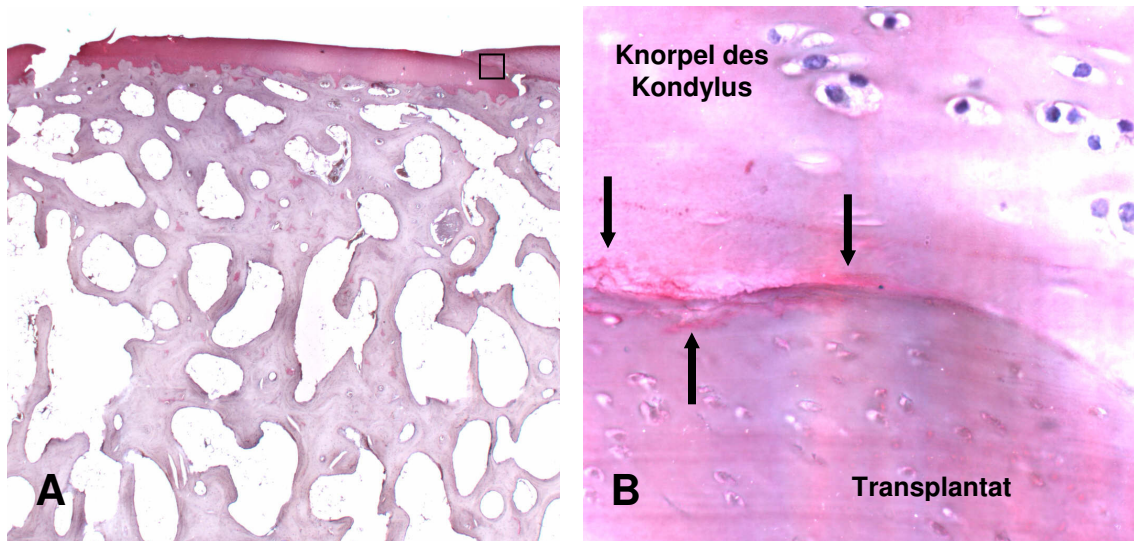


Abb. 31: Defekt 52 Wochen nach der Transplantation. Am rechten Defektrand liegt der transplantierte Knorpel dem Knorpel der Umgebung sicher an. Immunhistologisch lassen sich Kollagenfasern des Typs II an der Grenzlinie nachweisen, die noch kräftiger angefärbt sind als der umgebende Knorpel (Pfeile). Paraffineinbettung, immunhistologische Färbung für Kollagen II, Originalvergrößerung A: 12,5-fach, B: 400-fach. Die Immunhistologie mit einem gegen Kollagen I gerichteten Antikörper zeigt keine spezifische Anfärbung.

4. DISKUSSION

Bereits seit Hunderten von Jahren ist hyaliner Gelenkknorpel Gegenstand der Forschung. Vor über 250 Jahren stellte der Chirurg und Wissenschaftler WILLIAM HUNTER fest, dass einmal zerstörter Knorpel sich nie wieder erholen wird [83]. Diese Erkenntnis des 18. Jahrhunderts ist bis heute nicht widerlegt worden. Eine echte Regeneration eines Knorpeldefekts im Sinne einer Auffüllung des Defekts mit hyalinem Gelenkknorpel konnte postnatal in Säugetieren niemals beobachtet werden [16].

Klinisch müssen Gelenkknorpelschäden nicht mit Beschwerden verbunden sein. Sogar größere osteochondrale Schäden sind nicht zwangsläufig symptomatisch. Häufig führen aber Knorpelschäden zu akuten Schmerzen und Bewegungseinschränkungen des Gelenks, in schweren Fällen sogar zu chronischen Beschwerden [31]. Die Problematik der isolierten Knorpelläsion liegt jedoch nicht nur in der akuten Symptomatik, sondern vor allem in dem Risiko einer progredienten Degeneration des Gelenkknorpels [30,32,62,119,163,183]. Die Gefahr der Entwicklung einer Arthrose nach einer Knorpelverletzung konnte in zahlreichen epidemiologischen Studien nachgewiesen werden [45,67,94,108,158]. Knorpelschäden werden daher auch als „präarthrotische Deformität“ bezeichnet [57].

Die Wichtigkeit, eine suffiziente Therapie für Knorpeldefekte zu finden und damit eine Prävention der Entstehung einer Arthrose zu erreichen, wird durch die enormen volkswirtschaftlichen Folgen dieser Erkrankung zusätzlich unterstrichen. In den USA sind degenerative Knorpelveränderungen die zweithäufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit. JACKSON et al. rechnen damit, dass der größte Zuwachs an Patienten aller Erkrankungen bis 2020 in den Vereinigten Staaten die Zahl der Arthrose-Patienten sein wird. [90].

Daher wird seit vielen Jahren versucht, eine suffiziente Behandlung chondraler Defekte zu entwickeln. Ein optimales Therapieverfahren sollte dabei einer Reihe von Anforderungen gerecht werden:

1. Das den Knorpeldefekt füllende Gewebe darf sich in seinen funktionellen Eigenschaften nicht von physiologischem hyalinem Knorpel unterscheiden.
2. Das Reparaturgewebe muss langfristig im Defekt vorhanden bleiben und darf auch nach Jahren keine degenerativen Veränderungen aufweisen.
3. Klinisch muss der Patient beschwerdefrei werden und langfristig bleiben.
4. Die Therapie an sich darf zu keiner signifikanten Schädigung des noch gesunden Knorpels des Patienten führen.
5. Die Kosten der Therapie müssen ökonomisch tragbar sein.

Bei der Behandlung von Knorpeldefekten verfügt der Chirurg heute über eine große Auswahl verschiedener Therapieverfahren, die jeweils einige der genannten Anforderungen erfüllen. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, ein Therapieverfahren zu entwickeln, das allen Anforderungen vollständig gerecht wird. Insbesondere kann mit vielen dieser Techniken kein Reparaturgewebe erreicht werden, das funktionell hyalinem Knorpel gleichwertig ist. Eine optimale Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, wäre die Regeneration des nativen *hyalinen* Knorpels.

Das einzige derzeit in der Klinik eingesetzte Verfahren, das das Ziel einer Defektfüllung mit hyalinem Knorpel verfolgt, ist die autologe osteochondrale Transplantation. Trotz der weiten Verbreitung dieser Technik, gibt es nur wenige langfristig angelegte tierexperimentelle Studien über dieses Operationsverfahren. Die meisten Daten entstammen klinischen Studien und der histologischen Untersuchung bioptisch entnommenen Materials [4,5,9,81,107,123,161,185,188]. Tierexperimentelle Studien, insbesondere mit immunhistologischen Analysen, beinhalten bisher nur den Zeitraum von bis zu 6 Monaten nach der Transplantation [86,104,114,120,129,139,167]. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, den Heilungserfolg nach autologer osteochondraler Transplantation über den Verlauf eines Jahres hinweg zu untersuchen. Als Tiermodell wurde dafür das Göttinger Minipig ausgewählt.

4.1 Diskussion des Tiermodells

Versuche zur Knochen- und Knorpelheilung oder zur osteochondralen Transplantation an Tieren werden üblicherweise durchgeführt, um diese Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen. Dazu wurden bisher verschiedene Spezies verwendet. Allein durch die Verwendung verschiedener Tierspezies sind Arbeiten mit gleicher Zielsetzung aber nicht einmal untereinander vergleichbar, da Einflüsse der Tiergröße, der Stoffwechselrate, des Alters und des Knochenaufbaues beschrieben [58,97] oder anzunehmen sind. Eine große Zahl tierexperimenteller Untersuchungen zur Knorpelregeneration wird an Kleintiermodellen durchgeführt. Kleintiere zeigen jedoch mit ihrer hohen Stoffwechselrate eine große intrinsische Fähigkeit zur Selbstheilung [70]. Daher sollte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Anwendung am Menschen besonders kritisch hinterfragt werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse mit der Anwendung am Menschen zu erreichen, sollte einem Großtiermodell der Vorzug gegeben werden. Mit dem Minipig steht ein solches Tiermodell zur Verfügung, das bereits in zahlreichen Studien zur Heilung von Knorpeldefekten eingesetzt wurde [51,77,84,87,186]. Zwar stehen detaillierte Studien über den

Knorpelstoffwechsel dieser Spezies noch aus, ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Kollagenstruktur des Schweins der des humanen Knorpels im Vergleich mit anderen Tierspezies am stärksten ähnelt. Die Vergleichbarkeit ist auch größer als bei anderen Großtiermodellen, wie z. B. dem Schaf [97].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Für die Transplantation wurde unter Narkose mit Hilfe einer diamantbesetzten Hohlfräse und einer Stanze ein Defekt von 4,5 mm Durchmesser am medialen Femurkondylus geschaffen. Der gewichtstragende Bereich des medialen Kondylus' ist mit einer Häufigkeit von 32% aller Läsionen das Gebiet mit der größten Häufigkeit chondraler Defekte im Kniegelenk [82]. Auf die gleiche Weise wurde im patellaren Gleitlager ein Spenderzylinder (Durchmesser 4,6 mm) entnommen, der anschließend durch „press-fit“ Technik in den Defekt am Kondylus versenkt wurde. Die Fräsungen erfolgten unter Kühlung durch eine an die Bohrpistole angeschlossene Druckinfusion mit NaCl-Lösung.

4.2.1 Knöcherne Einheilung des Transplantats

Bereits 2 Wochen nach der Operation kann histologisch die beginnende Osteointegration des Transplantatzylinders nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist es jedoch noch nicht zu einer stabilen Verankerung des Zylinders im Defekt gekommen. Nur vereinzelt bestehen bereits knöcherne Brücken zwischen Transplantat und Transplantatbett. Der Knorpel-Knochen-Zylinder ist in allen Präparaten regelrecht versenkt. Trotz der noch nicht belastbaren Verbindung zu seiner Umgebung hat der eingebrachte Zylinder auch nach 2 Wochen voller Belastung des Gelenks die angestrebte Position im Defekt beibehalten. Die Verankerung mittels press-fit Technik kann also als erfolgreich bewertet werden. Der geringe Größenunterschied zwischen eingesetztem Knochenzylinder und dem Bohrloch hat für eine sichere Verankerung des Transplantats gesorgt. Lediglich in einem Präparat ist der transplantierte Zylinder etwas seitlich verkippt und abgesackt (s. S. 47).

Nach 8 Wochen ist die knöcherne Integration weit fortgeschritten. Radiologisch ist der Knochenzylinder nur noch schwer abzugrenzen, ein Knochenödem ist nicht mehr vorhanden. Histologisch zeigt sich, dass das Transplantat inzwischen stabil integriert ist, auch wenn eine homogene Trabekelstruktur noch nicht vorhanden ist. Das Remodeling der Trabekelstruktur durch Osteoblasten und Osteoklasten ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet. In der 26-Wochen-Kohorte kann schließlich die Osteointegration des Transplantats als abgeschlossen bewertet werden. Weder radiologisch noch histologisch kann zu diesem Zeitpunkt oder nach 52 Wochen das Transplantat auf Knochenebene abgegrenzt werden.

Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen anderer Autoren. WAGNER beschrieb schon 1972 in einer klinischen Studie, dass röntgenologisch „immer eine gute Einheilung“ nachweisbar war [184]. Auch BUCKWALTER schließt aus den bisherigen klinischen Erfahrungen, dass der knöcherne Teil des Transplantats gut einheilen kann [28]. Andere tierexperimentelle Studien bestätigen die erfolgreiche knöcherne Integration des Transplantatzylinders [103,104,167].

Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist eine erfolgreiche Osteointegration nach erfolgter autologer osteochondraler Transplantation als sehr wahrscheinlich zu bewerten. Solange Defekt- und Transplantatgröße richtig aufeinander abgestimmt sind, kann die Verankerung mittels press-fit Technik einen stabilen Halt des eingesetzten Zylinders im Bohrloch und einen sicheren Einbau in das knöcherne Transplantatbett gewährleisten.

4.2.2 Knorpelige Einheilung des Transplantats

2 Wochen nach der Operation ist der transplantierte Knorpel in allen Präparaten durch eine full-thickness Spalte von seiner Umgebung getrennt. Es sind keine Anzeichen einer Einheilung des Knorpels zu erkennen. Eine Integration des knorpeligen Transplantats ist aber auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu erwarten. Nur in einem Teil der bisher veröffentlichten Arbeiten wird überhaupt eine Verbindung des Knorpels zum Transplantatlager während des gesamten

Studienverlaufs beschrieben. Auch in den tierexperimentellen Studien, in denen eine Integration des Knorpels beobachtet werden konnte, beschreiben die meisten Autoren diese erst mit einem postoperativen Abstand von 12 bis 26 Wochen (s. u.).

In der vorliegenden Untersuchung konnten 8 Wochen postoperativ erste Anzeichen einer Integration des Knorpels beobachtet werden. Dabei war es bei einem Präparat zu einer Füllung des Spaltes am Defektrand durch Faserknorpel gekommen. Diese Gewebebildung entspricht dem Heilungsverhalten nach einer Mosaikplastik-Operation. Bei diesem Operationsverfahren werden mehrere kleine Knorpel-Knochen-Zylinder nach Art eines Mosaiks in den Defekt transplantiert [76]. Zwischen den Zylindern bildet sich auf Knorpelzebene Faserknorpel, so dass eine homogene Gelenkoberfläche erreicht wird. Die dazu nötigen mesenchymalen Stammzellen stammen aus dem eröffneten Markraum [66,92].

Zwei (von 6) Präparate der 8-Wochen-Kohorte zeigten dagegen den Beginn einer direkten Einheilung der einander anliegenden Anteile des Knorpels des Femurkondylus' und des eingesetzten Transplantats (s. S. 56 Abb. 18B). Die entstandene Verbindung war jedoch noch so instabil, dass sie bei der histologischen Präparation nur schwer erhalten werden konnte. Dennoch konnten an der ehemaligen Verbindungsstelle der beiden Knorpelanteile Typ II Kollagenfasern nachgewiesen werden (s. S. 56 Abb. 18D). Es ist zu vermuten, dass diese Fasern den Spalt zwischen den Knorpelanteilen überbrückt haben und hier eine gegenseitige Integration der Grundsubstanzen der beiden Knorpelanteile begonnen hatte.

Diese Form der Einheilung setzte sich im Laufe der Zeit fort, so dass bereits 26 Wochen nach der Operation in allen histologischen Präparaten aufgrund des Übergangs vom transplantierten Knorpel in den Knorpel des umgebenden Kondylus' eine sichere Einheilung des transplantierten Knorpels anzunehmen war. Es zeigte sich ein fließender Übergang zwischen den Grundsubstanzen der beiden Knorpelanteile. In einigen Präparaten war sogar die Festlegung einer genauen Grenze erst auf den zweiten Blick möglich (s. S. 61 Abb. 23).

Auch die 52-Wochen Kohorte zeigte bei 7 von 8 Präparaten eine derartige Integration der Matrix von Transplantatknorpel und dem Knorpel des umgebenden Kondylus.

Andere Veröffentlichungen zeigen kein einheitliches Bild vom Einheilungsverhalten des Transplantatknorpels. Während einige Autoren eine Einheilung entsprechend der in dieser Arbeit beobachteten Integration beschreiben, konnten in vielen anderen Studien keine Veränderungen an den Rändern des transplantierten Knorpels nachgewiesen werden.

Bereits bei einer Standzeit von 12 Wochen konnten NAM et al. in 50% (3 von 6) ihrer Präparate im histologischen Schnitt eine Einbindung des transplantierten Knorpels in den angrenzenden Knorpel an einer Seite des transplantierten Zylinders zeigen [129]. Allerdings wurden die Operationen an Kaninchen durchgeführt. Bei diesen Tieren kann aufgrund des schnelleren Stoffwechsels von Kleintieren von einem beschleunigten Heilungsprozess ausgegangen werden [70]. Auch MAKINO et al. untersuchten das Einheilungsverhalten autologer osteochondraler Transplantate an Kaninchen. Nach 24 Wochen hatte sich in den Präparaten im histologischen Bild an beiden Seiten eine Verbindung zwischen dem Knorpel des Transplantats und des Transplantatbetts ausgebildet [113].

Dass eine Integration des eingebrachten Knorpels in den umgebenden Knorpel des Transplantatlagers auch bei Verwendung eines Großtiermodells möglich ist, konnten MARUYAMA et al. bei ihren Untersuchungen an Miniaturschweinen zeigen. Bereits 4 Wochen nach der Operation konnten die Autoren im histologischen Bild an durchschnittlich einer Seite des eingesetzten Zylinders eine Integration des Knorpels beobachten [120].

LANE et al. transplantierten autologe Knorpel-Knochen-Zylinder in den medialen Femurkondylus von 6 Ziegen. In der histologischen Auswertung konnten die Autoren jedoch keine Verbindung des transplantierten Knorpels zum Knorpel des umgebenden Femurkondylus beobachten. Auch nach der maximalen Standzeit der Tiere von 12 Wochen bestand hier eine full-thickness

Spalte, die das Transplantat auf Knorpelzebene vom umgebenden Transplantatbett trennte [104]. Hier ist allerdings zu vermuten, dass die Standzeit der operierten Ziegen für eine sichere Einheilung zu kurz war. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde eine sichere Einheilung des Knorpels erst nach 26 Wochen beobachtet.

SIEBERT et al. führten autologe osteochondrale Transplantationen an den Kniegelenken von 20 Schafen durch. Dabei konnten die Autoren auch nach einer Standzeit von 26 Wochen keine Einheilung des Knorpels erkennen [167]. Die Autoren postulieren aus diesem Grund, dass „auch mit diesem Verfahren keine dem normalen hyalinen Knorpel gleichwertige Gelenkflächenrekonstruktion gelungen ist“. Diese Aussage muss jedoch aus Sicht der hier vorgestellten Ergebnisse relativiert werden. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist zu vermuten, dass eine Einheilung des Transplantats auch auf Knorpelzebene möglich ist. Auch die Ansicht, eine Integration des Knorpels komme nur „als faserknorpelige Narbe“ zustande [187], kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Angesichts der verschiedenen Studien, bei denen keine knorpelige Einheilung beobachtet werden konnte, stellt sich die Frage nach den Voraussetzungen einer Einheilung durch Integration der Grundsubstanz. Entscheidend für den Erfolg dieser Einheilungsform scheint der optimale Kontakt des transplantierten Knorpels zu seiner knorpeligen Umgebung zu sein. Da es nicht zu einer eigentlichen Gewebeneubildung kommt, ist zu vermuten, dass die Knorpelanteile aneinander direkt anliegen müssen. Das vorgestellte 52-Wochen-Präparat (s. S. 68 Abb. 29) zeigt am linken Transplantatrand eine Einheilung in der beschriebenen Form. Am rechten Rand des Transplantats besteht jedoch ein geringer Abstand zum Knorpel des Transplantatbetts. Hier ist eine Einheilung trotz der Standzeit von 52 Wochen nicht erfolgt. Auch in dem beschriebenen 8-Wochen-Präparat (s. S. 56 Abb. 18A) kann beobachtet werden, dass eine Einheilung nur in dem gelenkspaltnahen Anteil des Knorpels erfolgte, der offenbar postoperativ einen direkten Kontakt zwischen den beiden Knorpelanteilen aufwies. Gelenkspaltfern besteht jedoch ein gewisser Abstand

zwischen den Knorpelanteilen und es ist hier 8 Wochen nach der Operation noch nicht zum Beginn einer Einheilung gekommen.

4.2.3 Erhalt der physiologischen Knorpelstruktur

Entscheidend für den langfristigen Therapieerfolg ist neben dem Einheilungsverhalten primär das dauerhafte Überleben des Transplantats. Nur wenn der transplantierte Knorpel dauerhaft als hyaliner Knorpel erhalten bleibt, kann die Therapie als erfolgreich bewertet werden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur autologen osteochondralen Transplantation zeichnen im Durchschnitt ein positives Bild des Heilungserfolges. Oft zeigt sich, dass der transplantierte Knorpel über längere Zeit vital erhalten bleiben kann, ohne dass sich ausgeprägte degenerative Veränderungen beobachten lassen. DEGREIF beschreibt die bisherigen Ergebnisse als „sowohl funktionell als auch histologisch zufrieden stellend“ [52].

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein dauerhafter Therapieerfolg mit der autologen osteochondralen Transplantation möglich ist. Allerdings zeigen sich in einigen Präparaten auch degenerative Veränderungen des transplantierten Knorpels.

2 Wochen postoperativ ist der Knorpel in allen Präparaten gut erhalten, lediglich in einem der Präparate zeigt sich eine verminderte Anzahl angefärbter Zellkerne und in der Toluidinblau-Färbung eine geringere Konzentration der Glykosaminoglykane. Auch nach 8 Wochen ist der transplantierte Knorpel mit einer Ausnahme strukturell gut erhalten und füllt den Defekt sicher aus. Allerdings zeigt sich in einigen Präparaten eine Verminderung oder sogar die Abwesenheit vitaler Knorpelzellen. Da damit auch der Turnover der Matrixkomponenten eingeschränkt ist, wird in der Toluidinblau-Färbung eine verminderte Konzentration der Glykosaminoglykane in der Grundsubstanz sichtbar. Die Verteilung der Kollagene I und II entspricht jedoch den Verhältnissen bei physiologischem hyalinem Knorpel. Ein Präparat der 8-Wochen- und 2 Präparate der 26-Wochen-Kohorte zeigen deutliche

degenerative Veränderungen mit tiefen Fissuren des Knorpels. Die anderen Präparate der 26-Wochen-Kohorte sind vital und zeigen einen Knorpel, der den Defekt gut ausfüllt und mit dem Knorpel des umgebenden Kondylus' verwachsen ist. Nur in einigen Abschnitten ist auch hier die beschriebene Zellarmut zu sehen. Die 52-Wochen-Präparate verdeutlichen die Bandbreite der möglichen Operationsergebnisse. 25% (2 von 8) der Präparate zeigen Knorpel, der von tiefen Fissuren durchzogen und deutlich degenerativ verändert ist. In 50% der Kondylen ist der transplantierte Knorpel gut erhalten und füllt den Defekt sicher aus. Er zeigt allerdings Auffälligkeiten im Sinne einer geringen Zahl angefärbter Zellkerne und einer abgeschwächten Anfärbbarkeit mit Toluidinblau. Schließlich zeigen 25% (2 von 8) der Präparate einen vollständig vitalen Transplantatknorpel, der den Charakteristika nativen hyalinen Gelenkknorpels entspricht.

Trotz der in einigen Präparaten vorhandenen Veränderungen des transplantierten Knorpels in den Standardfärbungen, ist die Immunhistologie in allen Kohorten unauffällig. Die beschriebenen Veränderungen haben also bis zum Ende der Studie nicht zu einer nachweisbaren Veränderung in der Konzentration der Kollagene I und II geführt.

Der Knorpel des das Transplantat umgebenden Femurkondylus zeigt über den gesamten Verlauf der Studie keine signifikanten Zeichen einer Degeneration. Auch noch nach 52 Wochen ist dieser Knorpel vital und entspricht histologisch und immunhistologisch nativem Gelenkknorpel.

Viele der bisher veröffentlichten tierexperimentellen Untersuchungen stammen aus den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts. So führten 1979 HESSE et al. autologe Knorpel-Knochen-Transplantationen am medialen Femurkondylus von 45 Schafen durch [78]. Nach einer Standzeit der Tiere von bis zu 2 Jahren untersuchten die Autoren die Transplantate licht- und rasterelektronenmikroskopisch. Diese unterschieden sich dabei nicht von physiologischem hyalinem Knorpel und die Vitalität und Syntheseleistung der transplantierten Chondrozyten wiesen keine Auffälligkeiten auf.

Auch bereits 1972 hatte STÖRIG aus seinen Untersuchungen am Kaninchen und am Hund geschlossen, dass „ein umschriebenes körpereigenes Gelenkknorpeltransplantat ... hyalin erhalten bleiben kann“ [178].

30 Jahre später veröffentlichten MARUYAMA et al. ihre Ergebnisse über die autologe osteochondrale Transplantation an den Kniegelenken von Minipigs [120]. Wie in vielen aktuellen tierexperimentellen Untersuchungen ist die postoperative Standzeit der Tiere in dieser Studie verhältnismäßig kurz. Die in dieser Arbeit verwendeten Miniaturschweine wurden bereits nach einer Standzeit von 4 Wochen getötet und untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Transplantate histologisch keine Auffälligkeiten und unterschieden sich nicht vom Knorpel des umgebenden Femurkondylus.

LANE et al. transplantierten autologe Knorpel-Knochen-Zylinder in den medialen Femurkondylus von 6 Ziegen. 12 Wochen später konnten die Autoren keine makroskopischen oder histologischen Veränderungen des transplantierten Knorpels beobachten [104]. Ebenso berichten NAM et al. über entsprechend gute histologische Ergebnisse bei der Operation an den medialen Femurkondylen von Kaninchen. Auch hier betrug die Standzeit der Tiere maximal 12 Wochen, und es zeigte sich histologisch keine Degeneration des Transplantatknorpels [129].

Es gibt jedoch Untersuchungen, die zwar grundsätzlich die positive Einschätzung der autologen osteochondralen Transplantation unterstützen. Jedoch werden durch diese Arbeiten Zweifel insbesondere bezüglich der langfristigen Perspektive des transplantierten Knorpels verursacht, die eine allzu euphorische Beurteilung dieses Operationsverfahrens in Frage stellen.

MAKINO et al. untersuchten bis zu 24 Wochen postoperativ autologe osteochondrale Transplantate in Kaninchen [113]. Sie beobachteten dabei insbesondere bei einer längeren Standzeit der Tiere eine Dickenzunahme des transplantierten Knorpels, eine stärkere Anfärbung der Matrix mit Safranin-O sowie eine Erhöhung der Zelldichte und Ausbildung von Chondrozytenclustern. Ob der transplantierte Knorpel nach einem längeren Beobachtungszeitraum degeneriert oder sich physiologischer hyaliner Knorpel bildet, bleibt offen.

Eine der vorliegenden Arbeit ähnliche Studie wurde 2001 von SIEBERT et al. durchgeführt [167]. Allerdings wurden die Ergebnisse der an Schafen durchgeführten Transplantationen bereits nach einer Standzeit von maximal 6 Monaten untersucht. Immunhistologische Analysen wurden nicht durchgeführt. SIEBERT et al. dokumentierten bereits 3 Monate nach der Operation eine vollständige Osteointegration des Transplantats. Wie bereits oben beschrieben heilte das Transplantat in dieser Studie dagegen bei keinem der Tiere knorpelig in seine Umgebung ein. Dies wirft für die Autoren Fragen bezüglich der biomechanischen Eigenschaften und der Langzeitergebnisse dieses Operationsverfahrens auf. Die Sorge bezüglich einer möglichen Verschlechterung der Ergebnisse bei Langzeituntersuchungen wird insbesondere durch die Tatsache gestützt, dass bei einigen Präparaten dieser Studie eine Auffaserung der Transplantatoberfläche für eine Degeneration des Knorpels spricht [167].

Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Befürchtung der fehlenden knorpeligen Einheilung widerlegt haben, unterstreichen die hier beschriebenen strukturellen Veränderungen des transplantierten Knorpels die von SIEBERT et al. geäußerten Bedenken bezüglich einer langfristigen Verschlechterung des Zustands des Transplantatknorpels. So konnten in beiden Studien in einzelnen Präparaten tiefe Fissuren des transplantierten Knorpels beobachtet werden. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Fissuren auch nach 52 Wochen noch bestehen und die Struktur einzelner Präparate gefährden können.

Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass auch noch nach einem Jahr in einem Großteil der Präparate der transplantierte Knorpel eine sichere Defektfüllung gewährleistet. Dieser Erfolg der osteochondralen Transplantation entspricht auch der klinischen Erfahrung und bestätigt sich in zahlreichen klinischen Studien. MEENEN und RISCHKE führten osteochondrale Transplantationen an 52 Patienten mit Knorpeldefekten durch. 24 Monate nach der Operation konnten die Ergebnisse aller Patienten mit traumatisch bedingten oder durch Osteochondrosis dissecans verursachten Knorpelschäden als gut

oder sehr gut eingestuft werden. 76,9% der Patienten, bei denen präoperativ eine Arthrose diagnostiziert worden war, hatten gute oder sehr gute Ergebnisse [123]. WANG führte an 15 Patienten autologe osteochondrale Transplantationen durch. Nach einer Follow-up Zeit von 2 – 4 Jahren stufte er das Ergebnis von 80% der Patienten als gut oder sehr gut ein [185]. Ebenso berichten andere Autoren über ähnlich gute klinische Ergebnisse [4,5,41,101,121,161,188].

Auch LAPRELL führte erfolgreiche osteochondrale Transplantationen an 35 Patienten durch. Er stellte jedoch fest, dass nach einer durchschnittlichen Follow-up Zeit von 8,1 Jahren 12 Patienten radiologische Zeichen einer Arthrose entwickelt hatten und schloss daraus, dass dieses Operationsverfahren zwar die Gelenkfunktion verbessert, die Entstehung einer Arthrose aber nicht verhindern kann [107].

Zusammenfassend führen sowohl die Mehrzahl der tierexperimentellen als auch der klinischen Studien zu einer insgesamt positiven Bewertung der autologen osteochondralen Transplantation. Diese Bewertung wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Allerdings zeigen sich hier in einigen Präparaten degenerative Veränderungen des transplantierten Knorpels, die den Langzeit-Erfolg dieser Operationsmethode in Frage stellen könnten. Ebenso verursachen einzelne Studien anderer Autoren Zweifel am langfristigen Erfolg dieses Therapieverfahrens. Es stellt sich die Frage, welche Gründe für die weniger positiven Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu vielen anderen Studien ausschlaggebend sind.

4.3 Diskussion des Operationsverfahrens

Die verwendeten Instrumente der Firma medArtis wurden für den Einsatz am menschlichen Patienten entwickelt. Die Größe des Kniegelenks des Minipigs ist jedoch ungefähr vierfach geringer als das entsprechende Operationsgebiet am Menschen. Dieses Missverhältnis zwischen den Größen der Instrumente und der anatomischen Struktur des Tieres führte zu einer deutlich erhöhten Anforderung an den Operateur. Dadurch bedingte Fehler während der Operation könnten zu der Entstehung der beschriebenen degenerativen Veränderungen beigetragen haben.

Für die Transplantation kann die Entnahme des Spenderzylinders mit Hilfe einer diamantbesetzten Hohlfräse oder durch den Einsatz eines Rundmeißels erfolgen. Die letztere Technik findet v. a. bei der Durchführung einer Mosaikplastik Verwendung, bei der der Defekt durch eine Vielzahl deutlich kleinerer Spenderzylinder nach Art eines Mosaiks gefüllt wird [72,73,75,76,92,99]. Bei der Transplantation einzelner osteochondraler Zylinder entnehmen einige Autoren dagegen das Transplantat wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer gekühlten Hohlfräse [80,81,107,123,167], andere Autoren verwenden auch hier einen Hohlmeißel [4,12,161].

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Entnahmetechniken liegt in der starken Hitzeentwicklung beim Einsatz der Fräsen. Um eine Schädigung des Knorpels durch die hohe Temperatur zu verhindern, werden die Fräsen daher während des Einsatzes konstant gekühlt. Allerdings stellt sich die Frage, ob die eingesetzte Kühlung in der Praxis Hitzeschäden suffizient verhindern kann. Insbesondere bei *kleinen* Knorpel-Knochen-Zylindern besteht die Gefahr, dass sich trotz Kühlung Hitze innerhalb der Hohlfräse anstaut und zu einer Schädigung der Chondrozyten führt. Studien haben bereits nachgewiesen, dass Knorpel sensibel auf eine Hitzebelastung reagiert. So konnten YE et al. zeigen, dass ein Hitzeschock von 48 °C in vitro zur Apoptose von Chondrozyten führt und die Synthese von Proteoglykanen unterdrückt wird [189]. PAULSEN zeigte

bereits 1976, dass der Einsatz von Fräsen ohne suffiziente Kühlung zu einer Schädigung des Knorpels führt [138].

Für den Einsatz am Menschen stellen MEENEN et al. die Indikation für eine Transplantation ab einer Läsionsfläche von 1 cm² [123], entsprechend einem Durchmesser des Transplantatzylinders von ca. 11 mm. Aufgrund der deutlich kleineren anatomischen Verhältnisse am Minipig ist eine Transplantation von Zylindern dieser Größe nur schwer möglich und birgt das Risiko operationsbedingter Fehler. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Zylinder mit einem Durchmesser von 4,5 mm transplantiert. Würde die eingesetzte Kühlung für Zylinder dieser Größe keinen sicheren Abtransport der während des Fräsens entstehenden Hitze gewährleisten, bestünde die Gefahr, dass der Knorpel großflächig geschädigt wird.

Falls die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Veränderungen des transplantierten Knorpels durch Hitze verursacht worden sind, so ist anzunehmen, dass die Belastung des Knorpels an den Rändern des Transplantats in direkter Umgebung der Fräse größer ist als in der Transplantatmitte. Bei der histologischen Auswertung zeigt sich, dass in denjenigen Präparaten, die eine deutlich verminderte Zahl angefärbter Zellkerne aufweisen, die noch vorhandenen Zellkerne nur in der Transplantatmitte vorhanden sind (s. S. 55 Abb. 17) – also dort, wo der Abstand zur Fräse am größten ist.

Der Knorpel des den Defekt umgebenden Femurkondylus zeigt signifikante degenerative Veränderungen ausschließlich in unmittelbarer Nähe des Bohrlochs. Davon abgesehen ist der Knorpel des Kondylus in allen Präparaten vital. Es ist davon auszugehen, dass es in der äußeren Umgebung des Transplantats zu keinem Hitzaufstau kommen konnte und die eingesetzte Kühlung die Wärme in diesem Bereich suffizient abführen konnte.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie versuchten EVANS et al. die Frage nach der besten Entnahmetechnik für osteochondrale Zylinder zu beantworten. Die

Autoren untersuchten dabei die durch Hohlfräsen bzw. Hohlstößel verursachten Schäden am Transplantatknorpel. Die entnommenen Zylinder hatten einen Durchmesser von 2,7 mm und 4,5 mm, was der Zylindergröße in der vorliegenden Studie entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Entnahme durch Hohlfräsen zu einer signifikant stärkeren Schädigung des Knorpels und einer deutlichen Abnahme der Zahl angefärbter Chondrozyten führt. EVANS et al. schließen aus ihren Ergebnissen, dass eine Entnahme osteochondraler Zylinder künftig durch Hohlstößel erfolgen sollte [60].

Auch wenn in der vorliegenden Studie kein gezielter Vergleich zwischen den beiden Entnahmeverfahren erfolgte, stützen die gewonnenen Ergebnisse die Aussagen von EVANS et al. Zumindest bei der Transplantation kleinerer Zylinder mit einem Durchmesser unter 10 mm scheint die Entnahme mit Hilfe einer Hohlfräse zu einer Schädigung des Knorpels zu führen. Bei Entnahme größerer Zylinder ist aufgrund des klinischen Erfolges dieser Methode anzunehmen, dass hier eine suffiziente Kühlung gewährleistet ist.

4.4 Diskussion alternativer Therapieverfahren

Die autologe osteochondrale Transplantation erfüllt einige Punkte der eingangs beschriebenen Anforderungen an ein optimales Therapieverfahren für chondrale Defekte nicht. So wird durch die Entnahme des Spenderzylinders in gesundem Knorpel ein Defekt geschaffen, der als potentieller Ausgangspunkt der Entstehung von Arthrose bewertet werden muss. Auch die hier beschriebenen Veränderungen des transplantierten Knorpels zeigen, dass der langfristige Erhalt des hyalinen Knorpels nicht als sicher angenommen werden kann. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eines der derzeit klinisch eingesetzten alternativen Therapieverfahren bessere Erfolge verspricht.

Die Gelenklavage und das bereits 1941 von MAGNUSON beschriebene Débridement [112] gehören zu den ältesten Behandlungstechniken. Bei einem Vergleich der beiden Therapieansätze untereinander konnten CHANG et al. für die meisten Indikationen keinen Vorteil des deutlich invasiveren Débridements

erkennen [40]. Beide Verfahren verfolgen einen rein symptomatischen Ansatz, der eigentliche Knorpelschaden wird nicht therapiert [61,66]. Die eingangs aufgeführten Anforderungen an eine Therapie werden also in zentralen Punkten nicht erfüllt. Dennoch werden diese arthroskopischen Interventionen verbreitet eingesetzt. In mehreren klinischen Studien konnte zumindest bei einem Teil der Patienten eine über Jahre anhaltende Besserung der Beschwerden beobachtet werden [6,53,91]. Allerdings handelt es sich bei diesen Untersuchungen nicht um Placebo-kontrollierte Studien. Vor kurzem veröffentlichten MOSELEY et al. im New England Journal of Medicine jedoch eine Studie, in der 180 an Arthrose erkrankte Patienten entweder mit einem arthroskopischen Débridement und einer Lavage therapiert worden sind, oder lediglich eine Placebo-Operation durchgeführt worden ist. Dabei konnte kein Unterschied im Outcome zwischen Therapie und Placebo-Operation gefunden werden [127].

Bei der Pridie-Bohrung [146] und der von STEADMAN et al. entwickelten Microfracture-Technik [175-177] kommt es nach einer Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle zu einer Einblutung in den Defekt und damit zur Einleitung einer Heilungsreaktion. Im Gegensatz zu den beschriebenen rein symptomatischen Verfahren wird damit die Füllung des Defekts durch ein Reparaturgewebe erreicht. Histologisch wird das Reparaturgewebe von einigen Autoren als faserknorpelig bis bindegewebig beschrieben [17,165]. STEADMAN et al. beobachteten eine Defektfüllung mit einer Mischung aus Faserknorpel und hyalinem Knorpel [177]. Dies wirft die Frage nach der langfristigen Stabilität des – im Vergleich zum hyalinen Gelenkknorpel – mechanisch minderwertigen Faserknorpels auf. Einige klinische Follow-up Studien zeigen allerdings eine deutliche Besserung der Beschwerden [11,174], darunter auch eine von STEADMAN et al. durchgeführte Untersuchung an 1200 Patienten mit einem Follow-up von bis zu 7 Jahren nach der Operation [177]. Andere Studien zeigen dagegen keine Besserung des Patienten oder sogar eine Symptomverschlechterung [31].

Die Transplantation von Periost bzw. Perichondrium in Knorpeldefekte nutzt die Fähigkeit dieser Gewebe zur Chondrogenese [34,155]. Der entstehende

Knorpel wird von einigen Autoren als hyalinartig beschrieben [133,151,154]. Einige klinische Studien zeigen eine signifikante Besserung der Symptomatik nach der Transplantation [24,79,111]. Andere Studien zeigen dagegen weniger gute Ergebnisse. Bei einer Follow-up Untersuchung 6-9 Jahre nach einer Periosttransplantation bezeichnen ANGERMANN et al. nur 2 von 14 untersuchten Patienten als schmerzfrei. Der entstandene Knorpel wird in 10 Fällen als nicht hyalinartig beschrieben [2]. Von 88 durchschnittlich 52 Monate nach einer Perichondriumtransplantation nachuntersuchten Patienten bewerteten BOUWMEESTER et al. bei 55% den Heilungserfolg als schlecht. Nur in 38% der Patienten wurde das Ergebnis als gut eingeschätzt [15]. Bei einem Vergleich zwischen dem Aufbohren der subchondralen Knochenlamelle und der deutlich aufwändigeren Transplantation von Perichondrium konnte in einem Nachuntersuchungszeitraum von 10 Jahren kein signifikanter Unterschied im Therapieerfolg erkannt werden [14]. Trotz vielversprechender erster Ergebnisse stellt die Transplantation von Periost oder Perichondrium daher nicht den erhofften Durchbruch in der Therapie von Knorpeldefekten dar.

Der Durchbruch schien 1994 erreicht, als BRITTBERG et al. in einem viel beachteten Artikel die ersten klinischen Ergebnisse der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) vorstellte [21]. Bei dieser Technik werden in vitro vermehrte autologe Knorpelzellen unter einen auf den Knorpeldefekt genähten Periostlappen gespritzt. Die guten Ergebnisse führten zu einem außerordentlich großen und positiven Echo in der Laienpresse („The New York Times“, „The Boston Globe“, jew. 6.10.1994). Die chirurgische Fachwelt wies jedoch zunächst auf die wissenschaftlichen Mängel der Studie wie beispielsweise das Fehlen einer Vergleichsgruppe oder den kurzen Follow-up Zeitraum von 2 Jahren hin [63]. Die in den darauf folgenden Jahren veröffentlichten Studien zeichneten kein einheitliches Bild. BRIGGS et al. erreichten bei 8 von 14 Patienten durch autologe Chondrozytentransplantation eine Defektfüllung mit hyalinem Knorpel, bei 3 Patienten mit Faserknorpel [19]. Auch andere Autoren beschrieben eine gute Defektfüllung, bei einem großen Teil der therapierten Defekte bildete sich jedoch zumindest anteilsweise

Faserknorpel im Defekt. Die Möglichkeit zur Bildung von hyalinartigem Knorpel wird jedoch bestätigt [150,152,153]. PETERSON et al. veröffentlichten eine klinische Studie an 101 Patienten mit einem Follow-up von 2 bis 9 Jahren. Die Ergebnisse von 92% der Patienten mit isolierten Knorpeldefekten des Femurkondylus' wurden dabei klinisch als gut oder sehr gut bewertet [143]. Erggelet et al. stellten eine internationale Studie vor, in der die Ergebnisse von 1051 mit einer autologen Chondrozytentransplantation behandelten Patienten untersucht werden. Bei 85% der Patienten konnte bei einem Nachuntersuchungszeitraum von bis zu 36 Monaten eine Besserung der Symptomatik erreicht werden [59]. Auch die Untersuchungen anderer Autoren zeigen gute klinische Ergebnisse [20,22,69,126,141,142]. Vergleiche mit anderen etablierteren und meist deutlich kostengünstigeren Therapieverfahren relativieren jedoch diese erfreulichen Ergebnisse. In einer kürzlich vorgestellten prospektiv randomisierten Studie wurden erstmals die Ergebnisse einfacher knochenmarkstimulierender Verfahren mit denen der autologen Chondrozytentransplantation verglichen [100]. Dabei wurden keine histologischen Unterschiede im Reparaturgewebe der beiden Verfahren beobachtet. Klinisch konnten jedoch bei einem Follow-up bis 2 Jahre nach der Operation durch die Microfracture-Technik signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden als nach ACT.

4.4.1 Vergleich zwischen autologer Chondrozytentransplantation und autologer osteochondraler Transplantation

Vergleiche zwischen der ACT und der autologen osteochondralen Transplantation ergeben bisher kein einheitliches Bild. BENTLEY et al. beobachteten 100 Patienten nach ACT bzw. Mosaikplastik über einen Zeitraum von durchschnittlich 19 Monaten. Dabei wurden die Ergebnisse von 88% der Patienten nach ACT als gut oder sehr gut bewertet. Nach Mosaikplastik konnte dieses Ergebnis nur bei 69% der Patienten erreicht werden [9]. HORAS et al. konnten bei den von ihnen untersuchten 40 Patienten 2 Jahre nach der Operation keinen klinischen Unterschied zwischen ACT und autologer

osteochondraler Transplantation feststellen. Allerdings trat die klinische Verbesserung nach ACT im Vergleich zur osteochondralen Transplantation verzögert auf. Histologisch wurde bei diesem Verfahren hyaliner Knorpel im Defekt nachgewiesen, während der Defekt nach ACT vornehmlich mit Faserknorpel gefüllt war. Die Autoren würden daher die osteochondrale Transplantation gegenüber der autologen Chondrozytentransplantation bevorzugen [80,81,172]. BREINAN et al. konnten dagegen bei einem Vergleich der ACT mit unbehandelten Leerdefekten beim Hund keinen positiven Effekt der Therapie beobachten, die Ergebnisse der ACT entsprachen denen der Leerkontrollen [18].

Selbst BRITTEBERG schreibt inzwischen bei der Bewertung der autologen Chondrozytentransplantation, dass bei der Therapie von Knorpeldefekten „das letztendliche Ziel die vollständige Defektausfüllung mit hyalinem Knorpel ist, während wir in unseren Biopsien allenfalls hyalinartigen Knorpel fanden. ... Es muss darauf hingewiesen werden, dass die autogene Chondrozytentransplantation nur eine von verschiedenen Methoden ist und sich im Vergleich mit diesen nicht als besser erwiesen hat.“ [157].

4.5 Beantwortung der Fragen aus der Problemstellung

Wie heilt der knöcherne Anteil des Transplantats im Verlauf eines Jahres in den Defekt ein?

Bereits zwei Wochen nach der Transplantation sind einzelne Knochenbrücken zwischen Transplantat und Transplantatbett nachweisbar. Osteoblasten und Osteoklasten sind dabei, den knöchernen Transplantatzylinder in die Umgebung zu integrieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Zylinder bereits 8 Wochen nach der Operation stabil in seiner Umgebung verankert ist. 26 Wochen postoperativ kann die Osteointegration des Transplantats als abgeschlossen bewertet werden. Die Transplantation mittels *press-fit*-Technik hat eine stabile Verankerung und eine sichere knöcherne Einheilung gewährleistet.

Welches Anwachsverhalten zeigt der knorpelige Anteil des Transplantats im Verlauf eines Jahres? Kommt es am Rand des Defekts zu einer kontinuierlichen Verbindung zwischen dem Knorpel des Transplantats und der Umgebung?

Ab einem postoperativen Zeitraum von 8 Wochen nach der Transplantation zeigen sich zunehmend histologische Veränderungen, die als Zeichen einer knorpeligen Einheilung des Transplantats interpretiert werden können. Vorausgesetzt, es besteht direkter Kontakt zwischen den Rändern des Knorpels von Femurkondylus und Transplantat, scheint es zu einer gegenseitigen Integration der Grundsubstanzen der beiden Knorpelanteile zu kommen. Es ist zu vermuten, dass Typ II Kollagenfasern den ehemaligen Spaltraum überbrücken. Bereits 26 Wochen nach der Transplantation ist in den meisten Präparaten eine stabile Einheilung anzunehmen.

Welche Veränderung zeigt der Knorpel des Transplantats im Verlauf eines Jahres? Sind Anzeichen einer Degeneration vorhanden?

In der Mehrzahl der untersuchten Präparate füllt der transplantierte Knorpel nach einem Jahr den Defekt sicher aus. In einigen Präparaten unterscheidet

sich der Transplantatknorpel zu diesem Zeitpunkt kaum von vitalem hyalinem Gelenkknorpel. Von der 2-Wochen-Kohorte an zeigen sich jedoch auch Veränderungen des transplantierten Knorpels. In einzelnen Präparaten aller Kohorten ist eine Verminderung der Zahl anfärbarer Zellkerne und eine verringerte Anfärbbarkeit mit Toluidinblau entsprechend einer verminderten Konzentration von Glykosaminoglykanen zu beobachten. Einzelne Präparate zeigen sogar tiefe Fissuren, die den Knorpel durchziehen und seine Stabilität gefährden. Diese Veränderungen könnten durch eine insuffiziente Kühlung während der Transplantatentnahme bei einem verhältnismäßig kleinen Durchmesser der Transplantate ausgelöst worden sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eines der derzeit am häufigsten mit dem Ziel einer Heilung eingesetzten Therapieverfahren für Gelenkknorpeldefekte ist die autologe osteochondrale Transplantation (AOT). Bei diesem Operationsverfahren wird ein Knorpel-Knochen-Zylinder aus einer minderbelasteten Stelle des Gelenks entnommen und in den Defekt transplantiert. Um die langfristigen Veränderungen des Knorpels nach der Transplantation besser zu verstehen, wurde eine AOT an den Kniegelenken von 14 Göttinger Minipigs durchgeführt. Jeweils ein Teil der Tiere wurde nach 2, 8, 26 und 52 Wochen getötet. Die Kniegelenke wurden anschließend radiologisch und histologisch untersucht, zudem wurden immunhistologische Färbungen für die Kollagentypen I und II durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die verwendete *press-fit*-Technik eine stabile knöcherne Verankerung des Transplantats gewährleistet und zu einer sicheren Osteointegration führt, die nach 26 Wochen als abgeschlossen bewertet werden kann. Auch knorpelig lässt das histologische Bild nach 26 Wochen eine Integration der Grundsubstanz des Transplantats in den Knorpel des Transplantatbetts vermuten. Kollagenfasern des Typs II scheinen den ehemaligen Spalt zu überbrücken. Der transplantierte Knorpel füllt in der Mehrzahl der Präparate den ehemaligen Defekt auch noch nach 52 Wochen stabil aus. In 25% (2 von 8) der Präparate unterscheidet sich der Transplantatknorpel zu diesem Zeitpunkt kaum von vitalem hyalinem Gelenkknorpel. Es zeigen sich jedoch in einigen Präparaten auch Veränderungen des transplantierten Knorpels. Diese reichen von einer Verminderung anfärbbarer Zellkerne und einer geringeren Konzentration von Glykosaminoglykanen bis zu tiefen Fissuren, die den Knorpel durchziehen und seine Stabilität gefährden. Als mögliche Ursache dieser Veränderungen kommt eine insuffiziente Kühlung der Hohlfräse während der Transplantatentnahme bei einem verhältnismäßig kleinen Durchmesser der Transplantate in Betracht.

Es konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren eine gute Möglichkeit der Therapie chondraler Defekte darstellt. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine mögliche Schwachstelle in der Entnahme osteochondraler Zylinder mit einem Durchmesser von unter 10 mm mit Hilfe einer Hohlfräse liegt.

LITERATUR

1. Amis AA: **Evaluating the healing of articular cartilage defects.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A**: 1591-1592.
2. Angermann P, Riegels-Nielsen P, Pedersen H: **Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation. Poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years.** *Acta Orthop Scand* 1998, **69**: 595-597.
3. Asselmeier MA, Caspari RB, Bottenfield S: **A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus.** *Am J Sports Med* 1993, **21**: 170-175.
4. Attmanspacher W, Dittrich V, Stedtfeld HW: **Erfahrungen in der arthroskopischen Therapie von chondralen und osteochondralen Defekten am Kniegelenk mit dem OATS.** *Zentralbl Chir* 2000, **125**: 494-499.
5. Barber FA, Chow JC: **Arthroscopic osteochondral transplantation: Histologic results.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 832-835.
6. Baumgaertner MR, Cannon WD, Jr., Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC: **Arthroscopic debridement of the arthritic knee.** *Clin Orthop* 1990, 197-202.
7. Benninghoff A: **Der funktionelle Bau des Hyalinknorpels.** *Ergebn Anat Entw Gesch* 1925, **26**: 1-54.
8. Bentley G: **Grafts and implants for cartilage repair and replacement.** *Critical reviews in biocompatibility* 1989, **5**: 245-267.
9. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM *et al.*: **A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee.** *J Bone Joint Surg Br* 2003, **85**: 223-230.
10. Benya PD, Shaffer JD: **Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.** *Cell* 1982, **30**: 215-224.
11. Blevins FT, Steadman JR, Rodrigo JJ, Silliman J: **Treatment of articular cartilage defects in athletes: an analysis of functional outcome and lesion appearance.** *Orthopedics* 1998, **21**: 761-767.
12. Bobic V: **Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen.** *Orthopäde* 1999, **28**: 19-25.
13. Bouwmeester P, Kuijer R, Terwindt-Rouwenhorst E, van der LT, Bulstra S: **Histological and biochemical evaluation of perichondrial transplants in human articular cartilage defects.** *J Orthop Res* 1999, **17**: 843-849.
14. Bouwmeester PS, Kuijer R, Homminga GN, Bulstra SK, Geesink RG: **A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery.** *J Orthop Res* 2002, **20**: 267-273.
15. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, van der Linden AJ, Bulstra SK: **Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee.** *Int Orthop* 1997, **21**: 313-317.
16. Breinan HA, Hsu HP, Spector M: **Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines.** *Clin Orthop* 2001, S219-S230.
17. Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, Spector M: **Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes.** *J Orthop Res* 2000, **18**: 781-789.

18. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M: **Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model.** *J Bone Joint Surg Am* 1997, **79**: 1439-1451.
19. Briggs TW, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M: **Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee.** *J Bone Joint Surg Br* 2003, **85**: 1077-1083.
20. Brittberg M: **Die Transplantation autogener Knorpelzellen in Gelenkflächendefekte des Kniegelenks.** *Operat Orthop Traumatol* 2001, **13**: 198-207.
21. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** *N Engl J Med* 1994, **331**: 889-895.
22. Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A: **Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 3**: 109-115.
23. Broom ND, Poole CA: **Articular cartilage collagen and proteoglycans. Their functional interdependency.** *Arthritis Rheum* 1983, **26**: 1111-1119.
24. Bruns J, Behrens P: **Die Transplantation von autogenem Rippenperichondrium zur Behandlung von tiefen Gelenkknorpeldefekten.** In *Knieinstabilität-Knorpelschaden*. Edited by Imhoff AB, Burkart A. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 1998:82-88.
25. Bruns J, Steinhagen J: **Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten.** *Orthopäde* 1999, **28**: 52-60.
26. Buck BE, Malinin TI: **Human bone and tissue allografts. Preparation and safety.** *Clin Orthop* 1994, 8-17.
27. Buck BE, Resnick L, Shah SM, Malinin TI: **Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation.** *Clin Orthop* 1990, 249-253.
28. Buckwalter J, Coutts R, Hunziker EB, Mow VC: **Breakout Session 3: Articular Cartilage.** *Clin Orthop* 1999, **367S**: S239-S243.
29. Buckwalter JA: **The fine structure of the human intervertebral disc.** In *The American Academy of Orthopaedic Surgeons: Symposium on Idiopathic Low Back Pain*. Edited by White AA, Gordon SL. St. Louis, Mosby; 1982:108-143.
30. Buckwalter JA: **Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**: 13-15.
31. Buckwalter JA: **Articular cartilage injuries.** *Clin Orthop* 2002, 21-37.
32. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.** *Instr Course Lect* 1998, **47**: 487-504.
33. Buckwalter JA, Pita JC, Muller FJ, Nessler J: **Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates.** *J Orthop Res* 1994, **12**: 144-148.
34. Bulstra SK, Homminga GN, Buurman WA, Terwindt-Rouwenhorst E, van der Linden AJ: **The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro.** *J Orthop Res* 1990, **8**: 328-335.

35. Burgeson RE, Nimni ME: **Collagen types. Molecular structure and tissue distribution.** *Clin Orthop* 1992, 250-272.
36. Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB: **Operative Therapiemöglichkeiten des Knorpelschadens.** *Unfallchirurg* 2001, **104**: 798-807.
37. Caplan AI: **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 1991, **9**: 641-650.
38. Caplan AI, Fiszman MY, Eppenberger HM: **Molecular and cell isoforms during development.** *Science* 1983, **221**: 921-927.
39. Carlson ER, Marx RE, Buck BE: **The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995, **80**: 17-23.
40. Chang RW, Falconer J, Stulberg SD, Arnold WJ, Manheim LM, Dyer AR: **A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**: 289-296.
41. Chow JC, Hantes ME, Houle JB, Zalavras CG: **Arthroscopic autogenous osteochondral transplantation for treating knee cartilage defects: a 2- to 5-year follow-up study.** *Arthroscopy* 2004, **20**: 681-690.
42. Clark JM: **The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage.** *J Anat* 1990, **171**: 117-130.
43. Colwell CW, Jr., D'Lima DD, Hoenecke HR, Fronek J, Pulido P, Morris BA *et al.*: **In vivo changes after mechanical injury.** *Clin Orthop* 2001, S116-S123.
44. Convery FR, Akeson WH, Keown GH: **The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses.** *Clin Orthop* 1972, **82**: 253-262.
45. Cooper C, Inskip H, Croft P, Campbell L, Smith G, McLaren M *et al.*: **Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity.** *Am J Epidemiol* 1998, **147**: 516-522.
46. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH: **The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease.** *J Mol Med* 1998, **76**: 275-288.
47. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Jr., Lotz MK: **Impact of mechanical trauma on matrix and cells.** *Clin Orthop* 2001, S90-S99.
48. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW, Jr.: **Cartilage injury induces chondrocyte apoptosis.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A Suppl 2**: 19-21.
49. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW, Jr.: **In vitro and in vivo models of cartilage injury.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A Suppl 2**: 22-24.
50. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW, Jr.: **Prevention of chondrocyte apoptosis.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A Suppl 2**: 25-26.
51. Dallek M, Meenen NM, Jungbluth KH: **Zum Verhalten künstlich erzeugter Epiphysenfugendefekte, Teil 3: Transplantation von autologem und homologem Rippenknorpel beim Göttinger Miniaturschwein.** *Unfallchirurgie* 1995, **21**: 219-226.
52. Degreif J: **Welche Behandlung zur Knorpelregeneration ist bei Arthrose sinnvoll?** *Dtsch Med Wochenschr* 2003, **128**: 1674.

53. Dervin GF, Stiell IG, Rody K, Grabowski J: **Effect of arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee on health-related quality of life.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A**: 10-19.
54. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS: **Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature.** *J Oral Maxillofac Surg* 1995, **53**: 924-929.
55. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS: **The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the literature.** *J Oral Maxillofac Surg* 1995, **53**: 1182-1192.
56. Draenert K, Draenert Y: **A new procedure for bone biopsies and cartilage and bone transplantation.** *Sandorama* 1987, **3**: 254-269.
57. Duchow J, Kohn D: **Die Behandlung der beginnenden Gonarthrose im mittleren Lebensalter.** *Orthopäde* 2003, **32**: 920-929.
58. Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L: **Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology.** *Arch Orthop Trauma Surg* 1981, **99**: 59-64.
59. Erggelet C, Browne JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Mosely JB: **Die autologe Chondrozyten-Transplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenkes. Klinische Ergebnisse.** *Zentralbl Chir* 2000, **125**: 516-522.
60. Evans PJ, Miniaci A, Hurtig MB: **Manual punch versus power harvesting of osteochondral grafts.** *Arthroscopy* 2004, **20**: 306-310.
61. Felson DT, Buckwalter J: **Debridement and lavage for osteoarthritis of the knee.** *N Engl J Med* 2002, **347**: 132-133.
62. Felson DT, Zhang Y: **An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 1343-1355.
63. Friederich NF: **Autologe Knorpeltransplantation - Zukunft der Arthrotherapie?** *Schweiz Rundsch Med Prax* 1998, **87**: 399-402.
64. Fuller JA, Ghadially FN: **Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage.** *Clin Orthop* 1972, **86**: 193-205.
65. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ: **Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee.** *J Bone Joint Surg Am* 1980, **62**: 79-89.
66. Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, Schneider U, Marlovits S, Anders J *et al.*: **Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion.** *Dtsch Arztebl* 4 A.D., **100**: A 2448-A 2453.
67. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ: **Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis.** *Ann Intern Med* 2000, **133**: 321-328.
68. Ghadially FN, Thomas I, Oryschak AF, Lalonde JM: **Long-term results of superficial defects in articular cartilage: a scanning electron-microscope study.** *J Pathol* 1977, **121**: 213-217.

69. Gillogly SD: **Treatment of large full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation.** *Arthroscopy* 2003, **19 Suppl 1**: 147-153.
70. Gotterbarm T, Reitzel T, Schneider U, Voss HJ, Stofft E, Breusch SJ: **Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen. Eine tierexperimentelle Untersuchung am Göttinger Minipig.** *Orthopäde* 2003, **32**: 65-73.
71. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M: **The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation.** *J Orthop Res* 1989, **7**: 208-218.
72. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G: **Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle.** *Clin Orthop* 2001, S328-S336.
73. Hangody L, Fules P: **Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 2**: 25-32.
74. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I: **Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997, **5**: 262-267.
75. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M: **Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice.** *Orthopedics* 1998, **21**: 751-756.
76. Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L: **Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique.** *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86-A Suppl 1**: 65-72.
77. Hembry RM, Dyce J, Driesang I, Hunziker EB, Fosang AJ, Tyler JA *et al.*: **Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A**: 826-838.
78. Hesse W, Tscherne H, Hesse I: **Über die Einheilung nicht konservierter homologer Gelenkknorpeltransplantate im Experiment.** *Chir Forum Exp Klin Forsch* 1979, 193-197.
79. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ: **Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee.** *J Bone Joint Surg Br* 1990, **72**: 1003-1007.
80. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R: **Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A**: 185-192.
81. Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T: **Knorpelknochentransplantation versus autogene Chondrocytentransplantation. Eine prospektive vergleichende klinische Studie.** *Chirurg* 2000, **71**: 1090-1097.

82. Hunt N, Sanchez-Ballester J, Pandit R, Thomas R, Strachan R: **Chondral lesions of the knee: A new localization method and correlation with associated pathology.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 481-490.
83. Hunter W: **On the structure and diseases of articulating cartilages.** *Philos Trans R Soc London* 1743, **42B**: 514-521.
84. Hunziker EB: **Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**: 22-32.
85. Hunziker EB, Kapfinger E: **Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells.** *J Bone Joint Surg Br* 1998, **80**: 144-150.
86. Hunziker EB, Quinn TM: **Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 2**: 85-92.
87. Hunziker EB, Rosenberg LC: **Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane.** *J Bone Joint Surg Am* 1996, **78**: 721-733.
88. Imhoff AB, Öttl GM, Burkart A, Traub S: **Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken.** *Orthopäde* 1999, **28**: 33-44.
89. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM: **Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A**: 53-64.
90. Jackson DW, Simon TM, Aberman HM: **Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium.** *Clin Orthop* 2001, S14-S25.
91. Jackson RW, Dieterichs C: **The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up.** *Arthroscopy* 2003, **19**: 13-20.
92. Jakob RP, Franz T, Gautier E, Mainil-Varlet P: **Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections.** *Clin Orthop* 2002, 170-184.
93. Jeffery AK, Blunn GW, Archer CW, Bentley G: **Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage.** *J Bone Joint Surg Br* 1991, **73**: 795-801.
94. Jensen CH, Rofail S: **Knee injury and obesity in patients undergoing total knee replacement: a retrospective study in 115 patients.** *J Orthop Sci* 1999, **4**: 5-7.
95. Junqueira LC, Carneiro J: **Interzellulärsubstanzen.** In *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag; 1996:151-163.
96. Junqueira LC, Carneiro J: **Knorpel.** In *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag; 1996:180-189.
97. Kääh MJ, Gwynn IA, Nötzli HP: **Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species.** *J Anat* 1998, **193 (Pt 1)**: 23-34.

98. Kim HK, Moran ME, Salter RB: **The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits.** *J Bone Joint Surg Am* 1991, **73**: 1301-1315.
99. Kish G, Modis L, Hangody L: **Osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral lesions of the knee and talus in the athlete. Rationale, indications, techniques, and results.** *Clin Sports Med* 1999, **18**: 45-66, vi.
100. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E *et al.*: **Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial.** *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86-A**: 455-464.
101. Koulalis D, Schultz W, Heyden M, Konig F: **Autologous osteochondral grafts in the treatment of cartilage defects of the knee joint.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004, **12**: 329-334.
102. Kühnel W: **Knorpelgewebe.** In *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999:136-141.
103. Lane JG, Massie JB, Ball ST, Amiel ME, Chen AC, Bae WC *et al.*: **Follow-up of osteochondral plug transfers in a goat model: a 6-month study.** *Am J Sports Med* 2004, **32**: 1440-1450.
104. Lane JG, Tontz WL, Jr., Ball ST, Massie JB, Chen AC, Bae WC *et al.*: **A morphologic, biochemical, and biomechanical assessment of short-term effects of osteochondral autograft plug transfer in an animal model.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 856-863.
105. Lang CM: *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über "Das Phänomen der Chondrocytencluster" im pathologisch veränderten Knorpel.* Universität Ulm; 1992.
106. LaPrade RF, Botker JC: **Donor-site morbidity after osteochondral autograft transfer procedures.** *Arthroscopy* 2004, **20**: e69-e73.
107. Laprell H, Petersen W: **Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6-12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint.** *Arch Orthop Trauma Surg* 2001, **121**: 248-253.
108. Lau EC, Cooper C, Lam D, Chan VN, Tsang KK, Sham A: **Factors associated with osteoarthritis of the hip and knee in Hong Kong Chinese: obesity, joint injury, and occupational activities.** *Am J Epidemiol* 2000, **152**: 855-862.
109. Lexer E: **Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operations.** *Surg Gynecol Obstet* 1908, **6**: 601-609.
110. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B *et al.*: **Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis.** *Arch Biochem Biophys* 2000, **381**: 205-212.
111. Lorentzon R, Alfredson H, Hildingsson C: **Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998, **6**: 202-208.
112. Magnuson PB: **Joint débridement. Surgical treatment of degenerative arthritis.** *Surg Gynecol Obstet* 1941, **73**: 1-9.

113. Makino T, Fujioka H, Kurosaka M, Matsui N, Yoshihara H, Tsunoda M *et al.*: **Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 747-751.
114. Makino T, Fujioka H, Yoshiya S, Terukina M, Matsui N, Kurosaka M: **The effect of the small and unstable autologous osteochondral graft on repairing the full-thickness large articular cartilage defect in a rabbit model.** *Kobe J Med Sci* 2002, **48**: 97-104.
115. Malinin GI, Malinin TI: **Microscopic and histochemical manifestations of hyaline cartilage dynamics.** *Progress in histochemistry and cytochemistry* 1999, **34**: 163-242.
116. Mankin HJ: **The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts).** *N Engl J Med* 1974, **291**: 1285-1292.
117. Mankin HJ: **The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts).** *N Engl J Med* 1974, **291**: 1335-1340.
118. Mankin HJ: **The response of articular cartilage to mechanical injury.** *J Bone Joint Surg Am* 1982, **64**: 460-466.
119. Martin JA, Buckwalter JA: **The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 2**: 106-110.
120. Maruyama S, Hasegawa Y, Sakano S, Warashina H, Kitamura S, Yamauchi K *et al.*: **Experimental evaluation of the usefulness of osteochondral allograft for articular cartilage defect.** *J Orthop Sci* 2003, **8**: 560-566.
121. Matsusue Y, Kotake T, Nakagawa Y, Nakamura T: **Arthroscopic osteochondral autograft transplantation for chondral lesion of the tibial plateau of the knee.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 653-659.
122. Meachim G: **The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit.** *J Bone Joint Surg Br* 1963, **45-B**: 150-161.
123. Meenen NM, Rischke B: **Autogene osteochondrale Transplantation (AOT) bei Knorpeldefekten am Femurkondylus.** *Operat Orthop Traumatol* 2003, **15**: 38-56.
124. Meenen NM, Rischke B, Adamietz P, Dauner M, Fink J, Göpfert C *et al.*: **Knorpeldefektbehandlung.** *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998, **115**: 568-576.
125. Messner K, Gillquist J: **Cartilage repair. A critical review.** *Acta Orthop Scand* 1996, **67**: 523-529.
126. Minas T: **Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee.** *Clin Orthop* 2001, S349-S361.
127. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH *et al.*: **A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee.** *N Engl J Med* 2002, **347**: 81-88.
128. Müller B, Kohn D: **Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen Anbohrung nach Pridie.** *Orthopäde* 1999, **28**: 4-10.
129. Nam EK, Makhsous M, Koh J, Bowen M, Nuber G, Zhang LQ: **Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model.** *Am J Sports Med* 2004, **32**: 308-316.
130. Newman AP: **Articular cartilage repair.** *Am J Sports Med* 1998, **26**: 309-324.

131. O'Driscoll SW: **The healing and regeneration of articular cartilage.** *J Bone Joint Surg Am* 1998, **80**: 1795-1812.
132. O'Driscoll SW: **Technical considerations in periosteal grafting for osteochondral injuries.** *Clin Sports Med* 2001, **20**: 379-402, vii.
133. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: **The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.** *J Bone Joint Surg Am* 1986, **68**: 1017-1035.
134. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: **Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year.** *J Bone Joint Surg Am* 1988, **70**: 595-606.
135. O'Driscoll SW, Recklies AD, Poole AR: **Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study.** *J Bone Joint Surg Am* 1994, **76**: 1042-1051.
136. Paget J: **Healing of injuries in various tissues.** *Lectures on surgical pathology* 1853, **1**: 262-291.
137. Pässler HH: **Die Mikrofrakturierung zur Behandlung von Knorpeldefekten.** *Zentralbl Chir* 2000, **125**: 500-504.
138. Paulsen K: **Histologische Untersuchungen über mögliche Hitzeschäden an Knochen und Knorpel beim Bohren und Schleifen.** *Arch Otorhinolaryngol* 1976, **212**: 35-41.
139. Pearce SG, Hurtig MB, Clarnette R, Kalra M, Cowan B, Miniaci A: **An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts.** *Arthroscopy* 2001, **17**: 50-55.
140. Petersen JP, Ruecker A, v.Stechow D, Adamietz P, Poertner R, Rueger JM *et al.*: **Present and future therapies of articular cartilage defects.** *Eur J Trauma* 2003, **29**: 1-10.
141. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A: **Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability.** *Am J Sports Med* 2002, **30**: 2-12.
142. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A: **Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 2**: 17-24.
143. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A: **Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee.** *Clin Orthop* 2000, 212-234.
144. Petrides PE: **Binde- und Stützgewebe.** In *Biochemie und Pathobiochemie.* Edited by Petrides PE, Löffler G. Berlin; Heidelberg; New-York: Springer-Verlag; 1998:733-748.
145. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S: **Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair.** *Clin Orthop* 2001, S26-S33.
146. Pridie KH: **A method of resurfacing osteoarthritic knee joints.** *J Bone Joint Surg Br* 1959, **41-B**: 618-619.

147. Putz R: **Knorpelgewebe.** In *Benninghoff, A.: Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Band I.* Edited by Drenckhahn D, Zenker W. München; Wien; Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1994:160-166.
148. Quinn TM, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD: **Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants.** *J Orthop Res* 1998, **16**: 490-499.
149. Ravaud P, Moulinier L, Giraudeau B, Ayral X, Guerin C, Noel E *et al.*: **Effects of joint lavage and steroid injection in patients with osteoarthritis of the knee: results of a multicenter, randomized, controlled trial.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 475-482.
150. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S: **Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes.** *J Bone Joint Surg Br* 1999, **81**: 1064-1068.
151. Ritsilä VA, Santavirta S, Alhopuro S, Poussa M, Jaroma H, Rubak JM *et al.*: **Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery.** *Clin Orthop* 1994, 259-265.
152. Roberts S, Hollander AP, Caterson B, Menage J, Richardson JB: **Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 2586-2598.
153. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE *et al.*: **Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**: R60-R73.
154. Rubak JM: **Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. An experimental study.** *Acta Orthop Scand* 1982, **53**: 175-180.
155. Rubak JM, Poussa M, Ritsilä V: **Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits.** *Acta Orthop Scand* 1982, **53**: 181-186.
156. Rubak JM, Poussa M, Ritsilä V: **Effects of joint motion on the repair of articular cartilage with free periosteal grafts.** *Acta Orthop Scand* 1982, **53**: 187-191.
157. Rudert M, Brittberg M: **Kommentar zu Mats Brittberg: Die Transplantation autogener Knorpelzellen in Gelenkflächendefekte des Kniegelenks.** *Operat Orthop Traumatol* 2001, **13**: 208-210.
158. Sahlström A, Montgomery F: **Risk analysis of occupational factors influencing the development of arthrosis of the knee.** *Eur J Epidemiol* 1997, **13**: 675-679.
159. Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke RF, McGann LE: **Articular cartilage joint surface reconstruction techniques.** *J Orthop Sci* 1999, **4**: 457-461.
160. Schmidt H, Völkel S: **Zur Charakterisierung der immunologischen Abwehr bei xenogener Transplantation von Knochen und Knorpel.** *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1991, **15**: 129-132.
161. Schöttle PB, Oetl GM, Agneskirchner JD, Imhoff AB: **Operative Therapie von osteochondralen Läsionen am Talus mit autologer Knorpel-Knochen-Transplantation.** *Orthopäde* 2001, **30**: 53-58.

162. Schröder M: *Vergleichende lichtmikroskopische Untersuchungen zur Regeneration von Knorpeldefekten nach PRIDIE- und BECK-Bohrung: Eine experimentelle Studie am Kniegelenk des Kaninchens*. Universität zu Lübeck; 2002.
163. Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ: **Chondral injuries**. *Curr Opin Rheumatol* 2002, **14**: 134-141.
164. Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, Atasoy E: **Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand**. *J Hand Surg [Am]* 1984, **9**: 880-886.
165. Shamis LD, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S: **Effect of subchondral drilling on repair of partial-thickness cartilage defects of third carpal bones in horses**. *Am J Vet Res* 1989, **50**: 290-295.
166. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ: **Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage**. *J Bone Joint Surg Am* 1993, **75**: 532-553.
167. Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C: **Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten – Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafmodell**. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2001, **139**: 382-386.
168. Silver FH, Glasgold AI: **Cartilage wound healing. An overview**. *Otolaryngol Clin North Am* 1995, **28**: 847-864.
169. Skoog T, Johansson SH: **The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts**. *Plast Reconstr Surg* 1976, **57**: 1-6.
170. Skoog T, Ohlsen L, Sohn SA: **Perichondrial potential for cartilagenous regeneration**. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972, **6**: 123-125.
171. Sledge SL: **Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries**. *Clin Sports Med* 2001, **20**: 365-377.
172. Smith GD, Richardson JB, Brittberg M, Erggelet C, Verdonk R, Knutsen G *et al.*: **Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint**. *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A**: 2487-2488.
173. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI: **Cartilage regeneration using principles of tissue engineering**. *Clin Orthop* 2001, S161-S170.
174. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG: **Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up**. *Arthroscopy* 2003, **19**: 477-484.
175. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ: **Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk**. *Orthopäde* 1999, **28**: 26-32.
176. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ: **Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects**. *Clin Orthop* 2001, S362-S369.
177. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK: **Microfracture technique for full-thickness chondral defects. Technique and clinical results**. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997, **7**: 300-304.
178. Störig E: **Knorpeltransplantation im Tierexperiment und Erfahrungen über ihre klinische Anwendung**. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1972, **110**: 685-690.

179. Temenoff JS, Mikos AG: **Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage.** *Biomaterials* 2000, **21**: 431-440.
180. Teshima R, Otsuka T, Takasu N, Yamagata N, Yamamoto K: **Structure of the most superficial layer of articular cartilage.** *J Bone Joint Surg Br* 1995, **77**: 460-464.
181. Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Archer CW: **The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 215-225.
182. Thompson RC, Jr.: **An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint.** *Clin Orthop* 1975, 239-248.
183. Triantafillopoulos IK, Papagelopoulos PJ, Politi PK, Nikiforidis PA: **Articular changes in experimentally induced patellar trauma.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002, **10**: 144-153.
184. Wagner H: **Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation.** *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1972, **110**: 705-708.
185. Wang CJ: **Treatment of focal articular cartilage lesions of the knee with autogenous osteochondral grafts. A 2- to 4-year follow-up study.** *Arch Orthop Trauma Surg* 2002, **122**: 169-172.
186. Wang CJ, Chen CY, Tsung SM, Chen WJ, Huang HY: **Cartilage repair by free periosteal grafts in the knees of pigs: a histologic study.** *J Formos Med Assoc* 2000, **99**: 324-329.
187. Werner A, Fuß M, Krauspe R: **Operative gelenkerhaltende Verfahren bei Gelenkknorpelschäden. Knorpel induzierende Techniken und Knorpeltransplantation.** *Dtsch Arztebl* 2003, **100**: C442-C447.
188. Wirth T, Rauch G, Schuler P, Griss P: **Das autologe Knorpel-Knochen-Transplantat zur Therapie der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenks.** *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1991, **129**: 80-84.
189. Ye J, Haro H, Takahashi M, Kuroda H, Shinomiya K: **Induction of apoptosis of articular chondrocytes and suppression of articular cartilage proteoglycan synthesis by heat shock.** *J Orthop Sci* 2003, **8**: 387-395.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----|---|
| GAG | Glykosaminoglykan |
| AOT | Autologe Osteochondrale Transplantation |
| ACT | Autologe Chondrozytentransplantation |

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Norbert M. Meenen für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Erstellung der Arbeit bedanken. Ebenso danke ich besonders Herrn Dr. Jan-Philipp Petersen für die intensive Betreuung und Hilfe während der experimentellen Arbeit und die vielen Ratschläge bei der schriftlichen Anfertigung der Dissertation.

Außerdem danke ich sehr:

- Herrn Dr. Jens Schröder, für seine engagierte Mitarbeit als Operateur
- Herrn Dr. Alexander Stork, für seine große Unterstützung bei der Durchführung der magnetresonanztomographischen Untersuchungen und der Befundung der radiologischen Ergebnisse
- Frau C. Müldner, Frau O. Winter und Frau M. Dietzmann, für viele Ratschläge und ihre tatkräftige Hilfe im histologischen Labor
- Frau Dipl. Biol. Chr. Göpfert, für ihre große Hilfe in letzter Minute bei den immunhistologischen Analysen
- Meiner Freundin Katrin Kieser, für ihr Verständnis und ihre Geduld und ihre große seelische und tatkräftige Unterstützung während der letzten Jahre
- Meinen Eltern und meiner Schwester, für ihr ständiges Interesse und ihre Unterstützung; und besonders meiner Mutter, für ihren großen Einsatz bei der schriftlichen Erstellung der Dissertation

LEBENS LAUF

| | |
|-------------|--|
| 11.1.1979 | Geboren in Hamburg |
| 1983-1989 | Goethe-Grundschule, Quickborn |
| 1989-1998 | Elsensee-Gymnasium, Quickborn (Abitur 6/98) |
| 8/98 – 9/99 | Zivildienst beim Rettungsdienst des Kreises Pinneberg |
| Seit 10/99 | Medizinstudium an der Universität Hamburg |
| 8/01 | Ärztliche Vorprüfung |
| 3/03 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 3/05 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Hamburg, den 15.06.2005

Klaus Baumbach

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 15.06.2005

Klaus Baumbach